

**Interaktionen zwischen  
humanen neutrophilen Granulozyten und  
*Staphylococcus aureus* menschlichen und tierischen  
Ursprungs**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades ( Dr. rer. nat.) der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
**Thomas Schmidt**  
aus Siegen

Bonn, März 2012

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich Wilhelms-Universität Bonn.

Die vorliegende Arbeit wurde am Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Norbert Schnitzler (Universität Aachen)
2. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Georg Sahl (Universität Bonn)

Erscheinungsjahr: 2012

Tag der Promotionsprüfung: 19.06.2012

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.</b>	<b>Das Immunsystem des Menschen.....</b>	<b>1</b>
1.1	Granulozyten .....	3
1.2	Neutrophile Granulozyten .....	3
1.2.1	Homöostase: Entstehung und Abbau.....	3
1.2.2	Einwanderung ins Gewebe - Transmigration und Chemotaxis.....	5
1.2.3	Interaktion mit Krankheitserregern .....	7
<b>2.</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i> .....</b>	<b>10</b>
2.1	Struktur und Aufbau .....	10
2.2	Epidemiologie und Pathogenese.....	11
2.3	Resistenzmechanismen und Virulenzfaktoren.....	13
2.4	Zoonosen .....	18
<b>3.</b>	<b>Bedeutung von Neutrophilen Granulozyten in <i>Staphylococcus aureus</i>- Infektionen .....</b>	<b>19</b>
3.1	Klinisches Syndrom der Gram-positiven Sepsis .....	20
3.1.1	Dysfunktion der neutrophilen Granulozyten .....	21
<b>II</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>23</b>
<b>III</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>25</b>
<b>1.</b>	<b>Material .....</b>	<b>25</b>
1.1	Geräte.....	25
1.2	Verbrauchsmaterial.....	26
1.3	Medien zur Kultivierung von prokaryontischen und eukaryontischen Zellen .....	27
1.4	Sonstige Reagenzien.....	27
1.5	Kits .....	28
1.6	Antikörper.....	28
1.6.1	Erstantikörper und direkt konjugierte Antikörper .....	28

1.6.2	Zweit-Antikörper .....	28
1.6.3	Isotypkontrollen und G-Protein-Block .....	29
1.7	Rezeptorantagonisten.....	29
1.8	Verwendete Mikroorganismen .....	29
<b>2.</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>30</b>
2.1	Molekularbiologische Methoden.....	30
2.1.1	Bestimmung des spa- und Sequenztyps .....	30
2.1.2	Micro-Array-Analyse der verwendeten Stämme.....	30
2.2	Mikrobiologische Methoden.....	30
2.2.1	Kultivierung der Mikroorganismen .....	30
2.2.2	Wachstumsanalyse der verwendeten <i>S. aureus</i> -Stämme.....	31
2.2.3	Gewinnung von bakteriellem Überstand .....	31
2.2.4	Ermittlung des mittleren corpuskulären Volumens der bakteriellen Einzelkolonien in Flüssigkultur.....	32
2.2.5	Epsilometer-Test (E-Test) .....	32
2.2.6	Ermittlung der Fibrinogen-Bindungskapazität .....	32
2.3	Proteinbiochemische Methoden .....	33
2.3.1	Analyse des Exoproteinprofils mittels SDS-Gelelektrophorese.....	33
2.3.2	Nachweis und Konzentrationsbestimmung des „Chemotactic-Inhibiting Protein“ (CHIPS) im bakteriellen Überstand mittels ELISA .....	33
2.3.3	Nachweis und relative Konzentrationsbestimmung des $\alpha$ -Hemolysin im bakteriellen Überstand mittels ELISA.....	34
2.3.4	Nachweis und Konzentrationsbestimmung des bakteriellen Enzyms Staphylokinase im bakteriellen Überstand .....	34
2.4	Zellbiologische Methoden und Durchflusszytometrie .....	35
2.4.1	Blutabnahme .....	35
2.4.2	Isolierung von neutrophilen Granulozyten aus Vollblut .....	36
2.4.3	Plasmaentfernung aus Vollblut.....	36
2.4.4	Vorbereitung der Proben für das Durchflusszytometer.....	37
2.5	Interaktionsassays <i>S. aureus</i> / neutrophile Granulozyten.....	37
2.5.1	Chemotaxis .....	37
2.5.2	Killing von <i>S. aureus</i> durch neutrophile Granulozyten.....	40
2.5.3	Lyse der neutrophilen Granulozyten durch bakteriellen Überstand.....	41

2.5.4	Zytokinfreisetzung und Hämolyse im Vollblut nach Inkubation mit bakteriellem Überstand.....	41
2.5.5	Messung der Lactoferrinkonzentration im Vollblut nach Inkubation mit bakteriellem Überstand und anderen Stimulanzen.....	42
2.5.6	Aktivierung von neutrophilen Granulozyten durch bakteriellen Überstand .....	42
2.6	Statistik.....	46
<b>IV</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>47</b>
<b>1.</b>	<b>Charakterisierung der <i>S. aureus</i>-Stämme.....</b>	<b>47</b>
1.1	Wachstumsanalyse der verwendeten <i>S. aureus</i> -Stämme.....	47
1.2	DNA-Micro-Array.....	48
1.3	Epsilon-Meter-Test (E-Test) .....	50
1.4	Ermittlung des mittleren corpuskulären Volumens der bakteriellen Einzelzellen bzw. Konglomerate.....	50
1.5	Ermittlung der Fibrinogen-Bindungskapazität .....	52
1.6	Analysen auf Proteinebene .....	52
1.6.1	Analyse des Exoproteinprofils.....	52
1.6.2	Nachweis und Konzentrationsbestimmung des „Chemotactic-Inhibiting Protein“ (CHIPS) im bakteriellen Überstand.....	55
1.6.3	Nachweis und Konzentrationsbestimmung des bakteriellen Enzyms Staphylokinase im bakteriellen Überstand .....	56
1.6.4	Nachweis und relative Konzentrationsbestimmung des $\alpha$ -Hemolysin im bakteriellen Überstand.....	57
1.7	Interaktionen mit dem menschlichen Immunsystem insbesondere mit humanen neutrophilen Granulozyten .....	58
1.7.1	Serumaktivierung und Chemotaxis .....	58
1.7.2	Killing von <i>S. aureus</i> durch neutrophile Granulozyten.....	59
1.7.3	Lyse der neutrophilen Granulozyten durch bakteriellen Überstand.....	60
1.7.4	Hämolyse im Vollblut nach Inkubation mit bakteriellem Überstand.....	62
1.7.5	Zytokinfreisetzung im Vollblut nach Inkubation mit bakteriellem Überstand.....	63
<b>2.</b>	<b>Aktivierung von neutrophilen Granulozyten nach der Inkubation mit bakteriellem Überstand .....</b>	<b>65</b>

2.1	CD66b und CD11b-Expression.....	65
2.2	Ergebnispool der CD66b und CD11b-Expression .....	67
2.3	CD11a/CD11b/CD11c-Expression.....	68
2.4	Kinetik der CD66b/CD11b/CD18/CD62L-Expression.....	70
2.5	Korrelation von CD66b-Expression und Lactoferrin-Freisetzung .....	71
2.6	Bestimmung der Anzahl von homo- und heterotypischen Dubletten sowie größeren Zellaggregaten .....	72
2.7	Fotographische Dokumentation der CD66b/CD11b-Rezeptorexpression .....	74
2.7.1	Fotographische Dokumentation der CD66b/CD11b/CD18 Rezeptorexpression im ImageStream <sup>X</sup> .....	74
2.7.2	Fotographische Dokumentation der CD66b/CD11b Rezeptorexpression auf Zellaggregaten im LSM 780.....	76
2.8	Kinetik der Dublettenbildung und Vergleich der CD66b/CD11b-Rezeptorexpression mit Einzelzellen .....	78
2.9	CD11b-Expression und Aggregatbildung nach Inkubation mit kreuzvernetzendem CD66b-Antikörper.....	80
2.10	CD66b und CD11b-Expression auf isolierten neutrophilen Granulozyten.....	81
2.11	Vergleich der zellulären Blutparameter vor und nach Plasmaersatz .....	82
2.12	CD66b/CD11b-Expression und Aggregatbildung nach Plasmaersatz .....	83
2.13	CD66b/CD11b-Expression und Aggregatbildung nach Vorinkubation mit den C5aR1-Antagonisten W-54011 .....	85
<b>V</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>87</b>
<b>1.</b>	<b>Charakterisierung der <i>S. aureus</i>-Stämme.....</b>	<b>87</b>
<b>2.</b>	<b>Aktivierung von neutrophilen Granulozyten nach der Inkubation mit bakteriellem Überstand .....</b>	<b>99</b>
<b>VI</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>109</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>111</b>
	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>133</b>

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>138</b>
<b>ANHANG</b> .....	<b>141</b>
<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b> .....	<b>157</b>

# I Einleitung

## 1. Das Immunsystem des Menschen

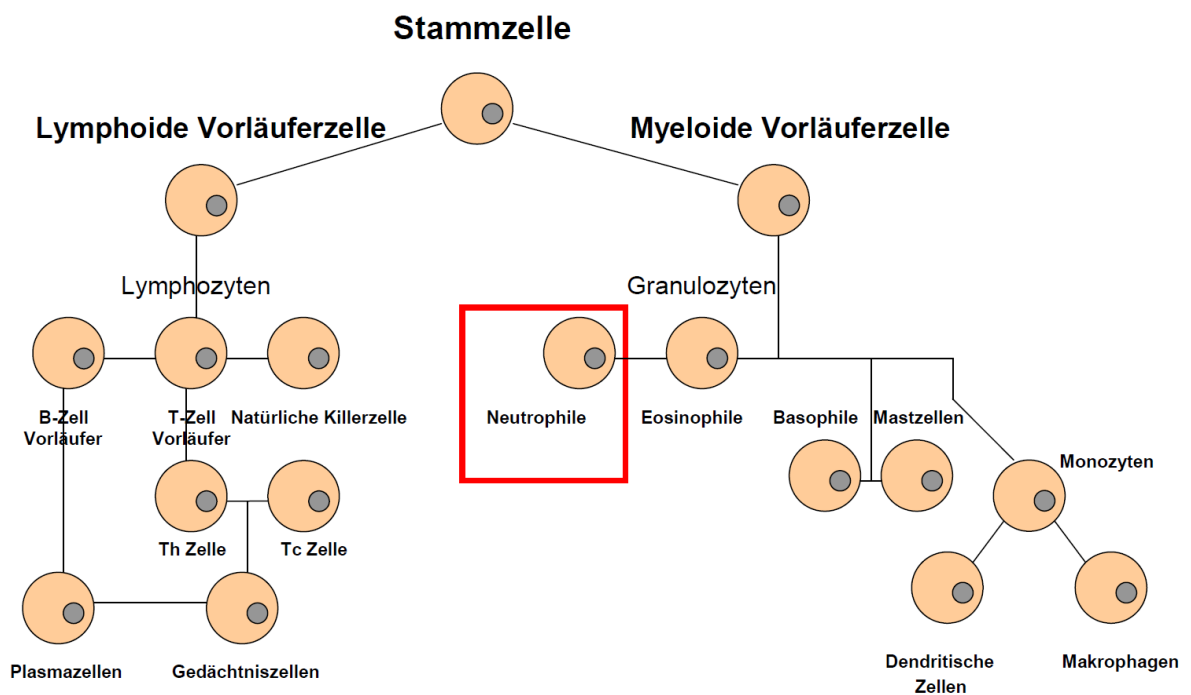
Das Immunsystem des Menschen ist ein zentraler Bestandteil des Organismus. Es dient in erster Linie als eine Art Schutzschild vor externen Pathogenen wie Bakterien und Viren, spielt aber auch bei der Beseitigung von zerstörten und entarteten Körperzellen eine wichtige Rolle. Die einzelnen Immunkomponenten setzen sich aus vielen verschiedenen Zellarten zusammen, die in einem komplexen Netzwerk miteinander verknüpft sind. Im klassischen Sinne lässt sich das Immunsystem in zwei Hauptbestandteile, die angeborene und adaptive Immunität unterteilen. Dabei handelt es sich, wie der Name besagt, einmal um eine angeborene Komponente, die unabhängig von der Art des Pathogens unmittelbar nach dem Eindringen des Erregers in den Körper aktiviert wird, und somit eine sehr schnelle Abwehrreaktion möglich macht, was wiederum eine potenzielle Ausbreitung des Krankheitserregers im Körperinneren verhindern soll. Die adaptive oder erworbene Immunantwort, zu der auch die Antikörperproduktion zählt, ist in ihrer Ausprägung dann deutlich langsamer, wenn es sich um einen Erstkontakt mit dem Pathogen handelt. Sie besitzt aber die Fähigkeit sich im Laufe des Lebens immer weiterzuentwickeln, und sich so auf veränderte Umweltfaktoren einzustellen. Dieses sich ständig selbst modifizierende System, das gezielt eine Immunität gegen hochspezifische Pathogenstrukturen so genannte Epitope induzieren kann, gilt als ein zentraler Faktor in der Evolution der Vertebraten. Diese beiden Systeme, die sich gegenseitig ergänzen, bilden die Grundlage des menschlichen Immunsystems. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass das traditionelle Bild von zwei separaten Einheiten immer mehr verschwimmt, da mehr und mehr direkte Interaktionen zwischen beiden Systemen nachgewiesen werden, so dass diese strikte Trennung im klassischen Sinne nicht mehr aufrechterhalten werden kann.

Alle zellulären Komponenten des Immunsystems haben ihren Ursprung im Knochenmark, wo sie sich aus hämatopoetischen Stammzellen entwickeln. Über eine Zwischenstufe lymphoider und myeloider Vorläuferzellen differenzieren sie sich in Lymphozyten bzw. den myeloiden Anteil der Immunzellen, die dann in den Blutkreislauf entlassen werden. Zu den Lymphozyten zählen die T-Zellen und natürlichen Killerzellen, sowie die antikörperproduzierenden B- bzw. Plasmazellen. Der myeloiden Gruppe gehören die Granulozyten, Monozyten, Mastzellen und dendritischen Zellen an (Abbildung 1).



Die meisten Immunzellen zirkulieren im Gefäß- und Lymphsystem und sind bei Bedarf, z. B. einer Infektion, in der Lage diese zu verlassen, und ins betroffene Gewebe vorzudringen. Andere Zelltypen, wie die Langerhanszellen, die der Gruppe der dendritischen Zellen zuzuordnen sind, und Mastzellen, befinden sich an Grenzflächen wie Schleimhäuten, wo Sie als eine Art Wachposten agieren, um beim Eindringen von Pathogenen unmittelbar eine Abwehrreaktion zu induzieren (Janeway *et al.*, 2002).

## Zellen des humanen Immunsystems



**Abbildung 1: Schema der Immunzellendifferenzierung im Menschen.** Neutrophile Granulozyten entwickeln sich wie die beiden anderen granulozytären Zellformen aus myeloiden Vorläuferzellen und grenzen sich daher schon in einem sehr frühen Stadium von den Entwicklungslinien der Lymphozyten ab.

## 1.1 Granulozyten

Die Granulozyten, die wie beschrieben, der myeloiden Immunzelllinie angehören und im klassischen Sinne der angeborenen Immunität zuzurechnen sind, lassen sich in drei Gruppen unterteilen. Die Unterscheidung in neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten lässt sich auf ihre jeweils unterschiedlichen zellulären Eigenschaften zurückführen. Diese basieren vor allem auf der Zusammensetzung der intrazellulären Granula, denen sie auch ihren Namen verdanken (Janeway *et al.*, 2002).

Neutrophile Granulozyten machen mit ca. 40-60 % den mit Abstand größten Anteil aller Leukozyten aus. Sie sind der zentrale Zelltyp zur Abwehr bakterieller Mikroorganismen. Für diesen Zweck befindet sich in ihren Granula ein Cocktail verschiedenster Enzyme und antimikrobieller Substanzen, die gezielt freigesetzt bzw. intrazellulär zur Abtötung aufgenommener Keime verwendet werden können (Wright *et al.*, 2010). Charakteristisch für neutrophile Granulozyten ist ihr drei- oder fünfsegmentiger Zellkern. Eine intensivere Auseinandersetzung mit diesem Zelltyp findet in Abschnitt 1.2 statt.

Eosinophile Granulozyten repräsentieren im Vergleich mit einem Anteil von 1-3 % eine sehr viel kleinere Zellpopulation. Bei ihnen handelt es sich um hochspezialisierte Zellen für die Parasitenabwehr, insbesondere von Nematodeninfektionen. Dafür sind in ihren Granula spezielle Proteine wie das „major basic protein“ vorhanden, die gezielt gegen diese Art von Pathogenen eingesetzt werden können (Kariyawasam und Robinson, 2006).

Basophile machen mit weniger als 1 % aller Leukozyten die kleinste Granulozytenpopulation aus. Ihre Funktion ist noch nicht genau definiert, sie können allerdings durch die Ausschüttung von Histamin ähnlich immunmodulatorische Eigenschaften entwickeln wie Mastzellen (Gibbs, 2005).

## 1.2 Neutrophile Granulozyten

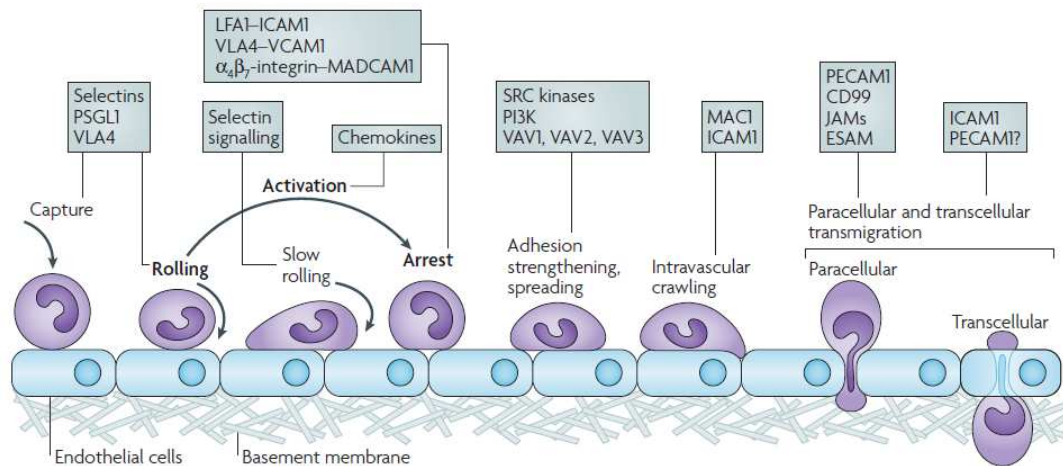
### 1.2.1 Homöostase: Entstehung und Abbau

Neutrophile Granulozyten, oder kurz Neutrophile, machen, wie beschrieben, den mit Abstand größten Anteil aller Leukozyten aus. Dies unterstreicht ihre bedeutende Rolle in Bezug auf die Abwehr von Infektionen. Aufgrund der Menge an zirkulierenden Zellen und ihrem gewebsschädigenden Potenzial, das in erster Linie auf den Molekülcocktail in ihren Granula zurückzuführen ist, sind alle Prozesse, die mit der Freisetzung von Neutrophilen aus dem

Knochenmark, der Einwanderung ins Gewebe und ihrer Aktivierung zu tun haben, hoch reguliert. Dies dient dazu, eine zielgerichtete Abwehrreaktion zu induzieren, ohne große körperliche Nebenwirkungen herbeizuführen. Um dies zu gewährleisten basieren viele Systeme auf dem Prinzip der negativen Rückkopplung. Wie bereits erwähnt, differenzieren sich neutrophile Granulozyten wie alle nukleären Zellbestandteile des Blutes aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Der zentrale Faktor für die Ausreifung von Neutrophilen ist G-CSF (granulocyte colony stimulating factor). Daher wird auf diese Komponente innerhalb der Regulierung der Neutrophil Homöostase gezielt Einfluss genommen. Makrophagen und dendritische Zellen, die in den Geweben apoptotische Partikel von Neutrophilen phagozitieren, produzieren weniger IL-23 (Ley *et al.*, 2006; Stark *et al.*, 2005; von Vietinghoff und Ley, 2009). IL-23 ist in der Lage, die Freisetzung von IL-17A durch spezielle T-Zelltypen zu induzieren was wiederum einen starken Stimulus für die G-CSF-Produktion darstellt (Ley *et al.*, 2006). Dadurch wird die Neuproduktion von Neutrophilen nach bereits erfolgter starker Einwanderung ins Gewebe negativ reguliert. Ein anderer Mechanismus betrifft den Abbau von seneszenten Zellen. Da neutrophile Granulozyten in einer Anzahl von  $1-2 \times 10^{11}$  / Tag produziert werden, und eine sehr kurze Halbwertszeit von 6-8 h aufweisen, muss ein enormer Abbau der Zellen erfolgen. Seneszente Zellen exprimieren den Rezeptor CXCR4, der eine zentrale Rolle in der Einwanderung bzw. dem so genannten „Homing“ im Knochenmark spielt. Dort angekommen gehen die Zellen in Apoptose über und werden von stromalen Makrophagen phagozytiert. Diese Aufnahme der apoptotischen Partikel fördert wiederum die Freisetzung von G-CSF was eine Neuproduktion von Zellen induziert (Furze und Rankin, 2008), (Nagase *et al.*, 2002). Die Bildung von Neutrophilen erfolgt über drei Stufen. Aus dem Stammzellpool, der ausschließlich aus pluripotenten undifferenzierten Zellen besteht, entwickelt sich ein mitotischer Pool aus granulozytären Vorläuferzellen, der in einen post-mitotischen Pool übergeht, der aus ausgereiften neutrophilen Granulozyten besteht, und als Reserve und zur Freisetzung bereit im Knochenmark vorliegt. Die Mechanismen, die bei einer vermehrten Rekrutierung von Neutrophilen bei Entzündungsprozessen, der so genannten Neutrophilie, eine Rolle spielen, sind noch nicht vollständig entschlüsselt. Sicher ist, dass G-CSF (granulocyte colony-stimulating-factor) und CXC Chemokine hierbei eine wichtige Funktion einnehmen (Wengner *et al.*, 2008). Die Freisetzung selber wird über die Expression von CXCR4 oder CXCR2 gesteuert, die entweder einen Verbleib der Zellen im Knochenmark (CXCR4) oder eine Förderung der Freisetzung (CXCR2) induzieren können.

### 1.2.2 Einwanderung ins Gewebe - Transmigration und Chemotaxis

Die Einwanderung der neutrophilen Granulozyten ins Gewebe erfolgt vornehmlich über post-Kapillarvenen, da hier die Endothelwand eine relativ geringe Breite aufweist, und der Venendurchmesser eine Kontaktaufnahme mit den Endothelzellen erleichtert. Dieser Prozess der Neutrophil/Endothel-Interaktion, der so genannten Transmigration oder Diapedese, ist stark reguliert, um unspezifische Gewebsschädigungen weitestgehend zu vermeiden. Der Vorgang wird durch eine Entzündungsreaktion im Gewebe ausgelöst, bei dem pro-inflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ ) und Chemokine wie IL-8 (interleukin-8) freigesetzt werden. Dadurch erfolgt in der näheren Umgebung eine Endothelaktivierung, die sich in einem Aktivierungsphänotyp der Endothelzellen widerspiegelt. Dieser zeichnet sich vor allem durch die Oberflächenexpression von P- und L-Selektinen und Integrinen an der Gefäßinnenseite aus. Diese Moleküle wirken als Bindungsstellen für die in der Zirkulation befindlichen neutrophilen Granulozyten. Die Selektine sind in der Lage in Interaktion mit den Molekülen PSGL-1 (P-selectin-glycoprotein-ligand 1), L-Selektin, ESL-1 (E-selectin ligand 1) und CD44 (Buscher *et al.*, 2010) auf der Zelloberfläche des Granulozyten diesen durch ständiges Lösen und Knüpfung von neuen Bindungen „abzubremsen“ und den ersten Kontakt zu initiieren. Dieser Prozess wird aufgrund des beobachteten „Entlangrollens“ der Zellen an der Gefäßwand als „Rolling“ bezeichnet. Nach dem Rolling-Vorgang erfolgt eine feste Adhäsion zwischen Granulozyt und Endothelzelle. Eine Schlüsselposition nehmen dabei die  $\beta_2$ -Integrine LFA-1 (lymphocyte-function-associated antigen 1) und Mac-1 (macrophage antigen-1) auf den Neutrophilen und ihrer Liganden ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) und ICAM-2 (intercellular adhesion molecule 2) auf den Endothelzellen ein. Integrine können in drei Aktivierungsformen vorliegen. Diese zeichnen sich durch eine blockierte, mittlere oder vollständige Ligandenbindung aus. Bei LFA-1 wird die Aktivierungsform mit dem höchsten Bindungspotential erst durch die Aktivierung von Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche des Granulozyten induziert (Zarbock *et al.*, 2007). Diese erfolgt bei der Transmigration über die Freisetzung von Chemokinen durch das aktivierte Endothel. Zwischen den neutrophilen Granulozyten und den Endothelzellen erfolgt also nicht nur eine spezifische Rezeptor- sondern auch eine Molekül-Rezeptor-Interaktion was zu einer weiteren Regulation des Prozesses beiträgt (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Transmigrationsmodell eines neutrophilen Granulozyten.** Die drei zentralen Vorgänge sind durch fettgedruckte Buchstaben hervorgehoben: Rolling, Aktivierung, Arrest.

Quelle: Ley *et al.*, 2007

Das vollständig aktivierte LFA-1 initiiert den Stopp des Rolling-Vorgangs und induziert zusammen mit Mac-1 eine feste Bindung. Dieser Prozess führt zu einer Polarisierung der Zelle und der Ausbildung eines so genannten Lammelopodiums, einem Zellfortsatz, in dem sich Rezeptoren für Chemotaxis und Phagozytose konzentrieren. Daraufhin kann die transendotheliale Migration stattfinden. Man unterscheidet dabei die transzelluläre und die parazelluläre Migration, bei denen der Granulozyt entweder durch eine Endothelzelle hindurch oder zwischen zwei Endothelzellen entlang ins Gewebe einwandert. Transmigrierte Neutrophile weisen einen höheren Aktivierungsstatus als naive Granulozyten in der Zirkulation auf. Dies zeigt sich beispielsweise in einer erhöhten IL-8 Freisetzung und Mac-1 Expression, was zum Anlocken weiterer Immunzellen und zur Verstärkung der Phagozytosekapazität beiträgt (Sorensen *et al.*, 2001; Theilgaard-Monch *et al.*, 2004; Scapini *et al.*, 2000 / Schnitzler *et al.*, 1999).

Nach der Migration ins Gewebe erfolgt die Wanderung der Zellen zum Entzündungsherd. Diese erfolgt über den Vorgang der Chemotaxis, einer Art von amöboiden Wanderung der Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten von Molekülen. Bei diesen Stoffen, den so genannten Chemoattraktoren, kann es sich um körpereigene Chemokine wie IL-8 oder C5a, aber auch um bakterielle Peptide wie fMLP (N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin) handeln, die aufgrund von Stoffwechselfvorgängen von den Pathogenen freigesetzt werden. Neutrophile sind in der Lage sehr geringe Konzentrationsunterschiede der Chemoattraktoren wahrzunehmen. Ein Unterschied von ca. 2 %, gemessen von der Zellvorderseite bis zur Zell-

rückseite, ist ausreichend, um eine chemotaktische Aktivität zu induzieren (Devreotes und Zigmond, 1988). Diese Fähigkeit der Konzentrationsbestimmung von Molekülen verknüpft mit der Ausrichtung der Zelle zum Ort der höchsten Konzentration wird als „Kompassmechanismus“ bezeichnet (Rickert *et al.*, 2000; Bourne und Weiner, 2002). Nach der Wahrnehmung des Gradienten kommt es zu einer Polarisierung der Zelle, die u.a. durch eine Aktin-Polymerisierung, Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphat-Produktion, Rho GTPase Aktivierung und Myosin-Phosphorylierung gekennzeichnet ist (Devreotes und Zigmond, 1988). Durch eine asymmetrische Polarisierung des F-Aktins, die am Vorderpol der Zelle in Migrationsrichtung der Zelle stattfindet, kommt es zur Ausbildung eines Pseudopods oder Scheinfußchens. Zusätzlich bilden sich an den Seiten und am Ende der Zelle noch spezielle Aktin-Myosin-Komplexe aus, die in Kombination mit dem Vorderpol die gerichtete Bewegung des Zellkörpers induzieren. Diese spezielle Art der Zytoskelettorganisation befähigt die Neutrophilen Granulozyten zu einer im Vergleich mit Fibroblasten 50 fach höheren Migrationsgeschwindigkeit.

### **1.2.3 Interaktion mit Krankheitserregern**

Nach der Einwanderung ins Gewebe und der Lokalisation der Entzündung kommt es bei entsprechenden Umgebungsreizen zu einer zweistufigen Aktivierung des neutrophilen Granulozyten. Die erste Aktivierungsstufe, der so genannte „Priming“-Vorgang erfolgt über proinflammatorische Mediatoren wie die Zytokine TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , das Chemokin IL-8 aber auch durch Pathogen-assoziierte Substanzen wie bakterielle Endotoxine (McPhail *et al.*, 1984). Je nach Umgebungssituation kann auch schon die Neutrophil/Endothel-Interaktion zur vollständigen Ausbildung der Aktivierungsphase 1 führen (Condliffe *et al.*, 1998). Diese Phase ist gekennzeichnet durch die Freisetzung von sekretorischen Vesikeln, die mit der Plasmamembran verschmelzen und so Rezeptoren wie Mac1 in der Zellmembran integrieren. Diese sind für nachfolgende Vorgänge wie eine Phagozytoseaktivität von großer Bedeutung. Eine vollständige Degranulation bzw. der höchste Aktivierungszustand der mit der größtmöglichen antimikrobiellen Aktivität einhergeht kann nur erreicht werden, wenn die Zellen vorher ein „Priming“ erfahren haben (Guthrie *et al.*, 1984; DeLeo *et al.*, 1998). Dieser Vorgang gehört den schon in 2.1 beschriebenen Regulationsmechanismen an, und dient dazu, die Granulozytenaktivität zu steuern, um eine vorschnelle und unkontrollierte Freisetzung von gewebsschädigenden Substanzen zu minimieren.

Nach dem „Priming“ und Erreichen des Entzündungsherds muss vor der Phagozytose, der Aufnahme der Pathogene in intrazelluläre Vesikel, eine Erkennung und Bindung der Mikroorganismen erfolgen. Neutrophile Granulozyten erkennen viele oberflächengebundene oder freigesetzte mikrobielle Substanzen, die so genannten „pathogen-associated molecular pattern“ (PAMP's) durch Muster-Erkennungsrezeptoren („Pattern-recognition receptors“), zu denen auch die Toll-like-Rezeptoren (TLR's) zählen (Akira und Takeda, 2004). Den PAMPs gehören z. B. bakterielle Substanzen wie Peptidoglycan, Lipoproteine, Lipoteichonsäuren oder Flagellin an. Durch die Bindung dieser Stoffe über Moleküle wie die TLR's erfolgt die Induktion einer intrazellulären Signaltransduktionskaskade der die Aktivierungsphase zwei, also die vollständige Aktivierung des neutrophilen Granulozyten initiiert. Diese ist gekennzeichnet durch eine höhere Lebensdauer (Sabroe *et al.*, 2003), ein verstärktes Adhäsionsvermögen und Phagozytosepotenzial, sowie die gesteigerte Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und ROS („reactive oxygen species“/ Sabroe *et al.*, 2003; Hayashi *et al.*, 2003). Letztere werden durch die Exozytose von Granula freigesetzt, die im nächsten Abschnitt genauer beschrieben wird. Zusätzlich zu den Muster-Erkennungsrezeptoren liegt ein zentraler Bestandteil der Pathogenerkennung in der Interaktion mit anderen Immunkomponenten wie dem Komplement und Antikörpern. Diese körpereigenen Proteine binden spezifisch an Pathogene und machen diese so ebenfalls für das Immunsystem sichtbar. Dieser Prozess wird als Opsonisierung bezeichnet. Neutrophile Granulozyten erkennen diese Proteine durch spezielle Komplement-Rezeptoren wie CD11b/CD18 (Mac1), CD11c/CD18, C1pR und CD35 oder Fc-Rezeptoren, die den Fc-Teil des gebundenen Antikörpers erkennen und binden. Zu diesen zählen die Oberflächenmoleküle CD16 (FcRIIb/IgG), CD23 (FcεRI/IgE), CD32 (FcγRIIa/IgG), CD64 (FcγRI) und CD89 (FcαR/IgA). Diese Kombination aus direkter Pathogenerkennung und Opsonisierung initiiert eine effiziente Aktivierung der Zelle und Phagozytose des Pathogens.

Bei der Phagozytose kommt es zum Umfließen des Pathogens durch die Zellmembran und zur Aufnahme ins Zellinnere, wo der Membran/Pathogen-Komplex als Phagosom vorliegt. Durch diesen Vorgang wird ein membrangebundener NADPH-Oxidase-Komplex aktiviert, der aus Sauerstoff und NADPH (Nikotinamidadenindinukleotidphosphat) das Hyperoxidanion  $O_2^-$  generiert. Dadurch steigt der Sauerstoffverbrauch des neutrophilen Granulozyten schlagartig um das 50 bis 100-fache an (Baldrige und Gerhard, 1933). Das hochreaktive Hyperoxidanion ist das Ausgangsprodukt weiterer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die in der Lage sind durch katalytische Reaktionen eine Vielzahl von Molekülen zu attackieren, und damit einen

zentralen Mechanismus in der Abtötung von Pathogenen einnehmen (Ludwig, 2006). Dieser als oxidativer oder respiratorischer Burst bezeichnete Vorgang steht in Wechselwirkung mit anderen mikrobiellen Substanzen, die sich in den Granula der Zelle befinden und mit dem Phagosom verschmelzen. Man unterscheidet klassischerweise primäre, sekundäre und tertiäre Granula, funktionell hat aber eine Klassifizierung im Hinblick auf die Anwesenheit von Myeloperoxidase und den beiden Markerproteinen Lactoferrin und Gelatinase eine größere Bedeutung (Borregaard, 1997). So findet man in primären wie sekundären Granula Myeloperoxidase, aber nie eine Co-Lokalisation dieses Enzyms mit dem Eisen-bindenden Lactoferrin (Cramer *et al.*, 1985). In 50 % aller Peroxidase-negativen Granula findet man Lactoferrin und die Matrix Metalloproteinase Gelatinase, in den restlichen aber eine strikte Trennung, was eine differentielle Exozytose beider Substanzen möglich macht (Kjeldsen *et al.*, 1993; Kjeldsen *et al.*, 1994).  $\beta$ -Glucuronidase findet man co-lokalisiert mit Myeloperoxidase, Elastase und Cathepsin G, während Defensine ausschließlich in Peroxidase-positiven Granula zu finden sind (Ganz *et al.*, 1985; Rice *et al.*, 1987). Während der Phagozytose werden die Peroxidase-positiven Granula im Gegensatz zu den Peroxidase-negativen komplett zum Phagosom geleitet (Ganz, 1987). Daher entsprechen die Peroxidase-positiven Granula weitestgehend dem Lysosom, das nach Verschmelzung mit dem Phagosom, das so genannte Phagolysosom bildet, wo letztendlich die Abtötung des Pathogens stattfindet. Die Myeloperoxidase ist in der Lage zusammen mit Wasserstoffperoxid und Sauerstoffradikalen das Oxidationsmittel Hypochlorige Säure (HOCl) zu bilden, was zur Abtötung des Pathogens beiträgt (Babior, 2004). Der Inhalt von Peroxidase-negativen Granula kann nach vollständiger Aktivierung komplett exozytotisch freigesetzt werden, wobei maximal 30 % der Peroxidase-positiven Granula für die Exozytose rekrutiert werden (Sengelov *et al.*, 1993). Die spezifische Verteilung von antimikrobiellen Substanzen und die differentieell gesteuerte interne oder externe Freisetzung der „Granulacocktails“ macht eine hocheffiziente Abtötung von Mikroorganismen möglich, ohne umliegende Gewebe stark zu beeinträchtigen. Um eine Homöostase innerhalb der voll aktivierten Neutrophilenpopulation während der Entzündung zu gewährleisten, ist die Phagozytose von Pathogenen in den meisten Fällen mit einer nachfolgenden Apoptoseinduktion verknüpft (Coxon *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 2002).



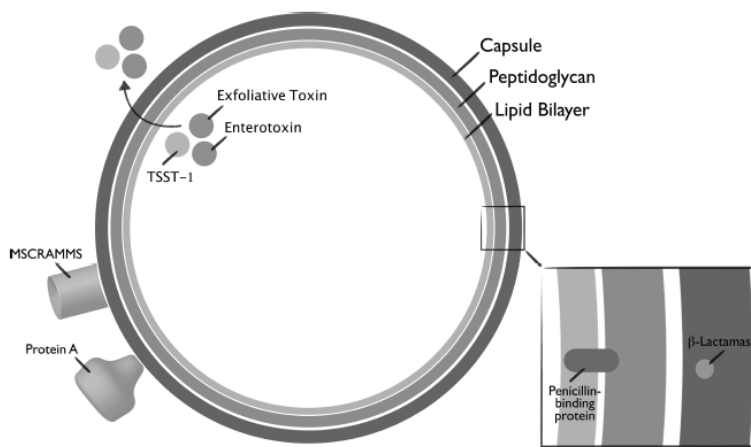
## 2. *Staphylococcus aureus*

Bei *Staphylococcus aureus* handelt es sich um ein gram-positives Bakterium aus der Familie der Micrococcaceae (Erstbeschreibung: Rosenbach, 1884). Charakteristisch für diesen Mikroorganismus ist die häufige Anordnung in einer Traubenform den so genannten Haufenkokken. Sein Name setzt sich aus dem altgriechischen „staphyle“ (Weintraube) und „kokkus“ (Kern) und dem lateinischen „aureus“ (der Goldene) zusammen. Die Bezeichnung „der Goldene“ auf Artebene bezieht sich auf die goldgelbe Pigmentierung seiner Kolonien. Als weitere Typisierungsmerkmale gelten ein positiver Nachweise für Koagulase, Mannitol-Fermentation und ein positiver Desoxyribonuklease-Test (Wilkinson, 1997). Die Bakterienzelle beinhaltet ein ringförmiges bakterielles Chromosom (ca. 2800bp) mit Prophagen, Plasmiden und Transposons. Die Virulenz- und Resistenzgene können sowohl auf dem Chromosom wie auch auf extrachromosomalen Elementen zu finden sein (Novick, 1990). Ein Gentransfer zum Austausch von genetischem Material kann zwischen verschiedenen Stämmen, Arten aber auch anderen Gram-positiven Bakterien durch mobile extrachromosomale Einheiten, wie Plasmide, stattfinden (Schaberg und Zervos, 1986).

### 2.1 Struktur und Aufbau

*Staphylococcus aureus* besitzt eine Zellmembran, eine Zellwand und eine Kapselhülle (Abbildung 3). Die Zellwand besteht, auf das Gewicht bezogen, zu ca. 50 % aus Peptidoglycan. Diese Polysaccharid-Peptide bestehen aus zwei Polysaccharid-Untereinheiten, aus N-Acetyl-Glucosamin und N-Acetylmuraminsäure. Zusätzlich ist die Zellwand von Wandteichonsäuren durchzogen, die kovalent mit dem Peptidoglycan verknüpft sind. Lipoteichonsäuren als Glycerol-Phosphat-Polymer durchziehen ebenfalls die Zellwand, sind aber in der Plasmamembran verankert. Diese drei Substanzen bilden die Grundstruktur der bakteriellen Zellwand (Lowy, 1998). Die meisten Staphylokokken sind von einer Mikrokapsel umgeben. Man unterscheidet elf verschiedene Polysaccharid-Serotypen, wobei die Typen 5 und 8 für 75 % aller *Staphylococcus aureus* induzierten humanen Infektionen verantwortlich gemacht werden können (Lee, 1996). Die meisten der Methicillin-resistenten Stämme (MRSA) gehören Typ 5 an. Die Bakterienhülle ist von zahlreichen Oberflächenproteinen durchsetzt, die auch oft als Virulenzfaktoren eine wichtige Rolle spielen. Die meisten Proteine dieser Art besitzen eine ähnliche Struktur. Sie ist gekennzeichnet durch eine sekretorische Signalsequenz am N-

Terminus, positiv geladene Aminosäuren, die bis in die Plasmamembran ragen, eine hydrophobe Membran durchspannende Domäne und eine Zellwandankerregion in der Nähe des C-Terminus (Lowy, 1998). Eine zentrale Aufgabe dieser Proteine besteht in der Beeinflussung der Adhäsionseigenschaften des Mikroorganismus. So spielen die so genannten MSCRAMM („microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“) bei der Besiedlung von Wirtsgewebe eine wichtige Rolle. Weitere Moleküle werden als Virulenzfaktoren im nächsten Abschnitt genauer beschrieben.



**Abbildung 3: Schematischer Zellaufbau von *S. aureus* mit der Darstellung ausgewählter Virulenzfaktoren**

Quelle: Morell und Balkin, 2010 ursprünglich von Gordon *et al.*, 2008

## 2.2 Epidemiologie und Pathogenese

*Staphylococcus aureus* ist ein häufiger Bestandteil der Bakterienflora der Haut und Schleimhäute des Menschen, wobei er bevorzugt die nasalen Schleimhautregionen besiedelt. 30 % - 50 % der Gesamtbevölkerung sind Träger des Bakteriums, 10 % - 20 % werden dabei dauerhaft besiedelt (Casewell und Hill, 1986; Sanford *et al.*, 1994). Die Kolonisierung mit dem Erreger stellt einen zentralen Risikofaktor in der Auslösung von invasiven Infektionen dar (Wenzel und Perl, 1995). Gesunde Individuen besitzen dabei ein viel geringeres Risiko an solchen Infektionen zu erkranken. Zu den Risikogruppen zählen vor allem Patienten in Krankenhäusern, die ein geschwächtes Immunsystem (Waldvogel, 1995) und/oder post-operative Wunden (Weinstein, 1959) oder Katheter aufweisen (Steinberg *et al.*, 1996). Somit besteht für die Mikroorganismen die Möglichkeit, ins Körperinnere vorzudringen. Viele dieser auch als „Krankenhauskeime“ bezeichneten *S. aureus*-Stämme (Abbildung 4) weisen eine Multiresistenz gegen Antibiotika auf, was auf einen verstärkten Antibiotikaeinsatz und den dadurch entstehenden Selektionsdruck zurückzuführen ist (Hiramatsu *et al.*, 2001). Die zu Grunde

liegenden Resistenzmechanismen werden im nächsten Abschnitt genauer behandelt. *S. aureus* zählt in diesem Zusammenhang zu den häufigsten Verursachern von nosokomialen (im Krankenhaus erworbenen) Infektionen. Der Prozess der Kolonisierung und die Weitergabe der Erreger von Mensch zu Mensch ist sehr komplex, und bisher ist nur sehr wenig über die Faktoren bekannt, die letztendlich eine erfolgreiche Besiedlung ermöglichen (Foster, 2004). Wie schon erwähnt, entfaltet sich das hohe pathologische Potenzial des Erregers erst nach dem Durchdringen der Haut- oder Schleimhautbarriere (Lowy, 1998). In der dann stattfindenden Interaktion mit dem menschlichen Immunsystem kommen die zahlreichen Virulenzfaktoren zum Tragen, die eine vollständige Beseitigung der Infektion oft verhindern. Diese werden ebenfalls im nächsten Abschnitt genauer beschrieben. Das induzierte Krankheitsbild ist vielfältig und stark abhängig von der infizierten Körperregion. Während das Eindringen des Erregers in die oberen Hautschichten oft zu einer Abszessbildung führt, können invasive Infektionen zu schwerwiegenden Erkrankungen wie Endokarditis (Sanabria *et al.*, 1990), Osteomyelitis (Mader *et al.*, 1987), Pneumonie (Webster *et al.*, 2007) oder Sepsis (Bone, 1994) führen. Das klinische Syndrom der Gram-positiven Sepsis wird in Abschnitt 3.1 genauer beschrieben. Eine zentrale Rolle in der Verbreitung innerhalb des Körpers nehmen die Endothelzellen ein. *S. aureus* ist in der Lage mittels Adhesin-Rezeptor-Interaktionen an die Oberfläche von Endothelzellen zu binden (Vercellotti *et al.*, 1984; Tompkins *et al.*, 1990), die die Bakterien daraufhin phagozytieren (Ogawa *et al.*, 1985; Hamill *et al.*, 1986). Da sie nicht wie neutrophile Granulozyten in der Lage sind die Mikroorganismen nach Aufnahme abzutöten, überleben die Erreger intrazellulär und sind somit vor weiteren Angriffen des Immunsystems oder Antibiotika geschützt. Die Endothelzellen dienen somit als Reservoir, das das Überleben der Keime im Körperinneren ermöglicht, und somit einen Ausgangsort für persistierende oder wiederkehrende Infektionen darstellt (Proctor *et al.*, 1995).

CC	klonale Linie	2005 (%)	2007 (%)	2008 (%)	2009 (%)	2010 (%)	Resistenzphänotyp
CC8	ST8; t008 („MRSA der klonalen Gruppe III“)	0	39	13,6	23	15,4	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL
CC8	ST247; t052 („Norddeutscher Epidemiestamm“)	0,2	0,7	1,6	0	0	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, GEN, SXT, RAM
	ST239; t037 („Wiener Epidemiestamm“)	0	2,0	2,6	1,8	0,6	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, GEN, SXT, TET, RAM (PHO, LIN)
CC 398	ST398 LA-MRSA	0	2,6	1,6	1,8	2	PEN, OXA (CIP), ERY, CLI, TET (SXT)
CC5	ST228; t001 („Süddeutscher Epidemiestamm“)	6,2	9,0	5,0	9	4	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, GEN, TET
	ST5; t002 („Rhein-Hessen-Epidemiestamm“)	21	10,2	2,6	6	6	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL
	ST225; t003 („Rhein-Hessen-Epidemiestamm“)		47	38	70	59	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL,
CC22	ST22; t005, t002, t032 („Barnim-Epidemiestamm“)	35,3	60	46	76	76	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL
CC45	ST45; t004, t038, t065 („Berliner Epidemiestamm“)	8,6	31	13,6	18	30	PEN, OXA, CIP, MFL, (ERY, CLI)
CC30	ST36; t018 („Epidemiestamm EMRSA-16“), UK	0,3	0,7	3,1	2,3	0	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL
Anzahl Krankenhäuser mit Epidemiestämmen		194	151	191	121	162	

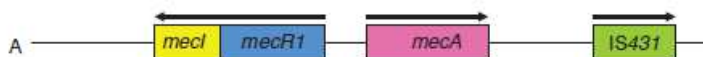
**Abbildung 4: Dynamik des Auftretens von epidemischen MRSA in Deutschland mit überregionaler Verbreitung in Krankenhäusern 2005-2010.**

Quelle: Epidemiologisches Bulletin 4.Juli 2011 / Nr. 26, Robert Koch Institut, Berlin, Deutschland

## 2.3 Resistenzmechanismen und Virulenzfaktoren

Der klassische Resistenzmechanismus, der sich nach dem Einsatz von Penicillin bei der Behandlung von Gram-positiven Infektionen innerhalb der *S. aureus*-Stämme entwickelt hat, basiert auf einem Enzym, das innerhalb der Zellwand des Bakteriums aktiv ist. Dabei handelt es sich um die  $\beta$ -Lactamase, eine Serinprotease, die in der Lage ist, den  $\beta$ -Lactamring des Penicillins zu hydrolysieren und somit die Bindung an das bakterielle Enzym D-Alanin-Transpeptidase verhindert. Somit kommt es nicht zu einer Störung der bakteriellen Zellwandsynthese, die das Absterben des Bakteriums zur Folge hätte. Heutzutage zeigen nur noch 5 % aller *S. aureus*-Stämme eine Sensitivität gegenüber diesem Antibiotikum (Lowy, 1998). Größere Probleme, als diese Resistenz gegen das klassische Penicillin, verursachen heutzutage andere Resistenzgene. Neben dem klassischen Penicillin wurden Penicillinase-resistente Penicilline und Cephalosporine als wirksame Antibiotika eingesetzt auf deren Wirksamkeit die  $\beta$ -Lactamase keinen Einfluss mehr hatte. Der zentrale Mechanismus für die Resistenzentwicklung gegen diese Art von Antibiotika ist auf das so genannte *mecA*-Gen zurückzuführen (Abbildung 5). Dieses codiert für das Penicillin-Binding-Protein 2a, das nach erfolgter Expression die Wirksamkeit der genannten Antibiotika aufhebt (Chambers, 1997). Seinen Ursprung hat dieses Gen vermutlich in einer anderen Staphylokokkenspezies (Archer und Niemeyer, 1994). Weitere Gene, die Einfluss auf diesen Vorgang nehmen sind das *bla*-Gen ( $\beta$ -Lactamase) und

das *fem*-Gen („factors essential für Methicillin resistance“). Stämme, die positiv für das *mecA*-Gen getestet werden, werden als Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) bezeichnet. Das Antibiotikum Vancomycin galt lange Zeit als Reserveantibiotikum gegen *S. aureus*, da sich bis dato keine Resistenzmechanismen entwickelt hatten. 1987 wurden die ersten Vancomycin-resistenten Enterokokken in Krankenhäusern nachgewiesen und seit 2002 wurden alleine in den USA neun Methicillin-resistente *S. aureus*-Stämme identifiziert, die neben dem *mecA*-Gen ebenfalls das *vanA*-Gen, das Resistenzgen für Vancomycin, besaßen (Weigel *et al.*, 2007). Mit der Zeit entwickeln sich also immer mehr multi-resistente *S. aureus*-Erreger deren Behandlung immer schwieriger wird. Da in dieser Arbeit der Fokus nicht auf den Resistenzmechanismen, sondern in den Immun-Evasions-Strategien dieses Erregertyps liegt, wird auf das Thema der Resistenzentwicklung nicht mehr genauer eingegangen.



**Abbildung 5: MecA-Gen-Komplex.** Neben dieser Genvariante sind bisher noch 8 weitere *MecA*-Gen-Komplexe beschrieben worden. Dies zeigt die hohe genetische Diversität, die auch innerhalb Resistenzgene zu finden ist.

*mecI* = Repressor, *mecR1* = Induktor, die Pfeile geben die jeweilige Transkriptionsrichtung an

Quelle: verändert nach Hanssen *et al.*, 2006

Basierend auf Katayama *et al.* 2001, Kobayashi *et al.* 2001b, Lim *et al.* 2003, Shore *et al.* 2005

Als Virulenzfaktoren bezeichnet man Stoffe, die die krankmachende Wirkung eines Mikroorganismus bestimmen. Sie dienen dabei oftmals dem Erreger als Hilfsmittel, um ihm das Überleben im Wirtsorganismus zu ermöglichen. Je potenter die Virulenzfaktoren sind, umso erfolgreicher das Überleben des Mikroorganismus. Die Anzahl an vitalen Pathogenen korreliert wiederum direkt mit dem Krankheitsverlauf. *Staphylococcus aureus* hat im Laufe der Co-Evolution mit dem Menschen ein Arsenal an Virulenzfaktoren entwickelt, um der menschlichen Immunabwehr zu entkommen bzw. seine Überlebens- und Vermehrungschancen nach Eindringen in den Körper zu erhöhen (Foster, 2005). Eine zentrale Komponente in der Überlebensstrategie von *S. aureus* stellt die Expression und Sekretion von Toxinen dar. Eine Gruppe dieser Proteine ist in der Lage Poren in den Plasmamembranen von Wirtszellen zu induzieren und diese damit zu lysieren. Der Prototyp dieses Toxins bildet das  $\alpha$ -Toxin oder  $\alpha$ -Hämolysin, das aus Monomeren besteht, die sich in der Wirtsmembran in Heptamere zusam-

menfügen und eine 14-strängige sogenannte  $\beta$ -barrel Pore entstehen lässt (Montoya und Gouaux, 2003). Bikomponente Leukotoxine bestehen aus vier Untereinheiten, die alle auf unterschiedliche Art und Weise von der Bakterienzelle sezerniert werden, und eine starke Affinität zu Leukozytenmembranen besitzen. Zu diesen Toxinen zählt das  $\gamma$ -Toxin oder  $\gamma$ -Hämolysin, das Panton-Valentine Leukocicdin (PVL) und die Leucocidine E, D und M. Während das  $\gamma$ -Hämolysin in Lage ist, Erythrozyten und Leukozyten zu lysieren und von ca. 90 % aller *S. aureus*-Stämme produziert, handelt es sich bei PVL um ein spezifisches Toxin für Leukozyten (Menestrina *et al.*, 2003), dass nur in 1 % - 2 % der *S. aureus*-Stämme nachgewiesen werden kann (Peacock *et al.*, 2002). Bei PVL scheint es sich um einen sehr potenten Virulenzfaktor zu handeln, da PVL-positive Stämme für zahlreiche Fälle von ernsthaften Hauterkrankungen wie Furunculosis (Prevost *et al.*, 1995) und nekrotisierender Pneumonie bei vorher gesunden Menschen verantwortlich gemacht werden kann (Said-Salim *et al.*, 2003; Gillet *et al.*, 2002). Da er vorwiegend bei Community-acquired (CA)-MRSA Erregern nachgewiesen wird, scheint er bei der Besiedlung von Menschen mit intakten Immunsystemen eine wichtige Rolle zu spielen. Eine weitere Gruppe immunmodulatorischer Proteine stellen die Enterotoxine dar. Sie wirken nicht als lysierende Toxine, sondern als Superantigene, die unmittelbar die T-Zellantwort beeinflussen. Enterotoxine, zu denen auch das „Toxic-shock-syndrome-toxin 1“ (TSST-1) zählt, können „unspezifisch“ an die MHCII (major histocompatibility complex II)-Moleküle von antigen-präsentierenden Zellen binden, und diese mit dem T-Zellrezeptor von T-Helferzellen verknüpfen. Daraufhin erfolgt eine peptid-unabhängige Aktivierung der T-Zellen, was zu ihrer Proliferation und einer massiven Ausschüttung von Lymphokinen führt. Hohe Konzentrationen an Lymphokinen sind charakteristisch für das Toxic-Schock-Syndrom, dem klinischen Syndrom das auf die Enterotoxinwirkung zurückzuführen ist (Chesney *et al.*, 1984; Llewelyn und Cohen, 2002). Jeder Enterotoxintyp erkennt eine spezifische Gruppe der variablen V $\beta$ -Ketten des T-Zellrezeptors was zu einer Aktivierung von bis zu 30 % der T-Zellpopulation führen kann. Zusätzlich sind die T-Zellen nicht mehr in der Lage in regulärer Form MHCII-Peptide zu erkennen bzw. peptidspezifisch aktiviert zu werden (Lussow und MacDonald, 1994). Diese Form der Inaktivität wird als Anergie bezeichnet.

