

Aus dem: Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische  
Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

# **Elimination und Überleben von *Staphylococcus aureus* in menschlichen Endothelzellen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Raphael Kland  
aus  
München

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Aepfelbacher

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Matthias Griese

Prof. Dr. Helmuth Forst

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Andreas Schröder

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen

Prüfung: 05.06.2008

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel erarbeitet.

München, den

gez. Raphael Kland

Die Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden von Juli 2003 bis Oktober 2007 am Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. M. Aepfelbacher ausgeübt.

Die Arbeit wurde betreut und von der medizinischen Fakultät vertreten durch Prof. Dr. med. Reinhardt.

Die Arbeit wurde teilweise durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Schröder, A; Kland, R; Peschel, A; von Eiff, C; Aepfelbacher, M  
„Live cell imaging of phagosome maturation in *Staphylococcus aureus* infected human endothelial cells: small colony variants are able to survive in lysosomes.”  
*Med Microbiol Immunol* (2006)

Autoren: Dr. Andreas Schröder, Raphael Kland als geteilte Erstautorenschaft

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b><u>1. ABKÜRZUNGEN UND BEGRIFFE</u></b> .....	5
<b><u>2. STAND DER FORSCHUNG</u></b> .....	6
2.1 <i>S. aureus</i> als Infektionserreger .....	6
2.2 Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i> .....	6
2.3. SCV von <i>S. aureus</i> : „ <i>Small Colony Variants</i> “ .....	8
2.4 Endothelzellen .....	12
2.4.1 Aktin Zytoskelett .....	12
2.4.2 Endozytose / Phagozytose .....	13
2.4.3 Reifung des Phagosoms .....	15
<b><u>3. ZIELE UND FRAGESTELLUNGEN</u></b> .....	17
<b><u>4. MATERIAL UND METHODEN</u></b> .....	18
4.1 Verwendete Laborgeräte .....	18
4.2 Verwendete Materialien: .....	19
4.2.1. Bakterienstämme: .....	19
4.2.2 Enzyme .....	20
4.2.3 Kulturmedien für Zellen und Bakterien .....	20
4.2.4 Antikörper .....	22
4.2.5 Farbstoffe .....	24
4.3 Methoden .....	25
4.3.1 Isolierung humaner Nabelschnurvenen-Endothelzellen .....	25
4.3.2 Kultivierung der Zellen und deren Handhabung .....	26
4.3.3 Transfektion .....	28
4.3.4 Anzucht von <i>S. aureus</i> -Stämmen .....	29
4.3.5 Zelluläres Infektionsmodell .....	32
4.3.6 Fluoreszenzfärbungen .....	33
4.3.7 Videomikroskopie .....	37
<b><u>5. RESULTATE</u></b> .....	38
5.1 Auswahl des geeigneten Stammes und Festlegung der Inkubationszeiten .....	38
5.2 Wiederauffinden von verschiedenen SCV nach deren Aufnahme in primäre menschliche Endothelzellen .....	41
5.3. Abtötung der Bakterien durch die Endothelzellen während der Früh- und Spätphase der Infektion .....	45
5.4 Adaptation des SCV-Stammes JB1 an intrazelluläres Überleben .....	47
5.5 Ein an Endothelzellen angepasster SCV – Stamm mit erhöhter Rückgewinnungsrate wird in Lysosomen nachgewiesen .....	51
5.6 Die Reifung des Lysosoms in Endothelzellen geschieht durch Interaktion mit Rab5- und Rab7 positiven Endosomen .....	57
<b><u>6. DISKUSSION</u></b> .....	62
<b><u>7. ZUSAMMENFASSUNG</u></b> .....	66
<b><u>8. LITERATURVERZEICHNIS</u></b> .....	67
<b><u>9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u></b> .....	71
<b><u>10. WIDMUNG UND DANKSAGUNG</u></b> .....	72
<b><u>11. LEBENS LAUF</u></b> .....	73

## 1. ABKÜRZUNGEN UND BEGRIFFE

<b>BHI</b>	„brain heart infusion“ (Nährlösung)
<b>BSA</b>	„bovine serum albumine“
<b>CD</b>	„cluster of differentiation“
<b>CFU</b>	„colony forming units“
<b>ECBM</b>	„endothelial cell basal medium“
<b>ECGM</b>	„endothelial cell growth medium“
<b>FCS</b>	„fetal calf serum“
<b>FNBP</b>	„fibronectin binding proteine“
<b>GFP</b>	„green fluorescent proteine“ (grün fluoreszierendes Protein)
<b>HBMEC</b>	„human brain microvascular endothelial cell“
<b>HDMEC</b>	„human dermal microvascular endothelial cells“
<b>HPAEC</b>	„human pulmonary artery endothelial cells“
<b>HUAEC</b>	„human umbilical artery endothelial cells“
<b>HUVEC</b>	„human umbilical vein endothelial cell“
<b>KBE</b>	Koloniebildende Einheiten
<b>LAMP</b>	„lysosomal-associated membrane proteins“
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>MIC</b>	„minimal inhibiting concentration“
<b>MOI</b>	„multiplicity of infection“
<b>NCTC</b>	„national collection of type cultures“
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>PBS</b>	„phosphate buffered saline“
<b>rH</b>	„relative humidity“ (relative Luftfeuchtigkeit)
<b>Rpm</b>	„rounds per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
<b>SCV</b>	„small colony variant“ → bradytrophe Klone von <i>S. aureus</i>
<b>SNARE</b>	„soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptor“
<b>TSB</b>	„tryptic soy broth“ (Nährlösung)
<b>YFP</b>	„yellow fluorescent proteine“ (gelb fluoreszierendes Protein)

## **2. STAND DER FORSCHUNG**

### **2.1 S. aureus als Infektionserreger**

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ist eine weit verbreitete Ursache ambulant erworbener und nosokomialer Infektionen (Lowy, 1998). Pyogene oberflächliche oder tief invasive Prozesse durch *S. aureus* sind oft gefolgt vom Eindringen der Bakterien in das Blutgefäßsystem, was zu Osteomyelitiden, Pneumonien, Hirn- und Hautabszessen, Endokarditiden, fremdkörper-assoziierten Infektionen, Bakteriämie und Sepsis führen kann. Eine schwerwiegende klinische Komplikation einer Bakteriämie mit *S. aureus* ist die Metastasierung von zirkulierenden Bakterien in distale Körperteile und Organe (Petti et al., 2003). Vor allem Patienten mit Kathetern oder unter Immunsuppression sind durch *S. aureus* hoch gefährdet. Dabei wurde *S. aureus* bisher meist als ein extrazellulär agierendes Pathogen charakterisiert, welches im Wirt proliferiert und ein hohes pathogenes Potential besitzt (von Eiff et al., 2004).

### **2.2 Virulenzfaktoren von S. aureus**

Als Virulenzfaktoren kann *S. aureus* sowohl eine Kapsel aus Polymeren der Glukosaminouronsäure oder der Mannosaminouronsäure wie auch sekretorische Enzyme und Toxine produzieren. Die Fähigkeit, Biofilme zu bilden und sich damit vor allem bei fremdkörperassoziierten Infektionen durch eine extrazelluläre Biomatrix abzukapseln, bietet bei der Therapie mit Antibiotika in der Praxis Probleme, da die Bakterien innerhalb des Biofilms eine 1.000 bis 1.500-fache Resistenz im Vergleich zu nicht biofilmassoziierten Bakterien zeigen können (Wu et al., 2003). Zur Anheftung an künstliche Materialien und Zelloberflächen produziert *S. aureus* einen Fibrinogenrezeptor, welcher als „Clumping factor“ bezeichnet wird. Häufig exprimieren die *S. aureus* – Stämme auch das so genannte Protein-A an der Oberfläche, welches an den Fc-Teil von Immunglobulinen bindet und somit die Opsonierung durch das Immunsystem verhindern kann. Dieses Molekül ist für den Mikrobiologen außerdem häufig von Interesse, da viele Immunfluoreszenzfärbungen von *S. aureus* über die Bindung von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern an Protein A vermittelt werden. Zu den sezernierten und virulenzassoziierten Enzymen zählt vor allem die freie Koagulase, welche sich an Prothrombin anheftet und proteolytisch Thrombin abspaltet. Sie stellt das diagnostische Hauptmerkmal für die Speziesbestimmung von *S. aureus* dar. Durch dieses Enzym ist es dem Erreger

möglich, sich im Gewebe abzukapseln. Die weiteren Enzyme wie Staphylokinase, welche durch die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin eine gebildete Abszesskapsel wieder auflösen kann, die Hyaluronidase, ein dem „spreading factor“ der A-Streptokokken verwandtes Molekül, thermostabile DNA-ase und diverse Lipasen befähigen den Erreger, sich weiter im Gewebe auszubreiten. Weiterhin sind mindestens vier membranschädigende Hämolytine bekannt, welche einzeln oder gemeinsam von den *S. aureus* – Klonen gebildet werden können. Man unterscheidet nach der griechischen Nomenklatur ein  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Toxin, welches jedes für sich genommen vor allem Erythrozyten zerstört, aber durch Porenbildung auch andere Gewebezellen in Mitleidenschaft ziehen kann. Besonders hervorzuheben ist das  $\alpha$ -Toxin, welches sich vor allem auf Phagozyten auszuwirken scheint. Ähnlich verhält sich das ebenfalls sekretorisch gebildete Leukozidin vorzugsweise gegenüber Granulozyten und Makrophagen.

Des Weiteren kann *S. aureus* wichtige hitzestabile Enterotoxine produzieren. Diese meist 30-kDa großen Proteine sind durch Erhitzen auf über 100°C über 30 Minuten und durch körpereigenes Trypsin nur unzureichend inaktivierbar. Es existieren elf immunologische Varianten, welche als „staphylococcal enterotoxin“ bezeichnet und folgendermaßen eingeteilt werden: SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, SEF, SEG, SEH und SEJ. Unter diesen besitzt das SEA die größte klinische Relevanz. Diese Enterotoxine wirken als Superantigene und sind häufig der Grund von staphylokokkenbedingter Nahrungsmittelvergiftung mit profusen Durchfällen und heftigem Erbrechen. Dabei ist letztlich noch nicht geklärt, ob diese Wirkung durch direkte Affektion des Magen-Darm-Traktes oder durch eine Superantigen-vermittelte, lokale Freisetzung von IL-2 und TNF- $\alpha$  über eine Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen zustande kommt. Eine weitere CD<sub>4</sub><sup>+</sup>-T-Zellaktivierung erfolgt durch ein weiteres Superantigen, das Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1 (TSST-1). Dieses Toxin wird bevorzugt im aeroben Milieu und bei Mg<sup>2+</sup>-Mangel produziert und triggert eine massive, unkontrollierte und vor allem systemische Freisetzung von IL-2 und TNF- $\alpha$ . Daraus resultiert das „*Toxic-Shock-Syndrom*“ mit akutem Kreislaufversagen und hoher Letalität. Das „*Staphylococcal-Scalded-Skin-Syndrom*“ (SSSS), eine generalisierte lebensbedrohliche Erkrankung, welche mit bullösen Hautveränderungen am gesamten Integument einhergeht, wird durch die Exfoliativ-Toxine A und B hervorgerufen. Diese Exfoliativ-Toxine sind Serinproteasen, welche an Zytoskelettproteine (Filaggrine) und Desmosomen der Epidermis zwischen

Stratum corneum und Stratum granulosum binden und diese zerstören. Es bilden sich intraepidermale, konfluierende Blasen und ziehen eine Ablösung der gesamten oberen Epidermisschicht nach sich (von Eiff et al., 2004). Eine Vielzahl von experimentellen Studien haben die Folgen der Interaktion zwischen dem Gefäßendothel und *S. aureus* untersucht, wie zum Beispiel die Aufnahme der Bakterien, Veränderung der Bakterien- oder Endothelzellfunktionen oder toxische Schäden durch *S. aureus* an den Endothelzellen. Es ist wurde bereits gezeigt, dass der Keim von Endothelzellen aufgenommen werden kann, woraus im Blutkreislauf eine Steigerung der gerinnungsfördernden Aktivität und Expression von Adhäsionsmolekülen (CD54/ICAM-1, CD106/VCAM-1 MHC-1) sowie eine Freisetzung von Zytokinen resultiert.

### **2.3. SCV von *S. aureus*: „Small Colony Variants“**

Interessanterweise zeigte sich bereits in anderen Studien, dass eine Subpopulation von *S. aureus*, welche einen reduzierten Stoffwechsel aufweist und kleine Kolonien auf Agarplatten bildet, über 48 h innerhalb von Endothelzellen, Epithelzellen und Keratinozyten überlebt, ohne sichtbaren Zellschaden zu verursachen. Diese Varianten werden „Small colony variants“ (SCV) genannt. Dabei imponieren die Kolonien nach 24 Stunden Bebrütung auf Blutagarplatten zumeist nadelspitz groß. Im Vergleich zu Wildtypstämmen sind die über Nacht gewachsenen Kolonien meist 10fach kleiner und die Generationszeit ist etwa 6mal so lang. Dem gegenüber stehen elektronenmikroskopische Aufnahmen, welche zeigen, dass die einzelne Bakterienzelle eines SCV die bis zu neunfache Größe der regulären Bakteriengröße von etwa 1-1,5 µm erreichen kann. Im Gegensatz zu der goldgelben Farbe der Kolonien des Vaterstammes stellen sich die Kolonien der SCV weiß dar. Die Hämolyse des Vaterstammes ist abhängig von den produzierten Toxinen. Diese Hämolyse ist jedoch bei den SCV allenfalls sehr schwach ausgeprägt und fehlt meist vollkommen. SCV können im klinischen Alltag regelmäßig aus Prozessen von andauernden und wiederkehrenden Infektionen isoliert werden. Es wurden bereits SCV in Reinkultur von Patienten mit den unter 2.1 beschriebenen Erkrankungen gewonnen. Meist waren diese Patienten einer prolongierten Antibiotikatherapie ausgesetzt. Bei Patienten mit Cystischer Fibrose wurde bereits eine Persistenz von 49,5 Monaten beschrieben. Die Persistenz von herkömmlichen *S. aureus* betrug dabei lediglich 25 Monate. Ein Zusammenhang zwischen Überlebensdauer und



Phänotyp liegt daher nahe (Proctor et al., 1995). So konnte bereits gezeigt werden, dass diese SCV über Jahre im menschlichen Organismus überleben können, wobei sie der Immunabwehr äußerst effektiv entgehen können. Bisher wurden solche Keime schon aus Blutkulturen, subkutanen Eiterungen und Knochenabszessen isoliert (Balwit et al., 1994). SCV sind häufig auxotroph für Hemin oder Menadion und zeichnen sich sowohl durch ein verlangsamtes Wachstum als auch eine verminderte Hämolyse, eine mangelnde Pigmentierung der Kolonien und eine generelle Widerstandsfähigkeit gegenüber Aminoglykosidantibiotika aus. Hemin und Menadion sind essentielle Vorläufer von Bestandteilen der Cytochromkomplexe, welche zentrale Komponenten der Elektronen-Transport-Kette darstellen. In der folgenden Zeit konnten SCV-Phänotypen auch in Labors durch Mutationen im *hemB*- oder *menD*-Gen der weit verbreiteten *S. aureus* – Stämme 8325-4 und 6850 künstlich hergestellt werden (von Eiff et al., 1997). Während sich die von Patienten isolierten Wildtyp *S. aureus* Stämme durch eine hohe Produktion von  $\alpha$ -Toxin äußerst zytotoxisch verhalten, zeigte sich, dass schon durch eine Passage im Nährmedium hervorgegangene Mangelmutanten, welche nicht in der Lage waren, Menadion oder Hemin selbst herzustellen, eine verminderte Zytotoxizität aufwiesen (Balwit et al., 1994). Diese Verminderung der toxischen Eigenschaften schien mit der Unfähigkeit zusammenzuhängen, das Haupthämolysin  $\alpha$ -Toxin zu bilden. Da die Menadion- und Heminmangelmutanten eine geringere Produktion von  $\alpha$ -Toxin aufwiesen, was an einer mangelnden bis fehlenden Hämolyse auf Columbia Blutagarplatten zu erkennen war, stand zu vermuten, dass auch die Zytotoxizität dieser Stämme eingeschränkt war. Diese Vermutung konnte von James M. Balwit et al. 1994 bewiesen werden (Balwit et al., 1994). Um das Auftreten von SCV bei eingeschränkter Virulenz erklären zu können, vermutete diese Arbeitsgruppe schon zu dieser Zeit, dass es einen intrazellulären Ort geben müsse, an dem die Bakterien gleichsam wie in einer biologischen Nische geschützt überdauern konnten.

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen zur Phagozytose von *S. aureus* befähigt sind, falls sie nicht durch das Bakterium vorher lysiert werden. Eine Studie, welche sich mit der Infektion von Endothelzellen aus Rinderaorta durch Wildtyp- *S. aureus* beschäftigt, bewies, dass das intrazelluläre Milieu SCVs effektiv selektiert. Diese Befähigung der SCV von *S. aureus* bei verminderter Aggressivität chronisch persistierende, nicht inflammatorisch wirksame Langzeitinfektionen zu verursachen, bleibt unberührt von dem pathogenen Potential. Vielmehr scheinen

diese Bakteriensubtypen in den Zellen zu überleben, wobei sie immer noch das volle genetische Material für die Virulenzfaktoren besitzen, welche für akut aggressive Verläufe verantwortlich sind. Diese Verläufe werden zumeist durch Revertanten hervorgerufen, deren Auftreten bereits im Labor nach mehrerer Subkultur beobachtet werden konnte. Eine weitere Eigenschaft der SCV ist für die Klinik bzw. die Material verarbeitenden Labors der Kliniken wichtig. Häufig werden durch die längere Generationszeit die Kolonien auf Standardagarplatten nicht im standardmäßigen Beobachtungszeitraum von 24 Stunden, sondern häufig erst nach 48-72 Stunden nachgewiesen. Daneben weisen die Kolonien meist eine atypische Morphologie auf. Die für *S. aureus* typischen, biochemischen Reaktionen können verzögert ablaufen oder ganz fehlen.

### **SCV und Antibiotika**

Wie vorher beschrieben, zeichnen sich SCV von *S. aureus* durch eine erhöhte Resistenz gegenüber Aminoglykosidantibiotika und Kombinationen aus Trimethoprim und Sulfamethoxazol (TMP/SMX) aus. Dies liegt vor allem daran, dass zur Aufnahme von Aminoglykosiden ein transmembranöser elektrochemischer Gradient notwendig ist. Da die Hemin- und Menadionmangelmутanten jedoch einen Defekt in der Atmungskette besitzen und auf die in der Umgebung vorkommenden Spuren von Hemin und Menadion angewiesen sind, um ihre Enzyme der Atmungskette zu synthetisieren, ist es den Bakterienzellen nur erschwert möglich, in ausreichendem Maße energiereiche Substrate zu produzieren. Diese Substrate sind aber dazu notwendig, die intra- oder transmembranösen Pumpen zu betreiben, welche für den elektrochemischen Gradienten sorgen. Demzufolge sind diese Stämme vor den Aminoglykosidantibiotika dadurch geschützt, dass es ihnen nur in begrenztem Maße möglich ist, diese chemischen Stoffe aufzunehmen. Auf der anderen Seite kann jedoch dadurch auch keine vollständige Resistenz entstehen, da bei einer zunehmenden extrazellulären Antibiotikakonzentration der aktive Transport gegenüber der reinen Diffusion des gelösten Stoffes in den Hintergrund tritt. Zusätzlich erfolgen bei einer Infektion und gleichzeitiger antibiotischer Behandlung direkt durch die Antibiotika eine Induktion der SCV, deren Selektion und schließlich eine konsekutive Ausbreitung des resistenten Stammes.

### **S. aureus und Apoptose**

Der programmierte Zelltod der Endothelzellen wird hauptsächlich durch das  $\alpha$ -Toxin vermittelt.

Zellen, welche in die Apoptose übergehen, zeigen mehrere charakteristische Vorgänge. Dazu gehören die Bildung von Ausstülpungen an der Membran (so genanntes blebbing), die Kondensation und Fragmentation von Chromatin sowie ein allgemeines Schrumpfen der Zelle (Bantel et al., 2001). Diese Veränderungen sind in erster Linie durch Caspasen induziert, eine Familie von intrazellulären Cystein-Proteasen. Es sind viele Stoffe bekannt, die in der Lage sind, den Mechanismus in Gang zu setzen, der letztendlich zum Zelltod führt. Unter diesen Stoffen finden auch Bakterien als Induktoren ihren Platz. Interessanterweise konnte dargestellt werden, dass in intakten Zellen nicht nur die Bakterien selbst fähig waren, diese Veränderungen hervorzurufen, sondern auch zum Teil die Überstände der Bakterienkulturen. Dies führte zu der Annahme, dass ein Stoff im Überstand vorhanden sein musste, welcher dies bewerkstelligen konnte. Versuche mit verschiedenen Bakterienstämmen und deren Überständen zeigten, dass bei jedem nachgewiesenen zytotoxischen Stamm auch der Überstand den Zelluntergang bedingte. Dies führte zur Entdeckung des  $\alpha$ -Toxins, eines Stoffes, welcher von den Bakterienzellen sekretorisch an das Wachstumsmedium abgegeben wird und einen dramatischen Effekt auf Endothelzellen hat. So konnte bewiesen werden, dass nicht nur die porenbildende Komponente des  $\alpha$ -Toxins für die Apoptose verantwortlich ist, sondern auch eine Aktivierung des zelleigenen Systems zum programmierten Zelltod führt. Dabei ist offenbar die Anbindung des Toxins an CD95 oder andere apoptoseinduzierende Membranrezeptoren nicht zur Auslösung der Apoptosekaskade nötig, sondern es erfolgt eine direkte Modulation des „*intrinsic cell death pathways*“. Um zu verifizieren, dass die beobachteten Effekte wirklich vom  $\alpha$ -Toxin stammten, wurde versucht, diesen Stoff mittels eines Antikörpers abzufangen. In der Folge konnte man beobachten, dass die Schädigung der Zielzellen in Anwesenheit dieses Antikörpers abzunehmen schien. Ebenfalls wurden die Überstände von nachgewiesenen zytotoxischen und nicht-zytotoxischen Bakterienstämme verglichen. Anfangs war nicht geklärt, wie es dem Toxin möglich war, diese Apoptosekaskade in Gang zu setzen; es konnte jedoch bald gezeigt werden, dass daran die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien beteiligt ist. Dies wurde dadurch bewiesen, dass die Induktion der Apoptose durch

---

Bcl-2 verhindert werden konnte. Dieser Stoff verringert die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und blockiert damit das apoptotische Potential des *S. aureus*  $\alpha$ -Toxins. Somit war bewiesen, dass es für zytotoxische Stämme nicht nötig ist, in die Zelle aufgenommen zu werden, um Zellen zu lysieren. Dabei wurde festgestellt, dass das lösliche Toxin sowohl die Initiatorcaspasen 8 und 9, wie auch Caspase 3 induziert (Bantel et al., 2001).

Auf der anderen Seite ist es diesen Stämmen nach ihrer Aufnahme in die Zellen damit auch nicht möglich, lange dort zu persistieren.

## **2.4 Endothelzellen**

Endothelzellen kleiden alle Gefäßinnenwände aus. Neben der mechanischen Barrierefunktion leisten sie als zur Phagozytose fähige Zellen einen entscheidenden Beitrag zur Infektabwehr. Dabei können die Zellen nicht nur passiv von Bakterien befallen werden, sondern verfügen über Mechanismen zur aktiven Aufnahme und Vernichtung der Mikroorganismen. Es wurde bereits gezeigt, dass *S.aureus* bereits innerhalb von 30 Minuten bis eine Stunde in Endothelzellen aufgenommen wird und dort Apoptose induzieren kann (Menzies, Kourteva 1998).

### **2.4.1 Aktin Zytoskelett**

Für die Formstabilität und für verschiedene Transportprozesse innerhalb der eukaryotischen Zelle existiert ein dynamisches, netzartiges Skelett, welches hauptsächlich aus Aktinpolymeren besteht. Dabei zählen das filamentöse F-Aktin (Polymer), welches den Hauptanteil des exprimierten Proteins darstellt, sowie das G-Aktin (Monomer) zu den am häufigsten exprimierten Proteinen des Zytosols. Bisher wurden sechs zelltypische Isoformen unterschieden. So existieren eigene Isoformen in Skelettmuskel-, Herzmuskel- und Nicht-Muskelzellen. Dabei verhält sich dieses Zellskelett nicht nur statisch, sondern ermöglicht durch die verschiedenen Polymerisationszustände auch die Änderung der Zellmorphologie sowie die Kontaktaufnahme zum extrazellulären Raum. Auch an Endozytosevorgängen ist Aktin beteiligt.

