

**Interaktionen zwischen sekretierten Proteinen von
Staphylococcus aureus und der Immunantwort des Wirtes**

**Interaction of secreted proteins of *Staphylococcus aureus*
and host immune response**



Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Science (GSLs), Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Klasse: *Infection and Immunity*

Vorgelegt von

Martina Selle

aus Kyritz

Institut für Molekulare Infektionsbiologie

Würzburg, 2015

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Thomas Dandekar

1. Betreuer: PD Dr. Knut Ohlsen

2. Betreuer: Prof. Dr. Caroline Kisker

3. Betreuer: Prof. Dr. Susanne Engelmann

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Danksagung

Ich danke allen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben, insbesondere aber:

- PD Dr. Knut Ohlsen für seine kompetente Anleitung, das entgegengebrachte Vertrauen und die harmonische Zusammenarbeit
- Professor Dr. Caroline Kisker für die wissenschaftliche Unterstützung und die Übernahme des Zweitgutachtens
- Unseren Kooperationspartnern an der Universität Greifswald und Braunschweig: Prof. Dr. Susanne Engelmann, Peggy Kloppot, Prof. Dr. Barbara Bröker, Dr. Julia Kolata, Dr. Sebastian Stentzel und Dr. Kirsten Dörries
- Unseren Kooperationspartnern aus dem Rudolf-Virchow-Zentrum in Würzburg: Dr. Maria Hirschbeck, Dr. Christin Schäfer und Dr. Florian Rohleder
- Unseren Kooperationspartnern aus dem Hans-Knöll-Institut in Jena: Prof. Dr. Peter Zipfel, Dr. Sascha Böhm und Anika Westphal
- Unseren Kooperationspartnern des Universitätsklinikums Münster: Prof. Dr. med. Barbara C. Kahl und Devika Bhagwat
- Unserem Kooperationspartner aus dem Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Würzburg: Dr. Stefan Kircher
- Den vielen Studentinnen, die mich im Rahmen von Praktika bei meinem Projekt unterstützt haben, vor allem aber Verena Schneider, Vanessa Klaus und Susanne Henn
- Dr. Tobias Hertlein für die Unterstützung bei einigen Tierexperimenten
- Ursula Wallner und Annika Parg für die technische Unterstützung und die vielen Kniffe und Tricks
- Den Kollegen der AG Ohlsen und AG Ziebuhr für die nette Arbeitsatmosphäre, ganz besonders aber Betty, Steffi, Tina und Theresa für ihre Unterstützung, Freundschaft und die gemeinsame Zeit.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, Freunden und allen Menschen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, vor allem aber meinem Joseph!  Du bist der Beste!

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	X
Zusammenfassung	XIII
Summary.....	XVI
1. Einleitung.....	1
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.2 Virulenzfaktoren und Immunevasion.....	3
1.2.1 Immunantwort gegen bakterielle Keime	3
1.2.2 Inhibierung der Chemotaxis von Neutrophilen.....	5
1.2.3 Verhinderung von Opsonophagozytose.....	5
1.2.4 Überleben im Phagosom und Resistenz gegen antimikrobielle Peptide	6
1.2.5 Immunmodulation.....	6
1.3 Komplement-Evasion von Pathogenen.....	7
1.4 Das Exoproteom von <i>S. aureus</i>	9
1.5 Transportmechanismen von Proteinen	11
1.6 Extrazelluläre Proteine und ihre Transportsignale	11
1.7 Anti- <i>S. aureus</i> Antikörperantwort.....	13
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit.....	15
2. Material	16
2.1 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Enzyme	16
2.2 Kits.....	16
2.3 Antibiotika	17
2.4 Medikamente	17
2.5 Medien und Agarplatten	17
2.6 Puffer und Lösungen	20
2.7 Bakterienstämme	21
2.8 Oligonukleotide	25
2.9 Plasmide	31
2.10 Mauslinien	33
2.11 Geräte.....	34

2.12 Längenstandards	34
2.13 Software	35
3. Methoden	36
3.1 Kultur von Bakterien.....	36
3.1.1 Anzucht und Stammhaltung.....	36
3.1.2 Bestimmung des Bakterienwachstums in Flüssigkeiten.....	36
3.1.3 Quantitative Bestimmung der koloniebildenden Einheiten.....	37
3.1.4 Transformation von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	37
3.1.4.1 Herstellung und Transformation Ca^{2+} -kompetenter Zellen	37
3.1.4.2 Herstellung und Transformation von TSS-kompetenten Zellen.....	38
3.1.4.3 Herstellung und Transformation elektrokompetenter Zellen.....	38
3.2 Zellkultur.....	39
3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	39
3.2.2 Ko-Kultur von A549-Zellen mit <i>S. aureus</i> -Stämmen.....	39
3.3 Arbeiten mit DNA	40
3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
3.3.2 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. aureus</i>	41
3.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	42
3.3.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	42
3.3.5 Enzymatische Hydrolyse von DNA (Restriktionsverdau).....	44
3.3.6 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel.....	44
3.3.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	45
3.3.8 Klonierung	45
3.3.8.1 Klonierung von PCR-Produkten mittels pGEM®T Vektorsystem.....	45
3.3.8.2 Klonierung von Restriktionsfragmenten	45
3.3.8.3 Erzeugung von Einzelbasenmutationen	46
3.3.8.4 Klonierung via Rekombination in <i>E. coli</i> SW102.....	46
3.3.9 DNA-Sequenzierung	46
3.4 Arbeiten mit RNA	47
3.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA	47
3.4.2 DNase-Verdau und cDNA-Synthese.....	47
3.5 Proteinbiochemische Methoden.....	48
3.5.1 Isolierung von Proteinen aus dem Gesamtzellextrakt von <i>E. coli</i> und <i>S. aureus</i>	48
3.5.2 Fraktionierende Proteinextraktion aus <i>S. aureus</i>	49
3.5.3 Überexpression rekombinanter Proteine.....	50
3.5.4 Aufreinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie	50

3.5.5	Dialyse	54
3.5.6	Aufkonzentrieren von Proteinen	55
3.5.7	Quantitative Proteinbestimmung.....	55
3.5.8	SDS-Polacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
3.5.9	native PAGE	57
3.5.10	Färbung von Polyacrylamidgelen	57
3.5.11	Thermofluor.....	58
3.5.12	Größenausschlusschromatografie.....	59
3.5.13	ELISA	60
3.5.13.1	Bestimmung von Antikörpertitern in Serum oder Plasma	61
3.5.13.2	Interaktionsstudien zwischen Faktor H und PurA.....	61
3.5.13.3	Kompetitions-ELISA.....	62
3.5.14	Western Blot.....	62
3.5.14.1	Proteintransfer mittels <i>Semidry Blot</i>	63
3.5.14.2	Immundetektion	63
3.6	Herstellung von Antikörpern.....	64
3.7	Isolation von Antikörpern aus Blutserum	64
3.8	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK).....	65
3.9	Adhäsion von <i>S. aureus</i> an eukaryotische Zellen und Invasion	65
3.10	Phänotypische Assays	66
3.11	Makrokolonie-Formation	66
3.12	FACS-Analysen.....	66
3.13	Mikroskopie.....	67
3.14	Phagentransduktion	68
3.14.1	Herstellung des Phagenlysats.....	68
3.14.2	Phagentransduktion	69
3.15	Infektionen im alternativen Tiermodell <i>Galleria mellonella</i>	69
3.16	Allgemeiner Umgang mit Versuchstieren	70
3.16.1	Maushaltung und Narkotisierung.....	70
3.16.2	Gewinnung von Vollblut und Serum	71
3.16.3	Herstellung von Infektionsproben für die Langzeitlagerung bei -80 °C.	71
3.16.4	Herstellung einer Infektionsdosis.....	71
3.16.5	Infektionsmodelle.....	72
3.16.5.1	Systemische Infektion/Sepsis-Modell	72
3.16.5.2	Intranasale Infektion/Pneumonie-Modell.....	72
3.16.5.3	Intramuskuläre Infektion/Abszess-Modell.....	72

3.16.5.4	Überlebensexperimente	73
3.16.6	Biolumineszenz-Imaging.....	73
3.16.7	Quantitative Bestimmung der Bakterienlast von Organen	73
3.16.8	Histologische Untersuchung von Organen	74
3.17	<i>Staph-Toxin</i> Protein-Array	74
4.	Ergebnisse	76
4.1	Charakterisierung sekretierter Proteine von <i>S. aureus</i> mit bislang unbekannter Funktion	76
4.1.1	Auswahl der Exoproteine und <i>in silico</i> Analyse	76
4.1.2	Überexpression und Aufreinigung der Zielproteine für die spätere funktionelle Charakterisierung	81
4.1.2.1	IMPACT: Proteinaufreinigung mittels Chitin-Bindedomäne	82
4.1.2.2	HaloTag: Proteinaufreinigung mittels kovalenter Bindung an das Säulenmaterial	83
4.1.2.3	His-Tag: Proteinaufreinigung mittels 6x Histidin	84
4.1.3	Generierung von Insertionsmutanten zur späteren funktionellen Charakterisierung ..	87
4.1.4	Funktionelle Charakterisierung der Zielproteine	88
4.1.4.1	Phänotypische Charakterisierung der Insertionsmutanten	89
4.1.4.2	Virulenz im alternativen Tiermodell <i>Galleria mellonella</i>	92
4.1.4.3	<i>In-vitro</i> -Expression	93
4.1.4.4	<i>In-vivo</i> -Expression	95
4.1.4.5	Bindung von Fibronektin und andere Komponenten der Extrazellulären Matrix.....	96
4.1.4.6	Adhäsion und Invasion in eukaryotische Zellen	98
4.1.4.7	Analyse der Komplement-inhibierenden Eigenschaften.....	100
4.2	Antikörperprofil gegen die Proteine P1 – P10 in humanen und murinen Seren.....	102
4.3	Charakterisierung von PurA	108
4.3.1	<i>In silico</i> Untersuchung von PurA.....	108
4.3.2	Native Konformation	109
4.3.3	Herstellung eines spezifischen polyklonalen Antikörpers gegen PurA	111
4.3.4	PurA bindet an humanen Faktor H.....	112
4.3.5	Inhibierung der Interaktion zwischen PurA und FH durch Antikörper.....	113
4.3.6	Die Interaktion zwischen PurA und FH ist unabhängig vom aktiven Zentrum in PurA	114
4.3.7	FH-Bindedomäne in PurA	117
4.3.8	<i>In-vitro</i> -Expression von <i>purA</i>	120
4.3.9	Zelluläre Lokalisation von PurA	121
4.3.10	<i>In-vivo</i> -Expression von PurA	123
4.3.11	Charakterisierung <i>purA</i> -defizienter <i>S. aureus</i> -Stämme <i>in vitro</i>	126
4.3.12	Virulenz <i>purA</i> -defizienter <i>S. aureus</i> -Stämme in <i>Galleria mellonella</i>	129

4.3.13	Charakterisierung weiterer Mutanten des <i>pur</i> -Operons	131
4.3.14	Virulenz <i>purA</i> -defizienter <i>S. aureus</i> -Stämme im Mausmodell	136
4.3.15	Kompetition zwischen Wildtyp und <i>purA</i> -Mutante <i>in vivo</i>	139
4.3.16	Inhibition der bakteriellen Adenylosuccinat-Synthase mit Hadacidin	141
4.4	α - <i>S. aureus</i> Antikörperantwort während einer Infektion -Ermittlung von Antikörperspezifitäten mittels <i>Staph-Toxin-Array</i>	150
5.	Diskussion	157
5.1	Auswahl von sekretierten und Oberflächen-assoziierten Proteinen aus <i>S. aureus</i> mit bislang unbekannter Funktion	157
5.2	Vermittlung von Adhärenz durch sekretierte Proteine	158
5.3	Komplement-inhibierende Eigenschaften der Zielproteine	163
5.4	PurA - ein multifunktionales <i>Moonlighting</i> -Protein?	166
5.5	Transport von PurA in das extrazelluläre Milieu	171
5.6	PurA ist ein entscheidender Virulenzfaktor	175
5.7	Untersuchung der Eignung von Adenylosuccinat-Synthase-Inhibitoren als potentielle Therapeutika bei <i>S. aureus</i> -Infektionen	179
5.8	Anti- <i>S. aureus</i> Antikörperantwort	183
6.	Literaturverzeichnis	192
7.	Anhang	208
7.1	Abkürzungsverzeichnis	208
7.2	Einzelwerte aus dem <i>Staph-Toxin-Array</i>	210
7.3	Homologie von PurA in unterschiedlichen Staphylokokken Stämmen	211
7.4	Homologie von Eap, P9 und P10	212

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ursachen und Konsequenzen einer <i>S. aureus</i> Bakteriämie.....	2
Abbildung 2: Übersicht über die Virulenzfaktoren und Immunevasions-Mechanismen von <i>S. aureus</i>	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Amplifikation der Komplement-Kaskade und der Schutz von wirts-eigenem Gewebe durch Faktor H.....	8
Abbildung 4: Längenstandard für die Gelelektrophorese.....	34
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Vektors pTXB1, der für die Expression der Proteine nach dem IMPACT-System verwendet wurde.....	82
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Aufreinigungssystems: IMPACT (<i>Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Proteintag</i>).....	83
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Vektors pFN18A, der für die Expression von Proteinen mit Halo- <i>Proteintag</i> verwendet wurde.....	84
Abbildung 8: Schematische Darstellung des HaloTag® Aufreinigungssystems (Promega, Mannheim, Deutschland).....	84
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Vektors pET28a+, der für die Expression der Proteine mittels His- <i>Tag</i> verwendet wurde.....	85
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Transposons, das zur Herstellung der gewünschten Insertionsmutanten verwendet wurde.....	87
Abbildung 11: Wachstum von <i>S. aureus</i> USA300 LAC* und den entsprechenden Mutanten ΔP1, ΔP2, ΔP3, ΔP4, ΔP5, ΔP8 und ΔP9 in B-Medium bei 37 °C.....	90
Abbildung 12: Hämolyse-Eigenschaften von <i>S. aureus</i> USA300 JE2, HG003, Newman, USA300 LAC* und den isogenen Mutanten ΔP1-ΔP9.....	91
Abbildung 13: Makrokolonie-Bildung von <i>S. aureus</i> USA 300 JE2 und den isogenen Mutanten ΔP1-ΔP9.....	92
Abbildung 14: Virulenz von <i>S. aureus</i> USA300 LAC* (WT) und den isogenen Mutanten ΔP1-ΔP9 in <i>Galleria mellonella</i> Larven. LAC* WT und ΔP1-ΔP9.....	93
Abbildung 15: <i>In-vitro</i> -Expression der Gene für die ausgewählten Proteine P1-P10.....	94
Abbildung 16: <i>In-vivo</i> -Expression der ausgewählten Proteine P1-P10.....	95
Abbildung 17: Adhäsion der Proteine P1-P10 an Fibronectin (FN) und der Proteine P2, P5 und P7-P10 an Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM)).	97
Abbildung 18: Adhäsion von <i>S. aureus</i> USA300 LAC* und den isogenen Mutanten ΔP1-ΔP9 an eukaryotische Epithelzellen (A549).....	99

Abbildung 19: Invasion von <i>S. aureus</i> USA300 LAC* und den isogenen Mutanten Δ P1- Δ P9 in eukaryotische Epithelzellen (A549).....	100
Abbildung 20: Aktivierung des alternativen Weges des Komplementsystems in Anwesenheit der Proteine P1-P10.. ..	101
Abbildung 21: Spezifische Antikörperantwort im Plasma von humanen nasalen <i>S. aureus</i> -Trägern und Nicht-Trägern.....	103
Abbildung 22: Spezifische Antikörperantwort in Seren von humanen immunsupprimierten Patienten-Gruppen.....	104
Abbildung 23: Spezifische Antikörperantwort in murinen Seren von wiederholt infizierten Tieren.....	106
Abbildung 24: Zusammenfassung aller ermittelten Antikörpertiter in humanen und murinen Plasmen bzw. Seren in Form einer <i>Heatmap</i>	107
Abbildung 25: Lokalisation von SA0016 (<i>purA</i>) im Genom von <i>S. aureus</i> N315.....	108
Abbildung 26: Natives Polyacrylamid-Gel von PurA. 6, 10 und 15 μ g aufgereinigtes Protein wurden der Größe nach in einer nativen PAGE aufgetrennt.....	110
Abbildung 27: Bindungsstudien zum Nachweis der Spezifität des generierten α -PurA-Antikörpers aus Kaninchen.	112
Abbildung 28: Bindung von humanem Faktor H (FH) an PurA.....	113
Abbildung 29: Inhibierung der Interaktion zwischen PurA und FH durch den spezifischen α -PurA-Antikörper.	114
Abbildung 30: Vergleich der Aminosäuresequenz von PurA aus <i>E. coli</i> (A) und aus <i>S. aureus</i> N315 (B).....	115
Abbildung 31: Bindung von FH an veränderte Varianten von PurA – die veränderten Varianten von PurA binden FH vergleichbar mit dem wildtypischen PurA (WT).	117
Abbildung 32: Einteilung von PurA in verschiedene Fragmente (I-VIII) anhand der vorhergesagten Sekundärstruktur.	118
Abbildung 33: Bindung von verschiedenen PurA-Fragmenten an Faktor H.....	120
Abbildung 34: <i>In-vitro</i> -Expression von <i>purA</i> in den <i>S. aureus</i> -Stämmen USA300 LAC*, Newman, 8325 und HG003 in verschiedenen Phasen des bakteriellen Wachstums (oben) mittels semiquantitativer RT-PCR.	121
Abbildung 35: Detektion von PurA in der cytoplasmatischen Fraktion (C), der Membran-Fraktion (M) und im Überstand (Ü) einer Bakterienkultur von <i>S. aureus</i> 8325 (WT) und einem Protein A-defizienten Stamm HG003 (Δ <i>spa</i>) mittels Western Blot-Analyse.	122
Abbildung 36: Oberflächen-assoziierte Lokalisation von PurA in der Bakterienzelle mittels FACS-Analyse und LSM-Aufnahmen.	123
Abbildung 37: Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen PurA.	124

Abbildung 38: Antikörperantwort gegen PurA in Plasmen von 16 Trägern und 16 Nicht-Trägern.	125
Abbildung 39: Insertion des <i>mariner based</i> Transposons in <i>purA</i>	126
Abbildung 40: Wachstum und Anzahl der koloniebildenden Einheiten von <i>S. aureus</i> USA300 LAC*, HG003 und Newman mit der jeweils zugehörigen <i>purA</i> -Mutante in TSB.	127
Abbildung 41: Wachstum von <i>S. aureus</i> USA300 LAC*, HG003 und Newman mit der jeweils zugehörigen <i>purA</i> -Mutante in B-Medium.....	128
Abbildung 42: Makrokoloniebildung von <i>S. aureus</i> USA 300 LAC (JE2) und Newman sowie den zugehörigen $\Delta purA$ -Mutanten.	129
Abbildung 43: Virulenz von <i>S. aureus</i> Wildtyp (WT) und $\Delta purA$ in <i>Galleria mellonella</i> Larven.	130
Abbildung 44: Übersicht über Lokalisation und Anordnung aller an der Purin-Biosynthese beteiligten <i>pur</i> -Gene innerhalb des Genoms von <i>S. aureus</i> N315.....	131
Abbildung 45: Wachstum (OD_{600}) von <i>S. aureus</i> USA300 JE2 (WT) und den isogenen Einzelmutanten des Purin-Synthesewegs ($\Delta purA$ - $\Delta purS$).....	133
Abbildung 46: Anzahl der koloniebildenden Einheiten von <i>S. aureus</i> USA300 JE2 (WT) und den isogenen Mutanten, die jeweils eine Mutation in einem Gen des Purin-Synthesewegs ($\Delta purA$ - $\Delta purS$) enthalten.....	134
Abbildung 47: <i>Spot Assay</i> von <i>S. aureus</i> USA300 JE2 (WT) und den isogenen Einzelmutanten des Purin-Synthesewegs ($\Delta purA$ - $\Delta purS$).	134
Abbildung 48: Virulenz verschiedener Einzelmutanten des Purin-Syntheseweges und des zugehörigen Wildtyps <i>S. aureus</i> USA300 JE2 in <i>Galleria mellonella</i>	135
Abbildung 49: Virulenz von <i>S. aureus</i> Newman und Newman $\Delta purA$ im Pneumonie-Überlebensversuch in Balb/c Mäusen (n=10).....	137
Abbildung 50: Virulenz von <i>S. aureus</i> USA300 LAC* und USA300 LAC* $\Delta purA$ im systemischen Infektionsmodell in Balb/c Mäusen.	138
Abbildung 51: <i>In-vivo</i> -Kompetition von <i>S. aureus</i> Newman bzw. USA300 LAC* und den isogenen $\Delta purA$ -Mutanten in <i>Galleria mellonella</i>	140
Abbildung 52: <i>In-vivo</i> -Kompetition von <i>S. aureus</i> Newman bzw. USA300 LAC* und der dazugehörigen <i>purA</i> -Mutante in Balb/c Mäusen.....	141
Abbildung 53: Experimenteller Ablauf für die Behandlung einer systemischen Infektion mit Hadacidin.....	143
Abbildung 54: <i>In-vivo</i> -Imaging einer systemischen Infektion mit <i>S. aureus</i> Newman <i>lux</i> unter Behandlung mit Hadacidin.	144
Abbildung 55: Zeitlicher Verlauf der Infektion nach intravenöser Inokulation von 5×10^7 CFU Newman <i>lux</i> und Behandlung mit Hadacidin anhand des Biolumineszenzsignals.....	145

Abbildung 56: <i>Ex vivo</i> Biolumineszenz-Imaging der isolierten Organe.....	146
Abbildung 57: Bestimmung der koloniebildenden Einheiten in den peripheren Organen...	147
Abbildung 58: Histologische Untersuchung der peripheren Organe (Herz, Milz, Niere und Leber) nach systemischer Infektion mit <i>S. aureus</i> Newman <i>lux</i> und Behandlung der Tiere mit Hadacidin.....	148
Abbildung 59: Übersicht über die Antikörperantworten gegen 63 verschiedene <i>S. aureus</i> Antigene in murinen Seren.	153
Abbildung 60: Mittels <i>Staph-Toxin-Array</i> bestimmte Antikörperantwort in den Seren der unterschiedlich immunisierten Tiere.	155
Abbildung 61: Übersicht über die Gesamt-Antikörper Antwort gegen alle 63 Antigene je Maus.....	156
Abbildung 62: Sequenz-Homologie zwischen den Proteinen SCIN (NWMN_1876, P5) und P1 (SACOL1169).....	165
Abbildung 63: Schematische Darstellung der Purin-Biosynthese und AMP-Synthese.....	167
Abbildung 64: Schematische Darstellung von Faktor H des Komplementsystems.....	169
Abbildung 65: Modell zur Komplementevasion von <i>S. aureus</i> durch PurA.	170
Abbildung 66: Übersicht über Proteintransport-Systeme in Staphylokokken.....	174
Abbildung 67: Strukturvergleich zwischen der Aminosäure Aspartat (links) und dem Strukturanalogon Hadacidin (rechts).	180
Abbildung 68: Antikörperantwort in den Seren der unterschiedlich infizierten Tiere.....	210
Abbildung 69: Homologie von PurA zwischen verschiedenen Staphylokokken-Stämmen. ...	211
Abbildung 70: Homologie zwischen Eap (Uniprot: Q9Z4J2) und P9 und P10.....	212

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Kits	16
Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika	17
Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Medikamente	17
Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Medien	18
Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	21
Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete <i>S. aureus</i> -Stämme	22
Tabelle 7: Allgemein verwendete Oligonukleotide	25
Tabelle 8: Oligonukleotide für die Klonierung in pTXB1 (Intein-CBD)	25
Tabelle 9: Oligonukleotide für die Klonierung in pPR-IBA1 (Strep-Tag)	26
Tabelle 10: Oligonukleotide für die Klonierung in pGEX4T-1 (GST-Tag)	27
Tabelle 11: Oligonukleotide für die Klonierung in pFN18A (Halo-Tag)	28
Tabelle 12: Oligonukleotide für die korrekte Insertion des Transposons in den Stämmen aus der NARSA-Bibliothek	28
Tabelle 13: Oligonukleotide für die RT-PCR	29
Tabelle 14: Oligonukleotide zur Untersuchung von PurA	29
Tabelle 15: In dieser Arbeit verwendete Plasmide	31
Tabelle 16: In dieser Arbeit verwendete Mauslinien	33
Tabelle 17: In dieser Arbeit verwendete Software	35
Tabelle 18: Zusammensetzung eines 15%igen SDS-Gels	56
Tabelle 19: Verwendete Puffer im Thermofluor Assay	59
Tabelle 20: Übersicht über alle auf dem <i>Staph-Toxin-Ag03</i> immobilisierten Antigene aus <i>S. aureus</i> gruppiert nach ihrer Funktion bzw. ihrem Vorkommen in der Bakterienzelle.	75
Tabelle 21: Übersicht über die ausgewählten Exoproteine mit bislang unbekannter Funktion (Teil 1)	78
Tabelle 22: Übersicht über die ausgewählten Exoproteine mit bislang unbekannter Funktion (Teil 2)	79
Tabelle 23: Übersicht über die ausgewählten Exoproteine mit bislang unbekannter Funktion (Teil 3)	80
Tabelle 24: Übersicht über aufgereinigte Zielproteine	86
Tabelle 25: Übersicht über die verwendeten NARSA-Stämme	88
Tabelle 26: Übersicht über die Funktion von Genen in räumlicher Nähe zu <i>purA</i>	109

Tabelle 27: Übersicht über die ausgetauschten Aminosäuren (AS) in PurA und die dazugehörigen Literaturstellen 116

Tabelle 28: Übersicht über die verschiedenen Fragmente, die zur Überexpression und Aufreinigung in den Expressionsvektor pET28a mit N-terminalen His- *Proteintag* kloniert wurden. 119

Tabelle 29: Übersicht über den Bewertungsschlüssel von Antikörperantwort und Score.... 152

Zusammenfassung

Staphylococcus aureus ist ein grampositives Bakterium, welches häufig als kommensaler Besiedler auf der Nasen- und Rachenschleimhaut von Säugetieren vorkommt. Darüber hinaus besitzt dieser fakultativ pathogene Mikroorganismus die Fähigkeit schwer zu behandelnde Krankenhausinfektionen auszulösen. Aufgrund der weiten Verbreitung von Antibiotikaresistenzen und dem Mangel an effektiven Therapien, verursachen *S. aureus* Infektionen jährlich enorme Kosten für das Gesundheitssystem. *S. aureus* wird meist von der Nase zum primären Infektionsort übertragen, wodurch zunächst sehr häufig Wund- und Weichteilinfektionen hervorgerufen werden. Von diesem primären Infektionsort ausgehend, kann der Erreger tiefer liegende Gewebsschichten infizieren oder sich über den Blutstrom im gesamten Organismus ausbreiten. Das Spektrum an Krankheitsbildern reicht von leichten Abszessen der Haut bis zu schweren, lebensbedrohlichen Erkrankungen wie Pneumonien und akuter Sepsis.

Für die erfolgreiche Kolonisierung und Infektion des Wirtes exprimiert *S. aureus* eine Vielzahl unterschiedlicher Virulenzfaktoren. Die wohl größte Gruppe an Virulenzfaktoren umfasst die Proteine, die an der Immunevasion und der Umgehung von verschiedenen Abwehrstrategien des Immunsystems beteiligt sind. Das bisherige Wissen über die Interaktion von *S. aureus* mit dem Immunsystem des Wirtes und die zugrunde liegenden Pathogenitätsmechanismen ist bisher limitiert.

Um neue Erkenntnisse über die Interaktion von Wirt und Pathogen zu erlangen, wurden im Rahmen dieser Arbeit bislang unbekannte sekretierte und Oberflächen-assoziierte Proteine von *S. aureus* funktionell charakterisiert. Die Funktion der ausgewählten Proteine wurde *in vitro* hinsichtlich Einfluss auf Komponenten des Immunsystems, Adhäsion an Wirtsfaktoren und Invasion in eukaryotische Zellen untersucht.

Mit Hilfe der vorangegangenen *in-vitro*-Charakterisierung der putativen Virulenzfaktoren, konnte für die cytoplasmatische Adenylosuccinat-Synthase PurA eine neuartige Funktion identifiziert werden. PurA ist bekannt als essentielles Enzym der *de novo* Purin-Synthese. In dieser Arbeit wurde nun gezeigt, dass PurA zudem an der Immunevasion beteiligt ist. Durch die Bindung des humanen Faktor H des Komplementsystems schützt PurA *S. aureus* vor der lytischen Aktivität des Komplementsystems und verhindert die Opsonisierung des

Pathogens. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde PurA detailliert charakterisiert. In Bindungsstudien mit rekombinantem Faktor H und PurA wurde eine direkte Interaktion beider Proteine nachgewiesen, wobei Faktor H mit dem N-terminalen Bereich von PurA interagiert. Weiterhin konnte PurA durch Immunfluoreszenz und FACS-Analysen auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden, wo es wahrscheinlich mit der Zellwand assoziiert vorliegt. Dort rekrutiert es Faktor H an die bakterielle Oberfläche und verhindert das Fortschreiten der Komplement-Kaskade und damit die Lyse des Pathogens. Aufgrund der Multifunktionalität zählt PurA somit zur Gruppe der *Moonlighting* Proteine.

Des Weiteren wurde die Rolle von PurA im Infektionsgeschehen in zwei unabhängigen Tiermodellen untersucht. In beiden Modellen wurde ein signifikant reduziertes Virulenzpotential der $\Delta purA$ -Mutante beobachtet. Zukünftig soll geklärt werden, ob die verminderte Virulenz in der fehlenden Komplementevasion oder im Defekt in der Purin-Synthese begründet ist. Aufgrund der sehr starken Attenuation in allen untersuchten Infektionsmodellen sollte PurA als potentielles Target für eine Therapie von *S. aureus* Infektionen weiter charakterisiert werden. Im Ergebnis dieser Arbeit wurde demnach mit PurA ein neues *Moonlighting* Protein identifiziert, das als Inhibitor des Komplementsystems wesentlich zur Immunevasion von *S. aureus* beiträgt.

Für das bessere Verständnis der humoralen *S. aureus*-spezifischen Immunantwort, Unterschieden in der Antikörperantwort und der gebildeten Antikörperspezifitäten wurde weiterhin das während der Kolonisierung und Infektion gebildete *S. aureus*-spezifische Antikörperprofil untersucht. Dazu wurden Plasmen von humanen nasalen Trägern und Nicht-Trägern sowie murine Seren von infizierten Tieren untersucht. Insbesondere wurde das Pathogen-spezifische Antikörperprofil in unterschiedlichen Infektionsmodellen mit Hilfe eines Proteinarrays analysiert, der im Rahmen dieser Arbeit in einer Kooperation mit der Firma Alere Technologies (Jena, Deutschland) und universitären Forschergruppen der Universitäten Greifswald, Münster und Jena mitentwickelt wurde. Die Antikörperprofile von intramuskulär und intravenös infizierten Tieren resultierten in jeweils spezifischen Antikörperprofilen. Diese Ergebnisse deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Art der Infektion und der gebildeten Antikörperspezifitäten hin. Wahrscheinlich beruht dies auf einer gewebespezifischen Genexpression als Anpassung an die individuellen Bedürfnisse im Wirtsorganismus. Das ausgebildete Antikörperprofil gibt somit einen Einblick in das Expressionsmuster von Virulenzfaktoren von *S. aureus* unter *in vivo* Bedingungen und trägt

damit zum Verständnis der komplexen Interaktion von Pathogen und Wirt bei. Diese Untersuchungen ergänzen zudem die bisherigen Kenntnisse über die Anpassung der humoralen Immunantwort an eine asymptomatische Kolonisierung im Gegensatz zu einer akuten Infektion durch *S. aureus*. Darüber hinaus können die gewonnenen Ergebnisse für diagnostische Zwecke und zur Identifikation von neuen Zielstrukturen für eine Vakzin-Entwicklung genutzt werden.

Summary

S. aureus is a gram-positive bacterium that is prevalent in animals. It is part of the commensal nasal and respiratory flora. Moreover, it has the ability to transform into a pathogenic micro-organism, thereby eliciting different diseases including hospital-associated infections. *S. aureus* is transmitted via direct contact from nasal mucosa to the site of infection where it may provoke skin and soft tissue infections. Due to the rapid development of resistance to antibiotics and a current lack of effective treatment options, *S. aureus* infections cause enormous costs for the health-care system. Starting from the primary site of infection, *S. aureus* invades into deeper tissues and into the bloodstream during the course of the infection. This leads to a dissemination of the pathogen in the body and is associated with a broad spectrum of diseases including skin abscesses, pneumonia or even acute septicaemia.

The pathogen *S. aureus* produces a multitude of virulence factors that help to colonize and infect the human host. Probably the most extensive group harbours proteins involved in immune evasion and circumvent different host defence mechanisms. Understanding of the interaction between *S. aureus* and the host immune response and the underlying pathogenicity mechanism is still limited.

As a part of this work, the interaction of novel secreted and surface-associated proteins of *S. aureus* with the host immune response was investigated in order to expand the knowledge of host pathogen interactions. Therefore, the function of thus far uncharacterized extracellular proteins of *S. aureus* was investigated *in vitro* in relation to influence on components of the immune system, adhesion to host factors and invasion in eukaryotic cells.

By using results from previous *in vitro* characterization of putative virulence factors, a novel function of cytoplasmic adenylosuccinate synthetase PurA was identified. Beside the catalytic reaction during *de novo* purine synthesis, PurA is independently involved in immune evasion. By binding human complement regulators such as factor H, it protects the bacteria from the lytic activity of the human complement system and prevents the opsonization of the pathogen. The progression of the complement cascade on the bacterial surface is prevented by recruiting complement FH.

On the basis of these findings, the moonlighting protein PurA was therefore characterized in detail. In this, the binding between both interaction partners FH and PurA was analysed first. Moreover, it was shown that the cytosolic protein PurA is also associated with the bacterial cell wall. Besides the *in vitro* characterization of PurA, the impact of the multitasking protein of *S. aureus* on virulence was investigated *in vivo*. Therefore $\Delta purA$ deletion mutants were studied regarding their virulence potential in the alternative animal model *Galleria mellonella* as well as in mice. Due to the reduced virulence of $\Delta purA$ deletion mutants in all investigated animal models, PurA was suggested as a potential target for antibiotic treatment during *S. aureus* infection. In summary, the moonlighting protein PurA enlarges the spectrum of immune evasion strategies used by *S. aureus* with a complement system inhibitor.

For better understanding of the pathogen-specific humoral immune response, the differences in antibody response and specificities were investigated in human plasma of nasal carriers and non-carriers as well as in murine sera of infected animals. Moreover, the anti-*S. aureus* antibody profile developed during infection was characterized depending on the type of infection by using a protein array that was co-developed in cooperation with the company Alere technologies (Jena, Germany) and university research groups from Greifswald, Münster and Jena. The results of the differentially infected mice indicated a relationship between developed antibody specificities and type of infection which is likely due to differential gene expression as an adaptation to individual requirements in the host environment. The results give insights into the expression pattern of virulence factors of *S. aureus* under *in vivo* conditions contributing to the understanding of the highly complex interaction between pathogen and host. Moreover, these findings supplement the current experience in the adaptations of the humoral immune response to asymptomatic colonization and acute infection. The results gained from this study can be used as a diagnostic tool or for target identification in the development of vaccine.

1. Einleitung

1.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus ist verantwortlich für eine Vielzahl von Klinik-assoziierten Infektionen und gewinnt vor allem durch die steigende Anzahl an Antibiotikaresistenzen an Bedeutung. [1,2] Das Gram-positive Bakterium *S. aureus* wurde erstmals 1880 von Alexander Ogston, einem schottischen Chirurgen beschrieben. Es ist ein nicht sporenbildendes Bakterium der Ordnung Bacillales, das nicht motil und fakultativ anaerob ist. Auf Grund ihrer Morphologie bezeichnete sie Alexander Ogston als Staphylokokken (grch. *staphylè* = Weintraube). [3,4]

Anton J. Rosenbach gilt als Namensgeber von *S. aureus*. 1884 gelang es ihm zwei Staphylokokken-Stämme zu isolieren. Die von ihm geprägte Nomenklatur der beiden Stämme orientierte sich an der Färbung der Kolonien: *S. aureus* (lat. *aurum* = golden) und *S. albus* (lat. *albus*=weiß, heute *S. epidermidis*). Bis heute sind über 30 unterschiedliche Staphylokokken-Spezies bekannt. [4]

S. aureus kommt als kommensales Bakterium in Säugetieren und Vögeln vor. Hier ist es vorwiegend auf Haut und Schleimhäuten von Nase und Rachen zu finden. In seltenen Fällen ist es auch im Blut und in verschiedenen anderen Geweben persistent. Hier kann es Auslöser für eine Reihe verschiedener Erkrankungen sein. [5,6]

S. aureus besitzt die Fähigkeit sich schnell an veränderte Umweltbedingungen anzupassen. Dies wird insbesondere in der schnellen Ausbildung von Resistenzen gegen Antibiotika bzw. Medikamente deutlich. Vor der Entdeckung von Antibiotika um 1940 lag die Mortalität von Bakteriämie-Patienten bei ≈80 %. [7] Die Einführung des ersten Antibiotikums Penicillin G im Jahr 1941 verbesserte die Prognose deutlich und reduzierte die Mortalitätsrate auf 20-40 %. Allerdings wurden lediglich ein Jahr später Staphylokokken-Stämme dokumentiert, die Resistenzen gegen dieses Antibiotikum entwickelt hatten. [8,9] Um Penicillin G-resistente Keime zu behandeln, wurde daraufhin im Jahr 1959 das erste halbsynthetische β -Lactam-Antibiotikum Meticillin für den Gebrauch in der Klinik eingeführt. Doch auch hier konnten bereits 1960 die ersten Meticillin-resistenten *S. aureus*-Stämme (MRSA) in Großbritannien isoliert werden. [10] In den darauf folgenden Jahren traten MRSA-Stämme in vielen weiteren Ländern auf. [11] Es wurde geschätzt, dass 2006 bereits bis zu 53 Millionen Menschen weltweit mit MRSA kolonisiert waren. [12,13]

Die Zahl der Erkrankungen und die Mortalitätsrate verursachen jährlich enorme Kosten für das Gesundheitssystem. Das grundlegende Verständnis für die Interaktion zwischen Pathogen und Wirt ist bisher nicht ausreichend vorhanden. Daher liegt ein Interessenschwerpunkt der medizinischen und biologischen Forschung auf dem Verständnis der Virulenzmechanismen von *S. aureus* und dessen Interaktion mit dem Wirt. [14]

Seine Vielseitigkeit als Pathogen wird in seinem breiten Wirtsspektrum deutlich, da *S. aureus* nahezu alle domestizierten Tiere, insbesondere Schweine, Geflügel und Rinder kolonisieren kann. Auch dort kann *S. aureus* Infektionen auslösen, weshalb es auch aus veterinärmedizinischer Sicht zu einem zunehmenden Problem wird. [15]

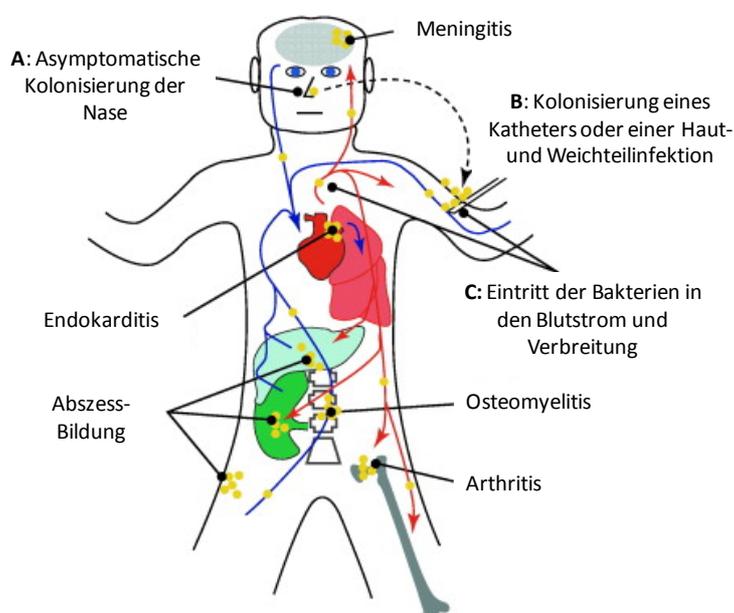


Abbildung 1: Ursachen und Konsequenzen einer *S. aureus* Bakteriämie. A: Als Kommensale in der Nase vorkommende Bakterien werden auf Wunden oder Katheter übertragen (B) und verursachen z.T. Haut- bzw. Weichteilinfektionen. Von dort aus können sie in den Blutstrom gelangen und sich im Körper ausbreiten (C). Dies führt zur Infektion von umliegenden Geweben und kann z.B. in Meningitis, Endokarditis und Abszessbildung resultieren. Modifiziert nach [16]

Die Übertragung von *S. aureus* erfolgt hauptsächlich von der Nase zum Infektionsort durch direkten Kontakt. Typischerweise wird die Infektion von einer Verletzung der Haut oder durch einen intravenösen Katheter bedingt. Dadurch entstehen in den meisten Fällen lokal begrenzte Haut- und Weichteilinfektionen, die weitestgehend gut therapierbar sind. In wenigen Fällen bekommt das Pathogen allerdings Zugang zum Blutstrom und löst eine sogenannte Bakteriämie aus. Dadurch kann es sich im ganzen Körper verbreiten. Dies kann

unterschiedliche Folgen wie z.B. Abszessbildung in umliegenden Organen, Arthritis, Endokarditis und Meningitis haben. [16] In Abbildung 1 sind die Ursachen und Konsequenzen einer *S. aureus* Bakteriämie zusammenfassend gezeigt.

1.2 Virulenzfaktoren und Immunevasion

Für die Kolonisierung und Ausbreitung im menschlichen Wirt hat *S. aureus* zahlreiche „Werkzeuge“ entwickelt, die man auch als Virulenzfaktoren bezeichnet. *S. aureus* exprimiert eine ganze Reihe verschiedener Virulenzfaktoren, die essentiell für die Interaktion zwischen Pathogen und Wirt sind. [17]

Im Allgemeinen kann man Virulenzfaktoren hinsichtlich ihrer Funktion in vier Gruppen unterteilen. Das sind zum einen Proteine, die in der Adhäsion und Invasion von Wirtszellen involviert sind. Eine weitere Gruppe bilden Faktoren, die Wirtszellen degradieren, um Nährstoffe zu gewinnen und um die Ausbreitung in tiefer liegende Gewebe zu ermöglichen. Die dritte Gruppe umfasst Proteine, die für die Verwertung von Nährstoffen aus dem Wirt verantwortlich sind und die vierte Gruppe bilden die Virulenzfaktoren, die die Immunevasion vermitteln. [2,18]

1.2.1 Immunantwort gegen bakterielle Keime

Gelangt *S. aureus* in den Blutkreislauf bzw. ins Gewebe, wird es mit den Mechanismen des Immunsystems konfrontiert, die auf das Abtöten des Pathogens abzielen. In erster Linie kommt es im Blut mit den Proteinen des Komplementsystems, einem evolutionär konservierten Teil des angeborenen Immunsystems, in Kontakt. Das Komplementsystem kann entweder über die Bindung von spezifischen Antikörpern an die Oberfläche der Bakterien (klassischer Weg) oder über den spontan ablaufenden alternativen Weg aktiviert werden. Beide Wege resultieren entweder in der Opsonisierung oder in der direkten Lyse der Bakterien. Durch die Opsonisierung werden Bestandteile des zellulären Immunsystems angelockt, die in der Lage sind die Bakterien zu internalisieren und zu degradieren. Zusätzlich zu den Komplement-Peptiden können Pathogene auch durch die Bindung von spezifischen Antikörpern opsonisiert werden. [19]

Auf der Ebene des zellulären Immunsystems wandern direkt nach dem Eindringen der Bakterien im Blut zirkulierende phagozytotisch aktive Zellen wie Neutrophile und Makrophagen zum Ort der Infektion. Sie werden vor allem durch die zuvor beschriebenen Oponine entlang eines Konzentrationsgradienten angezogen. Sind die Zellen am Ort der Infektion angekommen, sind sie in der Lage die Bakterien zu phagozytieren und zu lysieren. Anschließend präsentieren die phagozytierenden Zellen bakterielle Proteine über MHC II, wodurch eine spezifische B- und T-Zellantwort entsteht. [19,20]

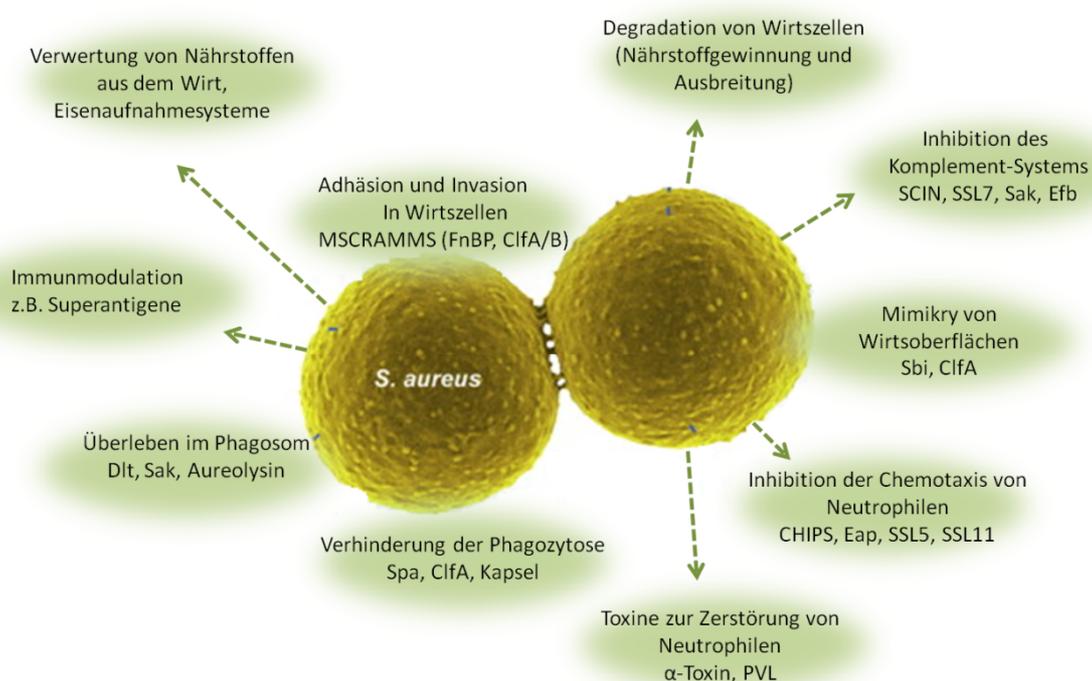


Abbildung 2: Übersicht über die Virulenzfaktoren und Immunevasions-Mechanismen von *S. aureus*. Es werden eine Vielzahl von verschiedenen Faktoren exprimiert, die an unterschiedlichen Mechanismen beteiligt sind. Nach [17]. MSCRAMM: *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*, FnBP: Fibronectin-Bindeproteine, ClfA/B: *Clumping factor*, SCIN: *Staphylococcus complement inhibitor*, SSL: *Staphylococcal superantigen-like proteins*, Sak: Staphylokinase, Efb: *extracellular fibrinogen-binding protein*, Sbi: *second immunoglobulin-binding protein*, CHIPS: *chemotaxis inhibitory protein of staphylococci*, Eap: *extracellular adhesive protein*, PVL: Panton-Valentine-Leukozidin, Spa: Protein A

S. aureus hat eine Vielzahl von Virulenzfaktoren entwickelt, mit deren Hilfe es in der Lage ist die Immunantwort des Wirtes zu umgehen. Alle Virulenzfaktoren, die an diesem als Immunevasion bezeichneten Prozess beteiligt sind, lassen sich wie in Abbildung 2 dargestellt, in mehrere Untergruppen unterteilen. Im Folgenden werden die wichtigsten Mechanismen genauer beleuchtet.