Durch diese beiden Faktoren wird der reguläre Ablauf der Immunantwort gestört, was zu einer höheren Überlebensrate von *Staphylococcus aureus* beiträgt. In ähnlicher Form wirkt das nicht zu den Enterotoxinen zählende „MHCII-analogue protein“ (Map oder Eap). Dieses bindet ebenfalls an den T-Zellrezeptor und beeinflusst die T-Zellfunktion (Jonsson *et al.*, 1995). Die Bindung führt unter anderem zu einer Verschiebung von der dominierenden Th<sub>1</sub>-

Immunantwort zu einer Th<sub>2</sub>-Antwort, was ebenfalls das Überleben von *S. aureus* begünstigt. Protein A hat neben der später noch beschriebenen anti-opsonisierenden Wirkung ebenfalls einen direkten Einfluss auf eine Lymphozytenpopulation. Dieses Molekül bindet an der V<sub>H</sub>3-Region in der Nähe der Antigen-Bindungsstelle des IgM-Moleküls. Wenn sich der Antikörper noch auf dem B-Lymphozyten bzw. Plasmazelle befindet führt diese Bindung zu einer Aktivierung der Zelle, was eine Proliferation und spätere Apoptoseinduktion in Gang setzt. Somit kommt es zu einer massiven Depletion von Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten in der Milz und im Knochenmark (Graille *et al.*, 2000; Silverman und Goodyear, 2002). Dieser Mangel an humoraler Immunität schwächt ebenfalls das Immunsystem des Wirtsorganismus. Anders als die bisher beschriebenen Substanzen werden von *S. aureus* auch Stoffe gebildet, die nicht inflammatorisch sondern anti-inflammatorisch wirken. Hierbei ist vor allem das Chemotaxis-inhibierende Protein (CHIPS) zu nennen. Dieses wird von den Bakterien ebenfalls in die Umgebung abgegeben. CHIPS ist in der Lage die Ligandenbindungsdomäne des C5aR (complement component 5a receptor) und FPR1 (formyl-peptide-receptor) auf neutrophilen Granulozyten zu blockieren, und so die Bindung der natürlichen Liganden C5a und fMLP zu verhindern (de Haas *et al.*, 2004). Diese werden bei der Aktivierung der Komplementkaskade (C5a) oder von den Bakterien selbst gebildet (fMLP) und wirken während einer Entzündungsreaktion wie beschrieben als Chemoattraktoren. 60 % aller *S. aureus*-Stämme produzieren dieses anti-inflammatorische Protein (Foster, 2005). Das „extracellular adherence protein“ (Eap) oder auch „MHCII-analogue protein“ (Map) wirkt neben der Beeinflussung der T-Zellfunktion (siehe oben) ebenfalls der Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten zum Entzündungsherd entgegen. Es bindet u.a. an das „intercellular adhesion-protein 1“ (ICAM1) auf Endothelzellen und verhindert so die Kontaktaufnahme der Neutrophilen mit dem Endothel während der Transmigration (Chavakis *et al.*, 2002). Ein weiterer zentraler Mechanismus neben der Toxinproduktion liegt in der Vermeidung einer Opsonisierung durch das Immunsystem. Bei diesem Vorgang binden körpereigene Proteine (Komplementfaktoren/Antikörper) an die Bakterienzelle und machen diese dadurch für Phagozyten „sichtbar“, was zu einer verstärkten Phagozytose und letztendlichem Abtöten des Erregers führt. Oberflächenproteine wie Protein A (Uhlen *et al.*, 1984) oder die vorherrschenden Fibrinogen-Bindungsproteine „Clumping Factor A (ClfA) und B (ClfB)“ (O'Brien *et al.*, 2002) versuchen dem entgegenzuwirken, indem sie Antikörper am Fc-Teil binden und sie so unschädlich machen, oder körpereigene Proteine wie Fibrinogen binden, und somit einen Kontakt mit den opsonisierenden Partikeln verhindern. Eine direkte Inhibition von Komplementfaktoren kann

über den *Staphylococcus aureus* Komplement Inhibitor (SCIN) erfolgen. Dieser ist in der Lage den C4bC2a- und C3bBb-Komplex zu stabilisieren und somit die Entstehung des C3a-Moleküls, einer der zentralen Opsonisierungsfaktoren, zu blockieren (Rooijackers *et al.*, 2005a). Selbst schon auf der Bakterienoberfläche gebundene IgG- und C3b-Moleküle können indirekt durch ein bakterielles Protein neutralisiert werden. Die Staphylokinase (SAK) spaltet körpereigenes Plasminogen, was an die Bakterienoberfläche gebunden hat, und wandelt es dadurch in die aktive Form, die Serinprotease Plasmin um. Diese wiederum kann gebundene Proteine wie IgG oder C3b spalten, was letztendlich zu einer verminderten Phagozytoseaktivität der neutrophilen Granulozyten führt (Rooijackers *et al.*, 2005b). Die Anwesenheit der beschriebenen vorherrschenden Kapseltypen 5 und 8 führt im Allgemeinen zu einer gesteigerten Virulenz der *S. aureus*-Stämme. So zeigt sich in manchen Studien, dass die Anwesenheit der Kapsel nach Opsonisierung die Aufnahme durch Neutrophile stark einschränkt, was auf anti-opsonisierende Eigenschaften der Kapseloberfläche hindeutet (Luong und Lee, 2002; Thakker *et al.*, 1998).

*Staphylococcus aureus* galt lange Zeit als extrazelluläres Pathogen. Neuere Erkenntnisse zeigen allerdings, dass er in der Lage ist, wie auch schon bei den Endothelzellen beschrieben, in körpereigene Zellen einzudringen und sich somit für die Immunabwehr „unsichtbar“ zu machen. Der Mechanismus der Internalisierung des Bakteriums basiert auf einer Fibrinogenbrücke, die über ein bakterielles Fibrinogen-Bindungsprotein und dem  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin der eukaryontischen Zelle gebildet wird (Schwarz-Linek *et al.*, 2004; Peacock *et al.*, 1999). Im Inneren der Zelle liegt das Bakterium in nahezu inaktiver Form vor (semi-dormant), die jeder Zeit wieder in eine aktive umgewandelt werden kann. Somit bildet sich ein Reservoir für immer wiederkehrende bzw. persistierende Infektionen. Bevorzugte Zelltypen sind die schon erwähnten Endothelzellen aber auch Epithelzellen. Eine Sonderform des Rückzugs in eukaryontische Wirtszellen stellt das Überleben in Phagosomen von Fresszellen wie Makrophagen oder Neutrophilen dar. So sind das Carotenoid Pigment und zwei Superoxid-Dismutase Enzyme von *Staphylococcus aureus* in der Lage, Sauerstoffradikale zu binden bzw. abzubauen und somit die antimikrobiellen Eigenschaften des Phagosomeninhalts stark zu reduzieren (Karavolos *et al.*, 2003). Die Basis für die Fähigkeit innerhalb von Phagosomen zu Überleben basiert auf einer stark modifizierten Genregulation, die die Anpassung des Mikroorganismus an das neue Milieu steuert. Diese spezielle Genaktivität wurde vor allem in Community-acquired MRSA nachgewiesen (de Haas *et al.*, 2004; Voyich *et al.*, 2005). Weitere Moleküle, die die antimikrobielle Wirkung der Phagozyten herabsetzen sind die Staphylokinase, die neben ihrer



Fähigkeit der Plasminogenaktivierung ebenfalls in der Lage ist Defensine zu binden (Jin *et al.*, 2004a), Aureolysin, das durch Spaltung ebenfalls die Defensinwirkung neutralisiert und eine membrangebundene O-Acetyltransferase, die die Aktivität des Lysozyms, einer Muramidase, herabsetzt (Bera *et al.*, 2005). Neben diesen auf Proteinen basierenden Mechanismen wurden aber auch Modifikationen in der Zellwand von *Staphylococcus aureus* nachgewiesen, die eine verstärkte „Killing-Resistenz“ zur Folge haben. Diese können die Zellwand, aber auch die Zellmembran betreffen (Staubitz *et al.*, 2004; Peschel *et al.*, 2001).

## 2.4 Zoonosen

In den letzten Jahren wurden Nutztierbestände und hier vor allem Schweinemastbetriebe als Reservoir für MRSA-Erreger identifiziert. Die Tiere sind mit verschiedenen MRSA-Stämmen besiedelt (Strommenger *et al.*, 2006; Weese und van Duijkeren, 2010; Garcia-Alvarez *et al.*, 2011) und wirken daher als Plattform für die Übertragung auf den Menschen. Bei diesen handelt es sich vor allem um Personen mit direkter Exposition zu Nutztieren, wie landwirtschaftliches und veterinärmedizinisches Personal. Es wurde nachgewiesen, dass diese Personengruppen ein vielfach erhöhtes Risiko besitzen, von den jeweiligen Stämmen besiedelt zu werden (Voss *et al.*, 2005; Wulf *et al.*, 2008b). Da, wie bereits beschrieben, schon die Besiedlung einen erhöhten Risikofaktor für eine Infektion darstellt, geht von den besiedelten Tieren eine gesundheitliche Gefahr für die entsprechenden Berufsgruppen aus. Zu dem besteht immer die Möglichkeit, dass Erreger aus ihrem Umfeld in eine sensible Umgebung wie Krankenhäuser eingeschleppt werden, und die Keime sich somit immer weiter verbreiten. Bei dem zentralen Erregertyp, der vorrangig in Schweinemastbetrieben nachgewiesen werden konnte, handelt es sich um den Sequenz Typ (ST) 398. Dieser klonale Erregertyp gilt bezogen auf sein häufiges Auftreten und seine genetischen Eigenschaften als einer der Stämme mit dem höchsten pathologischen Potenzial. Die ersten ST398 wurden in Frankreich zwischen 1996 und 2002 isoliert (Armand-Lefevre *et al.*, 2005). Bezogen auf die erste detaillierte Charakterisierung 2004 in den Niederlanden (Voss *et al.*, 2005) wird dieser Stamm auch als „Dutch pig strain“ bezeichnet. Die Isolate sind in ihrer Art speziell, da sie nicht wie alle bisherigen Isolate durch einen *Sma*I-Verdau mit anschließender Pulsed-Field Elektrophorese typisiert werden können. Dies ist auf eine bisher unbekannte Variation in ihrem Methylierungsmuster zurückzuführen (Bens *et al.*, 2006). Alle Isolate tierischen Ursprungs dieses ST gehören einem Pool von eng verwandten Spa-Typen an, die in der Multilocus-Sequenz ST398 zusammengefasst sind. Weltweit werden mehr und mehr dieser Erreger in Tierbeständen nachgewiesen (Wulf *et al.*,

2008b) und es gibt erste alarmierende Berichte von infizierten Menschen bzw. nosokomialen Infektionen (Krziwanek *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2009; Wulf *et al.*, 2008a). Diese beinhalten Fälle von Endocarditis (Ekkelenkamp *et al.*, 2006), Ventilator-assoziiertes Pneumonie (Witte *et al.*, 2007) und Wundinfektionen (Huijsdens *et al.*, 2006). Es zeigt sich, dass dieser Erregertyp in der Lage ist, die Speziesbarriere zu überwinden und Menschen erfolgreich zu besiedeln und zu infizieren. Aktuelle Studien zeigen erste Hinweise auf Anpassungsvorgänge von Tier zu Mensch, die auf horizontalem Gentransfer basieren und Resistenz- und Virulenzgene umfassen. So konnten Plasmid-basierende Resistenzgene, das Trimethoprim-Resistenzgen *dfrk* und das Lincosamide/Pleuromutulin/Streptogramin A exporter Gen *vga* im Genom des Erregers nachgewiesen werden (Kadlec und Schwarz, 2009a; Kadlec und Schwarz, 2009b). Zusätzlich gibt es den ersten Nachweis des Leukotoxins PVL, eines, der wie beschrieben, potentesten Virulenzfaktoren (Welinder-Olsson *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008). Weitere Studien sind notwendig, um das genaue pathologische Potenzial dieses Erregers zu ermitteln. Vergleichbar mit dem Rückzug des Bakteriums in eukaryontische Zellen, besitzt der Stamm ST398 mit den Nutztierbeständen ein riesiges Reservoir bzw. Rückzugsgebiet, aus dem er immer wieder neu in sensible Bereiche wie Krankenhäuser eingetragen werden kann.

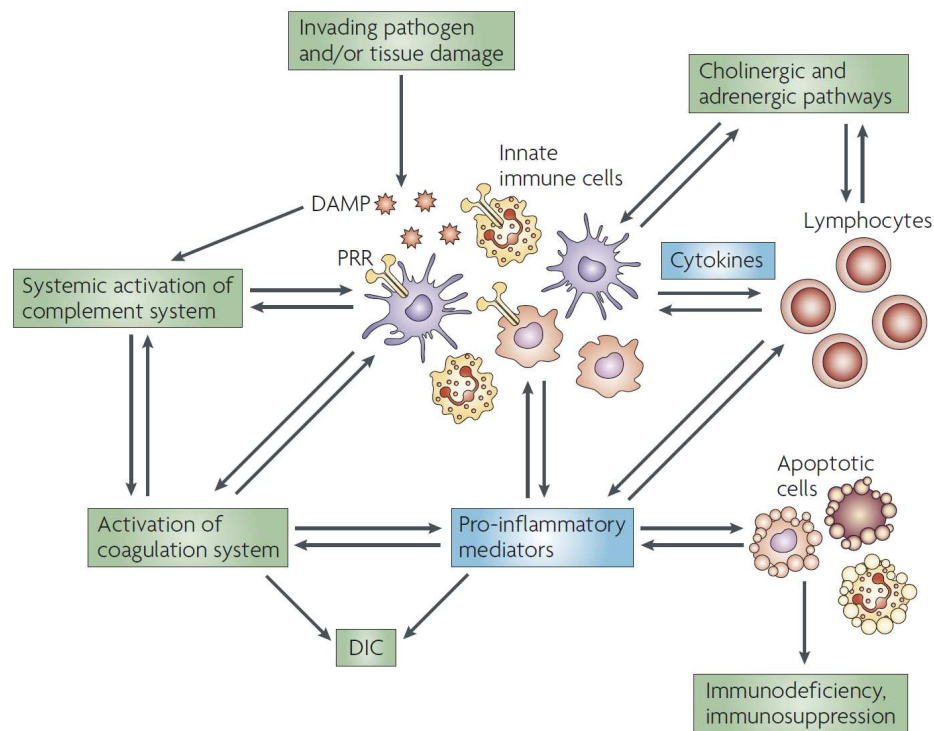
### **3. Bedeutung von Neutrophilen Granulozyten in *Staphylococcus aureus*- Infektionen**

Der Neutrophile Granulozyt ist die spezialisierte Immunzelle des Körpers für die primäre Abwehr bakterieller Infektionen. Sie spielt daher auch bei der Bekämpfung von *S. aureus*-Infektionen eine zentrale Rolle. Viele Beispiele zeigen, dass sich eine Beeinträchtigung der Granulozytenfunktion nachhaltig auf die Ausbreitung des Erregers im Körper auswirkt. Patienten mit chronischer Neutropenie, fehlerhafter Zellmigration (z. B. „leukocyte adhesion deficiency 1“) und intrazellulärem Killing leiden an verstärkten und persistierenden *S. aureus*-Infektionen (Spickett, 2008; Lakshman und Finn, 2001). Diese Bedeutung von Neutrophilen Granulozyten als zentrale Effektorzelle konnte durch *in vitro* Studien bestätigt werden (Molne *et al.*, 2000; Caver *et al.*, 1996; Kielian *et al.*, 2001). Obwohl durch die Co-Evolution zwischen Immunzelle und Pathogen sich, wie beschrieben, auf Seiten des Erregers zahlreiche Mechanismen entwickelt haben, die das Abtöten durch Neutrophile nach Eindringen in den Körper verhindern können, bleibt dieser Zelltyp die wichtigste Immunkomponente in der Bekämpfung dieses Erregertyps.

### 3.1 Klinisches Syndrom der Gram-positiven Sepsis

Sepsis bezeichnet ein komplexes klinisches Syndrom, das auf eine Reaktion des Immunsystems auf eine systemische Infektion zurückzuführen ist. Dabei entwickelt sich eine anfängliche Entzündungsreaktion zu einer unkontrollierten Immunantwort mit ernsthaften pathologischen Folgen. Eine Studie aus Nordamerika zeigt, dass die Prävalenz dieses Syndroms bei 3 Fällen / 1000 Personen liegt, was zu einer jährlichen Fallzahl im untersuchten Gebiet von 750.000 führt (Angus *et al.*, 2001). Die Todesrate liegt mit 30 % bis über 50 % sehr hoch, was die Gefährlichkeit dieser Erkrankung widerspiegelt. Die meisten Fälle von Sepsis werden durch bakterielle Infektionen ausgelöst. Dabei hat sich das Verhältnis zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Infektionen in den letzten zwei Jahrzehnten deutlich verschoben. Lag früher der Anteil der durch Gram-negative Erreger ausgelösten Fälle noch deutlich höher, so sind heute Gram-positive Bakterien allen voran *Staphylococcus aureus*-Infektionen mit einem Verhältnis von 52,1 % zu 37,6 % vorherrschend (Martin *et al.*, 2003). In der Gram-negativen Sepsis gilt das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) als zentraler Auslöser der klinischen Symptome. In der Gram-positiven Variante wurden die Zellwandbestandteile Lipoteichonsäure (LTA) und Peptidoglycan (PG) als Induktoren identifiziert. Sie wirken synergistisch und können das „multiorgan-dysfunction-syndrom“ (MODS) auslösen, was schließlich zum Tod führen kann (Kengatharan *et al.*, 1998). Gram-positive Virulenzfaktoren wie Exo- oder Enterotoxine sind dagegen vorrangig bei der Entstehung von septischen Schockzuständen beteiligt (Titheradge, 1999; Sriskandan und Cohen, 1999a). LTA und PG induzieren die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  und IL-6, was wiederum zur Entstehung des Sauerstoffradikals NO $^{\cdot}$  (Stickstoffmonoxid) beiträgt. NO $^{\cdot}$  wird von verschiedensten Zelltypen produziert und steht im Zusammenhang mit pathologischen Zuständen wie Endotoxemie, Cardiovaskulärer Fehlfunktion und MODS („multiorgan-dysfunction-syndrom“), die während einer Sepsis auftreten können. NO $^{\cdot}$  stellt in der Entstehung der Gram-positiven wie auch der Gram-negativen Sepsis eine wichtige Komponente dar (Szabo *et al.*, 1994). Durch das komplexe Zusammenspiel von vielen Faktoren und vielen Varianten des klinischen Syndroms der Gram-positiven Sepsis ist es bisher nur sehr eingeschränkt gelungen erfolgreiche Therapieformen zu entwickeln. Ein Beispiel dafür ist der komplexe Cross-Talk der Koagulations-, Komplement- und Fibrinolyse-Systeme, der während eines Sepsisgeschehens nachhaltig gestört ist. Zusätzlich kommt es zu einer schwerwiegenden Beeinflussung der zellulären Fraktion, die in direkter Wechselwirkung zu den bakteriellen Substanzen und den beschriebenen Molekülsystemen steht. Dieser Zellfraktion gehören eben-

falls die neutrophilen Granulozyten an, die, wie in 1.1 beschrieben mit 40 % - 60 % den mit Abstand größten Anteil an Immunzellen im Vollblut ausmachen.



**Abbildung 6: Modell „inflammatorisches Netzwerk im Sepsisgeschehen“.** Durch in das Blutgefäßsystem eingetragene so genannte „DAMP’s“ (danger associated molecular pattern), die aus bakteriellen Substanzen wie auch aus durch Gewebsschädigungen resultierenden Gewebefragmenten bestehen können, kommt es zur Aktivierung der Immunzellen über die zelleigenen „Pattern-recognition“-Rezeptoren. Daraufhin kommt es zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen, die ein pro-inflammatorisches Milieu generieren. Zusätzlich kommt es durch den Eintrag an Fremdstoffen zur Aktivierung des Komplementsystems und durch das Entzündungsmilieu zu einer Initiierung des Koagulationssystems und Inhibition der Fibrinolyse. Dies kann zu einer intravasculären Koagulation (DIC) führen, welche zu den schwerwiegendsten Auswirkungen des Sepsisgeschehens zu zählen ist. Das Entzündungsmilieu wiederum beeinflusst nachhaltig die Eigenschaften der Immunzellen wie z. B. der neutrophilen Granulozyten. Quelle: Rittirsch *et al.*, 2008.

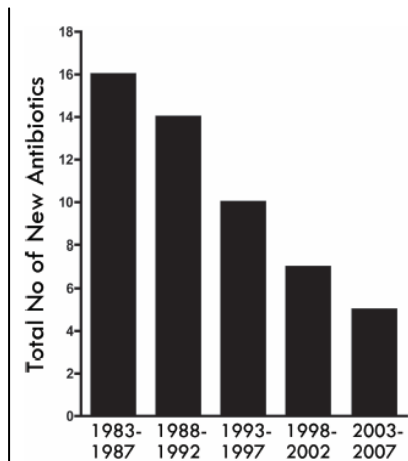
### 3.1.1 Dysfunktion der neutrophilen Granulozyten

Ein weiterer Faktor, der zur Manifestierung des Syndroms der Sepsis führt, liegt in den durch eine systemische Entzündungsreaktion induzierten veränderten Eigenschaften der peripheren neutrophilen Granulozyten. Die systematische Entzündung führt gleichzeitig zu einer systemischen Aktivierung der Neutrophilen. Untersuchungen von Personen mit einem sepsisbedingten multiplen Organversagen zeigen eine Aggregation von Neutrophilen in den renalen

Gefäßen (Nuytinck *et al.*, 1987; Brealey und Singer, 2000). So führt eine Entfernung der peripheren neutrophilen Granulozyten aus dem Gefäßsystem von Personen mit einer systemischen Entzündung über Leukozytendepositionsfilter zu einer Verbesserung der Nieren- und Lungenfunktion (Treacher *et al.*, 2001). Diese Form der Therapie ist allerdings nur sehr bedingt anwendbar, da die Neutrophilen, wie schon beschrieben, die zentrale Abwehrzellen für die der Sepsis zu Grunde liegenden Erregertypen darstellen, und somit eine auf dem Immunsystem basierende Immunantwort stark geschwächt wird (Brown *et al.*, 2006a). Die Fehlfunktion der Neutrophilen kann je nach Variante oder Ausprägung der Sepsis variieren. Gestört ist vor allem die Transmigration der Zellen ins Gewebe. Es findet zwar eine verstärkte Interaktion mit dem Endothel statt, eine Durchwanderung der Gefäßwand erfolgt allerdings nicht (Brown *et al.*, 2006a). Des Weiteren kann sich eine verstärkte Phagozytoseaktivität (Martins *et al.*, 2003; Stubner und Siedler, 1984) und/oder eine gesteigerte Apoptoseaktivität zeigen (Ishikawa *et al.*, 2000; Jimenez *et al.*, 1997). Die veränderten Eigenschaften der Neutrophilen spiegeln sich ebenfalls im Phänotyp der Zellen wider. So findet man auf der Zelloberfläche eine verminderte Expression des Selektins CD62L (McGill *et al.*, 1996; Rosenbloom *et al.*, 1999), des Chemokinrezeptors CXCR2 (Chishti *et al.*, 2004) und eine verstärkte Expression des Oberflächenmoleküls CD66b (Martins *et al.*, 2008) sowie des Fc-Rezeptors CD64 (Qureshi *et al.*, 2001). Der Komplementrezeptor CD11b kann sowohl in vermehrter, verminderter oder identischer Anzahl vorliegen (Lin *et al.*, 1993; Wakefield *et al.*, 1993). Im Gesamtbild zeigen die Zellen ein ähnliches Erscheinungsbild wie Neutrophile nach Aktivierung oder „Priming“, was zusätzlich durch die vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen und dem Transkriptionsfaktor „nuclear factor kappa B“ (NFkappaB) bestätigt wird (Martins *et al.*, 2003).

## II Zielsetzung

Antibiotika werden mehr und mehr zu einer stumpfen Waffe bei der Bekämpfung von pathogenen Mikroorganismen. Dies trifft auch für *Staphylococcus aureus* zu. Die Ausbildung von Multiresistenzen und die Verbreitung der multiresistenten Erreger schreitet in den letzten Jahren viel schneller voran, als die Entwicklung neuer Präparate, die eine effiziente Behandlung möglich machen würden (Abbildung 7). Somit kommt es immer mehr zu so genannten „difficult-to-treat“ Infektionen, bei denen herkömmliche Antibiotikatherapien nicht mehr greifen. Daher stellt sich die Frage nach alternativen oder ergänzenden Möglichkeiten, die eine solche Therapieform ersetzen oder zumindest unterstützen können. Ein Ansatzpunkt stellt dabei eine genauere Erforschung der Interaktion von Krankheitserregern mit dem menschlichen Immunsystem dar. Dies könnte Hinweise darauf liefern, inwieweit das Immunsystem unterstützt werden kann, um eine effektivere Bekämpfung der Erreger zu erzielen bzw. um zentrale Faktoren in den Immunevasionsstrategien der Mikroorganismen zu entschlüsseln. Auf diese genannten Punkte bezieht sich die Zielsetzung dieser Arbeit. Es soll die Interaktion von *S. aureus* mit dem menschlichen Immunsystem bzw. gezielt die Interaktion mit humanen neutrophilen Granulozyten untersucht werden. Dazu werden spezielle *S. aureus*-Stämme bzw. Sequenztypen verwendet, die sowohl aus dem Tier als auch aus dem Menschen stammen, und somit die Möglichkeit besteht, potenzielle Faktoren für die Anpassung an den Menschen durch vergleichende Analysen zu charakterisieren. Bei dem vorrangig verwendeten Bakterium handelt es sich um den in der Einleitung (2.4) beschriebenen *S. aureus* Sequenztyp 398. Zusätzlich zu den Analysen auf Erregerseite sollen durch Untersuchungen der neutrophilen Granulozyten neue Erkenntnisse in der Interaktion mit *S. aureus* gewonnen werden. Hierbei sollen die Wechselwirkungen von Vollblut mit bakteriellen Substanzen eine zentrale Rolle einnehmen, da diese Vorgänge in der Entstehung der Gram-positiven Sepsis von großer Bedeutung sind (Einleitung / 3.1). Ein Schwerpunkt liegt dabei in der Analyse der CD66b-



**Abbildung 7: Anzahl neu zugelassener Antibiotika, USA, 1983-2007**

Quelle: Morell / Balkin, 2010

Expression auf der Zelloberfläche von humanen neutrophilen Granulzyten nach der Inkubation von Vollblut mit bakteriellem Überstand.

# III Material und Methoden

## 1. Material

### 1.1 Geräte

Begasungsbrutschrank BB6220(Heraeus, Hanau)

Biopsie Hautstanze, 3,5 mm Innendurchmesser (pfm Medizin AG, Köln)

Brutschrank BD240 (Binder, Tuttlingen)

Coulter Counter, Multisizer TM3 (Beckman Coulter, Krefeld)

Dampfsterilisator, Varioklav (H + P, Hackermos)

Durchflusszytometer, FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg), FlowJo software (FlowJo, Ashland, USA)

Durchflusszytometer, ImageStream<sup>X</sup>, IDEAS software (Amnis, Seattle, USA)

Eismaschine, Scotsman AC45 (Frimont, Mailand, Italien)

Feinwaage, Sartorius LE-2445 (Sartorius AG, Göttingen)

Fluoreszenz-Scanner, LFA-3000 (Fujifilm, Tokio, Japan), Aida 1D Evaluation Software (ray-test, Straubenhardt)

Gefrierschrank, -20°C (Liebherr, Ochsenhausen)

Gefrierschrank, -70°C, Hera freeze (Heraeus, Hanau)

Hämatokritsystem, Coulter ACT8 (Bechman Coulter, Krefeld)

Intellimixer, Sky-Line RM-2L ELMI (LMS, Brigachtal)

Inversmikroskop, Axiovert 40C, AxioVision software (Zeiss, Jena)

Konfokalmikroskop, LSM 780, ZEN2010 software (Zeiss, Jena)

Magnetrührer, IKA-COMBIMAG RET (IKA-Werke, Staufen)

Multipipette, 4780 (Eppendorf, Hamburg)

Neubauer Zählkammer, (Laboroptik, Bad Homburg)

Pipetten, 0,5-10 µl, 10-100µl, 100-1000 µl, Research (Eppendorf, Hamburg)

Pipettierhilfe, Pipetboy acu (integra Biosciences, Fernwald)

sterile Werkbank, Hera safe (Heraeus, Hanau)



Stoppuhr (Junghans, Schramberg)  
 Thermomixer „comfort“ (Eppendorf, Hamburg)  
 Tischzentrifuge, Centrifuge 5819 R (Eppendorf, Hamburg)  
 Trockenschrank (Heraeus, Hanau)  
 Ultraschallbad, Sonorex Rk 255 H (Bandelin, Berlin)  
 UV-Photometer, GeneRay (Biometra, Göttingen)  
 Vortex, Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, USA)  
 Waage, METTLER PL200 (Mettler Waagen GmbH, Giessen)  
 Wasseraufbereitungssystem, Milli-Q (Millipore, Schwalbach)

## 1.2 Verbrauchsmaterial

Combitips plus 1, 5, 10 ml (Eppendorf, Hamburg)  
 Deckgläser 18 mm x 18 mm / 0,170 mm  $\pm$  0,005 mm (Zeiss, Jena)  
 Einmalbecher für Coulter Counter (Beckman Coulter, Krefeld)  
 Einmalkanülen 0,9 x 40 mm, Fin-Ject, (Henke Sass Wolf, Tuttlingen)  
 Einmalküvetten 1,5 ml, Plastibrand (Brand, Wertheim)  
 Einmalspritzen 5 ml, 10ml, 20ml, 50ml Norm-Ject (Henke Sass Wolf, Tuttlingen)  
 ELISA-Platten, 96-well Maxisorp immunoplate (Nunc, Roskilde, Dänemark)  
 FACS-Röhrchen, Falcon BD PS-Röhrchen (Becton-Dickinson)  
 Impfösen (VWR, Langenfeld)  
 Latex Einmalhandschuhe (VWR, Langenfeld)  
 Nitril Einmalhandschuhe (Microflex, Reno, USA)  
 Objektträger 76 mm x 26 mm (Menzel-Gläser, Braunschweig)  
 Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg)  
 Protein Konzentratorröhrchen, 7ml/9K, (Pierce/Thermo-Scientific, Waltham, GB)  
 Reaktionsgefäße, Eppis, 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf, Hamburg)  
 Schraubröhrchen mit Spitzboden 15 ml, 50 ml (Sarstedt, Nümbrecht)  
 Serologische Pipetten 5, 10, 25 ml (Sarstedt, Nümbrecht)  
 Serumröhrchen 10 ml (Sarstedt, Nümbrecht)  
 Sterilfilter, 0,2 $\mu$ m (Whatman, Springfield Mill, USA)  
 Zellkulturschale 35 mm x 10 mm, (Corning, Corning, USA)  
 Zellkultur-Multiwell, 96-well Flachboden (Nunc, Roskilde, Dänemark)

### 1.3 Medien zur Kultivierung von prokaryontischen und eukaryontischen Zellen

Blutagarplatten, Columbia agar 5 % Sheep Blood (Becton Dickinson, Heidelberg)

fötales Kälberserum, FKS (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)

Hirn-Herz-Dextrose, (HHD, Roth, Karlsruhe)

Iscove´s modified Dulbeccos Medium (IMDM), (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)

RPMI-1640 (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)

### 1.4 Sonstige Reagenzien

Agarose, UltraPure, (Invitrogen, Karlsruhe, Lot: D072408)

C5a (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Lot: 048K8711)

CHIPS (Hycult Biotechnology, Uden, Niederlande)

Chromophor, S-2251 (Chromogenix, Mailand, Italien)

Coulter Isoton II Diluent (Beckman Coulter, Krefeld)

Dextran T250 2%, (Pharmacocos, Holbaek, Dänemark)

DMSO (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Erythrozytenlyse-Puffer, Pharm-Lyse (Becton Dickinson, Heidelberg)

FACS-Lysing Solution (Becton Dickinson, Heidelberg)

Fibrinogen (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Lot: 108K7535)

fMLP (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Lot: 038K1283)

Hank´s balanced salt solution (HBSS, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)

Heparin, Heparin-Natrium-500-ratiopharm (ratiopharm, Ulm)

Laemmli Probenpuffer (BioRad, Hercules, USA)

LPS, *E. coli* 055:B5 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Lot: 127K4026)

Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe)

Percoll (Sigma, Taufkirchen)

Plasminogen (Chromogenix, Mailand, Italien, Lot: N1288077)

Proteinstandard, Precision Plus Protein All Blue Standards (BioRad, Hercules, USA)

SDS-Gel, Tris-HCl 15% (BioRad, Hercules, USA)

SDS-Gel Gesamtproteinfärbung, Flamingo Fluorescent Gel Stain (BioRad, Hercules, USA)

Staphylokinase (PJK, Kleinblittersdorf, Deutschland, Lot: 22269)

Zymosan, Zymosan A von *S. cerevisiae* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Lot: 115K1389)

## 1.5 Kits

Oxacillin E-Test (Biomerieux, Marcy-Etoile, Frankreich, Lot: 520500270)

Zytokin-ELISA, Quantikine (R u. D. Systems, Minneapolis, USA)

hu IL-8 (Lot: 269015, 270510)

hu IFN $\gamma$  (Lot: 261674, 265031)

hu IL-1 $\beta$  (Lot: 268014)

hu TNF $\alpha$  (Lot: 263572, 265075)

hu Lactoferrin-ELISA (Hycult Biotechnology, Uden, Niederlande; Lot: 10038K0911-D)

## 1.6 Antikörper

### 1.6.1 Erstantikörper und direkt konjugierte Antikörper

Huhn anti-human-Fibrinogen FITC (Agrisera, Vännäs, Schweden, Lot: 0911)

Maus-anti-CHIPS (JNC, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA, Lot: K0960)

Maus-anti-CHIPS (JCC, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA, Lot: L2106)

Maus anti-human CD66b FITC (Becton Dickinson, Heidelberg, Lot: 17794, 62302, Klon: D10F5)

Maus anti-human CD66b (Becton Dickinson, Heidelberg, Lot: 76076, Klon: D10F5)

Maus anti-human CD11b PE (Becton Dickinson, Heidelberg, Lot: 97965, 31965, 66289, Klon: D12)

Maus anti-human CD62L APC (Becton Dickinson, Heidelberg, Lot: 32215, Klon: DREG-56)

Maus anti-human CD18 PE-Cy5 (BioLegend, San Diego, USA, Lot: B136945, B120653, Klon TS1/18)

Maus anti-human CD11c PE-Cy5 (Becton Dickinson, Heidelberg, Lot: 74916, Klon: B-ly6)

Maus anti-human CD11a FITC (Becton Dickinson, Heidelberg, Lot: 57785, Klon: HI111)

Schaf anti- *S. aureus* alpha hemolysin HRP (Lot: 870471)

### 1.6.2 Zweit-Antikörper

Ratte-anti-Maus HRP (Becton Dickinson, Heidelberg, Lot: 40529)

### 1.6.3 Isotypkontrollen und G-Protein-Block

Maus IgG<sub>1</sub> FITC (Becton Dickinson, Heidelberg, Lot: 63839)

Maus IgM FITC (Becton Dickinson, Heidelberg, Lot: 41639)

Maus IgG<sub>2a</sub> PE (Becton Dickinson, Heidelberg, Lot: 60896)

Maus IgG<sub>1</sub> PE-Cy5 (BioLegend, San Diego, USA, Lot: B129754)

Maus IgM (Becton Dickinson, Heidelberg, Lot: 84057)

Ziege-IgG, ChromePure (Dianova, Jackson ImmunoResearch, West Groves USA, Lot: 86735)

## 1.7 Rezeptorantagonisten

C5a Rezeptor 1 Antagonist, W-54011 (Calbiochem/Merck, Darmstadt, Lot: D00086067)

## 1.8 Verwendete Mikroorganismen

Alle verwendeten *S. aureus*-Stämme (bis auf ATCC25923) wurden für das Projekt vom deutschen Referenzzentrum für Staphylokokken, dem Robert Koch Institut in Wernigerode, zur Verfügung gestellt. Eine Zusammenstellung aller elf eingesetzten Bakterienstämme, sowie zentrale stammspezifische Informationen befinden sich in nachfolgender Tabelle.

	spa-Typ	mecA	Ursprung	Fundort des Isolats
ATCC 25923		MSSA	human	
ST45	t004	MRSA	human	epidemisch (Berlin)
ST9a	t1313	MSSA	human	Abszess
ST9b	t337	MSSA	human	nasale Kolonisierung
ST9c	t3198	MSSA	pig	nasale Kolonisierung
ST398a	t011	MRSA	pig	nasale Kolonisierung
ST398b	t011	MRSA	human	nasale Kolonisierung
ST398c	t034	MRSA	pig	nasale Kolonisierung
ST398d	t034	MSSA	human	nasale Kolonisierung
ST398e	t034	MRSA	human	Wundinfektion
ST398f	t034	MRSA	human	Abszess

**Abbildung 8: Charakteristika der verwendeten *S. aureus*-Stämme.** Angaben enthalten Sequenz Typ, spa-Typ, *mecA*, Ursprung und Fundort der Isolate.

## **2. Methoden**

### **2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.1.1 Bestimmung des spa- und Sequenztyps**

Als Grundlage für die weiterführenden Experimente diente die genetische Charakterisierung der spa- und Sequenztypen, sowie die Information über die Herkunft und die Besiedlungsform der einzelnen Stämme. Diese Informationen wurden vom deutschen Referenzzentrum für Staphylokokken, dem Robert Koch Institut in Wernigerode, zur Verfügung gestellt.

#### **2.1.2 Micro-Array-Analyse der verwendeten Stämme**

Zur genaueren Unterscheidung und für den gezielten Nachweis von potenziellen Virulenzfaktoren wurden die Stämme zusätzlich mit Hilfe eines neuartigen auf *S. aureus* abgestimmten DNA-Microarrays analysiert. Mit dieser auf Primer Elongation basierenden Methode ist es möglich 330 verschiedene genetische Sequenzen zu detektieren (Monecke und Ehrlich, 2005). Zu ihnen zählen speziespezifische Kontrollen, Asessorische Genregulator Allele (*agr*), Virulenzfaktoren, adhesive Matrix-Moleküle, Kapseltyp-spezifische Gene und Resistenzgene. Dafür wurden alle elf Stämme wie in 2.2.1 beschrieben kultiviert, und jeweils drei Kolonien pro Stamm für die Analyse herangezogen. Die beschriebene Methode wurde vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Technischen Universität Dresden durchgeführt und die Ergebnisse übermittelt.

### **2.2 Mikrobiologische Methoden**

#### **2.2.1 Kultivierung der Mikroorganismen**

Alle *S. aureus*-Stämme wurden auf 5 % Schafblut-Agarplatten aufgebracht, und bei 37°C im Inkubator für 18 h kultiviert. Bei erfolgtem Wachstum von Einzelkolonien wurden die Platten anschließend bei 4°C gelagert. Eine Passage der Bakterien erfolgte alle 14 Tage. Für alle Experimente wurden Keime aus den Passagen 2-5 herangezogen. Für die Langzeitlagerung wurden die Mikroorganismen unter Einsatz des Microbank™-Systems bei -70°C aufbewahrt. Vor den Experimenten wurde jeweils eine Kolonie der Bakterien in IMDM über Nacht bei

37°C im Brutschrank unter leichtem Schütteln für 18 h inkubiert. IMDM wurde an Stelle von herkömmlichen Flüssigkulturmedien wie beispielsweise HHD eingesetzt, da es sich um ein vollsynthetisches Zellkulturmedium handelt. So können unerwünschte Nebenwirkungen durch nicht exakt definierbare Mediumbestandteile vermieden werden.

Daraufhin erfolgte eine 1:20 Verdünnung der Übernachtskultur (wieder in IMDM) und eine weitere Inkubationsphase im Brutschrank, bis die Bakterien die Zelldichte der beginnenden exponentiellen Phase erreicht hatten. Diese wurde anhand der optischen Dichte mittels eines Photometers ermittelt. Bei einer gemessenen Absorption (595 nm) von 0,2-0,6 wurde die Inkubation gestoppt, und die Bakterien für die weiteren Experimente vorbereitet.

### **2.2.2 Wachstumsanalyse der verwendeten *S. aureus*-Stämme**

Um einen Vergleich des Wachstums in IMDM zwischen den verschiedenen Stämmen zu ermöglichen und die Zeitpunkte der exponentiellen, post-exponentiellen und stationären Phase bestimmen zu können, wurden die Staphylokokken wie in 2.2.1 beschrieben in Flüssigkultur inkubiert. Nach einer 1:20 Verdünnung erfolgte eine stundenweise Messung der optischen Dichte bis 8 h, sowie nach 1 h / 3 h / 5 h eine Verdünnungsreihe mit anschließender Kultur auf HHD-Agar-Platten, um die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten/ml zu ermitteln (angewendete Verdünnungsreihe siehe 2.5.2).

### **2.2.3 Gewinnung von bakteriellem Überstand**

Für die Untersuchung der Interaktion von *S. aureus* Exoproteinen mit dem menschlichen Immunsystem wurde bakterieller Überstand gewonnen. Je nach Versuchsansatz handelte es sich dabei um einfach- oder aufkonzentrierten Überstand. Für die Gewinnung wurden die verschiedenen Stämme wie in 2.2.1 beschrieben in Flüssigmedium kultiviert. Nach entsprechender Inkubationszeit (6 h / Übernachtskultur für Aufkonzentrierung) erfolgte für die Trennung der flüssigen Phase von den Bakterienzellen ein Zentrifugationsschritt (4000 rpm-3220 x g / 10 min). Um weitere Bakterienreste zu entfernen wurde der Überstand abgenommen und mit einem Sterilfilter (0,2 µ) filtriert. Die Lagerung der entsprechenden Stammüberstände wurde bei -70°C durchgeführt. Für die Aufkonzentrierung erfolgte vor dem Einfrieren ein weiterer Zwischenschritt. Der filtrierte Überstand wurde mit Hilfe von Protein-Konzentratorröhrchen (> 9 kDa) nach Herstellerangaben 25-fach aufkonzentriert und aliquotiert. Die entsprechende finale Menge an Protein bzw. der verwendete prozentuale Anteil an Überstand wird in den jeweiligen Experimenten beschrieben.

#### **2.2.4 Ermittlung des mittleren corpuskulären Volumens der bakteriellen Einzelkolonien in Flüssigkultur**

Die Größe der Bakterienzellen innerhalb der Flüssigkultur wurde mit Hilfe einer Coulter-Counter-Messung ermittelt. Diese basiert auf der so genannten „Electrical Sensing Zone Method (ESZ)“, bei der die Größe von Partikeln mit Veränderungen im elektrischen Feld korreliert wird. Da die Bakterien aufgrund von Kontaminationsgründen vor der Messung abgetötet werden mussten, wurde ein Aliquot einer Übernachtflüssigkultur 1:100 in FACS-Lysing-Solution verdünnt. 100 µl dieser Verdünnung wurden zu 8 ml filtrierter Isoton-Lösung gegeben und analysiert. Das Ergebnis liefert sowohl Angaben zur Partikelkonzentration wie auch zum mittleren corpuskulären Volumen (MCV) der Bakterienzellen.

#### **2.2.5 Epsilometer-Test (E-Test)**

Zur Bestätigung der Array-Ergebnisse in Bezug auf die Oxacillin-Resistenz wurde ein Elutriations-Test mit den verwendeten Stämmen durchgeführt. Die Methode erfolgte durch die Verwendung eines Kits nach den Angaben des Herstellers. Der Test basiert auf der Bestimmung der mittleren Hemmkonzentration (MHK) von Oxacillin im Hinblick auf die verwendeten Keime.

#### **2.2.6 Ermittlung der Fibrinogen-Bindungskapazität**

Um die Fibrinogen-Bindungskapazität der verschiedenen Stämme zu testen, wurden die Bakterien der Übernachtskultur (Flüssigkultur) zweimal mit NaCl (0,9 %) gewaschen, und mit humanem Fibrinogen (1 mg / ml) für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte eine Inkubation mit einem FITC-markierten anti-Fibrinogen-Antikörper für 30 min bei 4°C. Die weitere Aufbereitung der Proben und die Analyse am FACS-Durchflusszytometer wird in 2.4.4 genauer beschrieben. Um eine unspezifische Bindung des fluoreszenzmarkierten Antikörpers beispielsweise an bakterielles Protein A zu verhindern, wurden die Proben mit Ziege-IgG-Antikörpern (100 µg / ml) vorinkubiert.

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Analyse des Exoproteinprofils mittels SDS-Gelelektrophorese

Um potenzielle Unterschiede im Exoproteinprofil der einzelnen Stämme festzustellen, wurde mit aufkonzentrierten Überständen (siehe 2.2.3) der Übernachtskultur eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Behandlung der Proben wurde wie folgt durchgeführt:

- 1:2-Verdünnung in Lämmli-Puffer (mit Mercapto-Ethanol)
- 5 min, 95°C
- Stopp der Reaktion auf Eis
- Auftragen der Proben auf das SDS-Gel (15 %) und Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld (gleichzeitiges Mitführen eines Protein-Standards)
- Gesamtproteinfärbung mit Flamingo-Fluoreszenz-Färbung nach Gebrauchsanweisung des Herstellers: 2 h Fixierung des Gels in 40 % EtOH / 10 % Essigsäure und nachfolgende Inkubation in Fluoreszenzfarbstoff (Flamingo Fluorescent Gel Stain).
- Analyse des Gels mit Fluoreszenzscanner und Gel-Evaluationssoftware

### 2.3.2 Nachweis und Konzentrationsbestimmung des „Chemotactic-Inhibiting Protein“ (CHIPS) im bakteriellen Überstand mittels ELISA

Als Bestätigung der Array-Ergebnisse auf Proteinebene und zur Ermittlung der genauen CHIPS-Konzentration wurde ein „Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay“ (ELISA) durchgeführt. Die Methode erfolgte ähnlich wie in Rooijackers *et al.*, 2006 beschrieben. Der genaue methodische Ablauf ist nachfolgend aufgelistet:

- Vorinkubation des bakteriellen Überstands (6 h + Übernachtskultur) 1 h mit Ziegen-IgG-Antikörpern (100 µg / ml), um potenzielle antikörperbindende Proteine wie Protein A mit Antikörpern abzusättigen
- Auftragen der Proben, sowie des Proteinstandards aus rekombinantem CHIPS, auf eine spezielle proteinbindene 96-well-Platte (Nunc Maxisorp) und Inkubation über Nacht bei 4°C
- 1 x Waschschrift mit Waschpuffer (PBS + 0,05 % Tween)



- Auftragen von Blockpuffer (PBS + 1 % FCS) und Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur (RT)
- 2 x Waschschrift mit Waschpuffer (PBS + 0,05 % Tween)
- Vorinkubation des CHIPS-spezifischen Erstantikörpers mit maus-spezifischem-HRP-konjugierten Zweitantikörper für 1 h bei RT
- Auftragen der Antikörpermischung und Inkubation für 2 h bei RT
- 3 x Waschschrift mit Waschpuffer (PBS + 0,05 % Tween)
- Auftragen der Substratlösung (TMB) für 30 min
- Stopp der Enzymreaktion durch Zugabe von 1 M Schwefelsäure
- Analyse der Lichtabsorption bei 450 nm / Referenz 540 nm im TECAN-Reader
- Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des rekombinanten Proteins

### **2.3.3 Nachweis und relative Konzentrationsbestimmung des $\alpha$ -Hemolysin im bakteriellen Überstand mittels ELISA**

Als Bestätigung der Array-Ergebnisse auf Proteinebene und Ermittlung der relativen -  $\alpha$ -Hämolysin-Konzentration wurde ein „Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay“ (ELISA) durchgeführt. Die Methode erfolgte ähnlich wie in 2.3.2 beschrieben. Der genaue methodische Ablauf ist nachfolgend aufgeführt:

- Schritte 1-5 siehe 2.3.2 (diesmal nur mit Übernachtskultur und ohne Proteinstandard durchgeführt)
- Auftragen des HRP-konjugierten-Schaf-anti- $\alpha$ -Hämolysin-Antikörpers für 1 h bei RT
- 3 x Waschschrift mit Waschpuffer (PBS + 0,05 % Tween)
- restliche Schritte siehe 2.3.2
- da keine Verdünnungsreihe Proteins mitgeführt werden konnte, wurde nur die relative Konzentration ermittelt

### **2.3.4 Nachweis und Konzentrationsbestimmung des bakteriellen Enzyms Staphylokinase im bakteriellen Überstand**

Als Bestätigung der Array-Ergebnisse auf Proteinebene und zur Ermittlung der Staphylokinase-Konzentration wurde ein Plasminogen-Aktivierungs-Assay durchgeführt. Die Methode

erfolgte wie in Jin *et al.* (2004b) beschrieben. Sie basiert auf der Staphylokinase-abhängigen Spaltung des Plasminogen in Plasmin, welches wiederum mit einem Chromophor interagiert, was zu einem Farbumschlag führt. Der genaue methodische Ablauf ist nachfolgend aufgeführt:

- Erstellung eines Gemisches aus humanem Glu-Plasminogen (15 µg/ml) + Chromophor (0,5 µg / ml) + bakterieller Überstand (Übernachtkultur) und Erstellung eines Gemisches aus humanem Glu-Plasminogen (15 µg / ml) + Chromophor (0,5 µg / ml) + Standard aus rekombinanter Staphylokinase in 96 well-Platte
- 10 min, 37°C
- Analyse des potenziellen Farbumschlags im TECAN-Reader (405 nm / Referenz 540 nm)
- Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des rekombinanten Proteins

## **2.4 Zellbiologische Methoden und Durchflusszytometrie**

### **2.4.1 Blutabnahme**

Die Blutabnahme erfolgte bei Probanden im Alter von 21-59 Jahren. Diese wurden vor jeder Blutspende nach eventuellen Erkrankungen bzw. Medikamenteneinnahmen befragt, die als Ausschlusskriterien für weitergehende Studien gelten würden. Zusätzlich wurde ein „Kleines Blutbild“ erstellt, um potenzielle pathologische Veränderungen der Blutkonstitution festzustellen, die ebenfalls als Ausschlusskriterien gelten würden. Die gemessenen Parameter enthielten: WBC (weiße Blutkörperchen), RBC (rote Blutkörperchen), HgB (Hämoglobin), Hct (Hämatokrit), MCV (mittleres corpusculäres Volumen RBC), MCH (mittleres corpuskuläres Volumen Hämoglobin), MCHC (mittlere corpuskuläre Hämoglobinkonzentration, Plt. (Blutplättchen). Die Koagulation des Blutes wurde durch die Zugabe von Heparin (10 IE / ml) inhibiert. Die Ethik-Kommission der „Ärzte-Kammer Nordrhein“ akzeptierte den Studienplan und die schriftliche Probandeninformation. Eine schriftliche Zustimmung zur Blutspende wurde vor der Entnahme von jedem Probanden eingeholt.

### 2.4.2 Isolierung von neutrophilen Granulozyten aus Vollblut

Die Isolierung der neutrophilen Granulozyten aus dem Vollblut erfolgte mittels einer Dextran/Percoll-Dichtegradientenzentrifugation. Der genaue methodische Ablauf ist nachfolgend beschrieben:

- heparinisiertes Vollblut wird 1:1 mit Dextran (2 %) gemischt
- 20 min, 37°C
- Überstand mit 1:1 RPMI (ohne Phenolrot) gemischt
- mit 66 % und 76 % Percoll in 50 ml Röhren unterschichtet
- Zentrifugation: 30 min, 600 x g (ohne Bremse)
- 1. (Lymphozyten + Monozyten) und 2. Phase (Granulozyten) getrennt
- Waschschrift mit 20 ml RPMI (ohne Phenolrot)
- Waschschrift mit 10 ml NaCl (0,9 %)
- Zellpellets in 1 ml IMDM resuspendiert
- Einstellung der gewünschten Zellzahl nach Zellzählung in Zählkammer
- Aliquot von 1. und 2. Phase für Reinheits- und Aktivitätsbestimmung im Durchflusszytometer
- Aufbereitung der Proben und Messung im Durchflusszytometer siehe Abschnitt 2.4.4
- Granulozyten-Gating-Parameter: Forward / Side-Scatter Charakteristika und CD11b<sup>+</sup> Population

### 2.4.3 Plasmaentfernung aus Vollblut

Für die Entfernung des Plasmas wurde folgender methodischer Ablauf angewendet:

- 5 ml Vollblut in 15 ml Röhren
- Zentrifugation: 3000 rpm (1811 x g), 10 min
- Überstand verworfen und Zellsuspension mit 10ml IMDM gewaschen
- Zentrifugation: 3000 rpm (1811 x g), 10 min
- Überstand verworfen und Zellsuspension mit 10 ml IMDM gewaschen
- Zentrifugation: 3000 rpm (1811 x g), 10 min
- Überstand verworfen und Zellsuspension in IMDM / 5 % FKS auf 5 ml (Ausgangsmenge) resuspendiert

- Erstellung eines kleinen Blutbilds zum Vergleich mit vorher analysiertem Vollblut
- Einsatz der Zellsuspension in den jeweiligen experimentellen Ansätzen

#### **2.4.4 Vorbereitung der Proben für das Durchflusszytometer**

Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurden die einzelnen Proben, bei denen es sich um Vollblut, Vollblut ohne Plasma oder auch isolierte Granulozyten handeln kann, auf Eis gelagert, bis alle Proben des jeweiligen Experiments zur weiteren Aufbereitung bereitstanden. Daraufhin wurden die Proben mit den entsprechenden Antikörpern bzw. Antikörpercocktails weiterhin auf Eis für 30 min inkubiert (bei Verwendung des Antikörpers anti-CD62L wurde eine Erythrozytenlyse mit Pharm-Lyse-Puffer vorgeschaltet, da die Antikörperbindung im Vollblut beeinträchtigt war). Es folgte eine Erythrozytenlyse und Fixierung der Zellen mit FACS-Lyse-Puffer für 20 min bei RT. Nach einem ein- bis dreimaligen Waschschrift mit NaCl für Proben mit bereits isolierten Granulozyten bzw. Proben mit noch vorhandenen Erythrozyten erfolgte die Messung an den entsprechenden Durchflusszytometern. Abweichungen vom Protokoll, verwendete Antikörper und Gating-Parameter werden in den einzelnen Assays genauer beschrieben.