Die Energie für die Umformungsarbeit bezieht Aktin direkt aus ATP. Hierbei wird ATP durch Aktin gebunden und beim Zusammenbau zu polaren Filamenten hydrolysiert. Durch die endständige Polymerisation beziehungsweise Depolymerisation ergibt sich

---

eine Doppelstranghelix mit einem Durchmesser von etwa 5-9 Nanometern. (Cooper et al., 2000). Dabei wird das schneller wachsende Ende mit vorwiegender Polymerisation als (+)- oder „*barbed end*“ und das langsamer wachsende Ende mit vorwiegender Depolymerisation als (-)- oder „*pointed end*“ bezeichnet.

Innerhalb der Zelle existieren viele Proteine, welche fähig sind, Aktin zu binden. Über diese Proteine wird je nach Bedarf gesteuert, ob die Polymerisation zu einem Aktin-Netz oder zu parallelen Aktin-Bündeln erfolgt, was dazu führt, dass die Plasmamembran mit bis zu 1µm/s bewegt werden kann (Svitkina et al., 1997). Darüber hinaus können die Vorschubzeiten an bestimmten Bereichen der Plasmamembran unterschiedlich koordiniert werden, so dass sowohl Zellbewegung als auch Vorbereitungen zur Phagozytose möglich werden (Adams, 2001; Pollard et al., 2003; Ridley et al., 2003)

#### **2.4.2 Endozytose / Phagozytose**

Bei der Aufnahme von Stoffen aus dem Extrazellulärraum gelten je nach Stoffgröße und –beschaffenheit verschiedene Gesetze. Die Aufnahme von relativ kleinen Molekülen wie freie Aminosäuren, Zucker oder Ionen erfolgt meist über spezielle unterschiedliche Transmembrankanäle. Der Eintritt von größeren Partikeln, freiem Wasser und Makromolekülen wird hingegen über spezialisierten Vesikeltransport vermittelt. Hierbei handelt es sich um verschieden kodierte Abschnürungen der Zellmembran nach innen. Dieser Vorgang wird als Endozytose bezeichnet. Je nach dem aufgenommenen Stoff erfolgt die Unterklassifikation als Pinozytose bei der Aufnahme von Flüssigkeit oder Phagozytose bei der Aufnahme von Makromolekülen, Zelltrümmern oder Mikroorganismen.

Es bestehen dabei verschiedene Strategien und Mechanismen der Aufnahme, welche vom jeweiligen Stoff und der Größe des Stoffes sowie von eventuell beteiligten Rezeptoren abhängen.

Man unterscheidet hierbei zwischen Makropinozytose, Clathrin- und Caveolin-abhängiger Endozytose, sowie auch Clathrin- und Caveolin-unabhängiger Endozytose (Stan 2006)

Unter Phagozytose versteht man die Aufnahme von Material, welches über 0,5µm im Durchmesser beträgt, in Vesikel. Dies ist ein Vorgang, welcher von Aktin abhängig

und von Clathrin unabhängig ist. Auf diese Art und Weise werden sowohl Nährstoffe, Zelltrümmer oder sogar apoptotische oder gealterte Zellen aufgenommen und schließlich verwertet. Einen besonderen Stellenwert hat die Phagozytose bei immunkompetenten Zellen im Rahmen der spezifischen Immunabwehr. Zu den immunkompetenten und zur Phagozytose fähigen Zellen zählt man in erster Linie das Mononukleäre Phagozytensystem (MPS). Dieses System besteht vor allem aus Granulozyten, dendritischen Zellen sowie Makrophagen und gewebeständigen Monozyten. Aufgrund ihrer hier dominanten Rolle werden diese hochspezialisierten Zellen auch als professionelle Phagozyten bezeichnet. In ihrer Rolle als Immunmodulatoren können sie je nach Rezeptorausstattung Mikroorganismen oder toxische Stoffe erkennen und über die Ausschüttung von Interleukinen und Interferonen inflammatorische Reaktionen initiieren, unterhalten oder dämpfen. Daneben existieren jedoch auch zur Phagozytose fähige Zellen, welche nicht in erster Linie an der Immunabwehr beteiligt sind. Diese bezeichnet man als Nicht-professionelle Phagozyten. Die Erkennung und Aufnahme von Makromolekülen sowie deren intrazelluläre Prozeption unterscheiden sich durch eine Reihe von Faktoren von den Mechanismen der professionellen Phagozyten (Rabinovitch, 1995). Zu diesen Zellen gehören unter anderem Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen.

### **Phagozytose über Aktin-Interaktion**

Die Aufnahme von Stoffen durch Phagozytose wird durch das Aktin-Zytoskelett mitgestaltet. Bindet ein Stoff über spezielle Rezeptoren an die Zellmembran, so kommt es zu einer Aktin-Reorganisation, was zu einer Umfassung des Partikels durch eine mit Aktin angereicherte Ausstülpung führt. Diese bezeichnet man als „*phagocytic*“ oder „*actin-cup*“. Da ist die genaue Funktion bei der Ausbildung dieser Strukturen noch nicht restlos erforscht. Es wird diskutiert, ob die Polymerisation des Aktins an der räumlichen Ausbildung der Strukturen oder sogar an der Abschnürung des frühen Phagosoms beteiligt ist (Qualmann et al., 2000). Es konnte jedoch in erst kürzlich erschienenen Arbeiten mit präziser zeitlicher und räumlicher Auflösung gezeigt werden, dass Aktin bereits depolymerisiert, bevor das frühe Phagosom abgeschnürt wird (Scott et al., 2005).

Die Polymerisation des Aktins an dem entstehenden Phagosom wird durch die GTPasen Rac und CDC42 (Caron et al., 2004) vermittelt und kontrolliert. Hierbei

findet sich Rac am gesamten Phagosom und reichert sich im Verlauf der Reifung weiter an, wohingegen sich CDC42 eher am Kopfende des sich schließenden Vesikels befindet (Hoppe et al., 2004). Dabei wird zwar die Aktinpolymerisation durch die GTPasen gesteuert, scheint aber von deren Inaktivierung unabhängig zu sein, da Aktin bereits depolymerisiert, bevor Rac inaktiviert wird (Scott et al., 2005).

### **2.4.3 Reifung des Phagosoms**

Die GTPase Dynamin vermittelt die Abschnürung des frühen Phagosoms in das Zytosol. Diese lagert sich ringförmig an das sich bildende Vesikel an und drückt dieses dann sowohl mechanisch als auch chemisch in das Zellinnere (Hinshaw, 2000). Entlang des phago-lysosomalen Signalweges erfährt die luminale und membranöse Zusammensetzung eine ständige Modifikation. Gleichzeitig wird das Vesikel von der Zellperipherie in Richtung Zellkern transportiert, wo sich die Phagosomen ringförmig perinukleär anlagern.

Durch Verschmelzung mit Lysosomen entstehen Phago-Lysosomen, welche durch einen niedrigen pH-Wert und eine hohe Konzentration an hydrolytischen Enzymen, Defensinen und bakteriziden Peptiden charakterisiert sind (Hampton et al., 1998; Tapper, 1996; Tjelle et al., 2000).

Das Verschmelzen und der Transport der Vesikel während des Reifungsprozesses werden hauptsächlich durch die kleinen GTPasen der Rab-Familie gesteuert, welche somit Markerproteine für unterschiedliche Reifungsstadien darstellen (Jordens et al., 2005). Daneben erfolgt die Steuerung über SNAREs („*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptor*“). SNAREs werden wegen eines Sequenzunterschiedes innerhalb einer hochkonservierten Region in Q-SNAREs (Q entspricht der Aminosäure Glutamin, auch t-SNAREs genannt) und R-SNAREs (R entspricht der Aminosäure Arginin, auch v-SNAREs genannt) unterteilt (Fasshauer et al., 1998). Diese Rezeptoren sind membrangebunden und können selektiv mit anderen SNAREs an „Zielmembranen“ interagieren und somit einen stabilen Komplex bilden. Dadurch kommt es zu einer allmählichen räumlichen Annäherung und dann zur Fusion der beiden Vesikel.

Die ersten Kontakte des Phagosoms erfolgen mit den frühen Endosomen oder „*sorting endosomes*“, welche einen leicht sauren pH-Wert um die 6,0 haben und durch die Proteine EEA1 („*early endosome antigen 1*“) und Rab5 gekennzeichnet sind. Über die molekulare Zusammensetzung dieser Proteine erfolgt eine Codierung



der intravesikalen Bestandteile (Gorvel et al., 1991; Jordens et al., 2005). Manche Stoffe werden über das perinukleär lokalisierte „*recycling endosome*“ Rab11-abhängig exozytiert oder wie Rezeptoren der Integrin-Familie wieder an die Zellmembran gebracht (Casswell et al., 2006). Moleküle, welche zur Zerstörung determiniert sind, werden über Zwischenformen in die späten Endosomen geleitet. Diese Endosomen haben einen pH um 5,5-6,0, sind mit einem Repertoire an hydrolytischen Enzymen ausgestattet und sind durch die GTPasen Rab7, Rab9 sowie LAMPs („*lysosomal-associated membrane proteins*“) charakterisiert. Die Endstufe des Endozytosepfades stellen die Lysosomen dar. Diese sind vor allem durch Cathepsin D, aber auch durch LAMPs bestimmt. Ihr pH-Wert liegt etwa bei 4,5-5,5 (Vieira et al., 2002).

Es wurden für den Reifungsprozess von den frühen Endosomen bis zu den Lysosomen bislang zwei Mechanismen diskutiert.

Das „*vesicle shuttle*“-Modell postuliert, dass es sich bei frühen Endosomen um stabile Organellen handelt, aus denen sich multivesikuläre Kompartimente entwickeln, welche dann im Anschluss zu den späten Endosomen transportiert werden.

Das Reifungsmodell besagt, dass die frühen Endosomen nur Zwischenstadien darstellen, über Fusions- beziehungsweise Spaltungsereignisse reifen und sich schließlich zu späten Endosomen und Lysosomen entwickeln (Gruenberg, 2001; Thilo et al., 1995).

Bisher konnten jedoch Fusionen nicht deutlich gezeigt werden. Deshalb vermutet man bislang, dass bei dem Reifungsprozess lediglich vorübergehende Fusionen oder Teilfusionen endosomaler und phagosomaler Vesikel stattfinden. Hierbei wird teilweise der Inhalt der Vesikel ausgetauscht. Hier spricht man deshalb vom so genannten „*kiss-and-run*“-Modell (Desjardins et al., 1994; Desjardins, 1995).



### **3. ZIELE UND FRAGESTELLUNGEN**

Das Ziel der Studie war die Untersuchung von SCV (**S**mall **C**olony **V**ariants) von *S. aureus*, speziell im Hinblick auf ihre Überlebensfähigkeit in humanen Endothelzellen. Es ist bereits beschrieben worden, dass SCV von Staphylokokken längere Zeit in Zellen persistieren können. Dies ist jedoch bis jetzt noch nicht systematisch untersucht worden und es war noch nicht geklärt, in welchen Zellkompartimenten sich diese Stämme befanden.

Folgende Fragestellungen wurden im Rahmen dieser Dissertationsarbeit untersucht:

- 1. Können nach einem Zeitraum von 5, 24 und 48 Stunden noch lebende *S. aureus* Bakterien aus HUVEC (**H**uman **U**mbilical **V**ein **E**ndothelial **C**ells) geborgen werden?**
- 2. Besteht ein Unterschied zwischen durch genetische Mutation hergestellten SCV und dem jeweiligen Vaterstamm?**
- 3. Wird die Überlebensfähigkeit der SCV durch schrittweise, intrazelluläre Selektion in Endothelzellen signifikant verbessert?**
- 4. In welchen intrazellulären Kompartimenten befinden sich die Bakterien nach der Aufnahme in die Endothelzellen?**
- 5. Wie ist die zeitliche Abfolge der Phagosomenreifung und der Bakterienelimination in den Endothelzellen?**

## **4. MATERIAL UND METHODEN**

### **4.1 Verwendete Laborgeräte**

Akkusto-optischer Filter (AOTF)	Tri-Launch-Dual-End; Prairie Technologies, Middleton – USA
Autoklav	Typ SM SL 669-1ED; Sterimaquet, Rastatt – Deutschland
Eismaschine/Flockeneisbehälter	Scotsman AF30; Frimont, Mailand – Italien
Emissionsfilter	525/50 nm Bandpass; 607/45 nm Chroma, Rockingham – USA
Filterrad für Emissionsfilter	Sutter Instruments; Navato Steuerung – USA
Helfeld-Verschluss und Steuerung	Uniblitz Shutter, Modell VMM-D1; Vincent Associates, Rochester NY-USA
Inkubatoren	BBD 6220 und Function Line B20; Kendro Langenselbold – Deutschland
Magnetrührer	RCT Basic; IKA Labortechnik Staufen – Deutschland
Mikrowellengerät	Micromat 135; AEG, Nürnberg – Deutschland
Netzgeräte	Powerpac 200 und 1000; Bio-Rad, München Deutschland
ph-Meter	MT 320; Mettler Toledo, Giessen – Deutschland
Pipetten	Pipetman 2, 10, 20, 100, 200, 1000; Gilson International B.V.; Bad Camberg – Deutschland
Pipettierhilfen	AccuJet; Brand, Wertheim – Deutschland
Schüttelinkubatoren	Certomat BS-1; Braun-Biotech Int./Sartorius, Göttingen – Deutschland
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl – Genkingen – Deutschland
Spektrophotometer	Ultrospec 3000; Amersham-Pharmacia, GE Healthcare Europe GmbH, München – Deutschland
Steuerung für AOTF	Neos; Melbourne – USA
Waagen	BP61 S und BL 1500 S; Sartorius Göttingen – Deutschland
Zentrifugen	Tischzentrifuge 5417C/5417R; Eppendorf Hamburg – Deutschland Megafuge 3.0 R; Kendro, Langenselbold – Deutschland

**Tabelle 4.1 In dieser Arbeit verwendete Geräte**

## 4.2 Verwendete Materialien:

### 4.2.1. Bakterienstämme:

<b>Stamm</b>	<b>Charakterisierung</b>	<b>Quelle:</b>
DU5883(pFnBA4)	Ausgangsstamm DU5883 (FnBPA), rekomplementiert mit dem Plasmid pFnBA4, exprimiert Voll-Längen FnBPA aus dem Stamm 8325-4, Resistenzen: Tc <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Green et al.
DU5883(pFnBB4)	Ausgangsstamm DU5883 (FnBPB), rekomplementiert mit dem Plasmid pFnBA4, exprimiert Voll-Längen FnBPA aus dem Stamm 8325-4, Resistenzen: Tc <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Green et al.
Z-7134	Klinisches Isolat, Wundabstrich Unterschenkel EDIN B positiv	Diese Arbeit
SA 113 WT	Klinisches Isolat	Iordanescu et al.
8325-4	Ausgangsstamm: NCTC8325, rekomplementiert mit einem Prophagen mit 11-bp deletion im rsbU-Gen der die sigB-Aktivität über eine Stimulation von RsbV steuert	NCTC 8325
I 10	Ausgangsstamm 8325-4, hemB knockout, Small colony variant, Marker: Erythromycin 2,5µg/ml	Von Eiff et al.
A2	Ausgangsstamm: I 10, rekomplementiert mit hemB, Marker Erythromycin 2,5µg/ml, Chloramphenicol 10µg/ml	Von Eiff et al.
6850	Klinisches Isolat aus Osteomyelitis	Balwit et al.
JB 1	Ausgangsstamm: 6850, Menadion auxotroph, Small colony variant, MIC Gentamicin 8µg/ml	Balwit et al.
II b 13	Ausgangsstamm: 6850, hemB knockout, Small colony variant, Marker: Erythromycin 2,5 µg/ml	Vadaux et al.
KM4	Ausgangsstamm: II b 13, rekomplementiert mit hemB, Marker: Erythromycin 2,5µg/ml, Chloramphenicol 10µg/ml	Vadaux et al.
CF2	Klinisches Isolat	Diese Arbeit
CF5	Klinisches Isolat	Diese Arbeit
S.carnosus FNBP-A	Tm300,p Ori23::FNBP-A8325-4	Sinha et al.

NCTC = National Collection of Type Cultures; SCV = small colony variant

**Tabelle 4.2.1 In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme**

**Versuchsgefäße****8-well und 6-well schalen von Nunc, Schubert & Weiss, München - Deutschland****4.2.2 Enzyme****Lysostaphin [Fa. SIGMA, Saint Louis, Missouri, USA]:**

Herkunft: *Staphylococcus staphylolyticus*  
 Spezifische Aktivität: 500 units/mg protein.  
 Stammlösung: 2mg Trockenpulver auf 1ml PBS.  
 Gelagert in 200 µl Aliquots bei: -20°C

Bei Lysostaphin handelt sich es um eine Glycylglycin-Endopeptidase aus *Staphylococcus staphylolyticus*, welche speziell die Pentaglycinbrücken in der Peptidoglycanschicht der Zellwand von *S. aureus* spaltet und damit direkt bakterizid auf ruhende oder proliferierende Keime wirkt. Zusätzlich löst Lysostaphin schon bei Konzentrationen von 1 µg/ml auch die extrazelluläre Matrix auf, welche manche *S. aureus* – Stämme in vitro auf Plastik- und Glasoberflächen bilden. (Wu et al., 2003).

**Ambicin® L [Fa. AMBI PRODUCTS LLC, Lawrence New York USA]:***(Rekombinantes Lysostaphin)*

Herkunft: *Staphylococcus simulans*  
 Spezifische Aktivität: 3990 units/mg  
 Stammlösung: 15 mg Trockenpulver auf 1ml 20 mM Natriumacetat  
 Gelagert in 200 µl Aliquots bei: -20°C

**4.2.3 Kulturmedien für Zellen und Bakterien****Blutagarplatten [Fa. BECTON DICKINSON GmbH, Heidelberg, Deutschland]:**

Es wurden Columbia Agarplatten mit 5% Schafsblut verwendet. Der Durchmesser betrug 90mm. Die Platten waren bei 28°C innerhalb des Mindesthaltbarkeitsdatums über mindestens 7 Tage steril, bei einem pH von  $7,3 \pm 0,2$ . Diese Platten sind für folgende Keime vorgesehen (Tabelle 4.2.3a):

Organismus	Stamm Nr.	Erwartetes Wachstum (KBE/ml)	Reales Wachstum (KBE/ml)	Hämolyse
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615	$10^3$ - $10^5$	$2,9 \times 10^4$	Beta (stark)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 6305	$10^3$ - $10^5$	$1,5 \times 10^3$	Alpha
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	$10^3$ - $10^5$	$1,5 \times 10^3$	Beta (schwach)
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	$10^3$ - $10^5$	$5,8 \times 10^3$	Gamma
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	$10^3$ - $10^5$	$4,9 \times 10^3$	Beta

Tabelle 4.2.3a Koloniemorphologie auf Blutagar

**Endothelial Cell Basal Medium (ECBM)****[Fa. PROMOCELL, GmbH, Heidelberg, Deutschland]:**

Es handelte sich um ein steriles, flüssiges Basalmedium ohne Wachstumsfaktoren oder Antibiotika. Das Medium enthielt den Farbstoff Phenolrot und ist für HUVEC, HUAEC (Human Umbilical Artery Endothelial Cells), HPAEC (Human Pulmonary Artery Endothelial Cells) oder HBMEC(Human Brain Microvascular Endothelial cell) vorgesehen und ist für Aussaatdichten von 5.000 Zellen / cm<sup>2</sup> optimiert. Der pH betrug 7,4 und die Osmolalität 275 ±5 mOsm/kg. Für Zellkulturflaschen von 25cm<sup>2</sup> Fläche wurden 5ml, für Flaschen mit 75cm<sup>2</sup> 15ml und für 6-Well-Schalen mit 9,6 cm<sup>2</sup> Fläche 2ml Füllmenge empfohlen.

**Endothelial Cell Growth Medium (ECGM)****[Fa. PROMOCELL, GmbH, Heidelberg, Deutschland]:**

Es handelte sich um ein steriles, flüssiges Wachstumsmedium ohne Wachstumsfaktoren oder Antibiotika. Das Medium enthielt den Farbstoff Phenolrot und ist für HUVEC, HUAEC, HPAEC oder HBMEC vorgesehen und ist für Aussaatdichten von 5.000 Zellen / cm<sup>2</sup> optimiert. Der pH betrug 7,4 und die Osmolalität 275 ±5 mOsm/kg.

Um das Medium auf ein vollwertiges Wachstumsmedium aufzuwerten, wurde jeder Flasche Grundmedium ein „*supplement pack*“ hinzugefügt. Die Inhaltsstoffe sind in der folgenden Tabelle 4.2.3b aufgelistet. Für Zellkulturflaschen von 25cm<sup>2</sup> Fläche wurden 5ml, für Flaschen mit 75cm<sup>2</sup> 15ml und für 6-Well-Schalen mit 9,6 cm<sup>2</sup> Fläche 2ml Füllmenge empfohlen.

Inhaltsstoffe des „supplement pack“	
ECGS/H	0.4 %
Fetal Calf Serum (FCS)	2 %
Epidermal Growth Factor	0.1 ng/ml
Hydrocortison	1 µg/ml
Basic Fibroblast Factor	1ng/ml
Amphotericin B	50ng/ml
Gentamicin	50 µg/ml

Tabelle 4.2.3b Inhaltsstoffe Supplement pack

**BSA (bovine serum albumine) [Fa. BIOMOL, Hamburg, Deutschland]**

Verwendet wurde vor allem zum Absättigen von unspezifischen Bindungsstellen Albumin aus Rinderserum.

Molekulargewicht:	~67.000 Da
Zusammensetzung:	99 % Albumin, 1% Fette, Stickstoffgehalt 14,9%
pH-Optimum:	7,2
Gelagert in Aliquots bei:	+ 4°C

**4.2.4 Antikörper****Mouse Gamma Globulin [Fa. MOLECULAR PROBES, Eugene Oregon USA]**

Verwendet wurde ein aufgereinigtes Maus-IgG, welches am Fc-Teil von Protein A gebunden wird.

Proteinkonzentration :	11,0 mg/ml,
Puffer:	0,01 M Natrium Phosphate, 0,25 M NaCl, pH 7,6
Gelagert in Aliquots bei:	+ 4°C

**Goat anti-mouse antibody [Fa. MOLECULAR PROBES, Eugene Oregon USA]**

Verwendet wurde ein aufgereinigter, monoklonaler Antikörper..

*Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L) 2 mg/ml.*

Absorptionsmaximum:	495 ± 5 nm,
Emissionsmaximum:	518 ± 5 nm
pH-Optimum:	8.0
Mol Farbe pro cm und Mol Protein:	71.000
Gelagert in Aliquots bei:	+ 4°C

**Goat anti-mouse antibody [Fa. MOLECULAR PROBES, Eugene Oregon USA]**

Verwendet wurde ein aufgereinigter, monoklonaler Antikörper.

*Alexa Fluor® 568 goat anti-mouse IgG (H+L) 2 mg/ml.*

Absorptionsmaximum:	579 ± 3 nm,
Emissionsmaximum:	603 ± 4 nm
pH-Optimum:	8.0
Mol Farbe pro cm und Mol Protein:	91.300
Gelagert in Aliquots bei:	+ 4°C

**Mouse anti-*S. aureus* antibody (MOX)****[Fa. US BIOLOGICAL, Swampscott, Massachusetts, USA]**

Verwendet wurde ein aufgereinigter monoklonaler Murin-IgG<sub>3</sub>-Antikörper.

Antikörpertarget:	<i>S. aureus</i> , Stamm Wood 46
Auslieferungskonzentration:	~2,0 mg/ml (OD 280nm) in 0,01 M PBS
pH-Optimum:	7,4.
Gelagert in Aliquots bei:	+ 4°C

Der Antikörper ist mit der F<sub>AB</sub>-Region spezifisch gegen *S. aureus*, Stamm Wood 46 gerichtet. Es bestanden keine Kreuzreaktionen gegenüber *E. Coli*, *Streptococcus Gruppe G*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Mycoplasma bovis* und *Mycoplasma bovigenitalium*

**Rabbit anti-*S. aureus* antibody****[Fa. DUNN Labortechnik GmbH, Ansbach Deutschland]**

Verwendet wurde ein aufgereinigter monoklonaler Murin-IgG<sub>3</sub>-Antikörper.