1.2.2 Inhibierung der Chemotaxis von Neutrophilen

Sobald *S. aureus* die physische Barriere der Haut überwunden hat, werden chemotaktisch aktive Substanzen freigesetzt, die hauptsächlich Neutrophile und Makrophagen zum Ort der Infektion locken. Diese Substanzen sind im Allgemeinen bakterielle, formylierte Peptide und aktivierende Peptidfragmente des humanen Komplementsystems. Um die Chemotaxis von Neutrophilen und anderen phagozytierenden Zellen an den Infektionsort zu verhindern, sekretiert *S. aureus* z.B. CHIPS (*chemotaxis inhibitory protein of staphylococci*). Dieses bindet spezifisch an G-Protein gekoppelte Rezeptoren auf der Oberfläche der Neutrophilen und verhindert damit die Bindung von chemischen Lockstoffen (Opsonine). [18,21–23] Zusätzlich dazu verhindert *S. aureus* die Bindung und die Diapedese von Neutrophilen an Endothel-Zellen, in dem es insbesondere den Virulenzfaktor Eap (*extracellular adherence protein*) sekretiert, der an ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule 1*, CD45) auf der Oberfläche von Endothel-Zellen bindet. Neutrophile nutzen ICAM-1 um aus dem Blutstrom zu entkommen und zum Ort der Infektion zu wandern. Dieser Vorgang wird von *S. aureus* gezielt verhindert. Des Weiteren produziert *S. aureus* eine Vielzahl von Toxinen, die mit hoher Affinität Leukozyten lysieren, in dem sie Poren in der Cytoplasmamembran bilden (α -Toxin, γ -Hämolyisin, PVL). [18,24,25]

1.2.3 Verhinderung von Opsonophagozytose

Antikörper gegen Oberflächen-Moleküle von *S. aureus* wie z.B. Peptidoglykan, Teichonsäuren und Oberflächen-assoziierte Proteine sind in humanem Serum ubiquitär nachweisbar. Diese binden zusammen mit Proteinen (C3, C5) des Komplementsystems spezifisch an die Oberfläche der Bakterien und sind somit maßgeblich an der Opsonisierung der Bakterien für professionelle phagozytotische Zellen beteiligt. *S. aureus* hat mehrere Strategien entwickelt, um die Opsonisierung zu verhindern. Zum einen werden Oberflächen-assoziierte Proteine exprimiert, wie z.B. Protein A, das den konstanten Teil (Fc-Teil) von Immunglobulin G (IgG) bindet. Dadurch wird die natürliche Orientierung der gebundenen Antikörper auf der Oberfläche der Bakterien geändert und die Bindung des Fc-Rezeptors von Neutrophilen ist nicht möglich. Die Phagozytose der Bakterien wird somit verhindert. [26,27] Des Weiteren exprimiert *S. aureus* gezielt Proteine wie ClfA und ClfB (*Clumping factor*), die Fibrinogen an die Bakterienoberfläche binden und somit ebenfalls die Bindung von

opsonisierenden Antikörpern verhindern. [28,29] Ähnlich wirkt auch eine dünne Kapsel-Schicht aus Polysacchariden, die die Aufnahme der Bakterien durch Neutrophile inhibiert. [30–32]

Zusätzlich dazu können Pathogene auch durch Bestandteile des Komplementsystems (hauptsächlich C3b) opsonisiert werden. *S. aureus* sekretiert SCIN (*Staphylococcus complement inhibitor*), das die Bildung von C3b und damit die Bindung dieses Peptids an die Oberfläche inhibiert. Außerdem kann es mit Hilfe von Efb (*extracellular fibrinogen-binding protein*) gezielt C3 blockieren, was einen ähnlichen Effekt wie SCIN zur Folge hat. [33–35] Darüber hinaus macht sich *S. aureus* die Komplement-inaktivierende Wirkung von Plasminogen zu Nutze. Wenn im Blut zirkulierendes Plasminogen in seine proteolytisch aktive Form Plasmin überführt wird, kann es Oberflächen-gebundenes C3b und IgG abspalten und somit maßgeblich die Anlagerung von opsonisierenden Peptiden verhindern. Die Bakterien nutzen diesen Mechanismus, in dem sie Staphylokinase (Sak) exprimieren. Dadurch wird Plasminogen an die Oberfläche der Bakterien gebunden und aktiviert. Dies führt zur Abspaltung von C3b und IgG auf der bakteriellen Oberfläche. [36,37]

1.2.4 Überleben im Phagosom und Resistenz gegen antimikrobielle Peptide

Wird *S. aureus* von einem Neutrophil phagozytiert, kann es durch Veränderungen in der Zellwand im Phagosom überleben. Dazu verfügt das Pathogen über zwei unterschiedliche Mechanismen. Beim ersten Mechanismus werden Modifikationen an den Lipoteichonsäuren bzw. an der Membran von verschiedenen Dlt Proteinen und MprF (*Multiple peptide resistance factor*) durchgeführt, wodurch die Ladung der Zellwand teilweise verändert und die Bindung von antimikrobiellen Peptiden verhindert wird. [38,39] In einem zweiten Mechanismus kann zusätzlich die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) mit Hilfe von Staphyloxanthin oder Superoxid-Dismutasen verhindert werden. [40–42]

1.2.5 Immunmodulation

Schließlich hat *S. aureus* nicht nur Strategien entwickelt, um die Mechanismen des Immunsystems zu inhibieren und abzuschwächen. Es kann die Immunantwort durch

Manipulation von B- und T-Zellen gezielt modulieren. So bindet beispielweise Protein A an die V_H3-Region von Immunglobulin M (IgM) auf der Oberfläche von B-Zellen, wodurch diese zur Apoptose angeregt werden. Dies führt zum Verlust eines großen Teils von B-Zellen in der Milz und im Knochenmark. [43,44]

Weiterhin kann die T-Zell-Antwort gezielt verändert werden. Durch die Bildung von Superantigenen wird MHC II auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen mit dem T-Zell-Rezeptor auf T_H-Zellen verbunden, ohne dass der T-Zelle ein Antigen präsentiert wird. Dies kann zur Aktivierung der T-Zellen führen, wodurch massiv Cytokine ausgeschüttet werden. [45,46]

1.3 Komplement-Evasion von Pathogenen

Das Komplementsystem ist ein Teil des angeborenen Immunsystems und besteht aus ca. 40 Plasmaproteinen, die für die Eliminierung von potentiell gefährlichen Zellen, Pathogenen und Fremdkörpern im Wirt zuständig sind. Als Reaktion auf eine Infektion mit einem Pathogen wird mit Hilfe des Komplementsystems eine proteolytische Kaskade ausgelöst, die damit äußerst schnell die Entzündungsreaktion einleitet. [47,48] Das Komplementsystem kann auf drei verschiedenen Wegen aktiviert werden, die als „alternativer“, „klassischer“ und „Lektin-abhängiger“ Weg bezeichnet werden. Jeder dieser Wege führt letztlich zur zentralen Reaktion des Komplementsystems: Der proteolytischen Spaltung und Aktivierung des Komplement-Proteins C3 in C3a und C3b. Letzteres lagert sich schnell an benachbarte Zelloberflächen an. Die Anlagerung hat massive Folgen: Es kommt zu einer Bindung von Faktor B (FB) und dieser wird wiederum von Faktor D gespalten. Letztendlich führt dies zur Formation der aktiven Konvertase C3bBb. Die Konvertase kann noch zirkulierendes ungespaltenes C3 ebenfalls spalten und zur Bindung an die Zelloberfläche motivieren. Wie in Abbildung 3 dargestellt, kommt es dadurch zu einer exponentiellen Aktivierung von C3 und zur Opsonisierung der Zelle. Des Weiteren führt eine zusätzliche Anlagerung von einem zweiten C3b Molekül zur Änderung der Spezifität. C3b₂.Bb spaltet daraufhin C5 in C5a und C5b. C5b rekrutiert C6 und bildet so einen stabilen Komplex, der als Ausgangspunkt für die Ausbildung einer Transmembran-Pore (zusammen mit C7, C8 und C9), dem sogenannten Membranangriffskomplex (MAC: *membrane attack complex*), führt. Dieser wird in jeder benachbarten Membran ausgebildet und resultiert in der Zytolyse. [47]

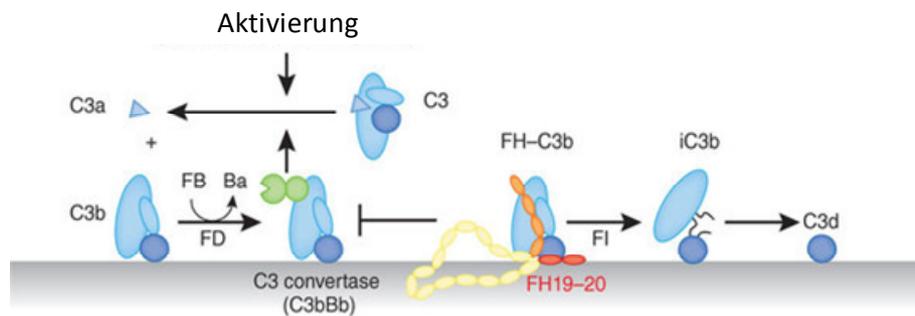


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Amplifikation der Komplement-Kaskade und der Schutz von wirts-eigenem Gewebe durch Faktor H. C3 wird in C3a und das Opsonin C3b gespalten. Der Pro-Protease Faktor FB bindet an C3b und wird dann durch Faktor D (FD) gespalten, wodurch Ba freigesetzt. Dies resultiert in der Bildung von des C3-Konvertase-Komplexes (C3bBb). Rechts ist der Schutz von körpereigenem Gewebe durch Faktor H (FH) gezeigt. Die FH Domänen 19-20 sind in rot hervorgehoben und die Domänen 1-4 in orange. Durch FH wird die C3 Konvertase in C3b und Bb gespalten und durch den Ko-Faktor I (FI) wird C3b schließlich in iC3b und C3d gespalten und damit vollständig inaktiviert. Modifiziert nach [49]

Potentiell jede Zelle, die mit dem Blut in Kontakt kommt, ist der schnellen Opsonisierung mit C3b und der Ausbildung des MAC über den alternativen Weg ausgesetzt. Deshalb ist es wichtig, die Anlagerung und Vervielfältigung von C3b an körpereigenen Oberflächen zu verhindern, um einer Schädigung von Wirtsgewebe entgegenzuwirken. Dafür ist Faktor H (FH) von entscheidender Bedeutung. [47,50,51] Es ist ein löslicher Faktor der im Blut zirkuliert und an allen körpereigenen Oberflächen und der extrazellulären Matrix wirkt. [52] Dort bindet er aktiv C3b und rekrutiert zusätzlich Faktor I (FI). Wenn FI aktiviert ist, wird C3b in iC3b gespalten und abgebaut. Dadurch wird der weitere Ablauf der Komplement-Kaskade verhindert. [53,54] Abbildung 3 stellt die Wirkungsweise von FH an körpereigenem Gewebe schematisch dar.

Sobald Pathogene in den Blutstrom des Wirtes gelangen, werden sie gezielt von dessen Komplementsystem angegriffen. Während apathogene Mikroorganismen gewöhnlich vom Komplementsystem eliminiert werden, haben einige Pathogene Strategien entwickelt, um dem Komplementsystem und die damit einhergehenden Immunantwort zu umgehen. [55] So sekretieren einige Mikroorganismen Proteasen, die verschiedenen Komplement-Faktoren wie C3b oder C5a proteolytisch degradieren. Andere hingegen sekretieren Faktoren, die dem Mikroorganismus helfen, sich vor dem Komplementsystem zu tarnen. [55]

Streptokokken der Gruppe B exprimieren beispielsweise eine Endopeptidase (ScpB) auf ihrer Oberfläche, die C5a spaltet und inaktiviert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass dies

signifikante Vorteile bei der Kolonisierung mit sich bringt. [56,57] *Pseudomonas aeruginosa* sekretiert hingegen eine Protease, die C3b gezielt spaltet. [58–61] Beide Mechanismen inhibieren die Amplifikation und die Aktivierung des Komplementsystems an der bakteriellen Oberfläche. In *S. aureus* sind die Proteine Efb und SSLs bekannt, die vergleichbare Funktionen übernehmen. [33,62,63]

Die Tarnung vor dem Komplementsystem wird hingegen über Bindeproteine erzielt, die lösliche Komplement-Regulatoren an die Oberfläche des Pathogens binden. Diese werden unter dem Begriff CRASP (*complement regulator acquiring surface protein*) zusammen gefasst. [55] CRASP-Proteine binden beispielsweise Faktor H, Faktor H-like (CFHL-1), Faktor H-related (CFHR-1) oder C4BP an die bakterielle Oberfläche. Vertreter dieser Gruppe wurden bereits z.B. in Gram-negativen Pathogenen (*Escherichia coli*, *Borrelia burgdorferi*, *P. aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*) und in Gram-positiven Bakterien (*S. pyogenes*, *S. pneumoniae*) sowie in Pilzen (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*) identifiziert. [64–69]

1.4 Das Exoproteom von *S. aureus*

Proteomstudien gewannen vor allem nach der Sequenzierung des gesamten Genoms von zwei Referenzstämmen im Jahr 2001 an Bedeutung [70]. Das Genom von *S. aureus* codiert für 2600-2700 verschiedene Gene, wobei ca. 1000 uncharakterisiert sind. Die Funktion von 30-40 % aller vorhergesagten Gene ist damit noch vollständig ungeklärt. [71,72] Das Genom von *S. aureus* wird in zwei Bereiche unterteilt. Der erste Bereich umfasst das relativ stabile Kerngenom, das hauptsächlich für Proteine codiert, die die normalen Haushaltsfunktionen übernehmen. Beispiele hierfür sind die Gene der Proteinbiosynthese, des Metabolismus oder der Zellteilung. Der zweite Bereich bildet einen flexiblen Genpool, der für eine Reihe verschiedener Virulenzfaktoren codiert. [73] Der flexible Teil des Genoms setzt sich hauptsächlich aus Plasmiden, Prophagen und mobilen Elementen zusammen, die in sogenannten Pathogenitätsinseln organisiert sind. [71] Dennoch gibt es auch einige gut charakterisierte Virulenzgene, die im stabilen Kerngenom organisiert sind. Dazu gehören insbesondere die Gene für Protein A (*spa*), Aureolysin (*aur*), α -Hämolysin (*hla*), Lipase (*lip*), Clumping factor (*clfAB*), Eap, Fibronectin-Bindeprotein A (*fnbA*) und Coagulase (*coa*). Im

klinischen Umfeld besteht jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Genotyp des jeweiligen Stammes und dem Virulenzpotential. [72]

Ein weiterer Schritt um die bisher uncharakterisierten Proteine näher zu untersuchen, waren 2D-Gel basierte und massenspektrometrische Untersuchungen der Gesamtheit aller Proteine von *S. aureus*. Dabei konnten mit einer Kombination aus vielen verschiedenen Techniken etwa 75% aller exprimierten Proteine identifiziert und zum Großteil quantifiziert werden. [74] Da alle extrazellulär vorliegenden Proteine ein vielversprechendes Reservoir für potentielle Virulenzfaktoren darstellen, rückte deren Untersuchung in den Vordergrund der Proteomstudien. [71,74,75] Daraus resultierend wurde der Begriff „*Surfacome*“ etabliert, der die Gesamtheit aller an der Oberfläche der Bakterienzelle exponierten Proteine umfasst. Dazu zählen Membranproteine, Lipoproteine, kovalent und nicht-kovalent an die Zelloberfläche gebundene Proteine und intrazelluläre Proteine, die auf unterschiedlichen Wegen in das äußere Milieu transloziert werden können. [76,77] Die Proteine des „*Surfacomes*“ und die Gesamtheit aller sekretierten Proteine bilden das sogenannte Exoproteom. Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Zusammensetzung des Exoproteoms zwischen verschiedenen *S. aureus*-Stämmen sehr heterogen ist. [72,76–78] In einer Studie mit 25 verschiedenen *S. aureus*-Isolaten konnten lediglich 7 von 63 sekretierten Proteinen im Exoproteom von allen Stämmen identifiziert werden. Dies bedeutet, dass lediglich 10 % des Exoproteoms konserviert sind. Betrachtet man die Menge der invariablen Proteine, so unterscheidet sich diese signifikant zwischen den einzelnen Isolaten. [72] Diese große Variabilität in der Zusammensetzung des Exoproteoms kann nicht ausschließlich auf den Unterschieden im Genom basieren, sondern deuten auch auf eine komplexe differenzielle Regulation während und nach der Transkription der Exoproteine hin. [72] Die hohe Variabilität und die komplexe Regulation innerhalb von verschiedenen Stämmen ist der Hauptgrund, warum die Funktion von 70 % aller bisher extrazellulär vorliegenden Proteine noch ungeklärt ist. [71] Da das Zusammenspiel bakterieller Virulenzfaktoren mit Faktoren aus dem Wirt bisher kaum verstanden ist, ist eine weitere Untersuchung dieser uncharakterisierten Proteine von großem Interesse. [71]

1.5 Transportmechanismen von Proteinen

Entscheidend für die Funktion eines Proteins als Virulenzfaktor ist dessen Transport in das extrazelluläre Milieu. Das Genom von *S. aureus* codiert für Proteine von sechs verschiedenen Proteinexport-Mechanismen. [71,79] Diese sind der Sec-abhängige Transportweg, der Tat-Transportweg, ABC-Transporter, Holine, ESAT-6- und Com-Transportwege.

Die wohl wichtigste Rolle bei der bakteriellen Proteinsekretion übernimmt der Sec-abhängige Transportweg. Eine Vielzahl von Proteinen wird auf diesem Weg über die Plasmamembran transportiert, indem sie zunächst gerichtet zur Membran transportiert, über die Membran transloziert und nach der Abspaltung des Signalpeptids korrekt gefaltet werden. [75,80] In neueren Studien wurde im Genom ein zusätzliches Sec-Transportsystem (SecA2-SecY2) identifiziert, das jedoch nicht essentiell für das Wachstum von *S. aureus* ist. Es wird wahrscheinlich nur ein kleiner Teil der Proteine darüber transportiert. [75,81,82]

Im Gegensatz zum Sec-abhängigen Transportweg, über den nur ungefaltete Proteine transportiert werden, können über den Tat-Transportweg auch vollständig gefaltete, Ko-Faktor-gebundene und oligomerisierte Proteine über die Membran transloziert werden. [83–85] Aus Sekretomstudien ist bekannt, dass nur sehr wenige Proteine überhaupt auf diesem Wege transportiert werden. [79] Allerdings zeigte eine Δ *tatAB* Mutante im Mausmodell eine signifikant verringerte Virulenz. [86]

ABC-Transporter sind eine große Gruppe von Proteinen, die hauptsächlich am Proteinexport beteiligt sind und eine ATP-Bindedomäne besitzen. [87] In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass bestimmte ABC-Transporter von *S. aureus* auch maßgeblich für die Virulenz verantwortlich sind. [88,89]

Der ESAT-6 Transportweg ist nach dem Proteine ESAT-6 aus *Mycobacterium tuberculosis* benannt, das ohne erkennbares Signalpeptid über die Membran transportiert wird und maßgeblich die Immunantwort des Wirtes moduliert. In *S. aureus* wurden 2 Proteine (EsxA und EsxB) gefunden, die eine ESAT-6 –ähnliche Struktur haben. Mutanten, denen beide Gene fehlen zeigen eine attenuierte Virulenz in murinen Abszess-Modell. [90,91]

1.6 Extrazelluläre Proteine und ihre Transportsignale

Extrazelluläre Proteine können hinsichtlich ihres Transports und ihrer Bindung an die bakterielle Oberfläche in mindestens fünf verschiedene Gruppen eingeteilt werden:

Lipoproteine, kovalent-gebundene, nicht-kovalent gebundene und cytoplasmatische Proteine.

Lipoproteine werden in der Regel über den Sec-abhängigen Transportweg exportiert. Danach werden diese modifiziert und verbleiben kovalent an die Membran gebunden. Die Funktion der meisten Lipoproteine in *S. aureus* ist noch unbekannt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass sie mit anderen sekretierten Proteinen interagieren, die dadurch an die Zellwand rückgebunden werden. [76,92,93].

Die zweite Gruppe umfasst Proteine, die ebenfalls kovalent an die Zelle gebunden sind. Im Gegensatz zu Lipoproteinen besitzen diese ein C-terminales Sortierungssignal (LPXTG-Motiv), welches von Sortasen (Srt) erkannt und gespalten wird. Dadurch werden die Proteine kovalent an der Pentapeptid-Brücke des Peptidoglykan-Rückgrats verankert. Diese Proteine werden auch unter dem Begriff MSCRAMMs („*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*“) zusammengefasst.[77]

Die dritte Gruppe umfasst Proteine, die über nicht-kovalente Bindungen an der Membran verankert sind. Die meisten besitzen bestimmte Zellwand-Bindedomänen, dazu zählen z.B. GW-Domänen, LysM-Domänen und C-terminale SH3-Domänen, die oft Teil von Phagen-codierten CHAP-Proteinen sind. [77] Zu dieser Gruppe gehören auch aus der Bakterienzelle sekretierte Proteine, die später über nicht-kovalente Bindung an die Zellwand zurück gebunden werden. Dazu zählen vor allem Eap (*extracellular adhesive protein*) und Efb (*extracellular fibrinogen-binding protein*). Die zunächst sekretierten und später rückgebundenen Proteine werden als SERAMs („*secretable expanded repertoire adhesive molecules*“) zusammengefasst.

Cytoplasmatische Proteine, die auch extrazellulär vorkommen, bilden die vierte Gruppe an Proteinen. All diese Proteine besitzen weder Zellanker, noch Sekretionssignal oder ein Zellwand-Bindemotiv. [77] Es gibt verschiedene Hypothesen, die die Lokalisation der Proteine erklären könnte. Entweder es gibt bisher noch unidentifizierte Translokationsmechanismen oder die Sekretion erfolgt nicht über klassische Mechanismen. Andererseits wird vermutet, dass die Proteine nach der Autolyse von einigen Bakterien an die Oberfläche zurück adhäreren z.B. durch ionische Wechselwirkungen mit Zellwandbestandteilen. Andererseits könnte es sich dabei lediglich um ein Artefakt handeln, das durch die Probenvorbereitung entsteht. [76,94–96]

Ungeachtet der Identität der Transport-Mechanismen von cytosolischen Proteinen, gibt es Studien, die gezeigt haben, dass Vertreter wie Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, einige Chaperone und das Metalloenzym Enolase an der Zelloberfläche lokalisiert sind. [76,97–100]. Für die Enolase, die im Cytoplasma die Bildung von Phosphoenolpyruvat übernimmt, konnten bereits einige extrazelluläre Funktionen, wie beispielsweise die Bindung an Laminin und Plasminogen gezeigt werden. Damit hat das Protein zwei völlig unabhängige Funktionen in zwei unterschiedlichen Kompartimenten der Bakterienzelle. [101,102] Proteine, die neben ihrer primären Funktion im Cytoplasma noch eine zweite eigenständige Funktion übernehmen wurde der Begriff „*moonlighting*“-Proteine etabliert. [103]

1.7 Anti-*S. aureus* Antikörperantwort

S. aureus ist ein ubiquitär verbreitetes Bakterium, mit dem Neugeborene im Allgemeinen innerhalb von wenigen Stunden in Kontakt kommen. Es konnte gezeigt werden, dass der Darm von 80 % aller Kinder innerhalb des ersten Lebensjahres kolonisiert wird. [104,105] Mit zunehmendem Alter nimmt die Kolonisierungsrate jedoch ab. Dennoch sind 20 % der Erwachsenen dauerhaft von *S. aureus* kolonisiert, weitere 30 % tragen einen entsprechenden Stamm zeitweise und 50 % der Erwachsenen sind nicht kolonisiert. [104,106] Die bakterielle Kolonisierung scheint dabei weitestgehend symptomlos zu verlaufen. Allerdings kann es in Folge einer Schwächung des Immunsystems zu schwerwiegenden Infektionen, wie z.B. Wundinfektionen, Pneumonie oder Endokarditis kommen. [105]

Ein wichtiger Faktor bei der Immunabwehr gegen *S. aureus* ist das adaptive Immunsystem. Hier sind insbesondere die *S. aureus*-spezifischen Antikörper von Bedeutung. Dieser Zusammenhang wird besonders bei Patienten mit Immunglobulin-Defekt deutlich. Sie tendieren zu häufigen *S. aureus* Infektionen und sind demnach sehr anfällig. [105,107]

Während einer Infektion können Antikörper verschiedene Funktionen übernehmen. Zum einen gibt es neutralisierende Antikörper, die verhindern, dass ein Pathogen an Zieloberflächen im Wirt wie z.B. extrazelluläre Matrix und Epithelzellen binden kann. Außerdem können vom Pathogen sekretierte Toxine gezielt neutralisiert werden.

Andererseits können Antikörper opsonisierende Wirkung haben und die Aufnahme der Bakterien durch phagozytierende Zellen beschleunigen. Über einen dritten Mechanismus können die Immunglobulin-Klassen IgM, IgG₁ und IgG₃ an bakterielle Oberflächen binden und das Komplementsystem über den klassischen Weg aktivieren. [105]

Alle bisherigen Untersuchungen zur Antikörperantwort gegen *S. aureus* zeigen, dass die Antikörperprofile sehr variabel und heterogen sind. [108] Für die Untersuchung der anti-*S. aureus* Antikörper, die während der Kolonisierung und Infektion gebildet werden, werden spezielle Techniken genutzt, wie z.B. ELISA-basierte Experimente, bei denen die Antikörperbindung an native, immobilisierte Antigene untersucht wird oder zweidimensionale Immunoblots (2D-IB) kombiniert mit Massenspektrometrie. [109–111]

Neben der hohen Heterogenität der Antikörperprofile, konnte gezeigt werden, dass das bereits bestehende immunologische Gedächtnis den Verlauf einer Erkrankung beeinflusst. [108] Im Allgemeinen haben erwachsene Träger ein spezifisches Antikörperprofil gegen ihren kolonisierenden *S. aureus*-Stamm entwickelt. Dabei richtet sich die Spezifität gegen eine große Anzahl von Zellwand-assoziierten und sekretierten Proteinen. Insbesondere gegen die stammspezifischen Superantigene werden hohe Titer an spezifischen Antikörpern gefunden. [111–113] In Studien mit Neugeborenen und Kleinkindern wurde gezeigt, dass die Kolonisierung sehr schnell erfolgt. Die spezifische Antikörperantwort wird aber teilweise erst Monate später gebildet und der Unterschied in der Antikörperkonzentration zwischen Trägern und Nicht-Trägern ist sehr gering. [114] Die Kolonisierung ist somit nicht der entscheidende Faktor für die Ausbildung einer anti-*S. aureus* Antwort. Vielmehr sind kleine, für den Patienten völlig ungefährliche Infektionen von Bedeutung, mit denen Träger von *S. aureus* wesentlich häufiger konfrontiert sind als Nicht-Träger. [108] Dies verdeutlicht auch, dass die Antikörperantwort auf die Antigene beschränkt ist, die während einer Infektion exprimiert werden und das Verhalten von *S. aureus in vivo* widerspiegeln. [112]

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung und Charakterisierung von bisher extrazellulären Proteinen von *S. aureus* mit unbekannter Funktion. Anhand von Daten aus Untersuchungen zum Sekretom und *Surfacome* von *S. aureus*, wurden einzelne Proteine ausgewählt, die bisher noch weitestgehend uncharakterisiert sind. Zudem sollten die Kandidaten möglichst konserviert in verschiedenen *S. aureus*-Stämmen vorkommen. Nach der Überexpression und Aufreinigung der Proteine wurden diese in Kombination mit Deletionsmutanten der entsprechenden Gene in zahlreichen *in-vitro*- und *in-vivo*-Experimenten charakterisiert. Ziel war es dadurch neue mögliche Virulenzfaktoren zu identifizieren. Dies sollte vor allem die Immunevasions-Mechanismen von *S. aureus* genauer beleuchten.

Des Weiteren sollte der Zusammenhang zwischen Virulenzfaktoren und dem Antikörperprofil, das während einer *S. aureus* Infektion ausgebildet wird, genauer charakterisiert werden. Dies sollte letztendlich zu einem besseren Verständnis der Interaktion von Wirt und Pathogen führen.

2. Material

2.1 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Enzyme

Alle Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen geliefert: ABgene, Biopur, BioRad, Brand, B. Braun, CompTech, Dispomed, Greiner Bio One, Macherey-Nagel, Millipore, MP Biomedicals, Pall, PluriSelect, Peqlab, Promega Sarstedt, Sartorius Stedim, Spektrum Biolabs und Thermo Fisher Scientific.

Zusätzlich dazu wurden alle Kits, Enzyme und Chemikalien und Nährmedien von folgenden Firmen bezogen: AppliChem, BioRad, Biochrom, Boehringer, Difco, GE Healthcare, Invitrogen, IBA, MBI-Fermentas, Machery Nagel, Merck, Miltenyi, MP-Bio, New England Biolabs, Oxoid, Peqlab, Promega, Qiagen, Roche, Roth, Serva, Sigma, Stratagene und Thermofisher Scientific (*life technologies*).

2.2 Kits

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Kits

Kit	Anbieter
Qiaquick PCR-Purification	Qiagen, Hilden, Deutschland
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNAProtect Bacteria Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
Gene Clean [®]	MP Biomedicals, LLC, Ohio, USA
Protino [®] Protein Purification System	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
SuperScript III Reverse Transkriptase	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
RNaseOUT	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
pGEM [®] -T Vektor System	Promega, Mannheim, Deutschland
NucleoBond Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Nucleospin [®] Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
IMPACT	New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland
miRNeasy Mini-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Halo Link	Promega, Mannheim, Deutschland
CellTiter-Glo [®]	Promega, Mannheim, Deutschland

2.3 Antibiotika

Alle Antibiotika wurden entsprechend den Angaben gelöst, steril filtriert und nach Abkühlen des Mediums (ca. 50 °C) zugegeben. Die Lagerung der gelösten Substanzen erfolgte bei -20°C.

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stocklösung 1000x
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O
Erythromycin	10 mg/ml in 70 % Ethanol
Tetracyclin	10 mg/ml in 70 % Ethanol
Chloramphenicol	20 mg/ml in 100 % Ethanol
Spectinomycin	100 mg/ml in H ₂ O

2.4 Medikamente

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Medikamente

Medikament	Hersteller
FORENE® Isofluran	ABBOTT GmbH und Co. KG,
Rompun® 2%	Bayer Vital GmbH
Ketanest®	PARKE-DAVIS GmbH/Pfizer
Hadacidin	Biozol

2.5 Medien und Agarplatten

Alle in dieser Arbeit verwendeten Medien wurden bei 121 °C und Überdruck (1 bar) für 20 min autoklaviert. Hitzelabile Zusätze wurden steril filtriert und nach dem Abkühlen der Medien auf ca. 50 °C hinzugefügt. Für die Herstellung von Festmedien wurde zusätzlich 1,5 % Agar hinzugefügt.

Die Zellkulturmedien wurden von der Firma *lifetechnologies* bezogen. Das FCS wurde von Biochrom geliefert.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Medien

Medium/Agarplatten	Komponenten	Menge/l
Luria-Bertani-Medium (LB)	Trypton/Pepton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
B-Medium	Trypton/Pepton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	K ₂ HPO ₄	1 g
TSB-Medium	<i>Trypticase Soy Broth</i> (BD)	30 g
BHI-Medium	Brain-Heart-Infusion (Oxoid)	37 g
MH-Medium	Müller-Hinton-Medium (Roth)	23 g
TB-Medium (<i>Terrific Broth</i>)	Trypton/Pepton	12 g
	Hefeextrakt	24 g
	Glycerin	4 ml
	KH ₂ PO ₄	2,3 g
	K ₂ HPO ₄	12,5 g
ZYM-5052 * ¹ (selbstinduzierendes Medium nach [115])	Trypton/Pepton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	50x5052	20 ml
	50xM	20 ml
	1000x Spurenelemente-Mix	1 ml
Blutagarplatten	B-Medium mit 5% Schafblut	50 ml Blut
IPTG-X-Gal-Platten	LB	
	IPTG (1M)	50 µl
	X-Gal (2% in DMFO)	4 ml
MKP-Platten	Trypton/Pepton	10 g
	Fleischextrakt	1 g
	D-Mannitol	10 g
	NaCl	75 g

Medium/Agarplatten	Komponenten	Menge/l
Mannit-Platten (pH 7,5)	Trypton/Pepton	10 g
	Fleischextrakt	1 g
	D-Mannit	10 g
	NaCl	5 g
	Hefeextrakt	10 g
	Phenolrot	2,5 mg
DNase-Test-Agar	Trypton/Pepton	20 g
	DNA	2 g
	NaCl	5 g
	Methylgrün	0,05 g
Gelatine-Platten * ²	TSB	
	Gelantine (Typ A)	50 g (5 %)
Casein-Platten * ³	TSB	
	Milchpulver	15 g (1,5 %) bzw. 50 g (5 %)
Zellkulturmedium	RPMI	500 ml
	FCS	10 %

*¹ 50x5052: 25% Glycerin, 2.5% Glucose, 10% Laktose

50xM : 1,25 M Na₂HPO₄, 1,25 M KH₂PO₄, 2,5 M NH₄Cl, 0,25 M Na₂SO₄

1000x Spurenelemente-Mix: 50 mM FeCl₃, 20 mM CaCl₂, 10 mM MnCl₂, 10 mM ZnSO₄, 2 mM CoCl₂, 2 mM CuCl₂, 2 mM NiCl₂, 2 mM Na₂MoO₄, 2 mM Na₂-SeO₃, 2 mM H₃BO₃ in 60 mM HCl

*² Die Gelatine-Platten wurden nach der Inkubation der Stämme über Nacht bei 37°C mit 25 % Trichloressigsäure geflutet, um den Hof um die Kolonien sichtbar zu machen.

*³ Das verwendete Milchpulver, wurde als 2x Konzentrat in Wasser gelöst und bei 115°C für 10 min autoklaviert. Anschließend wurden 2xTSB und Milch bei 65°C gemischt.

2.6 Puffer und Lösungen

Für enzymatische Reaktionen oder bei der Verwendung von Kits wurden die mitgelieferten Puffer nach Herstellerangaben verwendet. Alle selbst hergestellten Puffer wurden mit destilliertem Wasser angesetzt und nach Bedarf autoklaviert bzw. steril filtriert. Puffer und Lösungen, die für mehrere Methoden benötigt wurden, sind im Folgenden aufgeführt.

Puffer und Lösungen die speziell für eine Methode selbst hergestellt wurden, sind bei der jeweiligen Methode aufgeführt.

PBS (10x)	2 g/l KCl 2,4 g/l K_2HPO_4 80 g/l NaCl 14,2 g/l Na_2HPO_4 (wasserfrei) pH 7,4
PBS-T	PBS + 0,05 % Tween20
TBS:	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl
TBS-T	TBS + 0,1% Tween20
TE-Puffer	10 mM Tris (pH 7,5) 1 mM EDTA (pH 8)

2.7 Bakterienstämme

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
DH5α	$F^- endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 \Delta(argF-lacZYA) U169 (\Phi60\Delta lacZ M15\lambda^-)$	MBI Fermentas
TG1	$F'[traD36 lacI^q \Delta(lacZ) M15 proA^+B^+] glnV (supE) thi-1 \Delta(mcrB-hsdSM)5 (r_k^- m_k^- McrB^-) thi \Delta(lac-proAB)$	Zymoresearch
SW102	SW101 $\Delta galK$	[116]
Rosetta (DE3)	$F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm (DE3) pRARE, Cm^R$	Novagen ©

Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
BL21 (DE3)	$F^-, ompT, hsdS_B (r_B^-, m_B^-), dcm, gal, \lambda(DE3), pLysS, Cm^R$	Promega
KRX	$F^-, traD36, \Delta ompP, proA^+B^+, lacI^q, \Delta(lacZ)M15] \Delta ompT, endA1, recA1, gyrA96 (Nal^r), thi-1, hsdR17 (r_k^-, m_k^+), e14^- (McrA^-), relA1, supE44, \Delta(lac-proAB), \Delta(rhaBAD)::T7$ RNA Polymerase.	Promega
Origami™ (DE3)	$\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac^+ lacI^q pro] (DE3) gor522::Tn10 trxB pLysS (Cm^R, Str^R, Tet^R)$	Novagen ©

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete *S. aureus*-Stämme

Stamm	Eigenschaft	Herkunft/Referenz
COL	MRSA	[117]
NewHG	<i>SaeS</i> ⁺	[118]
N315	MRSA/VSSA	[70]
8325	NCTC 8325; Wildtyp, <i>rsbU</i> , <i>tcaR</i> ⁻	[119]
Newman	Punktmutation in <i>saeS</i> , Fibronektin-Bindeprotein sekretiert	[120]
Newman <i>luxABCDE</i>	Newman Wildtyp mit Insertion des <i>lux</i> -Operons (<i>luxABCDE</i>), Kan ^R	Tina Schäfer, persönlich
USA300 LAC	CA-MRSA	[121]
USA300 LAC*	CA-MRSA, Erm ^S	Laborstammsammlung
HG003	NCTC8325 mit <i>rsbU</i> ⁺ , <i>tcaR</i> ⁺	[118]
Newman Δspa	<i>spa</i> ⁻ , Spec ^R	Laborstammsammlung
8325 Δspa	<i>spa</i> ⁻ , Spec ^R	Laborstammsammlung
USA300 LAC* Δspa	<i>spa</i> ⁻ , Spec ^R	Diese Arbeit
HG003 Δspa	<i>spa</i> ⁻ , Spec ^R	Laborstammsammlung
USA300 JE2	CA-MRSA, USA300-Isolat, ohne Plasmide, Erm ^S	<i>Nebraska Transposon Mutant Library</i> , [122]
USA300 JE2 NE674 ΔP1	Insertionsmutante NE674, Erm ^R	<i>Nebraska Transposon Mutant Library</i>
USA300 JE2 NE1649 ΔP3	Insertionsmutante NE1649, Erm ^R	<i>Nebraska Transposon Mutant Library</i>
USA300 JE2 NE1593 ΔP4	Insertionsmutante NE1593, Erm ^R	<i>Nebraska Transposon Mutant Library</i>
USA300 JE2 NE1805 ΔP5	Insertionsmutante NE1805, Erm ^R	<i>Nebraska Transposon Mutant Library</i>
USA300 JE2 NE1688 ΔP8	Insertionsmutante NE1688, Erm ^R	<i>Nebraska Transposon Mutant Library</i>

Stamm	Eigenschaft	Herkunft/Referenz
HG003 NE674 ΔP1	Insertionsmutante NE674, Erm ^R	Diese Arbeit
HG003 NE1640 ΔP2	Insertionsmutante NE1640, Erm ^R	Diese Arbeit
HG003 NE1649 ΔP3	Insertionsmutante NE1649, Erm ^R	Diese Arbeit
HG003 NE1593 ΔP4	Insertionsmutante NE1593, Erm ^R	Diese Arbeit
HG003 NE1805 ΔP5	Insertionsmutante NE1805, Erm ^R	Diese Arbeit
HG003 NE1688 ΔP8	Insertionsmutante NE1688, Erm ^R	Diese Arbeit
HG003 NE111 ΔP9	Insertionsmutante NE111, Erm ^R	Diese Arbeit
Newman NE674 ΔP1	Insertionsmutante NE674, Erm ^R	Diese Arbeit
Newman NE1640 ΔP2	Insertionsmutante NE1640, Erm ^R	Diese Arbeit
Newman NE1649 ΔP3	Insertionsmutante NE1649, Erm ^R	Diese Arbeit
Newman NE1593 ΔP4	Insertionsmutante NE1593, Erm ^R	Diese Arbeit
Newman NE1805 ΔP5	Insertionsmutante NE1805, Erm ^R	Diese Arbeit
Newman NE1688 ΔP8	Insertionsmutante NE1688, Erm ^R	Diese Arbeit
Newman NE111 ΔP9	Insertionsmutante NE111, Erm ^R	Diese Arbeit
USA300 LAC* NE674 ΔP1	Insertionsmutante NE674, Erm ^R	Diese Arbeit
USA300 LAC* NE1640 ΔP2	Insertionsmutante NE1640, Erm ^R	Diese Arbeit
USA300 LAC* NE1649 ΔP3	Insertionsmutante NE1649, Erm ^R	Diese Arbeit
USA300 LAC* NE1593 ΔP4	Insertionsmutante NE1593, Erm ^R	Diese Arbeit
USA300 LAC* NE1805 ΔP5	Insertionsmutante NE1805, Erm ^R	Diese Arbeit
USA300 LAC* NE1688 ΔP8	Insertionsmutante NE1688, Erm ^R	Diese Arbeit
USA300 LAC* NE111 ΔP9	Insertionsmutante NE111, Erm ^R	Diese Arbeit
USA300 JE2 NE529 ΔpurA	Insertionsmutante NE529, Erm ^R	<i>Nebraska Transposon Mutant Library</i>
Newman ΔpurA	purA ⁻ , Erm ^R	Diese Arbeit
HG003 ΔpurA	purA ⁻ , Erm ^R	Diese Arbeit
USA300 LAC* ΔpurA	purA ⁻ , Erm ^R	Diese Arbeit
Newman ΔpurA Δspa	spa ⁻ , purA ⁻ , Spec ^R , Erm ^R	Diese Arbeit
HG003 ΔpurA Δspa	spa ⁻ , purA ⁻ , Spec ^R , Erm ^R	Diese Arbeit

Stamm	Eigenschaft	Herkunft/Referenz
8325 Δ purA Δ spa	<i>spa</i> ⁻ , <i>purA</i> ⁻ , Spec ^R , Erm ^R	Diese Arbeit
Newman Δ sbi	<i>sbi</i> ⁻ , Tet ^R	AG Zipfel, HKI, Jena (A. Westphal)
Newman Δ spa Δ sbi	<i>spa</i> ⁻ , <i>sbi</i> ⁻ , Spec ^R , Tet ^R	Diese Arbeit
8325 Δ spa Δ sbi	<i>spa</i> ⁻ , <i>sbi</i> ⁻ , Spec ^R , Tet ^R	Diese Arbeit
Newman Δ spa Δ sbi Δ purA	<i>spa</i> ⁻ , <i>sbi</i> ⁻ , <i>purA</i> ⁻ , Spec ^R , Tet ^R , Erm ^R	Diese Arbeit
USA300 JE2 NE522 Δ purB	<i>purB</i> ⁻ , Erm ^R	<i>Nebraska Transposon Mutant Library</i>
USA300 JE2 NE950 Δ purC	<i>purC</i> ⁻ , Erm ^R	<i>Nebraska Transposon Mutant Library</i>
USA300 JE2 NE750 Δ purD	<i>purD</i> ⁻ , Erm ^R	<i>Nebraska Transposon Mutant Library</i>
USA300 JE2 NE581 Δ purF	<i>purF</i> ⁻ , Erm ^R	<i>Nebraska Transposon Mutant Library</i>
USA300 JE2 NE353 Δ purH	<i>purH</i> ⁻ , Erm ^R	<i>Nebraska Transposon Mutant Library</i>
USA300 JE2 NE744 Δ purK	<i>purK</i> ⁻ , Erm ^R	<i>Nebraska Transposon Mutant Library</i>
USA300 JE2 NE1464 Δ purL	<i>purL</i> ⁻ , Erm ^R	<i>Nebraska Transposon Mutant Library</i>
USA300 JE2 NE1101 Δ purM	<i>purM</i> ⁻ , Erm ^R	<i>Nebraska Transposon Mutant Library</i>
USA300 JE2 NE1785 Δ purN	<i>purN</i> ⁻ , Erm ^R	<i>Nebraska Transposon Mutant Library</i>
USA300 JE2 NE494 Δ purQ	<i>purQ</i> ⁻ , Erm ^R	<i>Nebraska Transposon Mutant Library</i>
USA300 JE2 NE1237 Δ purR	<i>purR</i> ⁻ , Erm ^R	<i>Nebraska Transposon Mutant Library</i>
USA300 JE2 NE1134 Δ purS	<i>purS</i> ⁻ , Erm ^R	<i>Nebraska Transposon Mutant Library</i>

2.8 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Sigma, MWG Eurofins und *biomers* bezogen.