## **2.5 Interaktionsassays *S. aureus* / neutrophile Granulozyten**

### **2.5.1 Chemotaxis**

Das Potenzial der *S. aureus*-Stämme zur Aktivierung von humanem Serum wurde durch die Chemotaxis-Induktion der neutrophilen Granulozyten bestimmt. Dafür wurde folgender methodischer Ablauf verwendet:

#### Plasmaaktivierung:

- Abfüllen von 5 ml heparinisiertem Vollblut in Serumröhrchen
- Zentrifugation: 4000 rpm (3220 x g), 10 min
- Abnahme des Überstands/Serums
- Inkubation des homologen Serums für 1 h (37°C) mit lebenden Bakterien der jeweiligen Stämme ( $1 \times 10^9$  / ml)
- Zentrifugation: 10000 rpm (12781 x g), 2 min

- Abnahme des Überstands/aktivierten Plasmas und Einsatz als Chemoattraktor im Chemotaxis-Assay

Als Negativkontrolle wurde das Plasma 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert und die Probe wie oben beschrieben mit Bakterien inkubiert. Als Positivkontrolle diente eine Plasmaaktivierung mit Zymosan (0,25 mg / ml) anstelle von Bakterien. Zusätzlich wurde eine plasmaunabhängige Positivkontrolle mit fMLP ( $10^{-8}$ M) mitgeführt.

#### Zellisolation:

Für den Chemotaxis-Assay wurden isolierte neutrophile Granulozyten verwendet. Die Methode der Isolierung wurde wie in 2.4.2 beschrieben durchgeführt.

#### Chemotaxis-Assay:

Der Chemotaxis-Assay wurde als Unter-Agarose-Zellmigrations-Assay mit leichten Veränderungen nach dem Protokoll von Heit *et al.* (2003) durchgeführt (Schmidt *et al.*, 2009). Der Prozentansatz von Agarose im Agarosegel wurde von 1.6 % auf 1.0 % und die Anzahl der eingesetzten Zellen von  $1 \times 10^5$  auf  $5 \times 10^4$  Zellen / Gel gesenkt. Der genaue methodische Ablauf wird nachfolgend beschrieben:

- 10 ml HBSS + 20 ml RPMI (ohne Phenolrot) / 20 % FCS auf 68°C im Wasserbad erhitzt
- 0,4 g Agarose in 10ml dest. H<sub>2</sub>O durch Erhitzen gelöst
- HBSS + RPMI-Mischung mit Agarose-Lösung gemischt
- je 3 ml der Mischung in kleine Petrischalen gefüllt
- 30 min abkühlen lassen
- mit Hautstanze und Passform drei Löcher in gleichem Abstand in die Agarose gestochen



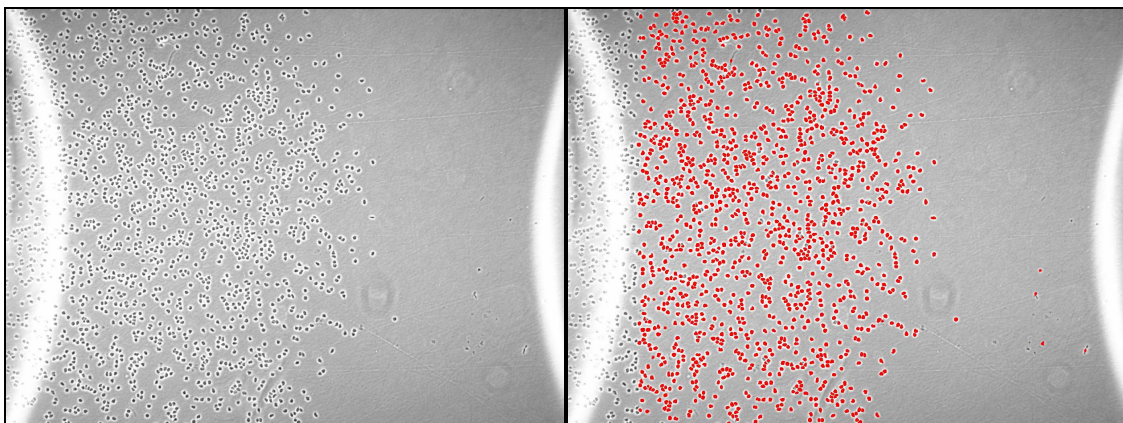
**Abbildung 9: Einfügen von drei identischen Vertiefungen in das vorher hergestellte Agarosegel.** (im Bild: Hautstanze, Passform, Petrischale mit Agarosegel)

- Gel in Löchern mit Hilfe von Wasserstrahlpumpe entfernt
- Äquilibrierung der Schale für 1 h bei 37°C (5 % CO<sub>2</sub>) im Inkubator
- Einfüllen von 50 µl Zellsuspension in mittleres Loch / Chemoattraktor links / Negativkontrolle (IMDM) rechts



**Abbildung 10: Funktionsbereites Agarosegel mit Vertiefungen zum Einfüllen der Chemattraktoren bzw. der Negativkontrolle.** (links: Chemoattraktor, Mitte: Zellsuspension, rechts: IMDM-Negativkontrolle)

- 2 h, 37°C (5 % CO<sub>2</sub>) Inkubationszeit im Inkubator
- Analyse der Anzahl der migrierten Zellen und der Länge der zurückgelegten Strecke mit AxioVision Software



**Abbildung 11: Aufnahme der Zellen nach erfolgter Migration (Axiovert 40c; 50 x Vergrößerung).** Links: Foto vor Analyse; Rechts: Foto nach Analyse mit AxioVision Software. Programm wurde in Vorversuchen so konfiguriert, dass pro Zelle ein Ereignis gezählt wird. Jeder rote Punkt bzw. Zelle entspricht einem Ereignis.

### 2.5.2 Killing von *S. aureus* durch neutrophile Granulozyten

Das Abtöten der verwendeten *S. aureus*-Stämme durch neutrophile Granulozyten wurde in einem so genannten Killing-Assay untersucht. Dabei wurde neben dem Vergleich der verschiedenen Erreger ebenfalls der Einfluss des bakteriellen Überstands auf diese Immunkomponente untersucht. Der genaue methodische Ablauf wird nachfolgend beschrieben:

#### Bakterienkultur:

- Gewinnung der Bakterien aus der Flüssigkultur (OD 0,2 - 0,6 siehe 2.2.1)
- Zentrifugation: 10000 rpm (12781 x g), 1 min
- Waschschrift mit NaCl (0,9 %)
- Bakterienpellet in 500 µl NaCl (0,9 %) aufgenommen
- 2 x 90 sec im Ultraschallbad zur Zelltrennung
- Bestimmung der Zelldichte mit CoulterCounter- Messung ( siehe 2.2.4)

#### Zellisolation:

Isolierung der neutrophilen Granulozyten und Serumgewinnung wie in 2.4.2 beschrieben und Einstellung der Zellzahl auf  $2,5 \times 10^6$  / ml mit 5 % intaktem homologem Serum

#### Inkubation Granulozyten und Bakterien:

- Einstellung der Bakteriendichte auf Verhältnis von 5:1 zu Granulozyten
- Bei Proben mit Überstand erfolgte eine 15 min Vorinkubation mit aufkonzentriertem Überstand (final 1 : 200). In Proben ohne Überstand wurde die entsprechende Menge an IMDM verwendet (Negativkontrolle)
- Inkubation der Co-Kultur für 2 h bei 37°C im Intelli-Mixer („Über-Kopf-Schütteln“, Programm F4/06 UpM)

#### Verdünnungsreihe und Ausplattieren der Zellsuspension:

- 0 min-Wert wurde direkt zu Beginn aus der Zellsuspension (Granulozyten + Bakterien) entnommen
- Verdünnungsreihe der jeweiligen Ansätzen von 0 min- und 120 min  $10^{-1}$  bis  $10^{-5}$
- Ausplattieren der verschiedenen Verdünnungsstufen auf HHD-Agar-Platten
- Inkubation 37°C, 18 h
- Auszählen der Einzelkolonien und Umrechnung auf Kolonie bildende Einheiten/ml

- die Differenz zwischen dem Wert „log Wert 120 min“ und „log Wert 0 min“ ergibt jeweilige Killing-Rate

### **2.5.3 Lyse der neutrophilen Granulozyten durch bakteriellen Überstand**

Um das Potential des bakteriellen Überstands in der Lyse von neutrophilen Granulozyten zu testen, wurden isolierte Granulozyten mit den jeweiligen *S. aureus*-Überständen inkubiert und die Anzahl an toten Zellen bestimmt. Der genaue methodische Ablauf wird nachfolgend beschrieben:

- Isolierung der neutrophilen Granulozyten wie in 2.4.2 beschrieben
- Einstellung der Zelldichte auf  $2,5 \times 10^6$  / ml in IMDM / 5 % hitzeinaktiviertes homologes Serum
- Inkubation der Granulozyten mit aufkonzentriertem Überstand (final 1 : 25 entsprechende Proteindichte > 9 kDa der Übernachtskultur) für 10 min, 37°C  
Negativkontrolle: IMDM; Positivkontrolle: Zellfixierung mit FACS-Lyse
- Stopp der Reaktion auf Eis
- Zugabe von Totzell-Farbstoff Ethidiumbromid (final 1,125 µg / ml) und direkte Messung im FACS-Durchflusszytometer
- Gating-Parameter werden in Abschnitt „Ergebnisse“ dargestellt

### **2.5.4 Zytokinfreisetzung und Hämolyse im Vollblut nach Inkubation mit bakteriellem Überstand**

Um eine mögliche Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen im Vollblut nach Stimulation mit bakteriellem Überstand zu untersuchen, wurden nach entsprechender Aktivierung verschiedene „Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay´s“ (ELISA´s) durchgeführt. Der genaue methodische Ablauf ist nachfolgend aufgelistet:

- Inkubation von heparinisiertem Vollblut mit 5 % des jeweiligen Bakterienüberstands (6 h-Kultur) für 6 h, 37°C (5 % CO<sub>2</sub>) in Zellkulturschalen; Negativkontrolle: IMDM; Positivkontrolle: LPS (10 ng/ml)
- Zentrifugation: 3000 rpm (1811 x g), 15 min
- Abnahme des Plasmaüberstands



- Für Hämolysebestimmung Verdünnung eines Teils des Plasma 1:2 mit NaCl (0,9 %) und Messung der optischen Dichte im TECAN-Reader (415 nm, siehe Fairbanks *et al.*, 1992).
- Für spätere Zytokinmessung Lagerung des restlichen Plasmas bei -70°C
- Bestimmung der Zytokinkonzentration mittels ELISA-Kit (gemessene Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-8, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) nach Angaben des Herstellers

### **2.5.5 Messung der Lactoferrinkonzentration im Vollblut nach Inkubation mit bakteriellem Überstand und anderen Stimulanzen**

Um eine mögliche Freisetzung von Lactoferrin im Vollblut nach Stimulation mit bakteriellem Überstand zu untersuchen wurden nach entsprechender Aktivierung ein „Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay“ (ELISA´s) durchgeführt. Der genaue methodische Ablauf ist nachfolgend aufgelistet:

- Überstandgewinnung wie in 2.2.3 beschrieben (24 h-Kultur/ 25 fach konz.)
- 45 minütige Inkubation von Vollblut mit aufkonzentriertem SaS (1:100), fMLP (2 x 10<sup>-8</sup>M), LPS (10 ng / ml), C5a (2 x 10<sup>-7</sup>M)
- Zentrifugation: 3000 rpm (1811 x g), 10 min
- Abnahme des Überstands (Plasmagewinnung)
- es erfolgte eine parallele Untersuchung der CD66b-Expression (siehe 2.4)
- Lagerung der Plasmaproben bei -70°C
- Durchführung des Lactoferrin-ELISA nach den Angaben des Herstellers

### **2.5.6 Aktivierung von neutrophilen Granulozyten durch bakteriellen Überstand**

Die Untersuchungen zur Aktivierung der neutrophilen Granulozyten durch bakteriellen Überstand zeichnen sich durch einen identischen experimentellen Ablauf aus. Dies bietet die Möglichkeit die Ergebnisse der verschiedenen Versuchsreihen für die Auswertung zu kombinieren. Der genaue methodische Ablauf wird nachfolgend beschrieben:

- Inkubation der neutrophilen Granulozyten mit verschiedenen Stimuli und aufkonzentriertem Bakterienüberstand

- Abnahme von 40 µl der jeweiligen Probe (200 µl für ImageStream-Analyse) zu den jeweils festgelegten Inkubationszeiten und Lagerung auf Eis
- Messung der Rezeptorexpression durch Antikörperfärbungen (genaue Angaben siehe Erläuterungen zu Versuchsreihen)
- Aufbereitung der Proben für die Analyse im Durchflusszytometer siehe 2.4.4
- Analyse im FACS- oder ImageStream<sup>x</sup> Durchflusszytometer; Gating-Parameter für neutrophile Granulozyten: Einzelzellgating + CD66b<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-Zellfraktion; Gating-Parameter für Neutrophil-Aggregate siehe „Analyse der Zell-Aggregate und fotografische Dokumentation“

### **Durchgeführte Versuchsreihen:**

#### **1. Aktivierungs-Assay A 15 min / 45 min**

- eingesetzte Stimuli: fMLP ( $2 \times 10^{-8}$ M), LPS (10 ng / ml), C5a ( $2 \times 10^{-7}$ M), SaS ST9 a, b, c (1:100)
- analysierte Zeitpunkte nach Stimulus-Zugabe: 15 min / 45 min
- verwendete Zellsuspensionen: Vollblut
- eingesetzte spezifische Antikörper: CD66b FITC, CD11b PE, CD18 PE-Cy5, CD62L APC
- Durchflusszytometer: FACS

#### **2. Aktivierungs-Assay B 15 min / 45 min**

- eingesetzte Stimuli: fMLP ( $2 \times 10^{-8}$ M), SaS ST9 a, b, c (1 : 100)
- analysierte Zeitpunkte nach Stimulus-Zugabe: 15 min / 45 min
- verwendete Zellsuspensionen: Vollblut
- eingesetzte spezifische Antikörper: CD66b FITC, CD11b PE, CD18 PE-Cy5, CD11c PE-Cy5, CD11a FITC
- Durchflusszytometer: FACS

#### **3. Aktivierungs-Assay C 15 min / 45 min**

- eingesetzte Stimuli: fMLP ( $2 \times 10^{-8}$ M), SaS ST9 a, b, c (1:100)
- analysierte Zeitpunkte nach Stimulus-Zugabe: 15 min / 45 min
- verwendete Zellsuspensionen: Vollblut / Vollblut ohne Plasma

- eingesetzte spezifische Antikörper: CD66b FITC, CD11b PE, CD18 PE-Cy5
- Durchflusszytometer: ImageStream<sup>x</sup>

#### 4. Aktivierungs-Assay D 15 min / 45min

- eingesetzte Stimuli: fMLP ( $2 \times 10^{-8}$ M), SaS ST9 a (1:100)
- analysierte Zeitpunkte nach Stimulus-Zugabe: 15 min / 45 min
- verwendete Zellsuspensionen: isolierte neutrophile Granulozyten
- eingesetzte spezifische Antikörper: CD66b FITC, CD11b PE, CD18 PE-Cy5
- Durchflusszytometer: FACS

#### 5. Aktivierungs-Assay „Kreuzvernetzung“

- eingesetzte Stimuli: fMLP ( $2 \times 10^{-8}$ M), SaS ST9 a (1:100) +/- CD66b IgM (3 $\mu$ g/ml)/ Maus IgM (3 $\mu$ g/ml)
- analysierte Zeitpunkte nach Stimulus-Zugabe: 45 min
- verwendete Zellsuspensionen: Vollblut
- eingesetzte spezifische Antikörper: CD11b PE
- Durchflusszytometer: ImageStream<sup>x</sup>

#### 6. Aktivierungs-Assay W-54011

- eingesetzte Stimuli: fMLP ( $2 \times 10^{-8}$ M), C5a ( $2 \times 10^{-7}$ M), SaS ST9 a, b, c (1:100)
- eingesetzte Rezeptorantagonisten: C5aR1-Antagonist (1 $\mu$ M)  
Es erfolgte vor Stimuligabe eine 10-minütige Vorinkubation mit dem Rezeptorantagonisten bzw. IMDM (Negativkontrolle)
- analysierte Zeitpunkte nach Stimulus-Zugabe: 15 min / 45 min
- verwendete Zellsuspensionen: Vollblut / Vollblut + C5aRA
- eingesetzte spezifische Antikörper: CD66b FITC, CD11b PE, CD18 PE-Cy5
- Durchflusszytometer: FACS

#### 7. Aktivierungskinetik

- eingesetzte Stimuli: fMLP, SaS ST9 a
- analysierte Zeitpunkte nach Stimulus-Zugabe: 0 / 0,5 / 1 / 3 / 10 / 15 / 45 / 75 / 105 min

- verwendete Zellsuspensionen: Vollblut
- eingesetzte spezifische Antikörper: CD66b FITC, CD11b PE, CD18 PE-Cy5
- Durchflusszytometer: FACS / ImageStream<sup>x</sup>

### **Analyse der Aggregatbildung und fotografische Dokumentation**

Da der ImageStream<sup>x</sup> die Durchflusszytometrie mit der Fluoreszenzmikroskopie verknüpft, ist es möglich, die Zellen nicht nur anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaften sondern auch nach ihrer Morphologie zu analysieren. Dies macht eine Auswertung über die Verteilung der markierten Rezeptoren als auch eine fotografische Darstellung der Zellen möglich. Zu dem kann sehr effektiv zwischen Einzelzellen und Aggregaten anhand ihrer morphologischen Eigenschaften unterschieden werden. Ein Hauptaspekt der in dieser Arbeit erstellten Analysen betrifft die Aggregatbildung der neutrophilen Granulozyten. Alle dargestellten Fotos sind mit einem 40 x Objektiv aufgenommen worden. Die Gating-Parameter für eine präzise Charakterisierung der Dubletten werden nachfolgend dargestellt. Die Analyse erfolgte mit der IDEAS Software.

- CD66b<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen:  
Ereignisse mit Beteiligung von neutrophilen Granulozyten
- „spot count function“:  
Trennung der Populationen/Bilder mit zwei getrennten Zellen von großen bzw. zusammenhängenden Zellen
- „aspect ratio“ (Länge/Breite) und „area“ (Größe der Zelle) im Hellfeld Modus:  
Trennung von großen Einzelzellen, Dubletten und größeren Aggregaten
- „aspect ratio“ (Länge/Breite) und „area“ (Größe der Zelle) im CD66b Modus:  
Trennung von homotypischen (Granulozyt / Granulozyt) und heterotypischen Dubletten (Granulozyt / andere Blutzelle)
- Statistische Analyse der Fluoreszenz- und Populationsparameter

Für die Quantifizierung der größeren Aggregate wurden die Analyseschritte eins und drei durchgeführt.

### **Analyse der Zellaggregate im LSM 780**

Für die mikroskopische Analyse der Zellaggregate im LSM780 wurden die Zellen wie in 2.4.4 aufbereitet. Die Zellsuspension wurde auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas versehen. Die fotografische Dokumentation und Analyse erfolgte anschließend mit dem LSM 780 (40 x Objektiv) in Verbindung mit der Software ZEN2010.

## **2.6 Statistik**

Die Daten wurden in Form einer deskriptiven Statistik als Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet. Für den Test auf Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk's-Test angewandt. Mögliche signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von Anova und LSD-Tests in Form von paarweisen Vergleichen ermittelt (SPSS 17.0, IBM SPSS Statistics, Armonk, NY, USA). P-Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant angesehen.

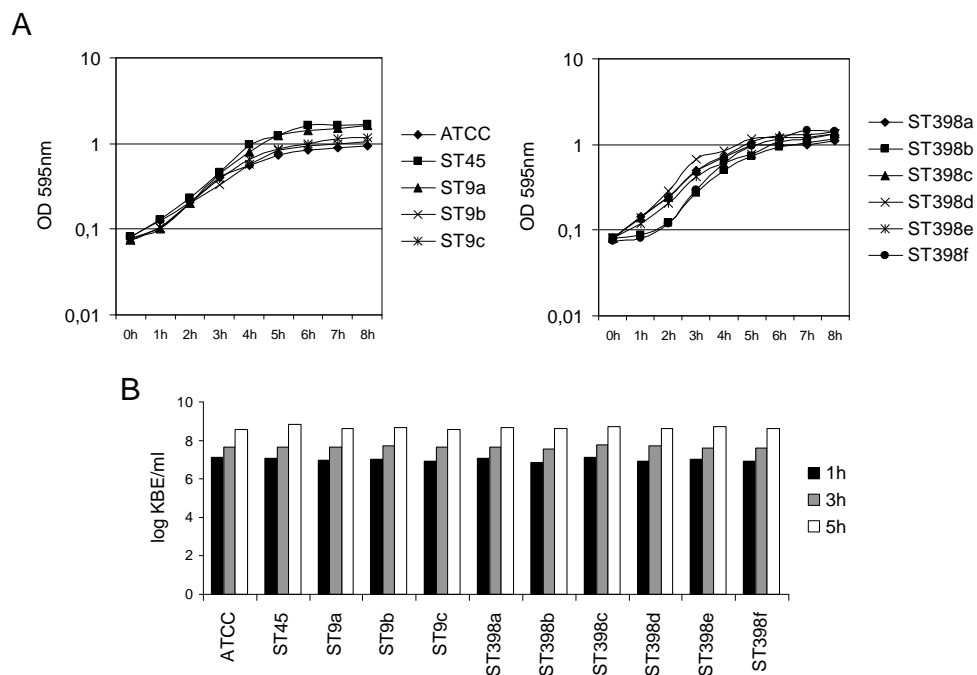
## IV Ergebnisse

### 1. Charakterisierung der *S. aureus*-Stämme

#### 1.1 Wachstumsanalyse der verwendeten *S. aureus*-Stämme

Der Wachstumsvergleich der verschiedenen Stämme in der IMDM-Flüssigkultur wurde durchgeführt, um potenzielle Wachstumsunterschiede im verwendeten vollsynthetischen Zellkulturmedium zu ermitteln. Bei nahezu identischem Wachstum sollten dann die verschiedenen bakteriellen Wachstumsphasen bestimmt werden.

Das Ergebnis des bakteriellen Wachstums zeigt für alle Stämme einen fast parallelen Verlauf. Die logarithmische Phase verläuft von 2 h bis 5 h, worauf sie in die post-logarithmische Phase (5 h - 7 h) übergeht. Danach ist die stationäre Phase des Zellwachstums erreicht. Die nur geringfügigen Abweichungen, die durch die optische Dichte ermittelten Wachstumskurven, (Abbildung 12A) konnten durch das parallel durchgeführte mikrobiologische Zellkulturverfahren bestätigt werden (Abbildung 12B). IMDM konnte somit als Flüssigkulturmedium für die weiteren Experimente eingesetzt werden.



**Abbildung 12: Wachstum der verschiedenen *S. aureus*-Stämme im vollsynthetischen Zellkulturmedium IMDM.** A, Kinetik des bakteriellen Wachstums nach Messung der optischen Dichte im UV-Photometer (595 nm). B, Bestimmung der Bakterienanzahl durch Ermittlung der koloniebildenden Einheiten (KBE) nach mikrobiologischer Kultivierung.

## 1.2 DNA-Micro-Array

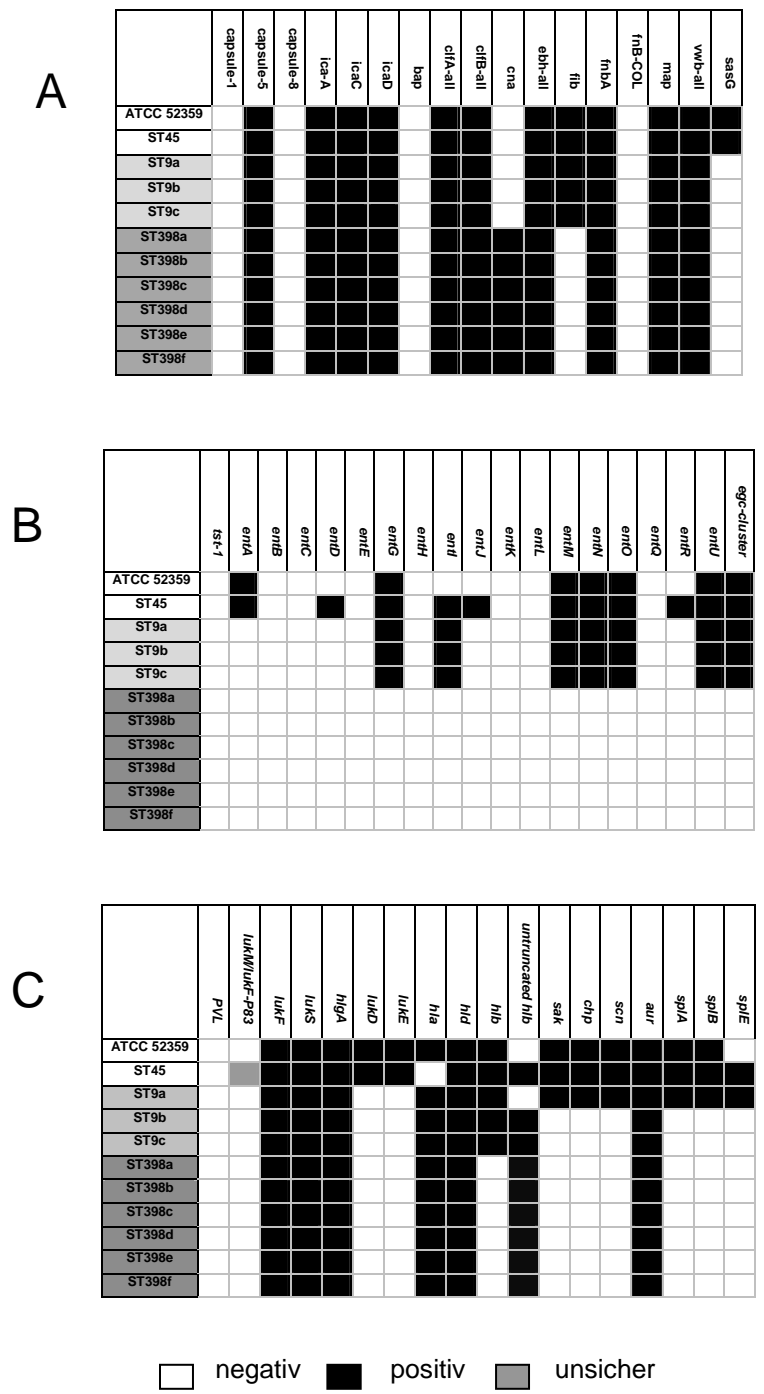
Die Adhäsionseigenschaften und die exprimierten Virulenzfaktoren bilden die zentralen Komponenten von *S. aureus* in der Interaktion mit dem menschlichen Immunsystem. Um sich einen Überblick über den genetischen Hintergrund bezüglich dieser Faktoren zu verschaffen, wurden die ausgesuchten Stämme mit Hilfe eines neuartigen Micro-Array analysiert. Dieses System erlaubt eine parallele Detektion von 330 relevanten Genen. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen eine Auswahl der wichtigsten und für diese Arbeit relevanten Adhäsions- und Virulenzfaktoren. Die kompletten Ergebnisse für die Stämme ST398c und ST398f liegen im Anhang vor.

Adhäsionsfaktoren: Abbildung 13A enthält Angaben zur Kapsel-, Biofilm- und Adhäsionsfaktor-Genen und zeigt ST-spezifische Abweichungen, aber keine Variation innerhalb der jeweiligen ST-Gruppen. In diesem Zusammenhang kennzeichnet das *cna*-Gen den ST398, das *fib*-Gen den ST9 und die Anwesenheit des *fib*- und *sasG*-Gens den ST45 und ATCC.

Virulenzfaktoren: Abbildung 13 B/C zeigt die An- oder Abwesenheit der zentralen Virulenz-Gene von *S. aureus* ab. Hier kann man im Gegensatz zu den Adhäsionsfaktoren sowohl interspezifische (zwischen den ST) als auch intraspezifische (innerhalb eines ST) ST-Unterschiede beobachten. Die ST398-Stämme unterscheiden sich deutlich von den anderen Sequenztypen durch das Fehlen jeglicher Enterotoxingene. Alle sechs untersuchten ST398-Stämme bilden eine uniforme Einheit und weisen keine intraspezifischen Unterschiede auf. Alle untersuchten Stämme wurden negativ für das *pvl*- und *tst*-Gen und positiv für die *lukF*- *lukS*-, *hlgA*-, *hla*- (außer ST45), *hld*- und *aur*-Gene getestet (Erläuterungen zu den verwendeten Abkürzungen befinden sich im Abkürzungsverzeichnis). Der Stamm ST9a, isoliert aus einem humanen Abszess, weist im Gegensatz zu ST9b und ST9c den Genlocus für *chp/sak/scn* auf. Zusammenfassung der Anzahl an positiven Resultaten für die 36 abgebildeten Gene (inklusive 17 Gene für verschiedene Enterotoxine): ATCC (21); ST45 (25); ST9a (17); ST9b (14), ST9c (17), ST398 (6, alle identisch).

Antibiotikaresistenzen: Da die Resistenzgene der Stämme für die Interaktion mit dem Immunsystem nicht von großer Bedeutung sind, wird das jeweilige Profil hier nicht tabellarisch ab-

gebildet. Trotzdem sind diese Gene ein wichtiger Bestandteil in der Charakterisierung der einzelnen *S. aureus* Stämme. Die hier erstellten Resistenzprofile weisen keine großen Unterschiede auf. Auffällig ist, dass alle Stämme positiv für *fosB* getestet wurden. Neben den ST398 und ATCC besitzen alle zusätzlich die *blaZ*-Resistenz. Die ST398 zeichnen sich durch das *tetM*-Resistenzgen aus, wobei beide Stämme porcinen Ursprungs ebenfalls das *ermC*-Gen besitzen. Positive Resultate der 33 ausgewählten Resistenzgene: ATCC (1); ST45 (5); ST9a (3); ST9b (4), ST9c (6), ST398a (6), ST398b (3); ST398c (7); ST398d (2), ST398e (4); ST398f (7).





**Abbildung 13: Genetischer Hintergrund der verschiedenen *S. aureus* Stämme.** Die Analyse erfolgte mittels eines auf *S. aureus* abgestimmten DNA-Micro-Array. Da die Methode eine hohe sehr Anzahl an Daten liefert, wurden hier nur exemplarisch die für die Interaktion mit dem Immunsystem wichtigsten Virulenz- und Adhäsionsgene abgebildet. A, Adhäsionsgene. B, Enterotoxin-Gene. C, Virulenzfaktoren neben Enterotoxinen.

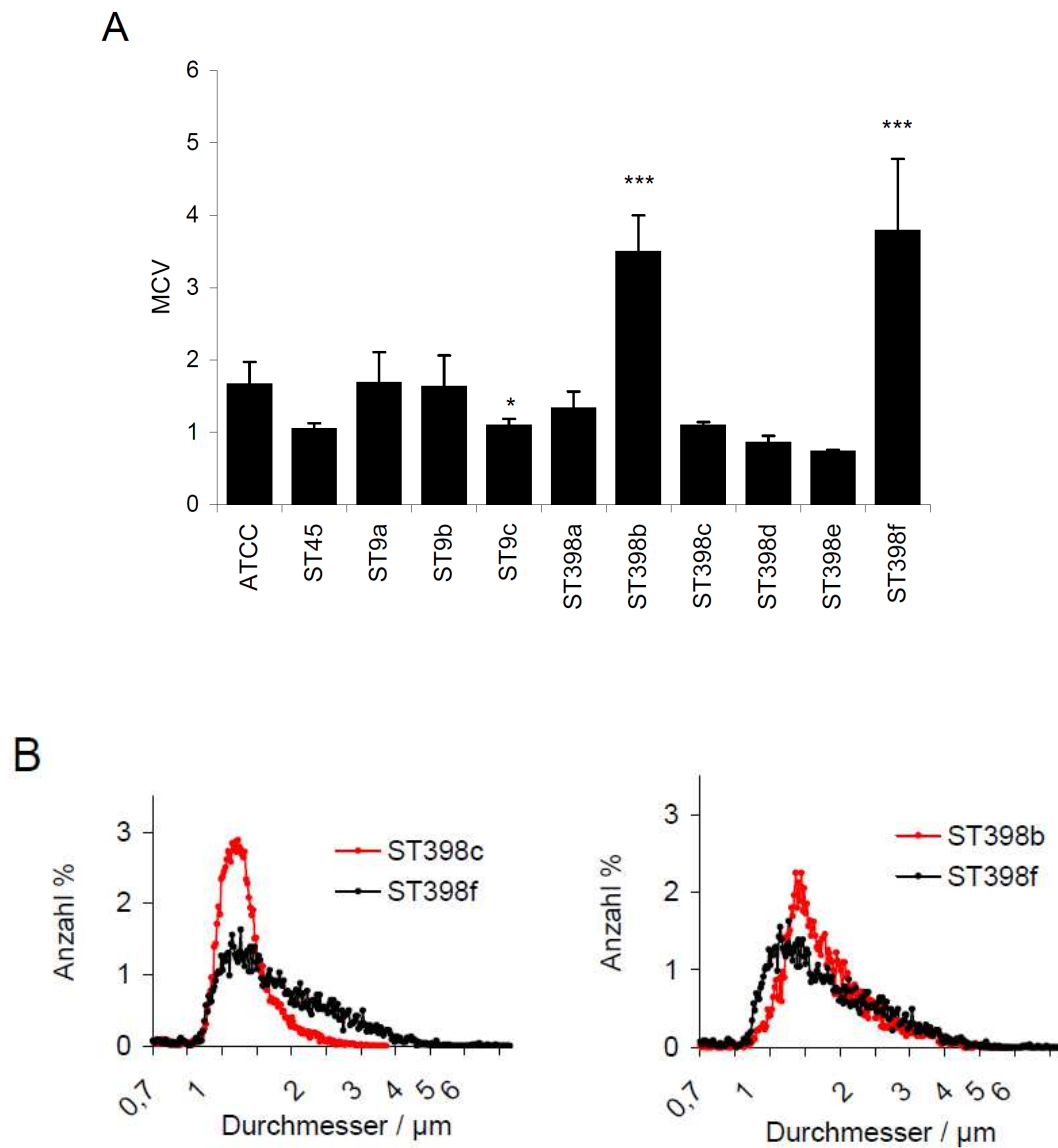
### 1.3 Epsilometer-Test (E-Test)

Der Epsilometer-Test sollte die Array-Ergebnisse bezüglich einer potenziellen Oxacillin-Resistenz bestätigen. Die Ergebnisse der beiden Methoden stimmten überein. Da es sich hierbei nur um eine Kontrollmethode handelte, wurde auf eine Abbildung der Ergebnisse verzichtet.

### 1.4 Ermittlung des mittleren corpuskulären Volumens der bakteriellen Einzelzellen bzw. Konglomerate

Die Größe bzw. das Volumen der bakteriellen Konglomerate in Flüssigkultur wurde analysiert, um innerhalb der Stämme potenzielle Unterschiede in der Zell-Zell-Adhäsion zu ermitteln.

Die Ergebnisse zeigen nur geringe Unterschiede zwischen den Sequenztypen ATCC, ST45, ST9, aber innerhalb des ST398 treten zwei Stämme auf, die sich signifikant von allen anderen durch ihr überdurchschnittliches Zellvolumen unterscheiden (Abbildung 14A). Bei ihnen ist eine Steigerung der Konglomeratgröße um das 2,5 fache zu beobachten. Geht man von einem Einzelzellvolumen von ca.  $1 \mu\text{m}^3$  aus, so bilden die Stämme ST398b und ST398f durchschnittliche Konglomeratgrößen von 3 - 4 Zellen. Ein Vergleich der Größenverteilung innerhalb der Gesamtpopulation macht dies ebenfalls deutlich (Abbildung 14B). Dieser gemessene Unterschied in der Konglomeratgröße deutet auf unterschiedliche Adhäsionseigenschaften innerhalb der verschiedenen ST398 hin.

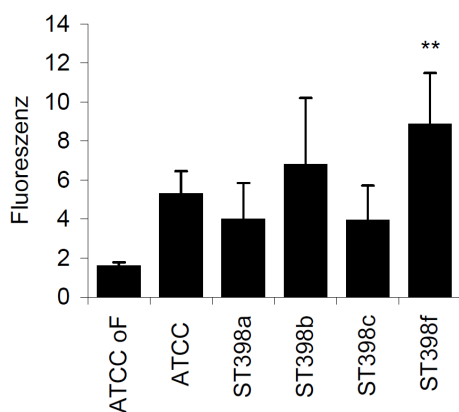


**Abbildung 14: Ermittlung der Konglomeratgrößen in Flüssigkultur.** A, Stammvergleich in Bezug auf das mittlere corpusculäre Volumen der Einzelkolonien. B, Vergleich der Stämme ST398c/ST398f und ST398b/ST398f im Hinblick auf Anzahl (y-Achse) und Zelldurchmesser (x-Achse). Die abgebildeten Daten basieren auf sechs unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige +/- Standardabweichung (n = 6; \*\*p < 0,01 \*\*\*p < 0,001 im Vergleich mit den entsprechenden Schweinestämmen).

## 1.5 Ermittlung der Fibrinogen-Bindungskapazität

Zur Adhäsion im Gewebe des Wirts und zur Abschirmung vom Immunsystem ist die Fähigkeit der Bindung von humanem Fibrinogen für *S. aureus* von großer Bedeutung. Durch den durchgeführten Test sollte das Potenzial der Fibrinogenbindung genauer untersucht werden.

Das Resultat spiegelt das Ergebnis der MCV-Analyse wieder. Die Stämme ST398b und ST398f, die schon das höchste Aggregationspotenzial besaßen, zeigen ebenfalls die höchste Fibrinogenbindungskapazität. Für den ST398f kann man im Vergleich mit dem Stamm tierischen Ursprungs eine Zunahme der gemessenen Fluoreszenz um mehr als 100 % beobachten. Es wird deutlich, dass zwei von vier Humanisolaten im Vergleich zu den anderen ST398 eine deutlich erhöhte Adhäsionsfähigkeit aufweisen.



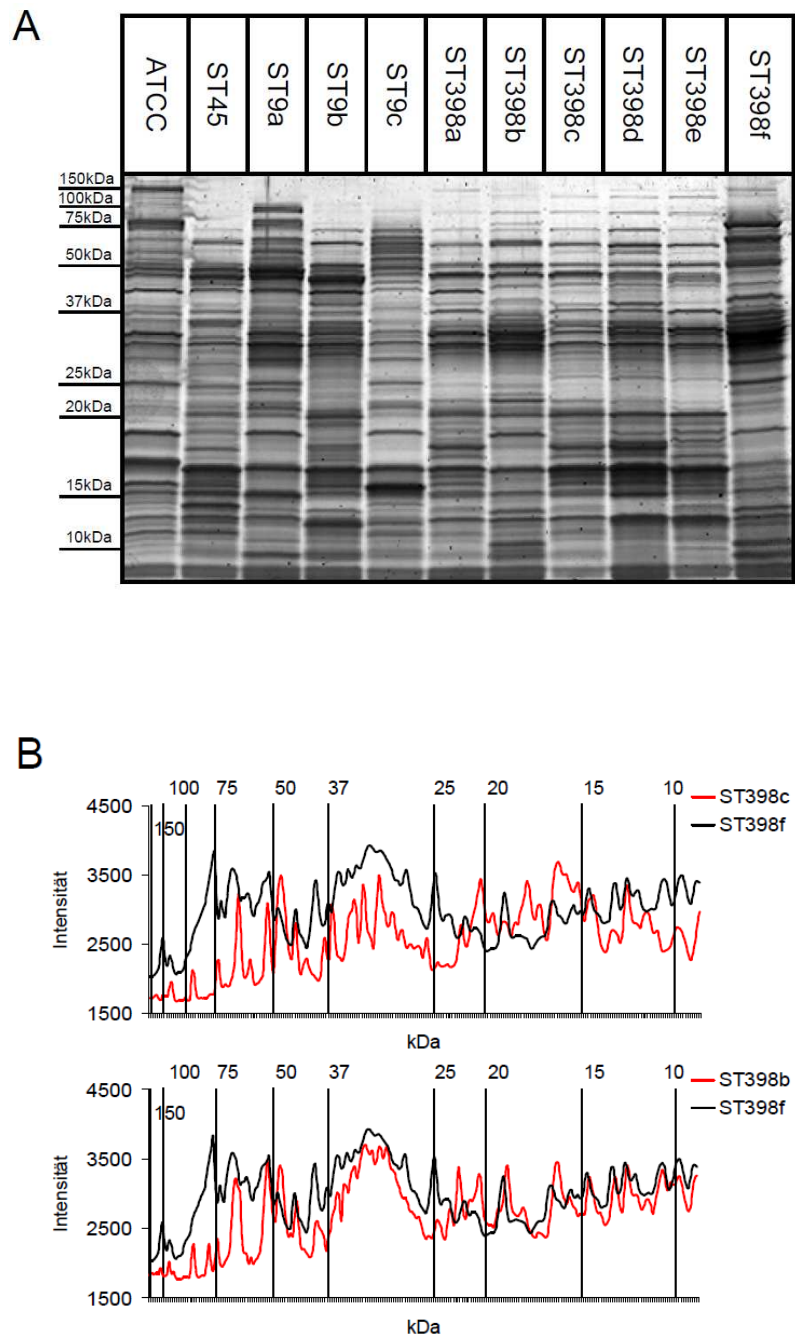
**Abbildung 15: Fibrinogenbindungskapazität der Stämme ATCC 52359 und ST398a, b, c und f.** Die Analyse erfolgte nach Inkubation mit humanem Fibrinogen (1 mg / ml) und Durchführung einer anti-Fibrinogen-Antikörperfärbung im Durchflusszytometer. Die abgebildeten Daten basieren auf sechs unabhängigen Experimenten. ATCC oF = Negativkontrolle ohne Fibrinogen. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige +/- Standardabweichung (n = 6; \*\*p < 0,01 im Vergleich mit den entsprechenden Stämmen tierischen Ursprungs).

## 1.6 Analysen auf Proteinebene

### 1.6.1 Analyse des Exoproteinprofils

Neben den zellgebundenen Eigenschaften wie dem Adhäsionsvermögen, nehmen die Exoproteine, die in den Bakterienüberstand sezerniert werden, wie schon erwähnt, ebenfalls einen zentralen Bestandteil in den Immunevasionsstrategien von *S. aureus* ein. Um sich einen Überblick über das Proteinprofil der einzelnen Stämme zu verschaffen, wurden die Proteine größenabhängig mit Hilfe einer 1D-SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, und mittels einer Gesamtproteinfärbung visualisiert. Somit erhält man zwar keine Aussage über die Art des Proteins, stattdessen aber ein Größenprofil, das ebenfalls eine Analyse von potenziellen Unter-

schieden innerhalb der Stämme möglich macht. Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde durch die Analyse des identischen Überstands in drei unabhängigen Experimenten bestätigt. Die Analyse der unterschiedlichen Profile zeigt deutliche Variationen zwischen und innerhalb der ST. Man kann große Unterschiede zwischen dem ATCC und ST45 speziell im Bereich 10 kDa - 20 kDa beobachten. Trotz der vorhandenen genetischen Unterschiede zwischen ST9b, c und ST9a scheinen die Profile von ST9a und ST9c ähnlicher zu sein. Erstaunlicherweise kann man trotz des identischen genetischen Hintergrunds die ST398 anhand der vorliegenden Muster in drei verschiedene Untergruppen unterteilen. Untergruppe A (ST398a, c, d, e) besteht aus den zwei Stämmen tierischer Herkunft und zwei menschlichen Isolaten. Sie zeichnen sich durch ein fast identisches Proteinmuster im Bereich 15 - 25 kDa und 45 - 75 kDa aus. Im Vergleich dazu zeigt der Stamm ST398f, das humane Isolat aus einem humanen Abszess (hier als Untergruppe C definiert), ein völlig anderes Proteinprofil. Klare Unterschiede liegen in der Menge an vorhandenem Protein im Bereich 30-37 kDa, in zusätzlichen Banden im Bereich von 11 kDa, 25 kDa, 30 kDa und 75 kDa und im Fehlen von Mustern in der Region zwischen 15 - 25 kDa. Der Stamm ST398b (hier definiert als Untergruppe B) repräsentiert eine intermediäre Form mit Charakteristika von Untergruppe A und C. Bei ihm können wir das typische Bandenmuster von Gruppe A zwischen 45-75 kDa, aber auch eine gesteigerte Proteinmenge in der Region 30-37 kDa und zusätzliche Banden bei 11 kDa und 75 kDa beobachten, was wiederum ein Merkmal des ST398f darstellt. Zusammenfassend unterstreichen diese klaren Unterschiede die schon bei der Analyse der Adhäsionseigenschaften festgestellten Besonderheiten von ST398b und ST398f.

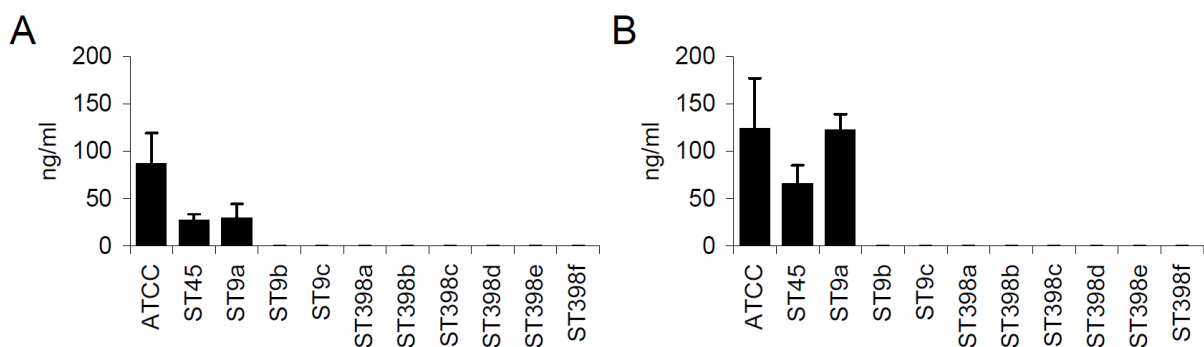


**Abbildung 16: Exoproteinmuster der verschiedenen *S. aureus*-Stämme.** A, Exoproteinmuster nach Durchführung einer SDS-Gelelektrophorese (15 %) und einer Proteinfärbung. Diese so genannte Flamingo-Fluoreszenzgefärbung (BioRad; Hercules, CA 94547) wurde mit dem Fluoreszenzscanner FLA-300 (Fuji-Film; Tokio, Japan) aufgenommen und mit der AIDA 1D-Evaluationssoftware (raytest; Straubenhardt, Deutschland) analysiert. B, Vergleich der Verteilungskurven Proteingröße (x-Achse)/Intensität (y-Achse) der Stämme ST398c/ST398f und ST398b/ST398f. Für die Reproduzierbarkeit der Methode wurde dreimal der identische Überstand und für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse vier verschiedene SaS analysiert.

## 1.6.2 Nachweis und Konzentrationsbestimmung des „Chemotactic-Inhibiting Protein“ (CHIPS) im bakteriellen Überstand

CHIPS ist ein potenter anti-inflammatorisch wirkender Virulenzfaktor, der durch die Bindung an den fMLP-Rezeptor 1, sowie den C5a-Rezeptor 1 auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten direkt Einfluss auf deren chemotaktische Aktivität nimmt (de Haas *et al.*, 2004). Um die Konzentration dieses Proteins im SaS zu bestimmen, wurde ein ELISA durchgeführt. Ein Vergleich der 6 h-Kultur mit der Übernachtskultur sollte zeigen, zu welchem Zeitpunkt die größte Menge an CHIPS im SaS vorliegt.

Das Ergebnis zeigt einen positiven Nachweis für CHIPS für die Stämme ATCC, ST45 und ST9a, und bestätigt damit auch das Resultat des Micro-Arrays. Alle drei Stämme, die als positiv für das *chp*-Gen getestet wurden, produzieren und sezernieren dieses auch in den Überstand. Auffällig sind die doch recht großen Unterschiede in der produzierten Menge. So befindet sich in der ATCC- und ST9a-Übernachtskultur im Durchschnitt die doppelte Menge mehr Protein als in der ST45-Übernachtskultur. Die Werte der 6 h-Kultur sind zwischen ST45 und ST9a dagegen ziemlich identisch. Es zeigt sich, dass nach der post-exponentiellen Phase (nach 6 h) die Produktion und Sekretion des Proteins unter diesen Kulturbedingungen bei weitem noch nicht abgeschlossen ist, und der Zeitpunkt der Sekretion zwischen den einzelnen Stämmen stark variiert.

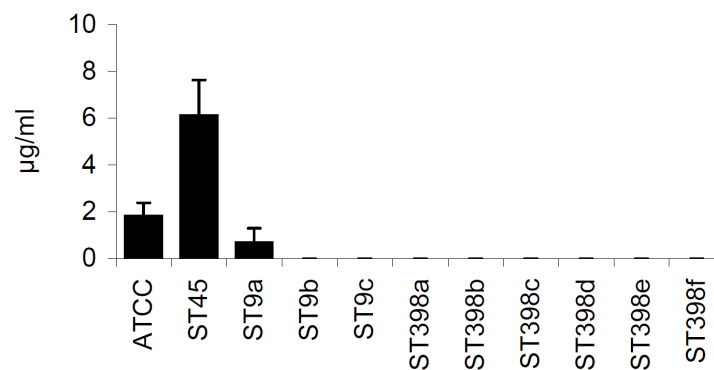


**Abbildung 17: Ermittlung der CHIPS-Konzentration im SaS.** Die Konzentration des Proteins wurde mittels ELISA bestimmt. A, CHIPS-Konzentration im SaS nach 6h-Kultivierung in IMDM (37°C). B, CHIPS-Konzentration im SaS nach 18h-Kultivierung in IMDM (37°C). Die abgebildeten Daten basieren auf sechs unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige +/- Standardabweichung (n = 6).

### 1.6.3 Nachweis und Konzentrationsbestimmung des bakteriellen Enzyms Staphylokinase im bakteriellen Überstand

Bei dem Virulenzfaktor Staphylokinase handelt es sich um ein Enzym, das durch die Spaltung von Plasminogen in Plasmin die Blutgerinnung beeinflusst. Es ist zusätzlich in der Lage, antimikrobielle Peptide der Granulozyten, so genannte Defensine, zu binden, und diese damit zu neutralisieren (Jin *et al.*, 2004c). Da sich das Staphylokinase-Gen (*sak*-Gen) zusammen mit dem *chp*- und *scn*-Gen in den meisten Fällen auf demselben Gen-Lokus befindet, müsste man eine ähnliche Expression bzw. Sekretion wie bei CHIPS erwarten.

Die Ergebnisse des Assays bestätigen in soweit den CHIPS-ELISA, als dass die Überstände der Stämme ATCC, ST45 und ST9a positiv auf dieses Protein getestet wurden. Die Menge an gemessener Staphylokinase verläuft in den verwendeten Übernachtskulturen aber gegensätzlich. ST45, der am wenigsten CHIPS produziert, sekretiert mit Abstand am meisten Staphylokinase. Dies deutet trotz identischem Gen-Lokus auf getrennte Regulationsmechanismen hin. Des Weiteren wurden durch die drei positiven und acht negativen Testergebnisse die Resultate des Micro-Array bestätigt.