Antikörpertarget:	ATCC 27660
Auslieferungskonzentration:	~4,5 mg/ml (OD 280nm) in 0,01 M PBS
pH-Optimum:	7,2.
Gelagert in Aliquots bei:	+ 4°C

Der Antikörper ist mit der F<sub>AB</sub>-Region speziell gegen für *S. aureus* typische lösliche und strukturelle Antigene gerichtet, welche vom Hersteller nicht näher charakterisiert wurden.

#### **4.2.5 Farbstoffe**

##### **Phalloidin [Fa. MOLECULAR PROBES, Eugene Oregon USA]**

Verwendet wurde gereinigtes Phalloidin, Rote Fluoreszenz

*Alexa Fluor® 568 phalloidin.*

Absorptionsmaximum:	578 ± 3 nm,
Emissionsmaximum:	600 ± 4 nm
pH-Optimum:	7.0
Gelagert in Aliquots bei:	-20°C
Durchmesser:	~ 12-15 Å
Molekulargewicht:	790 – 825 Da

Das bizyklische, extrem hydrophile Peptid und Pilzgift Phalloidin stammt vom Fliegenpilz (*amanita phalloides*) und bindet im Verhältnis 1:1 an F-Aktin-Untereinheiten des Zytoskelettes. Mit fluoreszenzgelabeltem Toxin ist es damit möglich nach Permeabilisierung der Zellmembran F-Aktin-Polymere darzustellen.

##### **LysoTracker [Fa. MOLECULAR PROBES, Eugene Oregon USA]**

LysoTracker ist ein azidophiler Farbstoff, welcher zur Permeation von Membranen fähig ist und sich aufgrund deshalb in sauren Zellkompartimenten anreichert.

Handelsname:	LysoTracker Red DND-99 / 1 mM in DMSO
Absorptionsmaximum:	577 nm
Emissionmaximum:	590 nm
Gelagert in Aliquots bei:	-20°C
Molekulargewicht:	78,13 Da
Summenformel:	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS

##### **Live-Dead- Färbekit: BacLight™ [Fa. MOLECULAR PROBES, Eugene Oregon USA]**

Verwendet wurde das BacLight™-System zur Färbung für Fluoreszenzmikroskopie, zugelassen und getestet für *S. aureus*. Das Kit besteht aus drei Komponenten, zwei Farbstoffen und einem Mikroskopieröl.

Component A:	SYTO®-Nukleinsäurefarbe	3,34 mM in DMSO
Component B:	Propidiumiodid (C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> I <sub>2</sub> N <sub>4</sub> )	20 mM in DMSO
Component C:	BacLight™ Mikroskopieröl	



---

Hierbei färbt SYTO 9 lebende und tote Bakterien, wohingegen Propidiumiodid nur Bakterien mit beschädigten Zellmembranen penetriert. SYTO 9 – positive Zellen fluoreszieren dabei grün, Propidiumiodid rot. Bei einer Kolo-kalisation beider Farbstoffe in einer Zelle mit beschädigter Zellmembran überwiegt der rote Farbstoff, so dass lebende Bakterien grün und tote rot fluoreszieren.

### **HUVEC Nucleofector™ Kit [Fa. AMAXA]**

Verwendet wurden die von Amaxa direkt bezogenen Reaktionslösungen.

## **4.3 Methoden**

### **Arbeiten in der Zellkultur**

Sämtliche Arbeitsschritte mit Zellen wurden unter einer Sterilbank im klimatisierten Zellkulturraum durchgeführt. Alle Lösungen wurden mit sterilen Einmalpipetten aufgezogen und auf die Versuchsgefäße verteilt.

#### **4.3.1 Isolierung humaner Nabelschnurvenen-Endothelzellen**

Die Endothelzellen wurden aus humanen Nabelschnüren isoliert.

Im Labor wurde pro Nabelschnur 10ml PBS + Gentamicin in 50ml Falcon Tubes aliquotiert und zusammen mit dem Wachstumsmedium ECGM [PROMOCELL] + Gentamicin + 2% FCS im Wasserbad auf 37°C eingestellt.

Die jeweilige Nabelschnur wurde dann in eine desinfizierte Haltevorrichtung eingespannt und deren Vene mit einer Knopfkanüle sondiert. Unter die Nabelschnur wurde eine Plastik-Nierenschale eingebracht, um die bei der Präparation anfallenden ungewünschten Flüssigkeiten aufzufangen. Im Anschluss wurde die Nabelschnur mit zwei bis drei großen Kocherklemmen in der Haltevorrichtung fixiert und mittels einer Kompresse und Bacillol außen gesäubert. Im Anschluss wurde ein 0,2 µm Membranfilter auf die Knopfkanüle aufgesetzt und die Vene solange mit PBS + Gentamicin gespült, bis Blutkoagel gelöst waren und kein Blut mehr durchgespült werden konnte. Anschließend wurde das in der Vene verbliebene PBS + Gentamicin mit 5ml Chymotrypsin aus dem Gefäß ausgewaschen. Danach wurde die Nabelschnurvene nach unten hin mit zwei kleineren Klemmen abgedichtet und solange mit Chymotrypsin aufgefüllt, bis die Vene leicht gebläht war. Die so präparierte Vene wurde in einen dafür hergerichteten Brutschrank bei 37°C über 30 Minuten inkubiert.

Während der Inkubationszeit wurde für jede Nabelschnur jeweils 2ml fetales Kälberserum in jeweils ein mit der Nummer der Nabelschnur beschriftetes Falcon Tube vorgelegt, um das zur Gewinnung der Zellen in der Vene vorhandene Chymotrypsin abzustoppen. Nach der Inkubationszeit wurde die Nabelschnur wieder in die Haltevorrichtung eingespannt und deren unteres Ende in das vorbereitete Falcon Tube gehängt. Anschließend wurde die Nabelschnur leicht massiert, um eventuell noch anhaftende Zellen von der Venenwand zu lösen. Erst jetzt wurden die zwei unteren Klemmen gelockert und die gelösten Zellen in das Falcon Tube übernommen. Nun wurde die Vene mit 10 ml PBS + Gentamicin gespült, um eine maximale Ausbeute an Zellen zu erreichen. Die Nabelschnur wurde anschließend wieder in den Transportbehälter verbracht und entsorgt.

#### **4.3.2 Kultivierung der Zellen und deren Handhabung**

Die gewonnenen Zellen wurden baldmöglichst nach der Entnahme für 10 Minuten bei 1200 U/min in einer Großraumzentrifuge sedimentiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, und die Zellen wurden in 5ml Wachstumsmedium resuspendiert und nach Überführung in eine 5ml Zellkulturflasche bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis zur Konfluenz als Passage 1 (P1) kultiviert.

Die isolierten Endothelzellen wurden nach Umsetzen in eine mittlere Zellkulturflasche in 10ml Wachstumsmedium im Brutschrank bei 37°C 5% CO<sub>2</sub> und relativer Luftfeuchtigkeit von 90% „relative humidity“ (rH). kultiviert, bis sie konfluent waren. Anschließend wurden die Zellen 1:2 verdünnt und auf zwei weitere mittlere Zellkulturflaschen verteilt, um eine Vermehrung für die Versuche zu erzielen. Für Versuche wurden Passagen ab Passage 3 (P3) verwendet. Vor der Infektion wurden die Zellen mit 2 ml Basalmedium ECBM gewaschen und dann bis zum Beginn der Infektion in 10 ml Basalmedium im Brutschrank stehen gelassen. Anschließend wurden 10 ml ECGM mit 200µl Lysostaphin [Stammlösung 2 mg/ml] gemischt, um eine Konzentration des Lysostaphins von 40 µg/ml zu erreichen. Anschließend wurde diese Suspension mittels eines 0,02 µm Sterilfilters in 15 ml Falcon tubes steril filtriert und im Wasserbad auf 37° C eingestellt.

### **Bestimmung der Zellzahl**

Für jede Aussaat wurde eine definierte Zellzahl verwendet. Um die Menge des Aussaatmediums zu bestimmen, wurden die Zellen/ml nach der jeweiligen Trypsinierung gezählt. Dazu wurden 50µl der Zellsuspension mit 50µl Trypanblaulösung gemischt. Die toten Zellen erhielten dadurch eine blaue Färbung und wurden bei der Auszählung somit nicht berücksichtigt. Etwa 2 -3 µl der Zählösung wurden in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellzahl in vier 0,1mm<sup>3</sup> großen Abschnitten unter dem Mikroskop bestimmt.

### **Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.**

Die Zellen wurden vor der Lagerung mittels Trypsin von dem Boden der Zellkulturflaschen abgelöst. Anschließend wurde das Trypsin abgestoppt. Die Zellen wurden zentrifugiert, der Überstand abgenommen und darauf in eiskaltem Einfriermedium resuspendiert. Das Einfriermedium bestand aus Wachstumsmedium, versetzt mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO). Die fertige Lösung mit  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen/ml wurde auf 2ml Kryoröhrchen verteilt und bei -20°C über einen Zeitraum von 24 Stunden eingefroren. Die endgültige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Für die erneute Kultur wurden die kryokonservierten Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Anschließend erfolgte die Resuspension in 5ml vorgewärmtem Wachstumsmedium. Durch Zentrifugation bei 800rpm (130g: Megafuge3.0) und anschließender Resuspension in frischen 5ml Wachstumsmedium wurden Reste des Einfriermediums entfernt. Die anschließende Kultivierung der Zellen erfolgte in kleinen Zellkulturkolben (25cm<sup>2</sup>).

### **Aussäen von Zellen**

Für die Infektionsversuche wurden Zellen in 6-well-Versuchsgefäße ausgesät. Analog erfolgte die Aussaat auf Glasscheibchen oder Glasbodenschälchen.

6-well-Versuchsgefäße	250.000 Zellen
12mm Glasscheibchen	20.000 Zellen

**Tabelle 4.3.2 Anzahl der ausgesäten Zellen**

Je 20.000 beziehungsweise 250.000 Zellen wurden als 2ml Suspension mit ECGM in mit Gelatine 0,2% beschichtete 6-Well Schalen ausgesät und im Brutschrank kultiviert, bis sie konfluent waren. Am Versuchstag wurde das Medium abgenommen,

die Zellen wurden einmal mit 1 ml pro well ECBM [PROMOCELL] gewaschen und dann in 2 ml ECBM pro well bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank belassen.

### **Coating von Zellkulturgefäßen und Glasplättchen**

Für die Anheftung der Endothelzellen an Oberflächen wie Zellkulturflaschen, 6-Well-Platten und Glasplättchen wurden diese mit einer Matrix aus Gelatine versehen. Verwendet wurde hierbei eine sterile 0,2 %ige Gelatinelösung, welche frisch angesetzt wurde. Hierzu wurde der Boden des jeweiligen Versuchsgefäßes komplett mit der Lösung benetzt. Anschließend folgte eine Inkubationsphase über Nacht im Brutschrank bei 37°C. Darauf wurde der Überstand abgesaugt und die Behältnisse unter der Sterilbank getrocknet. Die Aufbewahrung der so getrockneten Gefäße erfolgte bei 4°C.

### **Verdünnungsreihen**

Für jeden Versuchsansatz wurde eine Verdünnungsreihe vorbereitet, um Zeitverluste und Artefakte durch nachträgliches Bakterienwachstum nach Abschluss der Infektionsphase des Experimentes möglichst gering zu halten.

Die Verdünnung erfolgte in 2ml Reaktionsgefäßen, für die Inputkontrolle in 2 Schritten jeweils 1:100 und danach in 2 Schritten jeweils 1:10. Von den letzten drei Schritten wurden jeweils 100µl ausplattiert, was den Verdünnungsfaktoren von  $10^5$ ,  $10^6$  und  $10^7$  entspricht.

Für die Lysate erfolgte die Verdünnung ebenfalls in 2ml Reaktionsgefäßen in 3 Schritten 1:10. Vom Lysat direkt und den Verdünnungsschritten wurden jeweils 100µl ausplattiert, was den Verdünnungsfaktoren von  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  und  $10^4$  entspricht.

Jeder Verdünnungsschritt bei den Infektionen wurde zusätzlich auf dem Vortex gründlich gemischt, um eine Clusterbildung der Bakterien weitestgehend zu vermeiden.

### **4.3.3 Transfektion**

Die Transfektion der Endothelzellen wurden nach Herstellerangaben der Firma Amaxa, Köln – Deutschland mittels Nukleofektion durchgeführt. Hierzu wurden für die Transfektion pro Ansatz  $1 \times 10^6$  trypsinierte und abgezählte Zellen verwendet. Diese wurden mit 2µg der jeweiligen Plasmid-DNA transfiziert. Im Anschluss an die Transfektion wurden auf die Glasplättchen oder die Glasbodenschalen wie in 4.3.2

beschrieben jeweils  $2-3 \times 10^4$  Zellen ausgesät. Anschließend wurden die Zellen über Nacht unter Standard-Kulturbedingungen bei  $37^\circ\text{C}$  im Inkubator kultiviert und am nächsten Tag für die anstehenden Versuche eingesetzt.

### **Bakterienkultur**

Sämtliche Arbeitsschritte mit Zellen wurden unter einer Sterilbank im Labor durchgeführt. Alle Lösungen wurden mit sterilen Einmalpipetten aufgezogen und auf die Versuchsgefäße verteilt.

#### **4.3.4 Anzucht von *S.aureus*-Stämmen**

Von den benötigten Bakterienstämmen wurden in Selektivmedien Übernachtkulturen angesetzt, Kontrollausstriche angefertigt und in Kryogefäße aliquotiert. Anschließend wurden die Bakterien über Nacht auf  $-20^\circ\text{C}$  herabgekühlt und am folgenden Tag auf  $-80^\circ\text{C}$  überführt.

Um das Wachstumsverhalten charakterisieren zu können, wurden die Stämme in dem Medium kultiviert, in welchem sie das produktivste Wachstum zeigten. Nach Überimpfung aus der Stammsammlung bei  $-80^\circ\text{C}$  und Bebrütung in 20 ml Erlenmeyerkolben im Schüttler bei 125 rpm und  $36^\circ\text{C}$  wurden die Kulturen so lange verdünnt, bis eine OD von maximal 0,250 erreicht war. Um Mutationen der Stämme zu erschweren, erfolgten sowohl die Anzucht als auch die weitere Bebrütung bei antibiotikaselektierten Stämmen jeweils in Anwesenheit des jeweiligen Hemmstoffes. Danach wurden die Kulturen im Schüttler bei denselben Umgebungsparametern weiterbebrütet. Von diesen Kulturen wurden jede 30 Minuten eine Probe von  $800\mu\text{l}$  in eine Photometerküvette pipettiert und bei einer Wellenlänge von 600nm gemessen. Diese Prozedur wurde fortgeführt, bis die exponentielle Wachstumsphase in die Plateauphase übergegangen war. Der längste Beobachtungszeitraum lag bei sieben Stunden.

#### **Vorbereitung des Bakterienstammes JB1 für Infektionsversuche:**

Der Stamm *S. aureus* JB1 wurde als Ausgangsstamm gewählt und als Passage 0 (P0) bezeichnet.

Von JB1 wurde eine Probe aus der bei  $-80^\circ\text{C}$  lagernden institutseigenen Stammsammlung in TSB Medium angesetzt und 48 Stunden im Schüttler bei 175 rpm und  $37^\circ\text{C}$  bebrütet, bis die Suspension eine Optische Dichte (OD) von 1,200

erreicht hatte. Die OD wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 600nm gemessen. Dieser Wert entspricht in etwa einer Koloniezahl von  $44 \times 10^7$  Bakterienzellen pro ml.

Von dieser Suspension wurde 1 ml in sterile 2ml-Eppendorff-Reaktionsgefäße gegeben und bei 14.000 U/min 5 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, verworfen und das Bakterienpellet in 1ml PBS unter Mischen auf dem Vortex gründlich resuspendiert.

### **Passagierung und Adaptation des Ausgangsstammes an das Endothelzellmilieu:**

Für die Passagierung des SCV-Stammes JB1 (Balwit et al., 1994) wurden die Endothelzellen in einem Verhältnis von 100 Bakterien pro Endothelzelle infiziert. Dieses Infektionsverhältnis wird auch als „*multiplicity of infection*“ (MOI) bezeichnet. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen mit Basalmedium (endothelial basal medium ECBM) befüllt. Dieses Basalmedium enthält keine bakteriziden oder bakteriostatischen Zusätze. Zur Weiterbehandlung der Zellen wurde Wachstumsmedium + 40µg Lysostaphin angesetzt.

Nach einer Invasionsdauer von 2 Stunden wurde das Infektionsmedium abgenommen und die Zellen wurden mit vorgewärmten ECGM einmal gewaschen, um Reste des ECBM zu entfernen und das ECGM +40µg Lysostaphin, nicht zu verdünnen. Anschließend wurde das vorbereitete ECGM +40µg Lysostaphin auf die Zellen gegeben. Mikroskopisch wurde die MOI visuell geprüft.

Das ECGM +40 µg Lysostaphin wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen an jedem zweiten Tag gewechselt und die Bebrütung im Inkubator fortgesetzt. Vor der Passagierung wurde das überstehende Medium abgenommen und auf dem Vortex suspendiert. Davon wurden zweimal jeweils 100µl stichprobenartig auf Blutagarplatten ausgestrichen. Dies diente als Kontrolle des Erfolges der Lyse der Bakterien durch Lysostaphin. Die infizierten Zellen wurden daraufhin einmal mit vorgewärmten Basalmedium ohne Zusätze von Antibiotika gewaschen, um eventuell an der Bakterienoberfläche anhaftendes Lysostaphin abzuwaschen, anschließend mit 2ml Triton X-100 für einen Zeitraum von 30 Sekunden lysiert und das Lysat mit einem Cellscaper von der Kulturflasche gelöst. Die lysierten Zellen mit den freigewordenen Bakterien wurden in ein 2ml Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt und bei 14.000 Umdrehungen 10min zentrifugiert. Daraufhin wurden  $\frac{3}{4}$  des

Überstandes vorsichtig abgenommen, der Rest auf dem Vortex gemischt und anschließend in 10ml TSB überführt. Das so beimpfte Medium wurde im Schüttler 48 Stunden bei 37°C und 175 rpm inkubiert. Nach der Inkubationsperiode, bei einer OD von 1,200 des Infektionsmediums, wurde ein neuer konfluenter mittlerer Kolben wie oben beschrieben präpariert und infiziert. Aus der Bakteriensuspension wurden zusätzlich Kryokulturen hergestellt und als Passage 1, Passage 2, Passage 3 und Passage 4 bezeichnet.

### **Quantitätskontrolle vor den Versuchen**

Um zu quantifizieren, wie viele KBE bei der Infektion tatsächlich in die Wells der 6-well Platten überimpft werden konnten und um ein Maß für die Differenz zwischen der Anzahl der Bakterien zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende zu bekommen, wurde eine Quantitätskontrolle der Infektionslösung eingeführt. Für diese Kontrolle wurden pro Stamm 10 µl des Infektionsmediums in eine Verdünnungsreihe überführt und danach auf Blutagarplatten ausplattiert.

Artefakte durch nachträgliches Bakterienwachstum wurden durch Lagerung der Bakterien auf Eis zwischen den Arbeitsschritten kompensiert. Eine homogene Verteilung der Bakterien im Reaktionsgefäß für die Verdünnungsreihen und die Ausplattierung wurde durch Resuspendierung auf dem Vortex erreicht.

### **Infektion von Zellen in Kulturschalen und auf Glasscheibchen**

Aus der optischen Dichte der Bakterienkultur und aus dem durch Wachstumsraten bestimmten Referenzwert für die Zellzahl wurde das zur jeweiligen Infektion nötige Volumen berechnet. Das Infektionsverhältnis betrug bei den quantitativen Versuchsansätzen 100 Bakterien pro Endothelzelle und bei den Immunfluoreszenzfärbungen aufgrund der besseren Übersicht 10 Bakterien pro Endothelzelle. Die Zellen wurden danach mit diesem Volumen Bakteriensuspension unter einer Lamina-Airflow-Sterilbank infiziert und danach in einer Großraumzentrifuge bei 500 rpm über 7 Minuten zentrifugiert, um eine gleichzeitige Adhäsion der Bakterien an den Zellen und damit auch eine gleichzeitige Invasion zu erreichen. Bei Zentrifugation von Glasscheibchen wurde auf die aktive Abbremsung der Zentrifuge verzichtet, um übermäßige Scherkräfte zu vermeiden. Die Verlängerung des Abbremsvorganges wurde in die gesamte Zentrifugationsdauer einbezogen. Nach der Zentrifugation wurde den Bakterien unter konstanten äußeren

Bedingungen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90 % bei eine Stunde Zeit gegeben um in die Zellen zu invadiieren.

Nach der Stunde wurde das Basalmedium von den Zellen abgenommen und verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit 1ml ECGM gewaschen und ein vorher vorbereitetes, steril filtriertes und auf 37°C vorgewärmtes, ECGM + bis zu 100µg Lysostaphin pro ml Medium auf die Zellen gegeben, um nicht invadierte, extrazelluläre Bakterien zu verdauen. Die anschließende Lyse der extrazellulären Bakterien durch das Enzym Lysostaphin erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90 % rH für die quantitativen Versuche über 5, 24 und 48 Stunden und für die Fluoreszenzfärbungen über 4 Stunden.

#### **4.3.5 Zelluläres Infektionmodell**

##### **Versuche über 5 – 48 Stunden**

Als quantitative Ausgangskontrolle für die Anzahl der tatsächlich eingesetzten Bakterienklone wurden 10 µl Infektionssuspension je Stamm in die vorbereitete Verdünnungsreihe überführt. Aus dem letzten Verdünnungsschritt wurden 100 µl auf Blutagarplatten ausplattiert um Verdünnungen von 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup> und 10<sup>5</sup> zu erreichen. Die Agarplatten wurden über Nacht im Brutschrank bebrütet.

Zeitnah wurden die Zellen wie vorher beschrieben infiziert. Bei Erreichen des gewünschten Zeitwertes zu 5, 24 und 48 Stunden wurde der Überstand von den Zellen abgenommen, in ein 2ml Reaktionsgefäß gegeben und bei 14.000 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Da zu wenige Bakterienklone vorhanden waren, um ein Pellet zu bilden, wurden 100µl vom Boden des Reaktionsgefäßes als Verdaukontrolle unverdünnt auf Blutagarplatten ausplattiert und eine Nacht im Brutschrank bebrütet.

Die infizierten Endothelzellen wurden mit 1ml ECGM einmal gewaschen, um Reste des Überstandes zu entfernen und anschließend mit 1ml Triton X-100 über 10 Minuten bei 37°C lysiert.

Anschließend wurden die Zellreste mit je einem Cellscrapper gründlich vom Boden des jeweiligen Kulturgefäßes entfernt und das Lysat mit einer Pipette in je ein 2ml Reaktionsgefäß überführt.

Das Lysat wurde auf dem Vortex gründlich gemischt und anschließend in die Verdünnungsreihe überführt. Die so ausgestrichenen Agarplatten wurden ebenfalls über Nacht im Brutschrank bebrütet. Am nächsten Tag wurden die Blutagarplatten mit einem automatisierten Zählsystem ausgezählt.



### **Versuche über eine Stunde**

Die Infektion wurde analog zu den Überlebensversuchen über 24 bzw. 48 Stunden durchgeführt. Zusätzlich wurde für jedes Wertepaar ein Kontrollkulturgefäß ungecoatet ohne Zellen mitinfiziert und mitzentrifugiert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank in 2ml pro Gefäß ECBM bei 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 90 % relativer Luftfeuchtigkeit. Nach 15, 30, 45 und 60 Minuten wurde zum Medium im jeweiligen Gefäß 200 µl Triton X-100 2% gegeben, um in der Reaktionskammer eine Konzentration von 0,2% herzustellen. Die Lyse der Zellen erfolgte über 5 Minuten. Anschließend wurden die Zellreste und die Bakterien im Kontrollwell mit je einem Cellscaper vom Boden gelöst.