Tabelle 7: Allgemein verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'→3')	Verwendung
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung
SP6	CATACGATTTAGGTGACACTATAG	Sequenzierung
Intein_lp	CGATGGCGTTGTCAGTGT	Kolonie-PCR, pTXB1
Halo_up	GCTGGCTGTCGACGCTCGAG	Kolonie-PCR, pFN18A
pIBA1_seq_up	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung pPR-IBA1
pIBA1_seq_lp	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG	Sequenzierung pPR-IBA1
5' bursa aur kompl	TCTCTAGACACATAGATGGCGTC	Universelle Oligonukleotide zum Überprüfen der Stämme aus der NARSA-Bibliothek
3' bursa aur 500bp	TTAGCCTGCCATGATGTATACATTGTGTGAG	
3' bursa aur kompl	GTCTCTAGACGCGTATAACTATATAGGAAC	
16SrRNA-up	AGTTGGGCACTCTAAGTTGA	RT-PCR
16SrRNA-dw	CCCTTTGTATTGTCCATTGT	RT-PCR

Tabelle 8: Oligonukleotide für die Klonierung in pTXB1 (Intein-CBD)

Name	Sequenz (5'→3')
pTXB1_SACOL1169_up	CCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTATAGAAGGGAATAAAGCAG
pTXB1_SACOL1169_lp	CGACTCGCCCTCGGGTAGGGCAACTAGTGCATCTCCCGTGATGCATCTATTTATAATTTTCATCAATTTTC
pTXB1_SACOL0820_up	CCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCAACAACATGGCACACAAGTAA
pTXB1_SACOL0820_lp	CGACTCGCCCTCGGGTAGGGCAACTAGTGCATCTCCCGTGATGCAGTGGATGTAATTATATTTTCCTGG
pTXB1_SACOL0723_up	CCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTTTTAACGCATCATGATGCAC
pTXB1_SACOL0723_lp	CGACTCGCCCTCGGGTAGGGCAACTAGTGCATCTCCCGTGATGCAATGGATGAATGCATAGCTAGAAAC

Name	Sequenz (5'→3')
pTXB1_COL2557_up	CCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGG CAGATTTCACTTATCAATCCG
pTXB1_COL2557_lp	CGACTCGCCCTCGGGTAGGGCAACTAGTGCATCTCCCGTGATGCAGTA AATATAGTTAAAGTTACGTGC
pTXB1_JH1_2034_up	CCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGT CACCCTAGTAACTAATCTAG
pTXB1_JH12034_lp	CGACTCGCCCTCGGGTAGGGCAACTAGTGCATCTCCCGTGATGCAATA TTTACTTTTTAGTGCTTCGTC
pTXB1_JH91996_up	GGTGGTCATATGAAATTTAAGTCATTGATTAC
pTXB1_JH91996_lp	GGTGGTTGCTCTCCGCATTTTTTTTTTTGATTTAGTGT
pTXB1_col2661_up	GGTGGTCATATGATTTATGCTGCAATAAATCA
pTXB1_col2661_lp	GGTGGTTGCTCTCCGCAATTTTTAGGTGATTGTGCTT
pTXB1_col2002_up	GGTGGTGCTAGCAACTTTAATAATAATGAAGC
pTXB1_col2002_lp	GGTGGTTGCTCTCCGCAGAATTTAAGTTCAATATCTA
pTXB1_col0507_up	GGTGGTCATATGACTCAAGCAAATGCGGCTAC
pTXB1_col0507_lp	GGTGGTTGCTCTCCGCAGTGAATATATCTATAATTAT

Tabelle 9: Oligonukleotide für die Klonierung in pPR-IBA1 (Strep-Tag)

Name	Sequenz (5'→3')
pIBA1_col2557_up	TGCCCTGGTCTCCAATGGCAGATTTCACTTATCAATC
pIBA1_col2557_lp	TGCCCTGGTCTCAGCGCTGTAAATATAGTTAAAGTTAC
pIBA1_col1169_up	TGCCCTGGTCTCCAATGACTATAGAAGGGAATAAAGC
pIBA1_col1169_lp	TGCCCTGGTCTCAGCGCTTCTATTTATAATTTTCATCAA
pIBA1_col0820_up	TGCCCTGGTCTCCAATGCAACAACATGGCACACAAGT
pIBA1_col0820_lp	TGCCCTGGTCTCAGCGCTGTGGATGTAATTATATTTTC
pIBA1_JH12034_up	TGCCCTGGTCTCCAATGTCACCCTAGTAACTAATCT
pIBA1_JH12034_lp	TGCCCTGGTCTCAGCGCTATATTTACTTTTTAGTGCTT
pIBA1_col0507_up	TGCCCTGGTCTCCAATGACTCAAGCAAATGCGGCTAC
pIBA1_col0507_lp	TGCCCTGGTCTCAGCGCTGTGAATATATCTATAATTAT

Name	Sequenz (5'→3')
pIBA1_col2002_up	TGCCCTGGTCTCCAATGAACTTTAATAATAATGAAGC
pIBA1_col2002_lp	TGCCCTGGTCTCAGCGCTGAATTTAAGTTCAATATCTA
pIBA1_col2661_up	TGCCCTGGTCTCCAATGATTTATGCTGCAATAAATCA
pIBA1_col2661_lp	TGCCCTGGTCTCAGCGCTATTTTTAGGTGATTGTGCTT
pIBA1_JH91996_up	TGCCCTGGTCTCCAATGAAATTTAAGTCATTGATTAC
pIBA1_JH91996_lp	TGCCCTGGTCTCAGCGCTTTTTTTTTTTGATTTAGTGT

Tabelle 10: Oligonukleotide für die Klonierung in pGEX4T-1 (GST-Tag)

Name	Sequenz (5'→3')
pGEX_col0820_up	GGTGGTGGATCCCAACAACATGGCACACAAGT
pGEX_col0820_lp	GGTGGTGCGGCCGCTTAGTGGATGTAATTATATTTTC
pGEX_col0723_up	GGTGGTGGATCCTTTTTAACGCATCATGATGC
pGEX_col0723_lp	GGTGGTGCGGCCGCTTAATGGATGAATGCATAGCTAG
pGEX_col2557_up	GGTGGTGGATCCGCAGATTTCACTTATCAATC
pGEX_col2557_lp	GGTGGTGCGGCCGCTTAGTAAATATAGTTAAAGTTAC
pGEX_col0507_up	GGTGGTGGATCCACTCAAGCAAATGCGGCTAC
pGEX_col0507_lp	GGTGGTGCGGCCGCTTAGTGAATATATCTATAATTAT
pGEX_col2002_up	GGTGGTGGATCCAACCTTTAATAATAATGAAGC
pGEX_col2002_lp	GGTGGTGCGGCCGCTTAGAATTTAAGTTCAATATCTA

Tabelle 11: Oligonukleotide für die Klonierung in pFN18A (Halo-Tag)

Name	Sequenz (5'→3')
pFN18_col0820_up	TTTTGCGATCGCCCAACAACATGGCACACAAGT
pFN18_col0820_lp	TTTTGTTTAAACTTAGTGGATGTAATTATATTTTC
pFN18_col0723_up	TTTTGCGATCGCCTTTTTAACGCATCATGATGCA
pFN18_col0723_lp	TTTTGTTTAAACTTAATGGATGAATGCATAGCTAG
pFN18_col2557_up	TTTTGCGATCGCCGCAGATTTCACTTATCAATC
pFN18_col2557_lp	TTTTGTTTAAACTTAGTAAATATAGTTAAAGTTAC
pFN18_col0507_up	TTTTGCGATCGCCACTCAAGCAAATGCGGCTAC
pFN18_col0507_lp	TTTTGTTTAAACTTAGTGAATATATCTATAATTAT
pFN18_col2002_up	TTTTGCGATCGCCAACCTTAATAATAATGAAGCG
pFN18_col2002_lp	TTTTGTTTAAACTTAGAATTTAAGTTCAATATCTA

Tabelle 12: Oligonukleotide für die korrekte Insertion des Transposons in den Stämmen aus der NARSA-Bibliothek

Name	Sequenz (5'→3')
col1169burstest_up	CAATGGCTGATGCTAAAGTTGC
usa300.0883burstest_up	CTTAAGAAAGATAGCTACACAGC
purD_lp	GCGGCTGTTCTGGACCTATAACTACCCAATCAACATTTTGCTGT
purF_up	CTACTCAGGATTAACGAAGAATGTGGCGTG
purH_lp	CGCTGATTGTTGTGGATTTTCTCC
purK_up	TTGTTCCAGCGAGAATAGATAAAAACAGCTGAGGCGAAAGAGC
purL_lp	GGCACCAACTTGTTGGTCGTATTGATCA
purM_lp	CCGGCTACATCATATTCACCTTCGTGATAC
purN_up	TGCGATTTTGCATCAGGTTTCAGG
purQ_up	GCGGTTCTTGTTTTTCCAGGTTTCGA
purR_lp	CAACCGCATTTGCCAATGAA
purS_lp	CACTAACCTCATCCACTGTCAT

Tabelle 13: Oligonukleotide für die RT-PCR

Name	Sequenz (5'→3')
RTsacol0507_lp	GCGT TACTT GAGCTAGCAGTA
RTsacol0507_up	ACTCAAGCAAATGCGGCTAC
RTsacol0723_lp	GATGATGCTGAACCAGCTTG
RTsacol0723_up	GCAATAACAGCAACATCTGG
RTsacol0820_lp	GATGCTTGTGTACAGGTTG
RTsacol0820_up	CAACAACATGGCACACAAGT
RTsacol1169_lp	GCATCAGCCATTGATACGAA
RTsacol1169_up	GAAGGGAATAAAGCAGATGC
RTsacol2002_lp	ACGTTCCCCGATACCTCTAT
RTsacol2002_up	CAGCAA ACTTAGTTCATGCG
RTsacol2557_lp	TTCAACA ACTGCGACATGTC
RTsacol2557_up	CACTTATCAATCCGTCGAAC
RTsacol2661_lp	TTGTTTGTGACGATTGACT
RTsacol2661_up	TTATGCTGCAATAAATCATTC
RTSaurJH1-2034_lp	GCTTCGTCAATTTGTTATA
RTSaurJH1-2034_up	AAAATGAGGCACAAGCTAGC
RTsaurJH9-1996_lp	GCTTTATCTTTAGGTTGCTTT
RTsaurJH9-1996_up	TCAAGTACATTACACCATGGA

Tabelle 14: Oligonukleotide zur Untersuchung von PurA

Name	Sequenz (5'→3')
RT-PCR:	
RTpurA_lp	GCGCACGATTAGATATACGT
RTpurA_up	GTCATCAATCGTAGTAGTTGGG
SA0016-fw	GGAGCTAGCTCATCAATCGTAGTAGTTGGG
SA0016-rev	CGCGGATCCCTACCACAATTCTTTAATAGG

Name	Sequenz (5'→3')
Klonierung in pTXB1:	
pTXB1_purA_lp	GGTGGTTGCTCTCCGCACCACAATTCTTTAATAGGT
pTXB1_purA_up	GGTGGTGCTAGCTCATCAATCGTAGTAGTTGGGACA
Klonierung der PurA-Fragmente in pET28a:	
purA FI BamHI_lp	GGTGGTGGATCCCTATACTAAATGTAATTTATATG
purA FI NheI_up	GGTGGTGCTAGCTCATCAATCGTAGTAGTTGGGACA
purA FII BamHI_lp	GGTGGTGGATCCCTACGCACGATTAGATATACGTA
purA FII NheI_up	GGTGGTGCTAGCTCTGGTATCTTTTACAAAGAC
purA FIII BamHI_up	GGTGGTGGATCCCTAACGAATACCGATACGTTGAA
purA FIII NheI_up	GGTGGTGCTAGCCAAGTGATTTTACCATATCACTTAGCAC
purA FIV BamHI_lp	GGTGGTGGATCCCTATGTGTCTGTTACAAATTCTT
purA FIV NheI_up	GGTGGTGCTAGCATGGCAGATTTACTTGAAAA
purA FV BamHI_lp	GGTGGTGGATCCCTAATAAGCTTTACATACACCAA
purA FV NheI_up	GGTGGTGCTAGCTCAAAAATCTTAGACGATGC
purA FVI BamHI_lp	GGTGGTGGATCCCTAAATACCACTTACACGACGAG
purA FVI NheI_up	GGTGGTGCTAGCACATCACGTGTTGGTGATGG
purA FVII BamHI_lp	GGTGGTGGATCCCTATAAAGTACGCACATTTGTTA
purA FVII NheI_up	GGTGGTGCTAGCACAGATTTATCTATTAECTCAA
purA FVIII BamHI_lp	GGTGGTGGATCCCTACCACAATTCTTTAATAGGT
purA FVIII NheI_up	GGTGGTGCTAGCGAAGAATTACCTGAAAATGC
Mutation einer Aminosäure in PurA:	
purA G12-->V12 lp	TCCTTCGTCTACCCATTGTGTCCC
purA G12-->V12 up	GGGACACAATGGGTAGACGAAGGA
purA K139 -->I139 lp	ACGTTGAACTATGTCTACATATGC
purA K139 -->I139 up	GCATATGTAGACATAGTTCAACGT
purA K16 -->Q16 lp	CGTTATTTTTCTTGTCCTTCGTC
purA K16 -->Q16 up	GACGAAGGACAAGGAAAAATAACG
purA R146 -->L146 lp	GTAAATCTGCCATAAGAATACCGAT

Name	Sequenz (5'→3')
purA R146 -->L146 up	ATCGGTATTCTTATGGCAGATTTAC
purA R302 -->L302 lp	ACGACGTGGAAGTCCTGTTGTTGT
purA R302 -->L302 up	ACAACAACAGGACTTCCACGTCGT

2.9 Plasmide

Tabelle 15: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaft/Verwendung	Herkunft/Referenz
pGEM [®] -T	Vektorsystem, TA-Klonierung, Blau/weiß-Selektion, Amp ^R	Promega
pTXB1	Plasmid zur Überexpression von Proteinen mit Intein/CBD-Tag (C-terminal), Amp ^R	New England Biolabs
pTYB1	Plasmid zur Überexpression von Proteinen mit Intein/CBD-Tag (N-terminal), Amp ^R	New England Biolabs
pPR-IBA1	Plasmid zur Überexpression von Proteinen mit Strep-Tag (C-terminal), Amp ^R	IBA Göttingen
pPR-IBA2	Plasmid zur Überexpression von Proteinen mit Strep-Tag (N-terminal), Amp ^R	IBA Göttingen
pGEX4T-1	Plasmid zur Überexpression von Proteinen mit GST-Tag (N-terminal), Amp ^R	GE Healthcare
pFN18A	Plasmid zur Überexpression von Proteinen mit Halo-Tag (N-terminal), Amp ^R	Promega
pTXB1_col1169	Überexpression von SACOL1169 via Intein/CBD-Tag, Amp ^R	Diese Arbeit
pFN18_col0820	Überexpression von SACOL0820 via Halo-Tag, Amp ^R	Diese Arbeit
pTXB1_col0723	Überexpression von SACOL0723 via Intein/CBD, Amp ^R	Diese Arbeit
pFN18_col2557	Überexpression von SACOL2557 via Halo-Tag, Amp ^R	Diese Arbeit

Plasmid	Eigenschaft/Verwendung	Herkunft/Referenz
pTXB1_JH1_2034	Überexpression von Saur-JH1_2034 via Intein/CBD, Amp ^R	Diese Arbeit
pTXB1_Col2661	Überexpression von SACOL2661 via Intein/CBD, Amp ^R	Diese Arbeit
pFN18_col0507	Überexpression von SACOL0507 via Halo-Tag, Amp ^R	Diese Arbeit
pTXB1_JH9_1996	Überexpression von Saur-JH9_1996 via Intein/CBD, Amp ^R	Diese Arbeit
pFN18_col2002	Überexpression von SACOL2002 via Halo-Tag, Amp ^R	Diese Arbeit
pET28a_purA	Überexpression von PurA via His-Tag (N-terminal), Kan ^R	Stefanie Donat, Dissertation
pTXB1_purA	Überexpression von PurA via Intein/CBD, Amp ^R	Diese Arbeit
pET28a_purA FI	Überexpression von Fragment I von PurA mit His-Tag (N-terminal), Kan ^R	Diese Arbeit
pET28a_purA FII	Überexpression von Fragment II von PurA mit His-Tag (N-terminal), Kan ^R	Diese Arbeit
pET28a_purA FIII	Überexpression von Fragment III von PurA mit His-Tag (N-terminal), Kan ^R	Diese Arbeit
pET28a_purA FIV	Überexpression von Fragment IV von PurA mit His-Tag (N-terminal), Kan ^R	Diese Arbeit
pET28a_purA FV	Überexpression von Fragment V von PurA mit His-Tag (N-terminal), Kan ^R	Diese Arbeit
pET28a_purA FVI	Überexpression von Fragment VI von PurA mit His-Tag (N-terminal), Kan ^R	Diese Arbeit
pET28a_purA FVII	Überexpression von Fragment VII von PurA mit His-Tag (N-terminal), Kan ^R	Diese Arbeit
pET28a_purA FI-II	Überexpression von Fragment I-II von PurA mit His-Tag (N-terminal), Kan ^R	Diese Arbeit
pET28a_purA FI-III	Überexpression von Fragment I-III von PurA mit His-Tag (N-terminal), Kan ^R	Diese Arbeit
pET28a_purA FI-IV	Überexpression von Fragment I-IV von PurA mit His-Tag (N-terminal), Kan ^R	Diese Arbeit

Plasmid	Eigenschaft/Verwendung	Herkunft/Referenz
pET28a_purA FI-V	Überexpression von Fragment I-V von PurA mit His-Tag (N-terminal), Kan ^R	Diese Arbeit
pET28a_purA FI-VI	Überexpression von Fragment I-VI von PurA mit His-Tag (N-terminal), Kan ^R	Diese Arbeit
pET28a_purA FI-VII	Überexpression von Fragment I-VII von PurA mit His-Tag (N-terminal), Kan ^R	Diese Arbeit
pET28a_purA FII-VIII	Überexpression von Fragment II-VIII von PurA mit His-Tag (N-terminal), Kan ^R	Diese Arbeit
pET28a_purA V12	Überexpression von PurA mit mutierter Aminosäure, Kan ^R	Diese Arbeit
pET28a_purA Q16	Überexpression von PurA mit mutierter Aminosäure, Kan ^R	Diese Arbeit
pET28a_purA I139	Überexpression von PurA mit mutierter Aminosäure, Kan ^R	Diese Arbeit
pET28a_purA L146	Überexpression von PurA mit mutierter Aminosäure, Kan ^R	Diese Arbeit
pET28a_purA L302	Überexpression von PurA mit mutierter Aminosäure, Kan ^R	Diese Arbeit

2.10 Mauslinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien wurden bei Charles River und Janvier erworben.

Tabelle 16: In dieser Arbeit verwendete Mauslinien

Mauslinie	Inzucht/Auszucht	MHC-Haplotyp
BALB/cAnNCrI	Inzucht	H2 ^d
C57BL/6NCrI	Inzucht	H2 ^b
CrI:NMRI(Han)	Auszucht	Nicht bekannt

2.11 Geräte

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte wurden am Institut für Molekulare Infektionsbiologie nach Herstellerangaben verwendet. Geräte mit besonderer Relevanz oder Standorten außerhalb des oben genannten Instituts sind unten aufgeführt.

IVIS® Lumina II (Caliper Life Sciences)

MACSQuant® Analyzer (Miltenyi)

FACS Calibur (BD)

Viktor™ X Light Luminometer (Perkin Elmer)

TECAN

Dispomix (Bio-Budget Technologies)

ÄKTA und ÄKTAexpress (GE Healthcare) RVZ Würzburg (Strukturbiologie)

ARRAYMATE (Alere) Greifswald, Lehrstuhl für Mikrobiologie

2.12 Längenstandards

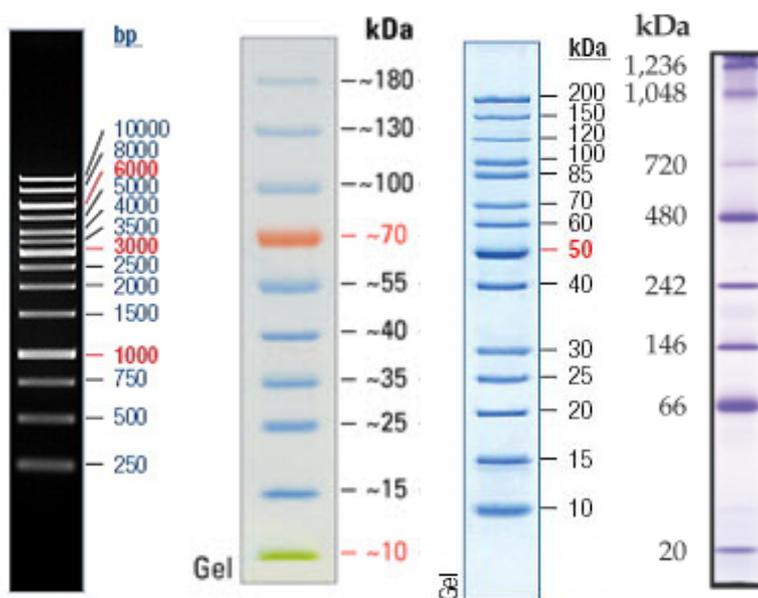


Abbildung 4: Längenstandard für die Gelelektrophorese: *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*, (ThermoFisher Scientific); *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, (ThermoFisher Scientific), *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* (ThermoFisher Scientific), *NativeMark™ Unstained Protein Standard* (ThermoFisher Scientific) (v.l.n.r)

2.13 Software

Tabelle 17: In dieser Arbeit verwendete Software

Software	Hersteller
Adobe Illustrator CS	Adobe System Inc., San Jose, CA, USA
CLC Sequence Viewer	CLC bio, Aarhus, Dänemark
Cyflogic	CyFlo Ltd, Turku, Finnland
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA USA
Iconoclust	Alere, Jena, Deutschland
LivingImage® 3.1	Perkin Elmer, Waltham , Massachusetts, USA
LSM Image Browser	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
MACSQuantify	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
MS Office 2007	BioRad, München, Deutschland
MyiQ	BioRad, München, Deutschland

3. Methoden

3.1 Kultur von Bakterien

3.1.1 Anzucht und Stammhaltung

Soweit nicht anders angegeben wurden *E. coli*-Stämme im Allgemeinen in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten angezogen. Für die Überexpression von rekombinanten Proteinen wurde darüber hinaus TB-Medium oder ZYM-5052 verwendet.

Die Anzucht von *S. aureus* erfolgte je nach Anwendung in TSB-, B-, BHI- und MH-Medium sowie den entsprechenden Agarplatten. Für die quantitative Bestimmung der Bakterienlast aus *in-vivo*-Proben wurden MKP-Agarplatten und LB-Agarplatten verwendet.

Je nach Bedarf wurde den Medien ein entsprechendes Antibiotikum aus einer zuvor vorbereiteten 1000x konzentrierten Stocklösung zugesetzt.

Die Inkubation der Bakterienkulturen erfolgte je nach Anwendung bei 30 °C, 37 °C bzw. 18 °C. Eine genaue Auflistung der verwendeten Medien und Inkubationsbedingungen für die Überexpression von Proteinen befindet sich in Tabelle 24.

Zur Herstellung von Flüssigkulturen wurde das entsprechende Medium mit Einzelkolonien oder einer definierten Menge aus einer Übernacht-Kultur (ÜNK) beimpft und bei 37 °C schüttelnd inkubiert.

Für die kurzfristige Aufbewahrung (7-14 Tage) wurden die Bakterien bei 4 °C auf Festmedien gelagert. Für die Dauerkonservierung wurden Flüssigkulturen mit sterilem Glycerin (Endkonzentration: 25 %) versetzt und bei -80 °C gelagert.

3.1.2 Bestimmung des Bakterienwachstums in Flüssigkeiten

Das Wachstum einer Bakterienkultur in Flüssigmedien wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda=600$ nm gemessen. Um das Messoptimum der Absorption des verwendeten Spektralphotometers zwischen 0,05 und 1 zu erreichen, wurden entsprechende Verdünnungen verwendet.

3.1.3 Quantitative Bestimmung der koloniebildenden Einheiten

Zur quantitativen Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (CFU) in einer Bakterienkultur, wurden die Bakteriensuspensionen in verschiedenen Stufen mit sterilem PBS verdünnt und auf geeignete Agarplatten ausplattiert. Nach der Inkubation bei 37 °C über Nacht, wurden die Einzelkolonien ausgezählt und daraus die CFU/ml bzw. CFU/Organ berechnet.

Eine besondere Form der Bestimmung der Anzahl der koloniebildenden Einheiten ist der sogenannte *Spot-Assay*. Dafür wurden 3 µl einer geeigneten Verdünnung der Bakterienkultur in Tropfenform auf Agarplatten aufgetropft, bei 37 °C inkubiert und ausgezählt.

3.1.4 Transformation von *E. coli*-Stämmen

Die Kompetenz von *E. coli*-Stämmen für die Aufnahme von episomaler bzw. Plasmid-DNA wurde über chemische oder elektrische Verfahren erreicht. Im nachfolgenden Abschnitt sind die unterschiedlichen Verfahren detailliert beschrieben

3.1.4.1 Herstellung und Transformation Ca²⁺-kompetenter Zellen

25 ml LB-Medium wurden im Verhältnis 1:50 aus einer *E. coli* ÜNK beimpft und anschließend bei 37 °C bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase schüttelnd inkubiert (OD₆₀₀ = 0,5- 0,6). Die Kultur wurde anschließend 10 min auf Eis gekühlt, die Bakterien pelletiert (5 min, 3.200 x g, 4 °C), das Pellet in 25 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und die Suspension für 30-60 min auf Eis gelagert. Die Zellen wurden erneut pelletiert (5 min, 3.200 x g, 4 °C), in 2,5 ml eiskalter CaCl₂-Lösung mit 15 % Glycerin resuspendiert und in Aliquots zu 100 µl bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit ca. 1 µg Plasmid-DNA oder mit 20 µl Ligationsansatz (siehe 3.3.8) versetzt und für 30-60 min auf Eis gekühlt. Nach einem Hitzeschock (90 s, 42 °C) wurden die Zellen mit 1 ml LB versetzt und 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden geeignete Volumina auf Selektionsmedium ausplattiert und die Agarplatten bei geeigneter Temperatur über Nacht inkubiert.

Verwendete Lösungen:

CaCl₂-Lösung:	50 mM CaCl ₂ 10 % (v/v) Glycerin
---------------------------------	--

3.1.4.2 Herstellung und Transformation von TSS-kompetenten Zellen

Alternativ zur Herstellung und Transformation Ca²⁺-kompetenter Zellen wurde in einigen Fällen eine weitere chemische Methode nach [123] angewendet. Im Gegensatz zur Ca²⁺-Methode wurden in dem Fall Poly-Ethylen-Glykole (PEGs) und Magnesium-Ionen verwendet, um die Plasmid-DNA in die Bakterien einzuschleusen. Hierfür wurden 25 ml LB-Medium mit einer *E. coli* ÜNK im Verhältnis 1:50 beimpft und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase geschüttelt (OD₆₀₀ ≈ 0,6). Anschließend wurden die Zellen pelletiert (5 min, 3.200 x g, 4 °C), in 2,5 ml TSS-Medium aufgenommen und in Aliquots zu 100 µl bei -80 °C gelagert. Für die Transformation wurden ebenfalls 1 µg Plasmid-DNA oder 20 µl Ligationsansatz zu den auf Eis aufgetauten Bakterien gegeben, die Bakterien bei 4 °C für 10-20 min inkubiert und anschließend mit 1 ml LB-Medium versetzt. Nach 1-stündiger Inkubation bei 37 °C, wurden geeignete Volumina auf Selektionsmedium ausplattiert und die Bakterien bei 37 °C inkubiert.

Verwendete Lösungen:

TSS-Lösung (100 ml)	85% LB-Medium 10% (w/v) PEG 3350 oder PEG 8000 5 ml DMSO 1 g MgCl ₂ x6H ₂ O (=50 mM) (pH 6,5)
-------------------------------	---

3.1.4.3 Herstellung und Transformation elektrokompetenter Zellen

25 ml LB-Medium wurden im Verhältnis 1:50 aus einer *E. coli* ÜNK beimpft und anschließend bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,5 - 0,6 geschüttelt. Die Kultur wurde 10 min auf Eis gekühlt, die Bakterien pelletiert (10 min, 3.200 x g, 4 °C) und abwechselnd zweimal mit 25 ml eiskaltem H₂Od. und zweimal mit 25 ml H₂Od. + 10% Glycerin gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml H₂Od. aufgenommen, direkt verwendet oder in Aliquots von 100 µl bei -80 °C gelagert.

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen für die Transformation mit PCR-Produkten nach [116] wurde der *E. coli*-Stamm SW102 unter geeignetem Selektionsdruck bei 30 °C angezogen ($OD_{600} = 0,6$) und anschließend zur Induktion der λ -Red-Rekombinase vom Chromosom für 15 min bei 42 °C geschüttelt.

Für die eigentliche Transformation wurden die elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit linearisierter Plasmid-DNA und PCR-Produkt vermischt. Die Transformation erfolgte durch Elektroporation in 2-mm-Elektroporations-Küvetten bei 2,5 kV, 25 μ F und 600 Ω (*Gene Pulser Xcell* Elektroporationssystem, BIORAD). Die Zellen wurden sofort in 1 ml LB-Medium überführt und 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden geeignete Volumina auf feste Selektionsmedien ausplattiert und die Agarplatten über Nacht im Brutschrank inkubiert.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Humane Lungeneithelkarzinom-Zellen A549 (ATCC[®] CCL-185[™]) wurden in Zellkulturmedium (RPMI mit Glutamat, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin-Streptomycin) bei 37 °C und 5 % CO₂ in Zellkulturflaschen kultiviert. Zur Passagierung wurden konfluente Kulturen (ca. 80 %) für 10 min mit 2 ml Trypsin-EDTA bei 37 °C inkubiert, durch Klopfen vom Substrat abgelöst und in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in einer 1:5 oder 1:10 Verdünnung neu ausgesät.

Für die Dauerkonservierung wurden 5×10^6 Zellen im oben beschriebenen Zellkulturmedium aufgenommen und 5 % DMSO zugegeben. Anschließend wurden die Aliquots sofort mit einer Abkühlrate von 1 °C/min auf -80 °C gekühlt und danach in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.2.2 Ko-Kultur von A549-Zellen mit *S. aureus*-Stämmen

Für die Ko-Kultivierung von tierischen Zellen und Bakterien wurden zunächst 1×10^5 A549-Zellen/Kavität in eine Mikrotiterplatte mit 24-Kavitäten ausgesät. Dabei wurde auf den Einsatz von Antibiotika vollständig verzichtet. Nachdem die Zellen an die Mikrotiterplatte adhärirt waren (ca. 6 h nach dem Aussähen), wurde die Zellen mit antibiotikafreiem Medium gewaschen und das Medium vollständig ausgetauscht, um Reste des Antibiotikums vollständig zu entfernen. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 2×10^6 Bakterien (MOI 20)

in einem Volumen von 200 µl inokuliert. Die Ko-Kultivierung dauerte je nach Anwendung 1-4 Stunden. Die Ko-Kultur wurde dazu bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.3 Arbeiten mit DNA

3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Extraktion von niedermolekularer DNA (Plasmide) aus *E. coli* wurde das Prinzip der alkalischen Lyse angewendet. Hierfür wurden die bakteriellen Zellen unter Zugabe von EDTA und SDS unter stark basischen Bedingungen vollständig lysiert. Proteine, sowie chromosomale DNA und Plasmid-DNA wurden durch diesen Schritt denaturiert. Nach der Neutralisation durch Kalium-Acetat wurde lediglich die Plasmid-DNA wieder renaturiert und anschließend von chromosomaler DNA und höher molekularen Bestandteilen, die als Salzkomplexe vorliegen, abgetrennt.

Mini-Präparation

Für die Isolierung von Plasmiden im kleinen Maßstab wurden die Bakterien aus 2 ml ÜNK zunächst pelletiert (1 min, 16.000 x g), das Pellet in 150 µl P1-Puffer (siehe 2.63.3.1, Material) resuspendiert, anschließend 150 µl P2 zugefügt und der Ansatz bei Raumtemperatur (RT) für 5 min inkubiert. Danach wurden 150 µl P3 zur Neutralisation zugegeben und der Ansatz mehrfach invertiert. Die Probe wurde für 15 min auf Eis inkubiert und danach Proteine und chromosomale DNA durch Zentrifugation für 10 min bei 16.000 x g pelletiert. Der Überstand wurde daraufhin in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,7-0,8 Vol. Isopropanol gefällt (15 min, 16.000 x g) und das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen. Anschließend wurde das Pellet komplett getrocknet und im letzten Schritt in 30 µl H₂O aufgenommen.

Verwendete Puffer:

P1	50 mM TrisHCl pH=8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNaseA
P2	200 mM NaOH 1 % SDS (w/v)
P3	3 M Kalium-Acetat pH 5,5

Midi-Präparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus bis zu 100 ml ÜNK erfolgte mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Midi Kits bzw. mit dem NucleoBond Xtra Midi Kit (Machery Nagel) nach Herstellerangaben.

3.3.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. aureus*

Die Isolierung von chromosomaler DNA aus *S. aureus* beruht auf der Lyse der Bakterien mittels Zellwand-degradierenden Enzymen und Detergenzien. Durch Fällung mit Chloroform und Isoamylalkohol werden Proteine und Polysaccharide von der chromosomalen DNA abgetrennt. Anschließend wird die extrahierte DNA gefällt und in H₂O_d. aufgenommen.

Für diese Methode wurde zunächst eine ÜNK von *S. aureus* in LB-Medium mit 1 % Glycin bei 37 °C angesetzt. Am nächsten Morgen wurden 2 ml dieser Kultur pelletiert (2 min, 16.000 x g, RT). Das Pellet wurde anschließend in 1 ml TE-Puffer gewaschen (2 min, 16.000 x g, RT) und danach in 100 µl 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) + 25 % Saccharose aufgenommen, mit 15 µl 0,5 M EDTA und 20 µl Lysostaphin (2 mg/ml) versetzt und für etwa 45 min bei 37 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 375 µl TE-Puffer, 225 µl 10 % SDS und 20 µl Proteinase K (10 mg/ml) dazu gegeben und der Ansatz nochmal bei 55 °C für 1 h inkubiert, bis die Flüssigkeit im Reaktionsgefäß vollständig klar war. Danach wurde die Probe mit 150 µl Natriumperchlorat (5M) durch Schwenken gemischt und anschließend 450 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben. Um die DNA von Proteinen zu trennen, wurde die Probe für 1,5 h bei RT geschüttelt, danach die wässrige Phase in eines Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit dem doppelten Volumen 100 % EtOH für 30 min bei 4 °C gefällt.

Anschließend wurde die DNA pelletiert (10 min, 16.000 x g, RT), mit 70 % EtOH gewaschen und nach dem Trocknen in 50 µl H₂O_d. aufgenommen.

Für den Einsatz der so hergestellten chromosomalen DNA in einer PCR wurde diese zuvor 1:50 oder 1:100 in H₂O_d. verdünnt.

3.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde spektralphotometrisch mit Hilfe eines NanoDrop-Photometers (peqlab) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei dieser Methode entspricht eine Absorption von 1 einer Konzentration von 50 µg dsDNA/ml bzw. 40 µg RNA/ml. [124] Die Qualität und die Reinheit der DNA wurde über die Quotienten der Absorption A₂₆₀/A₂₈₀ und A₂₆₀/A_{230nm} ermittelt. Reine Nukleinsäurelösungen weisen einen Quotienten (A₂₆₀/A₂₈₀) von 1,8 bis 2,0 auf. Der Quotient aus A₂₆₀/A_{230nm} gibt Aufschluss über Lösungsmittel- und Proteinverunreinigungen. Dieser lag bei allen Messungen zwischen 2,0 und 2,2.

Die Reinheit von RNA-Proben wurde zusätzlich mittels Bioanalyser bzw. im TBE-Gel überprüft.

3.3.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion [125] ist eine Methode zur *in-vitro*-Amplifikation von DNA. Der gewünschte DNA-Abschnitt wird durch Zugabe einer DNA-Polymerase und zweier synthetisch hergestellter Oligonukleotide (*Primer*) synthetisiert. Dabei kann eine bestimmte DNA-Sequenz durch die Wahl der Oligonukleotide gezielt vervielfältigt werden. Innerhalb kürzester Zeit kann mit Hilfe dieser Methode eine große Anzahl an identischen DNA-Kopien hergestellt werden. Die Anreicherung der DNA erfolgt in einem zyklischen Temperaturprozess, wobei die DNA-Menge exponentiell zunimmt.

In dieser Arbeit wurde die PCR angewendet um:

- Verschiedene DNA-Abschnitte aus chromosomaler DNA von *S. aureus* für Klonierungen und Sequenzierungen zu amplifizieren.
- DNA-Abschnitte in *E. coli* und *S. aureus* nachzuweisen.
- Die korrekte Insertion und Orientierung von DNA-Fragmenten in Vektoren bzw. im Genom nachzuweisen
- Einzelne Basenpaare in Plasmiden auszutauschen.
- durch Reverse Transkription erhaltene cDNA qualitativ und semi-quantitativ zu analysieren

Soweit nicht anders angegeben wurden in dieser Arbeit die DNA-Polymerasen GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) und Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) verwendet. Während die GoTaq® Flexi DNA Polymerase zum Nachweis von DNA in Standard-PCRS verwendet wurde, fand die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase aufgrund ihrer *proof-reading*-Aktivität bei Klonierungen Anwendung. Die Polymerasen wurden zusammen mit den mitgelieferten Puffern nach Herstellerangaben in einem Reaktionsvolumen von 20-100 µl eingesetzt. Zusätzlich dazu wurden 25 µM dNTPs und 0,5 µM jedes Oligonukleotids verwendet. Als Amplifikationsmatrize (*Template*) wurde entweder chromosomale DNA, Plasmid-DNA, Bakterienlysate oder cDNA eingesetzt.

Die verwendeten Temperatur-Protokolle der PCR-Reaktionen variierten je nach verwendeter Polymerase, Schmelztemperaturen der eingesetzten Oligonukleotide sowie der zu erwartenden Produktlänge. Generell setzten sie sich zusammen aus A: einer initialen Denaturierung des Ausgangsmaterials (2-5 min, 94-98 °C), B: 30 Zyklen bestehend aus Denaturierung (30 s, 94-98 °C), *Annealing* (Anlagerung) der Oligonukleotide (30 s, 50-65 °C) und Elongation (15-180 s, 68-72 °C) sowie C: einer abschließenden Elongation (5 min, 68-72 °C).

Die Auswertung der PCR-Reaktion erfolgte durch Elektrophorese eines 5-10 µl Aliquots in einem 1-2 %igen Agarosegel. Bei Bedarf wurden PCR-Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) bzw. dem Nucleospin® Gel and PCR Clean-up (Machery Nagel) gemäß Herstellerangaben für weitere Anwendungen aufgereinigt, um sie von störenden Salzen oder anderen Kontaminationen (Oligonukleotide, Proteine, etc.) zu befreien.

3.3.5 Enzymatische Hydrolyse von DNA (Restriktionsverdau)

Die enzymatische Hydrolyse von Plasmid-DNA bzw. von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe von sogenannten Restriktionsendonukleasen der Klasse II. Dazu wurden 2-10 µg DNA mit 1 U/µg Enzym in einem vom Hersteller mitgelieferten Puffer versetzt und für 1 h bei geeigneter Temperatur inkubiert.

Die geschnittene DNA wurde anschließend entweder mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) bzw. dem Nucleospin® Gel and PCR Clean-up (Machery Nagel) aufgereinigt und in einer Ligationsreaktion eingesetzt oder der Größe nach im Agarosegel separiert und das gewünschte DNA-Fragment aus dem Gel extrahiert.

3.3.6 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel

Durch die Methode der horizontalen Gelelektrophorese ist eine Separation der DNA anhand ihrer Molekülgröße möglich. Dabei wandern die DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung von der Kathode zur Anode und werden auf ihrem Weg durch die molekularen Siebeigenschaften der Agarose behindert.

Die DNA wurde dazu in einem 1-2 %igen Agarosegel mit 1x TAE-Puffer bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend für ca. 15 min in Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) gefärbt, mit H₂O d. gewaschen und unter UV-Licht in einem Geldokumentationssystem ausgewertet.

Verwendete Puffer:

DNA-Ladepuffer (6x):	50 % (v/v) TE 49,2 % (v/v) Glycerin 0,04 % (w/v) Xylencyanol 0,04 % (w/v) Bromphenolblau
TAE (50x)	2 M Tris 5,7% Eisessig 50 mM EDTA (pH 8)

3.3.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA Fragmente im Agarosegel, wurden die gewünschten DNA-Fragmente unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Gene Clean[®] Kit (MP Biomedicals) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

3.3.8 Klonierung

3.3.8.1 Klonierung von PCR-Produkten mittels pGEM[®]T Vektorsystem

Für die Klonierung bestimmte und durch PCR-generierte DNA-Fragmente wurden mittels pGEM[®]T Vektorsystem (Promega) über T/A-Überhänge zwischenkloniert. Diese Methode benötigt zwingend einen terminalen Adeninrest am 3'-Ende des PCR-Produkts, da es über einzelne Thymidin-Reste am 5'-Ende in den Zielvektor ligiert wird. Dieser wurde bereits linearisiert vom Hersteller bezogen.

Da die für die PCR verwendete Phusion-Polymerase keinen terminalen Adeninrest an das 3'-Ende des PCR-Produkts anhängt und gleichzeitig eine sehr effiziente 3'→5' Exonuklease-Aktivität besitzt, wurde der terminale Adenin-Rest in einem zweiten Schritt an das PCR-Produkt angehängt. Dazu wurde der PCR-Ansatz zunächst mittels QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) bzw. dem Nucleospin[®] Gel and PCR Clean-up Kit (Machery Nagel) aufgereinigt. In einer anschließenden PCR wurde das PCR-Fragment mit Hilfe der GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase für 20 min bei 68 °C adenyliert. Nach der Adenylierungsreaktion wurde das PCR-Fragment nach Herstellerangaben für 1 h bei RT in den Zielvektor ligiert. Über die Antibiotikaresistenz und die Färbung der Kolonien (Blau-Weiß-Selektion) wurde die Selektion der Klone durchgeführt.

3.3.8.2 Klonierung von Restriktionsfragmenten

Dafür wurden der Zielvektor und das gewünschte DNA-Fragment zunächst mit den gleichen Restriktionsenzymen hydrolysiert, so dass kompatible Enden an Insert und Vektor entstehen. 150 ng Insert und 50 ng linearisierter Vektor wurden anschließend in einem Volumen von 10 µl gemischt, mit 10 µl 2x *Quick Ligation* Puffer und 1 µl *Quick T4 DNA Ligase* aus dem *Quick Ligation Kit* (NEB) versetzt und anschließend für 5 min bei RT inkubiert. Mit dem Ligationsansatz wurden im Anschluss die Zielzellen transformiert.

3.3.8.3 Erzeugung von Einzelbasenmutationen

Das Einfügen von Basenmutationen wurde an methylierter Plasmid-DNA vorgenommen, die zuvor aus einem entsprechenden *E. coli*-Stamm isoliert wurde (siehe 3.3.1). Für die Mutation von einzelnen Basenpaaren in einem Plasmid wurden 2 komplementäre Oligonukleotide synthetisiert, die bereits die einzufügende Basenmutation enthielten, ansonsten aber vollständig komplementär zum Ausgangsplasmid waren. Die Primer wurden zusammen mit dem Plasmid in eine PCR-Reaktion eingesetzt und so ein linearisiertes Plasmid mit den entsprechenden Mutationen mittels Phusion Polymerase amplifiziert. Anschließend wurde der PCR-Ansatz mit dem Nucleospin® Gel and PCR Clean-up Kit (Machery Nagel) aufgereinigt und das methylierte Ausgangsplasmid mit DpnI verdaut. Der verdaute und aufgereinigte Ansatz wurde dann für die Transformation eingesetzt und die erhaltenen Klone mittels Sequenzierung überprüft.

3.3.8.4 Klonierung via Rekombination in *E. coli* SW102

Für diese Art der Klonierung wurde das Insert in einer PCR mit 50 bp-langen, zum Zielplasmid komplementären Überhängen amplifiziert. Das Zielplasmid wurde daraufhin mit Hilfe eines geeigneten Restriktionsenzym linearisiert, um die Anzahl falsch-positiver Klone zu minimieren. Das linearisierte Plasmid wurde zusammen mit dem aufgereinigten PCR-Produkt zu den elektrokompentenen Zellen gegeben und die Zellen mittels eines elektrischen Impulses transformiert. Über die zuvor induzierte λ -Rekombinase (siehe Abschnitt 3.1.4.3) erfolgte die Rekombination von linearisiertem Plasmid und Insert, wodurch ein vollständiges Konstrukt gebildet wurde.

3.3.9 DNA-Sequenzierung

PCR-Produkte und Plasmide wurden über die Firma SeqLab Sequence Laboratories Göttingen GmbH sequenziert. Als Ausgangsmaterial wurden 1,2 μ g Plasmid-DNA bzw. 90 ng PCR-Produkt verwendet. Standardprimer wurden von der Firma SeqLab nach Versand der Proben in entsprechender Menge zugegeben. Für die Verwendung von eigens synthetisierten Oligonukleotiden wurden 30 pmol dieser Primer direkt zum Ausgangsmaterial gegeben und versendet.

3.4 Arbeiten mit RNA

Beim Arbeiten mit RNA wurden generell Handschuhe getragen und DEPC-behandeltes H₂O_d. verwendet, um die Degradation der RNA durch Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden.

3.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Um RNA aus *S. aureus* zu isolieren, wurden 25 ml frischen B-Medium bzw. TSB-Medium mit Bakterien aus einer ÜNK auf eine OD₆₀₀ von 0,05 eingestellt. Die Kulturen wurden bei 37 °C schüttelnd bis zur gewünschten Wachstumsphase inkubiert. Dann wurden 2 ml aus dieser Kultur entnommen und mit 2 ml RNA Protect (Quiagen) versetzt, die Suspension für 5 s gemischt und dann 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (10 min, 3.200 x g, RT) und das Pellet bei -20 °C gelagert.

Für die Lyse der Zellen und die Extraktion der RNA wurde das Pellet in 1 ml RLT-Puffer + 10 µl/ml β-Mercaptoethanol (QIAGEN RNeasy Mini Kit) aufgenommen und in *Lysing Matrix E*-Röhrchen (MP Biomedicals) überführt. Die Lyse der Bakterien erfolgte in der Kugelmühle FastPrep (MP Biomedicals) zweimal für 30 s auf Stufe 6 (6 m/s) und einmal für 30 s auf Stufe 6,5 (6,5 m/s). Anschließend wurden die Bakterien für 2 min auf Eis gekühlt und dann für 10 min bei 16.000 x g (RT) zentrifugiert. Dadurch wurden gelöste Nukleinsäuren von den Kügelchen aus den *Lysing Matrix* Röhrchen und den Zelltrümmern getrennt. Die im Überstand befindlichen Nukleinsäuren wurden mit 1 Vol. EtOH (100 %) versetzt, anschließend nach Herstellerangaben über das QIAGEN *RNeasy Mini* Kit aufgereinigt und abschließend in 40 µl H₂O_d. eluiert.

3.4.2 DNase-Verdau und cDNA-Synthese

Der Abbau von DNA-Kontaminationen in der isolierten RNA-Probe ist für die nachfolgenden Anwendungen essentiell. Aus diesem Grund wurde die eluierte RNA (40 µl) mit 5 µl 10x DNase-Puffer und 5 µl DNase (Roche) versetzt und für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Um den Verdau der gesamten DNA zu überprüfen, wurde 1 µl des Restriktionsansatzes als Ausgangsmaterial in eine PCR eingesetzt. Es wurden Oligonukleotide verwendet, die innerhalb der Gene für die 16S rRNA binden. Konnte die vollständige Hydrolyse der DNA

nachgewiesen werden, wurde der DNase-Verdau durch Zugabe von 175 µl RLT-Puffer und 125 µl EtOH beendet und der verbliebene Ansatz wiederum über das QIAGEN *RNeasy Mini* Kit aufgereinigt.

Die cDNA-Synthese erfolgte anschließend mittels SuperScript™ III First-Strand Synthesis (*lifestechnologies*) und randomisierten Hexanukleotiden (Amersham) nach Herstellerangaben. Die cDNA wurde anschließend 1:20 bzw. 1:50 in H₂O d. verdünnt und als DNA-Matrize in die RT-PCR eingesetzt.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Isolierung von Proteinen aus dem Gesamtzellextrakt von *E. coli* und *S. aureus*

Für die Herstellung von Proteinproben aus Gesamtzellextrakt aus *E. coli* Bakterien, wurden diese in einem geeigneten Medium über Nacht bei 37 °C angezogen und am darauffolgenden Tag die optische Dichte der Bakterienkultur photometrisch bestimmt. Anschließend wurde das Volumen an Bakteriensuspension in einem Reaktionsgefäß pelletiert, um im endgültigen Probenvolumen eine optische Dichte OD₆₀₀ von 2 zu erreichen. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in TE-Puffer und der entsprechenden Menge 6x Lämmli-Probenpuffer [126] (siehe auch Abschnitt 2.63.5.8) resuspendiert. Für die Gewinnung von Proteinen aus *S. aureus* Gesamtzellextrakt, wurde 1 ml aus einer ÜNK pelletiert und das Pellet in 100 µl TE-Puffer und 20 µl 6x Lämmli-Probenpuffer aufgenommen.

Anschließend wurden sowohl die Proben aus *E. coli* als auch aus *S. aureus* bei 95 °C für 10 min inkubiert. Die Lagerung der Proteinproben erfolgte bei -20 °C.

Verwendete Puffer:

Lämmli- Probenpuffer (6x) (10 ml)	4,7 ml Glycerin 0,93 g DTT 12 % SDS 1,2 ml 0,5M Tris/HCl (pH 6,8) 6 mg Bromphenolblau
---	---

3.5.2 Fraktionierende Proteinextraktion aus *S. aureus*

Um die Proteine der cytoplasmatischen und der Membran-Fraktion aus einer *S. aureus* Kultur zu gewinnen, wurden die Bakterien aus 100 ml ÜNK zunächst pelletiert (15 min, 3.200 x g, 4 °C). Der Überstand wurde für die Isolierung der sekretierten Proteine verwendet (s.u.). Das Pellet wurde in 10 ml eiskaltem SMM-Puffer aufgenommen, 25 µl Lysostaphin (2 mg/ml) und 1 mM Proteaseinhibitor PMSF zugesetzt. Der Ansatz wurde für 10 min bei 37 °C inkubiert, um die Bakterien aufzuschließen. Die vollständige Lyse der Bakterien erfolgte daraufhin mittels FastPrep (MP Biomedicals) mit 0,1 mm großen *Silicabeads* für 2x 45 s bei Stufe 6,5 (6,5 m/s). Anschließend wurde der Ansatz bei 4 °C für 10 min zentrifugiert (16.000 x g), um die *Beads* und den Zelldebris zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen und für 1 h bei 4 °C und 100.000 x g zentrifugiert, um Membranproteine von der Fraktion der cytoplasmatischen Proteinen zu trennen. Die danach im Überstand befindlichen cytoplasmatischen Proteine, wurden bei -80 °C gelagert. Die pelletierte Membranfraktion wurde in 100 µl Membranpuffer aufgenommen und zum Lösen der Proteine für mindestens 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Isolierung der sekretierten Proteine aus dem Überstand, wurde dieser mit 5 % Trichloressigsäure versetzt und die Proteine über Nacht bei 4 °C gefällt. Anschließend wurde dieser Ansatz für 30 min bei 9.000 x g und 4 °C zentrifugiert, um die gefällten Proteine zu pelletieren. Das so entstandene Proteinpellet wurde in 20 ml eiskaltem Aceton resuspendiert. Anschließend wurde wiederum für 30 min bei 9.000 x g und 4 °C zentrifugiert, das Pellet im Anschluss für mindestens 1 h bei RT getrocknet und schließlich in 1 ml TE-Puffer aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Verwendete Puffer:

SMM-Puffer	0,5 M Saccharose 20 mM MgCl ₂ 20 mM Maleinsäure (pH 6,5)
Membran-Puffer	20 mM TrisHCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 1 % DDM 1 mM PMSF

3.5.3 Überexpression rekombinanter Proteine

Mit einer ÜNK eines entsprechenden Expressionsstammes wurde am nächsten Morgen unter Zugabe eines geeigneten Antibiotikums eine Kultur (500 ml - 10 l) im Verhältnis 1:100 angeimpft. Das dafür verwendete Kulturmedium variierte je nach Anwendung. Die Kultur wurde bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,6 bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Expression je nach verwendetem Expressionsstamm mit 0,2-1 mM IPTG bzw. mit 0,2 % Rhamnose induziert (siehe Übersicht in Tabelle 24). Die Kulturen wurden nach der Induktion der Proteinexpression entweder für 4 h bei 37 °C bzw. für 18-24 h bei einer Temperatur von 15-18 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert (15 min, 4.000 x g, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet bei -20 °C gelagert.

3.5.4 Aufreinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie

Affinitätschromatographie ist ein chromatographisches Trennverfahren, das auf der spezifischen Bindung eines Analyten an einen individuellen matrixgebundenen Liganden basiert. Diese Technik dient der Isolation von rekombinant exprimierten Proteinen aus einem Proteingemisch. Der Vorgang der Bindung zwischen Ligand und Zielprotein ist meist reversibel, um die spätere Trennung der beiden Interaktionspartner zu gewährleisten. Entscheidend für die Selektivität dieser Technik ist die Markierung des Zielproteins über ein *Proteintag*. Dies sind meist kurze Peptide, die zusammen mit dem Zielprotein als Fusionsprotein exprimiert werden und entweder C- oder N-terminal lokalisiert sind.

In dieser Arbeit wurden rekombinant hergestellte Proteine mit Hilfe von unterschiedlichen affinitätschromatographischen Verfahren aufgereinigt. Diese werden im Folgenden detaillierter beschrieben. Eine Übersicht über die jeweils verwendeten Verfahren und der jeweiligen Kulturbedingungen befindet sich in Tabelle 24.

IMPACT (Intein/CBD-Tag)

Die Aufreinigung von rekombinant exprimierten Proteinen, die mit CBD/Intein-Tag markiert wurden, erfolgte mit Hilfe des IMPACT (*Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag*) Kits (New England Biolabs GmbH). Bei dieser Methode wird zunächst das Gen für das Zielprotein in den Vektor pTXB1 kloniert, so dass nach der Translation ein

Fusionsprotein aus Zielprotein, Intein und Chitin-Binde-Domäne (CBD) generiert wird. Dabei befindet sich das Intein am C-terminalen Ende des Zielproteins.

Zunächst wurde das Zielprotein, wie in 3.5.3 beschrieben, in *E. coli* überexprimiert, die Bakterien lysiert und Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt. Die so entstandene Proteinlösung wurde auf eine zuvor mit 100 ml (10faches Säulenvolumen) Puffer A äquilibrierte Säule aus Chitin-beschichtetem Trägermaterial gegeben. Die Durchflussrate betrug zu diesem Zeitpunkt unter 1 ml/min. Nach dem Durchfluss der Proteinlösung wurde die Säule zunächst mit 200 ml (20 Säulenvolumen) Puffer B und anschließend mit 200 ml Puffer C gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine von der Säulenmatrix zu entfernen. Hierfür wurde die Flussrate auf ca. 2 ml/min eingestellt. Um das *Proteintag* vom Zielprotein abzuspalten, erfolgte im nächsten Schritt die Spaltung des Fusionsproteins. Dazu wurden 30 ml Puffer A + 50 mM β -Mercaptoethanol mit einer sehr hohen Durchflussrate (>3 ml/min) auf die Säule gegeben. Anschließend wurde der Fluss schnell abgestoppt und die Säule bei 4 °C für 16 h (über Nacht) inkubiert. Die Elution des Zielproteins erfolgte am nächsten Tag mit Puffer A in 8 Fraktionen à 2 ml.

Eine detaillierte schematische Darstellung des Funktionsprinzips des IMPACT Kits ist in Abbildung 6 gezeigt.

Verwendete Puffer

Puffer A:	20 mM HEPES pH 8,5 500 mM NaCl 1 mM EDTA
Puffer B (Waschpuffer 1)	Puffer A 0,1 % Triton-X 100
Puffer C (Waschpuffer 2)	20 mM HEPES pH 8,5 1 M NaCl 1 mM EDTA 0,1 % Triton-X 100

Halo-Tag

Die Aufreinigung von rekombinant exprimierten Proteinen mit fusioniertem HaloTag erfolgt über die kovalente Bindung an einen Trägermaterial-gebundenen Liganden. Für die Expression wurden die Zielgene zunächst in den Vektor pFN18A ligiert. Eine genaue schematische Darstellung dieses affinitätschromatographischen Verfahrens befindet sich in Abbildung 8.