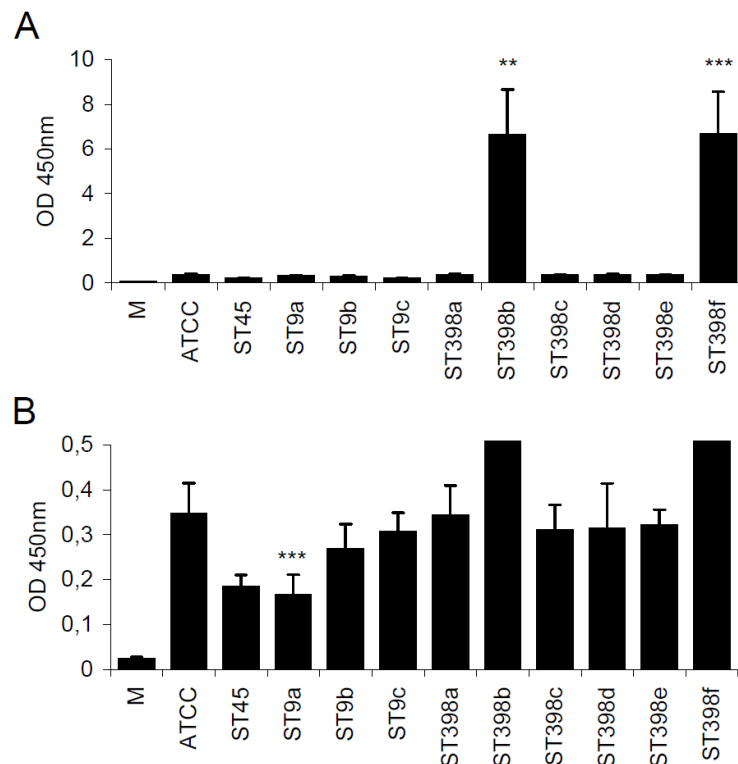


**Abbildung 18: Ermittlung der Staphylokinase-Konzentration im SaS.** Die Konzentration dieses Enzyms wurde mittels eines Plasminogen-Aktivierungsassays bestimmt. Humanes Plasminogen (15 µg / ml) wurde mit den Überständen und einem Chromatophor (0,5 g / ml) bei 37°C inkubiert. Bei Anwesenheit von Staphylokinase wurde das Plasminogen in Plasmin umgewandelt, welches mit dem Chromatophor interagiert. Der resultierende Farbumschlag wurde im Photometer analysiert. Die abgebildeten Daten basieren auf sechs unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige +/- Standardabweichung (n = 6).

### 1.6.4 Nachweis und relative Konzentrationsbestimmung des $\alpha$ -Hemolysin im bakteriellen Überstand

Hämolyse bzw. Zellyse ist ein zentraler Mechanismus von *S. aureus* in der Bekämpfung von Immunzellen. Dieser Vorgang der Membranzerstörung, der zum Absterben der Abwehrzelle führt, wird u.a. durch die so genannten Hämolsine induziert. Die Menge an produziertem Protein hat dabei einen großen Einfluss auf die Pathogenität des Organismus. Daher wurde hier exemplarisch die relative Konzentration des  $\alpha$ -Hämolysins im Bakterienüberstand bestimmt. Das Ergebnis liefert keine absoluten Konzentrationswerte, ein Vergleich der einzelnen Stämme untereinander könnte aber stammspezifische Unterschiede aufdecken.

Das Resultat unterstreicht die Sonderstellung der Stämme ST398b und ST398f. Die erzielten Werte dieser beiden Isolate liegen im Vergleich zu allen anderen um mehr als das 10-fache höher. Dies deutet auf eine stark erhöhte Produktion dieses Proteins hin. Den Stamm ST45, der nach Micro-Array-Analyse negativ für  $\alpha$ -Hämolysin sein sollte, würde man, bezogen auf die IMDM-Negativkontrolle, nach dieser Methode als positiv bezeichnen. Da es sich beim ST45 nur um einen Kontrollstamm handelte, wurde aber von zusätzlichen Tests, wie beispielsweise PCR, abgesehen.





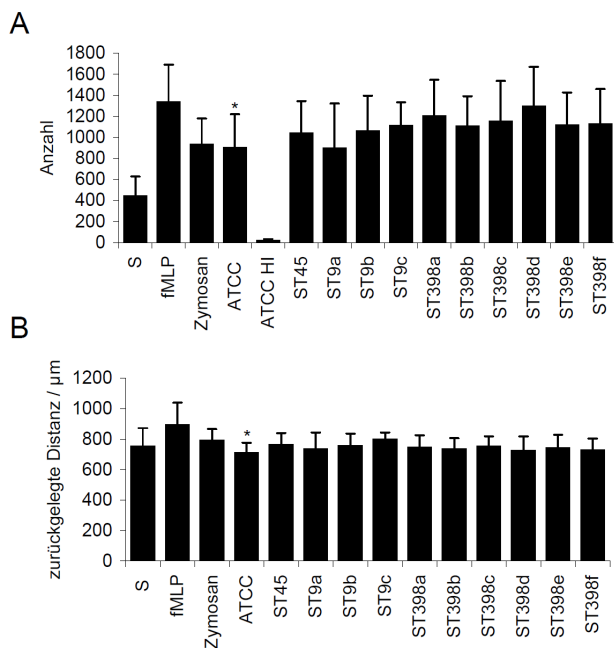
**Abbildung 19: Ermittlung der Alpha-Hämolysin-Konzentration im SaS.** Die relative Konzentration dieses Proteins wurde mittels ELISA bestimmt. A, Abbildung der gemessenen optischen Dichte bzw. der relativen Alpha-Hämolysin-Konzentration der verschiedenen Stämme im Maßstab 0 bis 10. B, Abbildung der gemessenen optischen Dichte bzw. der relativen Alpha-Hämolysin-Konzentration der verschiedenen Stämme im Maßstab 0 bis 0,5. Die abgebildeten Daten basieren auf sechs unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige +/- Standardabweichung (n = 6; \*\*p < 0,01 \*\*\*p < 0,001 im Vergleich mit den entsprechenden Schweinestämmen).

## 1.7 Interaktionen mit dem menschlichen Immunsystem insbesondere mit humanen neutrophilen Granulozyten

### 1.7.1 Serumaktivierung und Chemotaxis

Die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten an den Ort der Entzündung nimmt, wie in der Einleitung beschrieben, einen zentralen Stellenwert bei der Beseitigung einer Infektion ein. Dieser Migrationsprozess vom Endothel ins das umliegende Gewebe, die Chemotaxis, wird durch chemische Botenstoffe reguliert, die den Zellen über Konzentrationsgradienten die erforderliche Wanderungsrichtung vermitteln. Zu diesen als Chemoattraktoren bezeichneten Substanzen gehört der Komplement-Faktor C5a, der nach Komplementaktivierung, ausgelöst durch eindringende Mikroorganismen, im Serum gebildet wird. Der Prozess der Serumaktivierung und die anschließende Chemotaxisinduktion wurden in diesem Assay untersucht. Dies sollte der Feststellung von potenziellen stammspezifischen Unterschieden in der Komplement-Aktivierung bzw. Chemotaxis-Induktion dienen.

Das Ergebnis zeigt eine starke Chemotaxis-Induktion bei allen verwendeten *S. aureus*-Stämmen. Die Anzahl der migrierten Zellen und die durchschnittlich zurückgelegte Wanderungsstrecke entsprechen den mitgeführten Positivkontrollen. Weiterhin zeigt sich, dass bei beiden Parametern, bis auf einzelne Ausnahmen, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Isolaten zu beobachten sind. Auffällig ist die Tatsache, dass die drei Stämme, die positiv für den Virulenzfaktor CHIPS getestet wurden, auch die niedrigsten Zellzahlen aufweisen. Dieser Gruppe gehört auch der Stamm ATCC 25923 an, bei dem die einzigen signifikanten Unterschiede detektiert wurden. Die Negativkontrolle mit hitzeinaktiviertem Serum induziert so gut wie keine chemotaktische Aktivität. Dies deutet auf eine zentrale Rolle des Komplementsystems bei der Chemotaxis-Induktion hin.



**Abbildung 20: Chemotaxisinduktion von neutrophilen Granulozyten nach Serumaktivierung durch *S. aureus*.** Die Chemotaxis wurde in einem Unter-Agarose Zell-Migrationsassay durchgeführt. Als Positivkontrolle zur Serumaktivierung wurde Zymosan (0,25 mg/ml), als serumunabhängige Kontrolle fMLP ( $10^{-8}$ M) eingesetzt. Bei der Negativkontrolle handelte es sich um alleiniges Serum ohne Zugabe von Substanzen. A, durchschnittliche Anzahl der migrierten neutrophilen Granulozyten. B, durchschnittlich zurückgelegte Distanz ( $\mu\text{m}$ ). CHIPS-positive Stämme: ATCC, ST45, ST9a. Die abgebildeten Daten basieren auf sechs unabhängigen

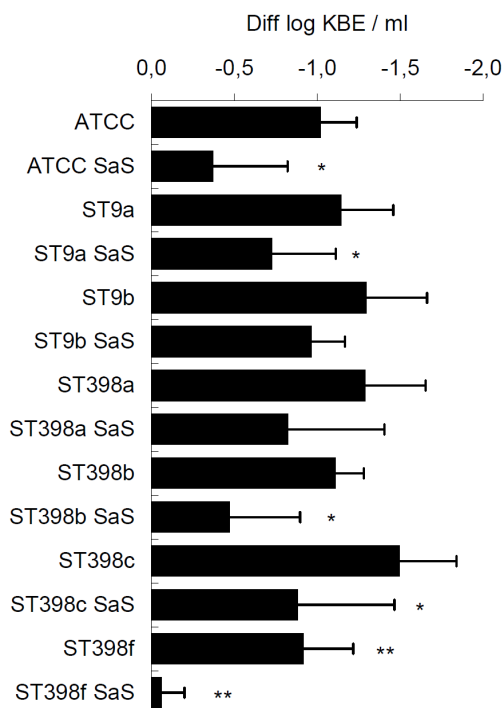
Experimenten mit sechs unterschiedlichen Probanden ( $n = 6$ ; \* $p < 0,05$ , Anzahl: signifikant im Verhältnis zu ST398 b, d, f; Distanz: signifikant im Verhältnis zu ST45, ST9b, c, ST398 b, d, f).

### 1.7.2 Killing von *S. aureus* durch neutrophile Granulozyten

Das Abtöten der Keime, das so genannte Killing, stellt nach den Prozessen der Chemotaxis und Phagozytose die finale und wichtigste Komponente im Aufgabenbereich der neutrophilen Granulozyten dar. Durch den durchgeführten Assay sollten sowohl potenzielle stammspezifische Unterschiede im Killing, wie auch der Einfluss der verschiedenen Exoproteincocktails (SaS) auf diesen zellulären Prozess untersucht werden. Dafür wurden die Granulozyten mit und ohne SaS vorinkubiert.

Nach Analyse der Ergebnisse kann man bei allen eingesetzten Isolaten eine negative Entwicklung der Kolonie-bildenden-Einheiten (KBE / ml) feststellen, was für ein erfolgreiches Killing spricht. In der Rate der getöteten Bakterien können allerdings signifikante Unterschiede detektiert werden. Dies betrifft wieder den Stamm ST398f, der schon in den vorherigen Assays in Erscheinung getreten ist. Der Einfluss der Exoproteine auf diesen Prozess tritt ebenfalls deutlich in Erscheinung. Bei allen Stämmen kommt es durch die Vorinkubation mit dem Überstand im Vergleich zur Probe ohne SaS-Einfluss zu einer detektierbaren und in den meisten Fällen signifikanten Verschlechterung der Killing-Rate. Dies wird vor allem wieder bei

ST398f deutlich, wo die Killing-Rate annähernd den Nullwert erreicht, was nur noch einer Stagnation des Bakterienwachstums entspricht.



#### Abbildung 21: Killing der *S. aureus*-Stämme durch neutrophile Granulozyten mit und ohne SaS-

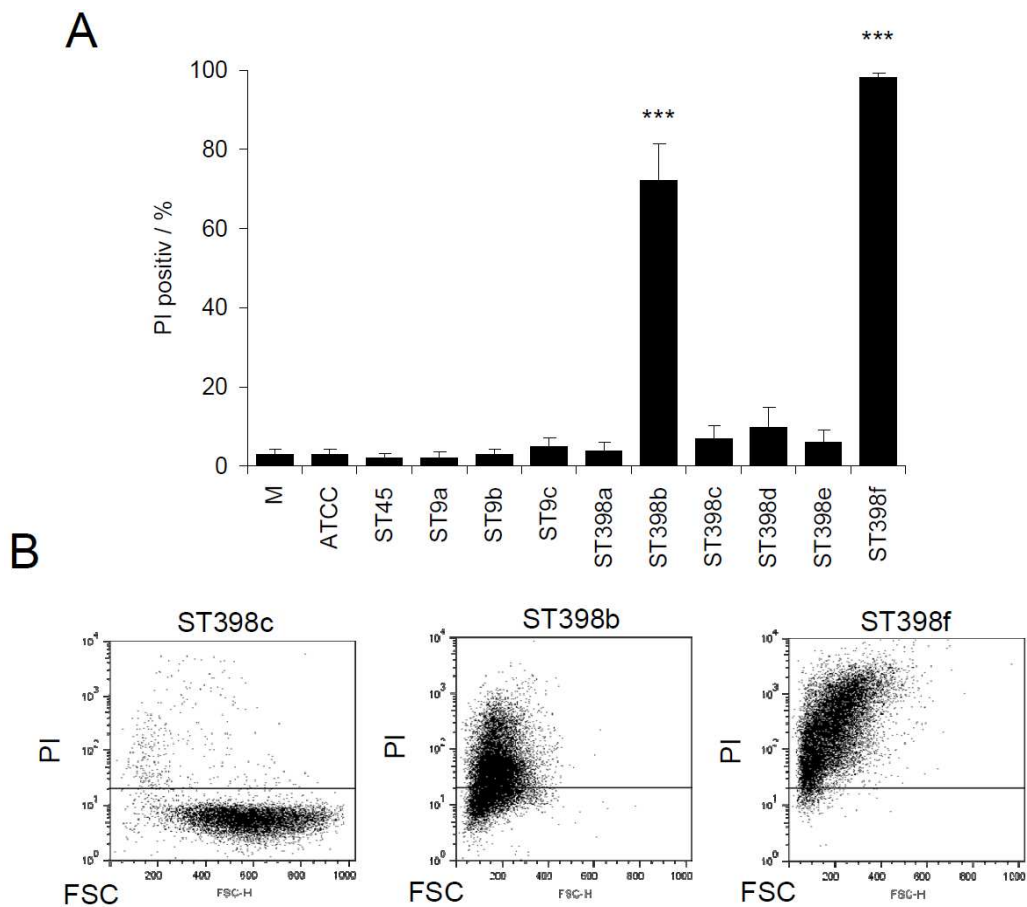
**Einfluss.** Isolierte neutrophile Granulozyten ( $2,5 \times 10^6$  / ml) wurden in IMDM / 5 % homologen Serum mit den Bakterien in einem Verhältnis von 1:5 für 120 min bei 37°C inkubiert. Die Killing-Rate ergibt sich aus der Differenz der ermittelten Menge koloniebildender Einheiten (KBE) / ml zwischen 0 min und 120 min. Die abgebildeten Daten basieren auf sechs unabhängigen Experimenten mit sechs unterschiedlichen Probanden. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige +/- Standardabweichung (n = 6; \*p < 0,05 \*\*p < 0,01; ohne SaS-Einfluss: Vergleich mit den entsprechenden Stämmen tierischen Ursprungs / mit SaS-Einfluss: Vergleich mit Proben ohne Überstand-Einfluss).

### 1.7.3 Lyse der neutrophilen Granulozyten durch bakteriellen Überstand

Das Abtöten der Immunzellen durch Lyse stellt, wie beschrieben, eine der effektivsten Methoden dar, dem Immunsystem des Wirts Widerstand zu leisten. Daher geht ein Anstieg der Lyseeigenschaften auch meistens mit einem Anstieg der Pathogenität des Bakteriums einher. In diesem Assay wurde die Lyse der neutrophilen Granulozyten durch den stammspezifischen Überstand getestet.

Das Ergebnis spiegelt exakt die Resultate des Hämolyse-ELISA's wider. Die Überstände von ST398b und ST398f sind die einzigen, die einen Prozentsatz von abgetöteten Zellen von deutlich über 10 % induzieren. Der Exoproteincocktail von ST398f ist in der Lage, annähernd 100 % der eingesetzten Immunzellen innerhalb von sehr kurzer Zeit (10 min Inkubation) abzutöten, was für eine hohe Konzentration von potenten Hämolyseinen spricht und durch das Ergebnis des Hämolyse-ELISA's bestätigt wird. Der Stamm ST398b zeigt mit ca. 70 % eine etwas niedrigere Lyserate, was vermutlich auf eine leicht geringere Konzentration und nicht auf eine andere Art von lysogenen Substanzen zurückzuführen ist. Auffällig ist, dass mit Ausnahme

des ST398a alle ST398 im Vergleich mit den anderen ST ein stärkeres Lysepotenzial aufweisen.

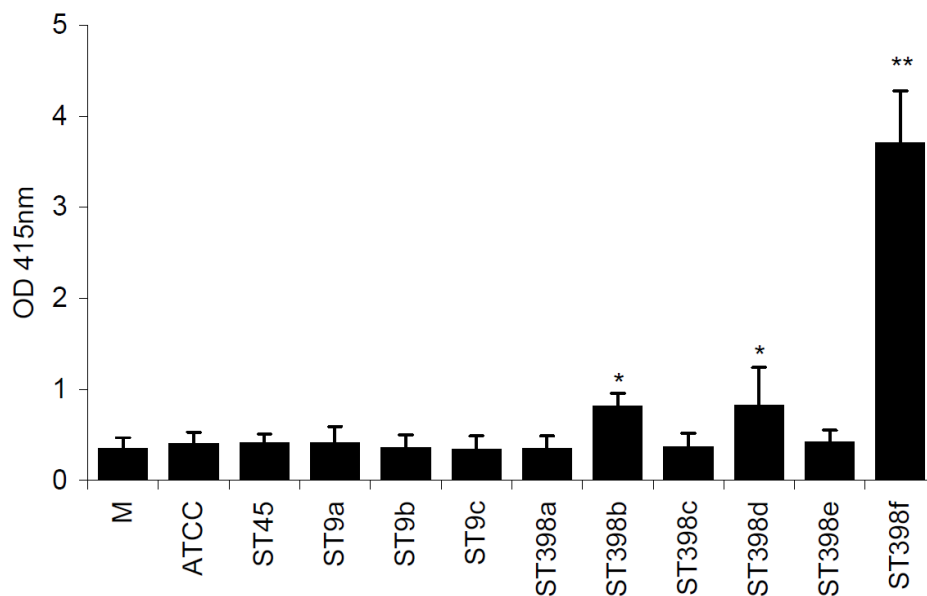


**Abbildung 22: Lyse der neutrophilen Granulozyten durch SaS.** Der Lyse-Assay basierte auf einer Inkubation der isolierten neutrophilen Granulozyten mit SaS der verschiedenen Stämme für 10 min bei 37°C. Die Bestimmung der Anzahl an lysierten Zellen erfolgte durch die Ermittlung des Prozentsatzes an Propidium (PI)-Iodid positiven Granulozyten. A, Prozentsatz der PI-positiven Granulozyten. B, Gating-Parameter und Vergleich der Dot-Plots von ST398c/ST398b/ST398f nach SaS/Granulozyten Inkubation. Die abgebildeten Daten basieren auf sechs unabhängigen Experimenten mit sechs unterschiedlichen Probanden. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige +/- Standardabweichung (n = 6; \*p < 0,05 \*\*p < 0,01 im Vergleich mit den entsprechenden tierischen Ursprungs).

### 1.7.4 Hämolyse im Vollblut nach Inkubation mit bakteriellem Überstand

Durch die Messung der Hämolyse, der Zerstörung der Erythrozyten, wird traditionell die Produktion und Freisetzung von Hämolsinen durch Bakterien dokumentiert. Diese eignet sich daher auch sehr gut als Methode, um die vorliegenden Stämme hinsichtlich ihres Hämolyseverhaltens zu charakterisieren.

Die Bestimmung der relativen Menge des freien Hämoglobins anhand der optischen Dichte zeigt ein ähnliches Resultat wie es schon beim  $\alpha$ -Hämolsin-ELISA und bei der Lyse der neutrophilen Granulozyten zu beobachten war. Die Sonderstellung des Stammes ST398f wird erneut deutlich, da der Überstand dieses Stammes im Vergleich zu allen anderen eine 4-5 fach höhere Hämolyseaktivität aufweist. Hinter diesem rangieren mit ST398b und ST398d ebenfalls die Stämme mit der stärksten Granulozytenlyse. Alle anderen SaS liegen im Bereich der Negativkontrolle.



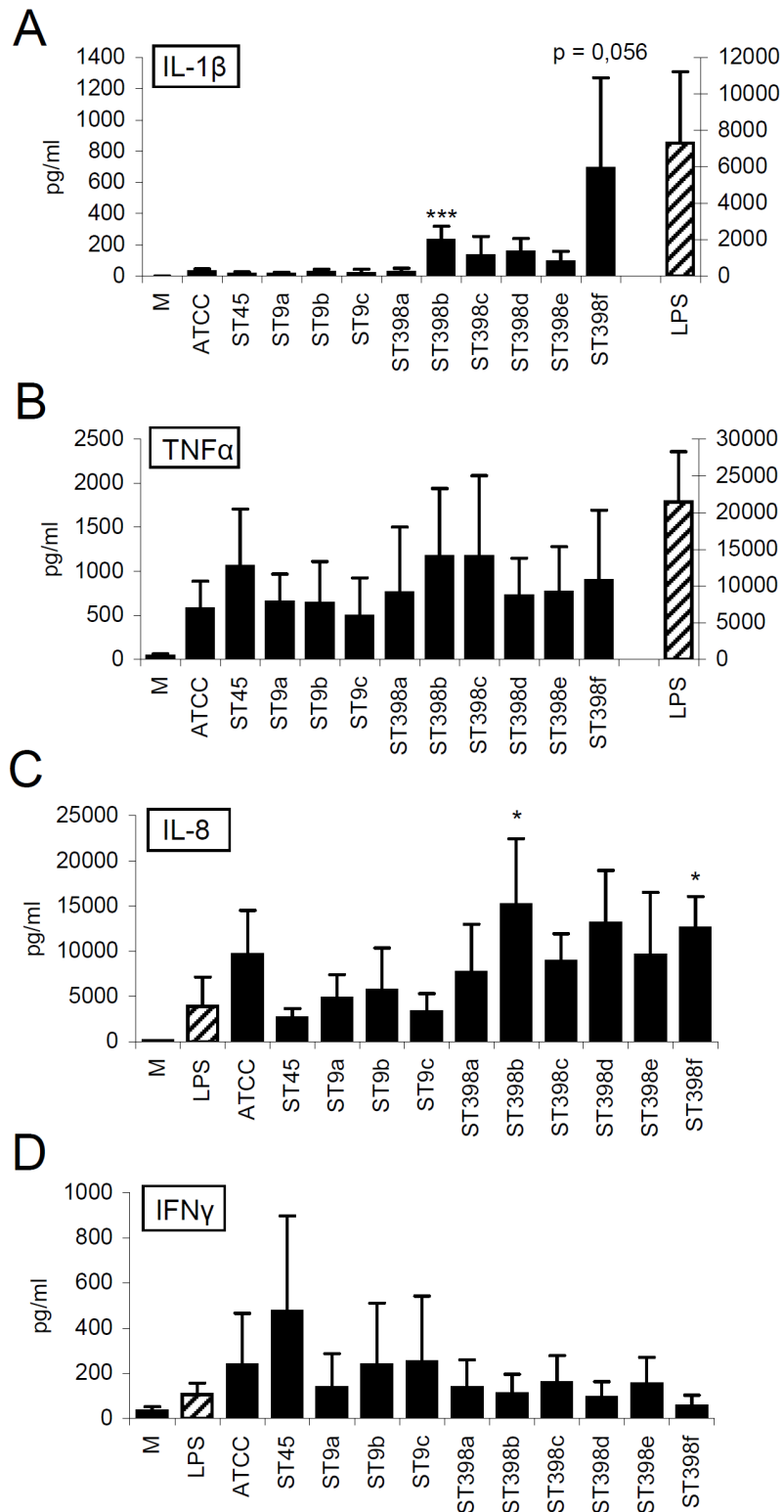
**Abbildung 23: Hämolyse im Vollblut nach Inkubation mit SaS.** Vollblut wurde mit SaS der verschiedenen Stämme für 6 h bei 37°C inkubiert. Die Quantifizierung der Hämolyse erfolgte anhand der fotometrischen Bestimmung (415 nm) freien Hämoglobins im Plasma.

Die abgebildeten Daten basieren auf sechs unabhängigen Experimenten mit sechs unterschiedlichen Probanden. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige +/- Standardabweichung (n = 6; \*p < 0,05 \*\*p < 0,01 im Vergleich mit den entsprechenden Stämmen tierischen Ursprungs).

### 1.7.5 Zytokinfreisetzung im Vollblut nach Inkubation mit bakteriellem Überstand

Zytokine spielen als interzelluläre Botenstoffe in der Zell-Zell-Interaktion des Immunsystems eine entscheidende Rolle. Abhängig von der komplexen Zusammensetzung des Zytokincocktails werden verschiedenste Zellreaktionen induziert, und so das Verhalten der Immunkomponenten gesteuert. Je nach Infektionstyp kann dabei das Zytokinprofil erheblich variieren. In diesem Fall soll durch die Inkubation von Immunzellen mit dem stammspezifischen SaS eine Zytokininduktion erfolgen, um eventuelle Unterschiede zwischen den Stämmen aufgrund des induzierten Botenstoffprofils festzustellen. Bei den untersuchten Zytokinen handelte es sich um die pro-inflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  und IL-8. Die Untersuchungen wurden im Vollblut durchgeführt.

Nach der Stimulation mit den verschiedenen Überständen konnte man eine Steigerung der TNF $\alpha$ -Konzentration im Plasma von ca. 500 % im Vergleich zur Negativkontrolle beobachten. Es sind allerdings keine signifikanten stammspezifischen Unterschiede erkennbar. Auffällig ist, dass das durch den SaS induzierte Level an TNF $\alpha$  in Relation zur Positivkontrolle, dem Gram-negativen Stimulus LPS, um ca. 40 fach niedriger liegt. Die IL-1 $\beta$ -Freisetzung zeigt ein anderes Muster. Hier erkennt man eine ähnliche Verteilung wie sie auch schon bei der Hämolyse und Lyse der neutrophilen Granulozyten zu beobachten war. Der Überstand des ST398f induziert mit Abstand die größte IL-1 $\beta$ -Freisetzung, wobei auch hier, wieder mit Ausnahme des ST398a, alle anderen ST398 im Vergleich mit den anderen Stämmen einen höheren Wert erzielen. Dieses Resultat deutet auf einen direkten Zusammenhang von Zellyse und IL-1 $\beta$ -Freisetzung hin. Wie schon bei TNF $\alpha$ , liegt auch hier die durch LPS induzierte Zytokinfreisetzung um ein Vielfaches höher. Die Konzentrationsbestimmung der Zytokine IFN $\gamma$  und IL-8 zeigt gegensätzliche Ergebnisse. Die Stämme des ST398 induzieren die höchste IL-8-Freisetzung, erzielen aber die niedrigste IFN $\gamma$ -Konzentration. Dies deutet auf einen gegensätzlich verlaufenden Mechanismus hin, der einen gleichzeitigen Anstieg von beiden Zytokinen verhindert. Zusätzlich fällt auf, dass es die drei ST398-Stämme mit der höchsten Lyseaktivität (ST398b, d, f) sind, die gleichzeitig die höchste IL-8- und niedrigste IFN $\gamma$ -Freisetzung induzieren. Somit könnte, wie schon bei IL-1 $\beta$  vermutet, ein direkter Zusammenhang zwischen Zellyse und Zytokinfreisetzung bestehen. Bei IL-8 und IFN $\gamma$  befindet sich das Niveau der LPS-induzierten Zytokinmenge im unteren Bereich der analysierten Überstandproben.



**Abbildung 24: Zytokininduktion im Vollblut nach Inkubation mit SaS.** Vollblut wurde mit SaS der verschiedenen Stämme für 6 h bei 37°C co-kultiviert. Die Quantifizierung der Zytokine im Plasma erfolgte durch die Verwendung von verschiedenen ELISA-Kits nach den Angaben des Herstellers (R u. D- Systems, Minneapolis, USA). A, IL-1 $\beta$  (pg / ml). B, TNF $\alpha$  (pg / ml). C, IL-8 (pg / ml). D, IFN $\gamma$  (pg /

ml). Aufgrund der großen Konzentrationsunterschiede wurde bei IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  bei der LPS-Stimulation eine zweite y-Achse mit entsprechend angepasster Dimension verwendet. Die abgebildeten Daten basieren auf sechs unabhängigen Experimenten mit sechs unterschiedlichen Probanden. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige +/- Standardabweichung (n = 6; \*p < 0,05 \*\*\*p < 0,001 im Vergleich zu den entsprechenden Stämmen tierischen Ursprungs).

## **2. Aktivierung von neutrophilen Granulozyten nach der Inkubation mit bakteriellem Überstand**

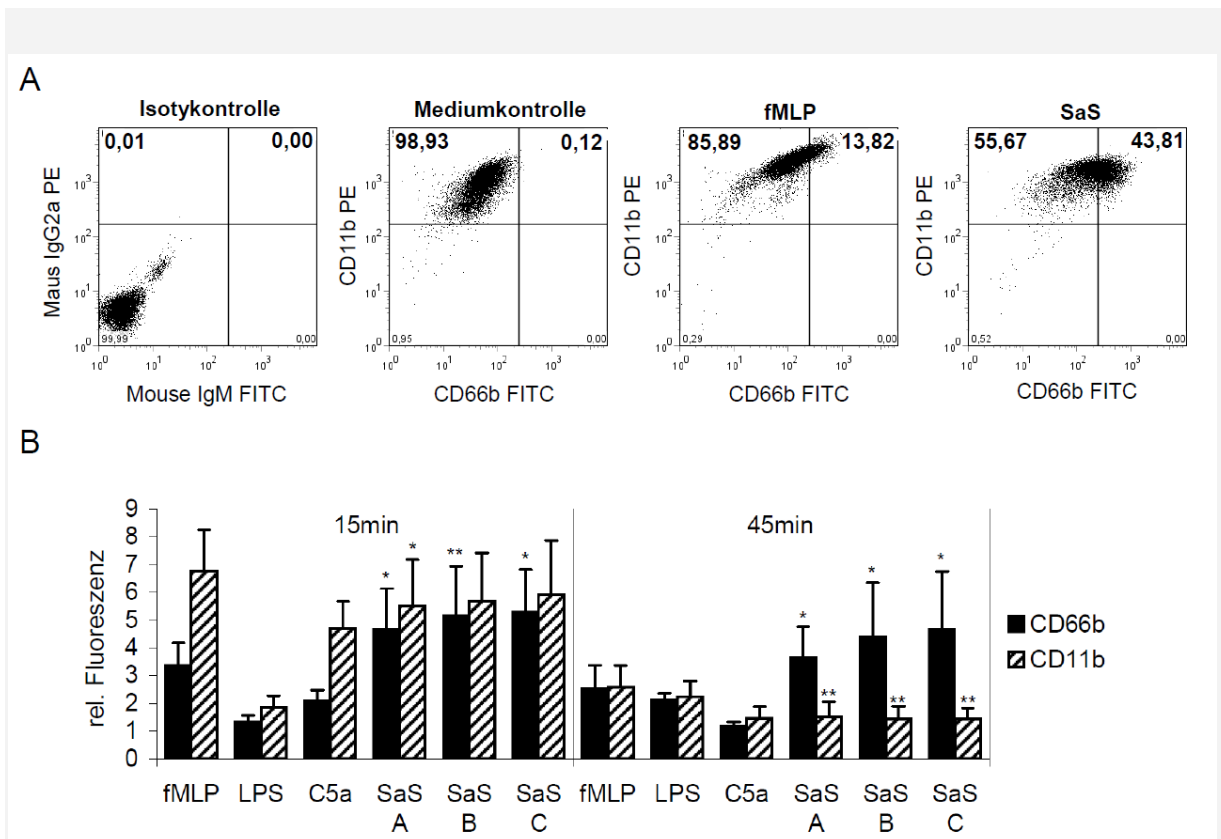
### **2.1 CD66b und CD11b-Expression**

Um eine Interaktion von neutrophilen Granulozyten mit anderen Substanzen zu ermitteln, gilt die Bestimmung des Aktivierungsstatus der Zellen als wichtiges Merkmal um eine Stimulation der Zellen durch externe Einflüsse zu untersuchen. Dazu zählt vorrangig die durchflusszytometrische Messung der relativen Menge an Oberflächenmolekülen, deren Zusammensetzung sich während der Zellaktivierung stark verändert. In diesem Fall wurden die Moleküle CD66b und CD11b untersucht, die nach Aktivierung vermehrt auf der Zelloberfläche zu finden sind, und daher als so genannte Aktivierungsmarker gelten. Als Aktivierungskontrolle wurden klassische Stimulanzen wie das bakterielle Peptid fMLP, der Gram-negative Zellwandbestandteil LPS und der Komplementfaktor C5a verwendet. Alle Experimente wurden im Vollblut durchgeführt.

Das Ergebnis zeigt deutliche Unterschiede zwischen den verwendeten „klassischen“ Granulozyten-Aktivatoren und der Verwendung der SaS. 15 min nach Zugabe der Stimulanzen fMLP, LPS oder C5a kann man eine Zunahme der relativen Molekülmenge von CD66b und CD11b auf der Zelloberfläche der Granulozyten beobachten. Das relative Zunahme steht in einem Verhältnis von annähernd 1:2 (CD66b:CD11b). Im Gegensatz dazu findet man bei allen drei Überständen ein Molekülverhältnis von ca. 1:1. Nach 45 min verschiebt sich das Verhältnis von 1:2 (fMLP, LPS oder C5a) zu 1:1 und von 1:1 (SaS) zu 2,5:1. Diese SaS-induzierte Aktivierungsform mit einer Überexpression von CD66b unterscheidet sich also deutlich von den klassischen Aktivatoren, und ist Gegenstand der weiteren nachfolgend dargestellten Untersuchungen. Die Molekülüberexpression ist nicht nur, wie erwähnt, gekenn-



zeichnet durch eine signifikante Erhöhung der relativen Moleküldichte, sondern zusätzlich auch durch eine Veränderung des Molekülverhältnisses von CD66b/CD11b. Die Messung der Molekülexpression basiert bei allen Daten auf Veränderungen der Fluoreszenzintensität, die von den jeweils eingesetzten monoklonalen Fluorochrom-markierten Antikörpern emittiert wird. Diese Messtechnik wird auch bei allen nachfolgenden Versuchsreihen angewendet. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die Relation zur Negativkontrolle ohne Aktivator.



**Abbildung 25: CD66b und CD11b Expression auf neutrophilen Granulozyten im Vollblut nach Inkubation mit SaS und anderen Stimuli.** Eingesetzte Substanzen: fMLP ( $2 \times 10^{-8}$  M), LPS (10 ng / ml), C5a ( $2 \times 10^{-7}$  M) und SaS A-C (1 %). SaS A-C entsprechen den Überständen der in Kapitel „Material und Methoden“ vorgestellten ST9a, b und c. A, Dot-Blots CD66b (x-Achse) CD11b (y-Achse) nach entsprechenden Stimulationen bzw. passender Isotypkontrolle (nach SaS-Stimulation). B, Zeitpunkte 15 min (links) und 45 min (rechts) nach Zugabe der jeweiligen Stimuli wurden für die Analyse herangezogen. Die relative Fluoreszenz bezieht sich auf das Verhältnis zur Negativkontrolle.

Die abgebildeten Daten basieren auf sechs bzw. neun unabhängigen Experimenten mit sechs bzw. neun unterschiedlichen Probanden. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige +/- Standardabweichung.  $n = 6$  (LPS, C5a),  $n = 9$  (fMLP, SaS A-C) \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  im Vergleich zur fMLP-Stimulation

## 2.2 Ergebnispool der CD66b und CD11b-Expression

Wie im Abschnitt „Material und Methoden“ erwähnt, basieren alle Versuchsreihen auf dem identischen Versuchsablauf. Dies bietet die Möglichkeit, alle relevanten Experimente bezüglich der CD66b/CD11b-Expression im Vollblut in einem Pool zusammenzufassen, da diese beiden Parameter bei allen Versuchsreihen ermittelt wurden. Die nachfolgende Tabelle bildet die Daten in Form eines Vergleichs mit der fMLP-induzierten Molekül-Expression ab.

Die Ergebnisse bestätigen die schon in 2.1 vorgestellten Unterschiede zwischen den beiden Stimulationsformen. Dies betrifft sowohl die Überexpression von CD66b, wie auch das CD66b/CD11b Verhältnis. Durch die hohe Anzahl an Experimenten können die ermittelten Daten sehr gut abgesichert werden. Dies ist vor allem deswegen von größerer Bedeutung, da die Ergebnisse größeren Schwankungen unterliegen, die zu relativ hohen Standardabweichungen führen. Um eine bessere Analyse zu gewährleisten werden daher bei machen Versuchsreihen die Experimente für die Darstellung nach dem Ausmaß der CD66b-Expression ausgewählt. Diese Auswahl basiert auf der nachfolgenden Tabelle und betrifft die Experimente, bei denen eine CD66b-Expressionsteigerung SaS/fMLP von weniger als 20 % (< 20 %) beobachtet wurde. Werden für die Darstellung Versuche ausgeschlossen, wird dies in den jeweiligen Abbildungslegenden vermerkt.

	15min					45min				
	Mean SaS /fMLP %↑	n (all)	n (<20%↑)	n (20-80%↑)	n (>80%↑)	Mean SaS /fMLP %↑	n (all)	n (<20%↑)	n (20-80%↑)	n (>80%↑)
<b>CD66b</b>										
SaS A	67.1%↑ ± 28,9	28	8 (28.6%)	11 (39.2%)	9 (32.1%)	66.4%↑ ± 27	46	14 (30.3%)	14 (30.3%)	18 (38.5%)
SaS B	54.6%↑ ± 18,7	12	3 (25%)	6 (50%)	3 (25%)	61.1%↑ ± 19,4	29	9 (31.1%)	9 (31.1%)	11 (37.9%)
SaS C	69.4%↑ ± 19	12	2 (16.7%)	6 (50%)	4 (33.3%)	71.2%↑ ± 20,2	29	5 (17.2%)	12 (41.3%)	12 (41.3%)
<b>CD11b</b>										
SaS A	12.8%↓ ± 3,5	28	5 (17.9%)	22 (78.7%)	1 (3.4%)	37.3%↓ ± 10,9	46	1 (2.2%)	32 (69.4%)	13 (28.3%)
SaS B	17.1%↓ ± 3	12	1 (8.3%)	11 (90.9%)	0	43.7%↓ ± 14,7	29	0	18 (62.1%)	11 (37.9%)
SaS C	12%↓ ± 2	12	3 (25%)	9 (75%)	0	43%↓ ± 13,8	29	0	19 (65.4%)	10 (34.5%)

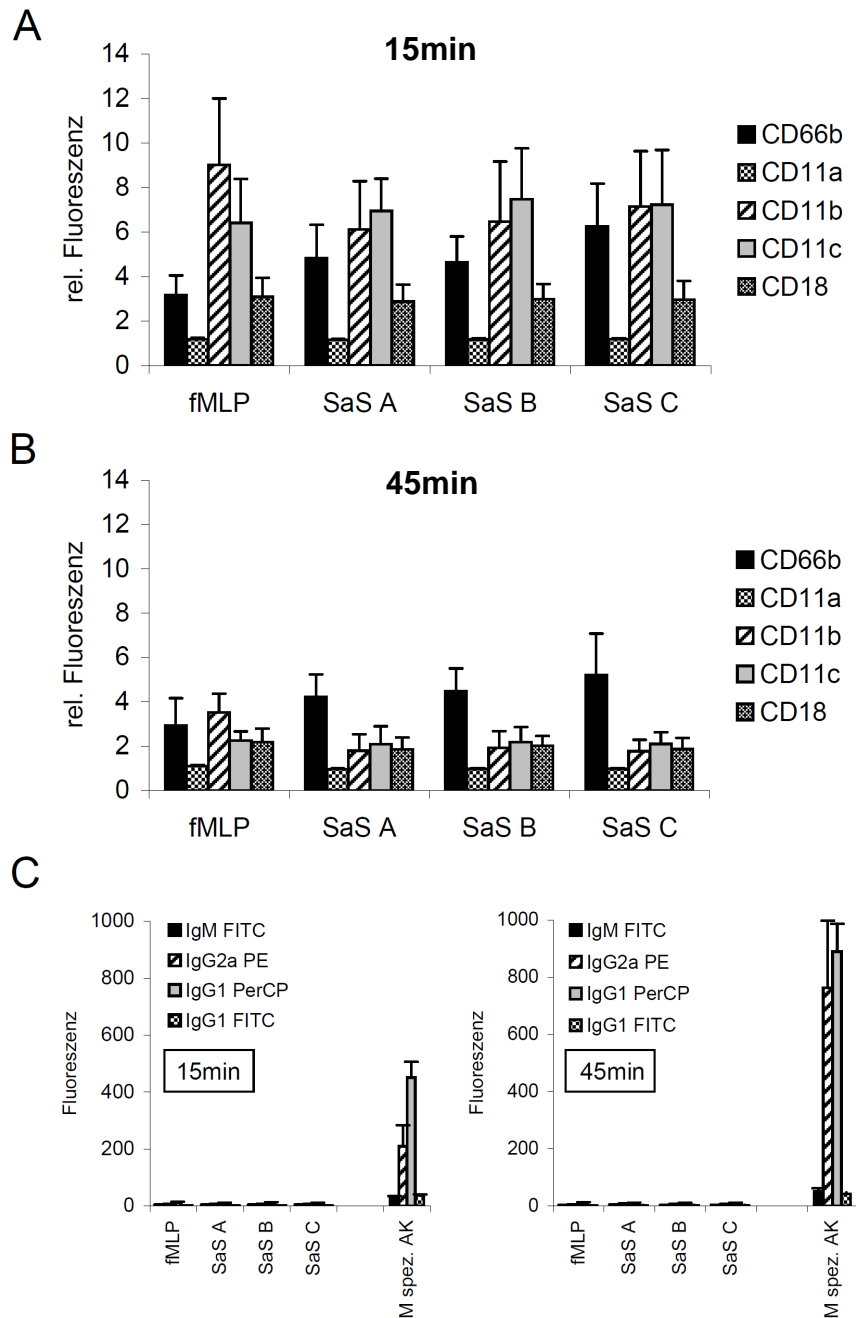
**Abbildung 26: Ergebnispool der fMLP und SaS induzierten CD66b und CD11b Expression auf neutrophilen Granulozyten.** Die Tabelle zeigt den Vergleich SaS/fMLP. Alle Daten bilden die SaS induzierte Steigerung oder Reduktion der Oberflächenmoleküle in Relation zur fMLP-Stimulation ab. Sie beziehen sich auf die relative Fluoreszenz im Verhältnis zur Negativkontrolle. Es sind alle relevanten Experimente der verschiedenen Versuchsreihen zusammengefasst. Die Analyse beinhaltet die Zeitwerte 15 min und 45 min und die Stimuli SaS A-C.

## 2.3 CD11a/CD11b/CD11c-Expression

Zu den  $\beta$ 2-Integrinen zählen neben CD11b auch die Oberflächenmoleküle CD11a und CD11c. Um zu testen, ob im Gegensatz zu CD11b die beiden anderen Rezeptoren in die CD66b-Überexpression eingebunden sind, und ebenfalls nach SaS-Stimulation in ähnlich vermehrter Form auf der Zelloberfläche zu finden sind, wurde wiederum eine Messung der relativen Molekülmenge durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass CD11a und CD11c ebenso wie CD11b nicht in die Überexpression von CD66b eingebunden sind. Während man bei CD11c eine Expressionssteigerung ähnlich der von CD11b beobachten kann, zeigt sich bei CD11a kaum eine Veränderung in der relativen Molekülmenge. Der zusätzlich analysierte Co-Rezeptor der  $\beta$ 2-Integrine, CD18, zeigt ebenfalls kein ähnliches Expressionsmuster. Somit kann eine parallele Überexpression für diese drei Moleküle ausgeschlossen werden.

Die für diese Versuchsreihe exemplarisch eingesetzten und auf die verwendeten Antikörper abgestimmten Isotypkontrollen zeigen kein relevantes Signal. Dies macht deutlich, dass es sich bei den vorliegenden Ergebnissen nicht um unspezifische Signale, sondern um echte Rezeptorfärbungen handeln muss.



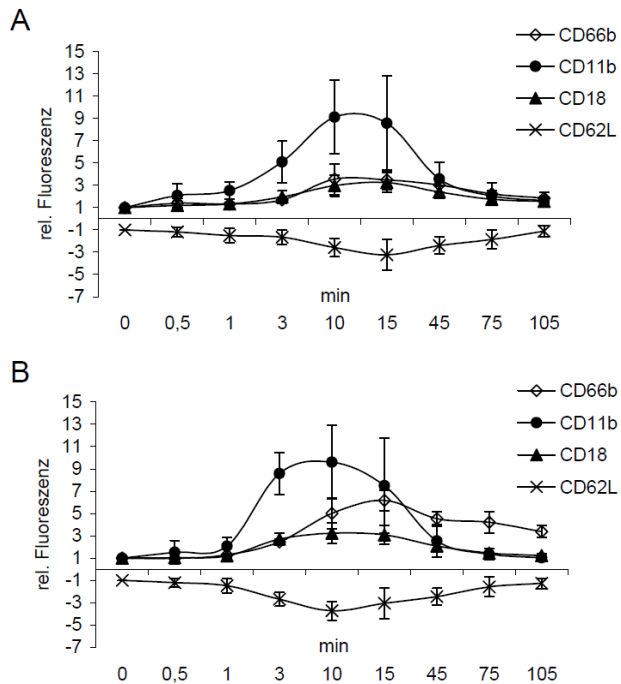
**Abbildung 27: CD11a/CD11b/CD11c-Expression nach Inkubation mit fMLP oder SaS.** Eingesetzte Substanzen: fMLP ( $2 \times 10^{-8}$  M) und SaS A-C (1 %). A, 15 min. B, 45 min. Die relative Fluoreszenz bezieht sich auf das Verhältnis zur Negativkontrolle. C, Absolutwerte der eingesetzten Isotypkontrollen im Vergleich zum Absolutwert der IMDM-Kontrolle (Negativkontrolle) nach Färbung mit den entsprechenden in A und B verwendeten spezifischen Antikörpern (M = Mediumkontrolle): CD66b FITC/IgM FITC; CD11a FITC/IgG1 FITC; CD11b PE/IgG2a PE; CD11c PerCP-CD18 PE-Cy5/IgG1 PerCP. Die Isotypkontrollen wurden in parallelen Ansätzen während der Versuchsreihe A/B eingesetzt. Die abgebildeten Daten basieren auf vier bzw. sechs unabhängigen Experimenten mit vier bzw. sechs unterschiedlichen Probanden. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige +/- Standardabweichung  $n = 6$  (A, B),  $n = 4$  (C).

## 2.4 Kinetik der CD66b/CD11b/CD18/CD62L-Expression

Um den zeitlichen Verlauf der Molekülexpression zu definieren, und somit das Phänomen der CD66-Überexpression genauer beschreiben zu können, wurde eine Kinetik der betreffenden Molekülexpression (CD66b/CD11b/CD18/CD62L) erstellt. Bei CD62L handelt es sich um ein Molekül, das sich bei Aktivierung von der Zelloberfläche löst. Im Gegensatz zu den drei anderen Molekülen auf der Zelloberfläche nimmt seine Anzahl also nicht zu, sondern ab. Für die Kinetik wurden die Messergebnisse von neun verschiedenen Zeitwerten (0 / 0,5 / 1 / 3 / 10 / 15 / 45 / 75 / 105 min) zusammengefasst.

Nach Analyse der Daten ergeben sich vier verschiedene Molekülkinetiken, die eindeutige Unterschiede zwischen der SaS- oder fMLP-Stimulation aufweisen. In der frühen Phase der Aktivierung (zwischen 0 min und 1 min) liegt die fMLP-Kurve für CD66b/CD11b/CD18 leicht über der des SaS. Zwischen 1 min und 3 min allerdings erreicht die SaS-induzierte Expression ihre maximale Steigerungsrate, wohingegen fMLP die höchste Zunahme erst zwischen 3 min und 10 min aufweist. Der Anstieg erfolgt im Vergleich mit der Überstandstimulation deutlich langsamer. Nach 3 min erfolgt beim SaS immer noch ein kontinuierlicher Anstieg von CD66b, obwohl die Amplitude für CD11b/CD18 bereits in die Stagnation übergegangen ist. Dies deutet daraufhin, dass zu diesem Zeitpunkt die Überexpression des Moleküls stattfindet. Bei fMLP sind zu diesem Zeitpunkt die Moleküle CD66b/CD11b/CD18 weiterhin in einem nahezu parallelen Expressionsmodus. Das frühere Erreichen des Amplitudenmaximums beim SaS scheint keine Auswirkungen auf die Molekülmenge zu haben, da beide Kurven annähernd das gleiche Fluoreszenzmaximum aufweisen. Die zeitliche Verzögerung der Aktivierung spiegelt sich auch in der Kinetik der CD62L-Abnahme wider. Die Expressionsverläufe unterstreichen also die Unterschiede, die zwischen der SaS und fMLP-Aktivierung bestehen, und zeigen neue Details, die eine genauere Analyse des Effekts ermöglichen.

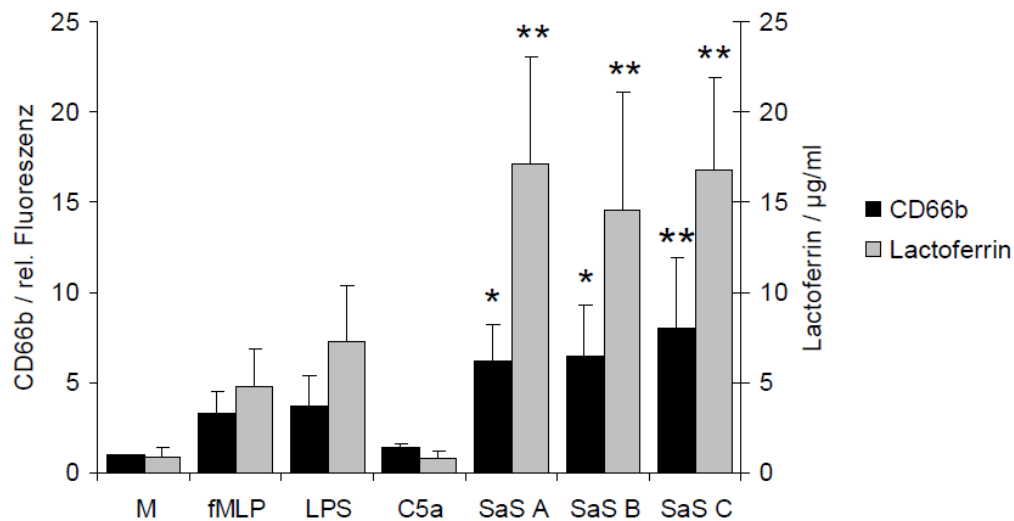
Erwähnenswert ist noch die Tatsache, dass man bei den absoluten Werten der Fluoreszenz nach SaS-Stimulation schon eine Stagnation der CD11b-Expression nach 10 min beobachten kann, wohingegen diese bei fMLP bis 45 min, und bei der Negativkontrolle bis 105 min stetig weiter ansteigt.



**Abbildung 28: Kinetik der CD66b / CD11b / CD18 / CD62L-Expression nach Stimulation mit fMLP oder SaS.** Analyisierte Zeitpunkte: 0, 0,5, 1, 3, 10, 15, 45, 75, 105 min. A, fMLP ( $2 \times 10^{-8}$  M) B, SaS A-C (1 %). Die relative Fluoreszenz bezieht sich auf das Verhältnis zur Negativkontrolle. Die abgebildeten Daten basieren auf sechs unabhängigen Experimenten mit sechs unterschiedlichen Probanden. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige  $\pm$  Standardabweichung  $n = 6$  (A, B),  $n = 4$  (C). Um eine genauere Analyse zu gewährleisten wurden Experimente mit einer SaS-induzierten CD66b Expressionssteigerung  $< 20\% \uparrow$  (Abbildung 26) nicht berücksichtigt.

## 2.5 Korrelation von CD66b-Expression und Lactoferrin-Freisetzung

Um eine mögliche Verknüpfung zwischen der CD66b-Expression und der Lactoferrinfreisetzung zu untersuchen, wurde nach der Stimulation des Vollbluts zeitgleich die Konzentration an freiem Lactoferrin im Plasma und die relative Menge an CD66b-Molekülen auf der Zelloberfläche untersucht. Das Ergebnis zeigt ein ähnliches Muster bei beiden Komponenten. Die Proben, die nach SaS-Stimulation eine CD66b-Überexpression zeigen, weisen auch die mit Abstand höchste Lactoferrinkonzentration im Plasma auf.



**Abbildung 29: Korrelation von CD66b-Expression und Lactoferrin-Freisetzung im Vollblut nach der Stimulation mit SaS und anderen Stimulanzen.** Eingesetzte Substanzen: fMLP ( $2 \times 10^{-8}$  M), LPS (10 ng / ml), C5a ( $2 \times 10^{-7}$  M) und SaS A-C (1 %). Analysierter Zeitpunkt: 45min; Einheiten: CD66b (y-Achse 1) relative Fluoreszenz, bezieht sich auf das Verhältnis zur Negativkontrolle; Lactoferrin (y-Achse 2) µg/ml.