Die Suspensionen wurden jeweils in 15 ml Reaktionsgefäße überführt und auf dem Vortex gründlich gemischt. Danach wurden jeweils 10µl Suspension aus dem 15 ml Reaktionsgefäß entnommen und die Verdünnungsreihe wie oben beschrieben durchgeführt. Die 2ml Reaktionsgefäße wurden während und unmittelbar nach den Verdünnungsschritten bis zum Ausplattieren auf Eis gekühlt, um eine Vermehrung der Bakterien zu unterbinden. Nach Abnahme des letzten Wertes wurden die Verdünnungen nacheinander vom Eis genommen und auf Blutagarplatten ausplattiert.

Die Agarplatten wurden ebenfalls über Nacht im Brutschrank bebrütet. Am nächsten Tag wurden die Blutagarplatten mit einem automatisierten Zählsystem ausgezählt.

### **4.3.6 Fluoreszenzfärbungen**

#### **Anfärbung der Bakterien und der Lysosomen (LysoTracker)**

Auf Glasscheibchen kultivierte und infizierte Zellen wurden aus dem Brutschrank genommen und das Medium entfernt. Dieses wurde als Verdauungskontrolle auf Blutagarplatten ausgestrichen.

Anschließend wurde die vorbereitete LysoTracker-Färbelösung auf die Zellen gegeben und eine halbe Stunde darauf belassen. Danach wurden die Glasscheibchen aus dem Medium genommen und 5 Minuten in Formalin 3,4% fixiert. Das Formalin wurde abgenommen, übermäßige Feuchtigkeit von den Zellen entfernt, die Glasscheibchen auf Glasobjektträgern in 3µl Mowiol eingebettet und mit farbneutralem Nagellack versiegelt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

### **Anfärbung der Bakterien und der Lysosomen (YFP-LAMP)**

Zur Anfärbung der Bakterien erhielten wir von R. Henry (Ann Arbor USA) ein Plasmid, welches für ein so genanntes „*yellow fluorescent proteine*“ (YFP) kodiert. Dieses YFP zeigt bei Anregung mit dem Laser einer bestimmten Wellenlänge eine gelbe Fluoreszenz. Des Weiteren erhielten wir von Craig Roy (New Haven USA) GFP-Rab5 und GFP-Rab7 Expressionskonstrukte für die frühen beziehungsweise späten Endosomen. Durch die Transfektion mit dem Plasmidvektor war es möglich, die Kolokalisation der Bakterien und der Lysosomen unter LIVE-CELL-Bedingungen zu verifizieren.

Die Amplifizierung der benötigten DNA erfolgte in *E.coli*. Zu Beginn wurde eine Probe des Stammes *DH5alpha* aus der Stammsammlung in einem Erlenmeyerkolben, befüllt mit 100ml LB-Medium, geimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler bei 200rpm bebrütet. Am nächsten Morgen erfolgten die Zentrifugation der Übernachtskultur und damit die Ernte der benötigten Bakterien.

Im Anschluss wurde die DNA aus den Bakterienzellen freigesetzt und mittels „*Quiagen EndoFree Plasmid Maxi Protocol*“ aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Transfektion der erhaltenen YFP-DNA in die Endothelzellen. Diese HUVECs wurden dann bis zur Auswertung am Mikroskop auf 35mm Glasbodenschälchen inkubiert.

### **Anfärbung der Bakterien außen und innen**

Zur Vorbereitung der Außenfärbung wurde der primäre Antikörper Rabbit-Anti-*S. aureus* 1:1000 in 4°C kaltem Basalmedium verdünnt und jeweils 500µl pro well einer 12-well-Platte vorgelegt.

Die infizierten Zellen auf den Glasscheibchen wurden beim jeweiligen Zeitwert aus dem Brutschrank genommen, einmal mit jeweils 1ml auf 37°C vorgewärmten ECBM gewaschen und anschließend in die Wells der präparierten 12-well Schale überführt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über 45 Minuten im Kühlschrank bei 4°C. Anschließend wurden die Glasscheibchen 3x jeweils 5 Minuten mit kaltem Basalmedium gewaschen. Daraufhin wurde der sekundäre Antikörper Anti-Rabbit-AK 1:200 in kaltem Basalmedium verdünnt und auf die Glasscheibchen gegeben. Die Inkubation erfolgte ebenfalls im Kühlschrank 30 Minuten bei 4°C.

Anschließend wurden die Glasscheibchen 3x jeweils 5 Minuten mit kaltem Basalmedium gewaschen. Danach erfolgte die Fixation in Formaldehyd 3,4% über 5 Minuten, mit darauf folgenden Waschschritten 3x 5 Minuten mit PBS. Anschließend

wurden die Zellen in 0°C eiskaltem Aceton 5 Minuten lang permeabilisiert und darauf 3x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Für die Innenfärbung wurde eine feuchte Kammer vorbereitet. Anschließend wurden unspezifische Bindungen mit 2% Bovinem Serum Albumin – PBS über 15 Minuten abgesättigt und die Zellen nochmals 3x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Als primärer Antikörper wurde wiederum Rabbit-Anti-*S. aureus* 1:1000 verwendet, die Inkubationszeit betrug 45 Minuten. Es folgte ein weiterer Waschschrift 3x 5 Minuten mit PBS. Als sekundärer Antikörper wurde für die Innenfärbung ein Anti-Rabbit-AK 1:200 verwendet, die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Nach einem abschließenden Waschschrift 3x 5 Minuten mit PBS wurde übermäßige Feuchtigkeit von den Glasscheibchen vorsichtig entfernt und die Zellen in 3µl Mowiol auf einem Objektträger eingebettet und mit farbneutralem Nagellack versiegelt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

### **Anfärbung der Bakterien und des Zytoskelettes**

Die infizierten Zellen wurden beim jeweiligen Zeitwert aus dem Brutschrank genommen. Darauf wurden die Zellen auf den Glasscheibchen 5 Minuten in Formalin 3,4% fixiert. Die fixierten Zellen wurden 3 x für 5 Minuten in PBS gewaschen und die unspezifischen Bindungen wurden über einen Zeitraum von 15 Minuten mit „*Bovine Serum albumine*“ (BSA) abgesättigt. Als primärer Antikörper wurde ein Maus-IgG (Verdünnung 1:500 in PBS) verwendet. Dieser bindet mit dem Fc-Teil an das von *S. aureus* auf der Oberfläche exprimierte Protein A. Es wurden je Glasscheibchen 30µl Antikörperlösung auf Parafilm in der feuchten Kammer aufgebracht. Dann wurden die Zellen über 1 Stunde mit dem Antikörper inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen nochmals 3 x für 5 Minuten in PBS gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde ein Anti-Maus-Antikörper verwendet (Verdünnung 1:200 in PBS). Dieser Inkubationsschritt erfolgte ebenfalls wie beim primären Antikörper in der feuchten Kammer und dauerte 45 Minuten. Nach einem Waschschrift 3 x 5 Minuten in PBS wurden die Zellen 4 Minuten im eiskalten Aceton bei -20°C permeabilisiert. Nun wurden die Glasscheibchen in der feuchten Kammer über 30 Minuten mit Rhodamin-Phalloidin (Verdünnung 1:50) inkubiert, um das Aktin-Zytoskelett zu färben.

Abschließend wurden die Zellen abschließend 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen und mit 3µl Mowiol auf einem Glasobjektträger eingebettet. Die Versiegelung erfolgte

durch Aufbringen von farbneutralem Nagellack. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

### **Anfärbung der Bakterien mit LIVE-DEAD- BacLight™ Kit**

Bei dem LIVE-DEAD- BacLight™ Kit handelt es sich um die Kombination von zwei Farbstoffen wie unter 4.2.5 beschrieben. Es wurde das Kit L7012 für Mikroskopie verwendet. Die Versuchslösungen wurden gefroren bei -20°C gelagert.

Für die erste Versuchsreihe wurden jeweils 3µl SYTO9 und Propidiumiodid in einem Reaktionsgefäß gemischt und dann für die Färbungen 1:333 fach auf 2 ml vorgewärmtes PBS verdünnt.

Für die zweite Versuchsreihe erfolgte eine getrennte Verdünnung von jeweils 3µl SYTO9 beziehungsweise 3µl Propidiumiodid in jeweils 1ml vorgewärmtem PBS.

Zu Beginn des Versuches wurde eine Bakterienkultur des zu untersuchenden Stammes im jeweiligen Nährmedium über 12-24 Stunden bebrütet und anschließend in Nährmedium auf die benötigte optische Dichte verdünnt. Nach Zentrifugation über fünf Minuten bei 14.000 U/min wurde das entstandene Bakterienpellet in 2ml sterilen PBS resuspendiert. Anschließend wurden mit der Infektionslösung Endothelzellen auf Glasscheibchen wie unter 4.3 beschrieben infiziert und inkubiert.

Es wurden die Zellen in der ersten Versuchsreihe zuerst mit Formaldehyd fixiert, dann in eiskaltem Aceton über eine Minute permeabilisiert und in einer feuchten Kammer über 30 Minuten mit der kombinierten Färbelösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Einbettung in Mowiol auf einem Objektträger und die mikroskopische Auswertung.

In der zweiten Versuchsreihe wurde die Infektionslösung vor der Infektion der Zellen mit SYTO9-Lösung gefärbt. Nach der Infektion der Zellen mit den gefärbten Bakterien erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wie in der ersten Versuchsreihe. Daran schloss sich eine Färbung der Zellen mit Propidiumiodid in einer feuchten Kammer an.

### **4.3.7 Videomikroskopie**

Zur *In vivo*- Beobachtung der Aufnahmekinetiken und zur Darstellung der Bakterien in lebenden Zellen stand ein computergestütztes Fluoreszenzmikroskop zur Verfügung. Sämtliche Beobachtungen an unfixierten Zellen entstanden mit Hilfe des „*Ultra View Confocal Live Cell Imaging Systems*“ (Fa Perkin Elmer Rodgau-Jügesheim, Deutschland).

Die Experimente an den Zellen erfolgten dabei in einer Inkubationskammer, Modell „*Inkubator Controller*“ (EMBL, Heidelberg) bei konstanten 37° C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Mikroskopanlage bestand aus einem Umkehrmikroskop Eclipse TE 300 „*spinning disc Invers*“ (Fa. Nikon, Düsseldorf) mit einem Objektiv von Nikon PlanApo 100x/1,4, welches mit einer Quecksilber-Kurzbogen-Lampe HBO (Fa Osram, München) verbunden war. Des Weiteren war das Gerät mit 2 verschiedenen, mit Edelgasen betriebenen Laseranlagen ausgestattet, um verschiedene Exzitationsmaxima bei 568nm (grüne Fluoreszenz) und 488nm (rote Fluoreszenz) ausnützen zu können. Es handelte sich um folgende Laseremitter: Ion laser serie 43; 568/647: Krypton, 488/514: Argon (Fa. Melles-Griot, Carlsbad, USA). Die Einstellungen der Laser waren wie im Folgenden beschrieben konfiguriert: 568: 607/45nm, 488: 525/50 nm Bandpass. Zum Umschalten zwischen den verschiedenen Wellenlängen wurde eine optischer *shutter-driver*, Modell Lambda 10-2 (Fa. Sutter Instruments, Navato, USA) verwendet. Die Aufzeichnung von Bildern und Filmen erfolgte mittels einer „*Scan interline digital*“ CCD – 3 Chip – Kamera Modell Orca ER (Fa. Hamamatsu, Herrsching) in einer Auflösung von 1344x1024 Pixel, als 12-bit-TIFF-Images aufgenommen. Es wurde als Aufnahme- und Visualisierungsquelle die „*Ultra-View Software*“ Version 5.5.0,2, von Perkin Elmer verwendet. Die Adaptation der Zellen erfolgte auf Glasbodenschälchen (Fa. MatTek, Ashland, USA). Dazu wurden je Glasbodenschälchen  $2 \times 10^4$  –  $3 \times 10^4$  Zellen ausgesät und bis zur Konfluenz bebrütet. Danach erfolgte wahlweise die Transfektion mittels YFP-Konstrukt wie vorher beschrieben oder die Einbringung von LysoTracker in das ECBM der Glasbodenschälchen.

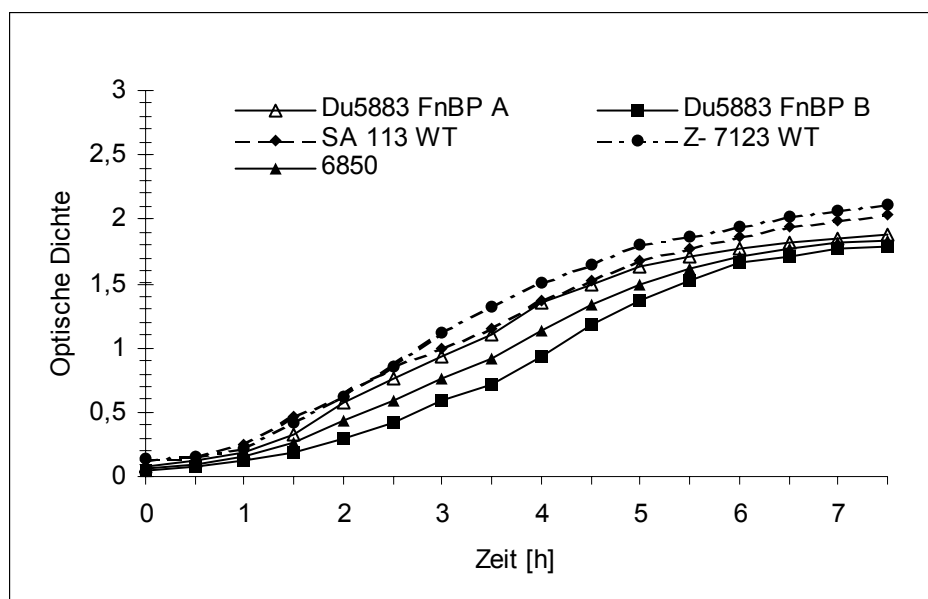
Die *in-vivo*- Aufnahmen wurden je nach Experiment in einem Zeitrahmen von ca. 10 Minuten bis 1,5h erstellt.

## 5. RESULTATE

### 5.1 Auswahl des geeigneten Stammes und Festlegung der Inkubationszeiten

Um einen geeigneten Staphylokokkenstamm für die Versuche zu finden, wurden mehrere Stämme aus der Stammsammlung der Abteilung Bakteriologie des Max-von-Pettenkofer-Institutes auf ihre Wachstumseigenschaften untersucht. Zusätzlich sollte der optimale Zeitpunkt zur Entnahme der Infektionsprobe aus den Kulturansätzen bestimmt und das Wachstumsverhalten der einzelnen Stämme dokumentiert werden.

Hierbei wurden zuerst bereits gut in ihrem Wachstum charakterisierte Stämme wie Du5883 FnBP-A und -B (**F**ibron**e**ctin-**b**indendes **P**rotein) gegen den JB1-Vaterstamm 6850 getestet. Diese Stämme zeigten ein vergleichbares Wachstum im LB-Medium. (Abb. 5.1a)

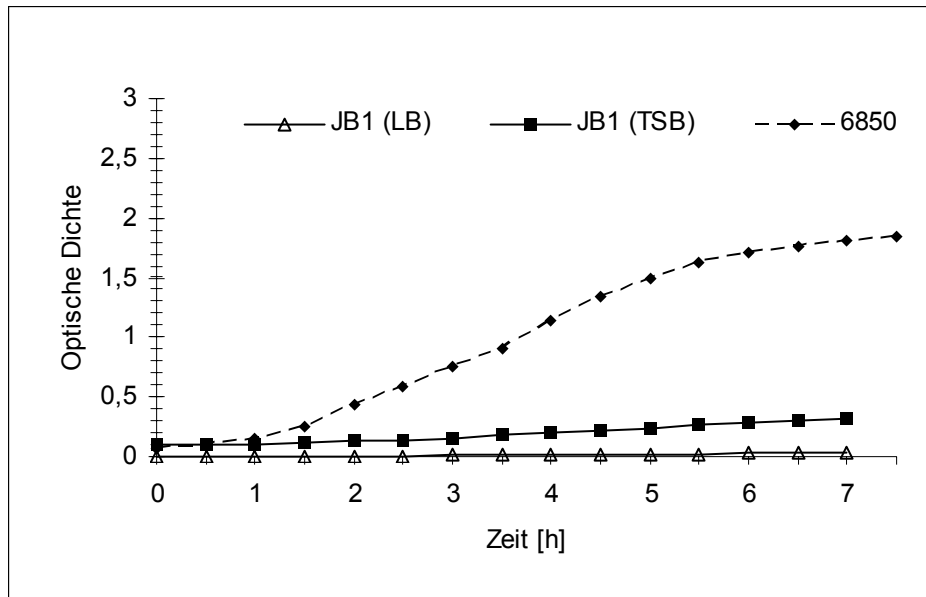


**Abbildung 5.1a Wachstumsverhalten verschiedener *S. aureus* – Stämme**

Die Abbildung zeigt die Wachstumsraten der Bakterienstämme Du5883 FnBP-A, Du5883 FnBP-B, SA 113 WT, Z-7123 WT und 6850 in LB-Medium. Der maximale Beobachtungszeitraum betrug 7,5 Stunden. Man erkennt den Übergang in die exponentielle Wachstumsphase nach einer Stunde und den Übergang in die Plateauphase ab 6 Stunden. Die Wachstumskinetik der Stämme ist dabei gleich.

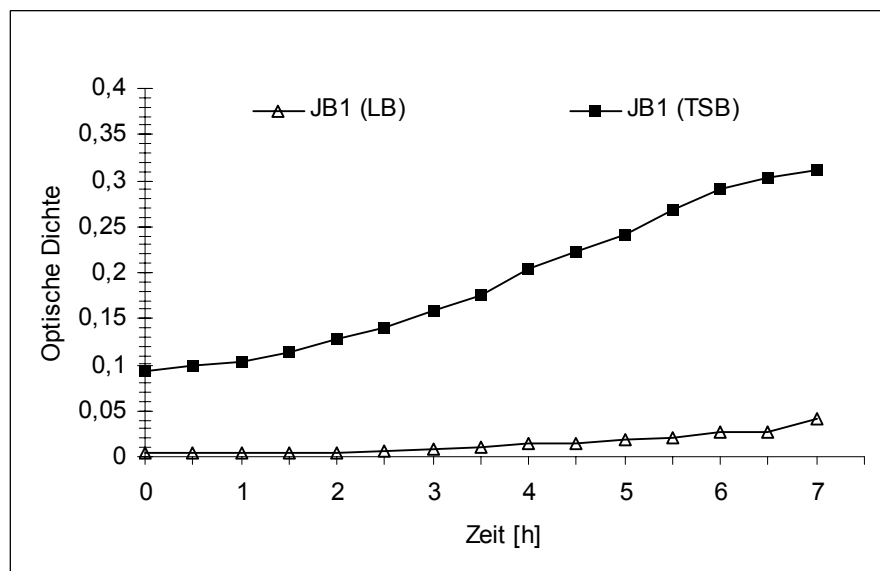
Der nächste Schritt bestand darin, den Vaterstamm 6850 mit der aus ihm hervorgegangenen Mutante JB1 zu vergleichen (Abb. 5.1b). Hierbei fiel auf, dass die Mutante im Gegensatz zum Vaterstamm deutlich langsamer wuchs. Dies konnte durch wiederholte Messung objektiviert werden. Zudem war zu beobachten, dass durch das Nährmedium TSB eine leichte Steigerung des Wachstums des Stammes JB1 erzielt werden konnte (Abb. 5.1c). Während der Vaterstamm 6850 das gleiche

Wachstumsverhalten wie die vorher getesteten Nicht-Zwergkolonievarianten zeigte, konnte man bei den Versuchsansätzen mit JB1 einen Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase erst ab 3,5 Stunden erkennen.



**Abbildung 5.1b Wachstumsverhalten von *S. aureus* JB1 und 6850**

Die Abbildung zeigt den Vaterstamm 6850 in LB-Medium verglichen mit der Mutante JB1 in LB und in TSB (Angabe in Klammern). Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus drei Experimenten. Der maximale Beobachtungszeitraum betrug 7,5 h.

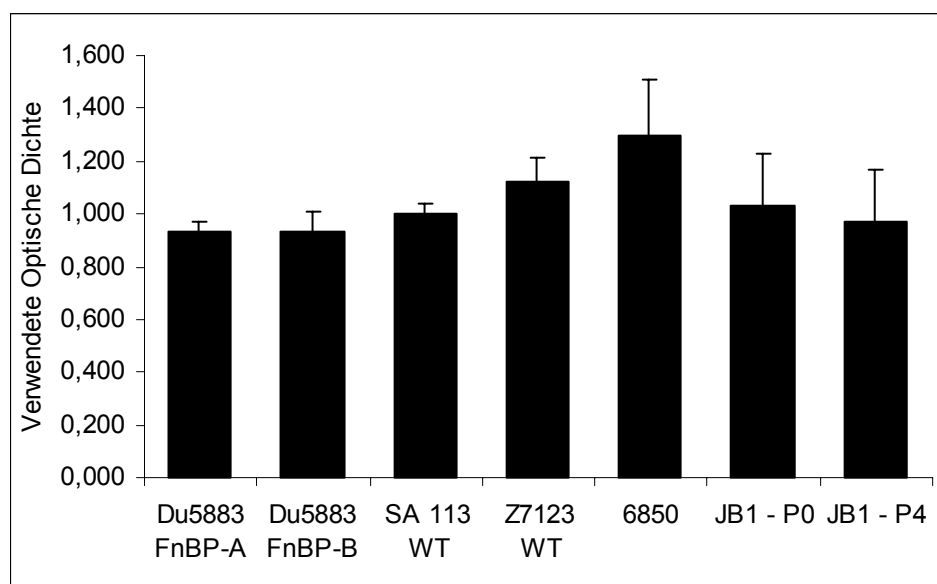


**Abbildung 5.1c Wachstumsverhalten von JB1 in verschiedenen Kulturmedien**

Die Abbildung zeigt den Unterschied im Wachstumsverhalten des Stammes JB1 in LB- und TSB-Medium während der Bebrütung über mindestens 7 Stunden. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus drei Experimenten.

Die Stämme JB1 und IIb13 zeigten aufgrund ihrer Eigenschaft als Menadion-, beziehungsweise Heminmangelmuranten erst nach etwa 3,5 Stunden einen Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase, so dass diese Stämme anstatt nur über 12 Stunden über mindestens 24 Stunden bebrütet werden mussten, um die für die Versuche nötige optische Dichte zu erreichen. Da die Stämme dann, bei längerer Bebrütung, jedoch ebenfalls eine maximale OD von 2,0 erreichten, war anzunehmen, dass nur die Wachstumsgeschwindigkeit der Stämme vermindert war und nicht die maximal erreichbare absolute Keimzahl.

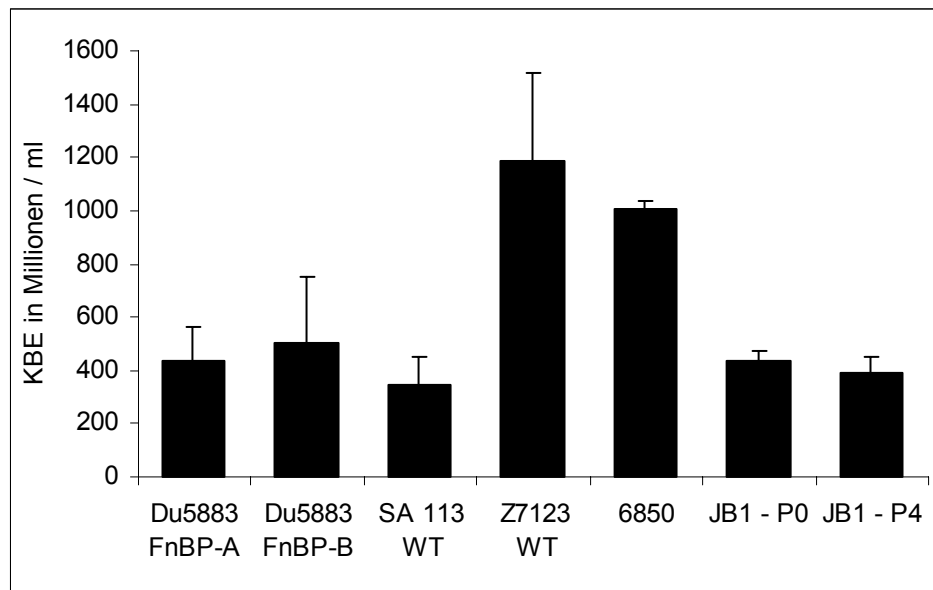
In den Abbildungen 5.1d und 5.1e sind die absoluten Zahlen in Millionen KBE /ml bei der zur Infektion eingesetzten optischen Dichte der 12- beziehungsweise 24-Stundenkulturen dargestellt. Aus den jeweils relevanten Anzahlen wurden die Mittelwerte gebildet und der resultierende Wert als Richtwert für die Berechnung der Infektionsdosen für jeden Stamm zugrunde gelegt. Da die langsam wachsenden Stämme JB 1 – P0 bis JB1 – P4 wie vorhin erwähnt ebenfalls die maximale OD erreichten, wurde dieser Richtwert auch bei den Versuchen mit diesen Mangelmutanten verwendet.