Die zuvor wie unter Abschnitt 3.5.3 beschrieben gewonnenen Pellets wurden in 20 ml Puffer A aufgenommen und für 6 min mit Ultraschall behandelt, um die Zellen zu lysieren. Anschließend wurden sämtliche Zelltrümmer durch Zentrifugieren (30 min, 20.000 x g, 4 °C) entfernt und das geklärte Lysat mit der Säulenmatrix HaloLink™ Resin (Promega) für 1 h bei RT rollend inkubiert. Der Ansatz wurde auf eine Polypropylen-Säule (Econo-Pac® column, BIORAD) gegeben und die Säule mit dem mindestens 20fachen Säulenvolumen WASH-Puffer gewaschen. Das gewaschene Säulenmaterial wurde anschließend mit 33 µl TEV-Protease (Promega)/ml Puffer A für 1,5 h bei RT bzw. ÜN bei 4 °C inkubiert, um das kovalent an die Säule gebundene Protein vom Säulenmaterial proteolytisch abzuspalten. Das geschnittene Tag-freie Zielprotein wurde mit Puffer A in Fraktionen eluiert. Der abgespaltene Tag und die Protease verblieben dabei an der Säule.

Verwendete Puffer:

Puffer A	150 mM NaCl 50 mM Hepes
WASH-Puffer	Puffer A 1 mM Arginin 0,1% Triton

His-Tag

Für die Aufreinigung der rekombinanten Proteine mit 6xHis-Tag wurde das „Protino Protein Purification System“ (Macherey Nagel) nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. Das Zellpellet wurde auf Eis aufgetaut und in 10 ml 1x LEW-Puffer mit Protease Inhibitor Cocktail (Complete Mini EDTA-free, Roche) resuspendiert und 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mittels 3-minütiger Ultraschallbehandlung lysiert und das Lysat für 10 min bei 3.200 x g und 4 °C zentrifugiert, um Zellbruchstücke zu entfernen. Der Überstand

wurde auf Eis gelagert und nach Herstellerangaben mit Hilfe der mitgelieferten Säule affinitätschromatographisch aufgereinigt. Das eluierte Zielproteine wurde in mehreren Fraktionen à 1,5 ml aufgefangen und bei 4 °C bzw. -20 °C gelagert.

Strep-Tag

In dieser Arbeit wurden einige der Proteine als Strep-TagII® Fusionsproteine mittels Strep-Tactin® exprimiert und aufgereinigt (IBA, Göttingen, Deutschland). Diese Methode basiert auf der nativen Bindung von Biotin an Streptavidin, wobei das rekombinant hergestellte Protein mit einem Strep-Tag markiert ist. Dieser Strep-Tag besteht aus acht Aminosäuren (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys), welche spezifisch an das Strep-Tactin Säulenmaterial binden. Bei dem hier verwendeten Strep-Tactin handelt es sich um ein gezielt verändertes Streptavidin. Diese Veränderung führt dazu, dass die Affinität der beiden Bindungspartner, im Vergleich zur natürlichen Biotin-Streptavidin-Interaktion 100x höher ist. Der *Proteintag* ist so klein, dass dieser kaum Einfluss auf die native Konformation des Zielproteins hat. Die Elution erfolgt durch Zugabe von Biotin- oder Desthiobiotin-haltigem Puffer, der das markierte Zielprotein vom Säulenmaterial verdrängt. Die entsprechenden Zielgene wurden hier mit Hilfe des Restriktionsenzym *BsaI* in den Vektor pPR-IBA1 ligiert.

Die Aufreinigung rekombinanter Proteine mit Strep-Tag erfolgte nach Herstellerangaben mittels Strep-Tactin® *Spin Columns* und *Gravity flow Strep-Tactin® Sepharose® Columns* (IBA, Göttingen).

GST-Tag

Bei diesem System wird das Zielprotein als Fusionsprotein mit einer 26 kDa großen Gluthation S-Transferase (GST) exprimiert. Das Tripeptid Gluthation wird dabei an das Säulenmaterial gebunden und kann dann mittels Enzym-Substrat Bindungsreaktion den GST-*Proteintag* im Fusionsprotein gezielt binden. Das gebundene Protein wird im Anschluss eluiert, in dem man lösliches reduziertes Gluthation im Überschuss zum Säulenmaterial gibt. Das lösliche Peptid verdrängt das immobilisierte Gluthation und das Zielprotein wird freigesetzt. Da der GST-*Proteintag* ein Molekulargewicht von ca. 26 kDa besitzt, kann dieser beispielsweise die Interaktion mit einem anderen Protein durch sterische Hinderung blockieren. Deshalb ist für weiterführende Experimente oft die proteolytische Abspaltung

des *GST-Proteintags* mit Hilfe der Protease Thrombin notwendig. Die Zielgene wurden hierfür in den Vektor pGEX4T-1 über die Schnittstellen *Bam*HI und *Not*I ligiert.

Für die Aufreinigung der GST-markierten Proteine wurde das Bakterienpellet in 10 ml PBS aufgenommen und die Zellen für 3 min mit Ultraschall lysiert. Anschließend wurde Triton-X-100 (Endkonzentration 1 %) zugefügt, um die Löslichkeit der Proteine zu erhöhen. Die Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation entfernt (30 min, 20.000 x g, 4 °C) und der klare Überstand zusammen mit 1 ml *GST-Beads* (Glutathione HiCap Matrix slurry, Quiagen) über Nacht rollend inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Ansatz auf eine Säule (Econo-Pac® *column*, BIORAD) gegeben und mit 10 Säulenvolumen PBS-EW gewaschen. Die Elution erfolgte mit TNGT-Puffer in 8 Fraktionen à 2 ml. Die Abspaltung des *Tags* erfolgte mit Hilfe von Thrombin (500 U) über 16 h bei 22 °C.

Verwendete Puffer:

PBS-EW	PBS 1 mM DTT 1 mM EDTA
TNGT-Puffer	50 mM Tris pH 8.0 0,4 M NaCl 50 mM red. GSH 0,1% Triton 1mM DTT

3.5.5 Dialyse

Die Dialyse dient dem Austausch von Salzen und Puffersubstanzen in Proteinlösungen bzw. zur Entfernung von einzelnen Komponenten aus dem bereits verwendeten Puffer. Dafür wurden die eluierten Proteine in einen Dialyse-Schlauch (MWCO 3500; Spectra/Por® Dialysis Membrane, Spectrum Laboratories) mit einer geeigneten Ausschlussgröße überführt. Dieser Schlauch wurde über Nacht bei 4 °C in einem großen Volumen (mindestens 5 l) des gewünschten Puffers unter leichtem Rühren inkubiert. Über die semipermeable Membran fand in dieser Zeit der vollständige Pufferaustausch statt. Anschließend konnten die Proteine im ausgetauschten Puffer wieder aus dem Dialyseschlauch entnommen werden und für weitere Versuche verwendet bzw. über lange Zeit bei -80 °C gelagert werden.

3.5.6 Aufkonzentrieren von Proteinen

Die Aufkonzentrierung von aufgereinigten Proteinen erfolgte zum einen mit Hilfe von einem Adsorbens (Spectra/Gel Adsorbent, Spectrum Laboratories) nach Herstellerangaben.

Zum anderen wurden die Proteine mittels AMICON® Zentrifugenfilter (Merck Millipore) mit geeigneter Ausschlussgröße bei 4 °C und 3.200 x g so lang zentrifugiert bis das gewünschte Volumen erreicht wurde.

3.5.7 Quantitative Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels NanoDrop Spektrophotometer (peqlab) bei einer Wellenlänge von 280 nm unter Einbeziehung des jeweiligen Extinktionskoeffizienten. Dafür wurde darauf geachtet, dass die Proteinlösung kein Imidazol, SDS oder andere Detergenzien enthielt. Als Referenz wurde der verwendete Puffer der Proteinlösung verwendet.

3.5.8 SDS-Polacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der denaturierenden SDS-PAGE wurde die Auftrennung isolierter Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht erreicht. Das enthaltene SDS überlagert die Eigenladung der in der Probe enthaltenen Proteine. Dadurch weisen die Proteine eine konstant negative Ladung auf. SDS führt zudem in Kombination mit DTT und der Inkubation der Probe bei 95 °C zum Zerfall der Tertiärstruktur und zur vollständigen Denaturierung der Proteine. Dies ermöglicht eine Auftrennung der Proteine proportional zu ihrem Molekulargewicht.

Für die denaturierende SDS-PAGE wurde zunächst zwischen zwei saubere Glasplatten mit einem Abstand von 1 mm ein ca. 5 cm hohes Trenngel (10-15% Acrylamid) gegossen, das nach Überschichtung mit Isopropanol auspolymerisierte. Anschließend wurde das Trenngel mit einem etwa 1,5 cm hohen Sammelgel überschichtet, wobei Geltaschen zum Auftragen der Proteine mit Hilfe eines Kammes ausgespart wurden. Nach der vollständigen Polymerisation des Gels wurde dieses in einer vertikalen Laufkammer fixiert und das Gel mit 1x SDS-Laufpuffer überschichtet. Die Proben wurden wie unter 3.5.1 beschrieben, mit 6x

Methoden

Probenpuffer [126] versetzt und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Im Anschluss wurden die zuvor ausgesparten Geltaschen mit den denaturierten Proteinproben beladen.

Die Auftrennung der unterschiedlichen Proteine erfolgte im elektrischen Feld bei konstanter Stromstärke von 25 mA/Gel in der Elektrophorese-Kammer BioRad-Mini-Protean II Cell (BioRad) für ca. 1 h. Im Anschluss wurden die Gele gefärbt (siehe Abschnitt 3.5.10) oder für weiterführende Analysen verwendet (siehe Abschnitt 3.5.14).

Tabelle 18: Zusammensetzung eines 15%igen SDS-Gels

	Trenngel 15 %ig, 10 ml	Sammelgel (5 %ig, 4ml)
H ₂ Od.	2,3 ml	2,7 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	-
1 M Tris (pH 6,8)	-	0,5 ml
30 % Acryl-Bisacrylamid-Mix	5 ml	0,67 ml
10 % SDS	0,1 ml	40 µl
10 % APS	0,1 ml	40 µl
TEMED	4 µl	4 µl

Verwendete Puffer und Lösungen:

SDS-PAGE Laufpuffer (10x)	1 % (w/v) SDS 14,4 % (w/v) Glycin 3 % (w/v) Tris
Lämmli- Probenpuffer (6x) (10 ml)	4,7 ml Glycerin 0,93 g DTT 12 % SDS 1,2 ml 0,5M Tris/HCl (pH 6,8) 6 mg Bromphenolblau
APS	10 % (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ in H ₂ O

3.5.9 native PAGE

Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist ein Trennverfahren für Proteine, bei dem die native Faltung erhalten bleibt. Dabei wird auf den Einsatz von Detergenzien und auf das Erhitzen der Proteinprobe verzichtet. Da die Eigenladung in dem Fall nicht durch SDS überlagert wird, erfolgt die Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt.

Für die native PAGE wurden kommerziell hergestellte Gele (NativePAGE™ Novex® 4–16% Bis-Tris Gele, *lifetechnologies*) nach Herstellerangaben verwendet. Die einzelnen Proteinproben wurden mit NativePAGE™ *Sample Buffer* (4x) und NativePAGE™ 5% G-250 *Sample Additive* versetzt und ohne vorheriges Aufkochen auf das Gel aufgetragen. Als Anoden-Laufpuffer wurde der NativePAGE™ 1X *Running Buffer* verwendet. Für die Kathode wurde der zuvor genannte Laufpuffer zusätzlich mit dem *Light Blue Cathode Additive* (200x) versetzt. Die Elektrophorese wurde in der XCell™ *SureLock™ Mini-Cell* nach Herstellerangaben bei konstanter Spannung von 150 V durchgeführt.

3.5.10 Färbung von Polyacrylamidgelen

Für die Färbung von Polyacrylamidgelen wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Färbelösungen verwendet. Zum einen wurden die PA-Gele für mindestens 1 h in herkömmlicher Coomassie-Lösung gefärbt bis diese vollständig blau gefärbt waren. Anschließend wurden sie zweimal für 20 min mit Coomassie-Entfärber entfärbt.

Ein anderer Teil der Gele wurde mit kolloidaler Coomassie-Lösung gefärbt bis die gewünschte Färbung erreicht wurde. Ein Entfärben war hier nicht nötig. Die Gele wurden zur Dokumentation mit Hilfe eines Flachbettscanners eingescannt.

Verwendete Lösungen:

Coomassie-Lösung	2,5 % CBB-R250 45 % Methanol 10 % Essigsäure
Coomassie-Entfärber	45 % MeOH 10 % Essigsäure
Kolloidale Coomassie-Lösung	5 % Al-Sulfat-(14-18)-Hydrat (in H ₂ O lösen) 10 % EtOH 0,02 % CBB-G250 2 % Phosphorsäure

3.5.11 Thermofluor

Thermofluor ist eine Temperatur-basierte Methode um die Stabilität von Proteinen unter verschiedenen Pufferbedingungen zu testen. Dazu wird der Farbstoff SYPRO Orange verwendet, der an hydrophobe Aminosäurereste und denaturiertes Protein bindet und dadurch fluoresziert. Protein und Farbstoff werden in einem entsprechenden Puffer (siehe Tabelle 19) langsam erhitzt. Dabei entfaltet sich das Protein und die hydrophoben Aminosäurereste werden frei zugänglich.

Bei dieser Methode wird die Änderung der Fluoreszenz bei steigender Temperatur gemessen und daraus eine Schmelzkurve erstellt. Da die Fluoreszenzintensität proportional zum Denaturierungszustand des Proteins ist, können daraus Rückschlüsse auf die Stabilität des Proteins gezogen werden. [127–129]

Es wurden 40 verschiedene Pufferbedingungen gleichzeitig getestet. Alle Puffer wurden in einer Konzentration von 100 mM eingesetzt.

Für die Untersuchungen zur Stabilität von Proteinen wurden 5-15 µg des Zielproteins mit 15 µl des zu testenden Puffers und 5 µl (1:100-1:200 in H₂O d. verdünnt) SyproOrange (*lifetechnologies*) gemischt und mit einer Geschwindigkeit von 1 °C/min bis zu einer Temperatur von 95 °C in einem *RealTime-Cycler* erhitzt. Nach jeder Minute wurde die Fluoreszenz gemessen. Anhand der Fluoreszenzintensitäten wurden Schmelzkurven erstellt, die Aufschluss über die Stabilität des Zielproteins in verschiedenen Puffern geben.

Tabelle 19: Verwendete Puffer im Thermofluor Assay

Puffersubstanz	pH Bereich	Puffer	pH Bereich
Citrat	4,5	Acetat	4,6
Na ⁺ /K ⁺ PO ₄	6,8 7,55	MOPS	7,0 7,5
MES	5,5 6,5	Cacodylate	6,0 6,5
Bis-Tris	5,5 6,5 7,0	BICINE	8,0 8,5 9,0
HEPES	7,0 7,5 8,0 8,5	Tris	7,0 7,5 8,0 8,5 9,0
ADA	6,5 7,0	TAPS	8,0 9,0
Bis-Tris Propan	6,0 7,0	Glycylglycin	8,5
PIPES	6,5 7,0 7,5	CHES	9,0 9,5
Imidazol	6,5 8,0	CAPS	9,8

3.5.12 Größenausschlusschromatografie

Um hochreine Proteinproben zu gewinnen und Proteinverunreinigungen zu beseitigen, wurden die bereits affinitätschromatographisch aufgereinigten Proteine mittels Größenausschlusschromatografie (Gelfiltration) nochmals gereinigt. Dabei werden die Proteine auf eine Säule aus inertem Material (meist quervernetztes Dextran oder quervernetzte Agarose) geladen. Kleine Proteine diffundieren eher in die Poren im Säulenmaterial und verbleiben deshalb wesentlich länger auf der Säule. Große Proteine diffundieren weniger stark oder gar nicht in die Poren des inertem Materials und passieren somit die Säule schneller, als Proteine mit geringerem Molekulargewicht. Sowohl das Molekulargewicht als auch die dreidimensionale Struktur der Proteine tragen zur Verweildauer bei.

Alle Experimente wurden am RVZ Würzburg in Kooperation mit der AG Kisker (Dr. Maria Hirschbeck, Dr. Christin Schäfer) mittels *HiLoad 16/60 Superdex 200 pg* (GE Healthcare) Säule durchgeführt. Dadurch ist eine Auftrennung von Proteinen zwischen 10 kDa und 600 kDa prinzipiell möglich. Für die Gelfiltration wurde am Chromatographie-System ÄKTexpress gearbeitet und die entsprechende Software UNICORN 5 (GE Healthcare) verwendet.

3.5.13 ELISA

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) dient der Detektion eines Antigens in einer Flüssigkeit. [130] Die Methode basiert auf der spezifischen Interaktion von Antikörper und Antigen. Durch den Einsatz eines HRP-konjugierten Sekundärantikörpers wird nach Zugabe eines Substrates eine Farbreaktion katalysiert. Die Intensität der Färbung ist ein Maß für die Menge an vorhandenem Antigen in der Probe.

ELISA ist eine sehr vielseitige Methode, die hauptsächlich Verwendung findet, um die Bindung von spezifischen Antikörpern an ein Antigen nachzuweisen. Allerdings kann diese Methode auch genutzt werden, um beispielweise die Interaktion zwischen zwei Bindungspartnern zu charakterisieren oder den spezifischen Antikörpertiter in einem Serum zu bestimmen. Für die Detektion der Interaktion zwischen Antigen und Primärantikörper wird ein HRP-konjugierter Sekundärantikörper verwendet. Die Antikörper-gebundene Peroxidase katalysiert in Anwesenheit des Substrates *o*-Phenylendiamin die Bildung eines blauen Chromogens. Nach geeigneter Reaktionszeit wird die Umsetzung des Substrates durch Zugabe von Schwefelsäure abgestoppt und anschließend die Absorption bei 450 nm gemessen. Diese ist ein Maß beispielsweise für die Bindung von Antikörper und Antigen.

In dieser Arbeit wurde für die Durchführung eines ELISA-Experiments eine Mikrotiterplatte (Maxisorp, Nunc, 96-well-Format) mit dem zu untersuchenden Antigen beschichtet. Dafür wurde das Antigen zuvor entsprechend in PBS verdünnt und jede Kavität mit jeweils 500 ng Protein beschichtet. Dazu wurde das Antigen für mindestens 12 h bei 4 °C in einer feuchten Kammer in der Mikrotiterplatte inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit PBS-T gewaschen und im Anschluss mit 5 % BSA (in PBS) für 2 h bei RT blockiert, um freie Antikörper-Bindungsstellen an der Mikrotiterplatte zu blockieren. Die Blockierungslösung wurde entfernt und die Platte entweder direkt aufgearbeitet oder bei -20 °C bis zur weiteren Benutzung gelagert. Im nächsten Schritt wurde die Platte mit dem Primärantikörper in

verschiedenen Verdünnungen in 2,5 % BSA (in PBS) für 1 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Bei diesem Primärantikörper handelte es sich um verschiedene für das jeweilige Antigen spezifische monoklonale bzw. polyklonale Antikörper oder um Serum von humanen Spendern oder Versuchstieren. Nach der Inkubation wurde die Platte erneut dreimal gewaschen und im Anschluss mit einem passenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper für 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde wiederum dreimal gewaschen. Die Detektion erfolgte mit 50 µl/Kavität TMB-Substrat (*TMB single solution chromogen for ELISA, lifetechnologies*). Im Anschluss wurde die Reaktion mit 50 µl 1N H₂SO₄ gestoppt und sofort die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm an einem Plattenlesegerät gemessen.

3.5.13.1 Bestimmung von Antikörpertitern in Serum oder Plasma

Für die Bestimmung von Antikörpertitern in Serum oder Plasma wurde auf jeder verwendeten Mikrotiterplatte eine Eichkurve erstellt. Bei den Untersuchungen der humanen Plasmen von Trägern und Nicht-Trägern wurde dafür die Platte zunächst mit IsaA beschichtet. Das immobilisierte IsaA wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen des monoklonalen humanisierten Antikörpers hUK-66 [131] detektiert und daraus eine Eichkurve mit einer Funktionsgleichung erstellt. Mittels dieser Funktion konnten die erhaltenen Messwerte für Proben mit unbekannter Antikörperkonzentration interpoliert und so eine Antikörperkonzentration berechnet werden.

3.5.13.2 Interaktionsstudien zwischen Faktor H und PurA

Um die Interaktion zwischen Faktor H und PurA zu untersuchen, wurden zunächst 500 ng/Kavität PurA in PBS an die Platte immobilisiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte wie unter 3.5.13 beschrieben blockiert und danach mit humanem Serum (0,01 - 10 %) in PBS bzw. mit aufgereinigtem Faktor H (Biopur, Schweiz) (0,01 - 10 µg/ml in PBS) für 1 h bei RT inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem spezifischen in der Ziege generiertem α-Faktor H-Antikörper (CompTech, USA) und einem HRP-konjugierten α-Ziege-Antikörper (ABIN376321, *Antikoerper-online.de*). Der Primärantikörper wurde dabei in einer Verdünnung von 1:2.000 in PBS mit 2,5% BSA und der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:5.000 verwendet.

3.5.13.3 Kompetitions-ELISA

Beim kompetitiven Immunassay handelt es sich um eine spezielle Variante des ELISAs. Hier wird ein Kompetitor eingesetzt, der in direkter Konkurrenz mit dem zu untersuchenden Antigen um einen Bindungsplatz am Primärantikörper steht. Das detektierte Signal verhält sich dabei umgekehrt zur Konzentration des Zielantigens.

Der Kompetitions-ELISA wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Bindung eines spezifischen Antikörpers an ein in Lösung befindliches Antigen zu untersuchen. Dazu wurde eine Mikrotiterplatte wie zuvor beschrieben (3.5.13) mit 500 ng Antigen/ Kavität beschichtet. Der spezifische Primärantikörper wurde mit unterschiedlichen Mengen des Antigens in Lösung inkubiert (2 h, RT) und anschließend auf die bereits blockierte Mikrotiterplatte gegeben. Primärantikörper und immobilisiertes Antigen wurden für 15 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Platte mit PBS-T gewaschen und im Anschluss mit dem Sekundärantikörper inkubiert (1 h, 37 °C). Die Detektion erfolgte wie bereits beschrieben (3.5.13).

3.5.14 Western Blot

Western Blot ist eine Technik zum spezifischen Nachweis von Proteinen mittels Immundetektion. [132] Dabei werden die Proteine zunächst entsprechend ihrem Molekulargewicht mittels SDS-PAGE (3.5.8) aufgetrennt. Der horizontalen Gelelektrophorese schließt sich der vertikale Proteintransfer auf eine Trägermembran aus Nitrozellulose bzw. PVDF an. Dadurch werden die zu analysierenden Proteine auf der Membran immobilisiert. Die Detektion einzelner Proteine erfolgt direkt auf der Membran mittels spezifischer Antikörper. Nachdem ein spezifischer Primärantikörper an das Zielprotein gebunden hat, wird dieser durch einen HRP-konjugierten Sekundärantikörper erkannt. Mit Hilfe der Antikörper-gebundenen Peroxidase kann die Chemilumineszenz-Reaktion von Luminol katalysiert werden. Das so entstehende Lumineszenz-Signal kann anschließend mittels Röntgen-Film bzw. CCD-Kamera dokumentiert werden.

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Verfahren des Proteintransfers auf eine Trägermembran: *Tank-Blot*-Verfahren und *Semidry Blot*-Verfahren. Im Folgenden wird das in dieser Arbeit verwendete *Semidry Blot*-Verfahren und die Immundetektion der Proteine auf der Membran genauer beschrieben.

3.5.14.1 Proteintransfer mittels *Semidry Blot*

Nach der SDS-PAGE (3.5.8) wurden die Proteine im *Semidry Blot*-Verfahren mit Hilfe eines Graphit-Blotters auf eine Nitrozellulose- bzw. eine PVDF-Membran übertragen. Die Graphitplatte wurde dazu zunächst auf der Anodenseite mit H₂O_d. angefeuchtet und darauf drei Lagen mit in Transferpuffer getränktem Whatmanpapier gelegt. Darauf wurde die ebenfalls in Transferpuffer getränkte Membran platziert und direkt im Anschluss das Acrylamidgel luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Dieses wurde dann mit drei Lagen in Transferpuffer getränktem Whatmanpapier bedeckt. Anschließend wurde die Graphitplatte der Kathode aufgesetzt und der Transfer bei RT und einer konstanten Spannung von 20 V durchgeführt. Je nach Größe der Zielproteine wurde die Dauer zwischen 15 und 60 min variiert.

Verwendete Puffer:

Transferpuffer (1x)	150 mM Tris
Western Blot	120 mM Glycin
	10 % EtOH

3.5.14.2 Immundetektion

Im Anschluss an den Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran, wurden die freien unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen mit 5 % Magermilch in TBS für 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C blockiert. Danach wurde die Membran mit dem primären Antikörper (1:500 – 1:10.000) in 5 % Magermilch in TBS für 1 h bei RT bzw. ÜN bei 4 °C inkubiert und anschließend dreimal mit TBS-T für 10 min gewaschen. Danach folgte die Inkubation mit einem geeigneten HRP-konjugierten Sekundär-Antikörper für 1 h bei RT. Schließlich wurde die Membran wiederum dreimal mit TBS-T für 10 min gewaschen. Für die Detektion wurde eine ECL-Detektionslösung aus 1 ml *Solution A*, 100 µl *Solution B* und 0,3 µl H₂O₂ vorbereitet und der Blot darin für 2 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion des generierten Lumineszenzsignals mittels lichtempfindlicher Kamera bzw. mit Röntgenfilmen.

Verwendete Lösungen:

Solution A	25 % Luminol in 0,1 M Tris (pH 8,8)
Solution B	0,11 % para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO

3.6 Herstellung von Antikörpern

Alle in dieser Arbeit verwendeten polyklonalen Seren aus Kaninchen und Antikörper aus dem Dotter von Hühnereiern wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Davids Biotechnologie (Regensburg) hergestellt. Die Tiere wurden mit den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten und aufgereinigten Antigenen nach einem Firmen-eigenen Protokoll immunisiert und nach 2-3 Monaten das Serum der Tiere bzw. der Dotter aus den Eiern gewonnen.

Für die Herstellung von murinen Antikörpern wurden je drei NMRI-Mäuse subkutan mit 100 µg Antigen dreimal im Abstand von 4 Wochen immunisiert. Hierbei wurde Alhydrogel® (Invivogen) als Adjuvans eingesetzt. 2 Wochen nach Abschluss der Immunsierung erfolgte die finale Blutentnahme. Das Vollblut wurde anschließend ca. 30 min bei RT agglutiniert und das Serum durch Zentrifugation (5 min, RT, 3.000 x g) gewonnen.

3.7 Isolation von Antikörpern aus Blutserum

Zur Isolation von Antikörpern aus Blutserum wurde dieses zusammen mit 1 ml Protein G *Beads* (Thermo Fisher Scientific) über Nacht rollend bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die *Beads* mit den gebundenen Antikörpern auf eine Polypropylen-Säule (Econo-Pac® *column*, BIORAD) gegeben und mit mindestens 20 Säulenvolumen TBS gewaschen. Die Elution der Antikörper erfolgte mit zwei verschiedenen Elutionspuffern (I+II) bei pH 1-2. Um Schäden am Antikörper zu vermeiden, wurde die eluierte Fraktion (1 ml) direkt in 100 µl Neutralisationspuffer eingetropt. Der pH-Wert wurde darüber hinaus direkt im Anschluss an die Elution überprüft und gegebenenfalls durch Zugabe von Neutralisationspuffer rejustiert. Die Elution erfolgte mit je 5 ml Elutionspuffer I und Elutionspuffer II in Fraktionen à 1 ml. Der Antikörper wurde im Anschluss in einen geeigneten Puffer dialysiert.

Verwendete Puffer und Lösungen:

Elutionspuffer I	50 mM Glycin-HCl (pH 2,7)
Elutionspuffer II	50 mM Glycin-HCl (pH 1,9)
Neutralisationspuffer	1 M Tris-HCl (pH 8,0) 1,5 M NaCl 1 mM EDTA

3.8 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Unter MHK versteht man die geringste Konzentration einer Substanz, die das Wachstum einer Bakterienkultur hemmt. Für diese Untersuchungen wurden ÜNK von verschiedenen *S. aureus*-Stämmen im Verhältnis 1:200 in MH-Medium bzw. TSB-Medium verdünnt. Die Bakterien wurden in einem Volumen von 200 µl zusammen mit verschiedenen Konzentrationen einer zu testenden Substanz (0,5 – 256 µg/ml) für 24 h bei 37 °C inkubiert. Als Wachstumskontrolle wurden unter gleichen Bedingungen Bakterien ohne Zugabe der zu testenden Substanz inkubiert.

3.9 Adhäsion von *S. aureus* an eukaryotische Zellen und Invasion

In dieser Arbeit wurde die Adhäsion und Invasion von unterschiedlichen *S. aureus* Wildtyp-Stämmen und Insertionsmutanten untersucht, um den Einfluss einzelner Proteinen auf die zuvor genannten Vorgänge zu analysieren. Dazu wurden die Zellen zunächst wie unter 3.2.2 beschrieben ausgesät und mit den Bakterien inokuliert.

Für die Untersuchungen zum Adhäsionsverhalten der Bakterien, wurde die Invasion der Bakterien durch die Verwendung von Serum-freiem RPMI inhibiert. Für diesen Vorgang werden zwingend Serumbestandteile benötigt.

Zellen und Bakterien wurden zusammen für 1 h bei RT inkubiert und die Zellen anschließend dreimal mit serumfreiem Zellkulturmedium gewaschen, um nicht-adhärenente Bakterien zu entfernen. Im Anschluss wurden die tierischen Zellen mit 100 µl Trypsin/EDTA abgelöst und mit 900 µl eiskaltem H₂O lysiert. Von diesem Zelllysate wurden Verdünnungen in PBS angefertigt und LB-Agarplatten ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und die gewachsenen Kolonien ausgezählt, um die Anzahl der adhärenenten Bakterien zu ermitteln.

Für die Invasionsversuche wurden die Zellen zusammen mit den Bakterien in Zellkulturmedium (RPMI) mit 10 % FCS bei 37 °C inkubiert. Die Ko-Kultivierung erfolgte je nach verwendetem Bakterienstamm für 2-4 h. Anschließend wurde das Zellkulturmedium entfernt und alle extrazellulären Bakterien durch die Zugabe von Antibiotika und Lysostaphin

(50µg/ml Gentamicin + 10 µg/ml Lysostaphin) über 45 min bei 37 °C abgetötet. Die Zellen wurden anschließend mit 1 % Saponin in PBS für 15 min bei 37 °C lysiert, davon Verdünnungen angefertigt und ausplattiert (s.o.). Am Folgetag wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt und die Anzahl der intrazellulären Bakterien bestimmt.

3.10 Phänotypische Assays

Für die phänotypische Charakterisierung von *S. aureus*-Stämmen, wurden folgende Eigenschaften untersucht: Sekretion von DNasen (über DNase Test Agarplatten), Hämolyse von Erythrozyten (Blutplatten), Serinprotease-Aktivität (Casein-Platten), Cysteinprotease-Aktivität (Gelatine-Platten) und der Mannit-Stoffwechsel (Mannit-Platten). [122,133] Für alle Untersuchungen wurden die unterschiedlichen Selektionsplatten punktförmig mit einem *S. aureus*-Stamm beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Größe und Färbung des jeweiligen Hofes um die Kolonien, wurde photographisch dokumentiert.

3.11 Makrokolonie-Formation

Für die Charakterisierung der Biofilm-Bildung wurde ein Makrokolonie-Bildungsassay verwendet. [134] Dieser beruht auf der Beobachtung, dass *S. aureus* hauptsächlich Biofilm in Anwesenheit von hohen Magnesium-Konzentrationen bildet. Aus diesem Grund wurden für diese Untersuchungen TSB-Agarplatten mit 100 mM MgCl₂ verwendet. Zunächst wurden die jeweiligen Stämme frisch auf TSB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Zellsuspension in PBS hergestellt und 2 µl dieser Suspension auf eine TSB-Agarplatte mit MgCl₂ aufgetropft. Um die Makrokolonie-Bildung zu provozieren, wurden die Platten für 5 Tage bei 37 °C inkubiert. Die Größe und Färbung der Makrokolonien wurde photographisch dokumentiert.

3.12 FACS-Analysen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten FACS-Analysen dienten dem Nachweis von PurA auf der Oberfläche der Bakterienzellen. Dazu wurde zunächst eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt, die anschließend am FACS ausgewertet wurde.

Für den Nachweis von PurA auf der Oberfläche von *S. aureus* Zellen mittels FACS, wurden die Stämme *S. aureus* Newman Δspa , HG003 Δspa und 8325 Δspa in TSB-Medium angezogen. Die Bakterien einer ÜNK wurden pelletiert (16.000 x g, 1 min) und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 1×10^7 - 1×10^8 Bakterien in PBS mit 5 % FCS für 30 min bei 37 °C mit α -PurA-Antikörper (aus Kaninchen) inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Bakterien zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 30 min bei 37 °C mit dem Sekundärantikörper (α -Kaninchen-Antikörper mit PE konjugiert, 1:500 in PBS) inkubiert. Um ungebundenen Sekundärantikörper wieder zu entfernen, wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen. Die entsprechenden Negativ-Kontrollen wurden lediglich mit primärem oder sekundärem Antikörper gefärbt. Die Zellen wurden anschließend direkt am FACS (FACSCalibur, BD) analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels Cyflogic Software.

3.13 Mikroskopie

Für den mikroskopischen Nachweis des Proteins PurA auf der Oberfläche von *S. aureus* Zellen wurde zunächst eine Immunfluoreszenz-Färbung von PurA und der bakteriellen DNA durchgeführt. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie angefertigt.

Für die Fluoreszenzfärbung der Bakterien wurden die Stämme *S. aureus* Newman Δspa und deren PurA-Mutante in TSB-Medium angezogen. Die Bakterien aus der ÜNK wurden pelletiert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 1×10^7 - 1×10^8 Bakterien entnommen und für 10 min mit 2 % Formaldehyd in PBS bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen für 1 min auf Eis inkubiert und anschließend das Formaldehyd durch zweimaliges Waschen der Zellen entfernt. Im nächsten Schritt wurden die Bakterien für 30 min bei 37 °C mit 50 μ g/ml α -PurA-Antikörper (aus Kaninchen) inkubiert. Danach wurden die Bakterien zweimal mit PBS gewaschen und im Anschluss für 45 min bei 37 °C mit dem Sekundärantikörper (α -Kaninchen-Antikörper mit Alexa 647 konjugiert, 1:100 in PBS) inkubiert. Um ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen, wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen. Die Negativ-Kontrollen wurden entweder mit primärem oder sekundärem Antikörper inkubiert. Anschließend wurde zusätzlich die zelluläre DNA mit NucBlue® Live Cell Stain (*lifetechnologies*) nach Herstellerangaben gefärbt. Im nächsten Schritt wurden die Bakterien auf einem Agarose-„Bett“ (1%) auf einen Objektträger gegeben, mit Fluoromount (Sigma)

eingedeckt und mikroskopiert. Die Aufnahmen wurden mit einem Leica TCS SP5 Mikroskop angefertigt und mit der dazugehörigen Software ausgewertet.

3.14 Phagentransduktion

Die Phagentransduktion dient der Übertragung von DNA von einem *S. aureus*-Stamm in einen anderen. Für den Gentransfer werden *S. aureus*-spezifische Bakteriophagen verwendet. Während der Infektion der Bakterien wird die DNA des Wirtes durch virale Enzyme unspezifisch fragmentiert und kann anschließend zufällig in das Phagen-Kapsid verpackt werden. Bei einer erneuten Infektion mit dem Phagen, wird die Fremd-DNA in den Zielstamm übertragen und kann dort mittels Rekombination in das Genom integriert werden.

Grundlegend wird für die Übertragung von DNA zunächst ein Phagenlysat vom Donor-Stamm hergestellt. Mit den daraus reisolierten Phagen wird im Anschluss der Zielstamm infiziert und entsprechende positive Klone unter Selektionsdruck isoliert. Im nachfolgenden Abschnitt werden die einzelnen Schritte der Transduktion genauer beschrieben.

3.14.1 Herstellung des Phagenlysats

Zunächst wurde eine 20 ml ÜNK (LB-Medium) des Donorstamms (37 °C) angesetzt. Am folgenden Tag wurde die Kultur mit 5 mM CaCl₂ versetzt. Anschließend wurden die Phagen 1:10 oder 1:100 in Phagenpuffer (LB-Medium + 5 mM CaCl₂) verdünnt. Aus der ÜNK wurden 300 µl in ein 15 ml-Röhrchen überführt und für 2 min bei 52 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des verdünnten Phagenlysats zu den Bakterien gegeben und gemischt. Der Ansatz wird dann für 2-3 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde warmer (55 °C) LB-Agar (0,6 % Agar) auf die Bakterien gegeben und die gesamte Suspension auf eine LB-Agarplatte überführt und bei 37 °C ÜN inkubiert. Das klare Lysat wurde zusammen mit 2 ml Phagenpuffer von der Agarplatte abgenommen und in ein 50 ml Röhrchen überführt, durchmischt und anschließend für 30 min bei 6.000 x g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde danach steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

3.14.2 Phagentransduktion

Für die eigentliche Phagentransduktion wurde eine 10 ml ÜNK (LB-Medium) des Akzeptorstamms angesetzt und bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde CaCl₂ in einer Endkonzentration von 5 mM zur Kultur gegeben und gemischt. Aus der ÜNK wurden 300 µl in ein 15 ml-Röhrchen überführt, der Ansatz für 2 min bei 52 °C inkubiert (nicht bei isogenen Stämmen) und anschließend mit 100 µl des zuvor hergestellten Phagenlysats infiziert. Der Ansatz wurde dann für 15-45 min bei RT inkubiert und anschließend wiederum 2 ml warmer Agar mit 20 mM Na₃-Citrat zugegeben. Der ganze Ansatz wurde nun auf einer Agarplatte mit geeignetem Selektionsdruck ausplattiert und wiederum ÜN bei 37 °C inkubiert. Die Kontrolle der positiven Klone erfolgte per PCR.

3.15 Infektionen im alternativen Tiermodell *Galleria mellonella*

Die *Galleria mellonella* Larven im letzten Larvenstadium wurden von der Firma Mous Live Bait (Ex Balk, Niederlande) bezogen. Diese wurden direkt nach der Ankunft bei 18 °C gelagert und innerhalb von drei Tagen für Versuche verwendet.

Für die Infektion der Tiere mit *S. aureus* wurden den Larven in das letzte Beinsegment 5×10^6 - 1×10^7 Bakterien (siehe auch 3.16.4) in einem Volumen von 20 µl injiziert. Nach der Applikation der Infektionsdosis wurden die Larven bei 37 °C inkubiert. Die Larven nehmen nach dem Tod sehr schnell eine schwarze Färbung an und können darüber einfach selektiert werden. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von maximal drei Tagen beobachtet und deren Überleben dokumentiert.

Zur Bestimmung der Bakterienlast in den Larven bzw. zur Re-Isolation von Bakterien wurden die *Galleria mellonella* Larven abgetötet, in 2 ml PBS aufgenommen und mittels Dispomix (Bio-Budget Technologies GmbH) in gentleMACS™ Röhrchen (Miltenyi) homogenisiert. Anschließend wurden geeignete Verdünnungen hergestellt und ausplattiert. Die Agarplatten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert und die Anzahl der Bakterien ausgezählt.

3.16 Allgemeiner Umgang mit Versuchstieren

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit Tieren sind durch die Regierung von Unterfranken genehmigt und unter der Leitung von PD Dr. rer. nat. Knut Ohlsen am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg durchgeführt worden. Das experimentelle Arbeiten mit Versuchstieren wurde nur von Personen mit fachlicher Eignung (Tierschutz und Versuchstierkunde) durchgeführt. Dabei wurde auf die Minimierung der Belastung der Versuchstiere Wert gelegt.

3.16.1 Maushaltung und Narkotisierung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere wurden von Charles River (Sulzfeld) und JANVIER LABS (Saint-Berthevin Cedex, Frankreich) bezogen. Die Tiere waren bei der Lieferung 6-8 Wochen alt und hatten ein Gewicht von ca. 18 g. Direkt nach der Ankunft wurde den Tieren eine Eingewöhnungszeit von mindestens einer Woche gewährt bevor das Experiment gestartet wurde.

Die Haltung der Tiere erfolgte in Gruppen zu maximal 5 Tieren in Propylenkäfigen bei konventionellen Standardbedingungen (12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus, $21\pm 1^\circ\text{C}$, $55\pm 5\%$ Luftfeuchtigkeit, 10-facher Luftwechsel, Wasser und Standard-Labortierfutter *ad libitum*). Die Zucht- und Tierhaltungseinheit waren als spezifisch Pathogen-frei (SPF) deklariert. Die Haltung der Tiere, die Versuchsdurchführung und Hygiene-Bestimmungen erfolgten gemäß den Richtlinien der FELASA (*"Federation of European Laboratory Animal Science Association"*).

Die kurzfristige Narkotisierung der Versuchstiere erfolgte über Inhalation eines 2%igen Isofluran-Sauerstoff-Gemisches (FORENE[®], ABOIT). Darin enthalten ist der Wirkstoff 1-Chlor-2,2,2-trifluorethyldifluoromethylether, für den eine geringe Löslichkeit im Blut charakteristisch ist, wodurch sich schnelle An- und Abflutzeiten ergeben. Die Anwendung ist auf gut belüftete Räume beschränkt, wobei zusätzlich die aus der Narkosekammer abgeleiteten Gase über ein Aktivkohlefiltersystem gefiltert wurden.

Für eine länger anhaltende Narkose wurde ein Gemisch aus Xylazin und Ketaminhydrochlorid intraperitoneal appliziert. Xylazin wirkt dabei als Schmerz- und Beruhigungsmittel und führt außerdem zur Muskelrelaxation. Ketamin wurde hingegen als

Schmerz- und Narkosemittel eingesetzt. Der Einsatz beider Medikamente führt zu Bewusstseinsverlust, Ausschalten der Schmerzempfindung sowie der Unterdrückung von Reflexen. Hierfür wurde eine Injektionslösung aus 250 µl Ketanest® (Pfizer, Berlin; Wirkstoff: (S)-Ketamin), 3 ml Rompun® (2%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen; Wirkstoff: Xylazin) und 4 ml physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Es wurden ca. 50 µl der Injektionslösung pro 10 g Körpergewicht appliziert.

Der Verlauf und die Tiefe der Narkose wurden anhand der Verluste der Reflexreaktionen wie z.B. dem Zwischenzehenreflex getestet.

3.16.2 Gewinnung von Vollblut und Serum

Das Vollblut von Versuchstieren wurde entweder durch Herzpunktion in sehr tiefer Narkose oder direkt aus dem zuvor getöteten Tier entnommen. Das Vollblut wurde ca. 30 min bei RT agglutiniert und das Serum durch Zentrifugation (5 min, RT, 3.000 x g) gewonnen.

3.16.3 Herstellung von Infektionsproben für die Langzeitlagerung bei -80 °C.

Für die Herstellung von Infektionsproben wurde der jeweilige Stamm frisch aus einer Dauerkonserve auf eine BHI-Agarplatte ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine ÜNK in BHI-Medium angelegt und damit 1 l BHI-Medium auf eine optische Dichte OD_{600} von 0,05 eingestellt. Anschließend wurde die Kultur 3,5 h Stunden bis zur exponentiellen Wachstumsphase bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden die Bakterien pelletiert (15 min, 4 °C, 3.200 x g) und in 100 ml frischem BHI-Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 20 ml sterilem Glycerin (86 %) wurden die Bakterien in 2 ml Aliquots in -80 °C tiefgefroren und gelagert.

3.16.4 Herstellung einer Infektionsdosis

Für die Herstellung von Infektionsdosen wurde Infektionsproben (für die Langzeitlagerung, siehe Abschnitt 3.16.3) aufgetaut, in 40 ml sterilem PBS aufgenommen und anschließend zum Entfernen von Medium- und Glycerin-Resten pelletiert (15 min, 3.200 x g). Danach

wurde der Überstand verworfen und das Pellet je nach gewünschter Infektionsdosis in 1-2 ml sterilem PBS resuspendiert. Anschließend wurde die optische Dichte (OD_{600}) des Inokulums bestimmt und anhand einer Eichkurve die CFU/ml berechnet. Daraus resultierend wurden die Bakterien je nach benötigter Infektionsdosis in sterilem PBS verdünnt und zeitnah den Versuchstieren appliziert. Zur Kontrolle wurde ein Teil der Infektionsdosis geeignet verdünnt und ausplattiert, um die tatsächlich applizierte Bakterienmenge zu bestimmen.

3.16.5 Infektionsmodelle

In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung der Interaktion von Wirt und Pathogen unterschiedliche Tiermodelle verwendet. Diese werden im Folgenden detailliert beschrieben.

3.16.5.1 Systemische Infektion/Sepsis-Modell

Bei einer systemischen Infektion verteilen sich die Bakterien mit Hilfe des Blutstroms im gesamten Organismus und adhären in großer Zahl im Nieren- und Lebergewebe, wo es häufig zur Ausbildung großer oberflächlicher Abszesse kommt. Um eine systemische Infektion in den Tieren zu induzieren, wurde das Inokulum direkt über die Schwanzvene in einem Volumen von 100 μ l in den Blutkreislauf appliziert.

3.16.5.2 Intranasale Infektion/Pneumonie-Modell

Für die Infektion der Lunge wurden die Tiere intranasal mit *S. aureus* infiziert. Dazu wurde die Maus über eine Inhalationsnarkose kurz narkotisiert und anschließend das Inokulum auf die Nase der Mäuse getropft. Die Bakterien wurden daraufhin von der Maus über die Nase inhaliert. Hierbei betrug das applizierte Volumen 20 μ l.

3.16.5.3 Intramuskuläre Infektion/Abszess-Modell

Abszesse sind tiefe Wundinfektionen von Haut und Muskelgewebe. Um diese Art von Wundinfektionen auszulösen, wurden die Bakterien in einem Volumen von 50 μ l direkt in

den *Musculus gluteus superficialis* der narkotisierten Maus appliziert. Zuvor wurde der Oberschenkel enthaart und desinfiziert.

3.16.5.4 Überlebensexperimente

Für die vergleichende Auswertung von zwei Staphylokokken-Stämmen wird entweder das Überleben bzw. die Bakterienlast der inneren Organe zu einem definierten Zeitpunkt herangezogen. Während des Versuches wurden die Tiere zweimal täglich hinsichtlich Gewichtsverlust, Fellbeschaffenheit, Körperhaltung und Mobilität überwacht. Es wurden dabei die laut Tierschutzgesetz vorgegebenen Richtlinien und Abbruchkriterien eingehalten.

3.16.6 Biolumineszenz-Imaging

Um den Infektionsverlauf in Mäusen besser nachvollziehen zu können, wurden einige Tiere mit dem biolumineszenten Stamm *S. aureus* Newman *lux* infiziert. Dadurch konnte die Infektion nicht-invasiv mittels IVIS® Lumina II (Caliper Life Sciences) und der zugehörigen Software LivingImage® 3.1. über drei Tage verfolgt werden. Dazu wurden die teilweise enthaarten Tiere in einer separaten Kammer mit Isofluran narkotisiert und anschließend in die Messkammer des IVIS® Lumina II gelegt. Während der Messung wurde die Körpertemperatur über eine Wärmeplatte im Gerät reguliert. Zusätzlich dazu wurde die Inhalationsnarkose über ebenfalls im Gerät befindliche Atemmasken aufrecht erhalten. Alle erstellten Aufnahmen wurden mit mittlerer Auflösung und einer Belichtungszeit von 2 min angefertigt.

Für die Quantifizierung wurden mittels mitgelieferter LivingImage® 3.1. Software sogenannte ROIs (*Region of interest*) festgelegt und die emittierten Photonen innerhalb dieser definierten Regionen gemessen.

3.16.7 Quantitative Bestimmung der Bakterienlast von Organen

Zur Bestimmung der Bakterienlast in Organen von infizierten Tieren, wurden die entsprechenden Organe aseptisch entnommen, in 2 ml sterilem PBS aufgenommen und mittels Dispomix (Bio-Budget Technologies GmbH) in gentleMACS™ Rührchen (Miltenyi) homogenisiert. Aus den Homogenisaten wurden geeignete Verdünnungen in PBS hergestellt, die Bakterien auf Agarplatten (LB-Agar oder MKP-Agar) ausplattiert und für 16-48 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Einzelkolonien ausgezählt und die Anzahl der

koloniebildenden Einheiten unter Einbeziehung der jeweiligen Verdünnungsfaktoren berechnet.

3.16.8 Histologische Untersuchung von Organen

Für die histologischen Untersuchungen wurden die Organe aseptisch entnommen, in 10 % Formalin-Lösung (Sigma) bei 4 °C fixiert und am Folgetag in PBS überführt. Anschließend wurden daraus im Pathologischen Institut der Universität Würzburg in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Stefan Kircher histologische Schnitte angefertigt und diese H&E (Hämatoxylin und Eosin) gefärbt.

3.17 *Staph-Toxin* Protein-Array

Beim *Staph-Toxin* Protein-Array handelt es sich um einen Array im 96-well Format auf dem 63 verschiedene Proteine aus *S. aureus* immobilisiert wurden. Der Proteinarray kann u.a. genutzt werden, um verschiedene Antikörperspezifitäten in Serumproben zu bestimmen.