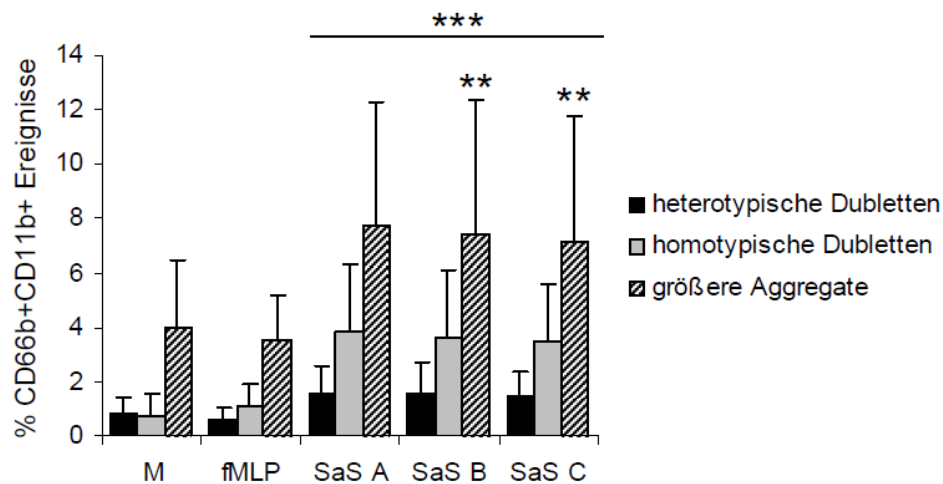
Die abgebildeten Daten basieren auf sechs unabhängigen Experimenten mit sechs unterschiedlichen Probanden. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige +/- Standardabweichung.  $n = 6$  \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  im Vergleich zur fMLP-Stimulation.

## 2.6 Bestimmung der Anzahl von homo- und heterotypischen Dubletten sowie größeren Zellaggregaten

Neben der Molekülexpression auf der Zelloberfläche wurde die Bildung von Zellaggregaten nach SaS- und fMLP-Stimulation untersucht. Dies sollte Aufschluss darüber geben, inwieweit sich die SaS-Aktivierung auf die Adhäsionsfähigkeit der Zellen auswirkt. Es stellte sich heraus, dass die Stimulation mit allen drei Überständen neben der CD66b-Überexpression ebenfalls zu einer stark erhöhten Aggregatbildung innerhalb des Vollbluts führt. Eine sichere Quantifizierung war nur bei den Zelldubletten möglich, da es sich bei ihnen um den vorherrschenden Aggregattyp handelte, und somit die vorliegende Anzahl für eine Analyse ausreichte.

Das Ergebnis der Quantifizierung der hetero- und homotypischen Dubletten sowie größerer Aggregate zeigt, dass im Vergleich mit fMLP die Bildung aller Aggregattypen stark erhöht ist.

Man kann mehr als die zweifache Menge an heterotypischen Dubletten sowie an größeren Aggregaten und fast die vierfache Anzahl an homotypischen Dubletten beobachten. Dies trifft auf alle drei SaS zu (heterotypische Dubletten: M: 0,8 % ± 0,59 fMLP: 0,58 % ± 0,44; SaS A: 1,56 % ± 1; SaS B: 1,55 % ± 1,17; SaS C: 1,46 % ± 0,93; homotypische Dubletten: M: 0,72 % ± 0,95; fMLP: 1,11 ± 0,8; SaS A: 3,8 % ± 2,5; SaS B: 3,6 % ± 2,5; SaS C: 3,4 % ± 2,2 aller CD66b<sup>+</sup>CD11<sup>+</sup>-Ereignisse; größere Aggregate: M: 4,0 % ± 2,6 fMLP: 3,5 % ± 1,7; SaS A: 7,8 % ± 4,6; SaS B: 7,4 % ± 4,9; SaS C: 7,2 % ± 4,6).



**Abbildung 30: Bildung von Zeldubletten und größeren Zellaggregaten nach Stimulation mit fMLP oder SaS.** Eingesetzte Substanzen: M (IMDM-Negativkontrolle), fMLP ( $2 \times 10^{-8}$  M) und SaS A-C (1 %). Analysierter Zeitpunkt: 45 min. Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil von hetero- und homotypischen Neutrophil-Dubletten sowie größeren Aggregaten an allen gemessenen CD66b<sup>+</sup> Ereignissen (Einzelzellen und größere Aggregate eingeschlossen).

Die abgebildeten Daten basieren auf 17 bzw. 26 unabhängigen Experimenten mit jeweils unterschiedlichen Probanden. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige +/- Standardabweichung n = 17 (SaS B, SaS C), n = 26 (M, fMLP, SaS A). \*\*p < 0,01 (SaS B, SaS C; größere Aggregate), \*\*\*p < 0,001 im Vergleich zur fMLP-Stimulation.



---

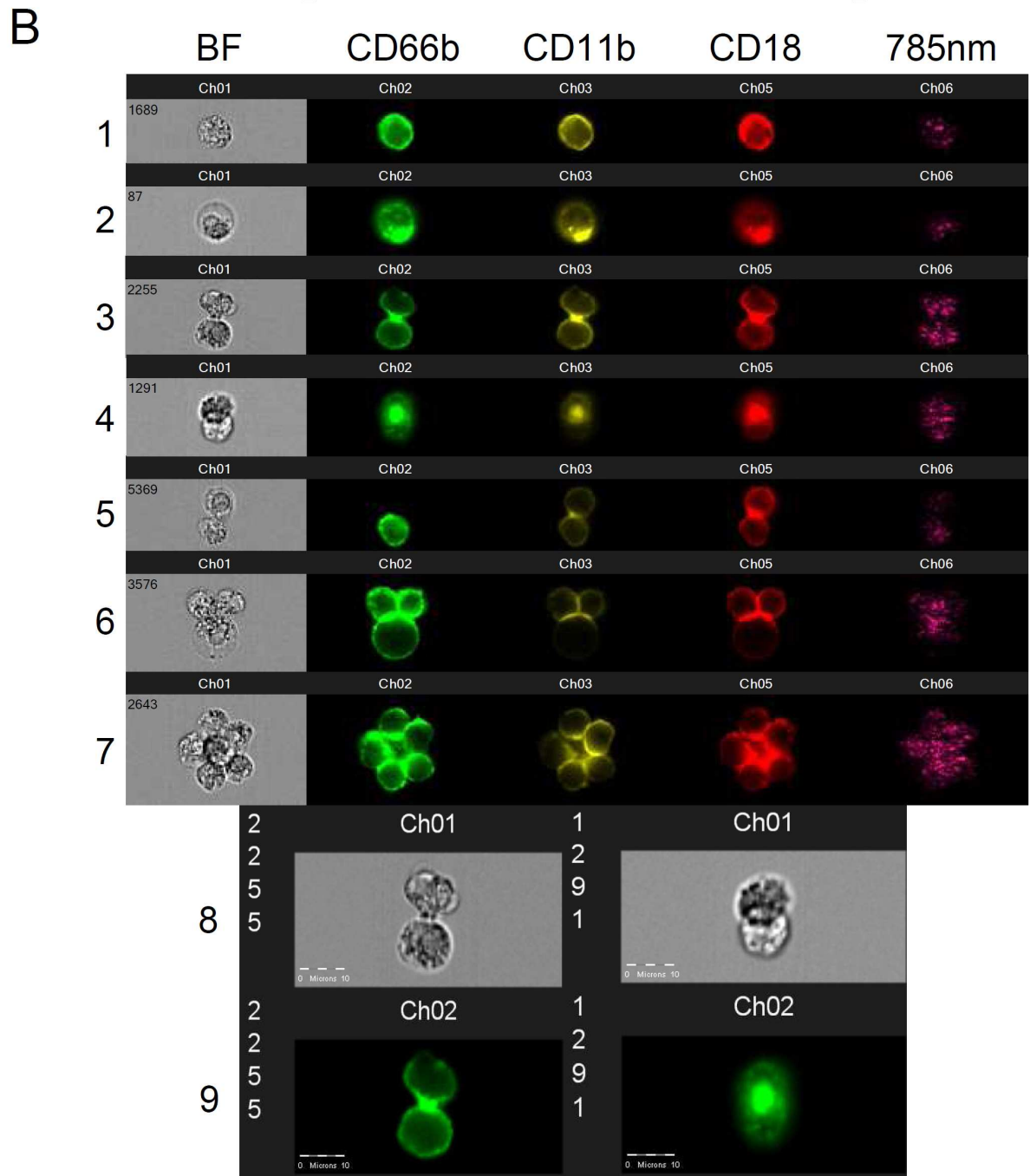
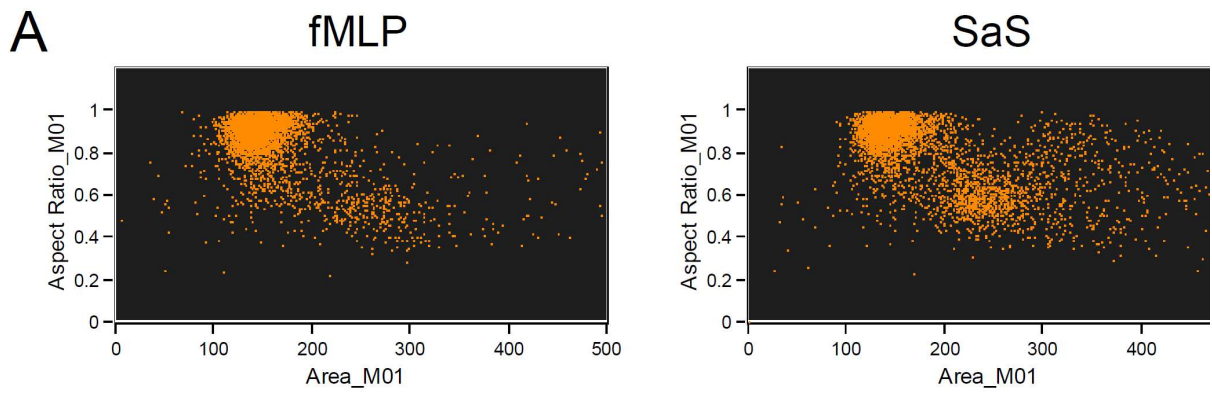
## **2.7 Fotografische Dokumentation der CD66b/CD11b-Rezeptorexpression**

### **2.7.1 Fotografische Dokumentation der CD66b/CD11b/CD18 Rezeptorexpression im ImageStream<sup>x</sup>**

Durch die Analyse im ImageStream<sup>x</sup> Durchflusszytometer können, neben den Fluoreszenzdaten, durch fotografische Dokumentation ebenfalls Aussagen zur Rezeptorverteilung auf der Zelloberfläche und zur allgemeinen Zellmorphologie getroffen werden.

Die homotypischen Dubletten zeigen eine Konzentration der analysierten Rezeptoren CD66b, CD11b und CD18 an den Zell-Zell-Kontaktstellen, was für eine Rezeptor-induzierte Adhäsion spricht. Diese spezielle Verteilung der Oberflächenmoleküle findet sich nicht nur auf Dubletten, sondern auch auf größeren Aggregaten und überraschenderweise auch auf einem Teil der Einzelzellpopulation. Hier besteht die Möglichkeit, dass die Rezeptorkonzentrierung vor dem Zell-Zell-Kontakt erfolgte, und den Zellteil repräsentiert, der die Adhäsion induziert, oder dass es sich bei ihnen um getrennte Zellaggregate handelt.

Diese Art der Zellpolarisierung scheint sich neben der Rezeptorverteilung ebenfalls auf die Organisation der Zellorganellen auszuwirken. Die Kombination aus dem Hellfeld-Modus und dem 785 nm Laser, dessen Signal ein Maß für die Zellgranularität liefert, macht eine Lokalisierung der Zellorganellen möglich. Vor allem in größeren Einzelzellen oder Zellclustern, die solche Zellen enthalten, kann man deutlich eine Co-Lokalisation von Zellorganellen und Rezeptoren erkennen. Zusätzlich zeigen sich im Hellfeld-Modus dunkle Punkte im Bereich der größten Rezeptordichte, was neben den Fluoreszenzsignalen ebenfalls für eine hohe Konzentration an Oberflächenmolekülen sprechen könnte.

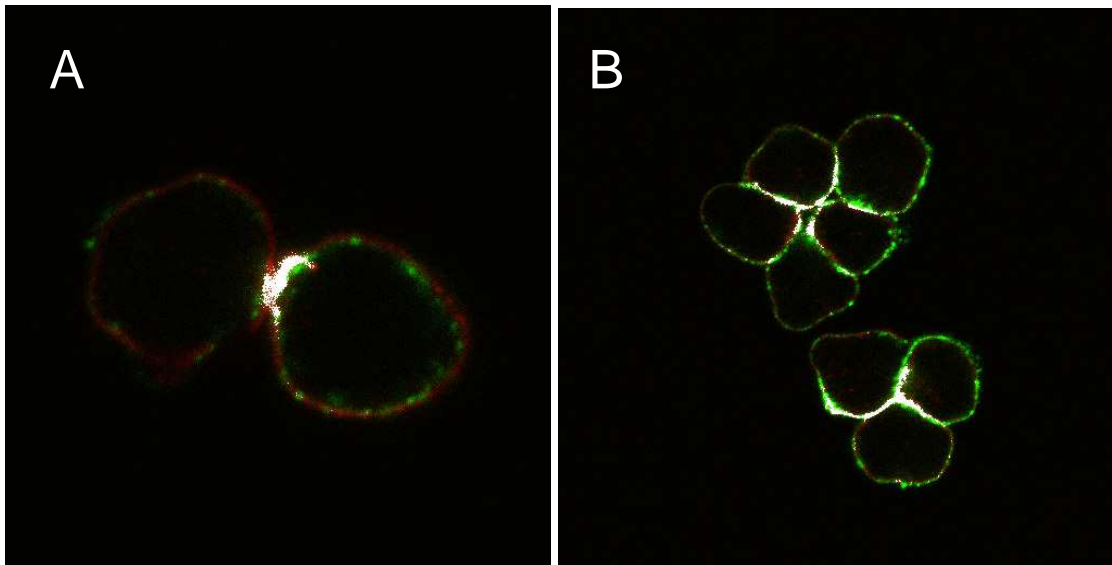


**Abbildung 31: Fotografische Dokumentation der CD66b/CD11b/CD18-Rezeptorexpression und Neutrophil-Aggregatbildung (ImageStream<sup>x</sup>).** A, Exemplarische Dot-Blots der Aggregatbildung (CD66b<sup>+</sup> Population) nach fMLP- ( $2 \times 10^{-8}$  M) und SaS (1 %)-Stimulation. Die x-Achse definiert die Fläche („area“) und die y-Achse das Verhältnis von Länge zu Breite („aspect ratio“) der gemessenen Ereignisse. Für die genaue Bestimmung von hetero- und homotypischen Dubletten wurden weitere Analyseschritte durchgeführt. Diese sind im Abschnitt „Material und Methoden“ genauer beschrieben. B, Fotoauswahl von Einzelzellen sowie Zellaggregaten nach SaS-Stimulation. Alle Fotos wurden mit einem 40 x Objektiv (ImageStream<sup>x</sup>; Amnis, Seattle, USA) aufgenommen, und mit der IDEAS-Software (Amnis, Seattle, USA) analysiert. Dargestellt wurden die Zellen im Kanal „Hellfeld“ (BF / Kanal 1) und in den Fluoreszenzkanälen für die CD66b- (FITC / Kanal 2), CD11b- (PE / Kanal 3) und CD18-Färbung (PE-Cy5 / Kanal 5). Der 785 nm-Laser liefert Angaben zu der Verteilung und Menge an Granula innerhalb der Zellen. Der Kanal 4 wurde für die vorliegende Analyse nicht benötigt. B-1, Einzelzelle. B-2, polarisierte Einzelzelle. B-3, homotypische Dublette (Seitenansicht). B-4, homotypische Dublette (Ansicht von oben). B-5, heterotypische Dublette (neutrophiler Granulozyt / Monozyt). B-6, homotypisches Zelltriolett. B-7, größeres Neutrophil-Aggregat. B-8, B-3 mit Maßstabsbalken. B-9, B-4 mit Maßstabsbalken.

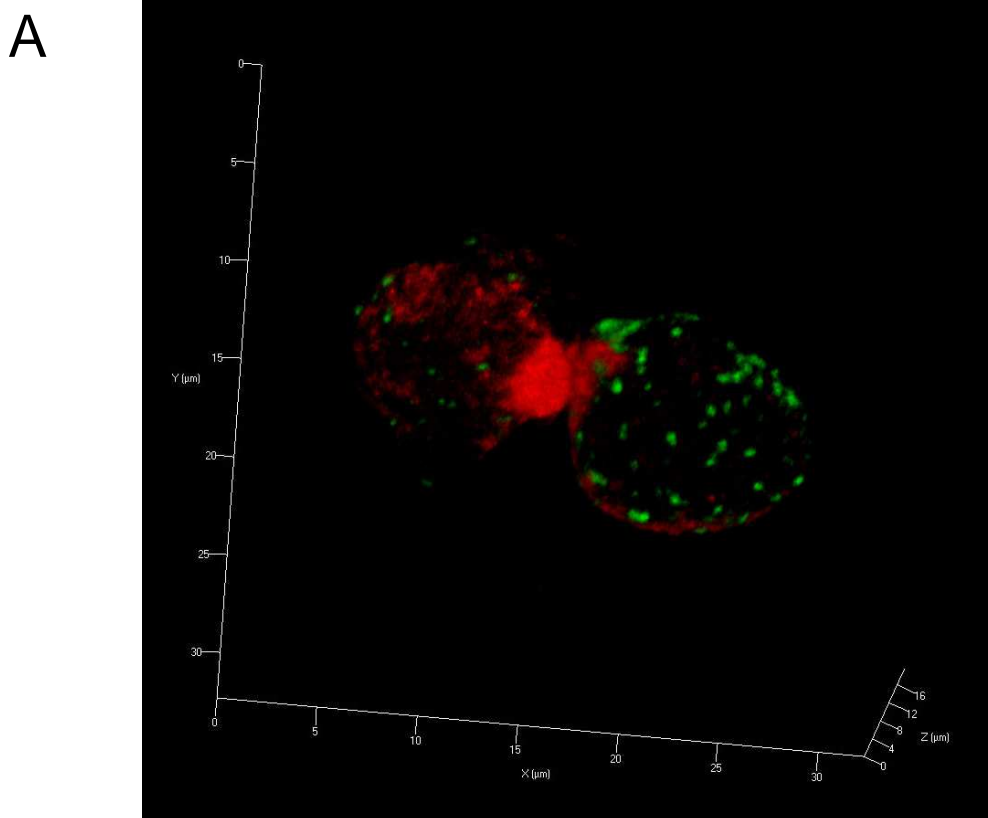
### 2.7.2 Fotografische Dokumentation der CD66b/CD11b Rezeptorexpression auf Zellaggregaten im LSM 780

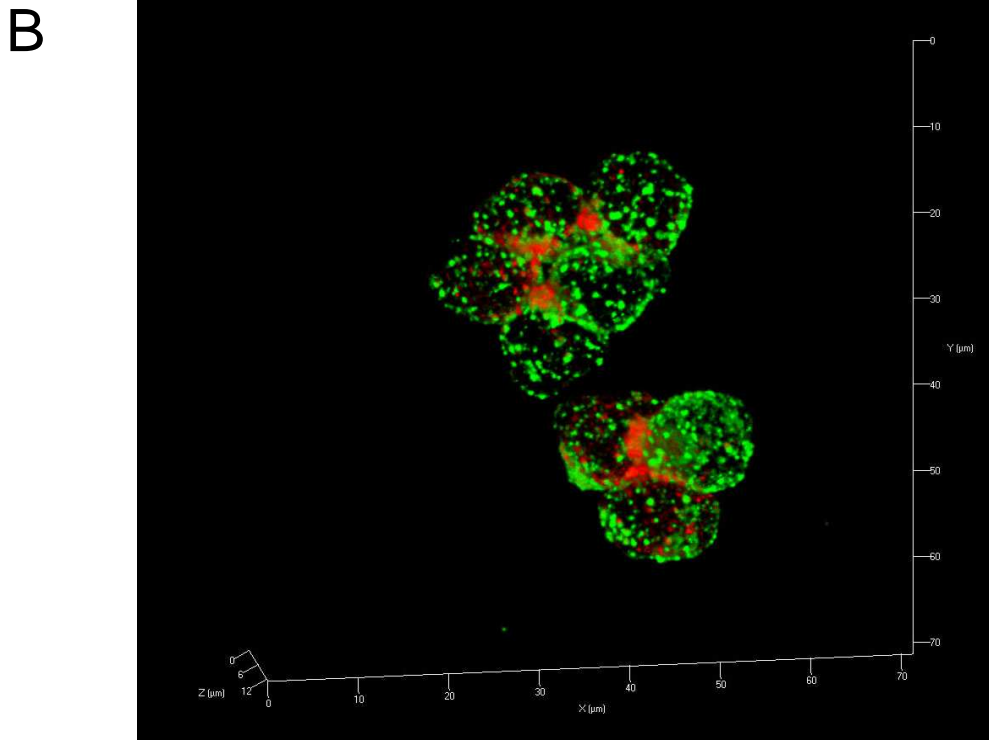
Beim LSM 780 handelt es sich um ein konvokales Laser-Scanning Mikroskop. Mit Hilfe dieser Technik war es möglich, sowohl 3-dimensionale Aufnahmen von Zellaggregaten zu generieren wie auch die schon in 2.7.1 thematisierte Co-Lokalisation der Moleküle genauer zu analysieren.

Die Auswertung der Co-Lokalisation zwischen CD66b und CD11b bestätigt die in 2.7.1 beschriebenen Beobachtungen. Beide Moleküle werden verstärkt an den Zell-Zell-Kontaktstellen exprimiert. Dies trifft sowohl auf Zelldubletten (Abbildung 32A) wie auch auf die größeren Zellaggregate (Abbildung 32B) zu. Die Darstellung der Molekülexpression im 3D-Modell zeigt deutlich, dass im Gegensatz zu den Zell-Zell-Kontaktstellen, auf der restlichen Zelloberfläche eine andere Molekülverteilung vorherrscht. Hier findet man bei CD11b sowohl bei den Dubletten wie auch Aggregaten eine im Vergleich zu CD66b diffuse Molekülverteilung. CD66b hingegen wird eher punktuell exprimiert (Abbildung 33A, B).



**Abbildung 32: Fotografische Dokumentation der CD66b/CD11b Oberflächenexpression und Co-Lokalisation auf Neutrophilaggregaten (LSM 780 / 40 x Objektiv) nach SaS-Stimulation. CD66b-Färbung (grün / Maus anti-human CD66b FITC), CD11b-Färbung (rot / Maus anti-human CD11b APC), Co-Lokalisation (weiß) A, Zelldublette; B, 3'er bzw. 5'er Zellaggregat**





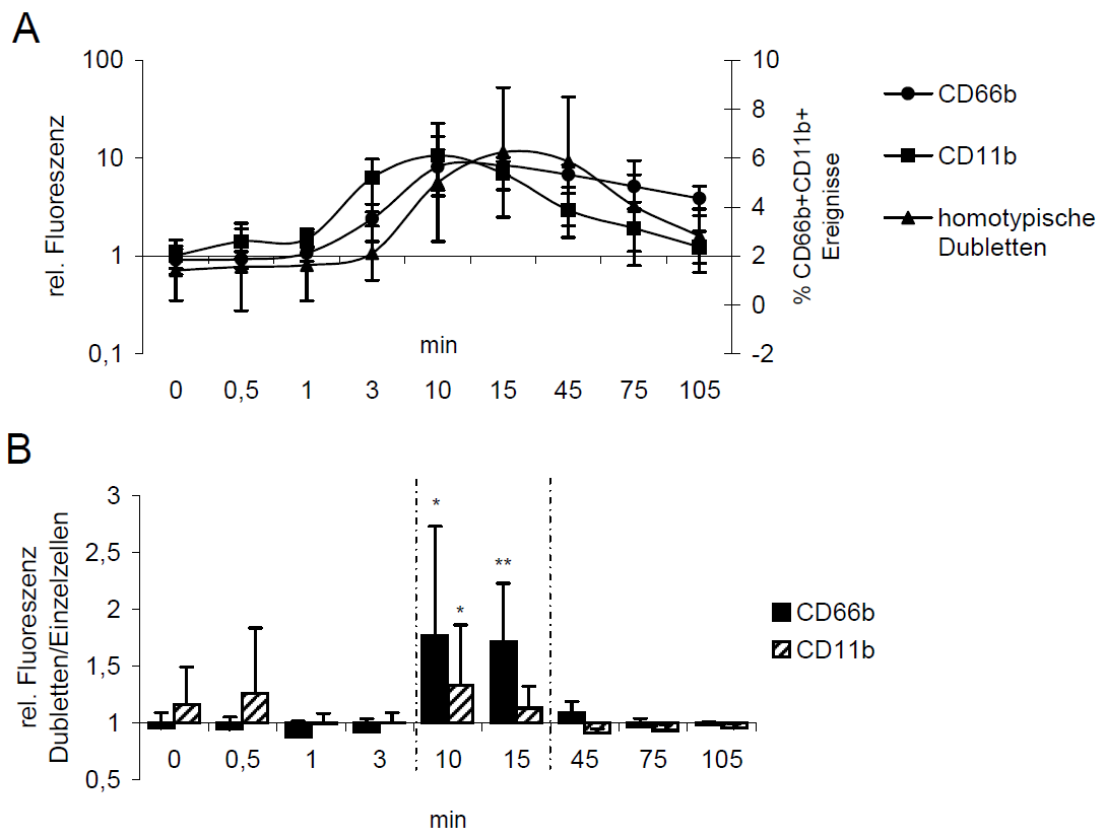
**Abbildung 33: 3D-Modell der CD66b/CD11b Oberflächenexpression nach SaS-Stimulation (LSM 780 / 40 x Objektiv).** CD66b-Färbung (grün / Maus anti-human CD66b FITC), CD11b-Färbung (rot / Maus anti-human CD11b APC); A, Zeldublette; B, 3'er bzw. 5'er Zellaggregat

## 2.8 Kinetik der Dublettenbildung und Vergleich der CD66b/CD11b-Rezeptorexpression mit Einzelzellen

Die Rezeptorkinetik wurde, wie schon für die Einzelzellen, ebenfalls für die homotypischen Dubletten erstellt. Um die Werte mit den Einzelzellen vergleichen zu können, wurde die Fluoreszenz der gemessenen Ereignisse halbiert. Da es sich bei den Aggregaten nach der Auswertung der Rezeptorverteilung allen Anschein nach um eine rezeptorvermittelte Adhäsion handelt, sollte im Vergleich mit der Kinetik der Dublettenanzahl ein möglicher Zusammenhang von CD66b/CD11b-Expression und Dublettenbildung ermittelt werden.

Nach der fMLP-induzierten parallelen CD66b/CD11b-Expression zwischen 3 min und 10 min kommt es zu keiner gesteigerten Bildung von homotypischen Dubletten. Die Anzahl der Aggregate steigt unabhängig vom Erscheinen der Moleküle CD66b/CD11b auf der Zelloberfläche erst mit der Zeit leicht an. Anders sieht es bei der SaS-induzierten Molekülexpression aus. Hier kann man zwischen 3 min und 10 min einen parallelen Anstieg der CD66b Expression und Dublettenmenge beobachten, was für einen direkten Zusammenhang dieser beiden Phä-

nomene spricht. Da beim maximalen Anstieg von CD11b zwischen 1 min und 3 min die Dublettenanzahl konstant bleibt, scheint CD11b nicht der auslösende Faktor zu sein. Unterstützt wird diese These durch einen Vergleich der Rezeptorexpression der Einzelzellen mit den Dubletten. Zum Zeitpunkt des stärksten Anstiegs der Dubletten (3 min – 10 min), in dem noch nicht alle Einzelzellen die maximale Aktivierung durchlaufen haben, weisen die Aggregate im Vergleich mit den Einzelzellen eine signifikant höhere CD66b-Expression auf. Dies spricht zusätzlich für eine zentrale Rolle von CD66b in der Initiierung der Aggregatbildung. Auffällig ist die Tatsache, dass nach dem Anstieg der Dubletten zwischen 3 min und 15 min ein Abfallen der Aggregatanzahl zu beobachten ist. Dies zeigt, dass die Clusterbildung der Granulozyten auf einem reversiblen Adhäsionsprozess basiert.

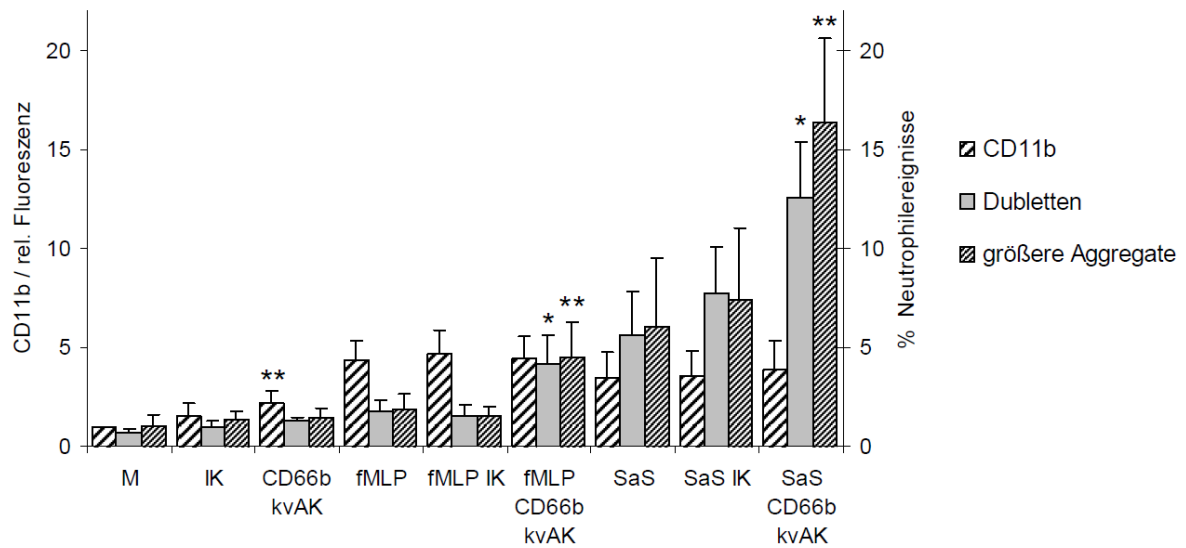


**Abbildung 34: Korrelation von CD66b-Expression und homotypischer Aggregatbildung nach SaS-Stimulation.** A, Kinetik der CD66b/CD11b-Expression nach Stimulation mit SaS A (1 %). Analytierte Zeitpunkte: 0, 0,5, 1, 3, 10, 15, 45, 75, 105 min. Die relative Fluoreszenz (y-Achse 1) bildet sich aus den halbierten Fluoreszenzwerten der Dubletten, und dem daraus abgeleiteten Verhältnis zur Einzelzell-Negativkontrolle. Die y-Achse 2 stellt den prozentualen Anteil der homotypischen Dubletten an allen CD66b<sup>+</sup> Ereignissen dar. (n = 6). B, Korrelation der CD66b/CD11b-Expression von Einzelzel-

len und homotypischen Aggregaten. Diese Abbildung beinhaltet einen Teil der in Abbildung A gezeigten Daten. Sie zeigt die relative Menge der Molekülexpression dargestellt als Dubletten/Einzelzell Quotient (Dublettenfluoreszenz / 2 geteilt durch Einzelzellfluoreszenz). Beide Werte basieren auf der relativen Fluoreszenz, also dem Verhältnis zur Einzelzell-Negativkontrolle. Die statistische Analyse wurde nur für die Zeitwerte 10 min und 15 min durchgeführt. ( $n = 6$ ).  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  im Vergleich zur relativen Fluoreszenz der Einzelzellen. Die abgebildeten Daten basieren auf sechs unabhängigen Experimenten mit jeweils unterschiedlichen Probanden. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige +/- Standardabweichung. Um eine genauere Analyse zu gewährleisten wurden Experimente mit einer SaS-induzierten CD66b Expressionssteigerung  $< 20\% \uparrow$  (Abbildung 26) nicht berücksichtigt.

## 2.9 CD11b-Expression und Aggregatbildung nach Inkubation mit kreuzvernetzendem CD66b-Antikörper

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der CD66b-Kreuzvernetzung und der Aggregatbildung von neutrophilen Granulozyten im Vollblut zu untersuchen, wurden die verschiedenen Proben neben fMLP und SaS zusätzlich mit oder ohne kreuzvernetzendem CD66b-Antikörper inkubiert. Damit mögliche „unspezifische“ Aktivierungen durch die eingesetzten Antikörpermoleküle ausgeschlossen werden können, wurden die Ansätze parallel mit der entsprechenden Isotypkontrolle in gleicher Konzentration behandelt. Das Ergebnis zeigt deutlich einen direkten Zusammenhang zwischen der Kreuzvernetzung von CD66b und der Aggregatbildung. Durch die Zugabe des CD66b-Antikörpers kann im Gegensatz zur Isotypkontrolle sowohl nach fMLP- wie auch nach SaS-Stimulation ein signifikanter Anstieg der Dubletten- und Aggregatbildung beobachtet werden. Die Ausprägung der Clusterbildung scheint dabei vom Aktivierungszustand der Zellen abhängig zu sein. Im Gegensatz zur fMLP und SaS-Stimulation kann in der Mediumkontrolle kein signifikanter Anstieg an Aggregaten beobachtet werden. Da nach der Stimulation der Zellen mit fMLP und vor allem SaS mit einem deutlichen Anstieg der CD66b-Moleküle auf der Zelloberfläche zu rechnen ist, scheint die Ausprägung der durch Kreuzvernetzung induzierten Clusterbildung in direkter Abhängigkeit zur Menge an exprimiertem CD66b zu stehen. Im Gegensatz dazu scheint die CD66b-AK-induzierte Aggregatbildung unabhängig von der CD11b-Expression zu erfolgen, da nach der fMLP-Stimulation die relative Menge an CD11b höher liegt als nach der SaS-Stimulation, die Menge an Zellclustern nach SaS-Aktivierung aber deutlich höher liegt. Interessant ist noch die Tatsache, dass in der Mediumkontrolle durch den alleinigen Antikörpereinsatz ein signifikanter Anstieg der CD11b-Expression induziert werden konnte.



**Abbildung 35: CD11b-Expression und Aggregatbildung im Vollblut nach Inkubation mit SaS, fMLP und kreuzvernetzendem CD66b-Antikörper.**

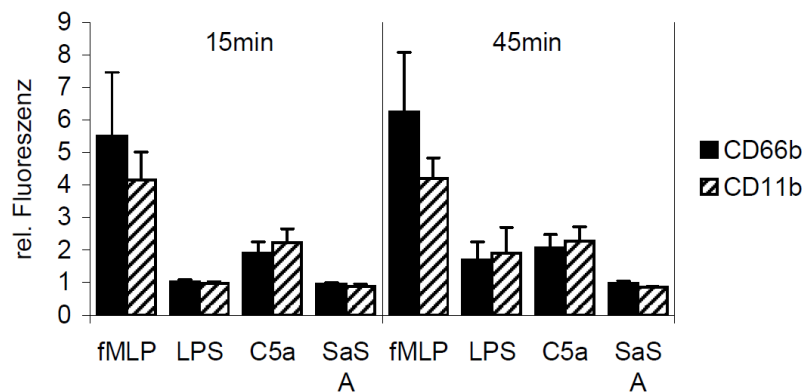
Eingesetzte Substanzen: fMLP ( $2 \times 10^{-8}$  M), SaS A (1 %), CD66b kvAK (CD66b kreuzvernetzender AK; 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , IK (Isotypkontrolle; 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Analysierter Zeitpunkt: 45min. Einheiten: CD11b (y-Achse 1) relative Fluoreszenz, bezieht sich auf das Verhältnis zur Negativkontrolle; Dubletten bzw. größere Aggregate (y-Achse 2) Anteil / % an allen gemessenen Neutrophilereignissen (inklusive Einzelzellen). Die abgebildeten Daten basieren auf sechs unabhängigen Experimenten mit sechs unterschiedlichen Probanden. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige +/- Standardabweichung  $n = 6$  \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  im Vergleich zur entsprechenden Isotypkontrolle.

## 2.10 CD66b und CD11b-Expression auf isolierten neutrophilen Granulozyten

Die bisher vorgestellten Versuchsreihen wurden alle in Vollblut durchgeführt. Da es sich dabei um eine hochkomplexe Zusammensetzung aus zellulären und Plasmabestandteilen handelt, ist es schwierig, eine Aussage über die Komponenten zu treffen, die letztendlich für die spezielle Aktivierungsform verantwortlich sind. Es könnte sich um eine direkte SaS-Neutrophil-Interaktion, aber auch um eine indirekte Aktivierung über andere Faktoren handeln. Daher wurde das Experiment ebenfalls mit isolierten Granulozyten mit einer Reinheit von  $> 95$  % durchgeführt. Somit war ein Ausschluss der meisten zellulären wie auch Plasmabestandteile gewährleistet.



Das Ergebnis macht deutlich, dass es durch die Entfernung des Plasmas und der übrigen Leukozyten nicht zur Entwicklung des beschriebenen Aktivierungstyps kommt. Überraschenderweise ist, im Gegensatz zum fMLP, und im Vergleich zur Negativkontrolle nach dem Einsatz des SaS keine Steigerung der CD66b- oder CD11b-Expression zu erkennen, was auf eine Nicht-Aktivierung der Zellen hindeutet. Eine direkte SaS/Granulozyten-Interaktion scheint alleine nicht die spezielle Aktivierung der Zellen zu induzieren.



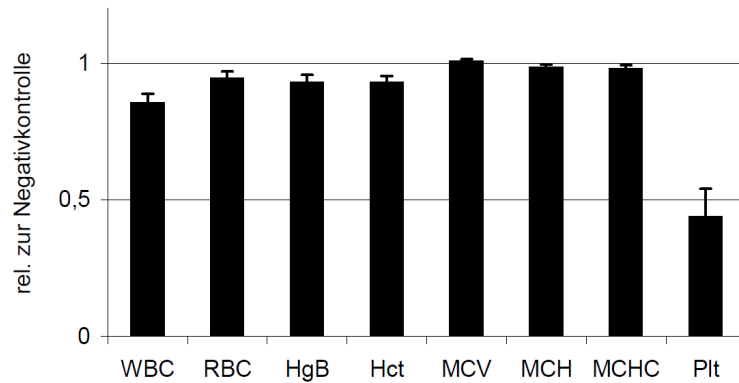
**Abbildung 36: CD66b und CD11b Expression auf isolierten neutrophilen Granulozyten nach Inkubation mit SaS und anderen Stimuli.** Eingesetzte Substanzen: fMLP ( $2 \times 10^{-8}$  M), LPS (10 ng / ml), C5a ( $2 \times 10^{-7}$  M) und SaS A (1 %). Die Zeitpunkte 15 min (links) und 45 min (rechts) nach Zugabe der jeweiligen Stimuli wurden für die Analyse herangezogen. Die relative Fluoreszenz bezieht sich auf das Verhältnis zur Negativkontrolle. Die abgebildeten Daten basieren auf sechs unabhängigen Experimenten mit sechs unterschiedlichen Probanden. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige +/- Standardabweichung. (n = 6).

## 2.11 Vergleich der zellulären Blutparameter vor und nach Plasmaersatz

Durch den Austausch des Plasmas durch Zellkulturmedium (IMDM / 5 % FCS) sollte eine potenzielle Beteiligung der Plasmafaktoren an den beobachteten Prozessen ermittelt werden. Um eventuelle osmotische Veränderungen oder Abweichungen in den Zellpopulationen nach Plasmasubstitution zu untersuchen, wurde jeweils vor und nach Anwendung der Methode ein kleines Blutbild erstellt.

Durch die Methodik kommt es zu einem Rückgang der weißen Blutkörperchen und Blutplättchen um ca. 15 % bzw. 60 %. Alle anderen Parameter liegen im Bereich des unbehandelten

Vollbluts. Da die gemessenen osmotischen Parameter (MCV, MCH, MCHC) unberührt bleiben, und nur ein leichter Rückgang der in dieser Studie relevanten weißen Blutkörperchen zu verzeichnen ist, wurde die Methode angewandt, um die Rolle des Plasmas in den jeweiligen experimentellen Abläufen zu ermitteln.



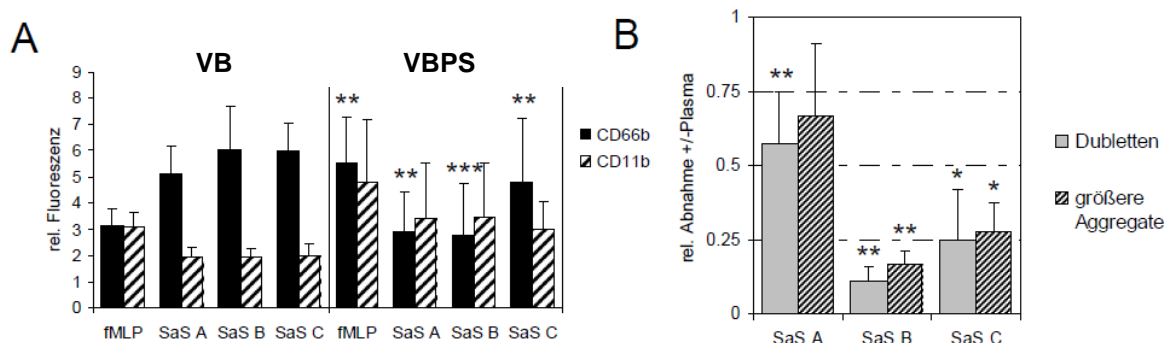
**Abbildung 37: Vergleich der zellulären Blutparameter vor und nach Plasmasubstitution.** Für die Kontrolle der zellulären Blutparameter nach dem Austausch des Plasmas durch Zellkulturmedium (IMDM / 5 % FKS) wurde das Blut vor und nach der Substitution mit Hilfe des Hämatokritsystem „Coulter ACT8“ (Beckman Coulter, Krefeld) analysiert. Die dargestellten Werte zeigen das Verhältnis zu den Vollblutparametern (Negativkontrolle, Wert 1). WBC = weiße Blutkörperchen, RBC = rote Blutkörperchen, HgB = Hämoglobin, Hct = Hämatokrit, MCV = mittleres corpuskuläres Volumen (RBC), MCH = mittleres corpuskuläres Hämoglobin, MCHC = mittlere corpuskuläre Hämoglobin-Konzentration, Plt = Blutplättchen. Die abgebildeten Daten basieren auf 15 unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Probanden. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige +/- Standardabweichung. n = 15.

## 2.12 CD66b/CD11b-Expression und Aggregatbildung nach Plasmaersatz

Da die Ergebnisse der bisher vorgestellten Versuchsreihen im Vollblut oder isolierten Granulozyten eine „Ja-Nein-Antwort“ bezüglich des Effekts geliefert haben, stellte sich die Frage, inwieweit zelluläre Bestandteile wie Monozyten oder Plasmakomponenten an der beschriebenen Neutrophilaktivierung mit Clusterbildung beteiligt sind. Zum Vergleich wurden alle Experimente nun parallel im Vollblut und im Vollblut mit Plasmaersatz durchgeführt, der noch den Großteil der zellulären Fraktion beinhaltet (siehe oben).

Wie die Ergebnisse zeigen, hat die Entfernung des Plasmas einen sehr großen Effekt auf die beschriebene Aktivierungsform der neutrophilen Granulozyten. Durch die Plasmasubstitution

kommt es bei allen drei SaS zu einer vollständigen Aufhebung der beschriebenen Phänomene. Die Rezeptorexpression ähnelt nun sehr der fMLP-induzierten Aktivierung. Im Vergleich zum Vollblut kommt es zu einem Rückgang der CD66b-Expression um 39 % und zu einer Steigerung der CD11b-Expression um 74 %. Dies resultiert wie bei fMLP in einem Rezeptorverhältnis von annähernd 1:1. Zusätzlich kann man einen massiven Rückgang an Dubletten und größeren Aggregaten zwischen 38 % (SaS A) und 85 % (SaS B) beobachten. Dies zeigt, dass die Entfernung des Plasmas vollständig die beschriebenen Effekte aufhebt, und somit die Plasmakomponenten eine Schlüsselrolle in der Entstehung des Aktivierungstyps einnehmen müssen.

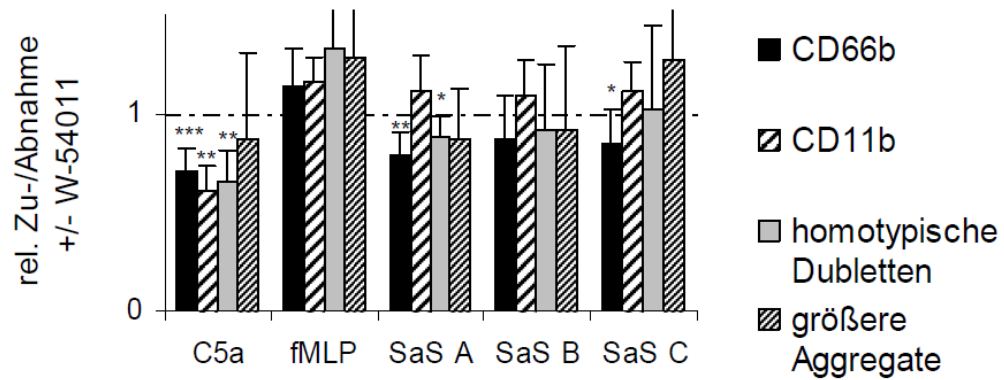


**Abbildung 38: Einfluss der Plasmasubstitution auf die CD66b/CD11b-Expression und Aggregatbildung.** Eingesetzte Substanzen: fMLP ( $2 \times 10^{-8}$  M) und SaS A-C (1 %). Analysierter Zeitpunkt: 45 min. A, Einfluss der Plasmasubstitution auf die CD66b/CD11b-Expression. Linke Seite: Vollblut (VB); Rechte Seite: Plasma durch Zellkulturmedium ersetzt (VBPS). Die relative Fluoreszenz bezieht sich auf das Verhältnis zur Negativkontrolle.  $n = 6$ . B, Einfluss der Plasmasubstitution auf die Aggregatbildung. Die Abbildung zeigt die Menge an hetero- und homotypischen Neutrophil-Dubletten sowie größeren Aggregaten in Relation zu Proben ohne Plasmasubstitution.  $n = 6$ . Die abgebildeten Daten basieren auf sechs unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Probanden. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige +/- Standardabweichung. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  im Vergleich zur jeweiligen Vollblutprobe.

## **2.13 CD66b/CD11b-Expression und Aggregatbildung nach Vorinkubation mit den C5aR1-Antagonisten W-54011**

Da die verantwortliche Komponente mit Hilfe der Plasmasubstitution ermittelt werden konnte, wurde nun gezielt nach Plasmaproteinen gesucht, die erst nach der SaS-Zugabe entstehen, und einen Einfluss auf die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten ausüben können. Ein Plasmaprotein, auf das dies zutrifft ist der Komplementfaktor C5a, der schon als Granulozyten-Stimulanz in 2.1 verwendet wurde. Der wichtigste Rezeptor der Granulozyten, um dieses Protein zu erkennen bzw. zu binden, ist der C5a-Rezeptor 1 (C5aR1). Mit Hilfe des C5a-R1-Antagonisten W-54011 ist es möglich, diesen Rezeptor für C5a zu blockieren, und somit eine Zellaktivierung über dieses Protein zu verhindern.

Die Wirkung des Antagonisten kann durch die Positivkontrolle bestätigt werden. Der Einsatz des natürlichen Liganden C5a führt im Gegensatz zu den Versuchen ohne Substanz zu einer Blockierung der Zellaktivierung und Dublettenbildung. Eine eventuelle Zytotoxizität kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da die fMLP-induzierte Aktivierung trotz Einsatz des Antagonisten unverändert stattfindet. Bei der SaS-induzierten Aktivierung kann man bei allen SaS eine leichte und auch nur teilweise signifikante Abnahme der CD66b- bzw. Zunahme der CD11b-Expression beobachten. Dies zeigt, dass der Effekt eine Ähnlichkeit mit der Molekülentwicklung nach Plasmaersatz besitzt, diese Entwicklung der CD66b und CD11b-Expression aber viel geringer ausfällt. Da man nach dem Ergebnis der Positivkontrolle eine unzureichende Wirkung des Antagonisten ausschließen kann, müssen noch andere Rezeptoren oder Plasmafaktoren neben C5a für den beobachteten Aktivierungstyp verantwortlich sein. Trotzdem kann eine Beteiligung von C5a und dem C5aR1 nachgewiesen werden. Was die Aggregatbildung angeht, so konnte durch den Einsatz des Antagonisten sowohl nach fMLP- wie auch nach SaS-Stimulation kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.



**Abbildung 39: Einfluss des C5a-Rezeptor1-Antagonisten W-54011 auf die CD66b/CD11b-Expression und Aggregatbildung.** Eingesetzte Substanzen: W-54011 (1  $\mu$ M), fMLP ( $2 \times 10^{-8}$  M), C5a ( $2 \times 10^{-7}$  M) und SaS A-C (1 %). Analysierter Zeitpunkt: 45 min. Vor Stimulation erfolgte eine 10 minütige Vorinkubation mit dem Rezeptorantagonisten oder der Trägersubstanz (IMDM, Negativkontrolle). Die dargestellten Werte zeigen das Verhältnis zu den Daten ohne Antagonisten-Einsatz (Negativkontrolle, Wert 1). Die abgebildeten Daten basieren auf sechs unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Probanden. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige +/- Standardabweichung. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  im Vergleich zur jeweiligen Probe ohne Rezeptorantagonist.

## V Diskussion

### 1. Charakterisierung der *S. aureus*-Stämme

Der Sequenztyp 398 entwickelt Virulenzmuster, die auf eine gesteigerte Anpassung an den Menschen hindeuten. Dieser evolutionäre Trend, der mit einer erhöhten Humanpathogenität einhergeht, wird in den Krankheitsbildern der betroffenen Personen deutlich. Tritt das Bakterium beim Tier vorrangig als Besiedler in Erscheinung, so findet man beim Menschen in den letzten Jahren ernsthafte ST398-induzierte Erkrankungen wie Endokarditis oder Ventilator-assoziierte Pneumonien (Ekkelenkamp *et al.*, 2006; Witte *et al.*, 2007). Auf genetischer Ebene zeigt sich dieser Wandel der Pathogenität in einer erhöhten genetischen Diversität innerhalb der Stämme, was den Erwerb von Virulenzfaktoren einschließt. Beispiele für ST398 „untypische“ Virulenzfaktoren sind die Nachweise für Panton-Valentine-Leucocidin (PVL) und Entero-toxine (Ekkelenkamp *et al.*, 2006; Kadlec *et al.*, 2009; Welinder-Olsson *et al.*, 2008). Der wichtigste Risikofaktor von diesem Bakterium besiedelt zu werden ist weiterhin die direkte Exposition zu MRSA-positiven Tieren, die als Überträger fungieren (Abbildung 40).

Characteristic	MRSA (N = 323)	MRSA ST398 (N = 292)
Male	135 (42%)	196 (67%)
Age (median)	52 (range 0–102)	43 (range 1–95)
Patients	235 (72%)	276 (94%)
Health care workers	88 (27%)	16 (6%)
Risk group		
Foreign hospital	41	6
Livestock contact	9	224
MRSA in family	15	8
Other Dutch HCI	6	1
Outbreak screening	166	2
Reason unknown	8	3
Unexpected	78	28

**Abbildung 40: Charakteristika von MRSA und ST398-MRSA positiven Individuen.** Vor allem in der Rubrik „livestock contact“ kann man deutlich die Unterschiede zwischen „herkömmlichen“ MRSA und ST398 erkennen.

Quelle: verändert nach Wulf *et al.*, 2011

Ein anderer *S. aureus*-Erreger, der mit der Besiedlung von Nutztieren in Verbindung gebracht wird, ist der Sequenz Typ (ST) 9. Dieser Stamm wird ebenfalls häufig in Schweinemastbetrieben nachgewiesen, es fehlen aber, im Gegensatz zum ST398, Hinweise für die Besiedlung anderer Tierarten. Der ST9 tritt beim Menschen nur selten in Erscheinung, und besitzt daher als Krankheitserreger eine eher untergeordnete Bedeutung (Kehrenberg *et al.*, 2009).

Da die genetische Analyse in der Charakterisierung von Mikroorganismen, inklusive *S. aureus*, einen zentralen Stellenwert einnimmt, wurde in dieser Arbeit ebenfalls der genetische Hintergrund der in „Material und Methoden“ vorgestellten Stämme untersucht. Bei ihnen handelte es sich um drei ST9 und sechs ST398 tierischen und menschlichen Ursprungs, sowie zwei humane Referenzstämme. Das Ergebnis des durchgeführten DNA-Microarrays zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen den ST9- und ST398-Stämmen. Während die ST398-Stämme, was die zentralen Virulenz- und Adhäsionsfaktoren angeht, alle eine identische genetische Ausstattung aufwiesen, wurden bei den ST9-Stämmen Unterschiede zwischen Stämmen menschlichen und tierischen Ursprungs deutlich. Bei einem humanen ST9-Isolat (ST9a) konnte man im Gegensatz zu seinem Gegenstück tierischen Ursprungs die Gene für die Virulenzfaktoren CHIPS/SAK/SCIN nachweisen, was auf die Aneignung eines beta-Hämolysin codierenden Bakteriophagen spricht (van Wamel *et al.*, 2006). Die positiven Ergebnisse für CHIPS und SAK konnten auf Proteinebene bestätigt werden. Dies deutet auf einen erfolgten Anpassungsprozess an humane Umgebungsbedingungen hin. Wie erwähnt, konnte man bezüglich der Ausstattung mit Virulenz- und Adhäsionsgenen keine zentralen Unterschiede zwischen den ST398-Stämmen detektieren. Es zeigte sich, dass, im Gegensatz zu den ST9, bei den ST398 keine die Virulenzfaktoren betreffenden genspezifischen Unterschiede zwischen den tierischen und humanen Isolaten vorlagen.