**Abbildung 5.1d Für die Versuche verwendete Optische Dichten bei 600nm (OD<sub>600</sub>)**

Die Abbildung zeigt die bei den Wachstumskurven und später auch bei den Infektionsversuchen angestrebten und eingesetzten optischen Dichten. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von mindestens 3 Experimenten. Die Standardabweichungen sind als Fehlerindikator angegeben.





**Abbildung 5.1e Absolute Keimzahlen bei der zugehörigen  $OD_{600}$**

Die Abbildung zeigt zu den jeweiligen optischen Dichten aus Abbildung 5.1d die jeweilige absolute Keimzahl. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von mindestens 3 Experimenten. Die Standardabweichungen sind als Fehlerindikator angegeben.

## **5.2 Wiederauffinden von verschiedenen SCV nach deren Aufnahme in primäre menschliche Endothelzellen**

Wie unter 3. beschrieben, bestand das Ziel dieser Arbeit darin, nach Infektion von HUVEC die Überlebensfähigkeit der Keime quantitativ zu dokumentieren und die Reifung der Phagosomen, welche *S. aureus* enthielten zu verfolgen. Weiterhin sollte damit der Ort bestimmt werden, an dem die Keime innerhalb der Zelle überleben konnten.

Um SCV von *S.aureus* zu identifizieren, welche in der Lage sind, über einen Zeitraum von 24 bis 48 Stunden in primären humanen Endothelzellen zu überleben und um deren intrazelluläre Lokalisation zu bestimmen, wurde eine Versuchsanordnung etabliert, mit deren Hilfe es möglich war, verschiedene SCV – Stämme an konfluente einreihige Zellschichten von Endothelzellen (so genannte „monolayers“) aus menschlichen Nabelschnurzellen anzuheften und das Eindringen der Bakterien in die Zellen zu ermöglichen.

Für diese Infektionsversuche wurde ein Infektionsverhältnis: Bakterien zu Endothelzelle von 100 Bakterien pro Endothelzelle verwendet, um SCV- Stämme zu identifizieren, welche auch in großer Menge nicht toxisch für die Zellen waren und somit auch für längere Zeitpunkte von 48 Stunden bis sieben Tage zur Beobachtung innerhalb der Endothelzellen zur Verfügung standen.

Die Tabelle 4.2.1 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme. Es handelt sich hierbei um die *S. aureus* Wildtypen 8325-4, 6850 und Z-7123, die „Small colony variants“ CF2, CF5, I10, IIb13 und JB1 (Balwit et al., 1994; Vadaux et al., 2002; von Eiff et al., 1997), die Revertanten A2 und KM4 sowie einen *S. carnosus* Stamm, welcher FNBP-A exprimiert. Dabei handelt es sich um ein Protein, welches die Adhäsion an die Zellmembran vermittelt und bei der Aufnahme durch die Endothelzellen beteiligt ist (Sinha et al., 2000).

Hierbei erwiesen sich die Stämme CF2, 6850, IIb13, KM4 und Z-7123 als toxisch. Diese Toxizität zeigte sich dadurch, dass sich die Zellen teilweise schon in einem Zeitfenster von 15 bis 30 Minuten von der Gelatinematrix am Boden des Kulturgefäßes ablösten und sich innerhalb von 3 – 5 Stunden komplett auflösten.

Auf mikroskopischer Ebene konnten typische Ausstülpungen der Zellmembran, so genanntes „blebbing“ beobachtet werden. Diese Wirkungen wurden bereits in verschiedenen Arbeiten insbesondere bei dem Stamm 6850 beschrieben. Es zeigten sich hierbei innerhalb der ersten 3,5 Stunden Schäden am Endothelmonolayer (Balwit et al., 1994).

Die Stämme CF5, 8325-4, I10, A2, JB1 und *S. carnosus* FNBP-A riefen andererseits selbst bei einem Verhältnis von über 100 Bakterien pro Endothelzelle keine solchen Veränderungen hervor.

Interessanterweise stellte sich die hemB-Mutante IIb13 wie ihr Vaterstamm 6850 als zytotoxisch dar, wohingegen der für Menadion auxotrophe Stamm JB1, welcher ebenfalls von 6850 abstammt, nicht dieses Verhalten zeigte. Folglich scheinen wie vorher angenommen manche SCV, welche sich aus dem gleichen genetischen Material durch unterschiedliche Mutationen entwickelt hatten, weniger Virulenzfaktoren zu produzieren als ihre Vaterstämme (Balwit et al., 1994; Proctor et al., 1995).

Innerhalb dieser Versuchsreihen wurden aus Nabelschnüren gewonnene HUVEC mit dem zu testenden Bakterienstamm in dem zuvor definierten Verhältnis 100 Bakterien zu 1 Endothelzelle infiziert. Um bei den Versuchsreihen eine Standardisierung für die Anheftung an die Endothelzellen und für den folgenden Aufnahmevorgang zu erreichen, wurde die Zeit für die Infektion auf eine Stunde limitiert. Hierauf erfolgte eine Elimination der frei extrazellulären und zelladhärenten Bakterien mittels Lysostaphin und Gentamicin.

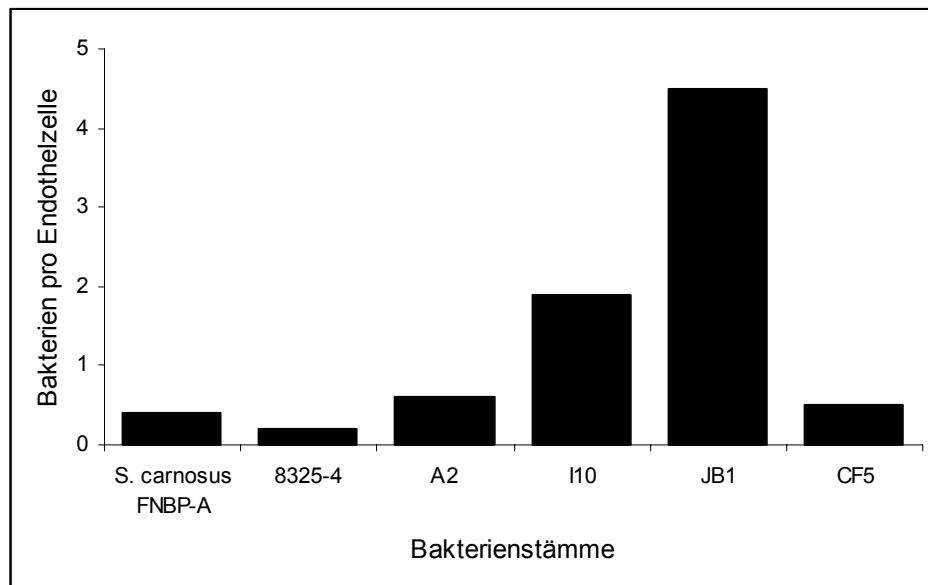
Dabei handelt es sich bei Lysostaphin um ein Protein, welches Zellwandbestandteile von Staphylokokken spaltet, und bei Gentamicin um ein Antibiotikum, welches auf die Proteinbiosynthese der Bakterien wirkt. Beide Stoffe werden nur in Spuren in Endothelzellen aufgenommen und beeinträchtigen so hauptsächlich die extrazellulären Keime.

Die weitere Kultivierung der infizierten Zellen wurde für 5, 24 beziehungsweise 48 Stunden weiterhin in Anwesenheit von extrazellulär hohen Konzentrationen der bakteriziden Substanzen fortgeführt. Diese Vorgehensweise stellte sicher, dass kein extrazelluläres Wachstum stattfinden konnte, was sowohl durch die Sterilität des Kulturüberstandes als auch durch Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen wurde.

Nach 5, 24, 48 Stunden sowie in einer getrennten Versuchsreihe nach 15, 30, 45 und 60 Minuten, wurden das extrazelluläre Milieu neutralisiert und jegliche intrazelluläre Bakterien durch Lyse der Endothelzellen mittels des Detergens Triton X-100 freigesetzt. Zuvor war durch einen Versuch abgesichert worden, dass diese kurze Exposition mittels des Detergens zwar in der Lage ist, die Zellmembranen von Endothelzellen aufzulösen, jedoch die Zellwände der Bakterien nicht signifikant beeinträchtigte. Im weiteren Verlauf der Versuchsanordnung wurde die Lebensfähigkeit der Bakterien überprüft, indem das Zelllysate nach entsprechender Verdünnung auf Blutagarplatten ausgestrichen wurde. Daraufhin erfolgte die Bebrütung der Platten über mindestens 12 Stunden.

Als 100%-Bezugspunkt für die prozentualen Überlebenswerte wurde eine Infektionskontrolle eingeführt. Hierbei wurde das Infektionsmedium direkt nach der OD-Messung in Verdünnungsreihen überführt und in mindestens drei Verdünnungen auf Blutagarplatten ausgestrichen wurden. Es folgte die Bebrütung über 12 Stunden und die Auswertung mittels eines automatisierten Koloniezählgerätes.

Es wurden etwa 100 Bakterien pro Endothelzelle zum Start der Versuchsanordnung eingesetzt. Davon konnten bei dem Stamm JB1 anfänglich nur etwa vier Bakterien pro Endothelzelle nach 24 Stunden wiedergewonnen werden. Die anderen Wildtyp- und SCV – Stämme zeigten sogar noch ein niedrigeres Überleben. In der Tat waren die SCV – Stämme I10 und CF5 nicht signifikant widerstandsfähiger gegen das intrazelluläre Milieu als der Wildtypstamm 8325-4. Diese zeigten ein mittleres Überleben von unter 0,5 Bakterien pro Endothelzelle (Abbildung 5.2a).



**Abbildung 5.2a. Rückgewinnungsrate mehrerer *S. aureus* / *carnosus* – Stämme im Vergleich**

HUVEC wurden mit den angegebenen Staphylococccenstämmen in einem Verhältnis von 100 Bakterien pro Endothelzelle infiziert. Nach einer Stunde wurden die extrazellulären Bakterien entfernt und es erfolgte eine Weiterkultivierung der HUVEC bei 50µg/ml Gentamicin und 20µl/ml Lysostaphin für 23 Stunden. Anschließend erfolgten die Lyse der Bakterien und der quantitative Ausstrich auf Blutagarplatten. Jeder Balken entspricht dem Mittelwert von 2 Experimenten

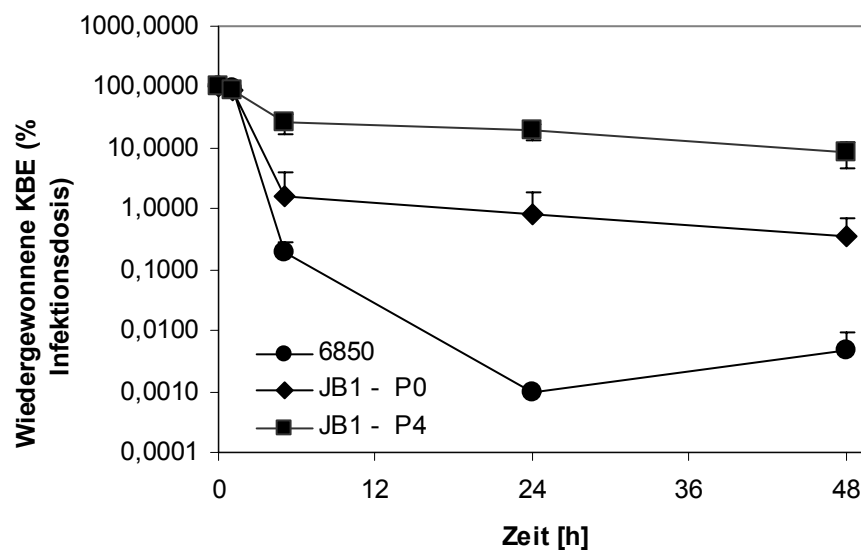
Diese Methode zeigte deutlich, dass Staphylokokken bei oder nach deren Aufnahme von den Zellen überaus effektiv eliminiert werden können. In unseren Experimenten zeigten der Vaterstamm 6850 sowie die Ausgangsmutante JB1-P0 gegenüber der neu gewonnenen Mutante JB1-P4, welche mehrere Passagierungen in Endothelzellen durchlaufen hatte und damit an die Zellen angepasst war, ein signifikant schlechteres Überleben (s. Abbildung 5.2b)

Mit Hilfe von Versuchsreihen, welche sich über ein Zeitfenster bis 48 Stunden erstreckten, war es uns möglich zu beweisen, dass die maximale Abtötung der Bakterien durch die Endothelzellen schon innerhalb der ersten 5 Stunden stattfindet. Weniger als 0,1% der Infektionsdosis der 6850 – Bakterien und weniger als 1% der Infektionsdosis der JB1-P0 – Bakterien konnten nach fünf Stunden wiedergewonnen werden. Zum anderen konnten wir bestätigen, dass die Klone des Stammes JB1 – P4 auch von diesem Abtötungseffekt betroffen sind, trotzdem aber einen deutlichen Überlebensvorteil gegenüber dem Vaterstamm 6850 und der Ausgangsmutante JB1 – P4 besitzen.

Diese Rückgewinnungsrate aller Stämme nahm bis 48 Stunden stetig ab. Während die überlebenden Bakterienklone bei den Stämmen 6850 und JB1 – P0 bereits nach 24 Stunden am unteren Rand der Messbarkeit angelangt waren, konnten, wurde im

Vergleich dazu die Überlebensfähigkeit des Stammes JB1 – P4 zwischen fünf und 48 Stunden auf immer noch hohe Werte von 25 bis 10 Prozent reduziert (s. Abbildung 5.2b)

Sogar nach 120 Stunden konnten immer noch 2% der Infektionsdosis wiedergewonnen werden, wohingegen bei den anderen Stämmen zu diesem Zeitpunkt keine lebenden Bakterien mehr nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt)



**Abbildung 5.2b Rückgewinnungsraten während der Versuche über 48 h**

Die Abbildung zeigt die wiedergewonnenen koloniebildenden Einheiten (KBE) zu 5, 24 und 48 Stunden in Anwesenheit von 50µg/ml Gentamicin und 20µl/ml Lysostaphin. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von mindestens 3 Experimenten. Die Standardabweichungen sind als Fehlerindikator angegeben. Wo diese fehlen, liegen diese innerhalb der Datenpunktmarkierungen.

### 5.3. Abtötung der Bakterien durch die Endothelzellen während der Früh- und Spätphase der Infektion

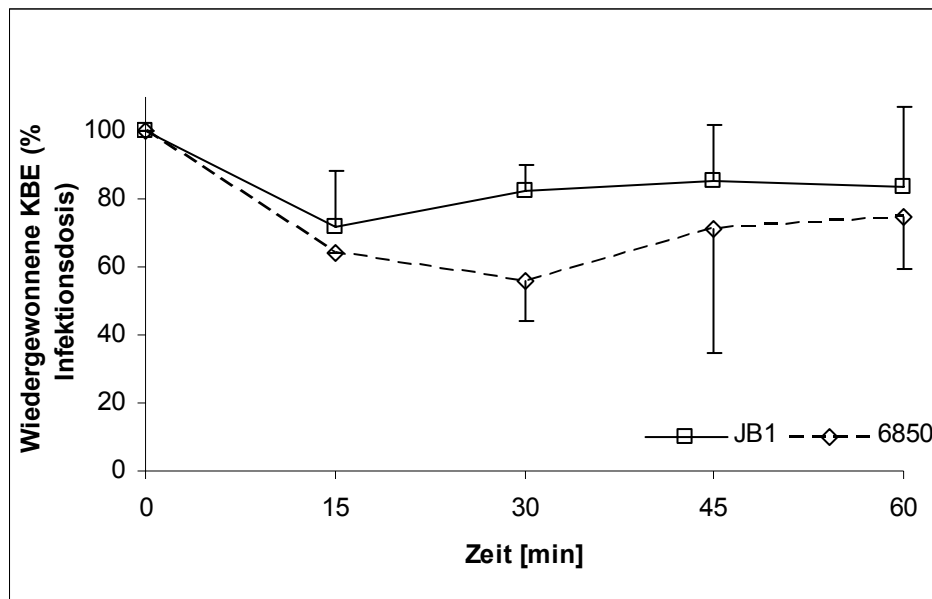
Wie im Kapitel 5.2 beschrieben, konnte beobachtet werden, dass bei den Versuchen über einen Zeitraum von bis zu 48 Stunden schon innerhalb der ersten 5 Stunden die größte Elimination der Bakterien durch die Endothelzellen vorherrschte. In dieses Zeitfenster war auch schon die erste Stunde eingerechnet, in welcher sich die Bakterien an die Zellen anhefteten und darin eindringen. Da sich aber nach Stunden noch phasenkontrastmikroskopisch kokkoide Strukturen in den Endothelzellen befanden, war von Interesse, ob es sich dabei um lebende Bakterien oder bereits abgetötete, nicht kultivierbare Bakterienzellen, so genannte „*bacterial ghosts*“ handelte. Um extrazelluläre und intrazelluläre lebende und tote Bakterien zu

---

unterscheiden, versuchten wir das LIVE-DEAD *BacLight*<sup>TM</sup> Färbeprotokoll, welches zur Unterscheidung von lebenden und toten Keimen in Bakterienkulturen entwickelt wurde, auf infizierte konfluente Glasscheibchen in der Zellkultur anzuwenden. Leider stießen wir mit diesem Versuchsansatz auf nicht lösbare Probleme. Das erste Problem bestand darin, dass sich die beiden Farben SYTO 9 und Propidiumiodid nicht nur in die zu färbenden Bakterien einlagerten, sondern auch die Zellmembranen der lebenden Endothelzellen färbten, was dazu führte, dass das Fluoreszenzbild überstrahlt war und damit keine eindeutige Zuordnung der Fluoreszenzsignale zu Bakterienzellen möglich war. Eine Färbung über die Zellmembran hinweg war deshalb nicht möglich.

Eine weitere Schwierigkeit ergab sich daraus, dass die Endothelzellen und Bakterien für die Färbung nicht fixiert werden durften, um die Zellmembranen / -wände nicht zu beschädigen. Dies führte dazu, dass durch die Färbung zu viele Endothelzellen von den Coverslips abgelöst wurden, was eine schlechte Präparatqualität nach sich zog. Die nächste Überlegung bestand darin, die Bakterien vor der Infektion der Zellen zu färben. Dazu wurde der erste Farbstoff in das gereinigte Infektionsmedium gegeben und dann -nach Infektion- der zweite Farbstoff angewandt. Leider führte auch diese Methode nicht zu einer Verbesserung der Präparatqualität, so dass dieser Nachweisweg sich als nicht praktikabel herausstellte und aufgegeben werden musste.

Weit praktikabler stellten sich die Experimente heraus, in welchen die Bakterien direkt auf Blutagarplatten ausplattiert wurden und quantitativ erfasst werden konnten. Diese Versuchsansätze waren in kurzen Zeiträumen logistisch schwer durchführbar, da parallel Versuchswerte genommen und die Versuchsansätze in die Verdünnungsreihen überführt werden mussten. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass innerhalb der ersten Stunde keine deutliche Reduktion der Keimanzahlen vorhanden war (s. Abbildung 5.3).



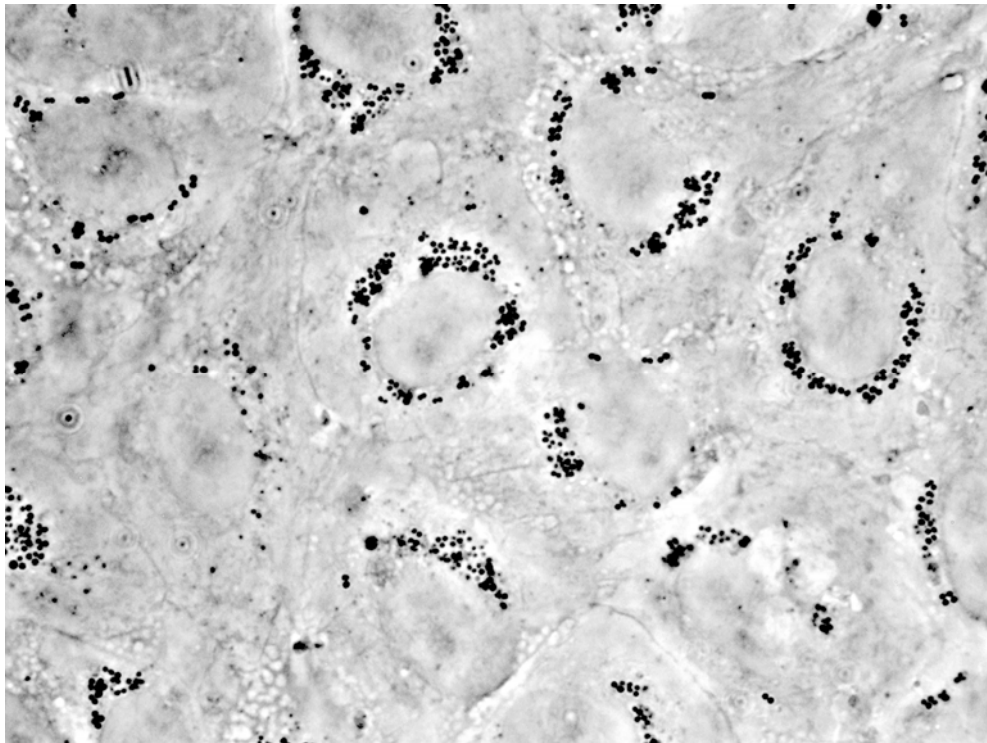
**Abbildung 5.3 Rückgewinnungsraten während der ersten Infektionsstunde**

Die Abbildung zeigt die prozentuale Rückgewinnung von koloniebildenden Einheiten (KBE) in einem Zeitfenster von 60 Minuten zu Messpunkten von jeweils 15 Minuten. Dazu wurden HUVEC mit den Stämmen JB1 und 6850 in einem Verhältnis von 100 Bakterien pro Endothelzelle infiziert. Die Bebrütung während der Stunde erfolgte ohne Anwesenheit von antimikrobiellen Stoffen in Basalmedium. Jeder Meßpunkt entspricht dem Mittelwert von 2 Experimenten, die Standardabweichungen sind zur besseren Übersicht einmal mit + (JB1) und mit – (6850) gekennzeichnet.

#### **5.4 Adaptation des SCV-Stammes JB1 an intrazelluläres Überleben**

Wie vorher beschrieben, konnten zu Beginn nur etwa 4% der initialen Infektionsdosis des SCV – Stammes JB1 in unserem Versuchsaufbau wieder gewonnen werden.

Wir konnten jedoch mittels Phasenkontrasmikroskopie verifizieren, dass unmittelbar vor dem Zeitpunkt der Endothelzellyse zwischen 70-90 kokkoide Strukturen intrazellulär lokalisiert waren. (Abbildung 5.4.a)



**Abbildung 5.4.a** Phasenkontrastaufnahme von mit *S. aureus* JB1 infizierten Endothelzellen

Phasenkontrastaufnahme von, in Formaldehyd fixierten, Endothelzellen, welche mit *S. aureus* JB1 infiziert sind. Erkennbar ist das perinukleäre Verteilungsmuster von etwa 70-90 kokkoiden Strukturen pro Endothelzelle, welche den Bakterien entsprechen.