Dafür wurden die Proteinarrays *Staph-Toxin-Ag03* der Firma Alere verwendet. Diese wurden zunächst mit 150 µl Waschpuffer für 5 min vorgewaschen und anschließend mit 100 µl Blockierungspuffer für 5 min blockiert. Das zu testende Serum bzw. die Organhomogenisate wurden in verschiedenen Verdünnungen in einem Volumen von 100 µl auf den Array gegeben und für 30 min inkubiert. Anschließend wurde der Array mit 150 µl Waschpuffer für 5 min gewaschen und danach mit einem HRP-konjugierten α -Maus IgG + IgM Antikörper (100 µl einer 1:1000 Verdünnung) inkubiert. Danach wurde der Array zweimal mit 150 µl Waschpuffer für 5 min gewaschen. Alle bisher beschriebenen Schritte wurden bei 37 °C und unter Schütteln durchgeführt.

Die eigentliche Detektion erfolgte durch Zugabe von 100 µl Substratlösung (Alere) für 10 min bei 25 °C. Nach der Inkubationszeit wurde das Substrat abgenommen und das Signal direkt gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels ARRAYMATE-Lesegerät in Zusammenarbeit mit der Firma Alere. Dabei wurde die Signalintensität von definierten Bereichen gemessen und in arbiträren Einheiten (AU) vom Gerät ausgegeben.

In der nachfolgenden Tabelle sind alle auf dem Proteinarray immobilisierten Antigene hinsichtlich ihrer bisher bekannten Funktion aufgeführt.

Tabelle 20: Übersicht über alle auf dem *Staph-Toxin-Ag03* immobilisierten Antigene aus *S. aureus* gruppiert nach ihrer Funktion bzw. ihrem Vorkommen in der Bakterienzelle. In fett gedruckt sind die Proteine, die mit mindestens 98 %iger Identität im Genom von *S. aureus* Newman vorkommen.

Cytosolische Proteine	Komplement Regulatoren	Porenbildende Proteine	Extrazelluläre Enzyme	Superantigene	Putativ sekretierte Proteine
CitC	Efb	Hlb	Geh	SEB	SACOL0021
GreA	SCIN	HlgA	GlpQ	SEC	SACOL0129
PknB	SaurJH1_2034	HlgB	IsaA	SEC-bov	SACOL 0444
PurA	SACOL 1169	HlgC	Lip	SEK	SACOL 0479
Stp	Sbi I-II	Hly	Nuc	SEL	SACOL 0480
Tig	Sbi I-IV / III-IV	lukF-PV	Plc	SEQ	SACOL0669
Tuf			SplA	SEI	SACOL0723
			SplB	SEM	SACOL0742
			SplC	Ssl-7	SACOL0755
			SplD	Ssl-11	SACOL0820
			SspA	TSST-1	SACOL 0908
			SspB		SACOL 0985
					SACOL1065
					SACOL1164
					SACOL 1788
					SACOL 1802
					SACOL1870
					SACOL 2197
					SACOL2295
					SACOL2661

Alle dazu durchgeführten Versuche wurden am Institut für Mikrobiologie der Universität Greifswald in Kooperation mit Prof. Susanne Engelmann und Peggy Kloppot durchgeführt.

Verwendete Puffer:

Waschpuffer

PBS
0.05 % Tween20
0.25 % Triton100
1 % FCS

Blockierungspuffer

PBS
0,05 % Tween20
10 % FCS

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung sekretierter Proteine von *S. aureus* mit bislang unbekannter Funktion

4.1.1 Auswahl der Exoproteine und *in silico* Analyse

Da bislang die Pathogenitätsmechanismen von *S. aureus* noch wenig verstanden sind, sollten in dieser Arbeit neue Virulenzfaktoren identifiziert und charakterisiert werden. Dies sollte im Weiteren das Verständnis der Interaktion zwischen Wirt und Pathogen verbessern. Vor allem sekretierte und Oberflächen-assoziierte Proteine stellen dabei ein Reservoir für bislang nicht charakterisierte Virulenzfaktoren dar. Dies liegt vor allem daran, dass Virulenzfaktoren hauptsächlich außerhalb der Bakterienzelle mit den Wirtsfaktoren interagieren. Betrachtet man die Genomsequenz von *S. aureus*, so ist die Funktion eines Großteils der vorhergesagten Proteine noch völlig ungeklärt. Darunter befinden sich auch zahlreiche sekretierte und Oberflächen-assoziierte Proteine. [71,72]

Innerhalb der Gruppe der sekretierten und Oberflächen-assoziierten Proteine wurde demnach nach potentiellen Virulenzfaktoren gesucht. Die Vorauswahl der Exoproteine für die individuelle Charakterisierung in dieser Arbeit erfolgte anhand der Ergebnisse von mehreren vorangegangenen Proteom-Studien. Auf der Basis dieser Studien wurden mehrere Proteine in einer *in silico* Analyse genauer charakterisiert. Resultierend aus den Ergebnissen eigener Datenbankrecherchen wurden letztlich 12 Proteine von *S. aureus* anhand ihrer Domänenstruktur ausgewählt und in dieser Arbeit genauer charakterisiert. Die Proteine sollten zunächst rekombinant hergestellt und anschließend deren Funktion *in vitro* und *in vivo* genauer untersucht werden.

Eine Zusammenfassung aller für dieses Projekt ausgewählten Proteine ist in Tabelle 21 dargestellt. Dort wurde den einzelnen Proteinen auch eine interne Bezeichnung (P1-P12) gegeben, die im Verlauf der Arbeit zur Vereinfachung beibehalten wird. Neben der vorhergesagten Funktion und der Domänenstruktur, sind in der Tabelle zusätzlich dazu einige allgemeine Eigenschaften der Proteine wie beispielsweise das Molekulargewicht, der isoelektrische Punkt, der Extinktionskoeffizient und die Anzahl der Aminosäuren dargestellt.

Die aus den Proteomstudien erhaltenen Erkenntnisse über die Exoproteom-Komposition von *S. aureus* wurden in einer Liste mit zahlreichen uncharakterisierten Proteinen und Proteinen mit bereits bekannter Funktion zusammengefasst. Aus dieser Sammlung wurden Proteine nach den folgenden Gesichtspunkten ausgewählt: universelles Vorkommen des zugehörigen Gens im Genom von möglichst vielen *S. aureus*-Stämmen, Domänenstruktur und Homologie zu bereits charakterisierten Virulenzfaktoren. Die letztendliche Auswahl erfolgte hauptsächlich nach der *in silico* Analyse der potentiellen Kandidaten mit Hilfe der Datenbanken: KEGG-Datenbank (www.genome.jp/kegg/kegg2.html, 01.10.2015), SMART-*Simple Modular Architecture Research Tool* (<http://smart.embl-heidelberg.de>, 01.10.2015), ESyPred3D Web Server 1.0 (ESyPred3D Web Server 1.0, 01.10.2015), *Aureolist* (<http://genolist.pasteur.fr/AureoList/>, 01.10.2015), *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, 01.10.2015) und PHYRE² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>, 01.10.2015).

Tabelle 21: Übersicht über die ausgewählten Exoproteine mit bislang unbekannter Funktion (Teil 1). Gezeigt ist die putative Domänen-Struktur der ausgewählten Proteine, die anhand der *in silico* Analyse bestimmt wurde. Zudem sind die 100 % identischen Orthologe (Bezeichnungen aus der KEGG-Datenbank), das Molekulargewicht, der isoelektrische Punkt, der Extinktionskoeffizient, die Anzahl der Aminosäuren und die eindeutige Zuordnung der einzelnen Gene bzw. Proteine in verschiedenen Datenbanken dargestellt. *Stand: 01.11.2015

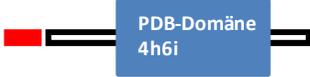
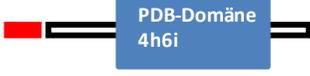
	Kennung in KEGG-Datenbank	Putative Funktion	Orthologe (100%) in <i>S. aureus</i> *	Domänen	Molekulargewicht	Isoelektrischer Punkt	Extinktionskoeffizient	Länge (bp)	Länge (AS)	Zuordnung in Datenbanken	Domänen-Struktur
P1	SACOL1169	Komplement - Inhibitor, Fibrinogen-Bindeprotein	SAAV_1127 USA300HOU_1095 NWMN_1070 SaurJH1_1240 SAHV_1149 SaurJH9_1216 SAOUHSC_01115 SAUSA300_1056 SAS1092 SAV1159 SA1004 MW1041	Signalsequenz (1-22) PDB Domäne (29-114)	12 kDa	8,79	1,11	351	116	NCBI-GI: 57650268 NCBI- GeneID: 3238697 UniProt: Q5HG55	
P 2	SACOL0820	Protein mit LysM – Domäne	USA300HOU_0783 NWMN_0724 SAOUHSC_00773 SAUSA300_0796	Signalsequenz (1-24) LysM Domäne (52-95) CHAP Domäne (164-279)	29 kDa	9,32	1,19	840	279	NCBI-GI: 57650096 NCBI- GeneID: 3237908 UniProt: Q5HHR3	
P 3	SACOL0723	Protein mit LysM – Domäne	SAAV_0627 USA300HOU_0686 NWMN_0634 SaurJH1_0704 SAHV_0662 SaurJH9_0689 SAOUHSC_00671 SAUSA300_0651 SAV0665 SA0620	Signalsequenz (1-16) LysM Domäne (28-71/90-133) CHAP Domäne (146-265)	28 kDa	5,84	1,71	798	265	NCBI-GI: 57651506 NCBI- GeneID: 3236426 UniProt: Q5HI03	
P4	SACOL2557	SsaA-like Protein, Protein mit CHAP- Domäne	SAAV_2610 USA300HOU_2536 NWMN_2443 SaurJH1_2620 SAHV_2528 SaurJH1_2620 SaurJH9_2567 SAOUHSC_02855 SAUSA300_2482 SAS2430	Signalsequenz (1-25) CHAP domain (25-143)	16 kDa	10,09	2,92	432	143	NCBI-GI: 57651054 NCBI- GeneID: 3238208 UniProt: Q5HD07	
P5	SaurJH1_2034 SCIN	Komplement Inhibitor,	USA300HOU_1946 NWMN_1876 SAHV1927 SaurJH9_1999 SAUSA300_1919 SAR2035 SAS1866 SAV1942 MW1884	Signalsequenz (1-17) PDB Domäne (27-113)	12 kDa	8,7	1,16	351	116	NCBI- GI: 150394477 NCBI- GeneID: 5317581 JGI: SaurJH12034 UniProt: A6U347	

Tabelle 22: Übersicht über die ausgewählten Exoproteine mit bislang unbekannter Funktion (Teil 2). Gezeigt ist die putative Domänen-Struktur der ausgewählten Proteine, die anhand der *in silico* Analyse bestimmt wurde. Zudem sind die 100 % identischen Orthologe (Bezeichnungen aus der KEGG-Datenbank), das Molekulargewicht, der isoelektrische Punkt, der Extinktionskoeffizient, die Anzahl der Aminosäuren und die eindeutige Zuordnung der einzelnen Gene bzw. Proteine in verschiedenen Datenbanken dargestellt. *Stand: 01.11.2015

	Kennung in KEGG-Datenbank	Putative Funktion	Orthologe (100%) in <i>S. aureus</i> *	Domänen	Molekulargewicht	Isoelektrischer Punkt	Extinktionskoeffizient	Länge (bp)	Länge (AS)	Zuordnung in Datenbanken	Domänen-Struktur
P6	SACOL1264 (<i>lytN</i>)	Zellwand-Hydrolase	NWMN_1157 SAOUHSC_01219	YSIRK-Signal (15-41) LysM Domäne (176-220) CHAP Domäne (249-378)	44 kDa	9,48	1,35	1152	383	NCBI-GI: 57651816 NCBI- GeneID: 3238356 UniProt: Q5HGI5	
P7	SACOL2661	Hypothetisches Protein	NWMN_2538 SAOUHSC_02973 S SAUSA300_2574	Transmembran-Domäne (4-26) Region mit geringer Komplexität (28-42, 60-93, 107-128)	16 kDa	6,2	2,24	459	152	NCBI-GI: 57652379 NCBI- GeneID: 3237036 UniProt: Q5HCQ8	
P8	SACOL0507	Protein mit LysM-Domäne	SAAV_0407 USA300HOU_0465 NWMN_0429 SaurJH1_0499 SAHV_0462 SaurJH9_0486 SAOUHSC_00427 SAUSA300_0438 SAS0422	LysM Domäne (28-71, 92-135, 159-202) CHAP Domäne (215-334)	35 kDa	9,58	1,81	1005	334	NCBI-GI: 57651346 NCBI- GeneID: 3237082 UniProt: Q5HIL2	
P9	SaurJH9_1996	Protein mit MAP-Domäne	SAAV_2006 SAHV_1923 SAV1938	Signalsequenz (1-21) MAP Domäne (51-138, 160-247, 269-356, 374-461)	54 kDa	9,95	1,3	1431	476	NCBI- GI: 148268413 NCBI- GeneID: 5168416 JGI: SaurJH91996 UniProt: A5IUA7	
P10	SACOL2002	Protein mit MAP-Domäne	USA300HOU_1942 NWMN_1872 SAOUHSC_02161	Signalsequenz (1-17) MAP Domäne (51-138, 162-249, 271-358, 376-463, 481-568, 589-676)	76 kDa	9,38	1,3	2055	684	NCBI-GI: 57650691 NCBI- GeneID: 3238647 UniProt: Q5HEI2	

Tabelle 23: Übersicht über die ausgewählten Exoproteine mit bislang unbekannter Funktion (Teil 3). Gezeigt ist die putative Domänen-Struktur der ausgewählten Proteine, die anhand der *in silico* Analyse bestimmt wurde. Zudem sind die 100 % identischen Orthologe (Bezeichnungen aus der KEGG-Datenbank), das Molekulargewicht, der isoelektrische Punkt, der Extinktionskoeffizient, die Anzahl der Aminosäuren und die eindeutige Zuordnung der einzelnen Gene bzw. Proteine in verschiedenen Datenbanken dargestellt. *Stand: 01.11.2015

	Kennung in KEGG-Datenbank	Putative Funktion	Orthologe (100%) in <i>S. aureus</i> *	Domänen	Molekulargewicht	Isoelektrischer Punkt	Extinktionskoeffizient	Länge (bp)	Länge (AS)	Zuordnung in Datenbanken	Domänen-Struktur
P11	SaurJH1_2565	Putatives Lipoprotein, DUF576	SaurJH9_2513 SAHV_2470 SAV2486 SA2274	Signalsequenz (1-23) DUF576 Domäne (2-258)	31kDa	9,01	0,9	777	258	NCBI-GI: 150395000 NCBI-GenID: 5317387 JGI: SaurJH12565 UniProt: A6U4M0	
P12	SA0016, PurA CRASP7	Adenylsuccinat-Synthetase	SAAV_0019 SaurJH1_0017 SaurJH9_0017 SAR0017 SAAG_00557 C248_0017 CH52_05365 RSAU_000017 SA268_0018 SAI2T2_1000140 SAI3T3_1000140 SAKOR_00017 SAI4T8_1000140 SABB_02138 SA40_0018 SAI1T1_2000140 SA957_0018 SAI7S6_1000140 SAI6T6_1000140 SAI8T7_1000140 SAZ172_0017 SAHV_0017 ECTR2_17 SAPIG0017 SAA6008_00017 HMPREF0772_10451 SAT0131_00019 M013TW_0018 SATW20_00170 SA2981_0017	Adenylsuccinat-Synthetase Domäne (3-422)	47 kDa	5,1	0,9	1284	427	NCBI-GI: 15925722 NCBI-GenID: 1122788 NITE: SA0016 UniProt: P99099	

4.1.2 Überexpression und Aufreinigung der Zielproteine für die spätere funktionelle Charakterisierung

Nach der vorangegangenen *in silico* Analyse und endgültigen Auswahl der zu charakterisierenden Proteine, sollten diese für weitere *in-vitro*-Untersuchungen zunächst rekombinant hergestellt werden. Dabei sollten die optimalen Bedingungen für die Aufreinigung jedes einzelnen Zielproteins evaluiert werden. Die rekombinant hergestellten Proteine wurden im Verlauf dieser Arbeit vor allem für Interaktionsstudien, *in-vivo*-Expressionsanalysen und für die Entwicklung eines Protein-Arrays (*Staph-Toxin-Array*, siehe 3.17) verwendet.

Da der Erfolg bei Überexpression und Aufreinigung von rekombinant hergestellten Proteinen meist vom verwendeten Expressionssystem abhängig ist, wurden in dieser Arbeit mehrere Expressionssysteme parallel genutzt. Dies sollte die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass das Zielprotein in großer Menge löslich innerhalb der Zelle vorliegt und somit affinitätschromatographische Aufreinigung möglich ist. Darüber hinaus wurden unterschiedliche Kultivierungsbedingungen, Medien und *E. coli* Expressionstämme getestet.

In dieser Arbeit wurden für die Expression und die affinitätschromatographische Aufreinigung der Proteine P1-P5, P7-P10 und P12 die optimalen Bedingungen hinsichtlich Temperatur, Medium, Expressionstamm und Pufferzusammensetzung untersucht. In Tabelle 24 sind die optimierten Bedingungen für die Expression und den Aufreinigungsprozess aller Zielproteine zusammenfassend dargestellt.

Alle aufgereinigten Proteine wurden zusätzlich mittels Größenausschlusschromatographie weiter gereinigt, so dass hochreines Protein gewonnen werden konnte. Für alle Proteine, für die sich Probleme in der Stabilität zeigten, wurde eine Thermoflour-Analyse (siehe auch 3.5.11) durchgeführt, um die optimalen Puffer-Bedingungen zu eruieren und die Stabilität der Proteine entscheidend zu verbessern.

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Expressionssysteme IMPACT, HaloTag und His6x-Tag kurz erläutert.

4.1.2.1 IMPACT: Proteinaufreinigung mittels Chitin-Bindedomäne

Das IMPACT- System (*New England Biolabs*, Frankfurt a. Main, Deutschland) (*Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Proteintag*) ist ein Expressionssystem bei dem das Zielprotein als Fusionsprotein zusammen mit einem Intein und einer Chitin-Bindedomäne (CBD) exprimiert wird. Die CBD wird für die affinitätschromatographische Aufreinigung des Zielproteins über Chitin-beschichtetes Säulenmaterial verwendet. Nach der direkten Zugabe eines Thiol-Reagenzes wie z.B. Dithiothreitol (DTT) auf die Säule, vollzieht die Intein-Domäne eine Selbstspaltung analog zum Protein-Spleißen und setzt das unmarkierte Zielprotein frei. Der *Proteintag* selbst hat ein Molekulargewicht von 27 kDa und bleibt nach der Spaltung an das Säulenmaterial gebunden. Es wird ausschließlich das Zielprotein von der Säule eluiert. In Abbildung 5 und Abbildung 6 ist zum einen der für die Expression verwendete Vektor und zum anderen der Aufreinigungsprozess eines mit einer CBD-Domäne markierten Proteins schematisch dargestellt.

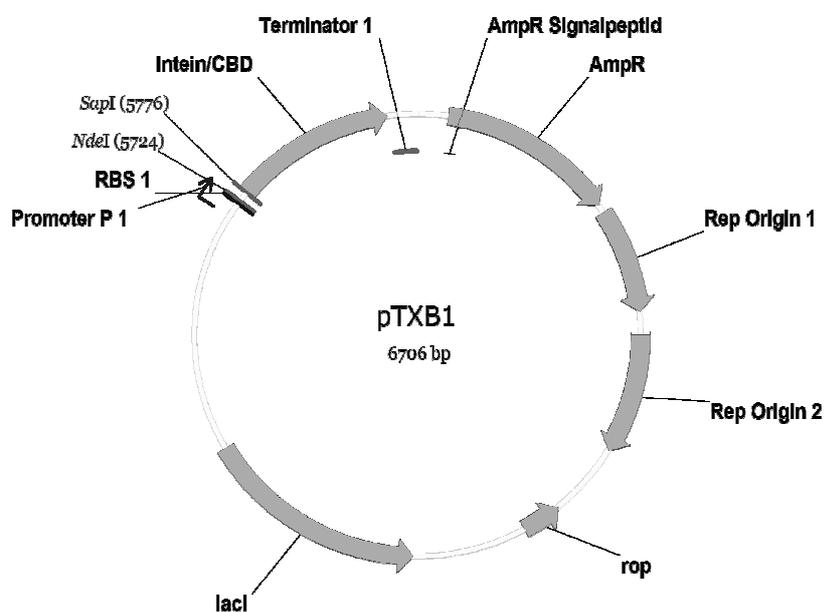


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Vektors pTXB1, der für die Expression der Proteine nach dem IMPACT-System verwendet wurde. Der Vektor codiert für eine Ampicillin-Resistenzkassette (AmpR). Das Zielgen wurde über die Schnittstellen *NdeI* und *SapI* in den Vektor ligiert oder mittels Rekombination eingefügt. Das Zielprotein wird als Fusionsprotein zusammen mit einem C-terminalen Intein und einer CBD exprimiert.

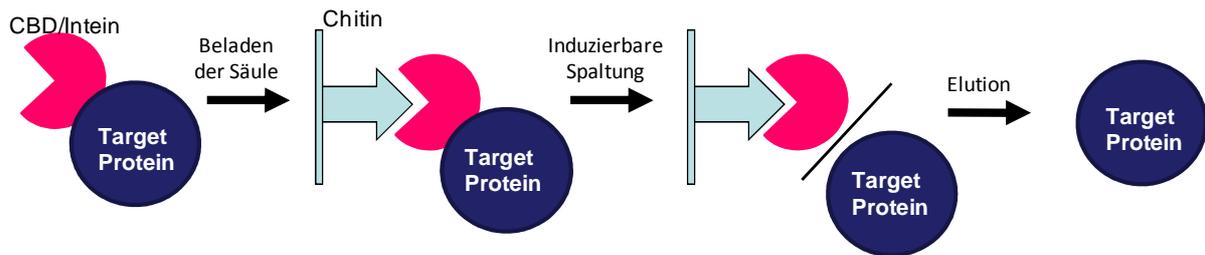


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Aufreinigungssystems: IMPACT (*Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Proteintag*) (NEB, Frankfurt a. Main, Deutschland) Das Targetprotein wird zunächst als Fusionsprotein mit einem Intein und einer Chitin-Bindedomäne (CBD) in *E. coli* überexprimiert. Die CBD bindet letztendlich an Chitin, das zuvor am Säulenmaterial immobilisiert wurde. Nach dem Waschen der Säule wird die Selbstspaltung des Inteins durch Zugabe eines Thiolreagenzes induziert und das Targetprotein ohne Markierung vom *Proteintag* abgespalten. Es kann dadurch im Anschluss von der Säule eluiert werden. Das Intein und die CBD verbleiben auf der Säule.

4.1.2.2 HaloTag: Proteinaufreinigung mittels kovalenter Bindung an das Säulenmaterial

In dieser Arbeit wurden insbesondere schwer lösliche Proteine über ein sogenanntes HaloTag der Fa. Promega (Mannheim, Deutschland) affinitätschromatographisch aufgereinigt (siehe Abbildung 8). Die HaloTag-Technologie basiert auf der Bildung einer kovalenten Bindung zwischen markierten Proteinen und einem an Sepharose *Beads* gekoppelten spezifischen Liganden, der als HaloLink bezeichnet wird. Bei dem *Proteintag* handelt es sich um eine veränderte bakterielle Dehalogenase, die eine hohe Affinität zum HaloLink™ oder anderen Chloralkan-Liganden besitzt. Während der Aufreinigung wird das markierte Protein über den *Proteintag* kovalent an die Säule gebunden und das Zielprotein anschließend mittels TEV-Protease wieder von der Säule abgespalten. *Proteintag* und Protease bleiben dabei am Säulenmaterial kovalent gebunden. Für die Expression von HaloTag Fusionsproteinen wurde der Vektor pFN18A verwendet, wobei die Restriktionsschnittstellen der Enzyme *SgfI* und *PmeI* genutzt wurden (siehe Abbildung 7).

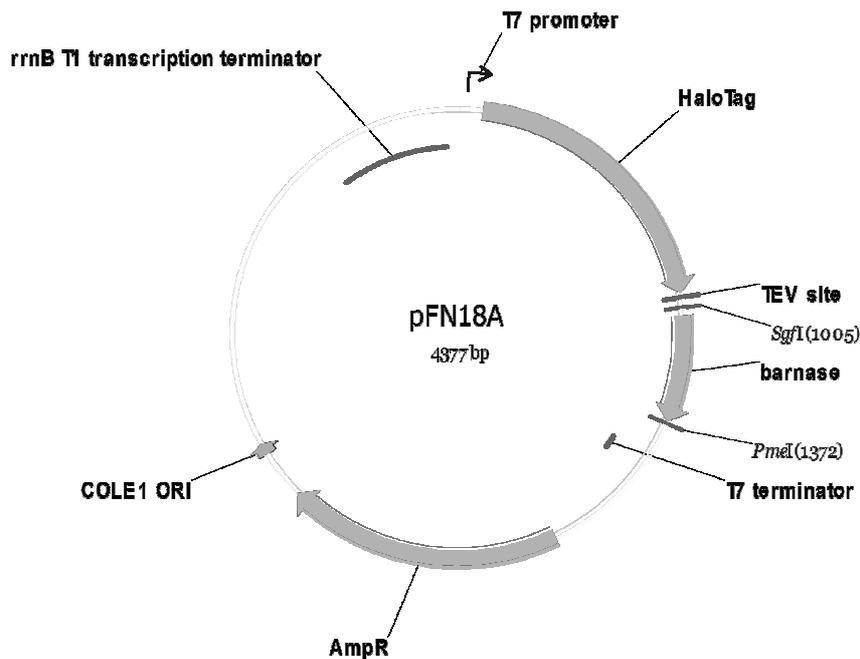


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Vektors pFN18A, der für die Expression von Proteinen mit Halo-*Proteintag* verwendet wurde. Der Vektor codiert für eine Ampicillin-Resistenzkassette (AmpR) und der zur Selektion verwendeten Barnase („Bakterielle RiboNucleASE“), die letal für die Zellen ist, in denen sie exprimiert wird. Durch den Austausch der Barnase mit dem Zielgen wird die letale Wirkung des Leervektors aufgehoben. Über den Vektor kann das Zielprotein als Fusionsprotein mit Halo-*Proteintag* exprimiert werden.

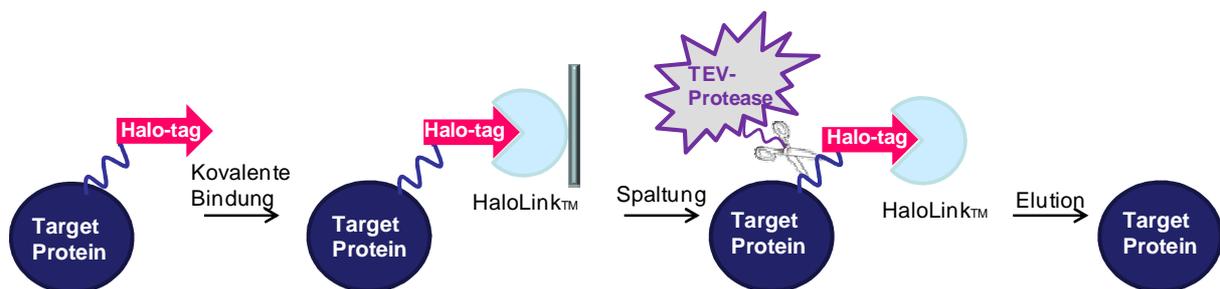


Abbildung 8: Schematische Darstellung des HaloTag® Aufreinigungssystems (Promega, Mannheim, Deutschland). Zunächst wird das Zielprotein als Fusionsprotein mit dem Halo-*Proteintag* exprimiert, anschließend kovalent an das Säulenmaterial HaloLink™ gebunden und das Zielprotein im nächsten Schritt mittels TEV-Protease vom *Proteintag* getrennt. Dadurch kann das Targetprotein ohne zusätzliche Markierung von der Säulenmatrix eluiert werden.

4.1.2.3 His-Tag: Proteinaufreinigung mittels 6x Histidin

Der Polyhistidin-*Proteintag* (His-Tag) besteht aus einer Folge von mindestens 6 Histidinen, die über einen kleinen Linker zusammen mit dem Zielprotein exprimiert werden. Der *Proteintag* bindet über eine Chelat-Komplex-Bindung an zweiwertige Ionen (z.B. Nickel- oder Kobalt-Ionen) mit hoher Affinität, die an einer Säulenmatrix immobilisiert werden. Die Elution der His-markierten Proteine von der Säule erfolgt mit Hilfe einer steigenden Imidazol-Konzentration im Elutionspuffer.

Die Zielgene oder Genfragmente für die rekombinante Expression mittels *His-Tag* wurden mittels der Schnittstellen *Bam*HI und *Nhe*I in den Vektor pET28a+ kloniert und dadurch mit einem N-terminalen *His-Tag* exprimiert (siehe Abbildung 9).

Die Expression und Aufreinigung des Zielproteins P12 (PurA) mittels *His-Tag* wurde wie in [135] durchgeführt.

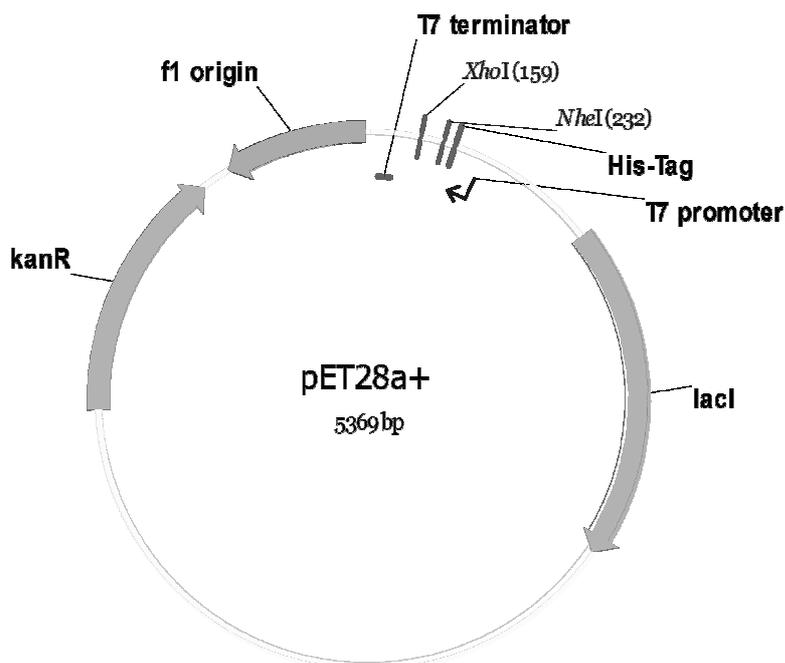


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Vektors pET28a+, der für die Expression der Proteine mittels *His-Tag* verwendet wurde. Der Vektor codiert für eine Kanamycin-Resistenzkassette (*KanR*). Das Zielgen wurde über die Schnittstellen *NheI* und *XhoI* in den Vektor ligiert. Das Zielprotein wird als Fusionsprotein zusammen mit einem N-terminalen *His-Tag* und einer Linkerregion exprimiert.

Ergebnisse

Tabelle 24: Übersicht über aufgereinigte Zielproteine. Die Tabelle zeigt auch die für die Aufreinigung und Expression wichtigen individuellen Parameter der einzelnen Proteine (verwendeter Expressionsstamm, Temperatur, Medium, Art der Induktion und der Puffer, in dem das Protein gelagert wurde).

	Proteintag	<i>E. coli</i>-Stamm	Temperatur	Medium	Induktion	Puffer
P1	Intein/CBD-Tag	BL21	30 °C	LB	0,4 mM IPTG	PBS, 300 mM NaCl, pH 7,5
P2	Halo-Tag	BL21	18 °C	ZYM	Selbstinduktion	PBS, 300 mM NaCl, pH 7,5
P3	Intein/CBD-Tag	BL21	18 °C	LB	0,4 mM IPTG	PBS
P4	Halo-Tag	KRX	18 °C	LB	0,2 % Rhamnose	PBS, 300 mM NaCl, pH 7,5
P5	Intein/CBD-Tag	BL 21	37 °C	LB	0,4 mM IPTG	50 mM Hepes, 500 mM NaCl
P7	Intein/CBD-Tag	Rosetta	18 °C	LB	0,2 mM IPTG	PBS
P8	Halo-Tag	Origami	18 °C	LB	0,4 mM IPTG	Tris-HCl pH 9 150 mM NaCl
P9	Intein/CBD-Tag	Rosetta	18 °C	TB	0,2 mM IPTG	PBS
P10	Halo-Tag	KRX	18 °C	TB	0,2 % Rhamnose	PBS, 300 mM NaCl, pH 7,5
P12	His-Tag Intein/CBD-Tag	BL21 Rosetta	18 °C	LB	1 mM IPTG 0,2 mM IPTG	0,1 M Tris, pH 8,5 0,3 M NaCl

4.1.3 Generierung von Insertionsmutanten zur späteren funktionellen Charakterisierung

Um die Funktion der potentiellen Virulenzfaktoren *in vivo* untersuchen zu können, wurden Insertionsmutanten hergestellt, indem in das für das Zielprotein codierende Gen ein Transposon inseriert wurde.

Die Herstellung der verschiedenen Mutanten für jedes einzelne Protein erfolgte mit Hilfe der NARSA-Library (Medical Center der Universität von Nebraska). Dabei handelt es sich um eine Transposon-Bibliothek, die Mutanten-Stämme für fast alle nicht essentiellen Gene von *S. aureus* enthält. Das dafür verwendete *Mariner-based* Transposon codiert für GFP (*Green fluorescent protein*), einen Replikationsursprung OriV und eine Erythromycin-Resistenzkassette (ErmR), die die Selektion der Klone ermöglicht. Die Struktur des verwendeten Transposons ist zudem in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

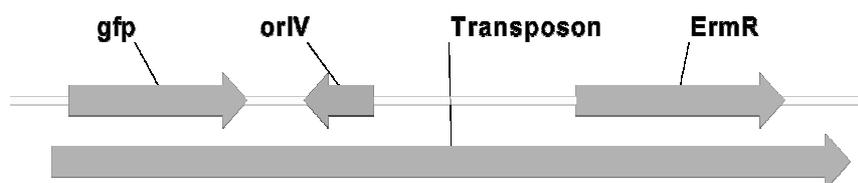


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Transposons, das zur Herstellung der gewünschten Insertionsmutanten verwendet wurde. Das Transposon codiert für eine Erythromycin-Resistenzkassette (ErmR), ein GFP (*Green fluorescent protein*) und ein R6K Replikations-Origin.

Alle in der Transposon-Bibliothek enthaltenen Einzelmutanten sind über die zufällige Integration des Transposons in das Genom von *S. aureus* generiert und die genaue Position des Transposons im Genom durch Sequenzieren ermittelt worden. Aus diesem Grund trägt jeder dieser Stämme eine Erythromycin-Resistenz-Kassette (*ermB*). Für die Herstellung von verschiedenen *S. aureus*-Stämmen mit der jeweiligen Mutation wurden in dieser Arbeit zunächst die verfügbaren Stämme ausgetrichen und die korrekte Insertion des Transposons mittels PCR überprüft. Im nächsten Schritt wurde das Transposon im Genom mit der Hilfe von Bakteriophagen in verschiedene *S. aureus*-Stamm-Hintergründe transduziert, da es sich bei dem Stammhintergrund aus der NARSA-Bibliothek (USA300 JE2) um einen artifiziellen Stamm handelt, dem vor der Herstellung der Bibliothek alle Plasmide gezielt entfernt

wurden. Danach wurde wiederum die korrekte Position des Transposons mittels PCR überprüft.

In Tabelle 25 sind alle aus der Transposon-Bibliothek verwendeten Stämme aufgelistet. Die Mutation der in der nachfolgenden Tabelle zusammengefassten Stämme wurden in dieser Arbeit für die weitere funktionelle Charakterisierung in die Stämme *S. aureus* USA300 LAC*, Newman und HG003 übertragen.

Tabelle 25: Übersicht über die verwendeten NARSA-Stämme

	Ortholog in <i>S. aureus</i> USA300 JE2	NARSA-Klon	Orientierung des Transposons
P1	SAUSA300_1056	NE764	in Leserichtung
P2	SAUSA300_0739	NE1640	gegen Leserichtung
P3	SAUSA300_0651	NE1649	in Leserichtung
P4	SAUSA300_2482	NE1593	gegen Leserichtung
P5	SAUSA300_1919	NE1805	gegen Leserichtung
P8	SAUSA300_0438	NE1688	in Leserichtung
P9/10	SAUSA300_0883	NE111	in Leserichtung
P12	SAUSA300_0017	NE529	gegen Leserichtung

4.1.4 Funktionelle Charakterisierung der Zielproteine

Die zuvor rekombinant in *E. coli* hergestellten Proteine und die mittels Transposon-Mutantenbibliothek gewonnenen Insertionsmutanten wurden hinsichtlich ihrer Funktion untersucht. Dabei wurden zunächst die phänotypischen Eigenschaften der Insertionsmutanten wie *in-vitro*-Wachstum und Hämolyse-Aktivität, und deren Virulenzpotential untersucht. Die rekombinant hergestellten Proteine wurden beispielweise verwendet, um die Expression *in vivo* und die Bindung der Proteine an Komponenten der extrazellulären Matrix zu untersuchen.

Im Folgenden wird die Charakterisierung der Proteine P1-P10 (siehe Tabelle 21-

Tabelle 23) und der zugehörigen Mutanten beschrieben. Die Untersuchungen zur Charakterisierung von P12 (PurA) folgen in einem separaten Abschnitt (siehe 4.3.).

4.1.4.1 Phänotypische Charakterisierung der Insertionsmutanten

Für die phänotypischen Untersuchungen wurden die zuvor mit Hilfe der NARSA-Stammsammlung erstellten Insertionsmutanten (siehe Tabelle 25) verwendet. In einem ersten Ansatz wurde das Wachstum der jeweiligen Mutanten *in vitro* untersucht.

Dazu wurden die jeweiligen Mutanten in den Stammhintergründen *S. aureus* USA300 LAC*, HG003 und Newman jeweils in B- bzw. TSB-Medium inkubiert, die optische Dichte der Kultur im Abstand von 30 min ermittelt und das Wachstum mit dem entsprechenden wildtypischen Stamm verglichen. Die Kultivierung und die Bestimmung der optischen Dichte wurden mit Hilfe eines TECAN Mikrotiterplatten-Lesegeräts durchgeführt.

Unter den gewählten Kulturbedingungen (37 °C, 24 h) konnten zwischen Mutanten und wildtypischem Stamm keine signifikanten Unterschiede im Wachstum beobachtet werden. Alle untersuchten Kulturen erreichten in B-Medium im Anschluss an die logarithmische Wachstumsphase nach etwa 9-10 h die stationäre Phase bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,9.

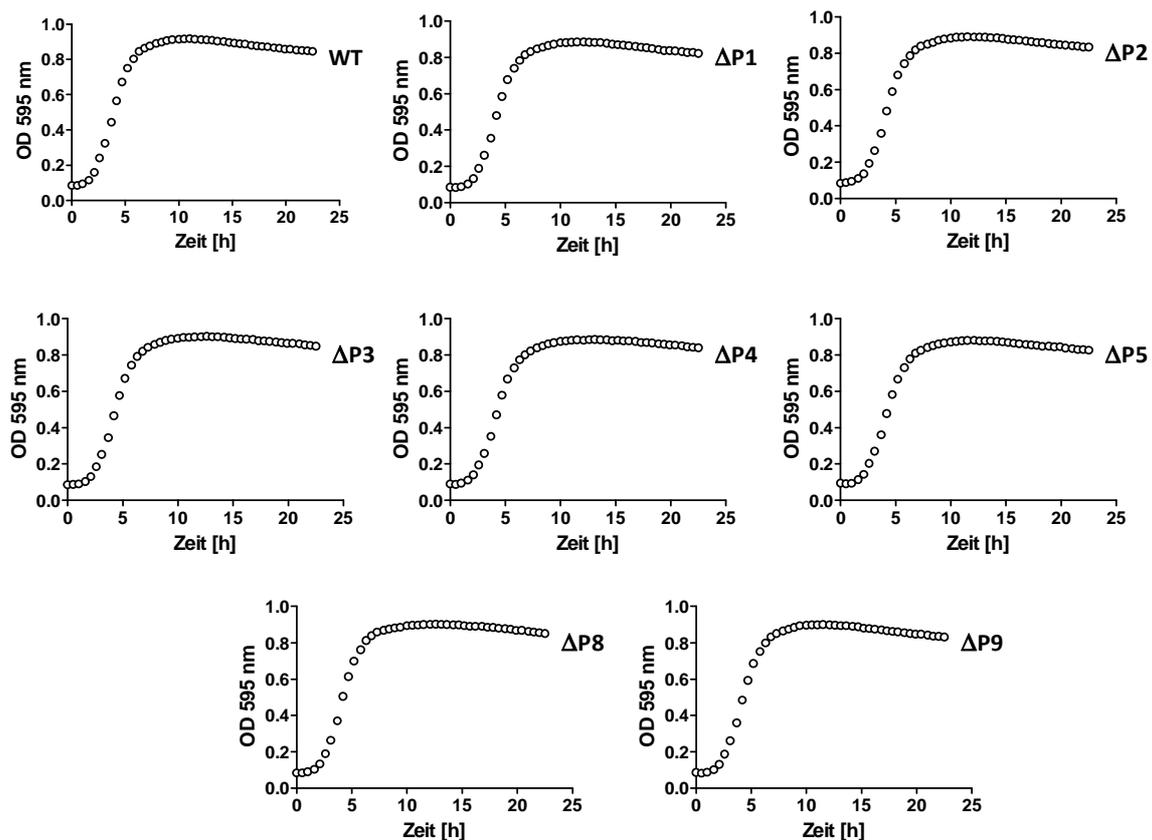


Abbildung 11: Wachstum von *S. aureus* USA300 LAC* und den entsprechenden Mutanten $\Delta P1$, $\Delta P2$, $\Delta P3$, $\Delta P4$, $\Delta P5$, $\Delta P8$ und $\Delta P9$ in B-Medium bei 37 °C. Das Wachstum wurde über einen Zeitraum von 24 h über die optische Dichte (OD₆₀₀) der Kultur bestimmt. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Wachstum beobachtet werden.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das jeweilige Zielprotein keinen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum und den Metabolismus unter *in-vitro*-Bedingungen nimmt. Alle möglicherweise durch die Deletion entstandenen Effekte können unter Kulturbedingungen von den Bakterien kompensiert werden. Exemplarisch dafür sind in Abbildung 11 die Wachstumskurven von *S. aureus* USA300 LAC* und den zugehörigen Mutanten in B-Medium gezeigt.

Zur detaillierteren Charakterisierung der Insertionsmutanten wurden einige phänotypische Untersuchungen auf verschiedenen Test-Agarplatten durchgeführt. Darunter ein Test auf die Hämolyse-Aktivität der mit Hilfe von Schafblut-Agarplatten durchgeführt wurde. Die Bakterien sekretieren normalerweise Toxine, die die im Agar enthaltenen Erythrozyten lysieren. Die Größe des durch Lyse entstehenden klaren Hofes um die Kolonie ist ein Maß für die Hämolyse-Aktivität. Hierbei konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Mutantenstämmen und dem jeweiligen Wildtyp beobachtet werden. Die getesteten Mutanten bildeten in Anhängigkeit vom jeweiligen Stammhintergrund einen sphärischen Hof

mit einem Durchmesser von 5-8 mm. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 12 zusammenfassend für verschiedene *S. aureus*-Stammhintergründe dargestellt.

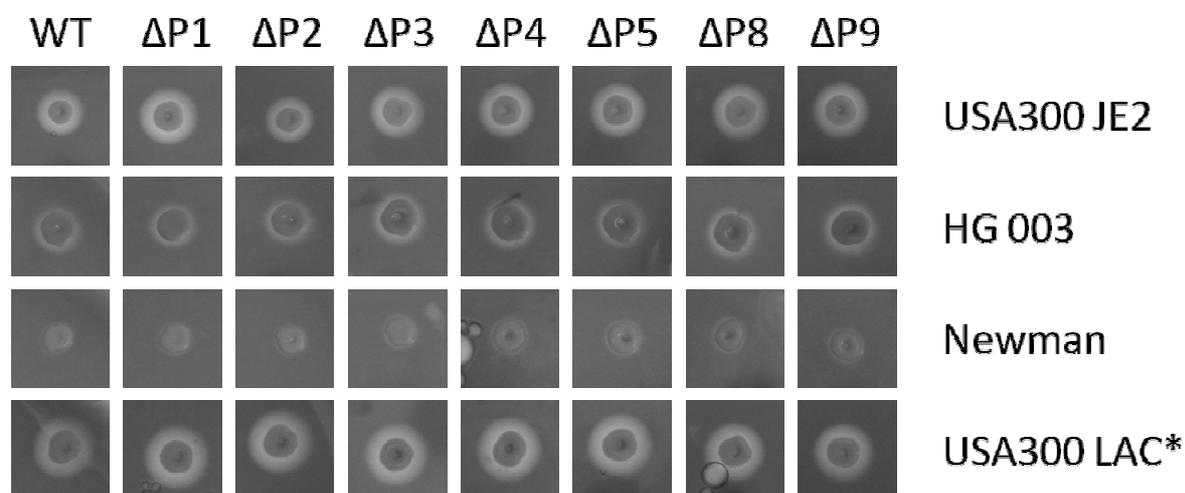


Abbildung 12: Hämolyse-Eigenschaften von *S. aureus* USA300 JE2, HG003, Newman, USA300 LAC* und den isogenen Mutanten $\Delta P1$ - $\Delta P9$. Einzelkolonie auf Blutagarplatten mit 5 % Schafblut nach 12-stündiger Inkubation bei 37 °C.

Neben dem *in-vitro*-Wachstum und der Hämolyse-Aktivität wurden Untersuchungen zur Serin- und Cystein-Protease Aktivität mit Hilfe von Casein- und Gelatine-haltigen Platten durchgeführt. In weiteren Ansätzen wurden außerdem die Fähigkeit zur Sekretion von DNasen und die Verwertung von Mannit, als Indikator für einen intakten Kohlenhydrat-Metabolismus, evaluiert. Bei keinem der hier verwendeten phänotypischen Tests konnte ein Unterschied zwischen dem wildtypischen Stamm und einer der Insertionsmutanten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse aus den zuvor beschriebenen phänotypischen Assays lassen vermuten, dass die hier untersuchten Zielproteine keinen oder nur einen untergeordneten Einfluss auf die Sekretion von Toxinen, Proteasen oder DNasen haben. Zudem konnte kein Stoffwechseldefekt festgestellt werden.

Zusätzlich zu den zuvor genannten Experimenten zum Phänotyp der Insertionsmutanten wurde die Fähigkeit zur Bildung von Biofilmen in Anwesenheit von hohen Magnesium-Konzentrationen genauer untersucht. [134] Dazu wurden 2 μ l einer Zellsuspension auf TSBMg-Agarplatten aufgetragen. Diese wurden anschließend für mehrere Tage inkubiert, um die Bildung von Makrokolonien zu provozieren. Die jeweiligen Kolonien erreichten einen Durchmesser von ca. 1 cm. Zudem waren sie deutlich gelb gefärbt und bildeten eine

dreidimensionale Struktur aus. Die Morphologie aller getesteten Stämme war dabei vergleichbar. Die Ergebnisse aus diesem Versuch sind in Abbildung 13 dargestellt.

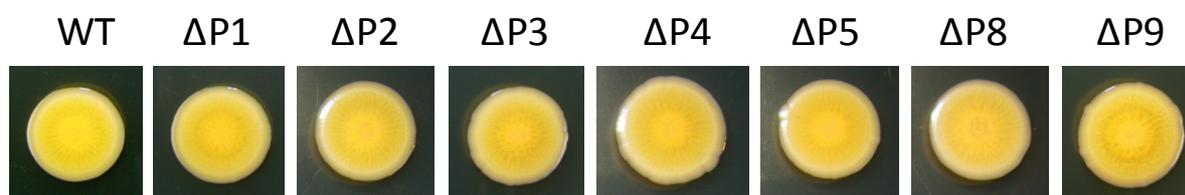


Abbildung 13: Makrokolonie-Bildung von *S. aureus* USA 300 JE2 und den isogenen Mutanten $\Delta P1$ - $\Delta P9$. Einzelkolonien nach 5-tägiger Inkubation auf TSBMg-Agarplatten bei 37 °C.

Da die Bildung von Makrokolonien ein Maß für die Fähigkeit zur Biofilm-Bildung darstellt, konnte sowohl im wildtypischen Stamm als auch in allen verfügbaren Mutanten ein vergleichbares Potential zur Biofilm-Bildung beobachtet werden. Demzufolge scheint sich keine der Mutationen negativ auf die Bildung eines Biofilms auszuwirken.

4.1.4.2 Virulenz im alternativen Tiermodell *Galleria mellonella*

Das Virulenzpotential der einzelnen Insertionsmutanten wurde zunächst im alternativen Tiermodell *Galleria mellonella* untersucht. In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass *Galleria mellonella* als Modellsystem geeignet ist, um die Virulenz verschiedener Pathogene (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *S. aureus*) zu untersuchen. [136–138] Dazu wurde eine definierte Menge an Bakterien in das letzte Beinsegment der Larven appliziert und das Überleben über 50 Stunden dokumentiert. Es wurden wiederum die Stämme *S. aureus* USA300 LAC*, Newman und HG0003 zusammen mit den entsprechenden Mutanten der Proteine P1-P9 verwendet (siehe Tabelle 25).