Die ersten spa-Typ-übergreifenden Unterschiede innerhalb der ST398-Stämme wurden nach der Analyse der Konglomeratgrößen in der Flüssigkultur deutlich. Dort zeigte sich, dass zwei Stämme, der ST398b und der ST398f, eine signifikant höhere Zellgröße als alle anderen aufwiesen. Das um mehr als das 2,5 fach erhöhte MCV deutet auf eine Veränderung in den Adhäsionseigenschaften der Bakterienzellen hin. Dieser Anstieg im Adhäsionspotenzial könnte auf eine gesteigerte Expression von „clumping“ Faktoren, wie dem „clumping factor A“ hindeuten. Es ist bekannt, dass dieses Protein bei einer hohen Zelldichte in Flüssigkultur eine Aggregation von Einzelkolonien induzieren kann (Foster, 2005). „Clumping factor A“ ist ein prominenter Virulenzfaktor (Josefsson *et al.*, 2001), der es der Bakterienzelle ermöglicht, an ihrer Oberfläche humanes Fibrinogen zu binden, und somit eine Opsonisierung zu vermeiden

und gleichzeitig die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix zu verbessern (Cree *et al.*, 1994; Greene *et al.*, 1995). Um diese Fibrinogen-Bindung zu testen, wurde ein Fibrinogenbindungs-Assay durchgeführt. Das Ergebnis zeigte eine ebenfalls stark erhöhte Fibrinogenbindungskapazität der Bakterienoberfläche bei den Stämmen ST398b und ST398f. Diese Beobachtung bestätigt die veränderten Adhäsionseigenschaften der beiden ST398 und weist deutlich auf eine Beteiligung des „Clumping factor A“ hin. Da, wie vorher beschrieben, alle ST398 den identischen Satz von Adhäsionsgenen aufweisen, ist das Ergebnis aller Wahrscheinlichkeit nach auf Veränderungen in den Regulationsmechanismen der Gen- bzw. Proteinexpression zurückzuführen.

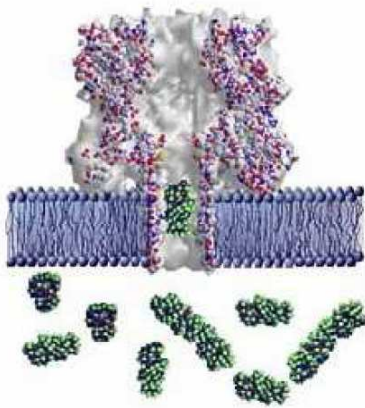
Neben den Adhäsionseigenschaften der Bakterien spielt auch die Produktion und Freisetzung von lysogenen Substanzen in Bezug auf die Pathogenität eine wichtige Rolle. Daher wurde das Lysepotenzial der verschiedenen SaS's im Hinblick auf Erythrozyten und neutrophile Granulozyten untersucht. Überraschenderweise zeigte sich bei den ST398 ein ähnliches Muster wie schon bei der Adhäsion. Bei der Lyse der neutrophilen Granulozyten konnte man nach der Behandlung durch die Überstände des ST398b und ST398f mit Abstand die meisten toten Zellen detektieren. Da der Prozentsatz an lysierten Zellen mit ca. 70 % (ST398b) bzw. annähernd 100 % (ST398f) lag, kann man von einem sehr hohen Lysepotenzial ausgehen. Eine 10-minütige Inkubation mit dem jeweiligen Exoproteincocktail reichte aus, um den Großteil an eingesetzten Immunzellen abzutöten. Der große Abstand zu den anderen SaS, die maximal einen Prozentsatz von 10 % lysierter Zellen erreichten, spricht für eine viel aggressivere lysogene Substanz oder eine viel höhere Substanzkonzentration. Ein ähnliches Bild, wie bei der Lyse der neutrophilen Granulozyten, zeigte der Grad der Erythrozytenschädigung. Hier fand man nach der Inkubation mit dem SaS des ST398f die mit Abstand höchste Freisetzung von Hämoglobin vor, die als Maßstab für die Erythrozytenlyse herangezogen wird. Auffällig war die Tatsache, dass die drei ST398 (ST398b, ST398b, ST398f), die den höchsten Prozentsatz an lysierten neutrophilen Granulozyten induzierten, auch die größte Erythrozytenschädigung hervorriefen. Dies deutet auf ein Hämolysin hin, dass sowohl hämolytische, wie auch leukolytische Eigenschaften besitzt. Da die Array-Ergebnisse zeigten, dass alle Stämme die gleiche genetische Ausstattung hinsichtlich der Hämolysine und Leukozidine besitzen, und die Wahrscheinlichkeit einer neuartigen Substanz sehr gering ist, wurde davon ausgegangen, dass es sich um eine stark erhöhte Konzentration des jeweiligen Proteins bzw. der jeweiligen Proteine handeln muss. Um diese These zu belegen wurde ein Alpha-Hämolysin-ELISA durchgeführt. Dieser spiegelte exakt das Ergebnis der Lyseexperimente wieder. So fand man im SaS der



Stämme ST398b und ST398f im Vergleich mit allen anderen ST398-Stämmen eine ca. 20-fach höhere Konzentration dieses Proteins vor.

Alpha-Hämolyisin ist der Archäotyp eines oligomerisierenden porenbildenden Toxins. Dieses wasserlösliche 34 kDa Protein wird nur von *S. aureus* und nicht von Koagulase-negativen Staphylokokken produziert und sezerniert. Es wird vermutet, dass die geringere Virulenz dieser Erreger auf das Fehlen dieses Virulenzfaktors zurückzuführen ist (Bhakdi *et al.*, 2004). Die Clusterbildung der Einzelmoleküle zu einem porenformenden Heptamer erfolgt in cholesterol- und sphingomyelinreichen Membranmikrodomänen. Nach abgeschlossener Oligomerisierung bildet sich eine Pore von 1 nm - 3 nm Durchmesser (Cescatti *et al.*, 1991). Alpha-Hämolyisin ist einer der zentralen Virulenzfaktoren von *S. aureus*. Die Verwendung von genetisch veränderten Mangelmutanten hat gezeigt, dass dieses Protein maßgeblich an gewebeschädigenden Prozessen und Abszessbildungen beteiligt ist (Bramley *et al.*, 1989; Patel *et al.*, 1987). Je nach Membranbeschaffenheit können Zellen in Alpha-Hämolyisin sensible und resistente Zellarten unterteilt werden. Bei den sensiblen Arten, zu denen Lymphozyten und Keratinozyten zählen, kommt es schon bei relativ geringen Toxin-Dosen zu einer Permeabilisierung der Membran und schließlich zur Nekrose der Zellen. Neutrophile Granulozyten werden den resistenten Zellen zugeordnet. Valeva *et al.* (1997) fanden heraus, dass Granulozytenmembranen die identische Menge an Alpha-Hämolyisin-Molekülen binden wie Lymphozytenmembranen, aber die Porenformende Proteindomäne nicht integriert werden kann. Daraus resultiert eine unvollständige Porenbildung die nicht zu einer Permeabilisierung der Zelle führt. Trotz dieses Nachweises gibt es zahlreiche Hinweise, dass Alpha-Hämolyisin einen negativen Einfluss auf die neutrophilen Granulozyten ausübt. Es gibt Studien, in denen nach Alpha-Hämolyisin Behandlung einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zellen (Suttorp und Habben, 1988), eine Apoptoseinduktion (Bantel *et al.*, 2001) oder ein stark herabgesetztes bakterielles Killing beobachtet wurde (Gemmell *et al.*, 1982). Am deutlichsten zeigt sich die Beteiligung des Proteins an Lyseprozessen in einer neu vorgestellten Studie zur Immunevasionstrategie von CA-MRSA. Dort wurde durch den Einsatz von Mangelmutanten gezeigt, dass Alpha-Hämolyisin bei der Zellyse nach erfolgter Phagozytose eine zentrale Rolle einnimmt (Voyich *et al.*, 2006). Dies steht im Widerspruch zur beschriebenen Lyseresistenz von Neutrophilen. Weitere Studien müssen zeigen, in wie weit eine andere intrazelluläre Membranstruktur oder die Beteiligung anderer Faktoren für die erfolgte Lyse verantwortlich ist. Die bestehende Literatur zeigt letztendlich, dass trotz leicht widersprüchlicher Erkenntnisse zumindest eine Beteiligung des nachgewiesenen Alpha-Hämolyisins an den beobachteten Lyseprozessen als sehr

wahrscheinlich angesehen werden kann. Als weitere Faktoren, die Lyseprozesse induzieren oder verstärken können, sind die ebenfalls im DNA-Micro-Array nachgewiesenen Beta-, Gamma- und Delta-Hämolsine, sowie die erst kürzlich entdeckten und noch nicht im Array enthaltenen Phenol-löslichen Moduline (Wang *et al.*, 2007) zu nennen.



**Abbildung 41: Lipid-Bilayer-Membran mit Alpha-Hämolysin-Nanopore.** Niedrige Konzentrationen des Proteins binden an bisher unbekannte Moleküle an der Zelloberfläche und bilden eine heptamere Pore aus, die den Austausch von monovalenten Ionen mit dem Zellinneren ermöglicht (siehe Abbildung). Dadurch kann in der Zelle eine DNA-Fragmentierung und Apoptoseinduktion ausgelöst werden (Bantel *et al.*, 2001). Hohe Alpha-Hämolysin-Konzentrationen führen zu einer unspezifischen Bindung der Proteine an die Zellmembran und zur Bildung von großen  $\text{Ca}^{2+}$ -durchlässigen Poren. Der unkontrollierte  $\text{Ca}^{2+}$ -

Einstrom führt zu einer massiven Nekrose (Bantel *et al.*, 2001). Quelle: (Robertson *et al.*, 2007) The National Institute of Standards and Technology (NIST), USA.

Man kann zusammenfassen, dass sich auch bezogen auf die lysogenen Eigenschaften die Sonderstellung der Stämme ST398b und ST398f innerhalb der ST398-Gruppe bestätigt hatte, wobei der ST398b einen leicht „abgeschwächten“ Phänotyp aufwies.

Auffällig war ebenfalls die Tatsache, dass der SaS des humanen ST9-Stammes mit den nachgewiesenen Genen für CHIPS/SAK/SCIN (ST9a) eine signifikant niedrigere Alpha-Hämolysin-Konzentration aufwies als der SaS der beiden anderen ST9-Stämme. Dies könnte in direktem Zusammenhang mit den anti-inflammatorischen Eigenschaften der Moleküle CHIPS und SCIN stehen. Die Lyse von Zellen stellt zwar eine wirksame Methode dar, das Immunsystem des Wirts zu schwächen, induziert aber gleichzeitig aufgrund der unkontrollierten Freisetzung von intrazellulären Substanzen eine starke Entzündungsreaktion, die wiederum zur Einwanderung von weiteren Immunzellen führt (genauere Angaben unter der später behandelten Thematik „Zytokine“). Daher könnte die geringe Menge an Alpha-Hämolysin in Kombination mit CHIPS etc. auf eine anti-inflammatorische Strategie hindeuten, die darauf abzielt, möglichst unbemerkt zu bleiben, um nicht vom Immunsystem erkannt zu werden. Eine inflammatorische Strategie macht nur Sinn, wenn der Erreger in der Lage ist, eine große Menge und / oder sehr potente Lysine freizusetzen, und somit eine Art Schutzschild um die Bakterienzelle zu errichten. Beide Stämme, sowohl der ST9a, wie auch der ST398f waren

beim Menschen an einer Abszessbildung beteiligt. Dieses Krankheitsbild wird auch mit einer „frustrierten Immunantwort“ gleichgesetzt (Anwar *et al.*, 2009), was bedeuten soll, dass der Erreger in der Lage ist, dem Immunsystem so starken Widerstand zu leisten, so dass es diesem nicht gelingt, die Infektion zu beseitigen. Daher kommt es zu einem Abkapselungsprozess, um den Erreger vom Körperinneren fernzuhalten. Beide *S. aureus*-Typen scheinen trotz gegensätzlicher Strategie dazu fähig zu sein. Inwieweit Enterotoxine, die im Gegensatz zu den ST398-Stämmen bei allen drei CHIPS/SAK/SCIN-positiven Stämmen vorkommen, bei einer anti-inflammatorischen Strategie eine Rolle spielen, müssten weitere Studien zeigen.

In wieweit die bisher beschriebenen Eigenschaften der Stämme letztendlich auch einen Einfluss auf den zentralen Abwehrmechanismus der angeborenen Immunität gegen bakterielle Infektionen, dem Abtöten der Bakterien durch neutrophile Granulozyten, besitzen, wurde in einem so genannten Killing-Assay ermittelt. Die Ergebnisse zeigten die potenzielle Abnahme von vitalen Keimen nach Inkubation mit neutrophilen Granulozyten. Hierbei wurde zusätzlich gezielt der Einfluss der Exoproteine auf diesen Vorgang untersucht. Es zeigte sich, dass alle Stämme humanen Ursprungs ohne SaS-Einfluss eine niedrigere „Killing-Rate“ wie die tierischen Ursprungs aufwiesen. Auffällig war dabei wiederum der hochsignifikante Unterschied zwischen ST398f und ST398c. Da in diesem Fall noch kein Einfluss der Exproteine vorlag, musste es sich bei den verantwortlichen Komponenten um zellgebundene Eigenschaften handeln. Zu diesen zählt u.a. die schon beschriebene Adhäsionsfähigkeit, die durch die bereits diskutierte Beeinflussung der Koloniegröße einen Einfluss auf die Phagozytosefähigkeit und somit auch das Killing ausüben könnte. Dagegen spricht der trotz ähnlichem Adhäsionspotenzials relativ große Unterschied zwischen ST398f und ST398b. Eine weitere Möglichkeit liegt in der im Zuge der Diskussion der Lyseergebnisse vorgestellten spezifischen Aktivierung von bakteriellen Genen nach erfolgter Phagozytose. CA-MRSA sind in der Lage, nach erfolgter Phagozytose im Zellinneren die Alpha-Hämolysin-Expression und Freisetzung drastisch zu steigern und somit die Zelle von innen heraus zu lysieren (Voyich *et al.*, 2006). Für diese Variante würde sprechen, dass der ST398f, wie schon beschrieben, das Potenzial besitzt, große Mengen dieses Proteins zu produzieren und freizusetzen. Am wahrscheinlichsten ist allerdings, dass eine Kombination von beiden bzw. von mehreren noch nicht untersuchten Faktoren dazu führt, dass das Abtöten der Keime in diesem Maße reduziert wird. Ungeachtet dessen zeigten die Experimente, die Exoproteine einen viel größeren Einfluss auf das bakterielle Killing besitzen wie die diskutierten zellgebundenen Eigenschaften. Bei allen Stämmen war eine deutliche Reduzierung des Killing nach Vorinkubation mit dem jeweiligen Überstand zu

erkennen. Den größte Einfluss hatte, wie erwartet, der SaS des ST398f. Die Interaktion von ST398f-SaS mit den Granulozyten führte zu einem Killing von nahezu +/- Null, was einer Stagnation des bakteriellen Wachstums entspricht. Dies kann auf die hohe Alpha-Hämolysin-Konzentration zurückzuführen sein, da bereits nachgewiesen wurde, dass dieses Molekül nachhaltig das Killing von *S. aureus* inhibiert (Gemmell *et al.*, 1982).

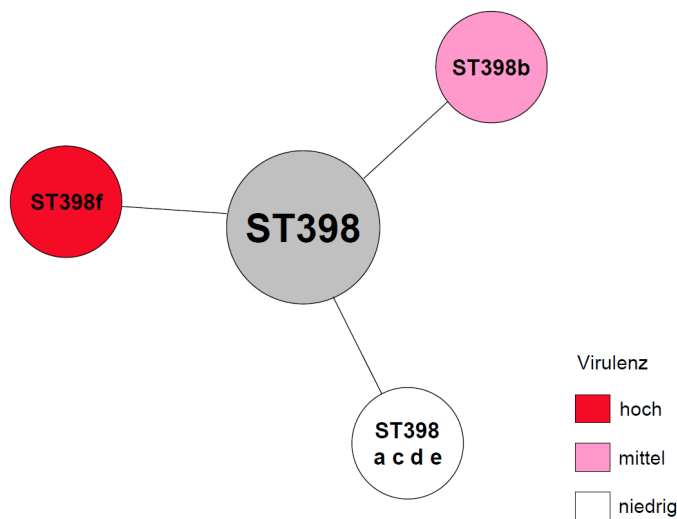
Während sich das ST398f-Ergebnis aller Voraussicht nach auf die lysogenen Eigenschaften des SaS zurückführen lässt, ist für die ATCC- und ST9a- induzierte Abnahme vermutlich das im Überstand nachgewiesene CHIPS-Protein verantwortlich. Dieses ist in der Lage die Phagozytose und somit auch das Killing von neutrophilen Granulozyten signifikant zu inhibieren (Rooijackers *et al.*, 2006). Setzt man die jeweilige Killing-Rate mit der Pathogenität des Erregers gleich, so zeigt sich, dass die humanen Stämme ST398b und vor allem ST398f im Vergleich mit den porzinen Stämmen gleichen spa-Typs eine stark erhöhte Virulenz aufweisen.

Wie schon erwähnt, kommt es durch die Lyse von Zellen zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion, was eine vermehrte Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen beinhaltet (Walev *et al.*, 1996; Bhakdi *et al.*, 1989). Dieser Vorgang wurde durch die Inkubation von Vollblut mit den jeweiligen SaS untersucht. Dadurch sollten die Auswirkungen der lysogenen Eigenschaften auf das Zytokinprofil und eventuelle stammspezifische Zytokinmuster detektiert werden. Das Ergebnis bestätigte einen direkten Zusammenhang von Zellysegeschehen und der Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-8 und IFN $\gamma$ . Die Proben der drei ST398-Überstände, bei denen auch die höchste Zellyseraten detektiert werden konnten, wiesen im Vergleich mit den anderen SaS eine höhere IL-1 $\beta$ -, IL-8- aber niedrigere IFN $\gamma$ - Konzentration auf. Inwieweit die IFN $\gamma$ -Freisetzung beispielsweise per negativer Rückkopplung durch die anderen Zytokine beeinflusst, oder, was wahrscheinlicher ist, die IFN $\gamma$ -produzierenden und für Alpha-Hämolysin sehr sensiblen T-Lymphozyten (Bhakdi *et al.*, 2004) durch die Lyse geschädigt werden, müsste in weiteren Studien noch ermittelt werden. Die vorliegenden Ergebnisse waren allerdings für die im Zuge dieser Arbeit zu treffenden Aussagen ausreichend. Bei der TNF $\alpha$ -Freisetzung war kein Zusammenhang mit den Lysegeschehen zu erkennen. Auffällig ist, dass durch den als Positivkontrolle verwendeten Gram-negativen Zellwandbestandteil LPS eine vielfach höhere Konzentration an IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  erzielt wurde. Dieses Ergebnis stimmt mit Beobachtungen in Gram-negativen Sepsisgeschehen überein, wo im Vergleich zu Gram-positiven Infektionen viel höhere Zytokinwerte gemessen werden (Sriskandan und Cohen, 1999b).

Der Prozess der Chemotaxis stellt, neben der Phagozytose und dem Killing, einen zentralen Vorgang in der Bekämpfung von bakteriellen Infektionen dar. Da die schon beschriebenen Stämme große Unterschiede im Phänotyp aufwiesen, stellte sich die Frage nach potenziellen stammspezifischen Unterschieden in der Chemotaxis-Induktion. Dafür wurden die Bakterien mit homologem Serum inkubiert und das aktivierte Serum als Chemoattraktor eingesetzt. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte nur sehr geringe Unterschiede zwischen den untersuchten Stämmen. Die drei Stämme, die das Protein CHIPS exprimieren, wiesen die niedrigste Anzahl an migrierten neutrophilen Granulozyten auf. Hier fanden sich beim Stamm ATCC 25923 die einzigen teilweisen (nur im Vergleich mit einigen Stämmen) signifikanten Unterschiede. Die Tatsache, dass die CHIPS-positiven Isolate auch die geringste Chemotaxis-Induktion aufwiesen, konnte erwartet werden, da, wie der Name schon sagt, dieses Protein in der Lage ist, gezielt den chemotaktischen Vorgang durch Rezeptorbindung zu inhibieren (siehe Einleitung). Das trotzdem nur ein geringer Unterschied im Vergleich zu CHIPS-negativen Isolaten zu beobachten ist, könnte auf die recht kurze Inkubationszeit von 1 h zurückzuführen sein, da im Gegensatz zur Plasmaaktivierung, die sofort abläuft und den Chemoattraktor C5a freisetzt, das CHIPS-Protein erst noch synthetisiert und freigesetzt werden muss. Für diese These spricht, dass der Stamm, der in der frühen Phase (6 h) der Kultivierung auch die größte Menge des Proteins produziert und sezerniert auch die einzigen signifikanten Ergebnisse liefert. Es deutet viel daraufhin, dass bei den beiden anderen Stämmen noch keine ausreichenden Mengen an CHIPS vorhanden sind, um die Chemotaxis effektiv zu inhibieren. Es zeigt sich also, dass die Chemotaxisinduktion in der frühen Phase unabhängig von der Produktion von Virulenzfaktoren und phänotypischen Unterschieden abläuft. Die Tatsache, dass in der Kontrolle mit hitzeinaktiviertem Serum keine Chemotaxis-Induktion stattfand, deutet ebenfalls daraufhin, dass potenzielle bakterielle Substanzen die als Chemoattraktor dienen können, wie fMLP, erst im späteren Verlauf der Infektion eine Rolle spielen. Die Plasmaaktivierung mit C5a-Generierung kann somit als der zentrale Bestandteil der frühen Chemotaxis-Induktion angesehen werden. Auffällig ist zudem, dass in allen Proben die Zellen im Durchschnitt nahezu die identische Distanz zurückgelegt hatten. Dies trifft auch auf die Serumkontrolle ohne Bakterien zu, die, wie erwartet, eine viel geringere Anzahl an migrierten Zellen aufwies. Das bedeutet, dass die zurückgelegte Wegstrecke nicht direkt von der C5a-Konzentration abhängig ist. Die Zellen, die chemotaktisch aktiv sind, legen auch eine ähnliche Distanz zurück. Der Unterschied liegt in der Anzahl an chemotaktisch aktivierten Zellen. Dieser Faktor ist wiederum eng mit der Molekülkonzentration verknüpft. Die einzigen, und auch wieder nur teilweise

signifikanten Unterschiede zeigten sich beim Stamm ATCC 25923. Es deutet sich damit an, dass das Protein CHIPS nicht nur die Anzahl der wandernden Zellen, sondern auch die zurückgelegte Distanz negativ beeinflusst.

Wie schon beschrieben, konnten erhebliche Unterschiede in der Exoproteinzusammensetzung der einzelnen Stämme nachgewiesen werden. Um sich einen Überblick über das Gesamtproteinmuster zu verschaffen, wurde eine Größenauftrennung per SDS-Gelelektrophorese und eine Gesamtproteinfärbung durchgeführt. Die Analyse der Exoproteinmuster bestätigte die bisherige Charakterisierung der ST398. Man konnte drei unterschiedliche ebenfalls spa-Typ überspannende Subgruppen erkennen, die den Ergebnissen der Adhäsions- und Lyseuntersuchungen entsprechen (Abbildung 42). Der ST398b bildete dabei bezüglich des Proteinmusters eine intermediäre Form, die Bestandteile der Gruppe 1 (ST398a, c, d, e) und Gruppe 3 (ST398f) enthielt. Dies könnte auf eine stufenweise Veränderung der ST398 von einem Stamm tierischen Ursprungs (Gruppe 1) zu einem humanen Erregertyp (Gruppe 3) hindeuten. Auffällig beim Exoproteinmuster des ST398b ist die erhöhte Proteinmenge im Bereich 25 kDa - 37 kDa, die ebenfalls bei ST398f beobachtet werden konnte. Legt man die Ergebnisse des Alpha-Hämolyisin-ELISA zugrunde, handelt es sich dabei aller Voraussicht nach um Alpha-Hämolyisin, das mit einer Größe von 34 kDa dem vorliegenden kDa-Bereich entspricht. Es kann aber auch eine Kombination mit anderen Hämolyisinen nicht ausgeschlossen werden, da diese alle in etwa demselben Größenbereich vorliegen. Zusätzlich zur Hämolyisinregion wiesen die Proteinmuster zwischen Gruppe 1 und Gruppe 3 in vielen anderen Bereichen große Unterschiede auf, die nicht mit den geringfügigen Abweichungen der Array-Ergebnisse erklärt werden können. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei ST398f um eine eigenständige Linie innerhalb der ST398-Stämme handelt. Da diese Methode der Gesamtproteinfärbung allerdings nur einen groben Überblick über die Exoproteine liefert, müssten zur Bestätigung dieser These genauere Analyseverfahren wie z. B. Maldi-Tof angewandt werden. Diese spezifische Untersuchung würde allerdings wieder ein ganz neues Themengebiet tangieren, und war daher nicht mehr Gegenstand dieser Arbeit.

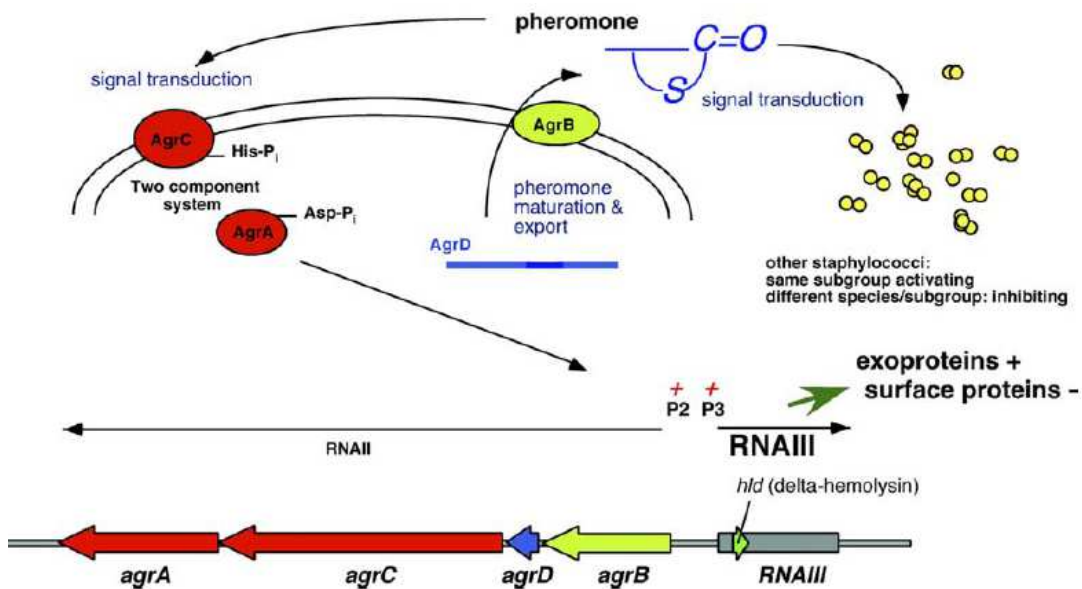


**Abbildung 42: Virulenz der untersuchten ST398.** Der Grad der Virulenz wurde anhand eines Vergleichs der Stämme untereinander festgelegt.

Für die ST9-Stämme kann im Gegensatz zu den ST398-Stämmen in vielen Fällen ein kausaler Zusammenhang zwischen den nachgewiesenen Genen und den beobachteten Phänomenen ermittelt werden. Da es sich dabei um den „Normalfall“ handelt, wird auf diesen Aspekt in den nachfolgenden Abschnitten nicht mehr genauer eingegangen. Da alle ST398-Stämme einen für die wichtigsten Virulenz- und Adhäsionsfaktoren identischen genetischen Hintergrund aufwiesen, ist es wahrscheinlich, dass die beobachteten Unterschiede, wie schon erwähnt, auf Variationen bzw. Mutationen in der Genregulation zurückzuführen sind.

Ein zentraler Regulationsmechanismus bei *S. aureus* ist das *agr*-System (Novick *et al.*, 1993). Dieses steuert unter anderem die Expression von Virulenzfaktoren. Der Mechanismus wird über die Zelldichte gesteuert, und bildet daher ein eigenständiges sich selbst regulierendes System (Abbildung 43). Ist eine bestimmte Zelldichte erreicht, so wird dieses über ein extrazelluläres Sensorpeptid an die Bakterienzelle weitergegeben, wo dann intrazellulär das *agr*-System aktiviert wird. Dadurch wird die Expression und Sekretion von Proteinen erhöht und gleichzeitig das *Sar*-System unterdrückt, das in der frühen Phase der Besiedlung die Expression von Adhäsionsproteinen steuert. (Papakyriacou *et al.*, 2000). Dies bedeutet, dass eine verstärkte *agr*-Aktivität bzw. erhöhte Bildung und Freisetzung von Virulenzfaktoren gleichzeitig mit einer Abnahme der Adhäsionsfähigkeit einhergehen muss. Dies widerspricht den bisher gemachten Beobachtungen bei ST398b und ST398f, wo eine Kombination aus erhöhter Adhäsionsfähigkeit und verstärkter Hämolysefreisetzung vorlag. Zu dem besaßen alle verwendeten ST398 das identische *agrI*-System. Dies könnte ein Hinweis für die Beteiligung

von *agr*-unabhängigen Mechanismen, wie dem kürzlich entdeckten *SarA* (Wolz *et al.*, 2000) und *cvfB* (Matsumoto *et al.*, 2007) sein. Ein *sigB* Mutantenstamm zeigte eine erhöhte *SarA*-Expression mit einhergehender Hyperproduktion von Alpha-Hämolyysin und gleichzeitig eine erhöhte Fibrinogenbindungskapazität, so wie sie bei den vorliegenden beiden ST398-Stämmen zu sehen war (Cheung *et al.*, 1999). Dies könnte eine Erklärung für die sehr stark variierenden Exoproteinkonzentrationen innerhalb der ST398-Stämme liefern, die sich, wie beschrieben, nachhaltig auf die Virulenz der Stämme auswirkten. Eine andere Möglichkeit, die vorgestellten Phänomene zu erklären, liegt in den zahlreichen anderen Regulatoren bzw. Genloci, die das *agr*-System beeinflussen können (Manna und Cheung, 2003; Manna und Cheung, 2006; Ingavale *et al.*, 2005).



**Abbildung 43: Agr-System von Staphylokokken.** Das System wird durch ein extrazelluläres post-translational modifiziertes Peptidpheromon aktiviert, das als Vorläuferform über das *agrD*-Gen exprimiert wird. *AgrB* ist für die Ausreifung und Sekretion des Peptids verantwortlich, während *agrA* und *agrC* die Signaltransduktion nach Peptidbindung induzieren. Daraufhin erfolgt die Aktivierung des *agr*-Systems, dass über ein regulatorisches RNA-Molekül (RNA III) seine Zielgene ansteuert.  
Quelle: Otto, 2004

Beim *agr*-System handelt es sich, wie beschrieben, um einen zentralen Mechanismus der hunderte von Genen ansteuern kann, und somit einen sehr großen Einfluss auf den Gesamtmetabolismus von *S. aureus* ausübt. Die einzelnen Untereinheiten können aber wiederum durch andere Regulationssysteme beeinflusst werden. Weitere molekularbiologische Analysen mit dem Fokus „Genregulation“ sind notwendig, um die genetischen Grundlagen des be-



obachteten Phänotyps aufzuklären, der letztendlich zu einer massiven Virulenzzunahme des Erregers führt. Die etwas „abgeschwächte“ Form des ST398b deutet dabei eher auf eine schrittweise Veränderung des Genoms hin, was eine Einzelmutation ausschließen würde.

Zusammenfassend kann man postulieren, dass die durchgeführte Charakterisierung der *S. aureus*-Isolate tierischen und humanen Ursprungs deutliche Hinweise auf einen Adaptionsprozess vom Tier zum Menschen liefern. Neben dem Erwerb von zusätzlichen Genen für Virulenzfaktoren (ST9a), der wie bekannt eindeutig zu einer Zunahme der Pathogenität führt, scheinen Veränderungen in den Genregulationsmechanismen bei diesem Prozess ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen (ST398). Dies ist sehr bemerkenswert, da bisher vor allem der Erwerb von hochpotenten Virulenzfaktoren wie PVL als Hauptursache für eine gesteigerte Pathogenität ausgemacht wurde. Durch ein genetisches Routinescreeningverfahren für *S. aureus* Virulenzfaktoren und Antibiotikaresistenzen, zu denen auch der durchgeführte DNA-Micro-Array zählt, wären bzw. sind die beobachteten Unterschiede innerhalb der ST398-Stämme nicht detektiert worden. Es zeigt sich also, dass eine Kombination aus genetischen Analysen, die in der Bakteriologie im Vordergrund stehen, und Untersuchungen auf Protein- sowie Wirt/Erreger-Ebene für die gezielte Charakterisierung von *S. aureus* von Vorteil sind.

Die im Zuge dieser Promotionsarbeit durchgeführten Untersuchungen liefern neue Hinweise darauf, dass der Sequenz Typ 398 durchaus in der Lage ist, humanpathogene Linien hervorzubringen, die sich zu neuen Community-acquired MRSA-Stämmen entwickeln könnten. Ob diese wiederum noch in der Lage sind, als Besiedler von Tieren, insbesondere Schweinen, zu fungieren, müssen weitere Studien zeigen. Sollte das der Fall sein, könnte dies zu massiven Problemen innerhalb von Gesundheitssystemen führen, die wie die Niederlande eine bisher recht erfolgreiche aber sehr aufwendige und teure „screen/isolate/destroy“-Politik zur Bekämpfung von MRSA betreiben. Käme es zur Ausbreitung solcher human pathogener Stämme in den Nutztierbetrieben, würde ein riesiges Erregerreservoir entstehen, in dem die Pathogene nicht effektiv bekämpft werden könnten. Die Folge wäre ein stetiger Eintrag von zoonotischen Erregern in die Bevölkerung bzw. auch in Krankenhäuser.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass es zukünftig für ein erfolgreiches Monitoring von ST398 nötig sein wird, Analysen sowohl auf genetischer wie auch auf phänotypischer Ebene durchzuführen. Dies trägt letztendlich dazu bei, neue Strategien für die Bekämpfung von *S. aureus*, einem der anpassungsfähigsten Erreger der Neuzeit, zu entwickeln.

## 2. Aktivierung von neutrophilen Granulozyten nach der Inkubation mit bakteriellem Überstand

Neben der schon diskutierten Charakterisierung von *S. aureus*-Stämmen menschlichen und tierischen Ursprungs lag ein Schwerpunkt der Arbeit in der Untersuchung von Interaktionen zwischen neutrophilen Granulozyten im Vollblut und Gram-positiven Substanzen. Auf dieser Basis sollte ein Modell entwickelt werden, das neue Erkenntnisse über die Dysfunktion von neutrophilen Granulozyten während einer Gram-positiven Sepsis liefert. Der Vorgang, der zu den veränderten Eigenschaften der Immunzellen führt, ist eng mit Zellaktivierungsprozessen verknüpft.

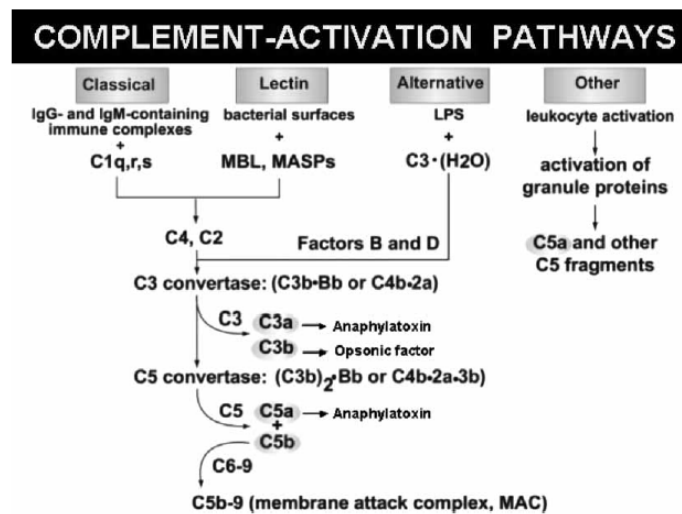
Der Transmigrationsprozess der neutrophilen Granulozyten aus dem Blutgefäß ins Gewebe erfolgt über komplexe Molekülinteraktionen, die durch dynamische Veränderungen innerhalb der Oberflächenrezeptoren gesteuert werden. Der sich dadurch verändernde Phänotyp des nun teilweise aktivierten Granulozyten ist gekennzeichnet durch eine gesteigerte Expression von  $\beta_2$ -Integrinen, aber auch anderer Oberflächenmoleküle wie CD66b (CD67, CEACAM8, CGM6, NCA-95). Aufgrund dieses Zusammenhangs wird CD66b auch als „Aktivierungsmarker“ bezeichnet (Torsteinsdottir *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2004). Die Expression des Moleküls auf der Zelloberfläche wird durch die Exocytose von sekundären bzw. spezifischen Granula induziert (Ducker und Skubitz, 1992). Daher fungiert CD66b auch als Indikatormolekül für die Exozytose dieses Granulatyps. Trotz dieser Definitionen sind die Funktionen des Moleküls weitgehend unbekannt. Es handelt sich bei diesem Molekül um ein einkettiges GPI-verankertes Glykoprotein der Ag (CEA) Familie (Thompson *et al.*, 1991), das ausschließlich bei Granulozyten im Menschen und zwei Primatenarten nachgewiesen werden konnte (Zhou *et al.*, 2001). Bisher wurde sowohl bei der Maus, also auch bei der Ratte kein entsprechendes Homolog zu CD66b identifiziert (Beauchemin *et al.*, 1999). Die Literatur, die sich bisher mit den Funktionen dieses Moleküls auseinandersetzt, beschreibt unter anderem eine heterotypische Adhäsion mit anderen Mitgliedern der CEA-Familie, den Molekülen CD66c und CD66e (Oikawa *et al.*, 1991). Es wird daher vermutet, dass CD66b bei Zelladhäsionsprozessen eine Rolle spielt. Zusätzlich wird gezeigt, dass eine Kreuzvernetzung der Moleküle zum oxidativen Burst (Lund-Johansen *et al.*, 1993) und Freisetzung von IL-8 (Schroder *et al.*, 2006) bei neutrophilen Granulozyten führt. Dieses deutet auch auf eine Beteiligung an Zellaktivierungs-

prozessen hin. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass CD66b die funktionelle Aktivität von Mac1 (CD11b/CD18) regulieren kann (Skubitz *et al.*, 1996). Yoon *et al.* (2007) zeigen, dass das Erscheinen des Moleküls auf der Zelloberfläche bei Eosinophilen eng mit der CD11b-Expression verknüpft ist. Daher würde auch für neutrophile Granulozyten eine parallele Expression von CD66b/CD11b erwartet. Diese war auch in den vorgestellten Ergebnissen nach fMLP-, LPS- oder C5a-Stimulation zu beobachten. Speziell nach der fMLP-Aktivierung konnte man parallel verlaufende Expressionsamplituden beobachten, die mit einem Rezeptorverhältnis von nahezu 1:1 nach 45 min endeten. Nach der Stimulation mit den bakteriellen Überständen entwickelte sich ein Rezeptormuster, das sehr stark vom „normalen“ Aktivierungsphänotyp abweicht. Im Gegensatz zur fMLP-Stimulation konnte man hier eine schnellere Aktivierung, und bezogen auf die CD11b-Expression, einen längeren Anstieg der CD66b-Expression beobachten, der letztendlich zu einer Überexpression des Moleküls führte. Die Maxima der CD11b-Level waren dabei vergleichbar, die Expressionskinetik des Moleküls war allerdings deutlich verschoben. Der zentrale Mechanismus, der diesen Effekt herbeiführt, scheint auf dem abrupten und steilen Anstieg der CD11b-Expression zu basieren, was auf einen massiven Aktivierungsimpuls hindeutet. Dieser setzte einen CD66b-Expressionsmechanismus in Gang, der offenbar abgekoppelt von der CD11b-Expression verläuft. Dies zeigte sich vor allem dadurch, dass die SaS-induzierte CD11b-Expressionsamplitude schon nach 10 min stagnierte, während die CD66b-Kurve noch bis zum Zeitpunkt „45 min“ weiter anstieg. Ein zusätzlicher Hinweis für einen autonomen Mechanismus liegt in der nachgewiesenen Nichtbeteiligung der  $\beta_2$ -Integrine CD11a und CD11c, sowie des Co-Rezeptors CD18.

Sekretorische Vesikel sind das Hauptreservoir für CD11b (Sengelov *et al.*, 1993b). Diese werden während des Transmigrationsprozesses in die Zellmembran integriert und somit die Moleküle auf der Zelloberfläche exprimiert. CD66b hingegen ist, wie oben erwähnt, in sekundären Granula lokalisiert (Ducker und Skubitz, 1992). Neben CD66b enthält dieser Granulatyp Substanzen wie Lactoferrin, Collagenase und Lysozym, die nach der Einwanderung ins Gewebe und bei der Phagozytose eine wichtige Rolle spielen (Borregard und Cowland, 1997b). Der starke Aktivierungsimpuls nach der SaS-Stimulation scheint die Exozytose der sekundären Granula zu induzieren, was zu einer Überexpression von CD66b und gleichzeitig verstärkter Freisetzung von Lactoferrin führt (siehe unten). Der daraus resultierende spezielle intraendotheliale Aktivierungsphänotyp, der zusätzlich durch eine verstärkte Aggregatbildung

gekennzeichnet ist (siehe unten) könnte zu dem in der Einleitung beschriebenen Sepsis-induzierten Verlust der Transmigrationsfähigkeit führen.

Dass nach dem Entfernen des Plasmas, sowohl beim Vollblut als auch nach Isolierung der Zellen, kein spezieller SaS-induzierter Aktivierungstyp mehr vorlag, spricht für eine zentrale Rolle von Plasmafaktoren. Gram-positive Substanzen, speziell in Kombination (de Kimpe *et al.*, 1995), sind in der Lage eine bakterielle Sepsis mit septischem Schock und multiplen Organversagen zu induzieren. Dies war der Hauptgrund für die Entscheidung anstelle von Einzelsubstanzen die *S. aureus*-Überstände als eine Art von „Gram-positivem Mix“ in den Experimenten einzusetzen. Bei Peptidoglycan und Lipoteichonsäuren, aber auch bei Gram-positiven Endo- und Enterotoxinen handelt es sich um bereits identifizierte potenzielle Induktoren der beschriebenen pathophysiologischen Zustände (Schwandner *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003). Ein häufig vorgefundenes Charakteristikum während einer Sepsis ist ein erhöhter Plasma-Spiegel des schon oben erwähnten Granulaproteins Lactoferrin (Müller-Kobold *et al.*, 2000). Dabei handelt es sich um ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 80 kDa. Seine Besonderheit liegt in der Fähigkeit große Mengen an freiem Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) zu binden. Da für den bakteriellen Stoffwechsel Eisen von großer Bedeutung ist, führt die vermehrte Bindung zu einem antimikrobiellen bzw. bakteriostatischen Effekt (Arnold *et al.* 1980). Dieses Protein wird, wie beschrieben, durch Exozytose der sekundären Granula nach Zellaktivierung zusammen mit dem Molekül CD66b von neutrophilen Granulozyten freigesetzt bzw. exprimiert (Borregard und Cowland, 1997). Die Ergebnisse zeigen eine stark erhöhte Lactoferrin-Freisetzung bei gleichzeitiger CD66b-Überexpression nach Stimulation mit SaS. Dies macht deutlich, dass das in diesem Projekt entwickelte *in vitro* Sepsis-Modell ähnliche Veränderungen bestimmter Blutparameter aufweist, wie sie auch bei einer Sepsis *in vivo* beobachtet werden. Neutrophile Granulozyten sind in der Lage viele bakterielle Substanzen direkt über Molekül/Rezeptor-Interaktionen wie beispielsweise über „Pattern-recognition“-Rezeptoren wahrzunehmen. Einer dieser Rezeptoren ist der TLR-2, der einen spezifischen Rezeptor für Peptidoglycan und Lipoteichonsäuren repräsentiert (Schwandner *et al.*, 1999). Viele der genannten Substanzen sind zu dem auch als potente Aktivatoren des klassischen und alternativen Komplement-Wegs bekannt (Espersen, 1985; Kawasaki *et al.*, 1987; Verbrugh *et al.*, 1979; Wilkinson *et al.*, 1978). Die Tatsache, dass die Entfernung des Plasmas vollständig die CD66b-Überexpression verhinderte, in Kombination mit dem beobachteten steilen Anstieg der CD11b-Expression, legen daher die Vermutung nahe, dass es sich bei dem vorliegenden Effekt um eine Aktivierung der Komplement-Kaskade handelt (Abbildung 44).



**Abbildung 44: Komplement-Aktivierung.** Die Komplement-Aktivierung kann über drei verschiedene Wege stattfinden: den klassischen, den alternativen und den Lektin Weg. Zusätzlich gibt es die Möglichkeit, dass leukozytäre Proteasen freigesetzt werden und Komplementkomponenten wie C5 spalten und somit ebenfalls Anaphylatoxine generieren.

Quelle: Sarma *et al.*, 2006

Diese These wird durch die Ergebnisse der Experimente mit dem C5aR1-Antagonisten W-54011 bestätigt. Das durch den Einsatz des Antagonisten die CD66b-Überexpression nur teilweise aufgehoben wurde, deutet auf die Beteiligung von anderen Plasma- oder Komplementfaktoren hin und zeigt, dass der vorliegende Aktivierungsphänotyp das Ergebnis einer Kombination von mehreren Stimuli sein muss.

Die großen Unterschiede innerhalb der Einzelerperimente, die sich in einer relativ hohen Standardabweichung ausdrücken, werden vermutlich durch die komplexe Interaktion der verschiedenen Komponenten verursacht. Hier kann beispielsweise die individuelle Plasmazusammensetzung eine Rolle spielen. Ein anderer Punkt betrifft den notwendigen Einsatz eines Anti-Koagulant. Um die Experimente mit Vollblut durchführen zu können, muss eine Inhibition der Koagulationskaskade erfolgen. Dafür wurde in diesem Fall der Wirkstoff Heparin verwendet. Koagulationsfaktoren sind an der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und vieler anderer Immunkomponenten beteiligt (Lo *et al.*, 1988; Strukova, 2006). Daher liegt die Vermutung nahe, dass man durch die *in vitro* Bedingungen bzw. die Inhibition dieser Faktoren einen anti-inflammatorischen Effekt herbeiführt, der die Aktivierung der Immunzellen und somit auch deren Aktivierungsphänotyp abschwächt. Die Reaktion *in vivo* mit intakten Koagulanzen müsste dementsprechend stärker ausfallen. Auf die Möglichkeit einer eventuel-

len Verlagerung des experimentellen Set-Up's von in vitro in in vivo-Bedingungen wird im weiteren Verlauf der Diskussion noch genauer eingegangen.

Das Auftreten von zahlreichen Zellaggregaten nach der Stimulation mit den bakteriellen Überständen, bei denen die Anzahl der Zelldubletten überwogen, stellte eine zweite bemerkenswerte Veränderung im „Verhalten“ der neutrophilen Granulozyten dar. Die entstehenden Zellcluster zeigten ein Polarisierungsmuster, dass durch die Konzentrierung der Moleküle CD66b, CD11b und CD18 an den Zell-Zell-Kontaktstellen gekennzeichnet ist. Diese Gebiete mit der höchsten Molekülkonzentration waren teilweise sogar im Hellfeld als dunkle Punkte in den jeweiligen Zellregionen erkennbar, was zusätzlich die Annahme verstärkt, dass es sich hier um eine molekülvermittelte und nicht um eine unspezifische Zellinteraktion handelt.

Überraschenderweise konnte man nach dem Erreichen der maximalen Dublettenanzahl zum Zeitpunkt „15 min“ eine Abnahme der Aggregate beobachten. Simon *et al.* (1998) beschreiben im Detail den Prozess der homotypischen Aggregation bei neutrophilen Granulozyten. Nach der Stimulation mit fMLP beobachten sie bei isolierten Zellen eine L-Selektin und  $\beta_2$ -Integrin abhängige homotypische Aggregation und Disaggregation ähnlich dem hier vorliegenden Phänomen. Sie vermuten, dass die Zelltrennung aufgrund einer Abnahme der Adhäsionsfähigkeit der Integrine erfolgt. Das Maximum an Aggregaten wurde bei den Experimenten in einem konstanten Flüssigkeitsstrom mit einer definierten Stärke von Scherkräften bzw. einer bestimmten Strömungsgeschwindigkeit erzielt. Da aufgrund des enormen Aufwands für die Experimente dieser Arbeit keine Untersuchungen unter „flow“-Bedingungen durchgeführt wurden, müsste man, ausgehend von diesem Modell, unter Strömungsbedingungen und gleichzeitiger SaS-Stimulation noch eine deutliche Erhöhung der Aggregatbildung erwarten. Die beschriebenen Phänomene zeigen, dass es sich bei den polarisierten Einzelzellen, die im Abschnitt „Ergebnisse“ auch fotografisch dokumentiert wurden, aller Voraussicht nach nicht um aktivierte Einzelzellen sondern um getrennte Zellaggregate handelt. Die Ergebnisse der Plasmasubstitution belegen, dass auch die beschriebene Aggregatbildung wie schon die CD66b-Expression von der Anwesenheit von Plasmafaktoren abhängig ist.

Rezeptorinteraktionen werden meistens von intrazellulären Signalkaskaden begleitet. Das Molekül CD66b findet man innerhalb der Zellmembran ausschließlich in so genannten „lipid rafts“. Aufgrund seiner Struktur ohne Zytoplasmadomänen kann eine direkte Rezeptor-Zytoplasma Interaktion also ausgeschlossen werden. Eine Kreuzvernetzung der Moleküle induziert eine Aktivierung der *Src* Kinase *Hck*, die ebenfalls in „lipid rafts“ lokalisiert ist (Robbins *et al.*, 1995). Dies bietet die Möglichkeit einer Lipid-Lipid Interaktion basierend auf

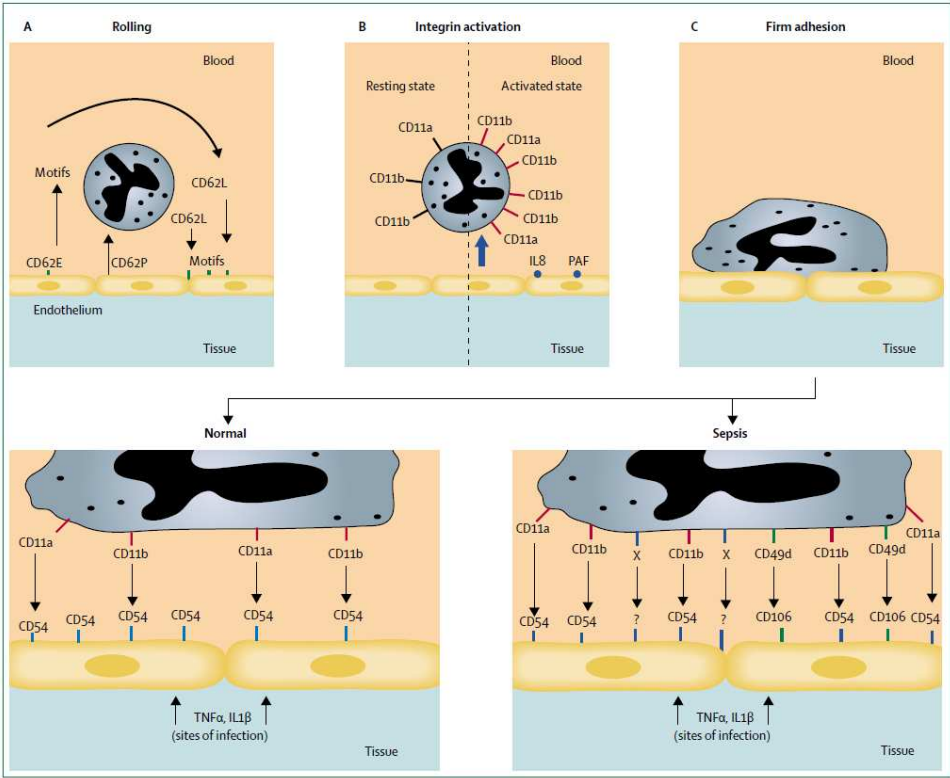
dem GPI von CD66b und dem Palmitoylat der *Hck*. Eine andere Variante, wie eine CD66b induzierte Signaltransduktion ablaufen könnte, liegt in einer direkten Interaktion des CD66b-Moleküls mit Transmembranproteinen, die über die benötigten Zytoplasmadomänen verfügen. Zu diesen zählen die Integrine, die bereits als potenzielle Mediatoren einer GPI-Protein-induzierten Zellaktivierung beschrieben wurden (Stockinger, 1997). Die Beobachtung der massiven Rezeptoransammlung an den Zell-Zell-Kontaktstellen, die nachgewiesener Weise die Moleküle CD66b, CD11b und CD18 enthält, und an der vermutlich noch viele weitere Rezeptoren beteiligt sind, lässt allerdings die Möglichkeit eines ausschließlich auf CD66b basierenden Signalwegs als unwahrscheinlich erscheinen.

Die schon erwähnte Rolle von CD66b in Adhäsionsprozessen, die Abhängigkeit der CD66b-Überexpression, wie auch der Aggregatbildung von Plasmafaktoren, aber in erster Linie die nachgewiesene parallel verlaufende CD66b-Expression und Dublettenbildung bei einer gleichzeitig im Vergleich zu den Einzelzellen erhöhten CD66b-Menge auf den Zeldubletten, können als Indikatoren für einen direkten Zusammenhang zwischen CD66b-Überexpression und Aggregatbildung angesehen werden. Zusätzlich deutet die nur leicht erhöhte Dublettenanzahl nach fMLP-Stimulation bei nahezu identischem CD11b/CD18-Level auf die Beteiligung eines zusätzlichen Integrin-unabhängigen Faktors wie CD66b hin. Die Adhäsionseffizienz von Zellen basiert u. a. auf der Anzahl und Affinität der exprimierten Adhäsionsmoleküle (Simon *et al.*, 1998). Es scheint, dass CD66b, vielleicht in Kombination mit anderen Molekülen, in der Lage ist, die Adhäsionseffizienz der neutrophilen Granulozyten sehr stark zu erhöhen, was letztendlich zu einer Clusterbildung der Zellen führt. Die Zelladhäsion ist ein komplexer Prozess, an dem viele Moleküle beteiligt sind. CD66b könnte dabei eine zentrale Rolle zwischen dem auf L-Selektin basierendem „Rolling“ und der durch die  $\beta_2$ -Integrine induzierten „festen“ Adhäsion einnehmen.