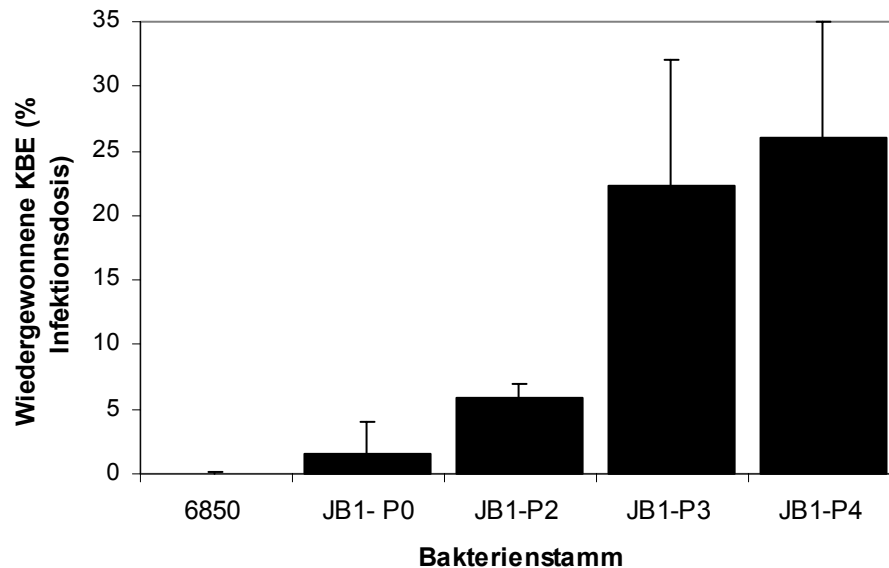
Deshalb schätzten wir, dass der Prozentsatz von lebenden, intrazellulären Bakterien ungefähr 5% betrug, was unzulänglich war, um die Lokalisation von lebenden Bakterien von der Lokalisation von toten Bakterien zu unterscheiden. Um daher die intrazelluläre Lebensfähigkeit zu steigern, bezeichneten wir die Ausgangsmutante *S. aureus* JB1 nun als unpassagierte Variante JB1-P0 und setzten den SCV-Stamm bis zu vier Zyklen dem intrazellulären Milieu der Endothelzellen aus.

Während bei der Passage P0 wie oben beschrieben nur 4% der eingesetzten Bakterien nach den ersten 5 Stunden wiedergewonnen werden konnten, stieg der Prozentsatz schon bei der zweiten Passage P2 auf über 5%. Der stärkste Anstieg der Überlebensfähigkeit konnte zwischen den Passagen P2 und P3 auf über 22% überlebende Keime verzeichnet werden. Des Weiteren brachte eine weitere Passagierung zu Passage P4 noch eine weitere Steigerung auf über 26% überlebensfähige Keime mit sich (Abbildung 5.4b).

Dies entspricht einer etwa 15 fachen Verbesserung der Überlebensfähigkeit gegenüber dem Ausgangsstamm JB1-P0 und einer etwa 300 fachen Verbesserung gegenüber dem Vaterstamm 6850.



Eine anschließende Passagierung auf P5 brachte hingegen keine weitere Steigerung mit sich, so dass davon auszugehen war, dass die maximale Überlebensfähigkeit innerhalb dem intrazellulären Milieu bei der Stammvariante JB1-P4 erreicht war (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 5.4b Darstellung der prozentualen Rückgewinnungsrate von *S. aureus* – Stämmen**

HUVEC wurden mit *S. aureus* 6850 und JB1 infiziert. Die Mutanten JB1-P2, JB1-P3 und JB1-P4 entstanden durch 2,3 oder 4 Zyklen einer siebentägigen Passagierung in Endothelzellen in Anwesenheit von 50µg/ml Gentamicin und mindestens 20µl/ml maximal 50µl/ml Lysostaphin. Die Gewinnung der Bakterien erfolgte jeweils am Ende des siebentägigen Zyklus durch Lyse der Endothelzellen mit Triton-X100 und Ablösung mittels Cellscrapper. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert von mindestens 3 Experimenten. Die Standardabweichungen sind als Fehlerindikator angegeben.

Die Passagierung der SCV-Stämme erfolgte hierbei wie vorher beschrieben.

Um auch den Vaterstamm 6850, welcher sich bei einem Infektionsverhältnis von 100:1 zytotoxisch darstellte, mit einzuschließen zu können, war es nötig, hier das Verhältnis Bakterien zu Endothelzelle auf 10 zu 1 zu reduzieren.

Dieses Infektionsverhältnis von 10:1 wurde durch Exposition der Endothelzellen mit verschiedenen Infektionsdosen zu 50, 40, 30, 20 und 10 Bakterienzellen pro Endothelzelle im Doppelinfektionsversuch bestimmt.

Einschlusskriterium für die späteren Infektionsversuche war hierbei ein über mindestens 5 Stunden phasenkontrastmikroskopisch intakter Monolayer der Endothelzellen bei den Versuchen zur Dosissuche.

Bei einem Infektionsverhältnis von 10 blieb der Monolayer über mindestens 5 Stunden intakt. Bei 10 bis 20 Bakterien pro Endothelzelle zeigten sich bereits geringe Schäden im Monolayer, was an Ausstülpungen (blebbing) der Endothelzellmembran

zu erkennen war. Versuche mit Infektionsdosen von 20 bis 50 Bakterien pro Endothelzelle erbrachten schließlich eine schnelle Destruktion des Monolayers.

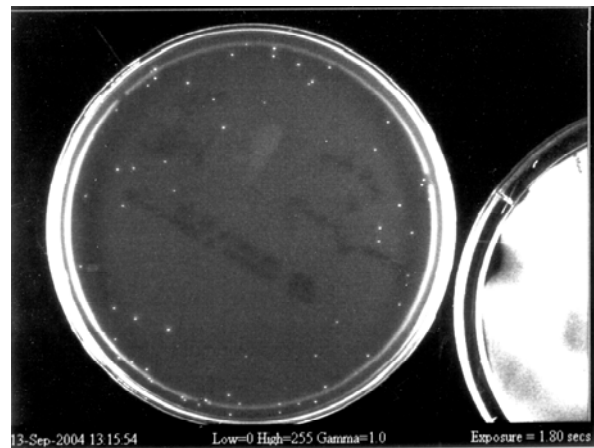
Wahrscheinlich wurde diese Destruktion von den Toxinen hervorgerufen, welche der zytotoxische Vaterstamm 6850 produziert.

Die Infektion durch die Bakterien konnte phasenkontrastmikroskopisch kontrolliert und bestätigt werden.

Zusätzlich erwarb der Stamm zunehmende Resistenzen gegen Lysostaphin und Gentamicin, so dass in Folge höhere Dosen des Enzyms Lysostaphin verwendet werden mussten, um eine Sterilität des extrazellulären Materials während der Versuche zu gewährleisten (Abbildungen 5.4c und 5.4d). Hierbei wurde die Dosis von anfänglichen 20µl/ml Medium sukzessive gesteigert, bis auch bei dem SCV-Stamm JB1 – P4 ein steriler Kontrollausstrich des Überstandes der Infektionsversuche zu beobachten war. Dazu musste die Dosis des Lysostaphins auf eine Konzentration von bis zu 50µl/ml Medium erhöht werden.



**Abbildung 5.4c**



**Abbildung 5.4d**

**Abbildungen 5.4c/d Kontrollproben der Versuchsüberstände bei Infektionsversuchen**

Es handelt sich jeweils um eine Kontrollprobe des Stammes JB1 – P0 (Abb. 5.4c) und JB1 – P4 (Abb. 5.4d) in Anwesenheit von 50µg/ml Gentamicin und 20µl/ml Lysostaphin. Man erkennt, dass sich bei einer Inkubation des Stammes JB1 – P0 über mindestens 12 Stunden keine Kolonien auf dem Blutagar gebildet haben. Dies spricht für eine vollständige Elimination der extrazellulären Keime.

Weiterhin ist ersichtlich, dass sich bei einer Inkubation des Stammes JB1 – P4 über denselben Zeitraum immer noch Kolonien auf dem Blutagar gebildet haben. Dies spricht für eine insuffiziente Elimination der extrazellulären Keime durch die verwendete Gentamicin- und Lysostaphinkonzentration. In der Folge der Infektionsversuche wurden die Dosen für Lysostaphin bis auf 50µl/ml angehoben, was einen sterilen Überstand zur Folge hatte.

### **5.5 Ein an Endothelzellen angepasster SCV – Stamm mit erhöhter Rückgewinnungsrate wird in Lysosomen nachgewiesen**

Um zu beweisen, dass die Bakterien auch wirklich von den Endothelzellen aufgenommen wurden und nicht extrazellulär proliferierten, wurde wie im Material- und Methodenteil beschrieben, Lysostaphin zum Inkubationsmedium hinzugefügt.

Dennoch strebten wir als weiteren Hinweis auf die intrazelluläre Lokalisation der Bakterien eine differentielle Anfärbung derselben innerhalb und außerhalb der Endothelzellen an. Um den Zeitpunkt bestimmen zu können, ab dem die meisten Bakterien in die Zellen aufgenommen waren, benutzten wir zunächst Rhodamin-Phalloidin, um das Zytoskelett der Zellen darzustellen und einen Mouse-IgG-Antikörper, welcher mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert war um die extrazellulären Bakterien darstellen. Da der IgG-Antikörper durch das in der Bakterienwand exprimierte Protein A am Fc-Teil gebunden und von der Zelle nicht aufgenommen wird, war es in Zusammenschau mit einem synchron aufgenommenen Phasenkontrastbild möglich, extrazelluläre von intrazellulären Bakterien zu unterscheiden. Durch Immunfluoreszenzfärbungen in verschiedenen Zeitfenstern konnten wir abschätzen, ab wann die meisten Bakterien in die Endothelzellen internalisiert worden waren. Diese Versuche wurden stellvertretend für die restlichen Stämme mit dem Stamm *S. aureus* SA-113WT durchgeführt. Die Aufnahmen belegten, dass die Aufnahme in die Zellen schon unter einer halben Stunde begann und nach einer Stunde weitestgehend abgeschlossen war. Nach zwei Stunden befanden sich so gut wie alle Bakterien intrazellulär.

Um zu erfahren, in welchem intrazellulären Kompartiment sich die lebensfähigen JB1-P4 befinden, benutzten wir eine M.O.I. von 30, denn dieses Vorgehen erlaubte es uns am besten, sowohl die Bakterien als auch intrazelluläre Membranstrukturen zu erkennen. Wenn man eine Rückgewinnungsrate von 25-30% der Inkubationsdosis nach fünf Stunden beim Stamm JB1-P4 zugrunde legt, folgt daraus, dass zu diesem Zeitpunkt etwa 8 der intrazellulär beobachteten Bakterien lebensfähig sind.

Zum Vergleich konnte man im Phasenkontrastbild ungefähr 30-40 kokkoide Formationen pro Endothelzelle erkennen (s. Abbildung 5.5a). Um nun zu beweisen, dass alle diese kokkoiden Strukturen tatsächlich intrazellulär waren, führten wir eine Innen/Außen – Färbung durch (Wiedemann et al., 2001). Mit dieser Technik werden zuerst extra- und intrazelluläre Bakterien grün und danach extrazelluläre Bakterien rot gefärbt. Durch Überlagerung der grünen und roten Fluoreszenz ergibt sich für die

extrazellulären Bakterien eine gelbe Fluoreszenz wobei die Intrazellulären Bakterien immer noch eine grüne Fluoreszenz zeigen.

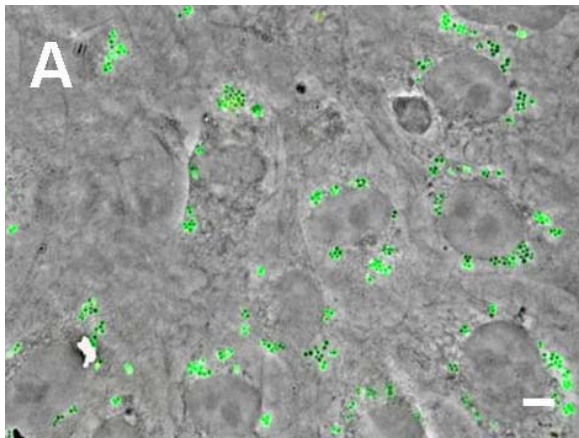


Abbildung 5.5a

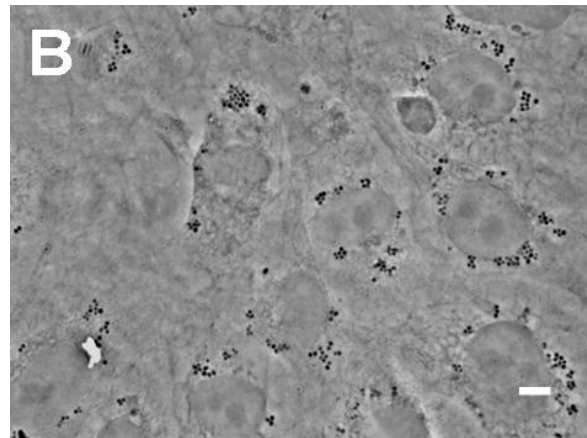


Abbildung 5.5b

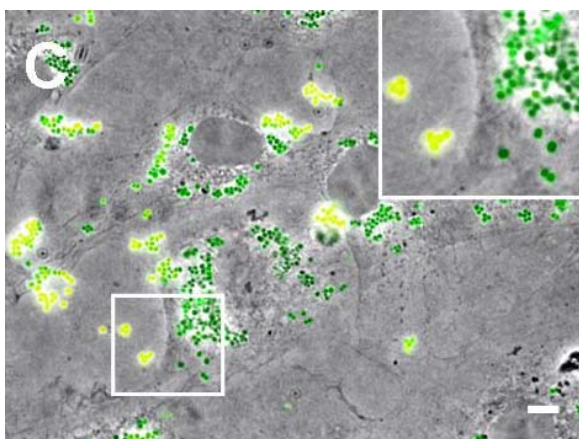


Abbildung 5.5c

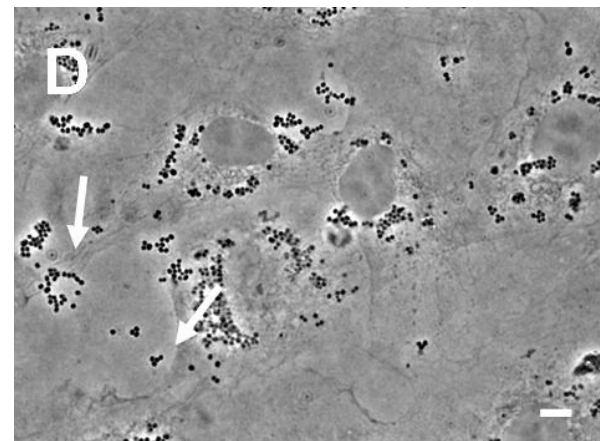


Abbildung 5.5d

**Abbildungen 5.5 a-b Innen/Außenfärbung von JB1 – P4 in/an humanen Endothelzellen in Anwesenheit von Lysostaphin und Gentamicin**

**Abbildungen 5.5c-d Innen/Außenfärbung von JB1 – P4 in/an humanen Endothelzellen in Abwesenheit von Lysostaphin und Gentamicin**

Die Abbildungen 5.4a-d stellen Endothelzellen dar, welche mit *S. aureus* in einem Verhältnis 30 Bakterien pro Endothelzelle JB1 – P4 infiziert wurden. Nach einer Stunde wurden die Zellen gewaschen und für 4h in Gegenwart oder Abwesenheit von 50µg/ml Gentamicin und 20µg/ml Lysostaphin weiter kultiviert um extrazelluläre Bakterien entfernen, bzw. den Effekte der bakteriziden Substanzen zu verifizieren (Abb. 5.5a/b), oder ohne diese antimikrobiellen Stoffe inkubiert (Abb. 5.5c/d). Mittels der speziellen Innen-Außenfärbung wurden Intrazelluläre Bakterien grün, und extrazelluläre Bakterien gelb dargestellt. Bei der Inkubation mit Gentamicin und Lysostaphin konnten nur intrazelluläre, grün gefärbte Bakterien nachgewiesen werden, welche sich um den Zellkern gruppieren. Dagegen waren ohne die beiden Stoffe auch extrazelluläre, gelb gefärbte, Bakterien zu sehen.

Die Abbildung 5.5a zeigt, dass in unserem Ansatz nach fünf Stunden ausschließlich grün gefärbte zellassozierte JB1 – P4 Bakterien zu sehen waren. Wenn jedoch Gentamicin und Lysostaphin nicht zum Wachstumsmedium zugesetzt wurden,

---

konnte man eine beträchtliche Anzahl von gelb gefärbten Bakterien erkennen (Abbildung 5.5c). Dies zeigt zum einen, dass unser Innen/Außenfärbungsprotokoll funktioniert und zweitens, dass die Umstände der Versuchsanordnungen zu den Infektionsversuchen jedes extrazelluläre Überleben der Bakterien ausschließen.

Des Weiteren beobachteten wir, dass sich aufgenommene und damit allein grün fluoreszierende Bakterien um den Zellkern gruppierten. Dieses Areal ist innerhalb der Zelle vorzugsweise mit Lysosomen belegt, was die Vermutung nahe legt, dass sich die intrazellulären Bakterien in den Lysosomen befinden. Dagegen kamen extrazelluläre Bakterien vorzugsweise an der Zellperipherie zu liegen oder waren ohne jeglichen Kontakt zu den Zellen nur am Glas der Glasscheibchen angeheftet.

Um nun die intrazelluläre Lokalisation von JB1-P0 mit der von JB1-P4 zu vergleichen und um etwaige Unterschiede oder Gemeinsamkeiten dahingehend aufzuzeigen, infizierten wir HUVEC mit beiden Stämmen über einen Zeitraum von fünf Stunden und behandelten diese anschließend mit LysoTracker, einer rot fluoreszierenden Sonde für saure Zellorganellen. Um zu bestätigen, dass sich die Bakterien und LysoTracker-positive Strukturen an derselben Stelle innerhalb der Zelle befanden, wurde jeweils ein Bild im Phasenkontrast- und roten Fluoreszenzmodus mit der Mikroskopkamera aufgezeichnet. Beide Bilder wurden anschließend mit Adobe Photoshop® 7.0 übereinander gelegt.



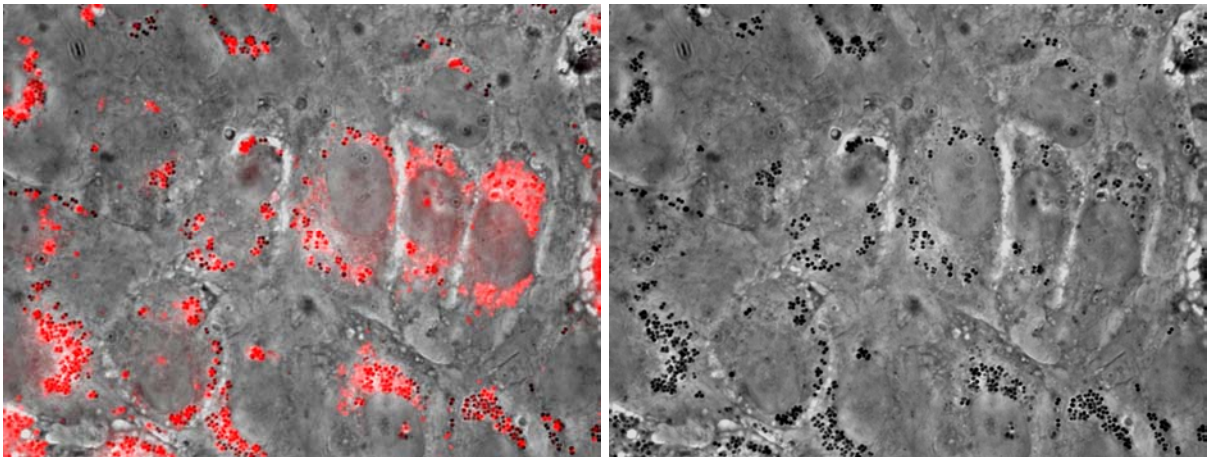


Abbildung 5.5e

Abbildung 5.5f

#### Abbildungen 5.5e/f Darstellung von LysoTracker-positiven Zellorganellen

Die Abbildungen 5.4e und 5.4f stellen Endothelzellen dar, welche mit *S. aureus* in einem Verhältnis 30 Bakterien pro Endothelzelle JB1 – P4 infiziert wurden. Nach einer Gesamtinfektionsdauer über 5 Stunden erfolgte die Entfernung des gentamicin- (50µg/ml) und lysostaphinhaltenen (20µg/ml) Mediums und es wurde die vorbereitete LysoTracker-Färbelösung für 30 Minuten auf die Zellen gegeben. Danach erfolgte die Fixierung für 5 Minuten in Formalin 3,4%. Die Abbildung 5.4f zeigt ein natives Phasenkontrastbild und die Abbildung 5.4e zeigt die rot kolorierten Lysosomen. Es stellt sich in der Zusammenschau beider Bilder eine deutliche Kolokalisation zwischen Bakterien und Lysosomen dar.

Die mikroskopische Auszählung zeigte, dass die Position von JB1-P0 oder JB1-P4 – Bakterien zu beinahe 100% mit der Lage der LysoTracker-positiven Strukturen übereinstimmte (Abbildung 5.5e).

Um weiterhin zu beweisen, dass es sich bei diesen Strukturen um Lysosomen handelt, wurden in einem weiteren Versuchsansatz Endothelzellen mit einem Vektor transfiziert, welcher ein gelb fluoreszierendes Fusionsprotein (YFP-LAMP-1) exprimiert. Dieses Protein besteht aus dem eigentlichen gelb fluoreszierenden Protein YFP und einem durch Versuche nachgewiesenen Marker für späte Endosomen und Lysosomen, genannt LAMP-1. Die transfizierten Zellen wurden über fünf Stunden mit JB1-P0 oder JB1-P4 infiziert, danach wurde die Kolokalisation der Bakterien mit YFP-LAMP-1 untersucht. Die Abbildungen 5.4g-i zeigen eine dreidimensionale Ansammlung von Kompartimenten, welche YFP-LAMP-1 positiv sind und Staphylokokken enthalten. Die gelbe Farbe stellt die komplette Überlagerung des LAMP-1 Kompartimentes (grün) und der markierten aufgenommenen Bakterien (rot) dar. Dies zeigt deutlich, dass alle Bakterien, die im Phasenkontrast im Referenzbild zu sehen sind, in LAMP-1-positive Areale eingebettet sind. Die Auszählung von JB1-P0 oder JB1-P4, die sich an derselben Stelle befinden wie diese Areale zeigte ähnliche Ergebnisse wie der Versuch mit LysoTracker, nämlich eine nahezu 100% Kolokalisation. Alles in allem liefern diese

Daten den Beweis, dass *S. aureus* SCV-Stämme, welche sich letztlich daran angepasst haben, in Endothelzellen zu überleben, die Fähigkeit besitzen, dem sauren Milieu der LAMP-1-positiven Lysosomen zu widerstehen.

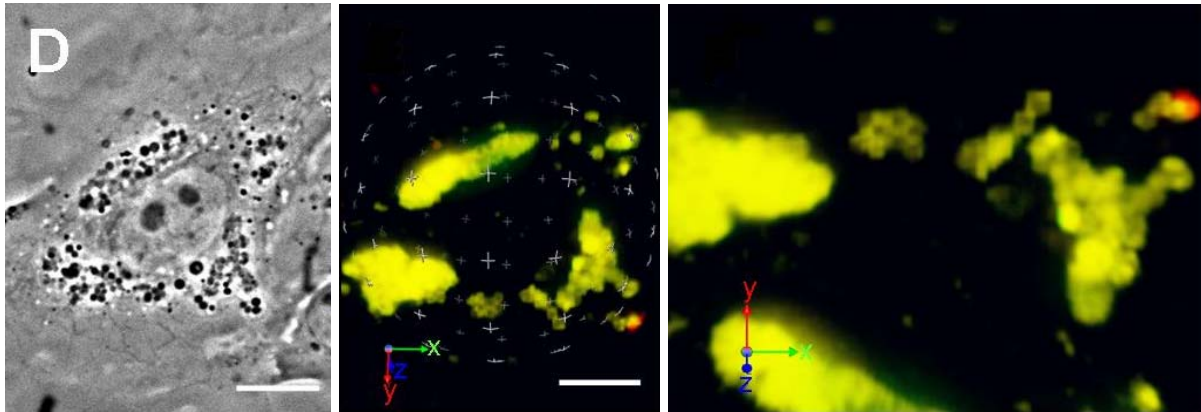


Abbildung 5.5g

Abbildung 5.5h

Abbildung 5.5i

#### Abbildungen 5.5g-i Darstellung von YFP-LAMP-1 positiven Zellorganellen

HUVEC wurden auf Glasscheibchen angezchtet wie unter im Material- und Methodenteil beschrieben. Es handelt sich bei Abbildung 5.4g um eine Phasenkontrastaufnahme einer lebenden Endothelzelle, welche JB1 – P4 internalisiert hat. Die Abbildung 5.4h stellt eine 3D-Rekonstruktion von Lysosomen dar. Diese Kompartimente sind mit YFP-LAMP-1 markiert und enthalten Bakterien, welche zuvor mit Alexa 568 markiert wurden. Die Perspektive ist mittels Achsangabe dargestellt. Der Meßbalken im rechten, unteren Bilderrand stellt eine Größe von 10µm dar. In der Abbildung 5.4i ist eine weitere Perspektive bei anderem Zoomfaktor dargestellt. Die gelbe Farbe resultiert aus der Überlagerung von YFP-LAMP-1 (wurde zur besseren Darstellung mittels Software grün eingefärbt) und den mit Alexa Fluor 568-markierten Bakterien (rotes Fluoreszenzmuster).