In Abbildung 14 ist exemplarisch das Überleben der Mottenlarven dargestellt, die mit 5×10^6 *S. aureus* USA300 LAC* oder den zugehörigen Mutanten $\Delta P1$ - $\Delta P9$ (Stammhintergrund USA300 LAC*) infiziert wurden. Es ließ sich hier kein signifikanter Unterschied im Überleben der Larven beobachten, d.h. dass keine der getesteten Mutanten in diesem Tiermodell in der Virulenz deutlich attenuiert ist. Zusätzlich dazu wurden ähnliche Ansätze im *S. aureus* Newman (5×10^6 CFU/Motte) und HG003 (1×10^7 CFU/Motte) Stammhintergrund durchgeführt. Auch hier konnte kein Unterschied im Überleben der Motten festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

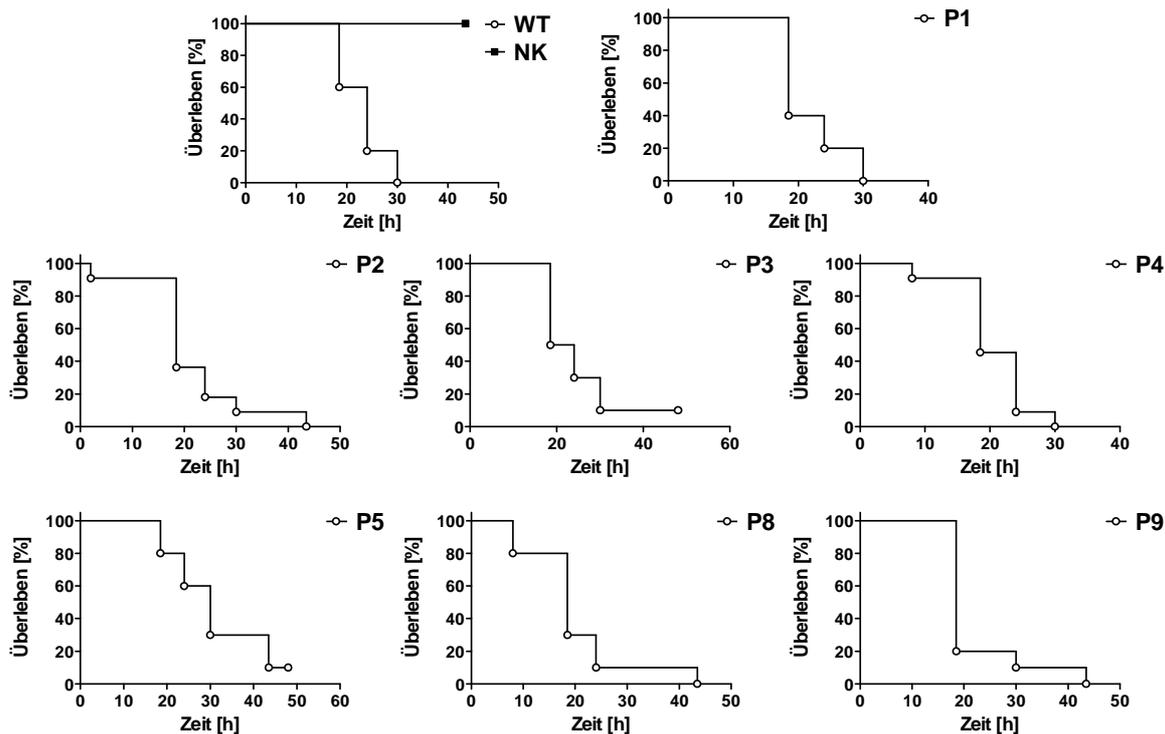


Abbildung 14: Virulenz von *S. aureus* USA300 LAC* (WT) und den isogenen Mutanten $\Delta P1$ - $\Delta P9$ in *Galleria mellonella* Larven. Kaplan-Meier Überlebenskurven von *S. aureus* USA300 LAC* WT und $\Delta P1$ - $\Delta P9$. Es gibt keinen signifikanten Unterschied im Überleben zwischen den einzelnen Mutanten und dem Wildtyp in diesem Tiermodell.

4.1.4.3 *In-vitro*-Expression

Einen ersten Hinweis auf die Relevanz von Proteinen für das Überleben *in vitro* lieferten Expressionsstudien. Dabei war es zunächst von Bedeutung, ob die Gene für die ausgewählten, bislang funktionell uncharakterisierten Proteine *in vitro* unter den gewählten Kulturbedingungen exprimiert werden. Daher wurde mit Hilfe von semiquantitativer RT-PCR (siehe Abschnitt 3.4.2) die *in vitro* mRNA-Expression analysiert. Dazu wurde aus drei verschiedenen *S. aureus* Kulturen (COL, N315, NewHG) RNA während der spätlogarithmischen Wachstumsphase isoliert, in cDNA umgeschrieben und als *template* für eine semiquantitative RT-PCR eingesetzt.

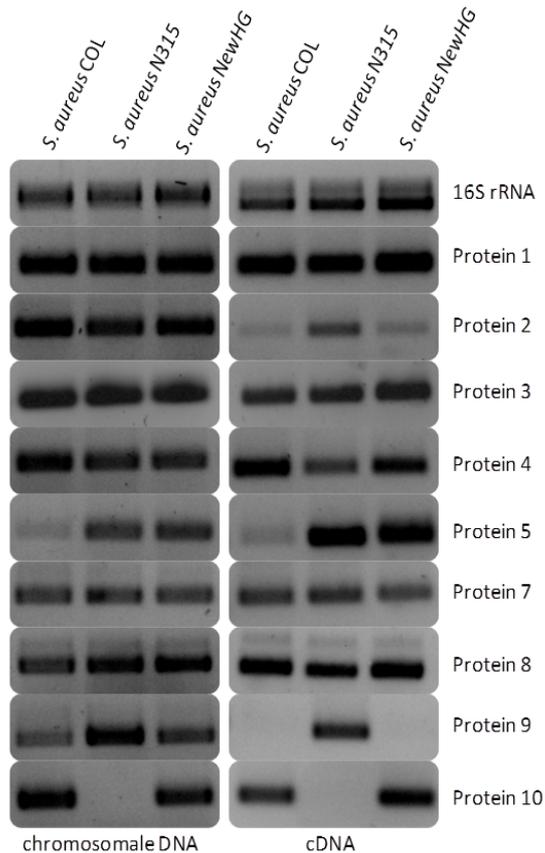


Abbildung 15: *In-vitro*-Expression der Gene für die ausgewählten Proteine P1-P10. Semiquantitative Reverse-Transkriptase PCR mit RNA aus den Stämmen *S. aureus* COL, N315 und NewHG, die während der spätlogarithmischen Wachstumsphase isoliert wurde. Alle Gene werden unter den gewählten Kulturbedingungen stammspezifisch *in vitro* exprimiert (siehe rechts: cDNA). Als Kontrolle für die Spezifität der Primer wurde zusätzlich eine PCR auf Basis von chromosomaler DNA der einzelnen Stämme durchgeführt (links: chromosomale DNA).

Um falsch-negative Ergebnisse durch stammspezifische Sequenz-Unterschiede auszuschließen, wurde RNA aus unterschiedlichen *S. aureus*-Stämmen gewonnen. Zudem wurde chromosomale DNA als *template* in einer separaten PCR-Reaktion eingesetzt. Aufgrund der hohen genetischen Varianz zwischen unterschiedlichen *S. aureus*-Stämmen, war dieser Schritt notwendig, um die Spezifität der *Primer* in den unterschiedlichen Stämmen zu überprüfen. Das Ergebnis dieser Kontroll-PCR ist in Abbildung 15 dargestellt.

Für die Expressionsanalyse wurde die 16S rRNA als Kontrolle gewählt. Anhand dieser wurde die eingesetzte RNA-Menge verglichen.

Wie in Abbildung 15 zu erkennen, wurde jedes der Proteine in mindestens einem der getesteten Stämme während der spätlogarithmischen Wachstumsphase exprimiert. Allerdings wird Protein 2 und Protein 9 in den Stämmen *S. aureus* Col und NewHG unter den gewählten Kulturbedingungen im Vergleich zu *S. aureus* N315 deutlich schwächer bzw. nicht exprimiert.

Dieses Ergebnis zeigt zusammengefasst eine stammspezifische *in-vitro*-Expression der untersuchten Gene.

4.1.4.4 *In-vivo*-Expression

Neben der Expression der Gene unter *in-vitro*-Bedingungen, wurde in einem zweiten Schritt analysiert, ob die Expression der Proteine P1-P10 auch unter *in-vivo*-Bedingungen erfolgt.

Einen Hinweis auf die Expression *in vivo* während der Kolonisierung bzw. Infektion liefern Antikörper im Serum eines Organismus mit bereits bestehendem immunologischen Gedächtnis. Werden spezifische Antikörper gegen ein Protein im Serum gefunden, bedeutet dies, dass das entsprechende Protein bereits *in vivo* exprimiert worden sein muss, da sonst eine Immunantwort und damit die Bildung von spezifischen Antikörpern gegen das Zielprotein nicht möglich wäre.

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die spezifischen Antikörper im Serum von infizierten Mäusen, gesunden humanen Spendern (Serum A-E) und dem IVIg Medikament Gamunex® (Grifols Deutschland GmbH, Frankfurt) mittels Western Blot analysiert.

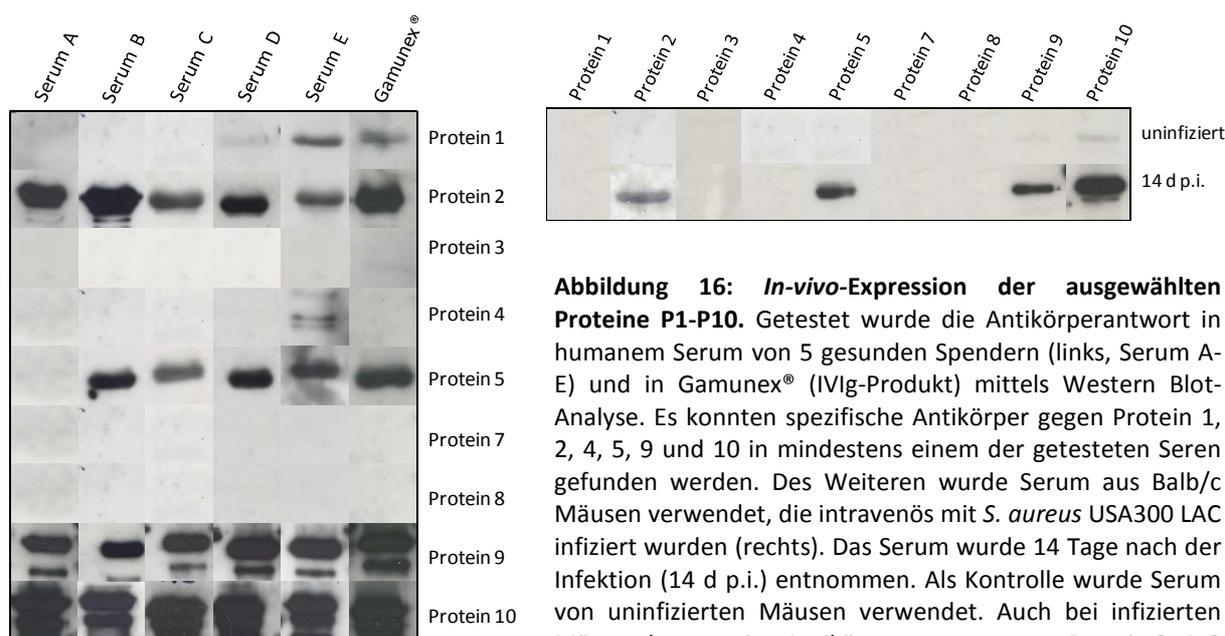


Abbildung 16: *In-vivo*-Expression der ausgewählten Proteine P1-P10. Getestet wurde die Antikörperantwort in humanem Serum von 5 gesunden Spendern (links, Serum A-E) und in Gamunex® (IVIg-Produkt) mittels Western Blot-Analyse. Es konnten spezifische Antikörper gegen Protein 1, 2, 4, 5, 9 und 10 in mindestens einem der getesteten Seren gefunden werden. Des Weiteren wurde Serum aus Balb/c Mäusen verwendet, die intravenös mit *S. aureus* USA300 LAC infiziert wurden (rechts). Das Serum wurde 14 Tage nach der Infektion (14 d p.i.) entnommen. Als Kontrolle wurde Serum von uninfizierten Mäusen verwendet. Auch bei infizierten Mäusen konnte eine Antikörperantwort gegen Protein 2, 4, 9 und 10 detektiert werden.

Wie in Abbildung 16 dargestellt, konnten spezifische Antikörper gegen die Proteine P1, P2, P4, P5, P9 und P10 in den getesteten Seren gefunden werden. Dabei wurde eine Antikörperantwort gegen die Proteine P2, P5, P9 und P10 in fast allen Seren detektiert. Die spezifische Antikörperantwort gegen P1 und P4 war dabei auf einige wenige humane Seren beschränkt. Dies spricht für eine Expression der Proteine P1, P2, P4, P5, P9 und P10 *in vivo*.

Demzufolge könnten diese womöglich auch eine Funktion während der Kolonisierung oder Infektion übernehmen.

Des Weiteren wurden murine Seren verwendet und auf spezifische Antikörper in einer Western Blot Analyse untersucht. Die verwendeten Seren, wurden aus Mäusen gewonnen, die 14 Tage zuvor mit einer sublethalen Dosis von *S. aureus* USA300 LAC intravenös infiziert wurden. Analog zur Analyse der humanen Seren (s.o.) konnten auch hier Antikörper gegen die Proteine P2, P5, P9 und P10 gefunden werden. Dies zeigt die Expression dieser Proteine im verwendeten Mausmodell. Die ähnlichen Antikörperrepertoires von Mensch und Maus sprechen für eine vergleichbare Immunantwort bzw. für eine vergleichbare Immunogenität der Antigene in beiden Organismen.

4.1.4.5 Bindung von Fibronektin und andere Komponenten der Extrazellulären Matrix

Da für die Kolonisierung und Infektion eines Wirtes die Adhäsion an typische Matrixproteine wie beispielsweise Fibronektin von entscheidender Bedeutung ist, wurde in dieser Arbeit die Bindung der zu charakterisierenden Proteine an Komponenten der extrazellulären Matrix untersucht.

Aufgrund der vorangegangenen *in silico* Analyse, gab es Hinweise auf eine mögliche Beteiligung einiger Zielproteine an der Adhärenz von *S. aureus* an Oberflächenstrukturen. Hier wurde nun die Bindung an die extrazelluläre Matrix und an Fibronektin untersucht, das ebenfalls die Bindung der Bakterien an Zellen vermitteln kann.

Für diese Analyse wurden die aufgereinigten Proteine P1-P10 an eine Kunststoffoberfläche immobilisiert. Anschließend wurden diese mit Fibronektin inkubiert und schließlich das gebundene Fibronektin mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Wie in Abbildung 17 (links) gezeigt, weisen die Proteine 2 und 10 eine starke Bindung an Fibronektin auf. Darüber hinaus konnte eine leicht schwächere Interaktion für die Proteine P4 und P9 gezeigt werden.

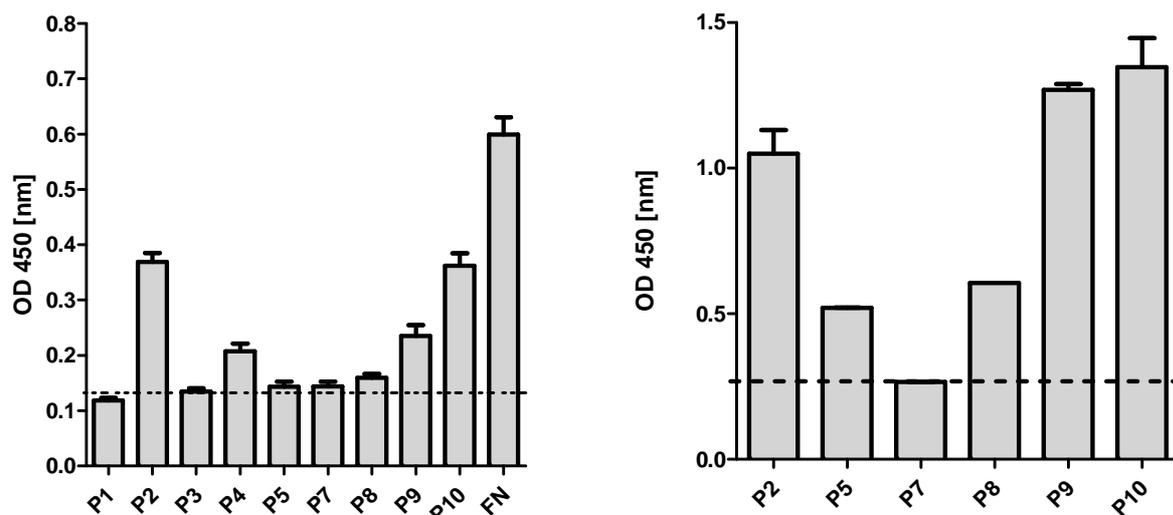


Abbildung 17: Adhäsion der Proteine P1-P10 an Fibronectin (FN) und der Proteine P2, P5 und P7-P10 an Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) Gezeigt ist die Bindung von 800 ng FN (links) an die Zielproteine in einem ELISA-basierten Ansatz. Beide Interaktionspartner wurden miteinander inkubiert und die Bindung von FN mit einem α -FN Antikörper detektiert. Dabei wurde deutlich, dass P2 und P10 an FN binden. Bei der Kontrolle (FN) wurde 800 ng reines FN immobilisiert und detektiert. Des Weiteren konnte eine starke Bindung der Proteine P2, P9 und P10 und eine schwache Bindung der Proteine P5 und P8 an Matrigel (rechts) gezeigt werden. Dazu wurden die Zielproteine mit Matrigel inkubiert und gebundenes Protein mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Die gestrichelte Linie stellt die Basislinie dar, die anhand der Negativkontrollen festgelegt wurde. Dargestellt ist der Mittelwert mit zugehörigem Standardfehler aus $n=9$ (links) und $n=3$ (rechts).

Neben der Bindung an Fibronectin wurde die Interaktion der Proteine mit anderen Komponenten der extrazellulären Matrix untersucht. Dazu wurde Matrigel (BD Biosciences, San Jose, USA), das hauptsächlich Laminin, Kollagen IV und Entactin enthält, an eine Kunststoffoberfläche immobilisiert und mit unterschiedlichen Mengen Zielprotein inkubiert. Anschließend wurde die Menge an gebundenem Protein mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gemessen. Für diesen Teilversuch konnten nur die Proteine P2, P5, P7, P8, P9 und P10 verwendet werden, da für die restlichen Kandidaten kein spezifischer Antikörper verfügbar war.

Die Untersuchungen ergaben, dass Protein P2, P9 und P10 an Komponenten im Matrigel binden (siehe Abbildung 17, rechts). Des Weiteren konnte eine schwache Bindung von P5 und P8 beobachtet werden. Das Adhärenzverhalten der Proteine P2, P9 und P10 sowohl an Fibronectin als auch an Matrigel, könnte darauf hindeuten, dass diese Proteine *in vivo* ebenfalls an Strukturen der extrazellulären Matrix binden.

4.1.4.6 Adhäsion und Invasion in eukaryotische Zellen

Die Fähigkeit zur Adhäsion an und Invasion in humane Epithelzellen hängt von Oberflächen-assoziierten Proteinen (MSCRAMMs) ab, die Komponenten der extrazellulären Matrix bzw. Oberflächenproteine von Wirtszellen erkennen und binden. Dadurch wird die Adhäsion an die Zielzellen bzw. die Invasion in diese Zellen vermittelt. Dieser Mechanismus ist für *S. aureus* während der Kolonisierung und Infektion des Wirtes von entscheidender Bedeutung.

Um zu analysieren, ob die Proteine P1-P9 für die Vermittlung von Adhärenz und Invasion von essentieller Bedeutung sind, wurden sowohl Adhäsion als auch Invasion in humane Epithelzellen A549 separat voneinander mit Hilfe der zuvor hergestellten Insertionsmutanten $\Delta P1$ - $\Delta P9$ (siehe 4.1.3) untersucht.

Um die Adhäsionsfähigkeit der Insertionsmutanten zu bemessen, wurden die humanen Lungenepithelzellen A549 in Mikrotiterplatten mit 24 Kavitäten in serumfreien RPMI-Medium ausgesät und am Folgetag jeweils mit den verschiedenen Bakterien-Stämmen (MOI 20) ko-kultiviert. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden die nicht adhärennten Bakterien durch Waschen der Zellen entfernt, die Zellen enzymatisch abgelöst und lysiert. Anschließend wurden die Lysate in unterschiedlichen Verdünnungen ausplattiert, um die Anzahl der darin enthaltenen koloniebildenden Einheiten zu bestimmen (siehe Methoden 3.9). In Abbildung 18 ist die Anzahl der adhärennten Bakterien von *S. aureus* USA300 LAC* (WT) und den entsprechenden Insertionsmutanten $\Delta P1$ - $\Delta P9$ dargestellt. Sowohl bei den wildtypischen Bakterien als auch den $\Delta P1$ - $\Delta P9$ defizienten Stämmen können im Mittel ca. 3×10^5 Bakterien innerhalb einer Stunde an 1×10^5 Zellen binden, was ca. 5 % des Inokulums entspricht. Anhand dieser Ergebnisse konnte kein signifikanter Unterschied in der Adhäsion der Bakterien an eukaryotische Zellen festgestellt werden.

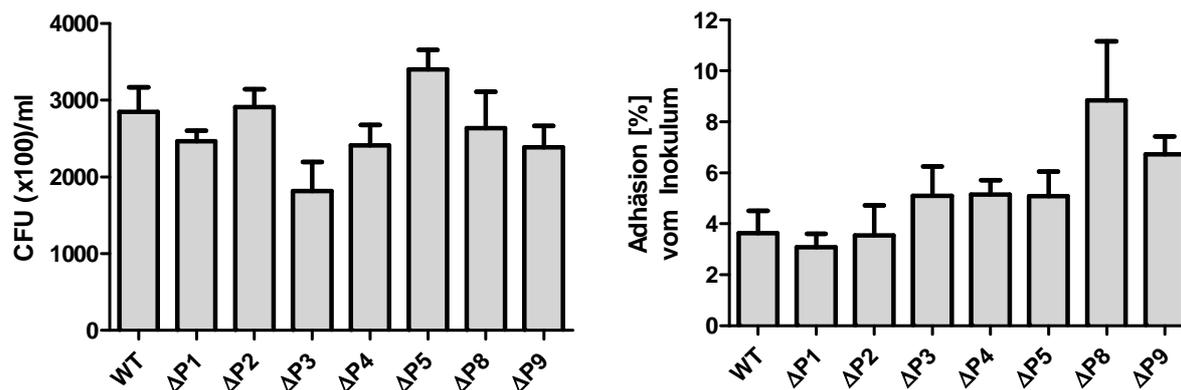


Abbildung 18: Adhäsion von *S. aureus* USA300 LAC* und den isogenen Mutanten ΔP1-ΔP9 an eukaryotische Epithelzellen (A549). A549 Zellen wurden für 1 h mit *S. aureus* ko-kultiviert (MOI20), ungebundene Bakterien entfernt, die Zellen lysiert und das Zelllysate ausplattiert, um die koloniebildenden Einheiten (CFU) zu bestimmen. Innerhalb von 1 h konnten ca. 3×10^5 Bakterien ($\pm 5\%$ des Inokulums) an die Zellen adhären. Zwischen den einzelnen Stämmen ist kein signifikanter Unterschied im Adhärenzverhalten vorhanden. Dargestellt ist die Anzahl der adhärenen Bakterien in CFU/ml (links) und der prozentuale Anteil der adhärenen Bakterien vom ursprünglichen Inokulum (rechts). Nach statistischer Analyse mittels *One-way* ANOVA sind die Ergebnisse nicht signifikant. Dargestellt ist der Mittelwert mit dem zugehörigen Standardfehler aus $n=9$.

Analog zu dem oben beschriebenen Versuchsaufbau wurden darüber hinaus zwei weitere Stammhintergründe (*S. aureus* Newman und HG003) getestet. Auch hier wurde kein Unterschied in der Adhärenz der Bakterienstämme an eukaryotische Zellen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Neben der Untersuchung der Adhäsion wurde die Fähigkeit zur Invasion in eukaryotische Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben ausgesät und mit einer MOI 20 in serumhaltigem RPMI für 2 h ko-kultiviert. Anschließend wurden die adhärenen extrazellulären Bakterien mit Gentamicin und Lysostaphin abgetötet, die Zellen lysiert und serielle Verdünnungen der in den Zelllysaten enthaltenen Bakterien ausplattiert, um die koloniebildenden Einheiten zu bestimmen (siehe Methoden 3.9).

In Abbildung 19 ist die Anzahl der invadierten Bakterien von *S. aureus* USA 300 LAC* und den zugehörigen Mutanten ΔP1-ΔP9 dargestellt. Innerhalb der Infektionsdauer von 2 h konnten $4-7 \times 10^5$ Bakterien in die Zellen invadieren. Dies entspricht 5-10 % des ursprünglichen Inokulums. Wie bei der Analyse der Adhäsionsfähigkeit wurde auch bei der Analyse der Invasionsfähigkeit kein signifikanter Unterschied zwischen den getesteten Stämmen beobachtet. Die Versuche wurden ebenfalls in zwei weiteren Stammhintergründen

(*S. aureus* Newman und HG003) durchgeführt, wobei auch hier keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden konnten (Daten nicht gezeigt).

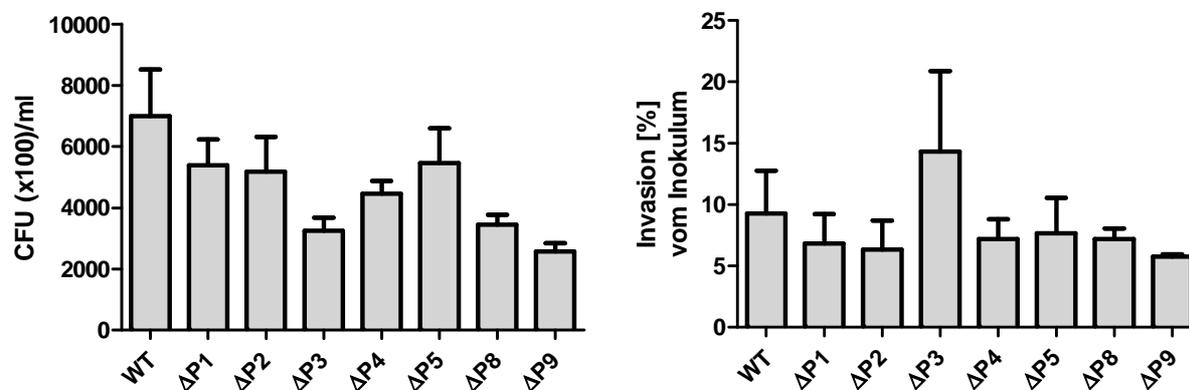


Abbildung 19: Invasion von *S. aureus* USA300 LAC* und den isogenen Mutanten $\Delta P1$ - $\Delta P9$ in eukaryotische Epithelzellen (A549). A549 Zellen wurden für 2 h mit *S. aureus* ko-kultiviert (MOI20), extrazelluläre Bakterien abgetötet, die Zellen lysiert und die im Zelllysat enthaltenen Bakterien ausplattiert, um die koloniebildenden Einheiten zu bestimmen. Innerhalb von 2 h konnten ca. $4\text{-}7 \times 10^5$ Bakterien ($\approx 5\text{-}10\%$ des Inokulums) in die Zellen invadieren. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen untersuchten Stämmen zu erkennen. Dargestellt ist die Anzahl der invasiven Bakterien in CFU/ml (links) und der prozentuale Anteil der invadierten Bakterien vom ursprünglichen Inokulum (rechts). Die statistische Signifikanz wurde mittels *One-way ANOVA* analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit dem zugehörigen Standardfehler aus $n=9$.

Wie die Ergebnisse dieser Analyse zeigen, hat keine der in diesem Abschnitt untersuchten Deletionen einen Einfluss auf die Adhäsion bzw. Invasion von *S. aureus* in eukaryotische Zellen. Die Proteine P1-P9 sind demnach nicht funktional an der Adhärenz oder Invasion in eukaryotische Zellen beteiligt.

4.1.4.7 Analyse der Komplement-inhibierenden Eigenschaften

Neben der Interaktion der Proteine P1-P10 mit Oberflächenstrukturen von Zellen, wurde zudem der Einfluss dieser Zielproteine auf das humane Komplementsystem untersucht. Dazu wurden die rekombinant hergestellten Proteine zusammen mit humanem Serum (NHS) und Kaninchen-Erythrozyten inkubiert und die Calcium-unabhängige Aktivierung des Komplementsystems über den alternativen Weg evaluiert. Als Maß dafür diente die Lyse von Erythrozyten in Anwesenheit von NHS, die über die Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 414 nm bestimmt wurde. Verhindert das zugegebene Protein den Ablauf der Komplement-Kaskade, so wird die Lyse der Erythrozyten verhindert. Diese Versuche

wurden am Hans-Knöll-Institut für Naturstoffforschung und Infektionsbiologie in Jena von Dr. Sascha Böhm (AG Peter Zipfel) durchgeführt.

Die Endkonzentration der isolierten Proteine P1-P10 betrug in einer ersten Analyse in allen Reaktionsansätzen 1 μM . Wie in Abbildung 20 dargestellt, führt die Inkubation der Erythrozyten mit den Proteinen P1 und P5 zu einer starken Inhibition des Komplementsystems. Die Lyse der Erythrozyten durch das Komplementsystem konnte dadurch fast vollständig inhibiert werden. Die Proteine P2-P4 und P7-10 führten hingegen nicht zu einer Verminderung der Lyse der Erythrozyten und nehmen somit keinen Einfluss auf die Komplement-Aktivierung.

Aufgrund des beobachteten starken inhibitorischen Effekts der Proteine P1 und P5 bei 1 μM wurde mit diesen Proteinen nochmals eine konzentrationsabhängige Bestimmung von 0,125 μM – 1 μM durchgeführt. Wie in Abbildung 20 zu erkennen, führt die Zugabe 0,5 μM P1 sowie 0,25 μM P5 zu einer deutlichen Inhibierung der Komplement-Kaskade.

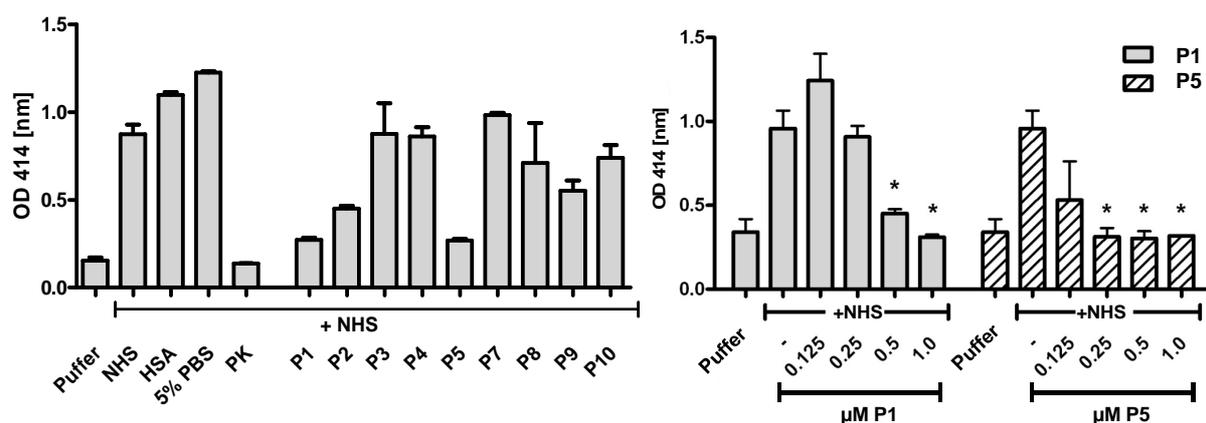


Abbildung 20: Aktivierung des alternativen Weges des Komplementsystems in Anwesenheit der Proteine P1-P10. Gezeigt ist die Hämolyse von Kaninchen-Erythrozyten in Anwesenheit von NHS und jeweils einem der Proteine P1-P10 (links). Die Lyse kann durch 1 μM der Proteine P1 und P5 fast vollständig inhibiert werden. Aus diesem Grund wurden nochmals unterschiedliche Konzentrationen der Proteine P1 und P5 eingesetzt (rechts). P1 und P5 können das Komplementsystem inhibieren, wobei P5 dabei wesentlich potenter ist. Puffer: ohne Zugabe von humanem Serum, NHS: humanes Serum, HSA: humanes Serum-Albumin, K: Positivkontrolle SCIN. Dargestellt ist der Mittelwert mit zugehörigem Standardfehler aus n=2.

Wie die Ergebnisse dieser Analyse zeigen, besitzen die Proteine P1 und P5 Komplement-inhibierende Eigenschaften und unterbinden die Aktivierung des Komplementsystems über den alternativen Weg. Vergleicht man beide Proteine direkt miteinander, so ist P5 der wesentlich potentere Inhibitor der Komplement-Aktivierung.

4.2 Antikörperprofil gegen die Proteine P1 – P10 in humanen und murinen Seren

Ein Vergleich der Antikörperprofile von uninfizierten humanen Spendern mit der während einer *S. aureus*-Infektion gebildeten Antikörperantwort ermöglicht eventuell eine Aussage über die Relevanz der untersuchten Proteine für die Kolonisierung bzw. Infektion. Zudem könnte dieser Ansatz Erkenntnisse über die *S. aureus*-spezifische Antikörperantwort während der asymptomatischen Kolonisierung und während einer Infektion liefern.

Zunächst wurde die Immunantwort von nasalen Trägern und Nicht-Trägern ermittelt und die daraus resultierenden Erkenntnisse mit der Antikörperantwort in murinen Seren nach einer wiederholten Infektion mit *S. aureus* verglichen.

Für die Untersuchungen des humanen Antikörperprofils während der Kolonisierung wurde Plasma von 16 gesunden nasalen *S. aureus* Trägern bzw. Nicht-Trägern verwendet. Alle Plasmen wurden von Prof. Barbara Bröker (Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Greifswald) zur Verfügung gestellt. Vor der Gewinnung der Plasmen wurden die Träger bzw. Nicht-Träger anhand von zwei Nasenabstrichen im Abstand von vier Wochen bestimmt. Der Antikörpertiter wurde in einem ELISA-basierten Experiment analysiert. Dazu wurden die zu untersuchenden Proteine einzeln an eine Kunststoffoberfläche immobilisiert, mit den Plasmen in geeigneter Verdünnung inkubiert und spezifisch gebundene Antikörper mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper detektiert. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer Eichkurve mit Hilfe des Proteins IsaA und einem monoklonalen α -IsaA Antikörper in bekannter Konzentration. Zusätzlich dazu wurde der spezifische Antikörpertiter auch für IsaA bestimmt. Dies diente hier als Positivkontrolle, da spezifische α -IsaA Antikörper universell in humanen Seren vorkommen.

An den in Abbildung 21 dargestellten Ergebnisse ist zu erkennen, dass die spezifische Antikörperantwort gegen die Proteine innerhalb einer Gruppe sehr variabel ist. Die höchsten Antikörpertiter wurden in beiden Gruppen gegen die Proteine P2, P8, P9, P10 und IsaA detektiert. Dabei gab es lediglich für zwei der 10 getesteten Proteine (P4 und P7) einen signifikanten Unterschied in der Antikörperantwort zwischen humanen Trägern und Nicht-Trägern.

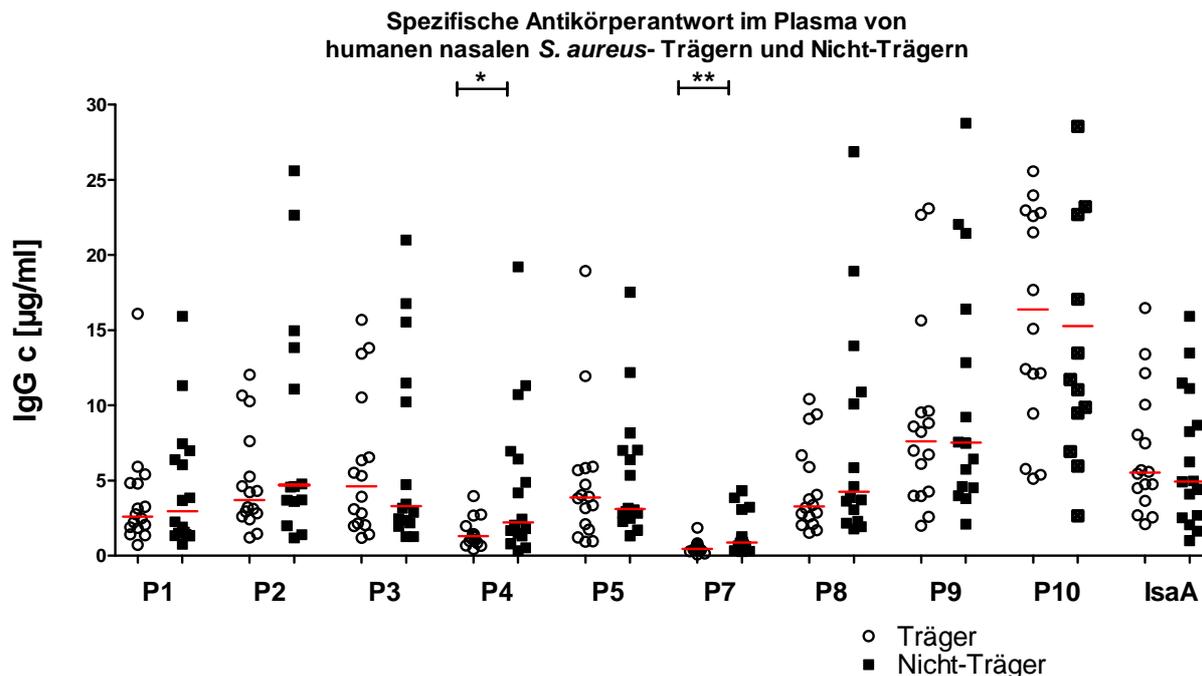


Abbildung 21: Spezifische Antikörperantwort im Plasma von humanen nasalen *S. aureus*-Trägern und Nicht-Trägern. Gezeigt ist der spezifische Antikörpertiter (IgG) in [µg/ml] gegen die Proteine P1-P10 und IsaA. Die Bestimmung erfolgte mittels ELISA in 16 Plasmen von gesunden nasalen *S. aureus*-Trägern und 16 gesunden Nicht-Trägern. Signifikante Unterschiede in der Antikörperantwort von Trägern und Nicht-Trägern wurden für die Proteine P4 [$p=0,03$ (*)] und P7 [$p=0,009$ (**)] bestimmt (Mann-Whitney-Test) ermittelt. Der Median aus allen Werten innerhalb einer Gruppe ist in rot dargestellt.

Neben der Analyse des Antikörpertiters der Proteine P1-P5, P7-P10 und IsaA in gesunden Probanden wurde humanes Serum aus Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen auf die spezifische Antikörperantwort untersucht. Dabei handelt es sich um Serum von Patienten mit einer Arteriellen Verschlusskrankheit (AOD), Diabetes-Patienten und Patienten mit terminaler Nieren-Insuffizienz (ESRD). Jede der drei Patientengruppen zeigt eine erhöhte Anfälligkeit für Staphylokokken-Infektionen. Dies liegt vor allem an einer Schwächung des angeborenen Immunsystems. [131,139–142]

Die Bestimmung des Antikörpertiters erfolgte wie bereits zuvor beschrieben (s.o.) in einem ELISA-basierten Versuchsaufbau. Wie in Abbildung 22 (A+B) dargestellt konnten auch hier die höchsten Antikörperantworten gegen die Proteine P2, P10 und IsaA in den AOD- und den Diabetes-Patienten detektiert werden. In beiden Patienten-Gruppen war das Antikörperprofil vergleichbar mit den Mustern, die sich aus der Untersuchung der gesunden humanen Spender ergab (siehe Abbildung 21). Die analysierten Seren der Dialyse-Patienten zeigen hingegen ein verändertes Antikörperprofil (siehe Abbildung 22 C). Hier war der Antikörpertiter gegen die getesteten Proteine weit geringer als in den Plasmen der gesunden

Spender. Dies wird vor allem bei den Proteinen deutlich, für die in den Plasmen der gesunden Probanden und in den beiden weiteren Patientengruppen (AOD + Diabetes) sehr hohe Titer gemessen wurden. Keiner der Patienten war von einer akuten *S. aureus* Infektion betroffen.

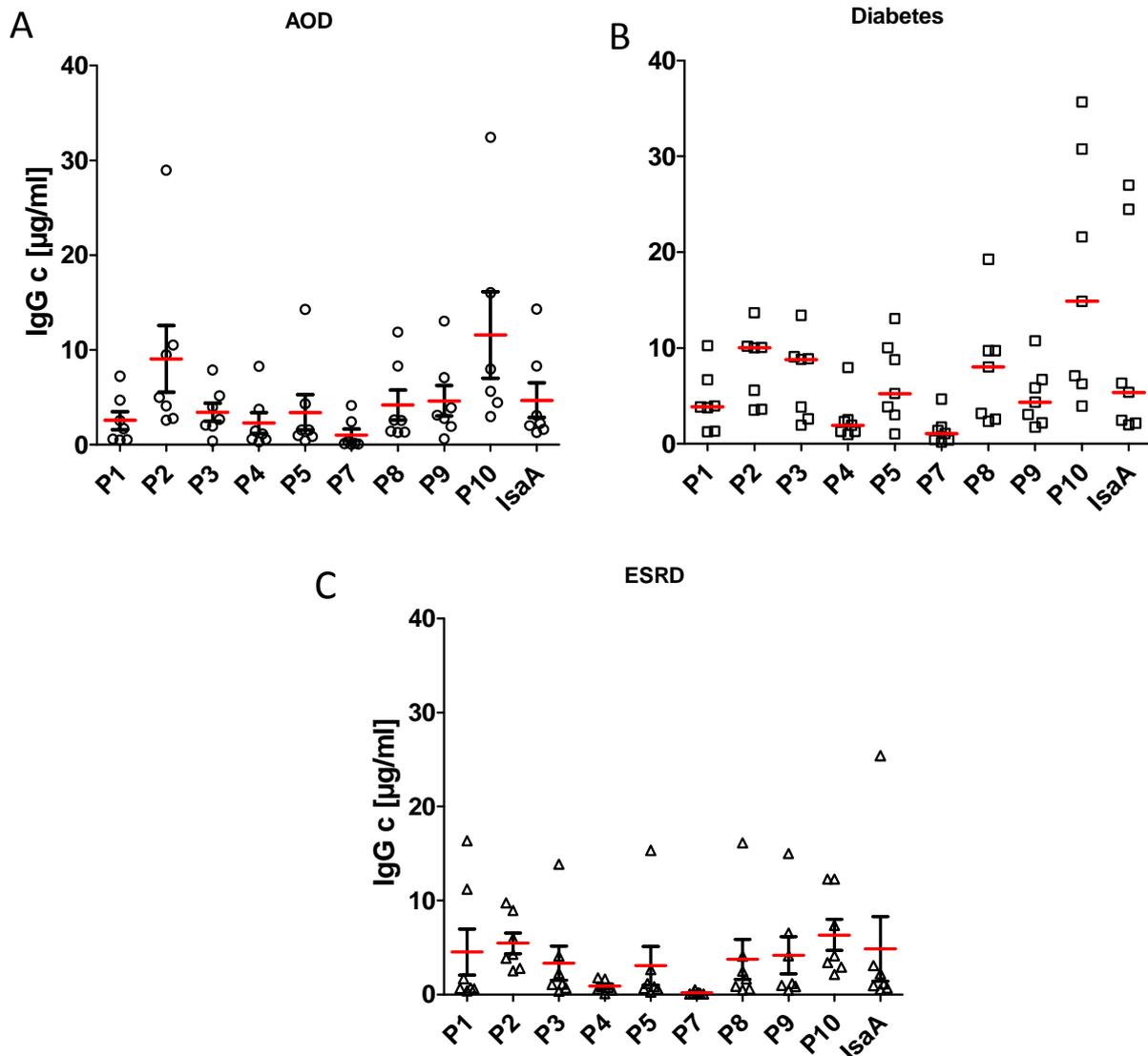


Abbildung 22: Spezifische Antikörperantwort in Seren von humanen immunsupprimierten Patientengruppen. Gezeigt ist der spezifische Antikörpertiter (IgG) in [µg/ml] gegen die Proteine P1-P5, P7-P10 und IsaA. Die Bestimmung erfolgte mittels ELISA in Seren von Patienten mit A: arterieller Verschlusskrankheit (AOD), B: Diabetes Patienten und in C: Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz (ESRD). Es gibt einen signifikanten Unterschied in der Antikörperantwort gegen Protein P10 zwischen Diabetes-Patienten und Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz ($p < 0,01$). Die Signifikanz wurde mittels *two-way* ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur berechnet.

Um das während der Kolonisierung gebildete Antikörperprofil mit dem während einer Infektion gebildeten vergleichen zu können, wurde darüber hinaus das Antikörperprofil von Mäusen untersucht, die mit *S. aureus* infiziert wurden. Die wiederholte Infektion über einen

Versuchszeitraum von ca. 6 Wochen diente der Generierung eines stammspezifischen Antikörperprofils als Antwort auf eine Infektion. Dazu wurden die Tiere im Abstand von zwei Wochen dreimal mit einer sublethalen Dosis *S. aureus* Newman infiziert, wobei dafür unterschiedliche Applikationsarten angewendet wurden. Es wurden drei Infektionsarten induziert, indem die Bakterien direkt über die Schwanzvene in den Blutstrom der Tiere injiziert wurden (systemische Infektion, Sepsis-Modell, 5×10^6 CFU/Maus), intranasal inokuliert wurden (Pneumonie-Modell, 1×10^7 CFU/Maus) oder direkt in den Oberschenkelmuskel appliziert wurden (Abszess-Modell, 5×10^6 CFU/Maus). Die Seren wurden anschließend in Zusammenarbeit mit Babett Oesterreich und Tobias Hertlein gewonnen.

Nach 40 Tagen wurde das Serum der Mäuse entnommen und die spezifische Antikörperantwort gegen die Proteine P1-P5, P7-P10 und IsaA ermittelt. Dazu wurden die Zielproteine immobilisiert, mit den murinen Seren inkubiert und die spezifisch-gebundenen IgG und IgM Antikörper mit einem HRP-konjugierten α -Maus-Antikörper detektiert.

Bei der generellen Betrachtung der Antikörpertiter in Abbildung 23 wird deutlich, dass die murinen Titer die Titer in den humanen Proben teilweise um den Faktor 100-200 übersteigen. Die höchste spezifische Antikörperantwort wurde bei den untersuchten Mäusen für die Proteine P1, P5, P9, P10 und IsaA gemessen. Dies ist wiederum dem Antikörperprofil von gesunden humanen Spendern sehr ähnlich (Vergleich siehe Abbildung 21). Vergleicht man die drei Infektionsmodelle untereinander so wird zum einen deutlich, dass die Titer für die Proteine P9, P10 und IsaA in den Seren der Pneumonie-infizierten Tiere am geringsten sind. Für die Proteine P2, P3, P4, P7 und P8 konnte in allen Proben ein Antikörpertiter bestimmt werden, der für jedes getestete Serum unter $20 \mu\text{g/ml}$ lag. Zudem konnten hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Infektionsmodellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der großen Varianz der Ergebnisse und der geringen Probenanzahl, lässt diese Analyse der murinen Seren jedoch nur eine tendenzielle Bestimmung der Antikörperantwort zu ohne Signifikanz zu erreichen.

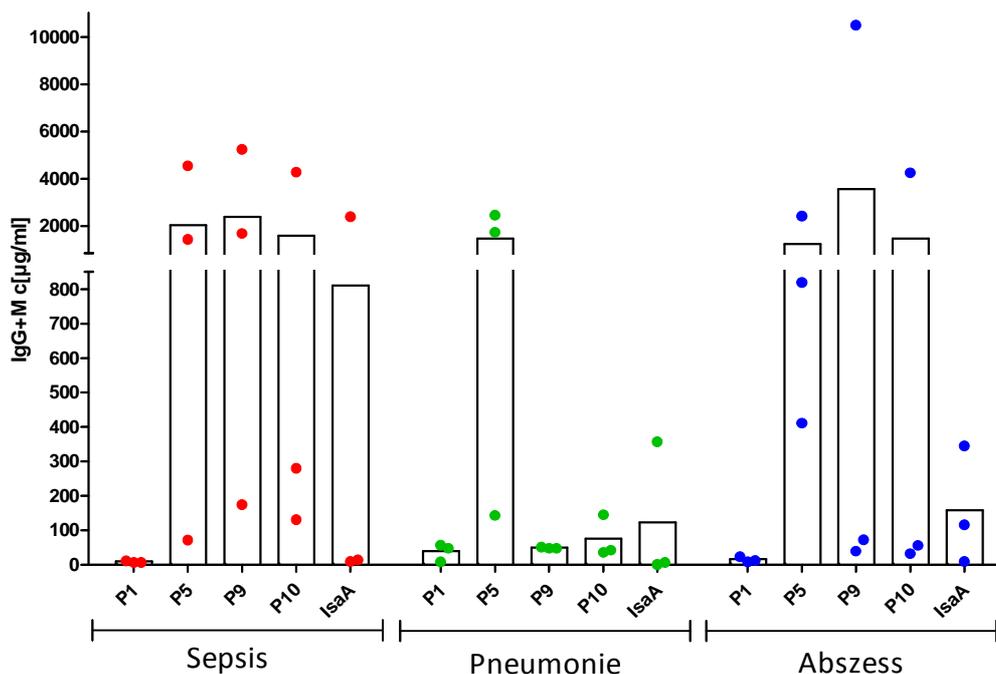


Abbildung 23: Spezifische Antikörperantwort in murinen Seren von wiederholt infizierten Tieren. Gezeigt ist der spezifische Antikörpertiter (IgG + IgM) in [µg/ml] gegen die Proteine P1, P5, P9, P10 und IsaA (Mittelwert aus n=3). Die Bestimmung erfolgte mittels ELISA in Seren von intravenös (Sepsis, 5×10^6 CFU/Maus), intranasal (Pneumonie, 1×10^7 CFU/Maus) und intramuskulär (Abszess, 5×10^6 CFU/Maus) infizierten Tieren.