Die Kreuzvernetzung der Moleküle scheint der zentrale Mechanismus zu sein, um die CD66b-Funktionen zu vermitteln. Wie schon erwähnt, führt dieser Ligationsprozess zum oxidativen Burst und der Ausschüttung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8 bei neutrophilen Granulozyten. Die nach der Überexpression vorhandene große Moleküldichte auf der Zelloberfläche könnte eine Kreuzvernetzung begünstigen. Da CD66b wohl keine homotypischen Verbindungen eingeht, müsste diese Molekülverknüpfung wahrscheinlich unter Teilnahme von anderen Mitgliedern der CD66-Familie, wie CD66d und CD66e, erfolgen. Die nach dem Zusammenreffen zweier CD66b<sup>++</sup>-Zellen stattfindende Kreuzvernetzung könnte zu einer massiven Zellaktivierung mit Polarisierung führen, die wiederum die beobachtete rezeptorvermittelte

Clusterbildung erklären würde. Bei diesem Modell würde CD66b als Initiator einer Zellaktivierung mit Zellpolarisierung fungieren, die in einer Aggregatbildung endet. Die feste Adhäsion zwischen den Zellen würde dann auf anderen Molekülen wie den Integrinen basieren. Deren Funktion könnte dann wiederum durch Mitglieder der CD66b-Familie reguliert werden, was zu einem sich selbst verstärkenden Effekt führen könnte. Diese These wird durch die „Kreuzvernetzungs-Experimente“ unterstützt. Durch die Ergebnisse kann erstmals dokumentiert werden, dass eine Kreuzvernetzung der CD66b-Moleküle neben einer Induktion des oxidativen Bursts (Lund-Johansen *et al.*, 1993) ebenfalls zur Aggregatbildung von neutrophilen Granulozyten innerhalb des Vollbluts führt. Die Anzahl der gebildeten Zellcluster ist dabei abhängig vom Aktivierungszustand und scheint unabhängig von der CD11b-Expression zu verlaufen. Dies führt zur Annahme, dass die Anzahl der exprimierten CD66b-Moleküle entscheidend für das Ausmaß der Aggregatbildung ist. Mehr CD66b-Moleküle sind in der Lage eine stärkere Kreuzvernetzung zu induzieren, was sich in einer stark erhöhten Anzahl an Zellclustern niederschlägt. Eine hohe Moleküldichte auf der Zelloberfläche scheint in der Lage zu sein, eine schnell verlaufende und sehr effektive Zelladhäsion herbeizuführen, die zu einer Dysfunktion der neutrophilen Granulozyten beitragen könnte. Eine andere Möglichkeit einen solchen pathophysiologischen Zustand auszulösen, besteht in der Interaktion mit dem Endothel. Brown *et al.* (2006) beschreiben, dass anti-CD11b-Antikörper bei Neutrophilen von Sepsispatienten *in vitro* nicht, wie im Normalfall, eine Interaktion mit einem Endothelmonolayer verhindern können. CD66b könnte also ein Kandidat sein, der zu dieser anormalen Adhäsion beiträgt (Abbildung 45).

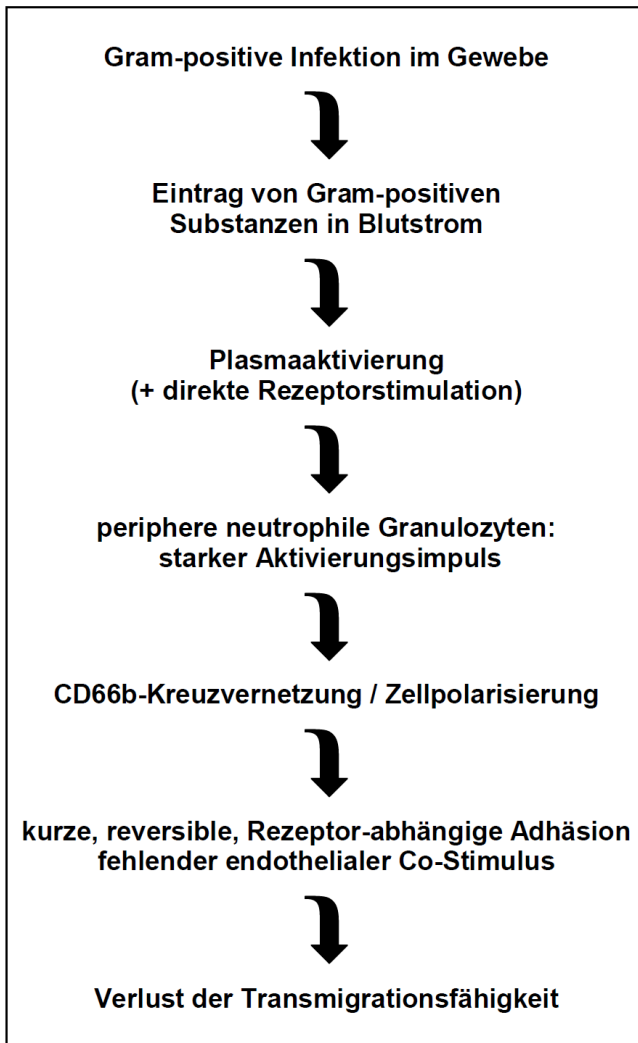




**Abbildung 45: Neutrophil-Endothel-Interaktion während einer Entzündungsreaktion.** A, Die Wechselwirkung zwischen Selektinen auf Neutrophilen (L-Selektin und Endothelzellen (E-Selektin und P-Selektin) induziert das „Rolling“ der Neutrophilen. B, Durch räumliche Nähe zum Endothel bzw. zum Entzündungsort werden die Neutrophilen aufgrund von pro-inflammatorischen Botenstoffen wie Interleukin-8 aktiviert und exprimieren Rezeptoren wie die  $\beta_2$ -Integrine CD11a und CD11b, die eine feste Adhäsion induzieren. C, Während einer Sepsis findet diese Adhäsion ebenfalls, allerdings in sehr viel höherer Intensität statt. Neben der zusätzlichen Beteiligung von CD49d–CD106 wird die Beteiligung von weiteren Molekülen vermutet.

Quelle: Brown *et al.*, 2006b

Die Tatsache, dass es bisher keine verfügbaren Substanzen gibt, die die Funktionen von CD66b neutralisieren, stellt das Hauptproblem für die funktionelle Untersuchung dieses Proteins dar. Durch die Arbeit kann daher eine Beteiligung von CD66b an der Neutrophilaggregation zwar als sehr wahrscheinlich angesehen werden, der finale Beweis aber ohne einen nicht aktivierenden CD66b-Inhibitor/Antagonisten letztendlich nicht erbracht werden.



**Abbildung 46:**  
**Modell eines CD66b-induzierten**  
**Transmigrationsdefizits**

Eine Kombination von Literaturrecherche mit den vorliegenden Ergebnissen konnte dennoch ausreichende Informationen liefern, um ein theoretisches Modell eines CD66b-induzierten Neutrophil Transmigrations-Defizits zu erstellen, wie es während einer Gram-positiven Sepsis auftreten könnte (Abbildung 46): Eine Penetration der Gewebe/Blut-Barriere führt zu einem massiven Eintrag von Gram-positiven Substanzen in den Blutstrom. Dadurch wird das Plasma aktiviert und, wie in den vorliegenden Experimenten eine spezielle Art der Entzündungsreaktion generiert. Dieser massive Aktivierungsimpuls aktiviert die peripheren neutrophilen Granulozyten, die dann den beschriebenen pathologischen Aktivierungsphänotyp ausbilden. Daraufhin kommt es zu einem kurzen und reversiblen homotypischen Adhäsionsprozess, der ohne die im Normalfall

vorliegenden Co-Stimuli des Endothels zu einer die Transmigration betreffenden Dysfunktion der Zellen führt. Dieser Prozess könnte parallel auch die Adhäsion an das Endothelium betreffen, wo die CD66b-Überexpression ebenfalls eine erfolgreiche Einwanderung verhindert. Um die Frage zu klären, in wieweit durch die CD66b-Überexpression die Einwanderung ins Gewebe verhindert wird, reicht ein einfacher Endothel-Neutrophil-Interaktions-Assay nicht aus, da nicht die Adhäsion an das Endothel, sondern die Durchwanderung blockiert ist. Man müsste daher ein komplettes in vitro Transmigrationsmodell etablieren. Dies wäre allerdings bei weitem über den Umfang dieser Arbeit hinausgegangen. Im Moment kann man also nur spekulieren, ob der beschriebene Aktivierungsphänotyp in direktem Zusammenhang zur in Gram-positiver Sepsis beobachteten neutrophilen Dysfunktion steht.

Weitere Studien sind zu dem notwendig, um die Beteiligung von weiteren spezifischen Plasmafaktoren und anderen Oberflächenmolekülen nachzuweisen. In vitro-Sepsis Modelle sind sehr theoretisch, da bei diesem komplexen Syndrom sehr viele verschiedene Komponenten eine Rolle spielen. Für die Untersuchung von CD66b gibt es in diesem Zusammenhang aber kaum eine Alternative, da dieses Molekül, wie beschrieben, bei Versuchstieren wie Mäusen und Ratten nicht vorkommt.

Zusammenfassend kann man also postulieren, dass durch die vorliegende Arbeit neue Erkenntnisse im Hinblick auf die Bedeutung von CD66b bei Gram-positiver Sepsis gewonnen werden konnten. Die Ergebnisse können somit zu einem besseren Verständnis dieses komplexen pathophysiologischen Prozesses beitragen.

## VI Zusammenfassung

Im Zuge dieser Arbeit wurden verschiedene *Staphylococcus aureus* - Stämme gleichen Sequenztyps tierischen oder humanen Ursprungs hinsichtlich ihrer humanpathologischen Eigenschaften charakterisiert. Dabei sollten neue Erkenntnisse hinsichtlich der Adaptionsfähigkeit von klassischen Tierstämmen wie den ST9 und ST398 an den Menschen, sowie allgemeine Mechanismen in der Wirt-Erreger-Beziehung untersucht werden. Durch eine intensive Analyse sowohl auf genetischer, immunologischer, wie auch auf Proteinebene, konnten dabei signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen festgestellt werden. Während bei den Sequenztypen 9 in einem humanen Isolat mit dem IEC (Immune Evasion Cluster) zusätzliche Virulenzgene detektiert werden konnten, wurden innerhalb der Sequenztypen 398 Unterschiede in der Virulenz festgestellt, die nicht auf der Aneignung von zusätzlichen Virulenzfaktoren, sondern aller Voraussicht nach auf Veränderungen in der Genregulation basieren. Zwei Stämme humanen Ursprungs zeigten eine starke, und für diesen Erregertyp erstmals beschriebene Erhöhung der Adhäsionseigenschaften bei einer gleichzeitig drastischen Zunahme des Lysepotenzials, was darauf hindeutet, dass die Kombination der beiden Faktoren bei der Steigerung der Humanpathogenität eine zentrale Rolle spielt. Bei dieser Beobachtung handelte es sich um ein ungewöhnliches Phänomen, da die zentrale *agr*-abhängige Genregulation von *Staphylococcus aureus* im Zuge eines Entweder-Oder-Mechanismus die Steigerung von nur einer der beiden Komponenten vorsieht. Daher muss innerhalb der Stämme eine Veränderung des *agr*-Gens oder eine Verschiebung hin zu anderen Regulationsmechanismen stattgefunden haben.

Der zweite Schwerpunkt der Arbeit lag in der Untersuchung der Interaktion von Substanzen Gram-positiven Ursprungs mit Vollblut. Im Zuge dessen sollte ein *in vitro* Modell zur Gram-positiven Sepsis entwickelt werden, in dem die schon in der Literatur beschriebene Sepsis-induzierte Dysfunktion der neutrophilen Granulozyten genauer analysiert werden sollte. Durch die Inkubation von bakteriellem Überstand mit Vollblut konnte in den Experimenten erstmals ein Aktivierungsphänotyp induziert werden, der durch eine Überexpression des Oberflächenmarkers CD66b gekennzeichnet war. Diese spezifische Zellaktivierung war plasmaabhängig und fand unter Beteiligung des Komplementfaktors C5a statt. Zusätzlich konnte eine mit der CD66b-Expression einhergehende starke Zunahme von homotypischen granulocytären Zellaggregaten dokumentiert werden, deren Bildung durch eine Kreuzvernetzung der

CD66b-Moleküle verstärkt werden konnte. Dies spricht für eine Beteiligung des Moleküls an pathologischen Zelladhäsionsprozessen. Das entstandene Modell bietet neue Ansätze, um die beschriebene Dysfunktion der neutrophilen Granulozyten zu erklären, und liefert somit auch neue Informationen, die letztendlich in neue Behandlungsansätze der Gram-positiven Sepsis einfließen könnten.

In dieser Arbeit konnten also auf zwei Themenfeldern neue, erstmals beschriebene Phänomene dokumentiert und analysiert werden, die einen wichtigen Beitrag zum Verständnis von *Staphylococcus aureus*-induzierten Infektionsabläufen liefern.

# Literaturverzeichnis

- Akira, S.** and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev Immunol* 4, 499-511.
- Angus, D.C.**, Linde-Zwirble, W. T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., and Pinsky, M. R. (2001). Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 29, 1303-1310.
- Anwar, S.**, Prince, L. R., Foster, S. J., Whyte, M. K., and Sabroe, I. (2009). The rise and rise of *Staphylococcus aureus*: laughing in the face of granulocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 157, 216-224.
- Archer, G.L.** and Niemeyer, D. M. (1994). Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends Microbiol.* 2, 343-347.
- Armand-Lefevre, L.**, Ruimy, R., and Andremont, A. (2005). Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 711-714.
- Arnold R. R.**, Brewer M., Gauthier J. J. (1980): Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infection and Immunity*, 28, 893–898.
- Babior, B.M.** (2004). NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 16, 42-47.
- Baldrige, C.W.**, Gerhard, R.W. (1933). The extra respiration of phagocytosis. *Am J Physiol*, 103/1933, S.235-6
- Bantel, H.**, Sinha, B., Domschke, W., Peters, G., Schulze-Osthoff, K., and Janicke, R.U. (2001). alpha-Toxin is a mediator of *Staphylococcus aureus*-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling. *J Cell Biol.* 155, 637-648.
- Beauchemin, N.**, Draber, P., Dveksler, G., Gold, P., Gray-Owen, S., Grunert, F., Hammarstrom, S., Holmes, K. V., Karlsson, A., Kuroki, M., Lin, S. H., Lucka, L., Najjar, S. M., Neumaier, M., Obrink, B., Shively, J. E., Skubitz, K. M., Stanners, C. P., Thomas, P., Thompson, J. A., Virji, M., von, K.S., Wagener, C., Watt, S., and Zimmermann, W. (1999). Rede-

fined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp. Cell Res* 252, 243-249.

**Bens, C.C.**, Voss, A., and Klaassen, C.H. (2006). Presence of a novel DNA methylation enzyme in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with pig farming leads to uninterpretable results in standard pulsed-field gel electrophoresis analysis. *J Clin Microbiol.* 44, 1875-1876.

**Bera, A.**, Herbert, S., Jakob, A., Vollmer, W., and Gotz, F. (2005). Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 55, 778-787.

**Bhakdi, S.**, Muhly, M., Korom, S., and Hugo, F. (1989). Release of interleukin-1 beta associated with potent cytotoxic action of staphylococcal alpha-toxin on human monocytes. *Infect. Immun.* 57, 3512-3519.

**Bhakdi S.**, Walev, I., Husmann M., Valeva A. (2004). Staphylococcal Alpha-Toxin. *Topics in Current Genetics*, Vol. 11.

**Bone, R.C.** (1994). Gram-positive organisms and sepsis. *Arch Intern Med* 154, 26-34.

**Borregaard, N.** (1997). Development of neutrophil granule diversity. *Ann N Y. Acad Sci.* 832, 62-68.

**Borregaard, N.** and Cowland, J.B. (1997b) Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89, 3503-3521

**Bourne, H.R.** and Weiner, O. (2002). A chemical compass. *Nature* 419, 21.

**Bramley, A.J.**, Patel, A.H., O'Reilly, M., Foster, R., and Foster, T.J. (1989). Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of *Staphylococcus aureus* for the mouse mammary gland. *Infect. Immun.* 57, 2489-2494.

**Brealey, D.** and Singer, M. (2000). Multi-organ dysfunction in the critically ill: effects on different organs. *J R. Coll. Physicians Lond* 34, 428-431.

- Brown, K.A.**, Brain, S.D., Pearson, J.D., Edgeworth, J.D., Lewis, S.M., and Treacher, D.F. (2006a). Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* 368, 157-169.
- Buscher, K.**, Riese, S.B., Shakibaei, M., Reich, C., Dervedde, J., Tauber, R., and Ley, K. (2010). The transmembrane domains of L-selectin and CD44 regulate receptor cell surface positioning and leukocyte adhesion under flow. *J Biol. Chem.* 285, 13490-13497.
- Casewell, M.W.** and Hill, R.L. (1986). The carrier state: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob. Chemother.* 18 Suppl A, 1-12.
- Caver, T.E.**, O'Sullivan, F.X., Gold, L.I., and Gresham, H.D. (1996). Intracellular demonstration of active TGFbeta1 in B cells and plasma cells of autoimmune mice. IgG-bound TGFbeta1 suppresses neutrophil function and host defense against *Staphylococcus aureus* infection. *J Clin Invest* 98, 2496-2506.
- Cescatti, L.**, Pederzoli, C., and Menestrina, G. (1991). Modification of lysine residues of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: effects on its channel-forming properties. *J Membr. Biol.* 119, 53-64.
- Chambers, H.F.** (1997). Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol. Rev* 10, 781-791.
- Chavakis, T.**, Hussain, M., Kanse, S.M., Peters, G., Bretzel, R.G., Flock, J.I., Herrmann, M., and Preissner, K.T. (2002). *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat. Med* 8, 687-693.
- Chesney, P.J.**, Bergdoll, M.S., Davis, J.P., and Vergeront, J.M. (1984). The disease spectrum, epidemiology, and etiology of toxic-shock syndrome. *Annu. Rev Microbiol.* 38, 315-338.
- Cheung, A.L.**, Chien, Y.T., and Bayer, A.S. (1999). Hyperproduction of alpha-hemolysin in a *sigB* mutant is associated with elevated SarA expression in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 67, 1331-1337.
- Chishti, A.D.**, Shenton, B.K., Kirby, J.A., and Baudouin, S.V. (2004). Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive Care Med* 30, 605-611.



- Condliffe, A.M.**, Kitchen, E., and Chilvers, E.R. (1998). Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clin Sci. (Lond)* *94*, 461-471.
- Coxon, A.**, Rieu, P., Barkalow, F.J., Askari, S., Sharpe, A.H., von Andrian, U.H., Arnaout, M.A., and Mayadas, T.N. (1996). A novel role for the beta 2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. *Immunity*. *5*, 653-666.
- Cramer, E.**, Pryzwansky, K.B., Villeval, J.L., Testa, U., and Breton-Gorius, J. (1985). Ultrastructural localization of lactoferrin and myeloperoxidase in human neutrophils by immunogold. *Blood* *65*, 423-432.
- Cree, R.G.**, Aleljung, P., Paulsson, M., Witte, W., Noble, W.C., Ljungh, A., and Wadstrom, T. (1994). Cell surface hydrophobicity and adherence to extra-cellular matrix proteins in two collections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Epidemiol Infect.* *112*, 307-314.
- de Haas, C.J.**, Veldkamp, K.E., Peschel, A., Weerkamp, F., van Wamel, W.J., Heezius, E.C., Poppelier, M.J., van Kessel, K.P., and van Strijp, J.A. (2004). Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J. Exp. Med.* *199*, 687-695.
- De Kimpe, S.J.**, Kengatharan, M., Thiemermann, C., and Vane, J.R. (1995). The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* act in synergy to cause shock and multiple organ failure. *Proc. Natl Acad Sci. U. S. A* *92*, 10359-10363.
- DeLeo, F.R.**, Renee, J., McCormick, S., Nakamura, M., Apicella, M., Weiss, J.P., and Nauseef, W.M. (1998). Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J Clin Invest* *101*, 455-463.
- Devreotes, P.N.** and Zigmond, S.H. (1988). Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and Dictyostelium. *Annu. Rev Cell Biol.* *4*, 649-686.
- Ducker, T.P.** and Skubitz, K.M. (1992) Subcellular localization of CD66, CD67, and NCA in human neutrophils. *J Leukoc.Biol.* *52*, 11-16.
- Ekkelenkamp, M.B.**, Sekkat, M., Carpaij, N., Troelstra, A., and Bonten, M.J. (2006). Endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* originating from pigs. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* *150*, 2442-2447.

- Espersen, F.** (1985). Complement activation by clumping factor and protein A from *Staphylococcus aureus* strain E 2371. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. C.* 93, 59-64.
- Fairbanks VF, Ziesmer SC, O'Brien PC.** Methods for measuring plasma hemoglobin in micromolar concentration compared. *Clin Chem* 1992; 38(1):132-40.
- Foster, T.J.** (2004). The *Staphylococcus aureus* "superbug". *J. Clin. Invest* 114, 1693-1696.
- Foster, T.J.** (2005). Immune evasion by staphylococci. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 948-958.
- Furze, R.C.** and Rankin, S.M. (2008). The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. *FASEB J* 22, 3111-3119.
- Ganz, T.** (1987). Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 55, 568-571.
- Ganz, T., Selsted, M.E., Szklarek, D., Harwig, S.S., Daher, K., Bainton, D.F., and Lehrer, R.I.** (1985). Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 76, 1427-1435.
- Garcia-Alvarez, L., Holden, M.T., Lindsay, H., Webb, C.R., Brown, D.F., Curran, M.D., Walpole, E., Brooks, K., Pickard, D.J., Teale, C., Parkhill, J., Bentley, S.D., Edwards, G.F., Girvan, E.K., Kearns, A.M., Pichon, B., Hill, R.L., Larsen, A.R., Skov, R.L., Peacock, S.J., Maskell, D.J., and Holmes, M.A.** (2011). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect. Dis* 11, 595-603.
- Gemmell, C.G., Peterson, P.K., Schmeling, D.J., and Quie, P.G.** (1982). Effect of staphylococcal alpha-toxin on phagocytosis of staphylococci by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 38, 975-980.
- Gibbs, B.F.** (2005). Human basophils as effectors and immunomodulators of allergic inflammation and innate immunity. *Clin Exp Med* 5, 43-49.
- Gillet, Y., Issartel, B., Vanhems, P., Fournet, J.C., Lina, G., Bes, M., Vandenesch, F., Piemont, Y., Brousse, N., Floret, D., and Etienne, J.** (2002). Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 359, 753-759.

- Graille, M.**, Stura, E.A., Corper, A.L., Sutton, B.J., Taussig, M.J., Charbonnier, J.B., and Silverman, G.J. (2000). Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proc. Natl Acad Sci. U. S. A* *97*, 5399-5404.
- Greene, C.**, McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P.E., Lew, D.P., and Foster, T.J. (1995). Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. *Mol. Microbiol.* *17*, 1143-1152.
- Guthrie, L.A.**, McPhail, L.C., Henson, P.M., and Johnston, R.B., Jr. (1984). Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *J Exp Med* *160*, 1656-1671.
- Hamill, R.J.**, Vann, J.M., and Proctor, R.A. (1986). Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect. Immun.* *54*, 833-836.
- Hanssen, AM.** und Ericson Sollid, U. (2005). *SCCmec* in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol* *46* (2006) 8-20
- Hayashi, F.**, Means, T.K., and Luster, A.D. (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* *102*, 2660-2669.
- Heit, B.** and Kubes, P. (2003). Measuring chemotaxis and chemokinesis: the under-agarose cell migration assay. *Sci. STKE.* *2003*, L5.
- Hiramatsu, K.**, Cui, L., Kuroda, M., and Ito, T. (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* *9*, 486-493.
- Huijsdens, X.W.**, van Dijke, B.J., Spalburg, E., van Santen-Verheuevel, M.G., Heck, M.E., Pluister, G.N., Voss, A., Wannet, W.J., and de Neeling, A.J. (2006). Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* *5*, 26.
- Ingavale, S.**, van, W.W., Luong, T.T., Lee, C.Y., and Cheung, A.L. (2005). *Rat/MgrA*, a regulator of autolysis, is a regulator of virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* *73*, 1423-1431.

- Ishikawa, K.**, Tanaka, H., Nakamori, Y., Hosotsubo, H., Ogura, H., Nishino, M., Shimazu, T., and Sugimoto, H. (2000). Difference in the responses after administration of granulocyte colony-stimulating factor in septic patients with relative neutropenia. *J Trauma* 48, 814-824.
- Janeway, C.**, Travers P., Walport M., Shlomchik M. (2002) *Immunologie*. 5. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Berlin
- Jimenez, M.F.**, Watson, R.W., Parodo, J., Evans, D., Foster, D., Steinberg, M., Rotstein, O.D., and Marshall, J.C. (1997). Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome. *Arch Surg* 132, 1263-1269.
- Jin, T.**, Bokarewa, M., Foster, T., Mitchell, J., Higgins, J., and Tarkowski, A. (2004a). *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol* 172, 1169-1176.
- Jonsson, K.**, McDevitt, D., McGavin, M.H., Patti, J.M., and Hook, M. (1995). *Staphylococcus aureus* expresses a major histocompatibility complex class II analog. *J Biol. Chem.* 270, 21457-21460.
- Josefsson, E.**, Hartford, O., O'Brien, L., Patti, J.M., and Foster, T. (2001). Protection against experimental *Staphylococcus aureus* arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant. *J Infect. Dis* 184, 1572-1580.
- Kadlec, K.**, Ehricht, R., Monecke, S., Steinacker, U., Kaspar, H., Mankertz, J., and Schwarz, S. (2009). Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 1156-1164.
- Kadlec, K.** and Schwarz, S. (2009a). Identification of a novel trimethoprim resistance gene, *dfrK*, in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain and its physical linkage to the tetracycline resistance gene *tet(L)*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 776-778.
- Kadlec, K.** and Schwarz, S. (2009b). Novel ABC transporter gene, *vga(C)*, located on a multiresistance plasmid from a porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3589-3591.

- Karavolos, M.H.**, Horsburgh, M.J., Ingham, E., and Foster, S.J. (2003). Role and regulation of the superoxide dismutases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 149, 2749-2758.
- Kariyawasam, H.H.** and Robinson, D.S. (2006). The eosinophil: the cell and its weapons, the cytokines, its locations. *Semin. Respir Crit Care Med* 27, 117-127.
- Katayama, Y.**, Ito, T., and Hiramatsu, K. (2001). Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1955-1963.
- Kawasaki, A.**, Takada, H., Kotani, S., Inai, S., Nagaki, K., Matsumoto, M., Yokogawa, K., Kawata, S., Kusumoto, S., and Shiba, T. (1987). Activation of the human complement cascade by bacterial cell walls, peptidoglycans, water-soluble peptidoglycan components, and synthetic muramylpeptides--studies on active components and structural requirements. *Microbiol. Immunol.* 31, 551-569.
- Kehrenberg, C.**, Cuny, C., Strommenger, B., Schwarz, S., and Witte, W. (2009). Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* strains of clonal lineages ST398 and ST9 from swine carry the multidrug resistance gene *cfr*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 779-781.
- Kengatharan, K.M.**, De, K.S., Robson, C., Foster, S.J., and Thiemermann, C. (1998). Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *J Exp Med* 188, 305-315.
- Kielian, T.**, Barry, B., and Hickey, W.F. (2001). CXC chemokine receptor-2 ligands are required for neutrophil-mediated host defense in experimental brain abscesses. *J Immunol* 166, 4634-4643.
- Kjeldsen, L.**, Bainton, D.F., Sengelov, H., and Borregaard, N. (1993). Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation. *Blood* 82, 3183-3191.

- Kjeldsen, L.**, Sengelov, H., Lollike, K., Nielsen, M.H., and Borregaard, N. (1994). Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils. *Blood* 83, 1640-1649.
- Kobayashi, N.**, Alam, M.M., and Urasawa, S. (2001). Genomic rearrangement of the *mec* regulator region mediated by insertion of *IS431* in methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 335-338.
- Kobayashi, S.D.**, Voyich, J.M., Buhl, C.L., Stahl, R.M., and DeLeo, F.R. (2002). Global changes in gene expression by human polymorphonuclear leukocytes during receptor-mediated phagocytosis: cell fate is regulated at the level of gene expression. *Proc. Natl Acad Sci. U. S. A* 99, 6901-6906.
- Krzywanek, K.**, Metz-Gercek, S., and Mittermayer, H. (2009). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from human patients, upper Austria. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 766-769.
- Lakshman, R.** and Finn, A. (2001). Neutrophil disorders and their management. *J Clin Pathol.* 54, 7-19.
- Lee, J.C.** (1996). The prospects for developing a vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 4, 162-166.
- Ley, K.**, Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev Immunol* 7, 678-689.
- Ley, K.**, Smith, E., and Stark, M.A. (2006). IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunol Res* 34, 229-242.
- Lim, T.T.**, Chong, F.N., O'Brien, F.G., and Grubb, W.B. (2003). Are all community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related? A comparison of their *mec* regions. *Pathology* 35, 336-343.
- Lin, R.Y.**, Astiz, M.E., Saxon, J.C., and Rackow, E.C. (1993). Altered leukocyte immunophenotypes in septic shock. Studies of HLA-DR, CD11b, CD14, and IL-2R expression. *Chest* 104, 847-853.
- Llewelyn, M.** and Cohen, J. (2002). Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. *Lancet Infect. Dis* 2, 156-162.

- Lo, S.K.**, Lai, L., Cooper, J.A., and Malik, A.B. (1988). Thrombin-induced generation of neutrophil activating factors in blood. *Am J Pathol.* *130*, 22-32.
- Lowy, F.D.** (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* *339*, 520-532.
- Ludwig, M.** (2006). Experimentelle Untersuchungen zu Zell-Zell-Interaktionen von Pulmonalepithelien und Granulozyten. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Lund-Johansen, F.**, Olweus, J., Symington, F.W., Arli,A., Thompson, J.S., Vilella, R., Skubit, K., and Horejsi, V. (1993). Activation of human monocytes and granulocytes by monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens. *Eur J Immunol* *23*, 2782-2791.
- Luong, T.T.** and Lee, C.Y. (2002). Overproduction of type 8 capsular polysaccharide augments *Staphylococcus aureus* virulence. *Infect. Immun.* *70*, 3389-3395.
- Lussow, A.R.** and MacDonald, H.R. (1994). Differential effects of superantigen-induced "anergy" on priming and effector stages of a T cell-dependent antibody response. *Eur J Immunol* *24*, 445-449.
- Mader, J.T.**, Morrison, L.T., and Adams, K.R. (1987). Comparative evaluation of A-56619, A-56620, and nafcillin in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* *31*, 259-263.
- Manna, A.C.** and Cheung, A.L. (2003). *sarU*, a *sarA* homolog, is repressed by *SarT* and regulates virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* *71*, 343-353.
- Manna, A.C.** and Cheung, A.L. (2006). Expression of *SarX*, a negative regulator of *agr* and exoprotein synthesis, is activated by *MgrA* in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *188*, 4288-4299.
- Martin, G.S.**, Mannino, D.M., Eaton,S., and Moss,M. (2003). The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* *348*, 1546-1554.
- Martins, G.S.**, Brunialti, M.K.C., Martos, L.S.W., Machado, F.R., Assuncao,M.S., Blecher, S., Salomao, R.(2008). Expression of cell surfacr receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis. *Critical Care*, *12*:R25

- Martins, P.S.**, Kallas, E.G., Neto, M.C., Dalboni, M.A., Blecher, S., and Salomao, R. (2003). Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock* 20, 208-212.
- Matsumoto, Y.**, Kaito, C., Morishita, D., Kurokawa, K., and Sekimizu, K. (2007). Regulation of exoprotein gene expression by the *Staphylococcus aureus* *cvfB* gene. *Infect. Immun.* 75, 1964-1972.
- McGill, S.N.**, Ahmed, N.A., Hu, F., Michel, R.P., and Christou, N.V. (1996). Shedding of L-selectin as a mechanism for reduced polymorphonuclear neutrophil exudation in patients with the systemic inflammatory response syndrome. *Arch Surg* 131, 1141-1146.
- McPhail, L.C.**, Clayton, C.C., and Snyderman, R. (1984). The NADPH oxidase of human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for regulation by multiple signals. *J Biol. Chem.* 259, 5768-5775.
- Menestrina, G.**, Dalla, S.M., Comai, M., Coraiola, M., Viero, G., Werner, S., Colin, D.A., Monteil, H., and Prevost, G. (2003). Ion channels and bacterial infection: the case of beta-barrel pore-forming protein toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett.* 552, 54-60.
- Molne, L.**, Verdrengh, M., and Tarkowski, A. (2000). Role of neutrophil leukocytes in cutaneous infection caused by *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 68, 6162-6167.
- Monecke, S.** and Ehricht, R. (2005). Rapid genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates using miniaturised oligonucleotide arrays. *Clin Microbiol. Infect.* 11, 825-833.
- Montoya, M.** and Gouaux, E. (2003). Beta-barrel membrane protein folding and structure viewed through the lens of alpha-hemolysin. *Biochim. Biophys. Acta* 1609, 19-27.
- Morell, E.A.** and Balkin, D.M. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a pervasive pathogen highlights the need for new antimicrobial development. *Yale J Biol. Med* 83, 223-233.
- Müller-Kobold, A.C.**, Tulleken, J.E., Zijlstra, J.G., Sluiter, W., Hermans, J., Kallenberg, C.G., and Tervaert, J.W. (2000) Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med* 26, 883-892.



- Nagase, H.**, Miyamasu, M., Yamaguchi, M., Imanishi, M., Tsuno, N.H., Matsushima, K., Yamamoto, K., Morita, Y., and Hirai, K. (2002). Cytokine-mediated regulation of CXCR4 expression in human neutrophils. *J Leukoc. Biol.* *71*, 711-717.
- Novick R.P.**, The staphylococcus as a molecular genetic system. In: Novick R.P., ed. *Molecular biology of the staphylococci*. New York: VCH, 1990:1-37.
- Novick, R.P.**, Ross, H.F., Projan, S.J., Kornblum, J., Kreiswirth, B., and Moghazeh, S. (1993). Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* *12*, 3967-3975.
- Nuytinck, H.K.**, Offermans, X.J., Kubat, K., and Goris, R.J. (1987). Whole body inflammation in trauma patients; an autopsy study. *Prog. Clin Biol. Res* *236A*, 55-61.
- O'Brien, L.**, Kerrigan, S.W., Kaw, G., Hogan, M., Penades, J., Litt, D., Fitzgerald, D.J., Foster, T.J., and Cox, D. (2002). Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. *Mol. Microbiol.* *44*, 1033-1044.
- Ogawa, S.K.**, Yurberg, E.R., Hatcher, V.B., Levitt, M.A., and Lowy, F.D. (1985). Bacterial adherence to human endothelial cells in vitro. *Infect. Immun.* *50*, 218-224.
- Oikawa, S.**, Inuzuka, C., Kuroki, M., Arakawa, F., Matsuoka, Y., Kosaki, G., and Nakazato, H. (1991). A specific heterotypic cell adhesion activity between members of carcinoembryonic antigen family, W272 and NCA, is mediated by N-domains. *J Biol. Chem.* *266*, 7995-8001.
- Otto, M.** (2004). Quorum-sensing control in Staphylococci -- a target for antimicrobial drug therapy? *FEMS Microbiol. Lett.* *241*, 135-141.
- Pan, A.**, Battisti, A., Zoncada, A., Bernieri, F., Boldini, M., Franco, A., Giorgi, M., Iurescia, M., Lorenzotti, S., Martinotti, M., Monaci, M., and Pantosti, A. (2009). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 infection, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* *15*, 845-847.

- Papakyriacou, H.**, Vaz, D., Simor, A., Louie, M., and McGavin, M.J. (2000). Molecular analysis of the accessory gene regulator (*agr*) locus and balance of virulence factor expression in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* *181*, 990-1000.
- Patel, A.H.**, Nowlan, P., Weavers, E.D., and Foster, T. (1987). Virulence of protein A-deficient and alpha-toxin-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele replacement. *Infect. Immun.* *55*, 3103-3110.
- Peacock, S.J.**, Foster, T.J., Cameron, B.J., and Berendt, A.R. (1999). Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiology* *145 ( Pt 12)*, 3477-3486.
- Peacock, S.J.**, Moore, C.E., Justice, A., Kantzanou, M., Story, L., Mackie, K., O'Neill, G., and Day, N.P. (2002). Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* *70*, 4987-4996.
- Peschel, A.**, Jack, R.W., Otto, M., Collins, L.V., Staubitz, P., Nicholson, G., Kalbacher, H., Nieuwenhuizen, W.F., Jung, G., Tarkowski, A., Van Kessel, K.P., and van Strijp, J.A. (2001). *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J Exp Med* *193*, 1067-1076.
- Prevost, G.**, Cribier, B., Couppie, P., Petiau, P., Supersac, G., Finck-Barbancon, V., Monteil, H., and Piemont, Y. (1995). Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect. Immun.* *63*, 4121-4129.
- Proctor, R.A.**, van, L.P., Kristjansson, M., Maslow, J.N., and Arbeit, R.D. (1995). Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect. Dis* *20*, 95-102.
- Qureshi, S.S.**, Lewis, S.M., Gant, V.A., Treacher, D., Davis, B.H., and Brown, K.A. (2001). Increased distribution and expression of CD64 on blood polymorphonuclear cells from patients with the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Clin Exp Immunol* *125*, 258-265.

- Rice, W.G.**, Ganz, T., Kinkade, J.M., Jr., Selsted, M.E., Lehrer, R.I., and Parmley, R.T. (1987). Defensin-rich dense granules of human neutrophils. *Blood* 70, 757-765.
- Rickert, P.**, Weiner, O.D., Wang, F., Bourne, H.R., and Servant, G. (2000). Leukocytes navigate by compass: roles of PI3Kgamma and its lipid products. *Trends Cell Biol.* 10, 466-473.
- Rittirsch,D.**, Flierl, M.A., and Ward, P.A. (2008) Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat.Rev Immunol.* 8: 776-787.
- Robbins, S.M.**, Quintrell, N.A., and Bishop, J.M. (1995). Myristoylation and differential palmitoylation of the HCK protein-tyrosine kinases govern their attachment to membranes and association with caveolae. *Mol. Cell Biol.* 15, 3507-3515.
- Robert Koch Institut**, Berlin (2011). *Epidemiologisches Bulletin* 4.Juli 2011 / Nr.26
- Robertson, J.W.**, Rodrigues, C.G., Stanford, V.M., Rubinson, K.A., Krasilnikov ,O.V., and Kasianowicz, J.J. (2007). Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore. *Proc. Natl Acad Sci. U. S. A* 104, 8207-8211.
- Rooijackers, S.H.**, Ruyken, M., Roos, A., Daha, M.R., Presanis, J.S., Sim, R.B., van Wamel, W.J., van Kessel, K.P., and van Strijp, J.A. (2005a). Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat. Immunol* 6, 920-927.
- Rooijackers, S.H.**, Ruyken, M., van, R.J., van Kessel, K.P., van Strijp, J.A., and van Wamel, W.J. (2006). Early expression of SCIN and CHIPS drives instant immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *Cell Microbiol.* 8, 1282-1293.
- Rooijackers, S.H.**, van Wamel, W.J., Ruyken, M., van Kessel, K.P., and van Strijp, J.A. (2005b). Anti-opsonic properties of staphylokinase. *Microbes. Infect.* 7, 476-484.
- Rosenbloom, A.J.**, Pinsky, M.R., Napolitano, C., Nguyen, T.S., Levann, D., Pencosky, N., Dorrance, A., Ray, B.K., and Whiteside, T. (1999). Suppression of cytokine-mediated beta2-integrin activation on circulating neutrophils in critically ill patients. *J Leukoc. Biol.* 66, 83-89.
- Sabroe, I.**, Prince, L.R., Jones, E.C., Horsburgh, M.J., Foster, S.J., Vogel, S.N., Dower, S.K., and Whyte, M.K. (2003). Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol* 170, 5268-5275.

- Said-Salim, B.**, Mathema, B., and Kreiswirth, B.N. (2003). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen. *Infect. Control Hosp. Epidemiol* *24*, 451-455.
- Sanabria, T.J.**, Alpert, J.S., Goldberg, R., Pape, L.A., and Cheeseman, S.H. (1990). Increasing frequency of staphylococcal infective endocarditis. Experience at a university hospital, 1981 through 1988. *Arch Intern Med* *150*, 1305-1309.
- Sanford, M.D.**, Widmer, A.F., Bale, M.J., Jones, R.N., and Wenzel, R.P. (1994). Efficient detection and long-term persistence of the carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect. Dis* *19*, 1123-1128.
- Sarma, V.J.**, Huber-Lang, M., and Ward, P.A. (2006). Complement in lung disease. *Autoimmunity* *39*, 387-394.
- Scapini, P.**, Lapinet-Vera, J.A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F., and Cassatella, M.A. (2000). The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* *177*, 195-203.
- Schaberg, D.R.** and Zervos, M.J. (1986). Intergeneric and interspecies gene exchange in gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.* *30*, 817-822.
- Schmidt, T.**; Brodesser, A.; Schnitzler, N.; Brandenburg, K.; Grüger, T.; Zündorf, J. (1999). A newly modified under-agarose cell migration assay leads to a polymorphonuclear leukocyte migration efficiency of 100%. *Journal of Medical Microbiology*, Vol.: 299S1, Abstract
- Schnitzler, N.**, Haase, G., Podbielski, A., Lutticken, R., and Schweizer, K.G. (1999) A costimulatory signal through ICAM-beta2 integrin-binding potentiates neutrophil phagocytosis. *Nat. Med.* *5*: 231-235.
- Schroder, A.K.**, Uciechowski, P., Fleischer, D., and Rink, L. (2006). Crosslinking of CD66B on peripheral blood neutrophils mediates the release of interleukin-8 from intracellular storage. *Hum. Immunol.* *67*, 676-682.
- Schwandner, R.**, Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., and Kirschning, C.J. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol. Chem.* *274*, 17406-17409.

- Schwarz-Linek, U.**, Hook, M., and Potts, J.R. (2004). The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. *Mol. Microbiol.* *52*, 631-641.
- Sengelov, H.**, Kjeldsen, L., and Borregaard, N. (1993). Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol* *150*, 1535-1543.
- Sengelov, H.**, Kjeldsen, L., Diamond, M.S., Springer, T.A., and Borregaard, N. (1993b) Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. *J Clin Invest* *92*, 1467-1476.
- Shore, A.**, Rossney, A.S., Keane, C.T., Enright, M.C., and Coleman, D.C. (2005). Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette mec in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 2070-2083.
- Silverman, G.J.** and Goodyear, C.S. (2002). A model B-cell superantigen and the immunobiology of B lymphocytes. *Clin Immunol* *102*, 117-134.
- Simon, S.I.**, Neelamegham, S., Taylor, A., and Smith, C.W. (1998). The multistep process of homotypic neutrophil aggregation: a review of the molecules and effects of hydrodynamics. *Cell Adhes. Commun* *6*, 263-276.
- Skubitz, K.M.**, Campbell, K.D., and Skubitz, A.P. (1996). CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils. *J Leukoc. Biol.* *60*, 106-117.
- Sorensen, O.E.**, Follin, P., Johnsen, A.H., Calafat, J., Tjabringa, G.S., Hiemstra, P.S., and Borregaard, N. (2001). Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* *97*, 3951-3959.
- Spickett, G.P.** (2008). Immune deficiency disorders involving neutrophils. *J Clin Pathol.* *61*, 1001-1005.
- Sriskandan, S.** and Cohen, J. (1999a). Gram-positive sepsis. Mechanisms and differences from gram-negative sepsis. *Infect. Dis Clin North Am* *13*, 397-412.
- Stark, M.A.**, Huo, Y., Burcin, T.L., Morris, M.A., Olson, T.S., and Ley, K. (2005). Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity.* *22*, 285-294.

- Staubitz, P.**, Neumann, H., Schneider, T., Wiedemann, I., and Peschel, A. (2004). MprF-mediated biosynthesis of lysylphosphatidylglycerol, an important determinant in staphylococcal defensin resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* *231*, 67-71.
- Steinberg, J.P.**, Clark, C.C., and Hackman, B.O. (1996). Nosocomial and community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremias from 1980 to 1993: impact of intravascular devices and methicillin resistance. *Clin Infect. Dis* *23*, 255-259.
- Stockinger, H.** (1997). Interaction of GPI-anchored cell surface proteins and complement receptor type 3. *Exp. Clin Immunogenet.* *14*, 5-10.
- Strommenger, B.**, Kehrenberg, C., Kettlitz, C., Cuny, C., Verspohl, J., Witte, W., and Schwarz, S. (2006). Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and their relationship to human isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* *57*, 461-465.
- Strukova, S.** (2006). Blood coagulation-dependent inflammation. Coagulation-dependent inflammation and inflammation-dependent thrombosis. *Front Biosci.* *11*, 59-80.
- Stubner, G.** and Siedler, H. (1984). Phagocytosis of neutrophilic granulocytes of intensive care patients: effect of immunoglobulin preparations. *Immun. Infekt.* *12*, 69-72.
- Suttorp, N.** and Habben, E. (1988). Effect of staphylococcal alpha-toxin on intracellular Ca<sup>2+</sup> in polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* *56*, 2228-2234.
- Szabo, C.**, Southan, G.J., and Thiemermann, C. (1994). Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiourrea sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *Proc. Natl Acad Sci. U. S. A* *91*, 12472-12476.
- Thakker, M.**, Park, J.S., Carey, V., and Lee, J.C. (1998). *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect. Immun.* *66*, 5183-5189.
- Theilgaard-Monch, K.**, Knudsen, S., Follin, P., and Borregaard, N. (2004). The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing. *J Immunol* *172*, 7684-7693.

- Thompson, J.A.**, Grunert, F., and Zimmermann, W. (1991). Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal.* 5, 344-366.
- Titheradge, M.A.** (1999). Nitric oxide in septic shock. *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 437-455.
- Tompkins, D.C.**, Hatcher, V.B., Patel, D., Orr, G.A., Higgins, L.L., and Lowy, F.D. (1990). A human endothelial cell membrane protein that binds *Staphylococcus aureus* in vitro. *J Clin Invest* 85, 1248-1254.
- Torsteinsdottir, I.**, Arvidson, N.G., Hallgren, R., and Hakansson, L. (1999). Enhanced expression of integrins and CD66b on peripheral blood neutrophils and eosinophils in patients with rheumatoid arthritis, and the effect of glucocorticoids. *Scand. J Immunol.* 50, 433-439.
- Treacher, D.F.**, Sabato, M., Brown, K.A., and Gant, V. (2001). The effects of leucodepletion in patients who develop the systemic inflammatory response syndrome following cardiopulmonary bypass. *Perfusion* 16 Suppl, 67-73.
- Uhlen, M.**, Guss, B., Nilsson, B., Gatenbeck, S., Philipson, L., and Lindberg, M. (1984). Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *J Biol. Chem.* 259, 1695-1702.
- Valeva, A.**, Walev, I., Pinkernell, M., Walker, B., Bayley, H., Palmer, M., and Bhakdi, S. (1997). Transmembrane beta-barrel of staphylococcal alpha-toxin forms in sensitive but not in resistant cells. *Proc. Natl Acad Sci. U. S. A* 94, 11607-11611.
- van Wamel, W.J.**, Rooijackers, S.H., Ruyken, M., van Kessel, K.P., and van Strijp, J.A. (2006). The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J. Bacteriol.* 188, 1310-1315.
- Verbrugh, H.A.**, van Dijk, W.C., Peters, R., van der Tol, M.E., and Verhoef, J. (1979). The role of *Staphylococcus aureus* cell-wall peptidoglycan, teichoic acid and protein A in the processes of complement activation and opsonization. *Immunology* 37, 615-621.

- Vercellotti, G.M.**, Lussenhop, D., Peterson, P.K., Furcht, L.T., McCarthy, J.B., Jacob, H.S., and Moldow, C.F. (1984). Bacterial adherence to fibronectin and endothelial cells: a possible mechanism for bacterial tissue tropism. *J Lab Clin Med* *103*, 34-43.
- Von Vietinghoff, V.S.** and Ley, K. (2009). IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice. *J Immunol* *183*, 865-873.
- Voss, A.**, Loeffen, F., Bakker, J., Klaassen, C., and Wulf, M. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg. Infect. Dis.* *11*, 1965-1966.
- Voyich, J.M.**, Braughton, K.R., Sturdevant, D.E., Whitney, A.R., Said-Salim, B., Porcella, S.F., Long, R.D., Dorward, D.W., Gardner, D.J., Kreiswirth, B.N., Musser, J.M., and DeLeo, F.R. (2005). Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. *J. Immunol.* *175*, 3907-3919.
- Voyich, J.M.**, Otto, M., Mathema, B., Braughton, K.R., Whitney, A.R., Welty, D., Long, R.D., Dorward, D.W., Gardner, D.J., Lina, G., Kreiswirth, B.N., and DeLeo, F.R. (2006). Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *J Infect. Dis* *194*, 1761-1770.
- Wakefield, C.H.**, Carey, P.D., Foulds, S., Monson, J.R., and Guillou, P.J. (1993). Polymorphonuclear leukocyte activation. An early marker of the postsurgical sepsis response. *Arch Surg* *128*, 390-395.
- Waldvogel, F.A.** *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrome). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 4th ed. Vol. 2. New York: Churchill Livingstone, 1995:1754-77.
- Walev, I.**, Weller, U., Strauch, S., Foster, T., and Bhakdi, S. (1996). Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* *64*, 2974-2979.
- Wang, J.E.**, Dahle, M.K., McDonald, M., Foster, S.J., Aasen, A.O., and Thiemermann, C. (2003). Peptidoglycan and lipoteichoic acid in gram-positive bacterial sepsis: receptors, signal transduction, biological effects, and synergism. *Shock* *20*, 402-414.



- Wang, R.**, Braughton, K.R., Kretschmer, D., Bach, T.H., Queck, S.Y., Li, M., Kennedy, A.D., Dorward, D.W., Klebanoff, S.J., Peschel, A., DeLeo, F.R., and Otto, M. (2007). Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat. Med.* *13*, 1510-1514.
- Webster, D.**, Chui, L., Tyrrell, G.J., and Marrie, T.J. (2007). Health care-associated *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Can J Infect. Dis Med Microbiol.* *18*, 181-188.
- Weese, J.S.** and van Duijkeren, E. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet. Microbiol.* *140*, 418-429.
- Weigel, L. M.**, Donlan, R.M., Shin, D.H., Jensen, B., Clark, N.C., McDougal, L.K., Zhu, W., Musser, K.A., Thompson, J., Kohlerschmidt, D., Dumas, N., Limberger, R.J., and Patel, J.B. (2007). High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 231-238.
- Weinstein, H.J.** (1959). The relation between the nasal-staphylococcal-carrier state and the incidence of postoperative complications. *N Engl J Med* *260*, 1303-1308.
- Welinder-Olsson, C.**, Floren-Johansson, K., Larsson, L., Oberg, S., Karlsson, L., and Ahren, C. (2008). Infection with Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* t034. *Emerg. Infect. Dis.* *14*, 1271-1272.
- Wengner, A.M.**, Pitchford, S.C., Furze, R.C., and Rankin, S.M. (2008). The coordinated action of G-CSF and ELR + CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute inflammation. *Blood* *111*, 42-49.
- Wenzel, R.P.** and Perl, T.M. (1995). The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and the incidence of postoperative wound infection. *J Hosp. Infect.* *31*, 13-24.
- Wilkinson, B.J.**, Kim, Y., Peterson, P.K., Quie, P.G., and Michael, A.F. (1978). Activation of complement by cell surface components of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* *20*, 388-392.
- Wilkinson, B.J.**, Biology. In: Crossley KB, Archer GL, eds. *The staphylococci in human disease*. New York: Churchill Livingstone, 1997:1-38.

- Witte, W.**, Strommenger, B., Stanek, C., and Cuny, C. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* *13*, 255-258.
- Wolz, C.**, Pohlmann-Dietze, P., Steinhuber, A., Chien, Y.T., Manna, A., van, W.W., and Cheung, A. (2000). *Agr*-independent regulation of fibronectin-binding protein(s) by the regulatory locus *sar* in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* *36*, 230-243.
- Wright, H.L.**, Moots, R.J., Bucknall, R.C., and Edwards, S.W. (2010). Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)* *49*, 1618-1631.
- Wulf, M.W.**, Markestein, A., van der Linden, F.T., Voss, A., Klaassen, C., and Verduin, C.M. (2008a). First outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in a Dutch hospital, June 2007. *Euro. Surveill* *13*.
- Wulf, M.W.**, Sorum, M., van, N.A., Skov, R., Melchers, W.J., Klaassen, C.H., and Voss, A. (2008b). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians: an international study. *Clin. Microbiol. Infect.* *14*, 29-34.
- Wulf, M.W.**, Verduin, C.M., van, N.A., Huijsdens, X., and Voss, A. (2011). Infection and colonization with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 versus other MRSA in an area with a high density of pig farms. *Eur J Clin Microbiol. Infect. Dis.*
- Yoon, J.**, Terada, A., and Kita, H. (2007). CD66b regulates adhesion and activation of human eosinophils. *J Immunol.* *179*, 8454-8462.
- Yu, F.**, Chen, Z., Liu, C., Zhang, X., Lin, X., Chi, S., Zhou, T., Chen, Z., and Chen, X. (2008). Prevalence of *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes among isolates from hospitalised patients in China. *Clin. Microbiol. Infect.* *14*, 381-384.
- Zarbock, A.**, Deem, T.L., Burcin, T.L., and Ley, K. (2007). Gα<sub>12i2</sub> is required for chemokine-induced neutrophil arrest. *Blood* *110*, 3773-3779.
- Zhao, L.**, Xu, S., Fjaertoft, G., Pauksen, K., Hakansson, L., and Venge, P. (2004). An enzyme-linked immunosorbent assay for human carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8, a biological marker of granulocyte activities in vivo. *J Immunol. Methods* *293*, 207-214.