Die Auswertung von mehreren Bildausschnitten verschiedener Präparate ergab keine Unterschiede der Stämme JB1 – P0 und JB1 – P4 im Bezug auf die Verteilung innerhalb der Zellkompartimente. So konnten wir auf zwei Arten zeigen, dass sich die Bakterien zu über 98% in LysoTracker- und YFP-LAMP-1-positiven Organellen aufhielten (s. Abbildungen 5.5k und 5.5l).

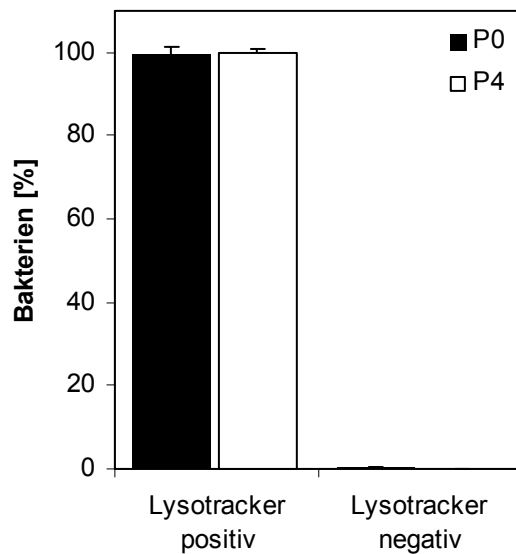


Abbildung 5.5k

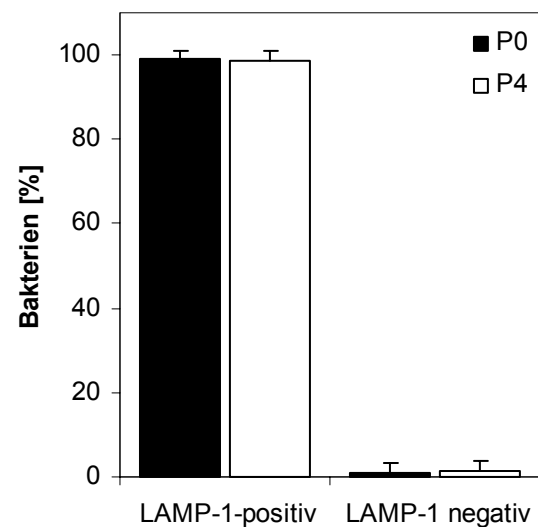


Abbildung 5.5l

**Abbildungen 5.5k/l Verteilung der Bakterien in/außerhalb von LysoTracker bzw. LAMP-1 positiven Zellorganellen**

Gezeigt ist die quantitativ erfasste Verteilung der Bakterien der Stämme JB1 – P0 und JB1 – P4 in Bezug auf Kolo-kalisation in LysoTracker- beziehungsweise LAMP-1-positiven Organellen. Die Auszählung erfolgte mikroskopisch.

Abbildung 5.5k: Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus 3 Experimenten und die Standardabweichung bei 2000 gezählten Bakterien.

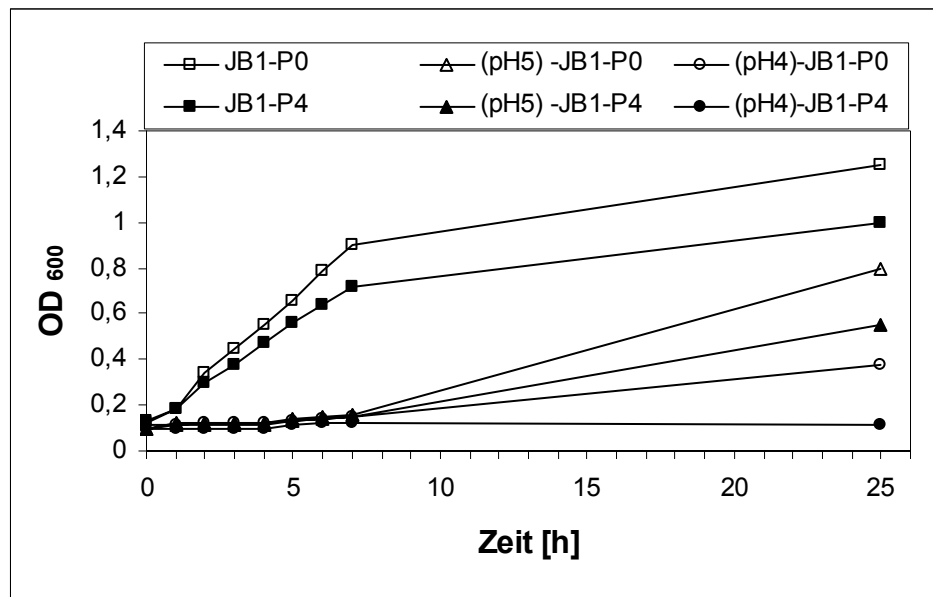
Abbildung 5.5l: Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus 3 Experimenten und die Standardabweichung bei 5000 gezählten Bakterien.

Da jedoch der Stamm JB1 – P4 eine deutliche höhere Rückgewinnungsrate zeigte als der unpassagierte Stamm JB1 – P0, muss der neue Stamm neue Merkmale entwickelt haben, um sich vor dem sauren Milieu der Lysosomen zu schützen.

Um zu untersuchen, ob bei den Stämmen JB1 – P0 und JB1 – P4 Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit oder der Empfindlichkeit gegenüber saurem pH bestanden, wurde eine pH-abhängige Wachstumskurve der Stämme JB1 – P0 und JB1 – P4 erstellt.

In der Abbildung 5.4m ist eine leichte Wachstumsverzögerung des Stammes JB1 – P4 gegenüber dem Stamm JB1 – P0 dargestellt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass beide Stämme in einer sauren Umgebung, wie sie in Lysosomen vorherrscht, dieselben Wachstumseinschränkungen aufweisen.





**Abbildung 5.5m. pH-abhängiges Wachstum der Stämme JB1 – P0 und JB1 – P4**

Übernachtskulturen von JB1 – P0 und JB1 – P4 wurden in TSB bei pH-Werten von 6,7 / 5 / 4 verdünnt. Anschließend erfolgte die Bebrütung in Flüssigkultur. Zu den ersichtlichen Zeitpunkten wurde jeweils die optische Dichte bei 600nm Wellenlänge gemessen. Gezeigt ist mit jeder Datenreihe jeweils eines von je 3 gleichartigen Experimenten.

Während die Stämme in den ersten 6 Stunden bei den pH-Werten von 5 und 4 kaum Unterschiede im Wachstumsverhalten zeigen, können nach 24 Stunden deutliche Differenzen in dem erzielten Wachstum nachgewiesen werden. In dem Medium mit einem pH-Wert von 5 zeigte sich dabei, unabhängig von der Passagierungsstufe des jeweiligen Stammes, eine Reduktion des Wachstums auf 50% des Vergleichswertes bei physiologischem pH-Wert von 6,7 des TSB-Mediums. Noch deutlicher sind die Resultate bei einem pH-Wert von 4. Hier kommt es zu einer Reduktion des Wachstums auf lediglich 10-20%. Daraus folgt, dass die erhöhte Rückgewinnungsrate des Stammes JB1 – P4 in den Infektionsversuchen weder auf eine erhöhte Wachstumsrate noch auf einer höheren pH-Resistenz zurückzuführen ist.

### **5.6 Die Reifung des Lysosoms in Endothelzellen geschieht durch Interaktion mit Rab5- und Rab7 positiven Endosomen**

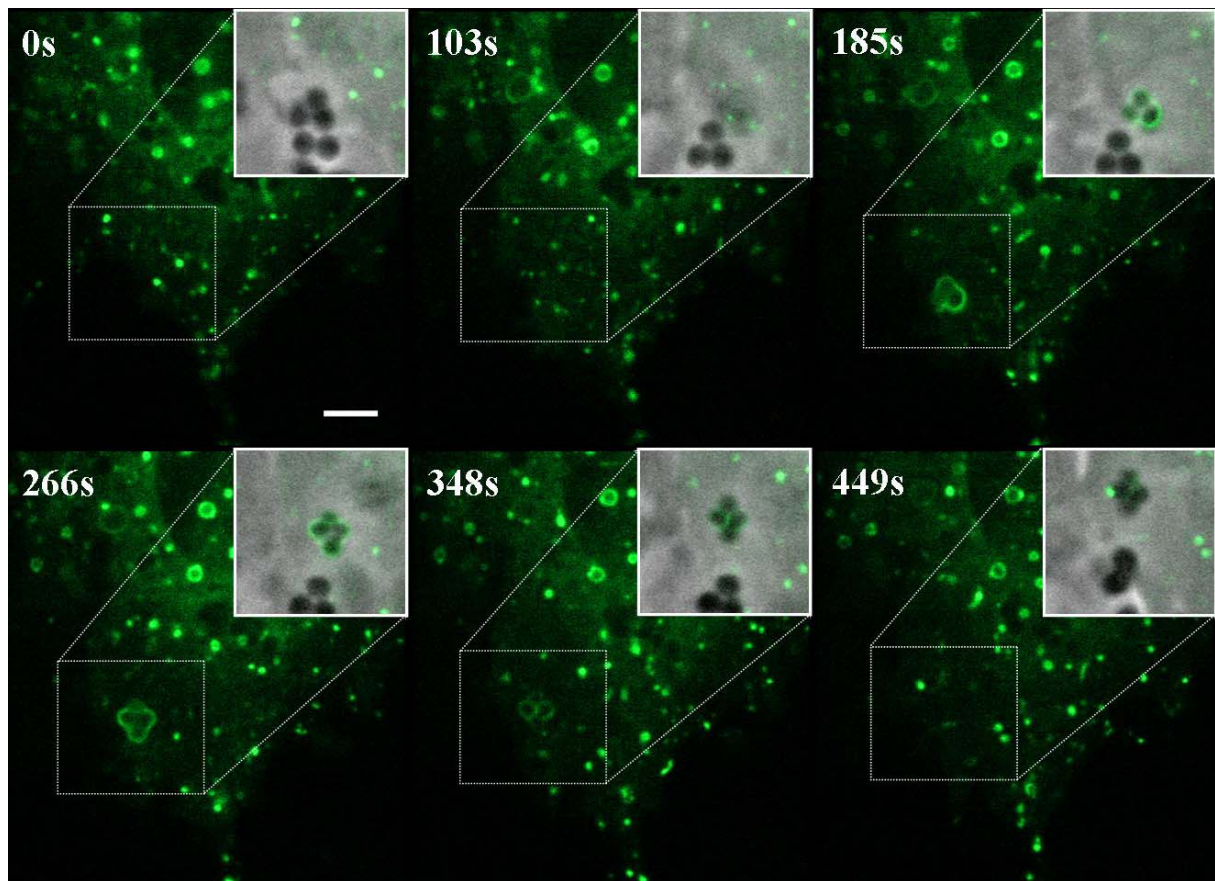
Bisher wurde die Reifung des Phago-Lysosoms intensiv in professionellen Phagozyten untersucht. Endothelzellen dagegen stellen als fakultative Phagozyten einen relativ neuen Anspruch an die Forschung dar. Hier wurde versucht, die intrazellulären Abtötungsmechanismen der Endothelzellen für Bakterien einer Zellorganelle zuzuordnen und die tatsächliche intrazelluläre Lokalisation der SCV von

*S. aureus* zu identifizieren. Hierzu wurden Phagosomen charakterisiert, welche *S. aureus* enthielten.

In zur Phagozytose fähigen Zellen werden Partikel wie Bakterien initial in ein membranumhülltes Phagosom aufgenommen. Dieses reift innerhalb von 30-60 Minuten durch mehrere Interaktionen und Verschmelzungen mit den lokalen endosomalen und lysosomalen Kompartimenten in ein Phago-Lysosom (Viera et al., 2002) Der pH-Wert in diesen Phago-Lysosomen ist mit 4,5 – 5,5 niedrig und eine Vielzahl von Molekülen mit bakterizider Wirkung und proteolytischen Enzymen töten und verdauen auf diesem Weg aufgenommene Mikroorganismen.

Um zu testen, ob die Reifung des Phagosoms in Endothelzellen, worin SCV von *S. aureus* enthalten sind, durch Interaktionen mit lokalen endosomalen Kompartimenten erfolgt, wurden HUVECs mit Vektoren, welche GFP Markerproteine exprimierten transfiziert. Als Marker für frühe Endosomen exprimierten wir ein GFP-Rab5- und für späte Endosomen wählten wir ein GFP-Rab7 Fusionsprotein. Die transfizierten HUVECs wurden daraufhin mit JB1-P4 infiziert und es erfolgte die Beobachtung der Interaktionen dieses Phagosoms mit Vesikeln, welche die oben genannten Marker aufwiesen.

Die Abbildung 5.6a stellt Ausschnitte einer Videosequenz dar und zeigt eine Endothelzelle mit mehreren peripheren und zentral um den Zellkern gelegenen frühen Endosomen. Diese sind an dem GFP-Rab5 Marker zu erkennen. Man erkennt deutlich eine vorübergehende starke Anreicherung von GFP-Rab5 um eine bakterielle Vierergruppe. Zur besseren Übersicht zeigen die kleinen Inlay-Grafiken eine Kombination aus dem Fluoreszenz- und Phasenkontrastkanal. Die Auswertung von mehreren ähnlichen Aufnahmen zeigte, dass sich schon nach 3-5 Minuten nach der Anheftung von *S. aureus* an die Endothelzelle solche GFP-Rab5 Anreicherungen bilden. Daher stellt dieser Vorgang einen der Initialschritte der Phagosomenbildung und –reifung dar.



**Abbildung 5.6a. Vorübergehende Anreicherung von Phagosomen mit dem Marker Rab5 für frühe Endosomen**

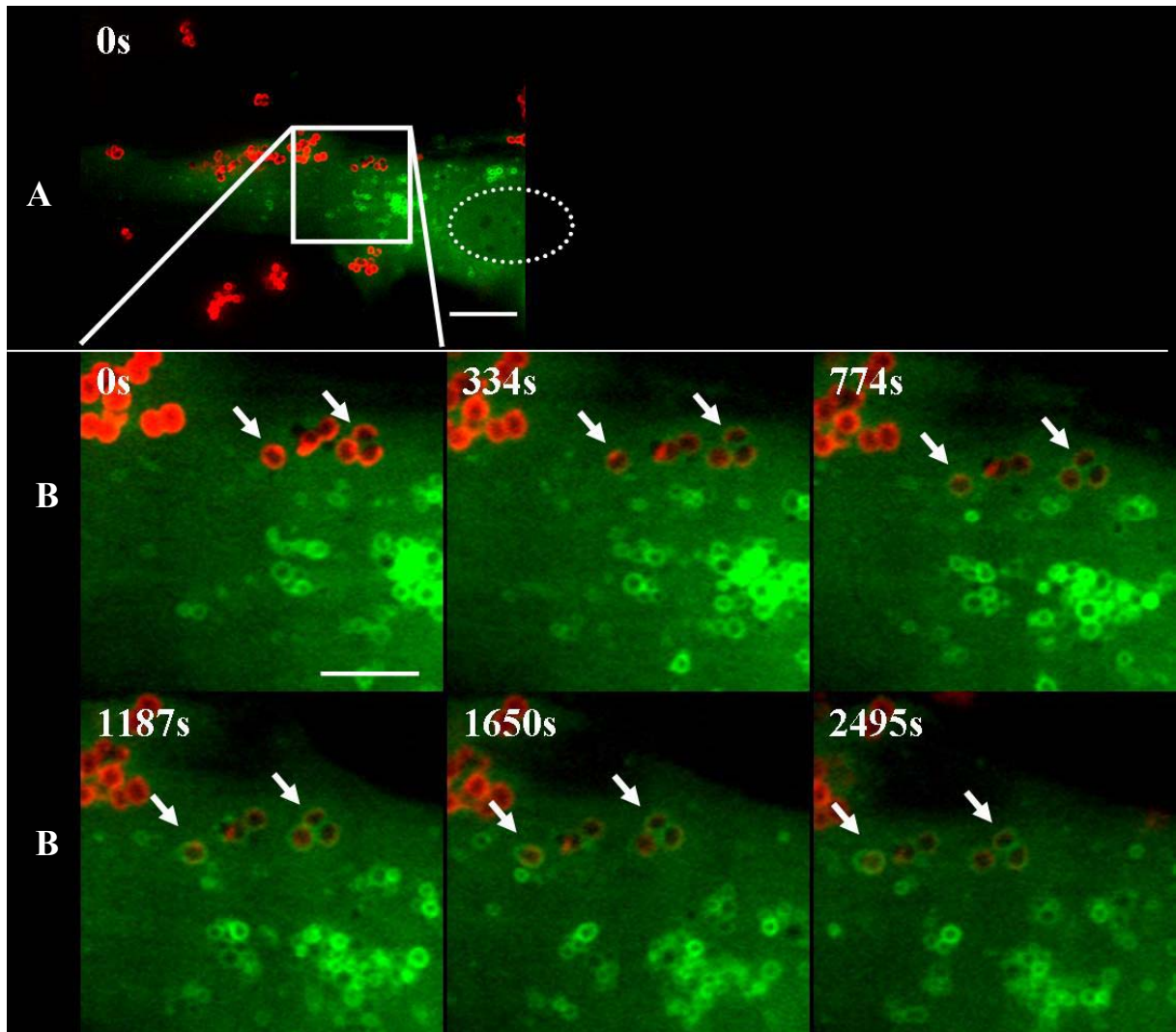
HUVEC wurden mit einem GFP-Rab5 Expressionsvector transfiziert und mit *S. carnosus* FNBP-A infiziert. Die Präparatauswertung erfolgte an einem konfokalen Mikroskop. Die Bilder zeigen die vorübergehende Anreicherung von GFP-Rab5 um eine Staphylokokken-Tetrade. Das erste Bild wurde als Zeitpunkt 0 Sekunden definiert. Die kleinen Quadrate stellen die Kombination der eingerahmten Fluoreszenzsignale mit dem Phasenkontrastbild dar. Der Maßbalken entspricht 5µm.

Weitere Einzelaufnahmen aus einer Videosequenz zeigen in der Abbildung 5.6b HUVEC, welche mit dem Marker für späte Endosomen GFP-Rab-7 transfiziert sind. Diese Zellen wurden mit *S. aureus* infiziert, welcher zuvor mit Alexa568 markiert wurde. Der Nachweis von Vesikeln mit internalisierten *S. aureus* zusammen mit dem Marker GFP-Rab7 konnte frühestens 20-30 Minuten nach der Aufnahme der Staphylokokken in die Endothelzellen erbracht werden und dauerte mehr als 60 Minuten an. Dies zeigt, dass in der chronologischen Abfolge der Kontakt von Phagosomen mit *S. aureus* und Rab7 positiven Zellorganellen deutlich später stattfindet als mit Rab5 positiven Organellen. Dies unterstützt die Annahme der Reifung von frühen zu späten Endosomen mit darin enthaltenen Bakterien.

Da die größte Abnahme in der Überlebensfähigkeit in einem Zeitraum von einer bis fünf Stunden stattfindet, wurde untersucht, wo sich die Vesikel mit den

---

Staphylokokken zu diesem Zeitpunkt befanden. Hierbei wurde die komplette Kolo-kalisation von Bakterien und LysoTracker in diesem Zeitfenster bereits gezeigt. Um nun zu beweisen, dass es sich bei diesen LysoTracker-positiven Organellen auch tatsächlich um Lysosomen handelt, wurden diese Ergebnisse, wie oben beschrieben durch die Versuche mit YFP-LAMP-1 verifiziert. Zusammen mit den in diesem Kapitel beschriebenen Daten der Videomikroskopie beweisen diese Ergebnisse, dass sich die Bakterien zum Zeitpunkt der maximalen Elimination in sauren, LAMP-1 positiven Phago-Lysosomen befinden. Diese Lysosomen bilden sich über ein Zeitfenster von 45 bis 60 Minuten durch Interaktionen mit frühen und späten Endosomen, wie durch die Marker Rab5 und Rab7 bewiesen wurde.



**Abbildung 5.6b Anreicherung von Phagosomen mit dem Marker Rab7 für späte Endosomen**

HUVEC wurden mit einem GFP-Rab7 Expressionsvektor (grün) transfiziert und anschließend mit einem, mit Alexa Fluor 568-markierten *S. aureus* Z7123 (rot) infiziert. Die Auswertung erfolgte an einem konfokalen Mikroskop. Es wird die Anreicherung von GFP-Rab7 um rot markierte Bakterien bei den markierten Zeitpunkten gezeigt. Das Bild **A** stellt ein Referenzbild einer infizierten Endothelzelle dar, welche GFP-Rab7 exprimiert. Der Zellkern ist durch die gestrichelte Linie verdeutlicht. Die Bilder unter **B** stellen das im Bild **A** eingerahmte Areal dar. Der Meßbalken entspricht einer Länge von 10  $\mu\text{m}$  in **A** und 5  $\mu\text{m}$  in **B**



## **6. DISKUSSION**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der überwiegende Teil der durch die Endothelzellen aufgenommenen *S. aureus* Bakterien eliminiert wird. Bei einem hohen Infektionsverhältnis von etwa 100 Bakterien pro Endothelzelle konnte beobachtet werden, dass einige *S. aureus* – Stämme in der Lage sind, die Endothelzellen zu beschädigen und letztendlich komplett zu töten. Dies deckt sich mit früheren Beobachtungen (Banthel et al, 2002, Bayles et al., 1998).

Legte man jedoch ein deutlich geringeres Infektionsverhältnis von etwa 10 Bakterien pro Endothelzelle zugrunde, so konnten auch die meisten toxischen Stämme von den Zellen effektiv eliminiert werden.

In dieser Arbeit konnte der *S. aureus* - Stamm JB1, welcher von einem Patienten mit Osteomyelitis isoliert wurde, stufenweise an das intrazelluläre Milieu der Endothelzellen adaptiert werden. Dieser Stamm JB1 – P4 zeigte nach fünf Stunden noch eine Rückgewinnungsrate von über 20% und nach 48 h immer noch von 2%.

Im Tierversuchsmodell konnte gezeigt werden, dass das Endothel in vivo korrekterweise als immunkompetentes Gewebe der Infektionsabwehr gewertet werden muss. So wurde gezeigt, dass schon nach 20 Minuten 99% der intravasalen Bakterien entfernt worden waren. Die geringen Scherkräfte in postkapillären Venolen bieten dabei optimale Konditionen für die Invasion der Bakterien in das angrenzende Gewebe (Laschke et al., 2005).

Nun stellt sich die Frage, wie die Bakterien in der Lage sind, dem Abwehrsystem der infizierten Zelle zu entgehen. Unsere Versuche zeigen, dass die SCVs zuerst mit Adhäsionsmolekülen für einige Zeit an die Oberfläche der Wirtszellen adaptieren und dann in die Zelle eingeschleust werden.