Zusammengefasst verdeutlichen die Ergebnisse die Unterschiede zwischen gesunden humanen Spendern in Abhängigkeit von ihrem Kolonisierungsstatus und erlauben einen Vergleich zwischen gesunden Probanden und immunsupprimierten Patienten. Des Weiteren können die so erhaltenen Antikörperantworten mit der *S. aureus*-spezifischen Antikörperantwort während einer Infektion verglichen werden. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 24 in Form einer *Heatmap* zusammenfassend dargestellt.

Bei der Analyse der Antikörperantwort gegen die Proteine P1-P5, P7-P10 und IsaA sind zwischen humanen Trägern und Nicht-Trägern nur geringe Unterschiede festzustellen. Signifikant unterschiedlich sind lediglich die Antikörpertiter für die Proteinen P4 und P7, wobei hier die Gruppe der Nicht-Träger die höheren Titer aufweist. Vergleicht man die Patienten mit AOD (Patienten A) und die Diabetes-Patienten (Patienten B) mit den gesunden Probanden (Träger und Nicht-Träger), so ähneln sich deren Antikörperprofile. Lediglich im Serum der Patienten mit terminaler Nieren-Insuffizienz wurden im Vergleich zu den gesunden Probanden und den weiteren Patientengruppen deutlich geringere Antikörpertiter gefunden. Die in diesen Versuchen gemessenen Titer wurden mit Titern aus wiederholt

infizierten Mäusen verglichen, um das gebildete Antikörperprofil während einer Infektion zu analysieren.

Vergleicht man die murinen mit den humanen Antikörpertiter (Abbildung 22 und Abbildung 23), so waren die Antikörpertiter in den infizierten Tieren teilweise 100 - 200 mal höher als in den humanen Serumproben. Während der Infektion wurden hauptsächlich Antikörper gegen die Proteine P1, P5, P9, P10 und IsaA gebildet. Innerhalb der infizierten Tiere gab es zudem Unterschiede in Abhängigkeit von der Infektionsart. In den Tieren mit systemischer Infektion wurden gegen IsaA deutlich mehr Antikörper gebildet. In den intranasal (Pneumonie) infizierten Tieren hingegen war der Antikörpertiter gegen die Proteine P9 und P10 deutlich geringer als bei den intravenös und intramuskulär infizierten Tieren. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Antikörper in Abhängigkeit von der jeweiligen Infektionsart gebildet werden.

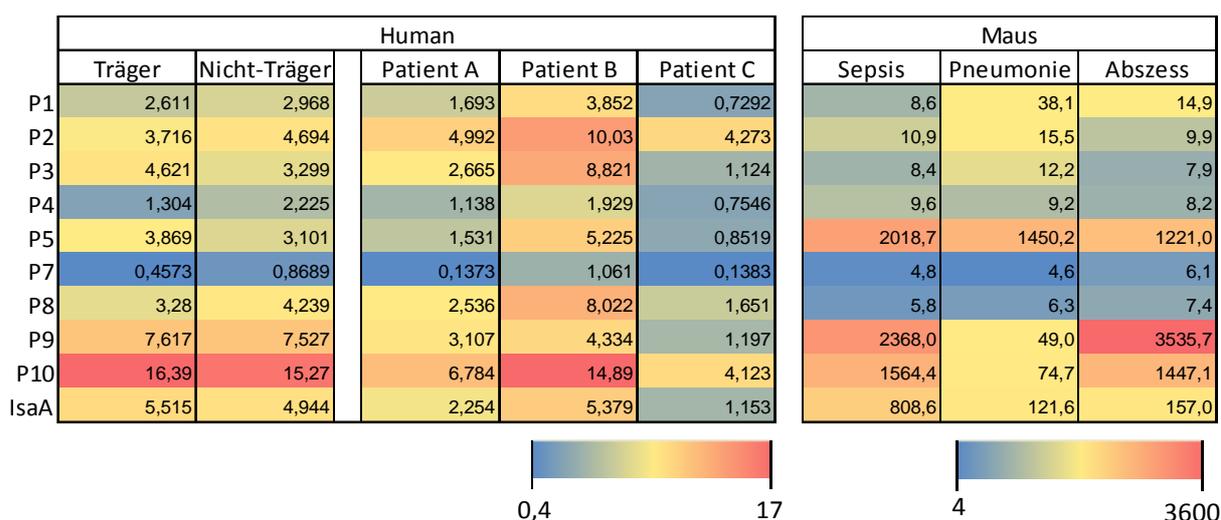


Abbildung 24: Zusammenfassung aller ermittelten Antikörpertiter in humanen und murinen Plasmen bzw. Seren in Form einer Heatmap. Dargestellt ist der Median (humane Seren) bzw. der Mittelwert (murine Seren) aus allen Einzelproben der wiederholt infizierten Tiere, aus den Plasmen von humanen Träger und Nicht-Trägern und aus den Seren der verschiedenen humanen Patientengruppen [Patient A: Patienten mit arterieller Verschlusskrankheit (AOD); Patient B: Patienten mit Diabetes; Patient C: Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz (ESRD)]. Mit steigender Antikörperkonzentration ändert sich die Farbe von blau nach rot (links: 0,4 µg/ml-17 µg/ml und rechts: 4 µg/ml-3600 µg/ml).

4.3 Charakterisierung von PurA

4.3.1 *In silico* Untersuchung von PurA

Für PurA (P12) konnte bereits in zahlreichen Studien sowohl in *E. coli* als auch in anderen Mikroorganismen eine Funktion in der Purin-Biosynthese gezeigt werden. Hierbei fungiert PurA als Adenylosuccinat-Synthase, die die GTP-abhängige Umsetzung von Inosinmonophosphat (IMP) zu Succinyladenosin-Monophosphat (sAMP) katalysiert. [143]

Anhand einer global angelegten Studie wurde über einen *Staph-Toxin-Array* [144] die Faktor H-Bindung der auf dem Array immobilisierten Proteine in Kooperation mit der Gruppe von Prof. Dr. Susanne Engelmann (Universität Braunschweig) untersucht. Durch diese Analyse gab es jedoch Hinweise darauf, dass PurA eine Faktor H-bindende Funktion ausübt. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, eine weitere Funktion von PurA während der Immunevasion zu bestimmen und detailliert zu charakterisieren.

Um mögliche Hinweise für weitere Funktionen von PurA außerhalb der Purin-Biosynthese zu gewinnen, wurde zunächst eine Analyse mit Hilfe verschiedener Datenbanken durchgeführt (www.genome.jp/kegg/kegg2.html, <http://smart.embl-heidelberg.de>, <http://genolist.pasteur.fr/AureoList/>, 01.10.2015).

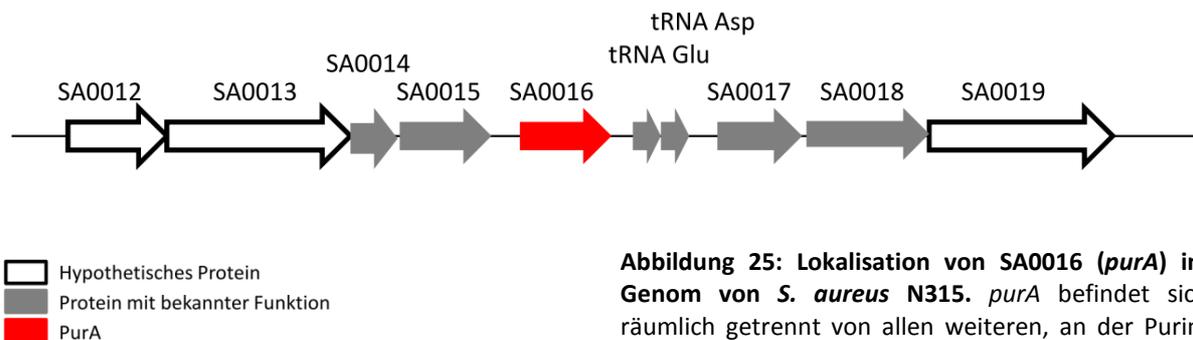


Abbildung 25: Lokalisation von SA0016 (*purA*) im Genom von *S. aureus* N315. *purA* befindet sich räumlich getrennt von allen weiteren, an der Purin-Synthese beteiligten *pur*-Genen.

Das für PurA codierende Gen (Locus SA0016 in *S. aureus* N315) befindet sich nicht in räumlicher Nähe von weiteren ebenfalls an der Purin-Synthese beteiligten *pur*-Genen, die ausgenommen von *purB* und *purR* alle in einem Operon organisiert sind. Das Gen *purA* ist im Genom umgeben von Genen, die für eine Helicase, ein ribosomales Protein, verschiedene Zwei-Komponenten-Systeme und zahlreiche hypothetische Proteine codieren (siehe Abbildung 25 und Tabelle 26). Aus der Funktion der Gene in räumlicher Nähe von *purA* lassen sich keinerlei Rückschlüsse auf eine mögliche zweite Funktion von PurA ziehen.

Tabelle 26: Übersicht über die Funktion von Genen in räumlicher Nähe zu *purA*

KEGG-Eintrag	Funktion (basierend auf Datenbankanalyse)
SA0014	Ribosomales Protein der großen Untereinheit L9
SA0015	DnaC, DNA Helicase
SA0016	PurA, Adenylosuccinat-Synthase
SA0017	VicC, Response-Regulator des 2-Komponenten-Systems VicK/VicR, Zellwand-Metabolismus
SA0018	VicK, Sensor-Histidin-Kinase des 2-Komponenten-Systems VicK/VicR, Zellwand-Metabolismus

Auch eine Analyse der Domänenstruktur von PurA lieferte keine weiteren Hinweise über eine zusätzliche Funktion, da lediglich die für die Purin-Biosynthese essentielle Adenylosuccinat-Synthase-Domäne identifiziert werden kann. PurA kann anhand seiner Domänenstruktur zur Superfamilie der Nucleosid-Triphosphat-Hydrolasen gehörig klassifiziert werden. Die *in silico*-Analyse lässt keine Rückschlüsse auf weitere Funktionen zu.

4.3.2 Native Konformation

Da die *in silico*-Analyse keinen Hinweis auf weitere Funktionen von PurA zulässt, wurde nach Homologien von PurA aus *S. aureus* zu anderen Orthologen des Proteins in anderen Organismen gesucht.

Ein Vergleich von *purA* aus *S. aureus* mit dem orthologen Gen in *E. coli* ergab eine deutliche Homologie der beiden Gene zueinander (Consensus: 61,3%, davon identische Positionen: 46,3%). Die Struktur des PurA-Orthologs aus *E. coli* konnte bereits in verschiedenen Arbeiten zusammen mit unterschiedlichen Ko-Faktoren wie z.B. Aspartat, zweiwertigen Kationen oder Nukleotiden mittels Röntgenkristallstrukturanalyse aufgelöst werden. [145,146] Dabei lag PurA in allen Fällen als Homodimer vor.

Um die native Konformation auch für das orthologe Protein in *S. aureus* zu überprüfen und genauere Angaben über das Molekulargewicht des Proteins unter nativen Bedingungen zu erhalten, wurde PurA mit Hilfe der Techniken Größenausschlusschromatographie, native PAGE und MALS analysiert. Gelfiltration und MALS-Analyse wurden in Kooperation mit Dr. Christine Schäfer und Dr. Florian Sauer (AG Kisker, RVZ, Würzburg) durchgeführt.

Ergebnisse

Im ersten Teil dieser Analyse wurde zunächst eine vergleichende Größenausschlusschromatographie mit rekombinant hergestelltem PurA durchgeführt. Dabei wurde eine Superdex-Säule zunächst mit einem Proteinstandard aus 5 definierten Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht beladen und deren Retentionszeit an der Säule dokumentiert. Aus den Retentionszeiten der Standardproteine wurde eine Kalibrierkurve erstellt. Im Anschluss wurde die Säule mit PurA beladen und ebenfalls das Laufverhalten dokumentiert. Ein Vergleich mit der Eichkurve der Proteinstandards lässt Rückschlüsse auf das Molekulargewicht von PurA zu. Bei dieser ersten Analyse konnte gezeigt werden, dass das Molekulargewicht von PurA unter nativen Bedingungen größer ist, als das monomere Molekulargewicht von 47,5 kDa.

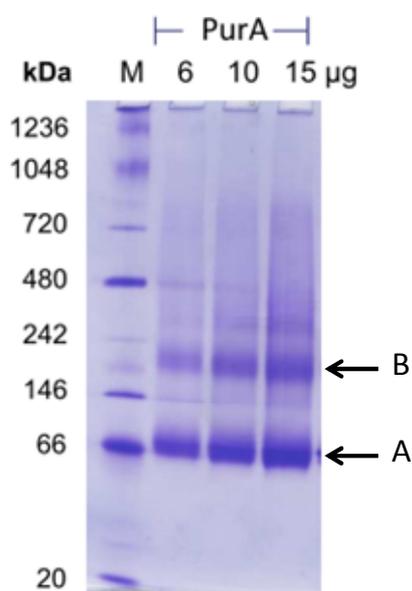


Abbildung 26: Natives Polyacrylamid-Gel von PurA. 6, 10 und 15 µg aufgereinigtes Protein wurden der Größe nach in einer nativen PAGE aufgetrennt. Das Molekulargewicht liegt bei >66 kDa und damit höher als das berechnete molekulare Gewicht des Monomers (47,5 kDa). PurA aus *S. aureus* liegt vermutlich als Homodimer vor. A: Homodimer, B: Tetramer, M: Größenstandard

Da die Größenausschlusschromatographie jedoch keine exakte Analyse des Molekulargewichts zulässt, wurde das Molekulargewicht von PurA mittels nativer PAGE und MALS weiter analysiert. Für die Analyse von PurA mittels nativer PAGE wurden verschiedene Mengen von PurA unter nativen Faltungsbedingungen in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Dabei waren zwei prominente Banden im gefärbten Acrylamidgel zu erkennen (siehe Abbildung 26). Beide Banden lagen oberhalb von 66 kDa (siehe Vergleich

Größenstandard). Dabei handelt es sich vermutlich um das Homodimer (A) und das Tetramer (B).

Neben Größenausschlusschromatographie und nativer PAGE, wurde das Molekulargewicht von PurA mittels MALS (*Multiangle light scattering*) untersucht. Dabei handelt es sich um eine Methode, die es ermöglicht über Lichtstreuung die absolute molare Masse von Partikeln in Lösung zu messen. Mittels dieser Methode konnte ein Molekulargewicht für PurA von $9,912 \times 10^4$ g/mol (\cong 99 KDa) bestimmt werden. Dieses Ergebnis bestätigt die voran gegangenen Analysen, dass PurA unter nativen Bedingungen als Homodimer vorliegt.

4.3.3 Herstellung eines spezifischen polyklonalen Antikörpers gegen PurA

Die weitere Charakterisierung von PurA erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe von Antikörperbasierten Methoden wie beispielsweise ELISA, Immunfluoreszenz und FACS-Analysen. Da zu Beginn dieser Arbeit kein geeigneter spezifischer Antikörper gegen PurA aus *S. aureus* vorlag, wurde zunächst ein polyklonaler α -PurA-Antikörper generiert.

Für die Herstellung eines PurA-spezifischen Antikörpers wurde in Zusammenarbeit mit der Fa. Davids Biotechnologie GmbH (Regensburg, Deutschland) ein Kaninchen über einen Zeitraum von sechs Wochen dreimal mit dem aufgereinigten PurA immunisiert und anschließend das Serum gewonnen. Der darin erhaltene polyklonale Antikörper wurde mit Hilfe von Protein G-Sepharose affinitätschromatographisch aufgereinigt, um alle weiteren Serumbestandteile vollständig zu entfernen.

Mit dem so gewonnenen Antikörper wurden Bindungsstudien sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, um die Spezifität des Antikörpers nachzuweisen. Wie in Abbildung 27 dargestellt, wurde die Spezifität in zwei unabhängigen ELISA-basierten Ansätzen evaluiert, wodurch die Bindung des generierten Antikörpers an immobilisiertes PurA untersucht wurde. Die Ergebnisse zeigen die Bindung des Antikörpers an PurA in Abhängigkeit von der eingesetzten Antikörperkonzentration. Darüber hinaus konnte mittels Kompetitions-ELISA auch die spezifische Bindung an lösliches Antigen gezeigt werden (siehe Abbildung 27, rechts).

Die Bindungsstudien ergaben, dass der selbst generierte Antikörper eine hohe Spezifität zum PurA-Protein in Lösung sowie zum immobilisierten Antigen aufweist.

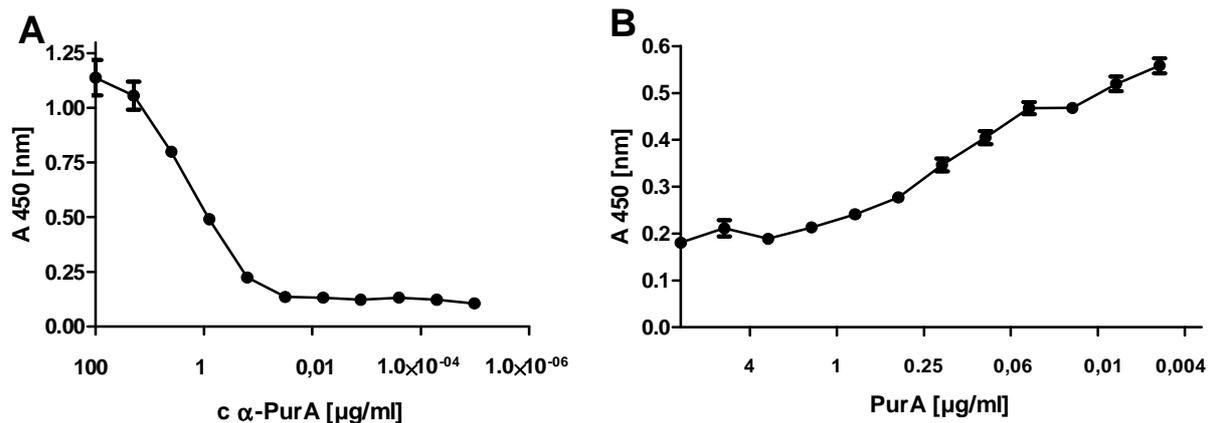


Abbildung 27: Bindungsstudien zum Nachweis der Spezifität des generierten α -PurA-Antikörpers aus Kaninchen. A: Bindungs-ELISA (siehe 3.5.13) an immobilisiertes PurA; Das Antigen wird hier in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration spezifisch erkannt. B: Bindung des polyklonalen Antikörpers an PurA in Lösung (Kompetitions-ELISA, siehe 3.5.13.3). Dargestellt ist der Mittelwert mit dem zugehörigen Standardfehler aus $n=4$ (links) und $n=9$ (rechts)

4.3.4 PurA bindet an humanen Faktor H

In voran gegangenen Untersuchungen in Kooperation mit der Universität Greifswald (Institut für Mikrobiologie) wurde die Bindung von zahlreichen sekretierten und Oberflächen-assoziierten Proteinen an Serumkomponenten untersucht. Dafür wurde ein Proteinarray verwendet, für den einige der immobilisierten Proteine im Rahmen dieser Arbeit rekombinant hergestellt wurden (siehe Methoden 3.17). Diese Untersuchungen lieferten Hinweise auf eine mögliche Interaktion von PurA mit FH.

Um eine Interaktion mit dem humanen Komplement Faktor H (FH) zu verifizieren, wurden Interaktionsstudien mit PurA und dem humanen Faktor H durchgeführt. In einem ELISA-basierten Ansatz wurde gezeigt, dass PurA spezifisch an immobilisierten Faktor H bindet (siehe Abbildung 28). Zusätzlich dazu wurde auch die Bindung von aufgereinigtem Faktor H sowie FH in humanem Serum (NHS) an zwei Varianten des PurA-Proteins (PurA-6xHis, unmarkiertes PurA) untersucht. Beide PurA-Varianten wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt, um einen Einfluss der Markierung des Proteins bei Interaktionsstudien vollständig ausschließen zu können.

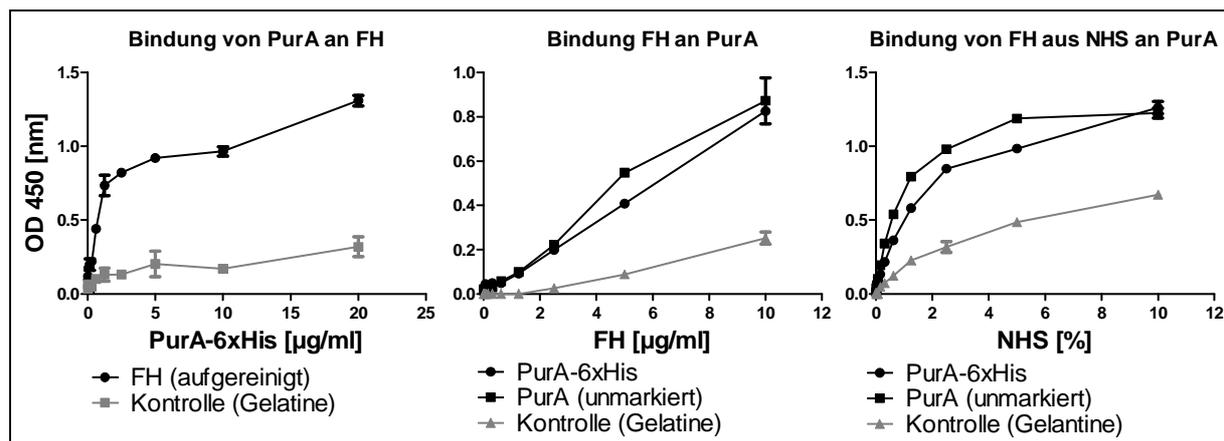


Abbildung 28: Bindung von humanem Faktor H (FH) an PurA. Links: Bindung von PurA an immobilisierten FH; Mitte: Bindung von aufgereinigtem FH an immobilisiertes PurA; rechts: Bindung von FH aus humanem Serum (NHS) an immobilisiertes PurA. Dargestellt ist der Mittelwert mit dem zugehörigen Standardfehler aus $n=2$ (links + rechts) und $n=3$ (Mitte).

Die in Abbildung 28 dargestellten Ergebnisse zeigen die spezifische Bindung von PurA sowohl an löslichen als auch immobilisierten FH. Zudem konnte die spezifische Interaktion von PurA mit FH in humanem Serum gezeigt werden.

4.3.5 Inhibierung der Interaktion zwischen PurA und FH durch Antikörper

Um die Bindung zwischen Faktor H und PurA genauer zu charakterisieren, wurde im Anschluss an die ELISA-basierten Bindungsstudien untersucht, ob die spezifische Bindung der beiden Interaktionspartner PurA und FH durch eine vorherige Inkubation von PurA mit dem Antikörper blockiert werden kann. Dazu wurde PurA an eine Kunststoffoberfläche immobilisiert, anschließend mit dem α -PurA-Antikörper inkubiert und im Anschluss die Bindung an Faktor H überprüft.

Die in Abbildung 29 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Bindung von PurA an FH mit zunehmender Antikörperkonzentration abnimmt. Da es sich bei dem verwendeten Antikörper um einen polyklonal hergestellten Antikörper handelt, bindet dieser an unterschiedliche Epitope innerhalb des PurA-Proteins und verhindert somit, dass PurA und FH in räumliche Nähe kommen und aneinander binden können.

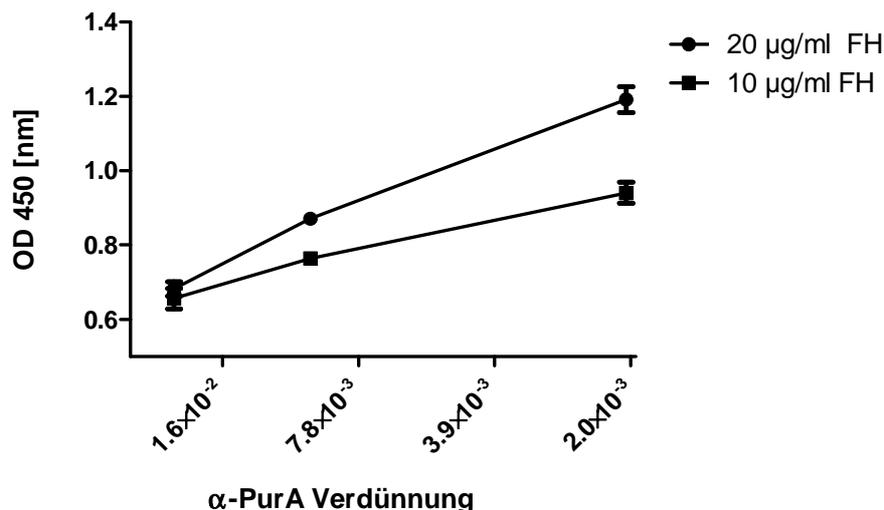


Abbildung 29: Inhibierung der Interaktion zwischen PurA und FH durch den spezifischen α -PurA-Antikörper. Durch die vorherige Inkubation von PurA mit dem spezifischen α -PurA Antikörper, kann die Bindung an FH konzentrationsabhängig inhibiert werden. Dargestellt ist der Mittelwert mit dem zugehörigen Standardfehler aus $n=4$.

Die in dieser Analyse gewonnenen Ergebnisse unterstreichen die Erkenntnisse aus den vorangegangenen Bindungsstudien und weisen auf eine direkte Interaktion von FH und PurA hin. Zudem konnte über diese Untersuchung die spezifische Bindung des zuvor generierten α -PurA Antikörpers verifiziert werden.

4.3.6 Die Interaktion zwischen PurA und FH ist unabhängig vom aktiven Zentrum in PurA

PurA kann neben FH auch die Substrate Aspartat, IMP und GTP binden. Dies ist für die katalytische Umsetzung von IMP zu sAMP während der Purinsynthese von essentieller Bedeutung. Nachfolgend wurde untersucht, ob die Bindung von FH an PurA an der Substratbindestelle erfolgt, die für die katalytische Funktion innerhalb der Purinsynthese benötigt wird.

Mit Hilfe von Informationen aus verschiedenen Datenbanken (www.uniprot.org, www.metacyc.org, 01.10.2015) wurden zunächst einzelne Aminosäuren im orthologen PurA-Protein identifiziert, die entscheidend für die katalytische Funktion von PurA innerhalb der Purin-Biosynthese sind. Fünf dieser Aminosäuren (G12, K16, K139, R146, R302) wurden aufgrund der Datenbankrecherche und aus Publikationen ausgewählt und gezielt gegen andere Aminosäuren ausgetauscht (siehe Abbildung 30 und Tabelle 27). Die für die

Mutagenese ausgewählter Aminosäuren sind in hochkonservierten Bereichen des PurA-Proteins lokalisiert, die für die Bindung der Substratmoleküle IMP, Magnesium-Ionen, GTP und Aspartat von entscheidender Bedeutung sind. Der Austausch jeder einzelnen Aminosäure führt in *E. coli* entweder teilweise oder zum völligen Verlust der katalytischen Aktivität. [147–149] Eine Übersicht über die jeweiligen mutierten Aminosäuren und deren Auswirkungen auf die Aktivität von PurA sind zusammenfassend in Tabelle 27 dargestellt.

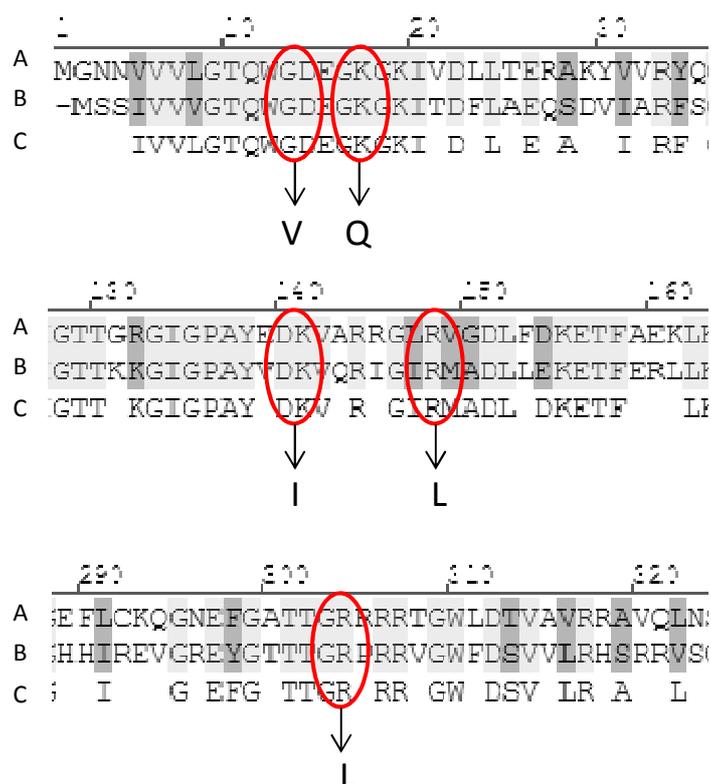


Abbildung 30: Vergleich der Aminosäuresequenz von PurA aus *E. coli* (A) und aus *S. aureus* N315 (B). C: Konsensus-Sequenz; in rot: Ausgetauschte Aminosäuren

Tabelle 27: Übersicht über die ausgetauschten Aminosäuren (AS) in PurA und die dazugehörigen Literaturstellen

Position der AS in <i>S. aureus</i> N315	AS-Austausch	Codon- Austausch	Auswirkungen (katalytische Aktivität)	Quelle
G12	Glycin → Valin	GGA → GTA	Signifikante Verringerung der Aktivität	[147]
K16	Lysin → Glutamin	AAA → CAA	Signifikante Verringerung der Aktivität	[147,148]
K139	Lysin → Isoleucin	AAA → ATA	Keine Aktivität	[147]
R146	Arginin → Leucin	CGT → CTT	Reduzierte Aktivität	[149]
R302	Arginin → Leucin	CGT → CTT	Katalytische Aktivität um 87 % verringert	[147]

Für die eigentliche Mutagenese wurde das Plasmid pET28a_purA als *template* in einer PCR eingesetzt, das gesamte Plasmid mit Hilfe von modifizierten Primern, die bereits die Mutation tragen, amplifiziert und anschließend in einen geeigneten Expressionsstamm transformiert. Anschließend wurden die inaktiven PurA-Varianten rekombinant exprimiert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Auf diesem Wege wurden fünf verschiedene Varianten des PurA-Proteins überexprimiert, aufgereinigt und deren Bindung an Faktor H im Vergleich zum wildtypischen Protein in einer ELISA-basierten Anwendung untersucht. Dabei konnte auch bei der Verwendung von unterschiedlichen Mengen an gereinigtem Faktor H kein Unterschied in der Bindung beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass das aktive Zentrum, das essentiell für die Funktion während der Purin-Synthese ist, nicht an der Bindung von Faktor H beteiligt ist. Beide Reaktionen können demnach wahrscheinlich völlig unabhängig voneinander ablaufen.

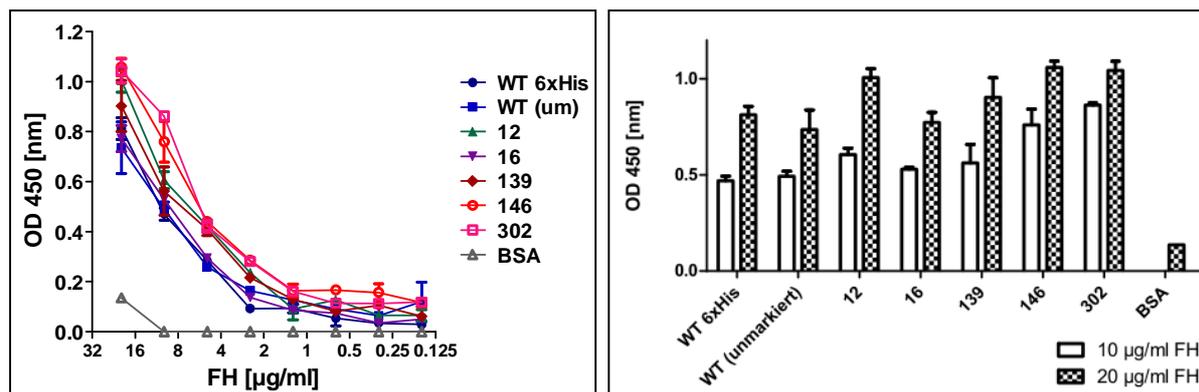


Abbildung 31: Bindung von FH an veränderte Varianten von PurA – die veränderten Varianten von PurA binden FH vergleichbar mit dem wildtypischen PurA (WT). Links: Bindung von PurA-Varianten an verschiedene Konzentrationen von FH, rechts: Bindung von PurA-Varianten an 10 µg/ml bzw. 20 µg/ml FH; Dargestellt ist der Mittelwert mit dem zugehörigen Standardfehler aus n=4. α-FH Antikörper: 1:2000; α-Ziege-HRP-Antikörper: 1:5000. WT 6xHis: unverändertes Protein mit N-terminalem His-*Proteintag*, WT (um): unverändertes Protein ohne Markierung, 12/16/139/146/302: Position, an der jeweils der AS-Austausch vorgenommen wurde, BSA: Kontrolle.

4.3.7 FH-Bindedomäne in PurA

Die Domäne innerhalb von Faktor H, die für die Bindung an PurA verantwortlich ist, konnte bereits in früheren Studien identifiziert werden. Dabei scheint die Domäne CCP 1-7 und CCP 18-20 von Faktor H entscheidend für die Bindung der beiden Interaktionspartner zu sein.

Weiterhin sollte die Bindedomäne innerhalb von PurA identifiziert werden. Da in voran gegangenen Experimenten bereits die Bindung von Faktor H im aktiven Zentrum von PurA ausgeschlossen werden konnte, wurde hier ein anderer Ansatz verfolgt. In Zusammenarbeit mit Dr. Christine Schäfer (AG Kisker, RVZ) wurde PurA *in silico* in acht Fragmente unterteilt (siehe Abbildung 32). Dabei wurde insbesondere darauf geachtet, dass die Sekundärstruktur des Proteins weitestgehend erhalten bleibt und die Faltung der kleineren Proteinfragmente nativ erfolgen kann.

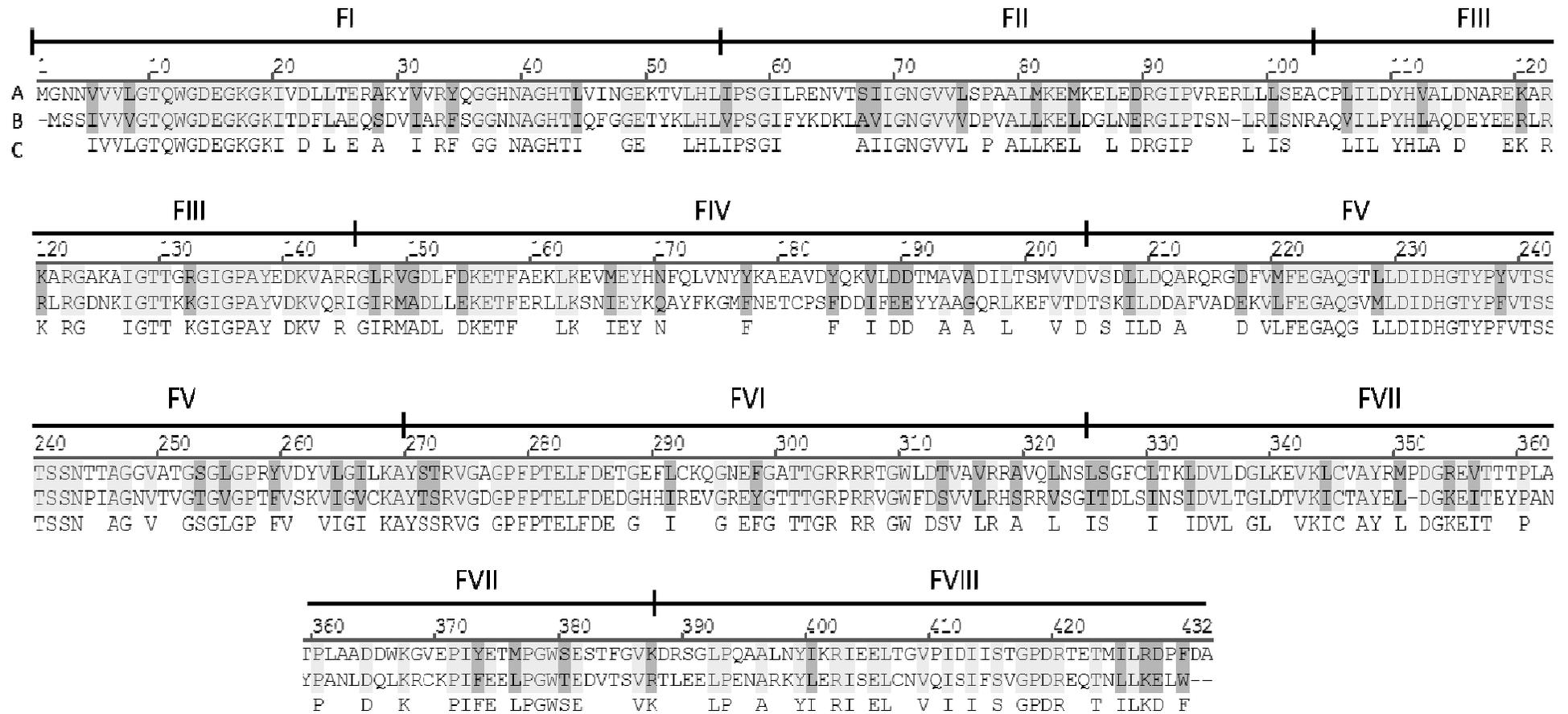


Abbildung 32: Einteilung von PurA in verschiedene Fragmente (I-VIII) anhand der vorhergesagten Sekundärstruktur. Dadurch sollte eine möglichst native Faltung der Einzelfragmente gewährleistet werden.

Im Anschluss an die *in silico* Analyse wurden die acht Fragmente einzeln oder in Kombination (siehe Tabelle 28) in den Expressionsvektor pET28a kloniert und als Fusionsprotein mit einem N-terminalen His-*Proteintag* in *E. coli* überexprimiert. Es wurden letztendlich nur die Fragmente FVI, FVII, FI-IV, FI-V und FII-VIII in einer Qualität und Reinheit gewonnen, die ausreichte um diese in einer Bindungsstudie mit Faktor H einzusetzen.

Tabelle 28: Übersicht über die verschiedenen Fragmente, die zur Überexpression und Aufreinigung in den Expressionsvektor pET28a mit N-terminalen His- *Proteintag* kloniert wurden. Die jeweiligen Fragmente sind mit römischen Ziffern markiert und entsprechen der Darstellung in Abbildung 32. Zusätzlich dazu sind die Aminosäuren (AS), die das jeweilige Fragment begrenzen im Einbuchstaben-Code, das berechnete Motiv des Fragments, die Anzahl der Aminosäuren und das Molekulargewicht angegeben. b: β -Faltblatt, h: α -Helix, l: Linker (unstrukturierter Bereich).

Fragment	Aminosäuren	Motiv	Länge [AS]	Molekulargewicht [kDa]
FVI	Y269-S323	bhlbh	78	8,7
FVII	L324-K386	bhblblbl	86	9,5
FI-IV	G2-D203		225	25
FI-V	G2-A268		290	31,7
FII-VIII	I57-A431		394	44

Die Bindungsstudie wurde wie zuvor beschrieben in einem ELISA-basierten Ansatz mit 20 $\mu\text{g/ml}$ aufgereinigtem Faktor H durchgeführt (siehe Methoden 3.5.13.2). Dazu wurde PurA bzw. eines der Fragmente an eine Kunststoffoberfläche immobilisiert und anschließend mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Faktor H inkubiert. Nach dem Waschen der Platten wurde anschließend die Menge an gebundenem Faktor H mit einem spezifischen anti-FH Antikörper detektiert.

Wie in Abbildung 33 dargestellt, zeigen sich deutliche Unterschiede in den Bindungseigenschaften der einzelnen Fragmente. Während die längeren Fragmente von PurA (I-IV, I-V, II-VIII) keinen signifikanten Unterschied in ihrer Fähigkeit zur Faktor H Bindung aufwiesen, ist die Bindung der Fragmente VI und VII an löslichen Faktor H signifikant ($p < 0,001$) geringer.

Dies deutet darauf hin, dass der N-terminale Teil von PurA (F I-IV) maßgeblich an der Bindung von FH beteiligt ist, während weitere Teile des PurA-Proteins hierfür weniger notwendig sind. Aus diesem Grund lässt sich die Bindedomäne innerhalb von PurA im N-terminalen Bereich auf die ersten 200 Aminosäuren eingrenzen.

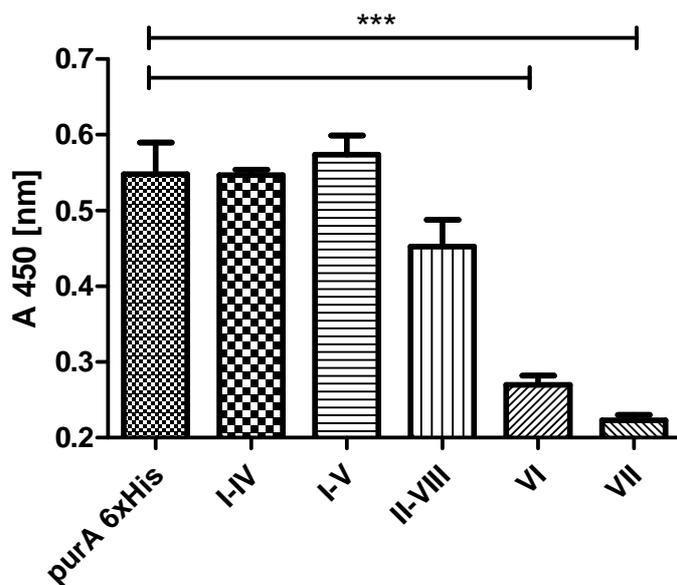


Abbildung 33: Bindung von verschiedenen PurA-Fragmenten an Faktor H. ELISA-basierter Versuch, bei dem PurA bzw. ein Fragment des Proteins an eine Mikrotiterplatte immobilisiert, anschließend zusammen mit 20 µg/ml Faktor H (FH) inkubiert und letztlich die Menge an gebundenem FH detektiert wurde (α -FH Antikörper: 1:2000; α -Ziege-HRP-Antikörper: 1:5000) purA 6xHis: unverändertes Protein in voller Länge mit N-terminalem His-*Proteintag*. Die einzelnen Fragmente sind mit römischen Zahlen benannt (siehe auch Tabelle 28). Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test berechnet (***) $p < 0,001$). Dargestellt ist der Mittelwert mit dem zugehörigen Standardfehler aus $n=6$.

4.3.8 *In-vitro*-Expression von *purA*

Um die Expression von *purA in vitro* näher zu untersuchen, wurde zunächst RNA aus vier verschiedenen *S. aureus*-Stämmen isoliert. Dazu wurden die Stämme in TSB bei 37 °C schüttelnd inkubiert und jeweils während der frühen logarithmischen, der logarithmischen, der späten logarithmischen und der stationären Wachstumsphase Proben für die RNA Isolation gewonnen (siehe Abbildung 34, Wachstumskurve). Diese wurde anschließend in cDNA umgeschrieben und als *template* in einer semiquantitativen PCR eingesetzt. Als Ladekontrolle wurde ein Teil des Gens amplifiziert, das für die 16S rRNA codiert.

Bei dieser Untersuchung zeigte sich zum einen, dass *purA* in den Stämmen *S. aureus* USA300 LAC*, Newman, 8325 und HG003 unter *in-vitro*-Bedingungen exprimiert wird. Allerdings ist die Expression abhängig vom jeweiligen Stammhintergrund unterschiedlich stark. Zudem wird deutlich, dass die Expression während der logarithmischen und der späten logarithmischen Phase generell am stärksten ist, was wahrscheinlich auf den erhöhten Bedarf an Purinen in diesen Wachstumsphasen zurück zu führen ist.

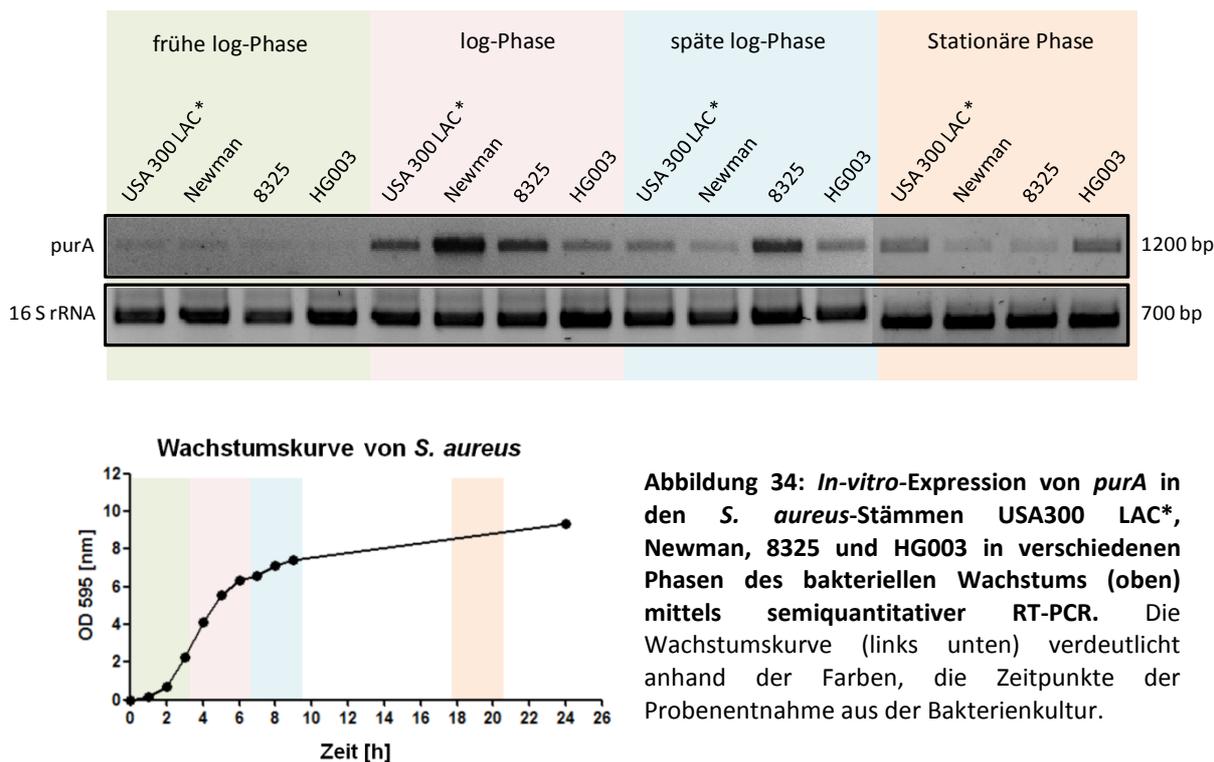


Abbildung 34: *In-vitro*-Expression von *purA* in den *S. aureus*-Stämmen USA300 LAC*, Newman, 8325 und HG003 in verschiedenen Phasen des bakteriellen Wachstums (oben) mittels semiquantitativer RT-PCR. Die Wachstumskurve (links unten) verdeutlicht anhand der Farben, die Zeitpunkte der Probenentnahme aus der Bakterienkultur.

4.3.9 Zelluläre Lokalisation von PurA

Die Lokalisation von PurA ist entscheidend für die Interaktion mit dem Immunsystem. In vorangegangenen Experimenten konnte bereits eine Interaktion mit Faktor H aus dem humanen Komplementsystem gezeigt werden. Damit beide Interaktionspartner *in vivo* überhaupt in räumliche Nähe gelangen können, ist die Lokalisation von PurA auf der Oberfläche der Zellen bzw. die Sekretion des Proteins nach außen von essentieller Bedeutung. Durch *in silico* Analysen konnte keinerlei Signalsequenz oder ein entsprechendes Motiv innerhalb von PurA gefunden werden, dass an der Sekretion bzw. der Verankerung des Proteins auf der Oberfläche der Zellen beteiligt sein könnte. Aus diesem Grund wurde die Lokalisation des Proteins in der Zelle mittels Western Blot, FACS-Analyse und mikroskopischer Aufnahmen gezeigt.

Zunächst wurden das Cytoplasma, die Membran und der Überstand einer *S. aureus* Kultur fraktioniert. Alle im Überstand einer ÜNK befindlichen Exoproteine wurden mit Trichloressigsäure gefällt, mit Aceton gewaschen und anschließend stark konzentriert in einen geeigneten Puffer aufgenommen. Für die Trennung von cytoplasmatischen und Membran-ständigen Proteinen wurde die Bakterienzelle mechanisch aufgeschlossen und

beide Proteinfractionen mittels Ultrazentrifugation fraktioniert (siehe 3.5.2). Die so gewonnenen Proben wurden in einer SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt und PurA mit dem in Kapitel 4.3.3 validierten spezifischen polyklonalen Antikörper im Western Blot detektiert.

Wie in Abbildung 35 dargestellt ist die Detektion des Proteins sowohl im untersuchten Stamm *S. aureus* 8325 als auch in HG003 Δspa ausschließlich in der Membranfraktion möglich.