**Zhou, G.Q.**, Zhang, Y., and Hammarstrom, S. (2001). The carcinoembryonic antigen (CEA) gene family in non-human primates. *Gene* 264, 105-112.

# Abbildungsverzeichnis

## Einleitung

**Abbildung 1:** Schema der Immunzellendifferenzierung im Menschen

**Abbildung 2:** Transmigrationsmodell eines neutrophilen Granulozyten  
Quelle: Ley *et al.*, Nature Reviews Immunology, 2007

**Abbildung 3:** Schematischer Zellaufbau von *S. aureus* mit der Darstellung ausgewählter Virulenzfaktoren  
Quelle: Morell *et al.*, Yale Journal of Biology and Medicine, 2010, ursprünglich von Gordon *et al.*, 2008

**Abbildung 4:** Dynamik des Auftretens von epidemischen MRSA in Deutschland mit überregionaler Verbreitung in Krankenhäusern 2005-2011  
Quelle: Epidemiologisches Bulletin 4.Juli 2011 / Nr. 26, Robert Koch Institut, Berlin, Deutschland

**Abbildung 5:** *MecA*-Gen-Komplex  
Quelle: Hanssen *et al.*, FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2006. Basierend auf Katayama *et al.* (2001), Kobayshi *et al.* (2001b), Lim *et al.* (2003), Shore *et al.* (2005)

**Abbildung 6:** Modell „inflammatorisches Netzwerk im Sepsisgeschehen  
Quelle: Rittirsch *et al.*, 2008

## Zielsetzung

**Abbildung 7:** Abbildung 9: Anzahl an zugelassenen Antibiotika, USA, 1983-2007

Quelle: Morell *et al.*, Yale Journal of Biology and Medicine, 2010

## **Material und Methoden:**

**Abbildung 8:** Charakteristika der verwendeten *S. aureus*-Stämme

**Abbildung 9:** Einfügen von drei identischen Vertiefungen  
in das vorher hergestellte Agarosegel

**Abbildung 10:** Funktionsbereites Agarosegel mit Vertiefungen zum Einfüllen  
der Chemattraktoren bzw. der Negativkontrolle

**Abbildung 11:** Aufnahme der Zellen nach erfolgter Migration  
(Axiovert 40c; 50 x Vergrößerung)

## **Ergebnisse**

**Abbildung 12:** Wachstum der verschiedenen *S. aureus*-Stämme im  
volsynthetischen Zellkulturmedium IMDM

**Abbildung 13:** Genetischer Hintergrund der verschiedenen *S. aureus* Stämme

**Abbildung 14:** Ermittlung der Koloniegrößen in Flüssigkultur

**Abbildung 15:** Fibrinogenbindungskapazität der Stämme ATCC 52359 und ST398a,  
b, c und f.

**Abbildung 16:** Exoproteinmuster der verschiedenen *S. aureus*-Stämme.

**Abbildung 17:** Ermittlung der CHIPS-Konzentration im SaS

**Abbildung 18:** Ermittlung der Staphylokinase-Konzentration im SaS

**Abbildung 19:** Ermittlung der Alpha-Hämolysin-Konzentration im SaS

**Abbildung 20:** Chemotaxisinduktion von neutrophilen Granulozyten nach Serumaktivierung durch *S. aureus*

**Abbildung 21:** Killing der *S. aureus*-Stämme durch neutrophile Granulozyten mit und ohne SaS-Einfluss

**Abbildung 22:** Lyse der neutrophilen Granulozyten durch SaS

**Abbildung 23:** Hämolyse im Vollblut nach Inkubation mit SaS

**Abbildung 24:** Zytokininduktion im Vollblut nach Inkubation mit SaS

**Abbildung 25:** CD66b und CD11b Expression auf neutrophilen Granulozyten im Vollblut nach Inkubation mit SaS und anderen Stimuli

**Abbildung 26:** Ergebnispool der fMLP und SaS induzierten CD66b und CD11b Expression auf neutrophilen Granulozyten

**Abbildung 27:** CD11a/CD11b/CD11c-Expression nach Inkubation mit fMLP oder SaS

**Abbildung 28:** Kinetik der CD66b / CD11b / CD18 / CD62L-Expression nach Stimulation mit fMLP oder SaS

**Abbildung 29:** Korrelation von CD66b-Expression und Lactoferrin-Freisetzung im Vollblut nach der Stimulation mit SaS und anderen Stimulanzen

**Abbildung 30:** Bildung von Zelldubletten nach Stimulation mit fMLP oder SaS

**Abbildung 31:** Fotografische Dokumentation der CD66b/CD11b/CD18-Rezeptorexpression und Neutrophil-Aggregatbildung

**Abbildung 32:** Fotografische Dokumentation der CD66b/CD11b Oberflächenexpression und Co-Lokalisation auf Neutrophilaggregaten (LSM 780 / 40 x Objektiv) nach SaS-Stimulation.

**Abbildung 33:** 3D-Modell der CD66b/CD11b Oberflächenexpression nach SaS-Stimulation (LSM 780 / 40 x Objektiv)

**Abbildung 34:** Korrelation von CD66b-Expression und homotypischer Aggregatbildung nach SaS-Stimulation

**Abbildung 35:** CD11b-Expression und Aggregatbildung im Vollblut nach Inkubation mit SaS, fMLP und kreuzvernetzendem CD66b-Antikörper

**Abbildung 36:** CD66b und CD11b Expression auf isolierten neutrophilen Granulozyten nach Inkubation mit SaS und anderen Stimuli.

**Abbildung 37:** Vergleich der zellulären Blutparameter vor und nach Plasmasubstitution

**Abbildung 38:** Einfluss der Plasmasubstitution auf die CD66b/CD11b-Expression und Aggregatbildung

**Abbildung 39:** Einfluss des C5a-Rezeptor1-Antagonisten W-54011 auf die CD66b/CD11b-Expression und Aggregatbildung.

## **Diskussion**

**Abbildung 40:** Charakteristika von MRSA und ST398-MRSA positiven Individuen. Quelle: Wulf *et al.*, European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2011

**Abbildung 41:** Lipid-Bilayer-Membran mit Alpha- Hämolysin-Nanopore.

Quelle: The National Institute of Standards and Technology (NIST),  
USA

**Abbildung 42:** Virulenz der untersuchten ST398

**Abbildung 43:** *Agr*-System von Staphylokokken

Quelle: Otto, FEMS Microbiology Letters, 2004

**Abbildung 44:** Komplement-Aktivierung

Quelle: Sarma *et al.*, Automimmunity, 2006

**Abbildung 45:** Neutrophil-Endothel-Interaktion während einer Entzündungsreaktion

Quelle: Brown *et al.*, Lancet, 2006

**Abbildung 46:** Modell eines CD66b-induzierten Neutrophil-Transmigrationsdefizits



# Abkürzungsverzeichnis

- ATCC (American Type Collection)
- C5a (complement component 5)
- C5aR (complement component 5 receptor)
- CA (community aquired)
- CEA (carcino embryonic antigen)
- DAMP (danger associated molecular pattern)
- ESL-1 (E-selectin-ligand-1)
- FKS (fötales Kälberserum)
- fMLP (N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine)
- FPR (formyl-peptide-receptor)
- G-CSF (granulocyte colony-stimulating-factor)
- GPI (glycophosphatidylinositol)
- ICAM (intercellular adhesion molecule)
- IFN (interferon)
- IL (interleukin)
- KBE (Kolonie-bildende Einheiten)
- LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1)
- LPS (lipopolysaccharide)
- LTA (lipoteichoic acid)
- Mac1 (macrophage antigen 1)
- MCV (Mittleres corpusculäres Volumen)
- MHCII (major histocompatibility complex II)
- MLST (multi-locus sequence-type)
- MODS (multiple organ dysfunction)
- MRSA (Methicillin-resistant *Stapylococcus aureus*)
- MSCRAMM (microbial surface components-recognizing-adhesive matrix molecules)
- MSSA (Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*)
- PAMP (pathogen-associated molecular pattern)
- PG (peptidoglycan)
- PSGL-1 (P-selectin-glycoprotein-ligand-1)

ROS (reactive oxygen species)

SaS (*Staphylococcus aureus* supernatant)

ST (sequence type)

TLR (Toll-like receptor)

TNF (tumor necrosis factor)

***S. aureus*-Gene:**

*capsule-1* = Capsule Type 1

*capsule-5* = Capsule Type 5

*capsule-8* = Capsule Type 8

*icaA* = Intercellular Adhesion protein A (N-glycosyltransferase)

*icaC* = Intercellular Adhesion protein C

*icaD* = Intercellular Adhesion protein D

*bap* = Surface Protein involved in Biofilm formation

*clfA-all* = Clumping Factor A

*clfB-all* = Clumping factor B

*cna* = Collagen-Binding Adhesion

*ebh-all* = Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein

*fib* = Fibrinogen Binding Protein

*fnbA-all* = Fibronectin-Binding Protein A

*fnB-COL* = Fibronectin-Binding Protein B

*map* = Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein

*vwb-all* = Willebrand Factor – Binding Protein

*sasG* = *S. aureus* Surface Protein G

*tst-1* = Toxic Shock Syndrome Toxin

*entA* = Enterotoxin A

*entB* = Enterotoxin B

*entC* = Enterotoxin C

*entD* = Enterotoxin D

*entE* = Enterotoxin E

*entG* = Enterotoxin G

*entH* = Enterotoxin H  
*entI* = Enterotoxin I  
*entJ* = Enterotoxin J  
*entK* = Enterotoxin K  
*entL* = Enterotoxin L  
*entM* = Enterotoxin M  
*entN* = Enterotoxin N  
*entO* = Enterotoxin O  
*entQ* = Enterotoxin Q  
*entR* = Enterotoxin R  
*entU* = Enterotoxin U  
*egc-cluster* = Enterotoxins seg/sei/sem/sen/seo/seu  
*PVL* = Pantone-Valentine Leukocidin  
*lukM/lukF-P83* = Bovine Leukocidin  
*lukF* = Haemolysin Gamma, Component B  
*lukS* = Haemolysin Gamma, Component C  
*hlgA* = Haemolysin Gamma, Component A  
*lukD* = Leukocidin D Component  
*lukE* = Leukocidin E Component  
*hla* = Haemolysin Alpha (Alpha Toxin)  
*hld* = Haemolysin Delta (Amphiphilic Membrane Toxin)  
*hlb* = Haemolysin Beta (Phospholipase C)  
*sak* = Staphylokinase  
*chp* = Chemotaxis Inhibitory Protein (CHIPS)  
*scn* = Staphylococcal Complement Inhibitor (SCIN)  
*aur* = Aureolysin  
*splA* = Serine Protease A  
*splB* = Serine Protease B  
*splE* = Serine Protease E

# Anhang

## ST398c:

### Genetic markers for *S. aureus* / MRSA / PVL

Taxonomy	Species	Marker	( <i>S.aureus</i> )	<b>positive</b>
MRSA (mecA)	<b>positive</b>			
PVL	negative			

### Species Markers / Regulatory Genes

Gene/Probe	Result	Explanation
23S-rRNA	<b>positive</b>	23S-rRNA Gene
gapA	<b>positive</b>	Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase
katA	ambiguous	Catalase
coA	<b>positive</b>	Coagulase
Protein A	<b>positive</b>	Staphylococcus Protein A
sbi	<b>positive</b>	IgG-binding protein
nuc	<b>positive</b>	Thermostable Nuclease (DNase)
fnbA	<b>positive</b>	Fibronectin-binding Protein A
vraS	<b>positive</b>	vraS Sensor Protein
sarA	<b>positive</b>	Staphylococcal Accessory Regulator A
eno	<b>positive</b>	Enolase, Phosphopyruvate Hydratase
saeS	<b>positive</b>	Histidine Protein Kinase (sae Locus)

### Resistance Genotype

Gene/Probe	Result	Explanation
mecA	<b>positive</b>	Methicillin, Oxacillin and all Beta-Lactams, defining MRSA
blaZ	<b>positive</b>	Beta-Laktamase
blaI	<b>positive</b>	Beta Lactamase Repressor (Regulatory Protein)
blaR	<b>positive</b>	Beta Lactamase Regulatory Protein
ermA	negative	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin
ermB	<b>positive</b>	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin
ermC	<b>positive</b>	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin
linA	negative	Lincosamides
msrA	negative	Macrolide
mefA	negative	Macrolide
mpbBM	negative	Macrolide
vatA	negative	Streptogramine
vatB	negative	Streptogramine
vga	negative	Streptogramine
vgaA	negative	Streptogramine
vgb	negative	Streptogramine
aacA-aphD	negative	Aminoglycoside (Gentamicin, Tobramycin)

aadD	<b>positive</b>	Aminoglycoside (Tobramycin, Neomycin)
aphA	negative	Aminoglycoside (Kanamycin, Neomycin)
sat	<b>positive</b>	Streptothricin
dfrA	negative	Trimethoprim
far	negative	Fusidic acid
Q6GD50	negative	Putative Fusidic Acid Resistance Protein
mupR	negative	Mupirocin
tetK	<b>positive</b>	Tetracycline
tetM	<b>positive</b>	Tetracycline
tetEfflux	<b>positive</b>	Tetracyclin Efflux Protein (Putative Transport Protein)
cat	negative	Chloramphenicol
fexA	negative	Chloramphenicol
cfr	negative	Phenicols, Lincosamides, Oxazolidinones (Linezolid), Pleuromutilins, Streptogramin A
fosB	negative	Putative Marker For Fosfomycin, Bleomycin
vanA	negative	Vancomycin
vanB	negative	Vancomycin
vanZ	negative	Vancomycin
mercury resistance locus	negative	Mercury resistance operon
qacA	negative	Unspecific efflux pump
qacC	negative	Unspecific efflux pump

## Virulence Genotype

Gene/Probe	Result	Explanation
tst-1	negative	Toxic Shock Syndrome Toxin
tst-RF122	negative	Toxic Shock Syndrome Toxin, allele from bovine strains
entA	negative	Enterotoxin A
entA-320E	negative	Enterotoxin A, allele from 320E
entA-N315	negative	Enterotoxin A, allele from N315
entB	negative	Enterotoxin B
entC	negative	Enterotoxin C
entCM14	negative	Enterotoxin -like Protein (ORF CM14 of U10927.2)
entD	negative	Enterotoxin D
entE	negative	Enterotoxin E
entG	negative	Enterotoxin G
entH	negative	Enterotoxin H
entI	negative	Enterotoxin I
entJ	negative	Enterotoxin J
entK	negative	Enterotoxin K
entL	negative	Enterotoxin L
entM	negative	Enterotoxin M
entN	negative	Enterotoxin N
entN_1	negative	Enterotoxin N - other than RF122
entO	negative	Enterotoxin O
entQ	negative	Enterotoxin Q
entR	negative	Enterotoxin R
entU	negative	Enterotoxin U
egc-cluster	negative	Enterotoxins seg/sei/sem/sen/seo/seu
PVL	negative	Pantone-Valentine Leukocidin

lukM/lukF-P83	negative	Bovine Leukocidin
lukF	<b>positive</b>	Haemolysin Gamma, Component B
lukS	<b>positive</b>	Haemolysin Gamma, Component C
lukS-ST22+ST45	<b>positive</b>	Haemolysin Gamma, Component C, allele from ST22 and ST45
hlgA	<b>positive</b>	Haemolysin Gamma, Component A
lukD	negative	Leukocidin D Component
lukE	negative	Leukocidin E Component
lukX	<b>positive</b>	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein
lukY-var1	<b>positive</b>	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein
lukY-var2	negative	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein, allele from MRSA252
hl	<b>positive</b>	Hypothetical Protein similar to Haemolysin
hla	<b>positive</b>	Haemolysin Alpha (Alpha Toxin)
hld	<b>positive</b>	Haemolysin Delta (Amphiphilic Membrane Toxin)
hIII	<b>positive</b>	Putative Haemolysin III
hl_III_Other than RF122	<b>positive</b>	Putative Haemolysin III (other than RF122)
hIb	negative	Haemolysine Beta (Phospholipase C)
un-truncated hIb	<b>positive</b>	Haemolysine Beta (Phospholipase C / un-truncated)
sak	negative	Staphylokinase
chp(CHIPS)	negative	Chemotaxis Inhibitory Protein (CHIPS)
scn	negative	Staphylococcal Complement Inhibitor (SCIN)
etA	negative	Exfoliative Toxin A
etB	negative	Exfoliative Toxin B
etD	negative	Exfoliative Toxin D
edinA	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor A
edinB	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor B
edinC	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor C
aur	<b>positive</b>	Aureolysin
aur - OtherThan252	negative	Aureolysin, allele from other than MRSA252
aur-MRSA252	<b>positive</b>	Aureolysin, allele from MRSA252
splA	negative	Serine Protease A
splB	negative	Serine Protease B
splE	negative	Serine Protease E
sspA	<b>positive</b>	Glutamyl Endopeptidase / V8-Protease
sspB	<b>positive</b>	Staphopain B
sspP	<b>positive</b>	Staphopain A (Staphylopain A)
ACME-locus	negative	Arginine catabolic mobile element
arcA-SCC	negative	arginine deiminase
arcB-SCC	negative	ornithine transcarbamoylase
arcC-SCC	negative	carbamate kinase, locus 2
arcD-SCC	negative	arginine/ornithine antiporter

### agr-Typing

Gene/Probe	Result	Explanation
agrI	<b>positive</b>	Accessory Gene Regulator - Type 1
agrII	negative	Accessory Gene Regulator - Type 2
agrIII	negative	Accessory Gene Regulator - Type 3
agrIV	negative	Accessory Gene Regulator - Type 4

## SCCmec-Typing

Gene/Probe	Result	Explanation
mecA	<b>positive</b>	Methicillin, Oxacillin and all Beta-Lactams, defining <b>MRSA</b>
mecR	negative	Signal Transducer Protein MecR1
mecR_truncated	negative	Signal Transducer Protein MecR1 - truncated
mecI	negative	Methicillin-Resistance Regulatory Protein
ugpQ	<b>positive</b>	Glycerophosphoryl-diester-Phosphodiesterase (next to mecA)
ccrA-1	negative	Cassette Chromosome Recombinase A, type 1
ccrA-2	negative	Cassette Chromosome Recombinase A, type 2
ccrA-3	negative	Cassette Chromosome Recombinase A, type 3
ccrAA-MRSAZH47	<b>positive</b>	Cassette Chromosome Recombinase A, type ZH47
ccrA-4	negative	Cassette Chromosome Recombinase A, type 4
ccrB-1	negative	Cassette Chromosome Recombinase B, type 1
ccrB-2	negative	Cassette Chromosome Recombinase B, type 2
ccrB-3	negative	Cassette Chromosome Recombinase B, type 3
ccrB-4	negative	Cassette Chromosome Recombinase B, type 4
ccrC	<b>positive</b>	Cassette Chromosome Recombinase C
merA	negative	Mercuric Reductase (SCCmec type III)
merB	negative	Alkylmercury Lyase (SCCmec type III)
kdpA-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase A chain
kdpB-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase B chain
kdpC-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase C chain
kdpD-SCC	negative	Sensor Histidine Kinase (Sensor Protein located in kdp operon)
kdpE-SCC	negative	KDP Operon Transcriptional Regulatory Protein (DNA-binding Response Regulator)
plsSCC-COL	negative	plasmin-sensitive surface protein
Q9XB68-dcs	negative	Hypothetical Protein Historical Name: CN050 Synonyms: dcs
xylR	negative	Pseudogene of Xylose Repressor

## Capsule / Biofilm

Gene/Probe	Result	Explanation
capsule-1	negative	Capsule Type 1
capsule-5	<b>positive</b>	Capsule Type 5
capsule-8	negative	Capsule Type 8
capH1	negative	Capsular Polysaccharide Synthesis Enzyme CapH Capsule type 1
capJ1	negative	O-Antigen Polymerase CapJ Capsule Type 1
capK1	negative	Capsular Polysaccharide Biosynthesis Protein CapK Capsule Type 1
capH5	<b>positive</b>	Capsular Polysaccharide Synthesis Enzyme CapH Capsule type 5
capJ5	<b>positive</b>	O-Antigen Polymerase CapJ Capsule Type 5
capK5	<b>positive</b>	Capsular Polysaccharide Biosynthesis Protein CapK Capsule Type 5
capH8	negative	Capsular Polysaccharide Synthesis Enzyme CapH Capsule type 8
capI8	negative	Capsular Polysaccharide Synthesis Enzyme CapI Capsule type 8
capJ8	negative	O-Antigen Polymerase CapJ Capsule Type 8
capK8	negative	Capsular Polysaccharide Biosynthesis Protein CapK Capsule Type 8
icaA	<b>positive</b>	Intercellular Adhesion Protein A (N-glycosyltransferase)
icaC	<b>positive</b>	Intercellular Adhesion Protein C
icaD	<b>positive</b>	Biofilm PIA Synthesis Protein D
bap	negative	Surface Protein Involved In Biofilm Formation

## MSCRAMMs / Adhaesion Factors

Gene/Probe	Result	Explanation
bbp-all	<b>positive</b>	Bone Sialoprotein-Binding Protein
bbp-COL+MW2	<b>ambiguous</b>	Bone Sialoprotein-Binding Protein, allele from COL and MW2
bbp-MRSA252	negative	Bone Sialoprotein-Binding Protein, allele from MRSA252
bbp-Mu50	negative	Bone Sialoprotein-Binding Protein, allele from Mu50
bbp-RF122	negative	Bone Sialoprotein-Binding Protein, allele from RF122
bbp-ST45	<b>positive</b>	Bone Sialoprotein-Binding Protein, allele from ST45
<b>Clumping Factor A</b>		
clfA-all	<b>positive</b>	Clumping Factor A
clfA-COL+RF122	<b>positive</b>	Clumping Factor A, allele from RF122
clfA-MRSA252	negative	Clumping Factor A, allele from MRSA252
clfA-Mu50/MW2	<b>positive</b>	Clumping Factor A, allele from MU50 / MW2
clfB-all	<b>positive</b>	Clumping Factor B
clfB-COL+Mu50	negative	Clumping Factor B, allele from COL / MU 50
clfB-MW2	<b>positive</b>	Clumping Factor B, allele from MW2
clfB-RF122	<b>positive</b>	Clumping Factor B, allele from RF122
<b>Collagen-Binding Adhesin</b>		
cna	<b>positive</b>	Collagen-Binding Adhesin
ebh-all	<b>positive</b>	Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein
eno	<b>positive</b>	Enolase, Phosphopyruvate Hydratase
fib	negative	Fibrinogen Binding Protein
fib-MRSA252	<b>positive</b>	Fibrinogen Binding Protein, allele from MRSA252
<b>Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein</b>		
ebpS	<b>positive</b>	Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein
ebpS-01-1111	<b>positive</b>	Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein, allele from ST45
ebpS-COL	<b>positive</b>	Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein, allele from COL
<b>Fibronectin-Binding Protein A</b>		
fnbA-all	<b>positive</b>	Fibronectin-Binding Protein A
fnbA-COL	negative	Fibronectin-Binding Protein A, allele from COL
fnbA-MRSA252	negative	Fibronectin-Binding Protein A, allele from MRSA252
fnbA-Mu50+MW2	negative	Fibronectin-Binding Protein A, allele from MU50 / MW2
fnbA-RF122	negative	Fibronectin-Binding Protein A, allele from RF122
<b>Fibronectin-Binding Protein B</b>		
fnbB-COL	negative	Fibronectin-Binding Protein B
fnbB-COL+Mu50+MW2	<b>positive</b>	Fibronectin-Binding Protein B, allele from COL / MU50 / MW2
fnbB-Mu50	<b>positive</b>	Fibronectin-Binding Protein B, allele from MU50
fnbB-MW2	negative	Fibronectin-Binding Protein B, allele from MW2
fnbB-ST15	<b>ambiguous</b>	Fibronectin-Binding Protein B, allele from ST15
fnbB-ST45-2	negative	Fibronectin-Binding Protein B, allele from ST45
<b>Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein</b>		
map	<b>positive</b>	Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein
map-RF122	<b>positive</b>	Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein, allele from RF122
map-MRSA252	<b>positive</b>	Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein, allele from MRSA252
map-Mu50+MW2	<b>ambiguous</b>	Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein, allele from MU50 / MW2
<b>Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C</b>		
sdrC-all	<b>positive</b>	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C
sdrC-B1	negative	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C, allele from B1



sdrC-COL	negative	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C, allele from COL
sdrC-Mu50	<b>positive</b>	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C, allele from MU50
sdrC-MW2+MRSA252+RF122	<b>positive</b>	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C, allele from MW2 / MRSA252 / RF122
sdrC-OtherThan252+122	negative	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C, allele from other than MRSA252 / RF122
<b>serD</b>		
sdrD-COL+MW2	negative	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D
sdrD-Mu50	<b>positive</b>	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D, allele from MU50
sdrD-other	negative	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D, allele from Other
sdrD-OtherThan252+122	<b>positive</b>	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D, allele from Other Than MRSA252 / RF122
<b>wfb</b>		
vwb-all	<b>positive</b>	Willebrand Factor - Binding Protein
vwb-COL+MW2	negative	Willebrand Factor - Binding Protein, allele from COL / MW2
vwb-MRSA252	negative	Willebrand Factor - Binding Protein, allele from MRSA252
vwb-Mu50	negative	Willebrand Factor - Binding Protein, allele from MU50
vwb-RF122	negative	Willebrand Factor - Binding Protein, allele from RF122
<b>spa</b>		
sasG	negative	S. aureus Surface Protein G
sasG-COL+Mu50	negative	S. aureus Surface Protein G, allele from COL / MU50
sasG-MW2	negative	S. aureus Surface Protein G, allele from MW2
sasG-OtherThan252+122	negative	S. aureus Surface Protein G, allele from other than MRSA252 and RF122

## Immunevasion & Misc.

Gene/Probe	Result	Explanation
isaB	<b>positive</b>	Immunodominant Antigen B
isaB_MRSA252	<b>positive</b>	Immunodominant Antigen B, allele from MRSA252
<b>mprF</b>		
mprF	<b>positive</b>	Probable Lysylphosphatidylglycerol Synthetase (Defensin Resistance)
mprF_COL+MW2	<b>ambiguous</b>	Lysylphosphatidylglycerol Synthetase (Defensin Resistance), allele from COL/MW2
mprF_Mu50+252	<b>positive</b>	Lysylphosphatidylglycerol Synthetase (Defensin Resistance), allele from MU50/MRSA252
<b>isdA</b>		
isdA	<b>positive</b>	Heme/Transferrin-Binding Protein
isdA-MRSA252	<b>positive</b>	Heme/Transferrin-Binding Protein, allele from MRSA252
isdA-OtherThan252	negative	Heme/Transferrin-Binding Protein, allele from Other-ThanMRSA252
<b>lmrP</b>		
lmrP	<b>positive</b>	Putative Transporter Protein
lmrP-RF122	negative	Putative Transporter Protein, allele from RF122
<b>Q2YUB3</b>		
Q2YUB3	negative	Multidrug Resistance Protein
hsdS1-RF122	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 1, allele from RF122
hsdS2-ST5+ST8	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 2, allele

		from ST5 / ST8
hsdS2-MW2+476	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 2, allele from MW2 / 476
hsdS2-RF122	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 2, allele from RF122
hsdS2-MRSA252	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 2, allele from MRSA252
hsdS3-AllOtherThanRF122+252	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 3, allele from any other than MRSA252 / RF122
hsdS3-ST8+ST1+RF122	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 3, allele from ST8 / ST1 / RF122
hsdS3-Mu50+N315	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 3, allele from Mu50 / N315
hsdS3-CC51+MRSA252	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 3, allele from CC51 / MRSA252
hsdS3-MRSA252	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 3, allele from MRSA252
hsdSx-CC25	<b>positive</b>	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type X, allele from CC25
hsdSx-CC15	<b>positive</b>	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type X, allele from CC15
hsdSx-etd	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type X, allele from etD
Q2FXC0	negative	Q2FXC0
Q7A4X2	negative	Hypothetical Protein Next To entG
hysA1-MRSA252	negative	Hyaluronate Lyase A1_MRSA252
hysA1-MRSA252+RF122 hysA2-all	and <b>positive</b>	Hyaluronate Lyase A1, alleles from MRSA252/RF122 and Hyaluronate Lyase A2, all alleles
hysA1-MRSA252+RF122 hysA2-COL+USA300	and <b>positive</b>	Hyaluronate Lyase A1, alleles from MRSA252/RF122 and Hyaluronate Lyase A2, all alleles
hysA2-AllOtherThan252	negative	Hyaluronate Lyase A2, any other allele than MRSA252
hysA2-COL+USA300+NCTC	<b>positive</b>	Hyaluronate Lyase A2_COL/USA300/NCTC8325
hysA2-AllOtherThan COL+USA300+NCTC	negative	Hyaluronate Lyase A2, any other allele than COL/USA300/NCTC8325
hysA2-MRSA252	<b>ambiguous</b>	Hyaluronate Lyase A2_MRSA252

### set / ssl Genes

Probe	Result	Explanation
setC_MW0345	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein C
set6-COL-SACOL468	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 6 /SSL1, allele from COL / SCOL468
set6-Mu50-SAV0422	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 6 /SSL1, allele from Mu50 / SAV0422
set6-MW2-MW0382	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 6 /SSL1, allele from MW2 / MW0382
set6-SAR0422-MRSA252	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 6 /SSL1, allele from SAR0422-MRSA252
set6_All_Others	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 6 /SSL1, any other allele
set6_RF122	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 6 /SSL1 - RF122
set7	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 7 /SSL2
set8/ssl3	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 8 /SSL3
set8/ssl3- SAR0424	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 8 /SSL3, allele from MRSA252-SAR0424
set9/ssl4	<b>ambiguous</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 9 /SSL4

set9/ssl4 - MRSA252-SAR0425	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 9 /SSL4, allele from MRSA252-SAR0425
set3/ssl5	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 3 /SSL5
set3/ssl5 - RF122	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 3 /SSL5, allele from RF122
set3/ssl5 - MRSA252	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 3 /SSL5, allele from MRSA252
set21/ssl6	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 21 /SSL6
set21/ssl6-NCTC / MW2	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 21 /SSL6, allele from NCTC8325 / MW2
set1/ssl7	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 1 /SSL7
set1/ssl7-MRSA252	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 1 /SSL7, allele from MRSA252
set1/ssl7-AF188836	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 1 /SSL7, allele from AF188836
set12/ssl8	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 12 /SSL8
set5/ssl9	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 5 /SSL9
set5/ssl9-MRSA252	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 5 /SSL9, allele from MRSA252
set4/ssl10	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 4 /SSL10
set4/ssl10-RF122	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 4 /SSL10, allele from RF122
set4/ssl10-MRSA252	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 4 /SSL10, allele from MRSA252
set2/ssl11-COL	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 2 /SSL11, allele from COL
set2/ssl11-Mu50/N315	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 2 /SSL11, allele from Mu50 / N315
set2/ssl11-MW2/MSSA476	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 2 /SSL11, allele from MW2/MSSA476
set2/ssl11-MRSA252	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 2 /SSL11, allele from MRSA252
setB3	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein B3
setB3-MRSA252	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein B3, allele from MRSA252
setB2	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein B2
setB2-MRSA252	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein B2, allele from MRSA252
setB1	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein B1

## ST398f :

### Genetic markers for *S. aureus* / MRSA / PVL

Taxonomy	Species	Marker	( <i>S.aureus</i> )	<b>positive</b>
MRSA (mecA)		<b>positive</b>		
PVL		negative		

### Species Markers / Regulatory Genes

Gene/Probe	Result	Explanation
------------	--------	-------------

23S-rRNA	<b>positive</b>	23S-rRNA Gene
gapA	<b>positive</b>	Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase
katA	<b>positive</b>	Catalase
coA	<b>positive</b>	Coagulase
Protein A	<b>positive</b>	Staphylococcus Protein A
sbi	<b>positive</b>	IgG-binding protein
nuc	<b>positive</b>	Thermostable Nuclease (DNase)
fnbA	<b>positive</b>	Fibronectin-binding Protein A
vraS	<b>positive</b>	vraS Sensor Protein
sarA	<b>positive</b>	Staphylococcal Accessory Regulator A
eno	<b>positive</b>	Enolase, Phosphopyruvate Hydratase
saeS	<b>positive</b>	Histidine Protein Kinase (sae Locus)

## Resistance Genotype

Gene/Probe	Result	Explanation
mecA	<b>positive</b>	Methicillin, Oxacillin and all Beta-Lactams, defining MRSA
blaZ	<b>positive</b>	Beta-Laktamase
blaI	<b>positive</b>	Beta Lactamase Repressor (Regulatory Protein)
blaR	<b>positive</b>	Beta Lactamase Regulatory Protein
ermA	<b>positive</b>	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin
ermB	<b>positive</b>	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin
ermC	negative	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin
linA	negative	Lincosamides
msrA	negative	Macrolide
mefA	negative	Macrolide
mpbBM	negative	Macrolide
vatA	negative	Streptogramine
vatB	negative	Streptogramine
vga	negative	Streptogramine
vgaA	negative	Streptogramine
vgb	negative	Streptogramine
aacA-aphD	negative	Aminoglycoside (Gentamicin, Tobramycin)
aadD	<b>positive</b>	Aminoglycoside (Tobramycin, Neomycin)
aphA	negative	Aminoglycoside (Kanamycin, Neomycin)
sat	negative	Streptothricin
dfrA	negative	Trimethoprim
far	negative	Fusidic acid
Q6GD50	negative	Putative Fusidic Acid Resistance Protein
mupR	negative	Mupirocin
tetK	<b>positive</b>	Tetracycline
tetM	<b>positive</b>	Tetracycline
tetEfflux	<b>positive</b>	Tetracyclin Efflux Protein (Putative Transport Protein)
cat	negative	Chloramphenicol
fexA	negative	Chloramphenicol
cfr	negative	Phenicols, Lincosamides, Oxazolidinones (Linezolid), Pleuromutilins, Streptogramin A
fosB	negative	Putative Marker For Fosfomicin, Bleomycin
vanA	negative	Vancomycin
vanB	negative	Vancomycin
vanZ	negative	Vancomycin

mercury resistance locus	negative	Mercury resistance operon
qacA	negative	Unspecific efflux pump
qacC	negative	Unspecific efflux pump

## Virulence Genotype

Gene/Probe	Result	Explanation
tst-1	negative	Toxic Shock Syndrome Toxin
tst-RF122	negative	Toxic Shock Syndrome Toxin, allele from bovine strains
entA	negative	Enterotoxin A
entA-320E	negative	Enterotoxin A, allele from 320E
entA-N315	negative	Enterotoxin A, allele from N315
entB	negative	Enterotoxin B
entC	negative	Enterotoxin C
entCM14	negative	Enterotoxin -like Protein (ORF CM14 of U10927.2)
entD	negative	Enterotoxin D
entE	negative	Enterotoxin E
entG	negative	Enterotoxin G
entH	negative	Enterotoxin H
entI	negative	Enterotoxin I
entJ	negative	Enterotoxin J
entK	negative	Enterotoxin K
entL	negative	Enterotoxin L
entM	negative	Enterotoxin M
entN	negative	Enterotoxin N
entN_1	negative	Enterotoxin N - other than RF122
entO	negative	Enterotoxin O
entQ	negative	Enterotoxin Q
entR	negative	Enterotoxin R
entU	negative	Enterotoxin U
egc-cluster	negative	Enterotoxins seg/sei/sem/sen/seo/seu
PVL	negative	Pantone-Valentine Leukocidin
lukM/lukF-P83	negative	Bovine Leukocidin
lukF	<b>positive</b>	Haemolysin Gamma, Component B
lukS	<b>positive</b>	Haemolysin Gamma, Component C
lukS-ST22+ST45	<b>positive</b>	Haemolysin Gamma, Component C, allele from ST22 and ST45
hlgA	<b>positive</b>	Haemolysin Gamma, Component A
lukD	negative	Leukocidin D Component
lukE	negative	Leukocidin E Component
lukX	<b>positive</b>	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein
lukY-var1	<b>positive</b>	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein
lukY-var2	negative	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein, allele from MRSA252
hl	<b>positive</b>	Hypothetical Protein similar to Haemolysin
hla	<b>positive</b>	Haemolysin Alpha (Alpha Toxin)
hld	<b>positive</b>	Haemolysin Delta (Amphiphilic Membrane Toxin)
hIII	<b>positive</b>	Putative Haemolysin III
hl_III_Other than RF122	<b>positive</b>	Putative Haemolysin III (other than RF122)
hlb	negative	Haemolysine Beta (Phospholipase C)
un-truncated hlb	<b>positive</b>	Haemolysine Beta (Phospholipase C / un-truncated)
sak	negative	Staphylokinase
chp(CHIPS)	negative	Chemotaxis Inhibitory Protein (CHIPS)
scn	negative	Staphylococcal Complement Inhibitor (SCIN)

etA	negative	Exfoliative Toxin A
etB	negative	Exfoliative Toxin B
etD	negative	Exfoliative Toxin D
edinA	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor A
edinB	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor B
edinC	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor C
aur	<b>positive</b>	Aureolysin
aur - OtherThan252	negative	Aureolysin, allele from other than MRSA252
aur-MRSA252	<b>positive</b>	Aureolysin, allele from MRSA252
splA	negative	Serine Protease A
splB	negative	Serine Protease B
splE	negative	Serine Protease E
sspA	<b>positive</b>	Glutamyl Endopeptidase / V8-Protease
sspB	<b>positive</b>	Staphopain B
sspP	<b>positive</b>	Staphopain A (Staphylopain A)
ACME-locus	negative	Arginine catabolic mobile element
arcA-SCC	negative	arginine deiminase
arcB-SCC	negative	ornithine transcarbamoylase
arcC-SCC	negative	carbamate kinase, locus 2
arcD-SCC	negative	arginine/ornithine antiporter

### agr-Typing

Gene/Probe	Result	Explanation
agrI	<b>positive</b>	Accessory Gene Regulator - Type 1
agrII	negative	Accessory Gene Regulator - Type 2
agrIII	negative	Accessory Gene Regulator - Type 3
agrIV	negative	Accessory Gene Regulator - Type 4

### SCCmec-Typing

Gene/Probe	Result	Explanation
mecA	<b>positive</b>	Methicillin, Oxacillin and all Beta-Lactams, defining MRSA
mecR	negative	Signal Transducer Protein MecR1
mecR_truncated	negative	Signal Transducer Protein MecR1 - truncated
mecI	negative	Methicillin-Resistance Regulatory Protein
ugpQ	<b>positive</b>	Glycerophosphoryl-diester-Phosphodiesterase (next to mecA)
ccrA-1	negative	Cassette Chromosome Recombinase A, type 1
ccrA-2	negative	Cassette Chromosome Recombinase A, type 2
ccrA-3	negative	Cassette Chromosome Recombinase A, type 3
ccrAA-MRSAZH47	<b>positive</b>	Cassette Chromosome Recombinase A, type ZH47
ccrA-4	negative	Cassette Chromosome Recombinase A, type 4
ccrB-1	negative	Cassette Chromosome Recombinase B, type 1
ccrB-2	negative	Cassette Chromosome Recombinase B, type 2
ccrB-3	negative	Cassette Chromosome Recombinase B, type 3
ccrB-4	negative	Cassette Chromosome Recombinase B, type 4
ccrC	<b>positive</b>	Cassette Chromosome Recombinase C
merA	negative	Mercuric Reductase (SCCmec type III)
merB	negative	Alkylmercury Lyase (SCCmec type III)

kdpA-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase A chain
kdpB-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase B chain
kdpC-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase C chain
kdpD-SCC	negative	Sensor Histidine Kinase (Sensor Protein located in kdp operon)
kdpE-SCC	negative	KDP Operon Transcriptional Regulatory Protein (DNA-binding Response Regulator)
plsSCC-COL	negative	plasmin-sensitive surface protein
Q9XB68-dcs	negative	Hypothetical Protein Historical Name: CN050 Synonyms: dcs
xylR	negative	Pseudogene of Xylose Repressor

## Capsule / Biofilm

Gene/Probe	Result	Explanation
capsule-1	negative	Capsule Type 1
capsule-5	<b>positive</b>	Capsule Type 5
capsule-8	negative	Capsule Type 8
capH1	negative	Capsular Polysaccharide Synthesis Enzyme CapH Capsule type 1
capJ1	negative	O-Antigen Polymerase CapJ Capsule Type 1
capK1	negative	Capsular Polysaccharide Biosynthesis Protein CapK Capsule Type 1
capH5	<b>positive</b>	Capsular Polysaccharide Synthesis Enzyme CapH Capsule type 5
capJ5	<b>positive</b>	O-Antigen Polymerase CapJ Capsule Type 5
capK5	<b>positive</b>	Capsular Polysaccharide Biosynthesis Protein CapK Capsule Type 5
capH8	negative	Capsular Polysaccharide Synthesis Enzyme CapH Capsule type 8
capI8	negative	Capsular Polysaccharide Synthesis Enzyme CapI Capsule type 8
capJ8	negative	O-Antigen Polymerase CapJ Capsule Type 8
capK8	negative	Capsular Polysaccharide Biosynthesis Protein CapK Capsule Type 8
icaA	<b>positive</b>	Intercellular Adhesion Protein A (N-glycosyltransferase)
icaC	<b>positive</b>	Intercellular Adhesion Protein C
icaD	<b>positive</b>	Biofilm PIA Synthesis Protein D
bap	negative	Surface Protein Involved In Biofilm Formation

## MSCRAMMs / Adhaesion Factors

Gene/Probe	Result	Explanation
bbp-all	<b>positive</b>	Bone Sialoprotein-Binding Protein
bbp-COL+MW2	negative	Bone Sialoprotein-Binding Protein, allele from COL and MW2
bbp-MRSA252	negative	Bone Sialoprotein-Binding Protein, allele from MRSA252
bbp-Mu50	negative	Bone Sialoprotein-Binding Protein, allele from Mu50
bbp-RF122	negative	Bone Sialoprotein-Binding Protein, allele from RF122
bbp-ST45	<b>positive</b>	Bone Sialoprotein-Binding Protein, allele from ST45
clfA-all	<b>positive</b>	Clumping Factor A
clfA-COL+RF122	<b>positive</b>	Clumping Factor A, allele from RF122
clfA-MRSA252	<b>positive</b>	Clumping Factor A, allele from MRSA252
clfA-Mu50/MW2	<b>positive</b>	Clumping Factor A, allele from MU50 / MW2
clfB-all	<b>positive</b>	Clumping Factor B
clfB-COL+Mu50	negative	Clumping Factor B, allele from COL / MU 50
clfB-MW2	<b>positive</b>	Clumping Factor B, allele from MW2
clfB-RF122	<b>positive</b>	Clumping Factor B, allele from RF122
cna	<b>positive</b>	Collagen-Binding Adhesin
ebh-all	<b>positive</b>	Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein



eno	<b>positive</b>	Enolase, Phosphopyruvate Hydratase
fib	negative	Fibrinogen Binding Protein
fib-MRSA252	<b>positive</b>	Fibrinogen Binding Protein, allele from MRSA252
ebpS	<b>positive</b>	Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein
ebpS-01-1111	<b>positive</b>	Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein, allele from ST45
ebpS-COL	<b>positive</b>	Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein, allele from COL
fnbA-all	<b>positive</b>	Fibronectin-Binding Protein A
fnbA-COL	negative	Fibronectin-Binding Protein A, allele from COL
fnbA-MRSA252	negative	Fibronectin-Binding Protein A, allele from MRSA252
fnbA-Mu50+MW2	negative	Fibronectin-Binding Protein A, allele from MU50 / MW2
fnbA-RF122	negative	Fibronectin-Binding Protein A, allele from RF122
fnbB-COL	negative	Fibronectin-Binding Protein B
fnbB-COL+Mu50+MW2	<b>positive</b>	Fibronectin-Binding Protein B, allele from COL / MU50 / MW2
fnbB-Mu50	negative	Fibronectin-Binding Protein B, allele from MU50
fnbB-MW2	negative	Fibronectin-Binding Protein B, allele from MW2
fnbB-ST15	negative	Fibronectin-Binding Protein B, allele from ST15
fnbB-ST45-2	negative	Fibronectin-Binding Protein B, allele from ST45
map	<b>positive</b>	Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein
map-RF122	<b>positive</b>	Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein, allele from RF122
map-MRSA252	<b>positive</b>	Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein, allele from MRSA252
map-Mu50+MW2	negative	Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein, allele from MU50 / MW2
sdrC-all	<b>positive</b>	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C
sdrC-B1	negative	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C, allele from B1
sdrC-COL	negative	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C, allele from COL
sdrC-Mu50	<b>positive</b>	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C, allele from MU50
sdrC-MW2+MRSA252+RF122	<b>positive</b>	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C, allele from MW2 / MRSA252 / RF122
sdrC-OtherThan252+122	negative	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C, allele from other than MRSA252 / RF122
sdrD-COL+MW2	negative	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D
sdrD-Mu50	negative	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D, allele from MU50
sdrD-other	negative	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D, allele from Other
sdrD-OtherThan252+122	<b>positive</b>	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D, allele from Other Than MRSA252 / RF122
vwf-all	<b>positive</b>	Willebrand Factor - Binding Protein
vwf-COL+MW2	negative	Willebrand Factor - Binding Protein, allele from COL / MW2
vwf-MRSA252	negative	Willebrand Factor - Binding Protein, allele from MRSA252
vwf-Mu50	negative	Willebrand Factor - Binding Protein, allele from MU50
vwf-RF122	negative	Willebrand Factor - Binding Protein, allele from RF122



sasG	negative	S. aureus Surface Protein G
sasG-COL+Mu50	negative	S. aureus Surface Protein G, allele from COL / MU50
sasG-MW2	negative	S. aureus Surface Protein G, allele from MW2
sasG-OtherThan252+122	negative	S. aureus Surface Protein G, allele from other than MRSA252 and RF122

### Immunevasion & Misc.

Gene/Probe	Result	Explanation
isaB	<b>positive</b>	Immunodominant Antigen B
isaB_MRSA252	<b>positive</b>	Immunodominant Antigen B, allele from MRSA252
mprF	negative	Probable Lysylphosphatidylglycerol Synthetase (Defensin Resistance)
mprF_COL+MW2	negative	Lysylphosphatidylglycerol Synthetase (Defensin Resistance), allele from COL/MW2
mprF_Mu50+252	negative	Lysylphosphatidylglycerol Synthetase (Defensin Resistance), allele from MU50/MRSA252
isdA	<b>positive</b>	Heme/Transferrin-Binding Protein
isdA-MRSA252	<b>positive</b>	Heme/Transferrin-Binding Protein, allele from MRSA252
isdA-OtherThan252	<b>positive</b>	Heme/Transferrin-Binding Protein, allele from Other-ThanMRSA252
lmrP	<b>positive</b>	Putative Transporter Protein
lmrP-RF122	negative	Putative Transporter Protein, allele from RF122
Q2YUB3	<b>ambiguous</b>	Multidrug Resistance Protein
hsdS1-RF122	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 1, allele from RF122
hsdS2-ST5+ST8	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 2, allele from ST5 / ST8
hsdS2-MW2+476	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 2, allele from MW2 / 476
hsdS2-RF122	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 2, allele from FR122
hsdS2-MRSA252	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 2, allele from MRSA252
hsdS3-AllOtherThanRF122+252	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 3, allele from any other than MRSA252 / RF122
hsdS3-ST8+ST1+RF122	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 3, allele from ST8 / ST1 / RF122
hsdS3-Mu50+N315	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 3, allele from Mu50 / N315
hsdS3-CC51+MRSA252	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 3, allele from CC51 / MRSA252
hsdS3-MRSA252	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type 3, allele from MRSA252
hsdSx-CC25	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type X, allele from CC25
hsdSx-CC15	<b>positive</b>	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type X, allele from CC15
hsdSx-etd	negative	Site-specific Deoxyribonuclease Subunit Type X, allele from etD

Q2FXC0		negative	Q2FXC0
Q7A4X2		negative	Hypothetical Protein Next To entG
hysA1-MRSA252		negative	Hyaluronate Lyase A1_MRSA252
hysA1-MRSA252+RF122	and	<b>positive</b>	Hyaluronate Lyase A1, alleles from MRSA252/RF122 and
hysA2-all			Hyaluronate Lyase A2, all alleles
hysA1-MRSA252+RF122	and	<b>positive</b>	Hyaluronate Lyase A1, alleles from MRSA252/RF122 and
hysA2-COL+USA300			Hyaluronate Lyase A2, all alleles
hysA2-AllOtherThan252		negative	Hyaluronate Lyase A2, any other allele than MRSA252
hysA2-COL+USA300+NCTC		<b>positive</b>	Hyaluronate Lyase A2_COL/USA300/NCTC8325
hysA2-AllOtherThan COL+USA300+NCTC		negative	Hyaluronate Lyase A2, any other allele than COL/USA300/NCTC8325
hysA2-MRSA252		negative	Hyaluronate Lyase A2_MRSA252

### set / ssl Genes

Probe	Result	Explanation
setC_MW0345	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein C
set6-COL-SACOL468	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 6 /SSL1, allele from COL / SCOL468
set6-Mu50-SAV0422	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 6 /SSL1, allele from Mu50 /SAV0422
set6-MW2-MW0382	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 6 /SSL1, allele from MW2 /MW0382
set6-SAR0422-MRSA252	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 6 /SSL1, allele from SAR0422-MRSA252
set6_All_Others	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 6 /SSL1, any other allele
set6_RF122	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 6 /SSL1 - RF122
set7	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 7 /SSL2
set8/ssl3	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 8 /SSL3
set8/ssl3- MRSA252- SAR0424	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 8 /SSL3, allele from MRSA252-SAR0424
set9/ssl4	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 9 /SSL4
set9/ssl4 - MRSA252- SAR0425	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 9 /SSL4, allele from MRSA252-SAR0425
set3/ssl5	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 3 /SSL5
set3/ssl5 - RF122	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 3 /SSL5, allele from RF122
set3/ssl5 - MRSA252	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 3 /SSL5, allele from MRSA252
set21/ssl6	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 21 /SSL6
set21/ssl6-NCTC / MW2	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 21 /SSL6, allele from NCTC8325 / MW2
set1/ssl7	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 1 /SSL7
set1/ssl7-MRSA252	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 1 /SSL7, allele from MRSA252
set1/ssl7-AF188836	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 1 /SSL7, allele from AF188836
set12/ssl8	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 12 /SSL8
set5/ssl9	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 5 /SSL9
set5/ssl9-MRSA252	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 5 /SSL9, allele from MRSA252
set4/ssl10	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 4 /SSL10
set4/ssl10-RF122	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 4 /SSL10, allele from RF122
set4/ssl10-MRSA252	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 4 /SSL10, allele from

		MRSA252
set2/ssl11-COL	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 2 /SSL11, allele from COL
set2/ssl11-Mu50/N315	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 2 /SSL11, allele from Mu50 / N315
set2/ssl11-MW2/MSSA476	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 2 /SSL11, allele from MW2/MSSA476
set2/ssl11-MRSA252	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein 2 /SSL11, allele from MRSA252
setB3	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein B3
setB3-MRSA252	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein B3, allele from MRSA252
setB2	negative	Staphylococcal Superantigen-Like Protein B2
setB2-MRSA252	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein B2, allele from MRSA252
setB1	<b>positive</b>	Staphylococcal Superantigen-Like Protein B1

## Veröffentlichungen

Auszüge dieser Arbeit waren Bestandteil folgender Publikationen und Kongressbeiträge.

### Originalarbeiten:

*„Phenotyping of Staphylococcus aureus reveals a new virulent ST398 lineage“*

Thomas Schmidt, Josef Zündorf, Thomas Grüger, Kerstin Brandenburg, Ana-Lena Reiners, Jörg Zinserling, Wolfgang Witte und Norbert Schnitzler (2012)  
Clinical Microbiology and Infection  
DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03775.x

*“CD66b overexpression and homotypic aggregation of peripheral blood neutrophils after activation by a gram-positive Stimulus”*

Thomas Schmidt, Josef Zündorf, Thomas Grüger, Kerstin Brandenburg, Ana-Lena Reiners, Jörg Zinserling und Norbert Schnitzler (2012)  
Journal of Leukocyte Biology  
DOI: 10.1189/jlb.0911483

### Kongressbeiträge (Vorträge und Posterpräsentationen):

*“A newly modified Agarose-cell-migration-assay leads to polymorphonuclear leukocyte migration efficiency of 100%“*

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, DGHM, Göttingen 20.-23. September 2009, Abstract veröffentlicht in International Journal of Medical Microbiology, Vol.: 299S1, S. 33

*“Overexpression of CD66b on human polymorphonuclear leukocytes after stimulation with S. aureus supernatant”*

40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, DGFI, Leipzig, 22.- 25. September 2010, Abstracts veröffentlicht auf CD

*“The Staphylococcus aureus-induced and serum mediated chemotactic activity of polymorphonuclear leukocytes is not affected by the phenotypic diversity of the bacterial isolates.”*

34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Bonn, 30. März-04. April 2011; Abstract veröffentlicht in Abstractband S. 191

*“Overexpression of CD66b on human polymorphonuclear leukocytes after stimulation with Staphylococcus aureus supernatant.”*

1st European Conference of Microbiology and Immunology, Budapest, 12.-14. Mai 2011, Abstract veröffentlicht in Abstractbook S. 105-106

# Danksagung

# Lebenslauf

---

---

---

---

---