In den Versuchsreihen dieser Arbeit wurden primäre menschliche Endothelzellen aus den Venen von Nabelschnüren isoliert und mit verschiedenen *S. aureus* – Stämmen infiziert. Dabei zeigte sich, dass nahezu alle aufgenommenen Bakterien über Phagosomen in Lysosomen transportiert wurden und dort sogar für Tage verblieben. Dabei spielte es keine Rolle, ob der Stamm eine Rückgewinnungsrate von 20% oder 0,1% zeigte. Diese Schlussfolgerungen wurden durch Färbung der Lysosomen mit LysoTracker, einem für saure Kompartimente spezifischen Farbstoff, und dessen Kolokalisation mit den Bakterien gewonnen. Die Resultate konnten durch die Verwendung des Lysosomenmarkers YFP-LAMP-1 (Eskelinen et al., 2003) und dessen Kolokalisation mit den Bakterien verifiziert werden.

Die Beobachtung der Aufnahmevorgänge mit Videomikroskopie an lebenden Zellen zeigt darüber hinaus, dass sich die Reifung der Phagosomen zu Lysosomen über aufeinander folgende Interaktionen mit bereits in der Zelle vorhandenen frühen, Rab5 – positiven, und späten, Rab7 – positiven, Zellorganellen vollzieht. Dabei erfolgte der erste Nachweis der Kolo-kalisation von Bakterien und Rab5-positiven Zellorganellen, welche frühen Endosomen entsprechen, bereits nach 20 bis 30 Minuten nach Versuchsbeginn. Dies verdeutlicht, wie schnell die Aufnahme von SCV vor sich geht. Die Aufnahme der Staphylokokken in die Lysosomen war innerhalb von 60 Minuten abgeschlossen. Nach diesem Zeitfenster fiel die Überlebensrate der Bakterien wie beschrieben sehr schnell ab. Hieraus kann man folgern, dass die Aufnahme in Lysosomen eine überaus effektive antibakterielle Methode für die Endothelzellen zur Elimination von Staphylokokken darstellt.

Small colony Varianten von verschiedenen Bakterienspezies werden regelmäßig von chronischen Infektionen isoliert. Dies steht of im Zusammenhang mit längerdauernder Therapie mit Antibiotika. Dieses Phänomen ist insbesondere bei Behandlung mit Aminoglykosiden sehr ausgeprägt und nicht selten zu beobachten (Kahl et al., 1998, Krut et al., 2003, Lowy, 1998, von Eiff et al., 1997). Interessanterweise zeigen gerade die durch das intrazelluläre Milieu induzierten SCV eine erhöhte Überlebensrate (Balwit et al., 1994).

Vor diesem Hintergrund stellte sich nun die Frage, in welchem Kompartiment der Zelle sich die Bakterien aufhielten. Es ist bekannt, dass vor allem *Chlamydien*, *Legionellen* und *Salmonellen*, sowie *Mykobakterien* in eigenen membranumhüllten Strukturen überdauern können. Diese Hüllen werden durch die Bakterien induziert, indem auf die Regulation des Zellhaushaltes der Wirtszelle Einfluss genommen wird (Hackstadt, 2000, Meresse et al., 1999). Zusätzlich verändern diese Bakterienstämme auch die Reifung und Ansäuerung von Phagosomen. Andere Pathogene, wie *Shigellen* und *Listerien*, lösen das Phago-Endosom auf und vermehren sich nicht organellengebunden frei im Zytoplasma (Hackstadt, 2000, Meresse et al., 1999). Ebenso wurde berichtet, dass *S. aureus* auch aus Phago-Endosomen entkommen und frei im Zytoplasma proliferieren könnte (Bayles et al., 1998).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch deutlich, dass sich der *S. aureus* – SCV – Stamm JB1 und vor allem der noch besser angepasste Subklon JB1 – P4, nach

---

dessen Aufnahme in die Zelle, in den selben intrazellulären Kompartimenten befindet, wie andere *S. aureus* und *S. carnosus* – Stämme.

Es wurde vermutet, dass hierbei die Bildung von Small colony Varianten durch die grampositiven Kokken *S. aureus* eventuell einen ursächlichen Faktor für die Chronifizierung von Osteomyelitiden und langwierigen Infektionen bei Patienten mit Cystischer Fibrose darstellt und für therapierefraktäre Verläufe von infektiöser Endokarditis und katheterassoziierte Infektionen verantwortlich gemacht werden kann.

Diese Varianten von *S. aureus* sind dabei im Organismus vor Angriffen doppelt geschützt. Zum einen ist es ihnen gelungen, sich in einer biologischen Nische zu etablieren, indem sie sich durch ihre Aufnahme in beispielsweise Endothelzellen dem körpereigenen Immunsystem entziehen, zum anderen zeigen sie durch ihren Defekt in der Atmungskette eine nicht unerhebliche Resistenz gegenüber antibiotischen Stoffen. Dies resultiert aus der fehlenden Fähigkeit, diese Stoffe über einen transmembranösen Transport aufzunehmen.

Jetzt wird es Ziel von weiterführenden Arbeiten sein zu untersuchen, inwiefern sich die hochadaptierten SCV – Stämme von den Stämmen unterscheiden, welche sich nachweislich weniger resistent gegenüber dem lysosomalen Milieu zeigen. Vorfeldversuche hierzu zeigen bereits jetzt, dass zwischen den Stämmen JB1 – P0 und JB1 – P4 keine Abweichungen im Wachstumsverhalten, der Hämolyseeigenschaften, der Empfindlichkeit gegenüber pH-Veränderungen oder Antibiotika oder dem genetischen Material bestehen. Es ist angeraten, weitere Untersuchungen durchzuführen, um Veränderungen im Bakterienstoffwechsel oder der Bakterienstruktur nachzuweisen, welche eine Widerstandsfähigkeit gegenüber den ansonsten bakteriziden Komponenten der Lysosomen, wie hydrolytische Enzyme, bakterizide Peptide oder sauren pH, hervorrufen könnten (Viera et al., 2002).

Alles in Allem belegen die Daten dieser Arbeit, dass SCVs von *S. aureus* in den Lysosomen der menschlichen Endothelien, trotz der hier vorherrschenden hohen bakteriziden Aktivität, überleben können.

Die Bakterien halten sich hierbei fast ausschließlich in unveränderten Phago-Lysosomen auf und die Überlebensfähigkeit der Bakterien nimmt über die Zeit hinweg kontinuierlich ab. Diese Erkenntnisse und das Fehlen von intrazellulärer bakterieller Proliferation, legen den Schluss nahe, dass die SCVs nicht in die



Regulationsmechanismen der Zelle eingreifen. Viel eher scheint der hocheffiziente, protektive Mechanismus der SCV darin zu bestehen, dass sich die Bakterien an das Milieu der Lysosomen anpassen.

## **7. ZUSAMMENFASSUNG**

„*Small colony variants*“ (SCV) von *S. aureus* sind aufgrund ihrer Fähigkeit intrazellulär zu überleben, an wiederkehrenden und chronischen Infektionen beteiligt. Um die Überlebensfähigkeit zu objektivieren und um das intrazelluläre Kompartiment, in welchem die Bakterien überdauern zu identifizieren, wurden primäre, menschliche Endothelzellen mit verschiedenen Wildtyp- und SCV-Stämmen infiziert. Anschließend wurde die Reifung des Phagosoms mittels Videomikroskopie verfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass die Reifung der Phago-Lysosomen, welche SCV enthielten über abfolgende Interaktionen mit Rab5- und Rab7-positiven, frühen bzw. späten endosomalen Vesikeln abläuft. Die Markierung intrazellulärer Kompartimente mit LysoTracker oder YFP-LAMP-1 zeigte, dass sich nahezu alle Bakterien in Lysosomen befanden. Innerhalb von 45-60 Minuten war die Aufnahme in diese Organellen abgeschlossen, und die Bakterien konnten darin bis zu fünf Tage nachgewiesen werden.

Die Rückgewinnungsrate der meisten Staphylokokkenstämme betrug unter 1% der Infektionsdosis nach einer intrazellulären Verbleibedauer von 24 Stunden. Dies zeigte eine hohe bakterizide Aktivität der endothelialen Lysosomen. Der für Menadion auxotrophe SCV Stamm JB1 zeigte initial eine niedrige Rückgewinnungsrate von 4% der Infektionsdosis, wobei alle anderen getesteten SCV Stämme von den Endothelzellen zumeist fast vollständig eliminiert wurden. Durch wiederholte intrazelluläre Passagierung des Ausgangsstammes JB1 (oben als JB1 – P0 bezeichnet) wurde ein Subklon JB1 – P4 generiert, welcher eine sehr verbesserte Ausbeute von 25-30% zeigte.

Interessanterweise konnten zwischen dem Ausgangstamm JB1 – P0 und dem Subklon JB1 – P4 keine Unterschiede in der intrazellulären Verteilung gefunden werden. Beide Stämme befanden sich nach Aufnahme vollständig in den Lysosomen.

Die erhobenen Daten liefern den Beweis, dass an das Überleben in Endothelzellen angepasste SCV Stämme in der Lage sind, dem bakteriziden Milieu der Lysosomen zu widerstehen und in den Endothelzellen zu persistieren. Es ist durchaus denkbar, dass zu einem späteren Zeitpunkt die Bakterien wieder zum Vaterstamm revertieren und so rezidivierende Infektionen hervorrufen können.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

- Adams JC (2001): Cell-matrix contact structures. *Cell Mol Life Sci* 58:371-392
- Balwit J M, van Langevelde P, Vann J M, Proctor RA (1994) Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. *J Infect Dis* 170:1033-1037
- Bantel H, Sinha B, Domschke W, Peters G, Schulze-Osthoff K, Janicke RU (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
- Baumert N, von Eiff C, Schaaff F, Peters G, Proctor R A, Sahl HG (2002) Physiology and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* small colony variants. *Microb Drug Resist* 8:253-260
- Bayles K W, Wesson C A, Liou L E, Fox L K, Bohach G A, Trumble WR (1998) Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun* 66: 336-342
- Beekhuizen H, van de Gevel J S, Olsson B, van Benten I J, van Furth R (1997) Infection of human vascular endothelial cells with *Staphylococcus aureus* induces hyperadhesiveness for human monocytes and granulocytes. *J Immunol* 158: 774-782
- Caron E, Hall A (1998): Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282:1717-1721
- Caswell PT, Norman JC (2006): Integrin trafficking and the control of cell migration. *Traffic* 7:14-21
- Cooper JA, Schäfer DA, (2000): Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr. Opin. Cell Biol* 12:97-103
- Desjardins M (1995): Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. *Trends Cell Biol.* 6:183-186
- Desjardins M, Huber LA, Parton RG, Griffiths G (1994): Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392:505-509
- Eskelinen E L, Tanaka Y, Saftig P (2003) At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol* 13: 137-145
- Essler M, Amano M, Kruse H J, Kaibuchi K, Weber P C, Aepfelbacher M (1998) Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells. *J Biol Chem* 273: 21867-21874
- Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R (1998): Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 95:15781-15786
- Gorvel JP, Chavrier P, Zerial M, Gruenberg J (1991): Rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* 64:915-925
- Greene C, McDevitt D, Francois P, Vaudaux PE, Lew DP, Foster TJ.(1995) Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* in fibronectinbinding proteins and studies on the expression of the *fnb* genes. *Mol Microbiol* , 17, 1143-1152

- Gruenberg J (2001): The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:721-730
- Hackstadt T (2000) Redirection of host vesicle trafficking pathways by intracellular parasites. *Traffic* 1: 93-99
- Hahn H., Falke D, Kaufmann S., Ullmann U., „Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie“, 4. korrigierte Auflage 2001 Springer Verlag Berlin Heidelberg New York .ISBN 3-540-67857-3
- Hampton MB, Kettle AJ Winterbourn CC (1998): Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. *Blood* 92:3007-3017
- Heesemann J, Laufs R (1985) Double immunofluorescence microscopic technique for accurate differentiation of extracellularly and intracellularly located bacteria in cell culture. *J Clin Microbiol* 22:168-175
- Hoppe AD, Swanson JA (2004). Cdc42, Rac1 and Rac2 display distinct patterns of activation during phagocytosis. *Mol Biol Cell* 15:3509-3519
- Iordanescu S. and Surdeanu M. (1976) Two restriction and modification systems in *Staphylococcus aureus* NCTC8325. *J. Gen. Microbiol.* 96, 277-281
- Jordens I, Marsman M, Kuijl C Neefjes J (2005): Rab proteins connecting transport and vesicle fusion. *Traffic* 6:1070-1077
- Kahl B, Herrmann M, Everding A S, Koch H G, Becker K, Harms E, Proctor R A, Peters G (1998) Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 177: 1023-1029
- Krut O, Utermohlen O, Schlossherr X, Kronke M (2003) Strain-specific association of cytotoxic activity and virulence of clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Infect Immun* 71:2716-2723
- Laschke M W, Kerdudou S, Herrmann M, Menger M D (2005) Intravital fluorescence microscopy: a novel tool for the study of the interaction of *Staphylococcus aureus* with the microvascular endothelium in vivo. *J Infect Dis* 191:435-443
- Lowy F D (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339:520-532
- Menzies B.E., Kourteva I. (1998) Internalization of *Staphylococcus aureus* by Endothelial Cells Induces Apoptosis. *Infection and Immunity* 66:5994-5998
- Meresse S, Steele-Mortimer O, Moreno E, Desjardins M, Finlay B, Gorvel JP (1999) Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death. *Nat Cell Biol* 1:E183-E188
- Petti C A, Fowler Jr VG (2003) *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis. *Cardiol Clin* 21:219-33
- Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29:545-576
- Pollard TD, Borisy GG (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112:453-465
- Proctor R A, van Langevelde P, Kristjansson M, Maslow J N, Arbeit RD (1995) Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 20:95-102

- Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M, sMaslow JN, Arbeit RD (1995) Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 20:95-102
- Qualmann B, Kessels MM, Kelly RB, (2000): Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. J Cell Biol 150:111-117
- Que Y A, Haefliger J A, Piroth L, Francois P, Widmer E, Entenza J M, Sinha B, Herrmann M, Francioli P, Vaudaux P, Moreillon P (2005) Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. J Exp Med 201:1627-1635
- Rabinovitch M (1995): Professional and non-professional phagocytes: an introduction. Trends Cell Biol. 5:85-87
- Ridley AJ, Hall A (1992a): The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. Cell 70:389-399
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992b): The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. Cell 70:401-410
- Ridley AJ, Swartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borsy G, Parsons JT, Horwitz AR (2003): Cell migration: integrating signals from front to back. Science 302:1704-1709
- Scott CC, Dobson W, Botelho RJ, Coady-Osberg N, Chavrier P, Knecht DA, Heath C, Stahl P, Grinstein S (2005). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis directs actin remodeling during phagocytosis. J Cell Biol 169:139-149
- Sinha B, Francois P, Que Y A, Hussain M, Heilmann C, Moreillon P, Lew D, Krause KH, Peters G, Herrmann M (2000) Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. Infect Immun 68:6871-6878
- Stan R.V. (2006) Endocytosis pathways in endothelium: how many? Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 290:806-808
- Svitkina TM, Verkhovsky AB, McQuade KM, Borisy GG (1997): Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratinocytes: mechanism of cell body translocation. J Cell Biol 139:397-415
- Tapper H (1996): The secretion of preformed granules by macrophages and neutrophils. J Leukoc Biol 59:613-622
- Thilo L, Stroud E, Haylett T (1995): Maturation of early endosomes and vesicular traffic to lysosomes in relation to membrane recycling. J Cell Sci 108 (Pt 4):1791-1803
- Tjelle TE, Lovdal T, Berg T (2000): Phagosome dynamics and function. Bioessays 22:255-263
- Trürlsch K, Hoffmann H, Keller C, Schubert S, Bader L, Heesemann J, Roggenkamp A (2003) Highly resistant metabolically deficient dwarf mutant of *Escherichia coli* is the cause of a chronic urinary tract infection. J Clin Microbiol 41:5689-5694
- Vann J M, Proctor RA (1988) Cytotoxic effects of ingested *Staphylococcus aureus* on bovine endothelial cells: role of *S. aureus* alpha-hemolysin. Microb Pathog 4:443-453
- Vaudaux P, Francois P, Bisognano C, Kelley W L, Lew D P, Schrenzel J, Proctor R A, McNamara P J, Peters G, von Eiff C (2002) Increased expression of clumping factor and fibronectin-binding proteins by *hemB* mutants of *Staphylococcus aureus* expressing small

- colony variant phenotypes. *Infect Immun* 70:5428-5437
- Veltrop M H, Thompson J, Beekhuizen H (2001) Monocytes augment bacterial species- and strain-dependent induction of tissue factor activity in bacterium-infected human vascular endothelial cells. *Infect Immun* 69:2797-2807
  - Vieira O V, Botelho R J, Grinstein S (2002) Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J* 366:689-704
  - von Eiff C, Becker K, Metze D, Lubritz G, Hockmann J, Schwarz T, Peters G (2001) Intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants within keratinocytes: a cause for antibiotic treatment failure in a patient with darier's disease. *Clin Infect Dis* 32:1643-1647
  - von Eiff C, Bettin D, Proctor R A, Rolaufts B, Lindner N, Winkelmann W, Peters G (1997) Recovery of small colony variants of *Staphylococcus aureus* following gentamicin bead placement for osteomyelitis. *Clin Infect Dis* 25:1250-1251
  - von Eiff C, Heilmann C, Proctor R A, Woltz C, Peters G, Gotz F (1997) A site-directed *Staphylococcus aureus hemB* mutant is a small-colony variant which persists intracellularly. *J Bacteriol* 179:4706-4712
  - von Eiff et al., *Hygiene / Mikrobiologie*, 2004/2, "Staphylokokkus aureues "SCV" das "zweite" Gesicht eines klinisch wichtigen Erregers."
  - Wasi F, Shuter J (2003) Primary bacterial infection of the myocardium. *FrontBiosci* 8:228-231
  - Wiedemann A, Linder S, Grassl G, Albert M, Autenrieth I, Aepfelbacher M (2001) *Yersinia enterocolitica* invasin triggers phagocytosis via beta1 integrins, CDC42Hs and WASp in macrophages. *Cell Microbiol* 3:693-702
  - Wu JA, Kusuma C, (2003): Lysostaphin Disrupts *S. aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms on Artificial Surfaces *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Volume 11, 2003,
  - Zerial, M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:107-117

**9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Tabelle 4.1 In dieser Arbeit verwendete Geräte .....	18
Tabelle 4.2.1 In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme .....	19
Tabelle 4.2.3a Koloniemorphologie auf Blutagar .....	21
Tabelle 4.2.3b Inhaltsstoffe Supplement pack .....	22
Tabelle 4.3.2 Anzahl der ausgesäten Zellen .....	27
Abbildung 5.1a Wachstumsverhalten verschiedener <i>S. aureus</i> – Stämme .....	38
Abbildung 5.1b Wachstumsverhalten von <i>S. aureus</i> JB1 und 6850 .....	39
Abbildung 5.1c Wachstumsverhalten von JB1 in verschiedenen Kulturmedien .....	39
Abbildung 5.1d Für die Versuche verwendete Optische Dichten bei 600nm (OD <sub>600</sub> ) .....	40
Abbildung 5.1e Absolute Keimzahlen bei der zugehörigen OD <sub>600</sub> .....	41
Abbildung 5.2a. Rückgewinnungsrate mehrerer <i>S. aureus</i> / <i>carneus</i> – Stämme im Vergleich .....	44
Abbildung 5.2b Rückgewinnungsraten während der Versuche über 48 h .....	45
Abbildung 5.3 Rückgewinnungsraten während der ersten Infektionsstunde .....	47
Abbildung 5.4.a Phasenkontrastaufnahme von mit <i>S. aureus</i> JB1 infizierten Endothelzellen .....	48
Abbildung 5.4b Darstellung der prozentualen Rückgewinnungsrate von <i>S. aureus</i> – Stämmen .....	49
Abbildungen 5.4c/d Kontrollproben der Versuchsüberstände bei Infektionsversuchen .....	50
Abbildungen 5.5 a-b Innen/Außenfärbung von JB1 – P4 in/an humanen Endothelzellen in Anwesenheit von Lysostaphin und Gentamicin .....	52
Abbildungen 5.5c-d Innen/Außenfärbung von JB1 – P4 in/an humanen Endothelzellen in Abwesenheit von Lysostaphin und Gentamicin .....	52
Abbildungen 5.5e/f Darstellung von LysoTracker-positiven Zellorganellen .....	54
Abbildungen 5.5g-i Darstellung von YFP-LAMP-1 positiven Zellorganellen .....	55
Abbildungen 5.5k/l Verteilung der Bakterien in/außerhalb von LysoTracker bzw. LAMP-1 positiven Zellorganellen .....	56
Abbildung 5.5m. pH-abhängiges Wachstum der Stämme JB1 – P0 und JB1 – P4 .....	57
Abbildung 5.6a. Vorübergehende Anreicherung von Phagosomen mit dem Marker Rab5 für frühe Endosomen .....	59
Abbildung 5.6b Anreicherung von Phagosomen mit dem Marker Rab7 für späte Endosomen .....	61

---

## **10. WIDMUNG UND DANKSAGUNG**

**Ich widme die vorliegende Arbeit meinen Eltern:**

**Rosa Kland-Thoma, Reinhard Kland**

**und meiner Partnerin:**

**Konstanze Lorenz**

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. J. Heesemann für die Möglichkeit, meine Arbeiten am Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie in kollegialer und konstruktiver Umgebung durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Martin Aepfelbacher, der die Voraussetzungen für diese Arbeit geschaffen hat, indem er mich in seine Arbeitsgruppe aufnahm. Außerdem danke ich ihm für Hilfe bei der Planung und Durchführung der Arbeit und die jederzeit willkommene und immer konstruktive Kritik in den verschiedenen Entstehungsphasen.

Die wahrscheinlich größte Hilfe für die Versuche, welche zu dieser Arbeit führten, und wertvolle Tips zum Schreiben derselben bekam ich von Dr. Andreas Schröder, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mich bei leichten wie auch schwierigen Fragen nie im Stich ließ.

Weiterhin danke ich Sabrina Schubert und Claudia Trasak für die vorbildliche Vorbereitung und Durchführung von Experimenten, welche für diese Arbeit essentiell waren.

Ebenfalls gilt mein Dank allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Aepfelbacher für wertvolle Anregungen und viele Erklärungen.



**11. LEBENS LAUF**

Ausbildung	1985 – 1989	Grundschule a. d. Weißenseestr. München
	1989 – 1998	Albert-Einstein-Gymnasium München
	Mai 1998	Abitur / Teilnahme an "Jugend forscht", Biologie
	2000 – 2006	Ludwig-Maximilian-Universität München Studiengang Humanmedizin
	2006	3. Staatsexamen und Erteilung der Approbation
Promotion	2004	Beginn der Promotion am Max-von-Pettenkofer- Institut Abteilung Bakteriologie / Doktorvater Prof. Dr. Aepfelbacher
Publikation	2008	Abschluß der Promotion zum Dr. med.
	2006	Schröder, A; Kland, R; Peschel, A; von Eiff, C; Aepfelbacher, M „Live cell imaging of phagosome maturation in <i>Staphylococcus aureus</i> infected human endothelial cells: small colony variants are able to survive in lysosomes." <i>Med Microbiol Immunol</i>
Ersatzdienst	1999 – 2000	Clemens-Maria-Kinderheim
Praktika	2000	Krankenpflagedienst – Deutsches Herzzentrum
	2001	Krankenpflagedienst – KKH München-Perlach
	2002	Famulatur – KH Neuperlach – Innere Medizin
	2004	Famulatur – Max-von-Pettenkofer-Institut
	2004	Famulatur – Klinikum der LMU - Chirurgie
	2005	Famulatur – KH Bogenhausen - Neurologie
	2005 – 2006	Praktisches Jahr – Klin. Rosenheim – Orthopädie
	2006	Praktisches Jahr – KH – Neuperlach – Innere Med.
	2006	Praktisches Jahr – Klin. Traunstein – Chirurgie
Studien- abschluß	2006	Abschluß des Studiums durch Staatsexamen, Erteilung der Approbation
Beruf	2007	Seit 1. Februar 2007 beruflich tätig im Kreiskrankenhaus Bad Reichenhall in der Abteilung für Allgemeinchirurgie
Persönliche Informationen	Familienstand:	ledig
	Staatsangehörigkeit:	Deutsch
	Alter:	29
	Geburtsort:	München
	Konfession:	römisch-katholisch
	Eltern: Geschwister:	Rosa Kland-Thoma, Reinhard Kland Regina Kland