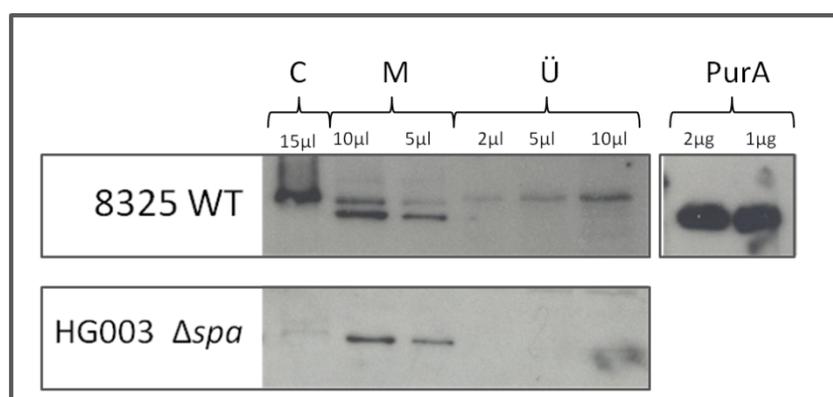


Abbildung 35: Detektion von PurA in der cytoplasmatischen Fraktion (C), der Membran-Fraktion (M) und im Überstand (Ü) einer Bakterienkultur von *S. aureus* 8325 (WT) und einem Protein A-defizienten Stamm HG003 (Δspa) mittels Western Blot-Analyse. Für die Detektion wurden ein spezifischer α -PurA-Antikörper und ein HRP-konjugierter Sekundäntikörper verwendet. C: cytoplasmatische Proteine M: Membranfraktion, Ü: Überstand, PurA: rekombinant hergestelltes PurA, PurA ist zusätzlich durch einen Pfeil markiert. Es wurden unterschiedliche Mengen der einzelnen Fraktionen aufgetragen.

Neben der Western Blot-Analyse wurde mit zwei weiteren unabhängigen Methoden PurA auf der Oberfläche von intakten *S. aureus* Bakterien detektiert. Zum einen wurde PurA in einer Durchflusszytometrie-basierten Untersuchung auf *S. aureus* Newman Δspa mit Hilfe des α -PurA Antikörpers aus Kaninchen und einem Phycoerythrin-konjugierten Sekundär-Antikörper detektiert (siehe Abbildung 36). Zusätzlich dazu wurde die Lokalisation von PurA in einem vergleichbaren Ansatz in den Stämmen *S. aureus* 8325 Δspa und HG003 Δspa untersucht. Es konnte in allen verwendeten Stammhintergründen PurA auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

In einem zweiten Ansatz wurden die Bakterienzellen kurz ohne einen Permeabilisierungsschritt fixiert und anschließend das PurA-Protein ebenfalls mit dem polyklonalen α -PurA Antikörper und einem Alexa647-konjugierten Sekundär-Antikörper detektiert. Die DNA der Bakterien wurde mit Hoechst 33342 angefärbt. Die Bakterien wurden anschließend auf einen Objektträger aufgebracht und mikroskopische Aufnahmen

mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskop (LSM) angefertigt. Wie in Abbildung 36 zu erkennen, konnte eine Lokalisation von PurA in Zellwand-nahen Bereichen dargestellt werden.

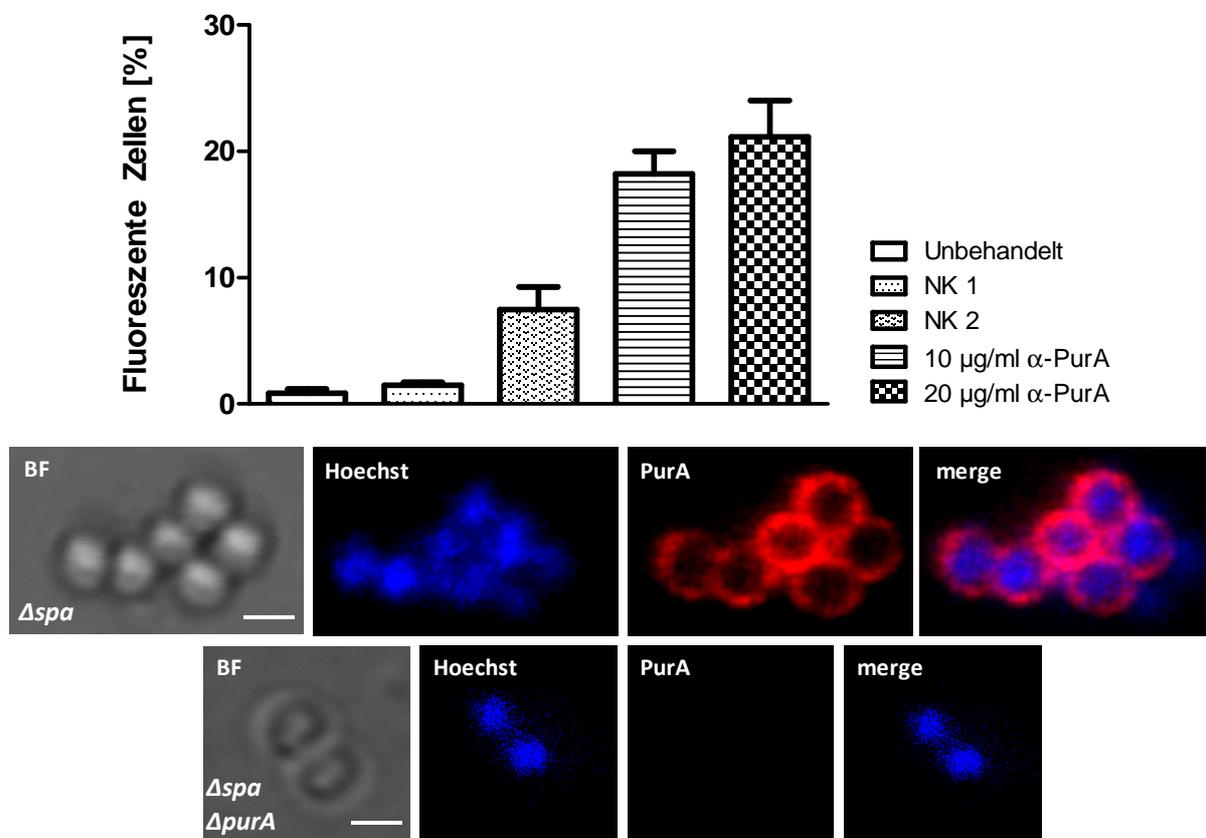


Abbildung 36: Oberflächen-assoziierte Lokalisation von PurA in der Bakterienzelle mittels FACS-Analyse und LSM-Aufnahmen. Oben: FACS-Analyse von PurA auf der Oberfläche von *S. aureus* Newman mit einem spezifischen α -PurA Antikörper und einem PE-konjugierten Sekundärantikörper. Angegeben ist die relative Anzahl fluoreszierender Zellen [%] im Bezug zur Gesamtzellzahl. Dargestellt ist der Mittelwert mit dem zugehörigen Standardfehler aus $n=3$. NK1: ohne Sekundärantikörper, NK2: ohne α -PurA Antikörper. Alle FACS-Analysen wurden ausschließlich mit Protein A (SpA)-defizienten Stämmen durchgeführt. Unten: Mikroskopie-Aufnahmen von *S. aureus* Newman Δspa . Detektion von PurA mit spezifischem Antikörper und Alexa647-konjugiertem Sekundärantikörper. BF: Lichtmikroskopische Aufnahme, Hoechst: spezifische Färbung von DNA, PurA: Detektion mit oben beschriebenen Antikörpern, *merge*: Überlagerung beider fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen. Messbalken entspricht 1 µm.

4.3.10 *In-vivo*-Expression von PurA

Nachdem PurA auf der Oberfläche von *S. aureus* nachgewiesen und die Expression des *purA* Gens bereits unter *in-vitro*-Kulturbedingungen gezeigt werden konnte, wurde in diesem Abschnitt die *in-vivo*-Expression untersucht.

Als Maß für die Expression *in vivo* gilt der Nachweis von spezifischen Antikörpern in humanem bzw. tierischem Serum von Organismen mit bereits bestehender

Antikörperantwort. Dies beruht darauf, dass eine spezifische Antikörperantwort ausschließlich gegen die Fremd-Proteine gebildet werden kann, die auch tatsächlich *in vivo* exprimiert werden. Der Nachweis von Antikörpern gegen bakterielle Proteine im Serum gilt als Indikator für eine Expression während der Kolonisierung bzw. Infektion des Wirtes.

Aus diesem Grund wurde hier die Bindung von spezifischen Antikörpern aus einem IVIg (intravenöse Immunglobuline)-Produkt Gamunex® (Grifols Deutschland GmbH, Frankfurt) und aus einer Mischung aus Seren von humanen Spendern mit einer *S. aureus* Infektion (R-IVIg) auf spezifische Antikörper gegen PurA in einem ELISA-basierten Versuchsansatz getestet. Die Detektion erfolgte hier mittels eines humanspezifischen, HRP-konjugierten Sekundärantikörpers.

Wie in Abbildung 37 dargestellt, konnten in Gamunex® und R-IVIg spezifische Antikörper gegen PurA gefunden werden. Dies lässt darauf schließen, dass PurA unter *in-vivo*-Bedingungen exprimiert wird.

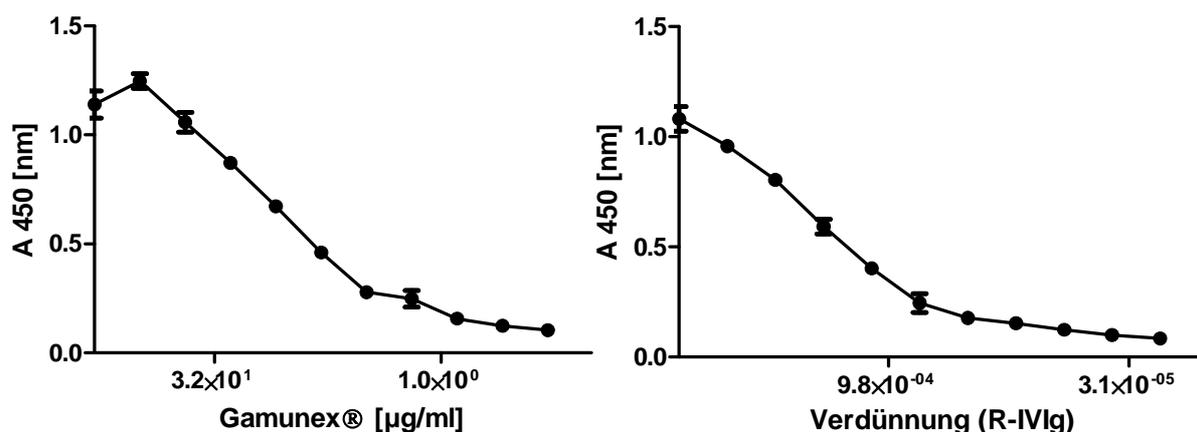


Abbildung 37: Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen PurA. Bindung von Antikörpern an immobilisiertes PurA aus zwei verschiedenen IVIG-Präparaten (Gamunex® [links], R-IVIg [rechts]). In beiden IVIG-Präparaten konnten spezifische Antikörper gegen PurA nachgewiesen werden.

Um den Zusammenhang zwischen dem Kolonisierungsstatus und der Bildung von spezifischen Antikörpern gegen PurA detaillierter zu beleuchten, wurde neben der Analyse von zwei IVIg-Präparaten eine weitere Titerbestimmung mit Plasmen von 16 Trägern, die nasal mit *S. aureus* kolonisiert waren, und 16 Nichtträgern durchgeführt. Die Plasmen der Träger und Nicht-Träger wurden von Prof. Barbara Bröker (Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Greifswald) zur Verfügung gestellt. Die Titerbestimmung wurde hierbei analog zur vorherigen Analyse (s.o.) durchgeführt.

Vor der Gewinnung der humanen Plasmen wurden die gesunden Probanden zweimal im Abstand von 4 Wochen auf ihren Kolonisierungsstatus hin überprüft. Für diese Untersuchung wurden Nasenabstriche angefertigt. Als Träger wurden nur solche Personen ausgewählt, bei denen in beiden Untersuchungen *S. aureus* in der Nasenschleimhaut nachgewiesen werden konnte. Als Nicht-Träger wurden nur die Probanden klassifiziert, deren Nasenabstriche im Versuchszeitraum durchgehend negativ auf *S. aureus* getestet wurden. Die daraus resultierenden Ergebnisse sind in Abbildung 38 zusammengestellt.

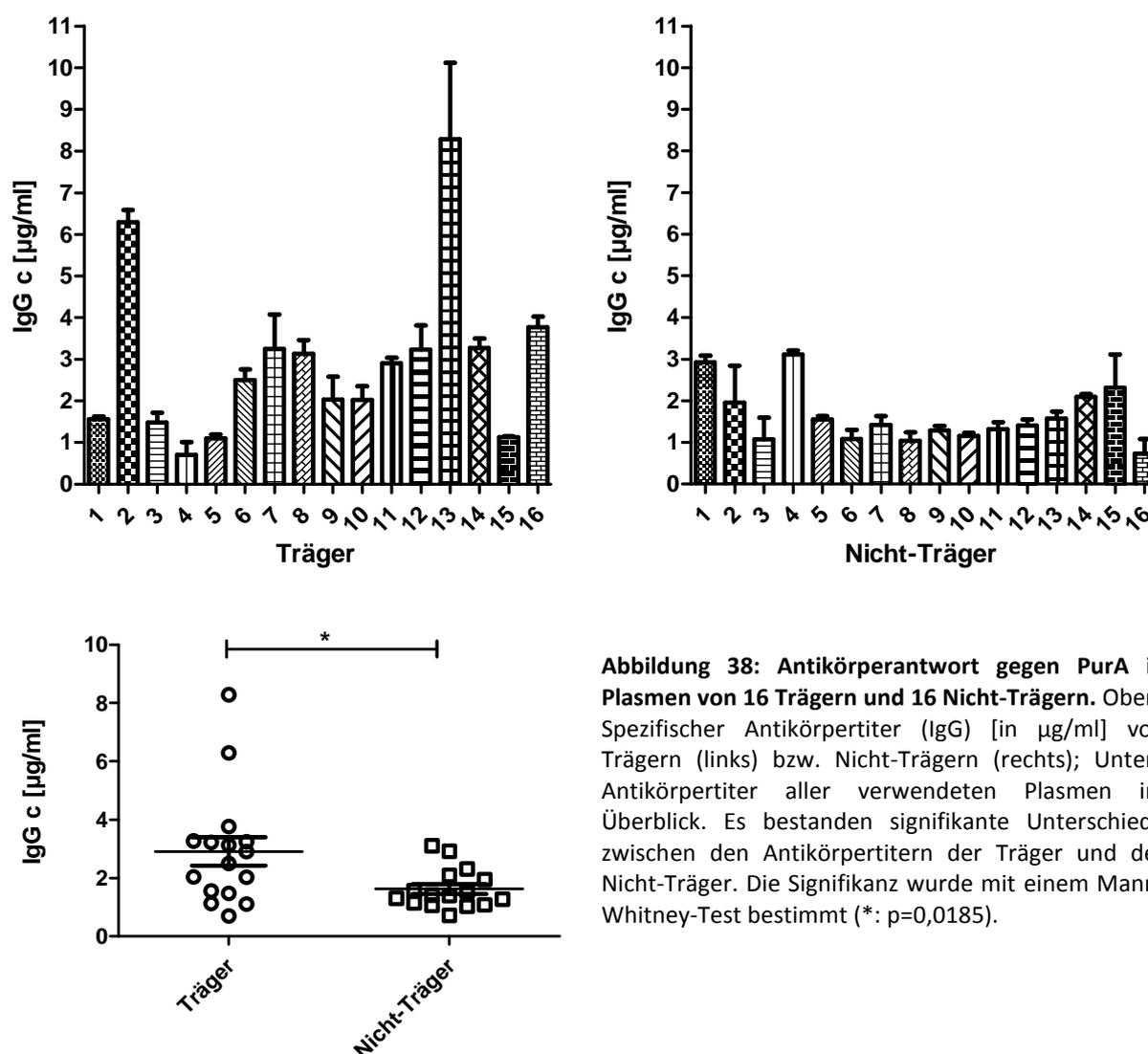


Abbildung 38: Antikörperantwort gegen PurA in Plasmen von 16 Trägern und 16 Nicht-Trägern. Oben: Spezifischer Antikörpertiter (IgG) [in µg/ml] von Trägern (links) bzw. Nicht-Trägern (rechts); Unten: Antikörpertiter aller verwendeten Plasmen im Überblick. Es bestanden signifikante Unterschiede zwischen den Antikörpertitern der Träger und der Nicht-Träger. Die Signifikanz wurde mit einem Mann-Whitney-Test bestimmt (*: $p=0,0185$).

Bei dieser Untersuchung konnte ein signifikanter Unterschied in der Antikörperantwort der beiden Versuchsgruppen festgestellt werden. Personen, die nasal mit *S. aureus* kolonisiert waren (Träger), haben einen deutlich höheren Antikörpertiter als Personen der Vergleichsgruppe. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass PurA von *S. aureus in vivo* exprimiert wird.

4.3.11 Charakterisierung *purA*-defizienter *S. aureus*-Stämme *in vitro*

Um den Einfluss von PurA auf das Wachstum und die Biofilm-Bildung von *S. aureus* zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit *purA*-defiziente *S. aureus*-Stämme *in vitro* untersucht.

Für diese Untersuchungen wurde zunächst eine *purA*-Mutante in verschiedenen *S. aureus* Hintergründen hergestellt. Als Grundlage für die Mutante diente die NARSA Transposon Mutanten Bibliothek des *Medical Center* der Universität von Nebraska (UNMC; USA). Diese Sammlung enthält Mutanten für annähernd jedes nicht-essentielle Gen von *S. aureus* und umfasst mehrere tausend *S. aureus* USA300 JE2 Stämme, bei denen jeweils ein Gen durch Insertion eines *mariner based* Transposons deletiert wurde.

Für die Charakterisierung der $\Delta purA$ -Mutante wurde der entsprechende Stamm (*S. aureus* USA300 JE2 NE529) zunächst aus der Bibliothek ausgestrichen, die korrekte Insertion des Transposons mittels PCR überprüft und das Transposon anschließend per Phagentransduktion in verschiedene *S. aureus*-Stammhintergründe transduziert. Abbildung 39 zeigt die Insertion des Transposons in *purA*.



Abbildung 39: Insertion des *mariner based* Transposons in *purA*

Nach der Transduktion wurde das Wachstum der Insertionsmutante im Vergleich zu dessen wildtypischen Stamm in unterschiedlichen Kulturmedien über einen Zeitraum von 24 Stunden untersucht. Wie in Abbildung 40 zusammengestellt, konnte abhängig vom verwendeten Medium ein signifikanter Wachstumsunterschied beobachtet werden. Werden die jeweiligen Stämme in TSB-Medium angezogen, erreichen die Mutanten die stationäre Phase bei einer niedrigeren optischen Dichte als die wildtypischen Kontrollstämme.

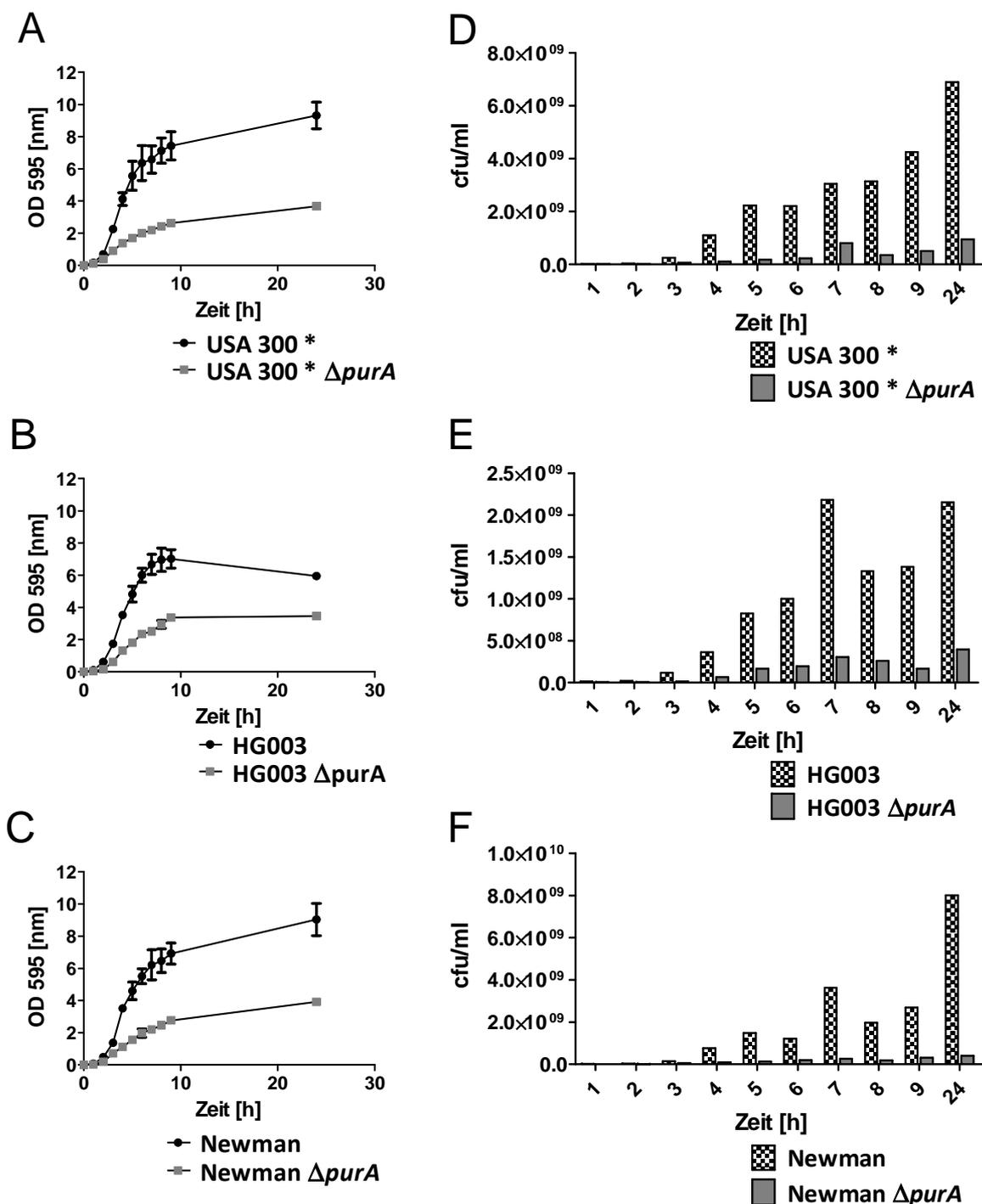


Abbildung 40: Wachstum und Anzahl der koloniebildenden Einheiten von *S. aureus* USA300 LAC*, HG003 und Newman mit der jeweils zugehörigen *purA*-Mutante in TSB. A-C: Optische Dichte (OD_{595}) der Bakterienkultur in TSB-Medium, D-F: Anzahl der koloniebildenden Einheiten (CFU/ml) der untersuchten Stämme. Signifikante Unterschiede im Wachstum (A-C) wurden zwischen dem jeweiligen wildtypischen Stamm und der zugehörigen Mutante bestimmt. (USA300*: $p=0,0099$; HG003: $p=0,0083$; Newman: $p=0,0285$ mit ungepaartem t-Test)

Neben der Analyse des Bakterienwachstums wurden die koloniebildenden Einheiten in TSB an verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums untersucht. Für diese Analyse wurde jeweils

eine Probe aus der Bakterienkultur in PBS verdünnt und anschließend auf LB-Agar ausplattiert. Wie in Abbildung 40 dargestellt, ist die Anzahl an koloniebildenden Einheiten (CFU, *colony forming units*) der Mutanten im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp deutlich geringer. Dabei ist zu erkennen, dass *purA*-defiziente Stämme im Vergleich zum Wildtyp einen Wachstumsdefekt aufweisen. Dieses Wachstumsdefizit wurde jedoch im zudem getesteten B-Medium nicht beobachtet (siehe Abbildung 41). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Zusammensetzung des Mediums einen Einfluss auf das Wachstum der *purA*-defizienten Bakterien hat.

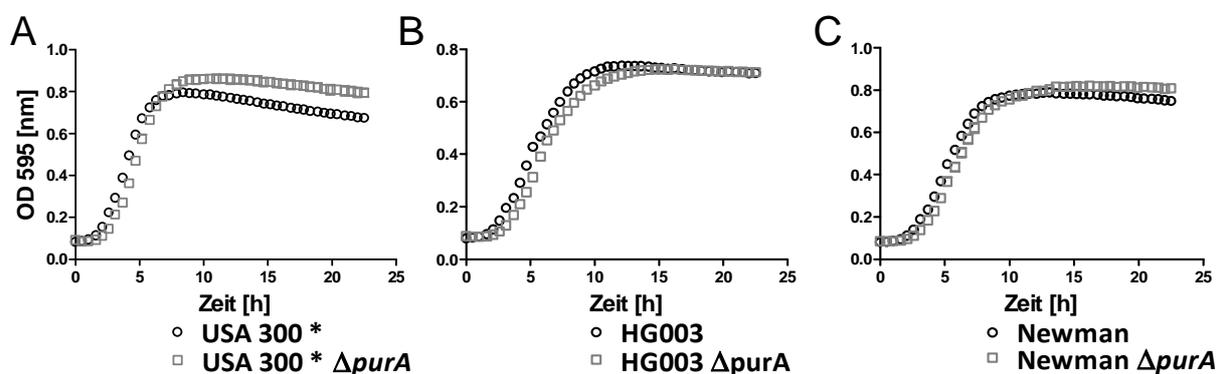


Abbildung 41: Wachstum von *S. aureus* USA300 LAC*, HG003 und Newman mit der jeweils zugehörigen *purA*-Mutante in B-Medium. A-C: Optische Dichte (OD₅₉₅) der Bakterienkultur in B-Medium. Es sind keine signifikanten Unterschiede im Wachstum zwischen dem jeweiligen wildtypischen Stamm und der zugehörigen Mutante zu erkennen.

Zusätzlich zur *in-vitro*-Wachstumsanalyse wurde das Potential von *purA*-defizienten Stämmen zur Biofilmbildung untersucht. Für diese Analyse wurden Zellsuspensionen vom wildtypischen Stamm und von der zugehörigen PurA-Mutante auf TSB-Agarplatten ausplattiert, die mit 100 mM MgCl₂ versetzt wurden. Dieses Medium bedingt die Ausbildung von Biofilmen in Makrokolonien nach 5tägiger Inkubation bei 37 °C. Wie in Abbildung 42 gezeigt, sind deutliche Unterschiede in der Bildung der Makrokolonien zu beobachten. Zum einen sind die Kolonien der PurA-Mutante deutlich kleiner als die des wildtypischen Stammes. Außerdem sind Unterschiede in der Färbung und der 3-dimensionalen Struktur der Kolonien zu erkennen. Die Ergebnisse dieser Analyse deuten auf einen Defekt der PurA-Mutante bei der Biofilmbildung hin, der wahrscheinlich in dem generellen Wachstumsdefekt in TSB-Medium begründet ist.

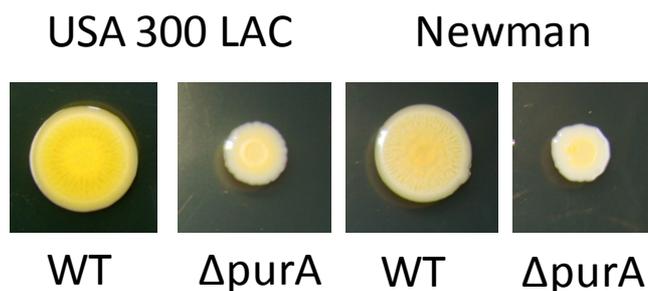


Abbildung 42: Makrokoloniebildung von *S. aureus* USA 300 LAC (JE2) und Newman sowie den zugehörigen $\Delta purA$ -Mutanten. Es wurden 2 μ l einer Bakterienkultur auf TSBMg-Agarplatten aufgetropft und diese anschließend bei 37 °C für 5 Tage inkubiert. Die *purA*-defizienten Stämme bilden deutlich kleinere Makrokolonien aus und sind im Vergleich zum wildtypischen Stamm heller gefärbt.

4.3.12 Virulenz *purA*-defizienter *S. aureus*-Stämme in *Galleria mellonella*

Neben der Wachstumsanalyse *in vitro* wurde überprüft, ob die Deletion von *purA* auch einen Einfluss auf die Kolonisierung eines Wirtes und das Überleben *in vivo* hat. Um das Virulenzpotential der *purA*-Mutante besser abschätzen zu können, wurde ein alternatives Tiermodell verwendet. In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass sich Wachsmottenlarven von *Galleria mellonella* eignen, um die Virulenz verschiedener Pathogene (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *S. aureus*) zu analysieren. [136–138]

Für die Analyse der Virulenz wurde in dieser Arbeit eine definierte Menge *S. aureus* Wildtyp-Stamm bzw. die entsprechende Mutante in das letzte Beinsegment der Larven im letzten Larvenstadium injiziert. Dabei wurde die Überlebensrate der Mottenlarven über mehrere Tage analysiert, wobei die Verfärbung der Larven von weiß nach schwarz als Anzeichen für die Mortalität gewertet wurde.

Der Verlauf der Infektion ist in Abbildung 43 in Form von Kaplan-Meier-Kurven und als prozentualer Anteil lebender Larven zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion dargestellt. Vergleicht man die unterschiedlichen *S. aureus*-Stammhintergründe Newman und USA300 LAC*, so wird ein signifikanter Unterschied im Überleben der Wachsmottenlarven deutlich. Dabei ist die Virulenz der $\Delta purA$ -Mutante in beiden Stammhintergründen deutlich attenuiert. Während z.B. 30 Stunden nach der Infektion noch alle mit der *purA*-Mutante infizierten Larven leben, leben nur noch ca. 50 % der mit *S. aureus* Newman infizierten Larven und knapp 20 % der mit *S. aureus* USA300 LAC* infizierten

Mottenlarven. Beim Vergleich der beiden Wildtyp-Stämme wird zusätzlich deutlich, dass USA300 LAC* wesentlich virulenter ist als *S. aureus* Newman.

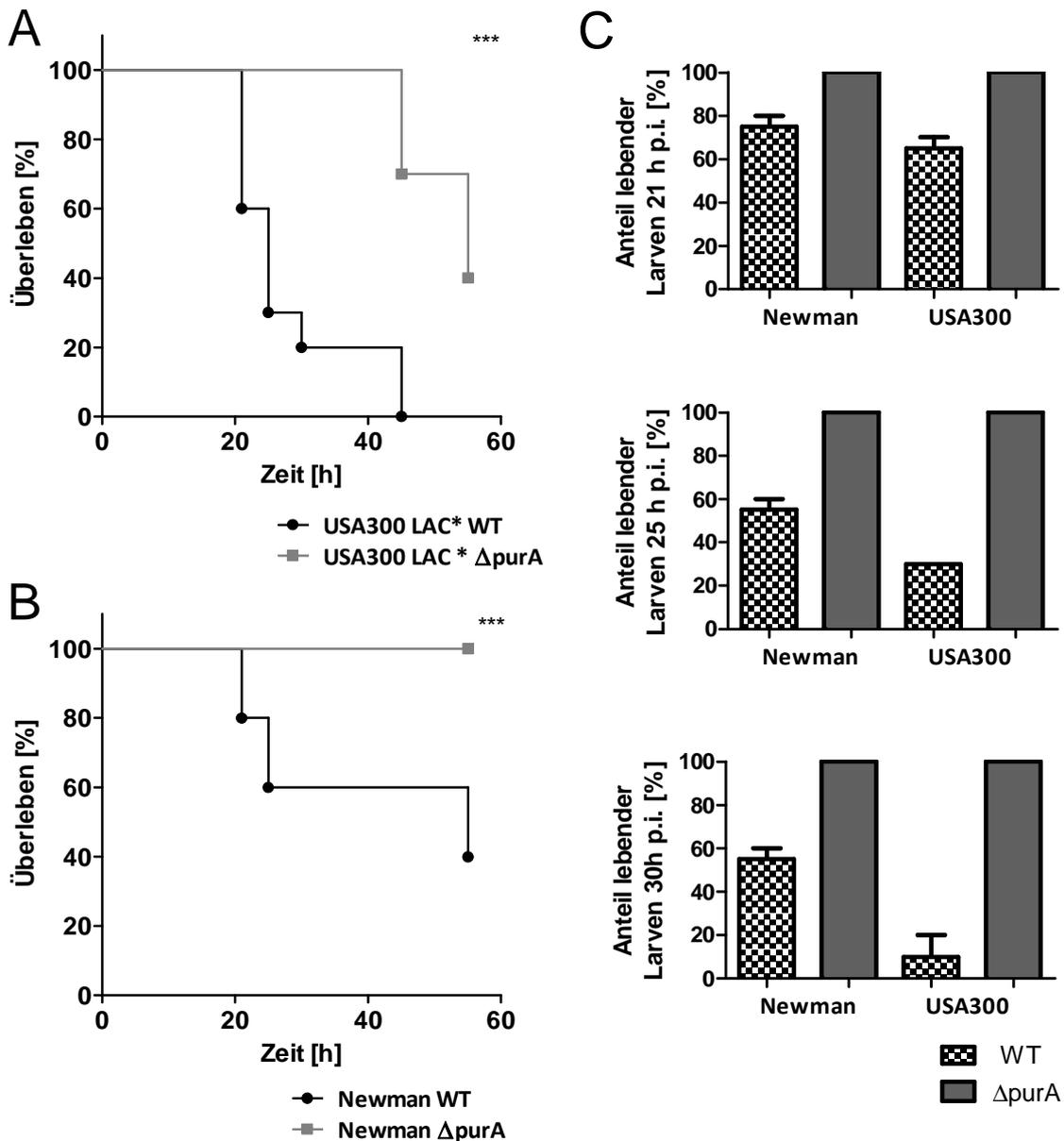


Abbildung 43: Virulenz von *S. aureus* Wildtyp (WT) und $\Delta purA$ in *Galleria mellonella* Larven. A+B: Kaplan-Meier Überlebenskurven von *S. aureus* Newman WT und $\Delta purA$ bzw. USA300 LAC* und $\Delta purA$. C: Prozentualer Anteil der überlebenden Larven zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion. Das Überleben der Mottenlarven, die mit dem jeweiligen Wildtyp-Stamm infiziert wurden ist signifikant geringer als das der Larven, die mit der isogenen *purA*-Mutante infiziert wurden [$p < 0,001$ (***)], Logrank(Mantel-Cox)-Test].

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Deletion von PurA den Infektionsverlauf deutlich abmildert, wodurch eine höhere Überlebensrate der Motte resultiert.

4.3.13 Charakterisierung weiterer Mutanten des *pur*-Operons

Es konnte gezeigt werden, dass PurA neben der Funktion in der Purin-Biosynthese eine weitere unabhängige Funktion in der Immunevasion übernimmt. Da eine verminderte Virulenz der *purA*-defizienten Stämme in *Galleria mellonella* beobachtet wurde, sollte im Folgenden untersucht werden, ob der Defekt in der Purinbiosynthese oder in der Immunevasion für die verringerte Virulenz entscheidend ist.

Dazu wurde zunächst das *in-vitro*-Wachstum und die Virulenz in *Galleria mellonella* von anderen Mutanten aus dem *pur*-Operon charakterisiert. Das *pur*-Operon codiert für 11 Gene, die alle an der Purin-Biosynthese beteiligt sind und in diesem Stoffwechselweg eine katalytische Funktion übernehmen. Außerhalb des Operons sind drei weitere Gene lokalisiert, die ebenfalls an diesem Biosyntheseweg beteiligt sind. Hierzu gehören die Gene *purA* und *purB*, wobei letzteres für ein bifunktionales Protein codiert, das zwei unabhängige Schritte innerhalb der Purin-Synthese katalysiert. Zusätzlich dazu findet sich das Gen *purR* im Genom von *S. aureus*, das für einen Repressor codiert. Die Übersicht über die an der Purin-Synthese beteiligten Gene sind in Abbildung 44 dargestellt.

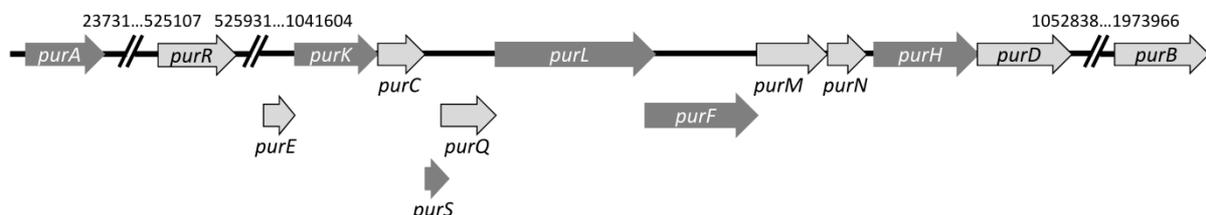


Abbildung 44: Übersicht über Lokalisation und Anordnung aller an der Purin-Biosynthese beteiligten *pur*-Gene innerhalb des Genoms von *S. aureus* N315. Alle Mutanten mit *in vitro* Wachstumsdefekt sind in dunkelgrau dargestellt.

Für die Überprüfung der Hypothese, ob die verminderte Virulenz der *purA*-defizienten Stämme in der gestörten Purin-Synthese begründet ist, wurde zunächst die NARSA Transposon Mutanten Bibliothek nach Mutanten der an der Purin-Synthese beteiligten Gene durchsucht. Dabei konnten Einzelmutanten für alle Gene im *pur*-Operon und alle assoziierten Gene mit Ausnahme von *purE* gefunden werden. Bei allen aus der Sammlung verwendeten Mutanten wurde die korrekte Integration des Transposons mittels PCR überprüft.

In einem ersten Ansatz wurde eine vergleichende Analyse des *in-vitro*-Wachstums aller Mutanten zusammen mit dem Wildtyp in TSB angefertigt. Wie für die $\Delta purA$ -Mutante bereits gezeigt (siehe Kapitel 4.3.11), wurde auch für die Mutanten $\Delta purF$, $\Delta purH$, $\Delta purK$, $\Delta purL$ und $\Delta purS$ ein Wachstumsdefekt beobachtet (siehe Abbildung 45). Alle weiteren getesteten Stämme ($\Delta purB$, $\Delta purC$, $\Delta purD$, $\Delta purM$, $\Delta purN$, $\Delta purQ$ und ΔpuR) zeigen ein mit dem Wildtyp vergleichbares Wachstum. Die quantitative Überprüfung dieses Ergebnisses über die Analyse der koloniebildenden Einheiten bestätigt diese Beobachtung (siehe Abbildung 46). Bei der Analyse der koloniebildenden Einheiten zeigen die Mutanten $\Delta purF$, $\Delta purH$, $\Delta purK$, $\Delta purL$ und $\Delta purS$ über den gesamten Versuchszeitraum eine signifikant geringere Anzahl an koloniebildenden Einheiten. Des Weiteren wurden diese Beobachtungen durch einen unabhängig durchgeführten *Spot-Assay* bestätigt. Dazu wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Bakterienwachstums Proben aus der Kultur entnommen und in PBS verdünnt. Jeweils 2 μ l dieser Verdünnungen wurde auf eine Agarplatte aufgetropft. Nach der Inkubation der Platten bei 37 °C zeigte sich eine deutlich geringe Anzahl an koloniebildenden Einheiten für die Mutanten $\Delta purF$, $\Delta purH$, $\Delta purK$, $\Delta purL$ und $\Delta purS$ (siehe Abbildung 47.)

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Analyse, dass die Gene $\Delta purF$, $\Delta purH$, $\Delta purK$, $\Delta purL$ und $\Delta purS$ der Purin-Synthese Einfluss auf das *in-vitro*-Wachstum von *S. aureus* nehmen. Der beobachtete Wachstumsdefekt ist zudem vergleichbar mit dem der *purA*-defizienten Stämme. Sollte der Defekt in der Purinsynthese für den beobachteten Virulenzdefekt verantwortlich sein, sollten auch die Mutationen in den Genen $\Delta purF$, $\Delta purH$, $\Delta purK$, $\Delta purL$ und $\Delta purS$ wie auch $\Delta purA$ einen Einfluss auf die Virulenz haben.

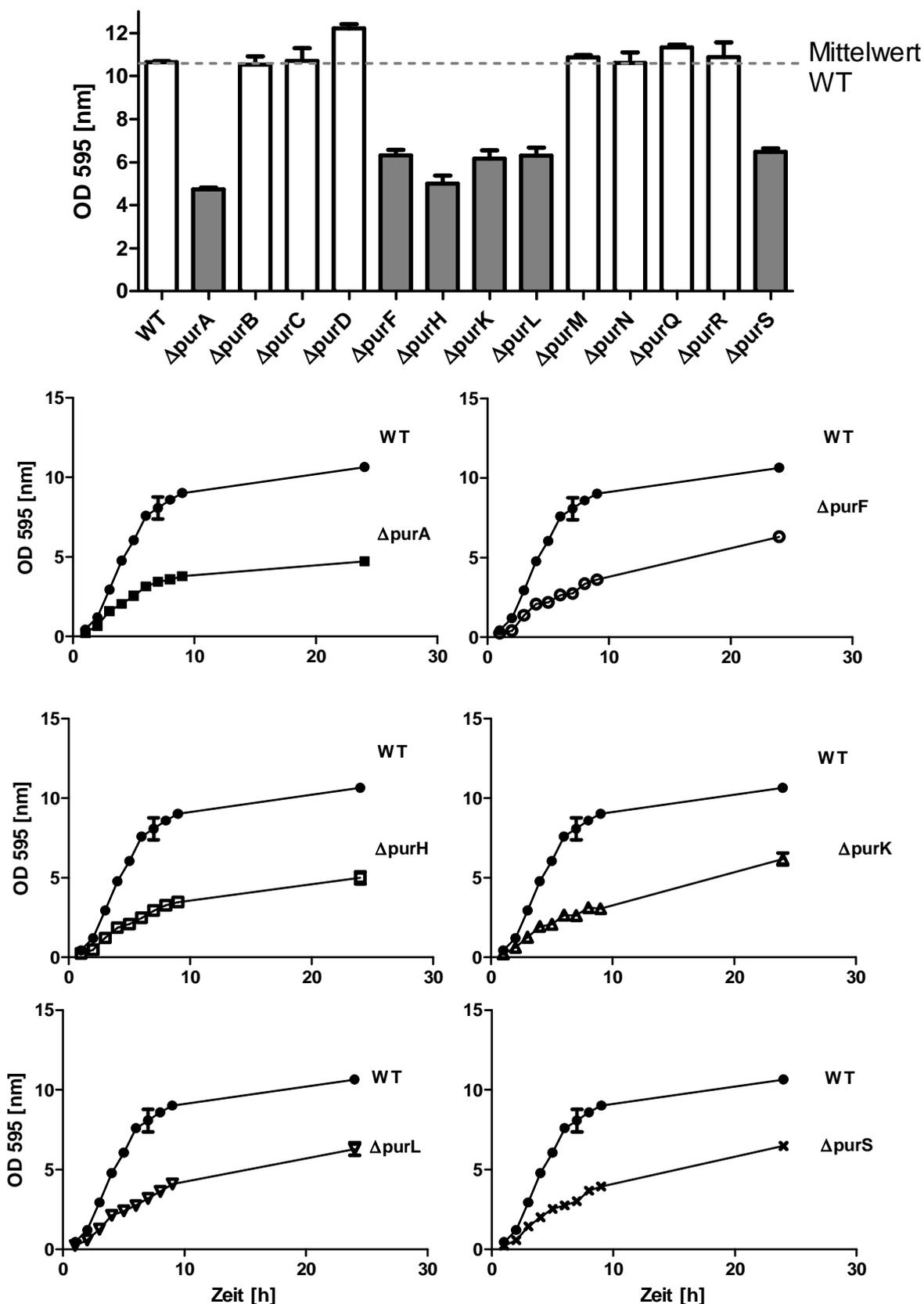


Abbildung 45: Wachstum (OD₆₀₀) von *S. aureus* USA300 JE2 (WT) und den isogenen Einzelmutanten des Purin-Synthesewegs ($\Delta purA$ - $\Delta purS$). Oben: Vergleich der optischen Dichte (OD₆₀₀) aller getesteten Stämme nach 24-stündiger Inkubation. $\Delta purA$, $\Delta purF$, $\Delta purH$, $\Delta purK$, $\Delta purL$ und $\Delta purS$ zeigen eine signifikant geringere OD₆₀₀ verglichen mit dem WT. Unten: Wachstum von $\Delta purA$, $\Delta purF$, $\Delta purH$, $\Delta purK$, $\Delta purL$ und $\Delta purS$ über einen Zeitraum von 24 h verglichen mit dem WT. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit dem zugehörigen Standardfehler aus n=2.

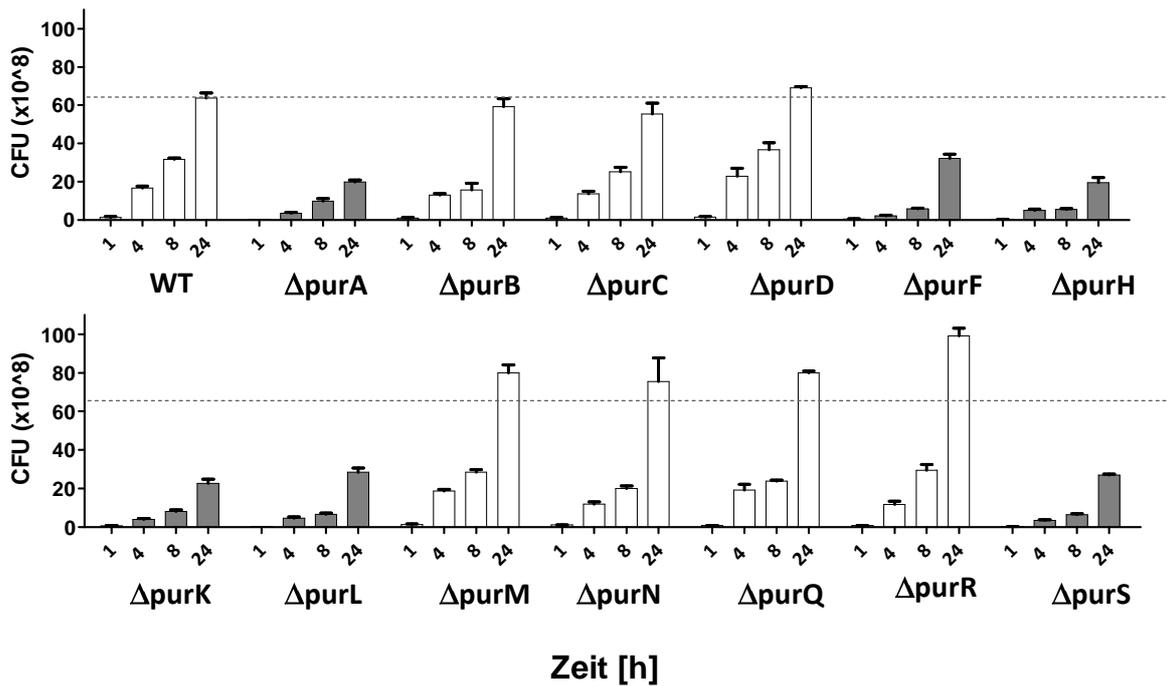


Abbildung 46: Anzahl der koloniebildenden Einheiten von *S. aureus* USA300 JE2 (WT) und den isogenen Mutanten, die jeweils eine Mutation in einem Gen des Purin-Synthesewegs ($\Delta purA$ - $\Delta purS$) enthalten. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten wurde 1, 4, 8 und 24 h nach Start der Inkubation in TSB-Medium bestimmt. Die Mutanten mit einem deutlichen Wachstumsdefekt sind in grau dargestellt. Die Kulturen der Mutanten $\Delta purA$, $\Delta purF$, $\Delta purH$, $\Delta purK$, $\Delta purL$ und $\Delta purS$ enthalten zu allen gemessenen Zeitpunkten signifikant weniger koloniebildende Einheiten als der Wildtyp. (für den Messpunkt 24 h: $p < 0,0001$, One-way ANOVA mit angeschlossener *Bonferroni's* Multiple Comparison Test); Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit dem zugehörigen Standardfehler aus $n=4$. Die gestrichelte Linie entspricht dem Mittelwert des Wildtyps nach 24 h.

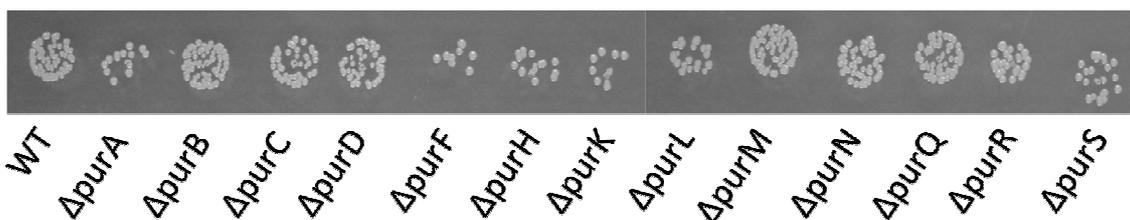


Abbildung 47: Spot Assay von *S. aureus* USA300 JE2 (WT) und den isogenen Einzelmutanten des Purin-Synthesewegs ($\Delta purA$ - $\Delta purS$). Die Stämme wurden für 8 h in TSB-Medium inkubiert, anschließend in PBS bis zu einer Verdünnung von 10^6 verdünnt und jeweils 2 μ l dieser Verdünnung auf eine TSB-Platte aufgetropft. Im Anschluss daran wurde die Platte erneut für 18 h bei 37 °C inkubiert und das Ergebnis fotografisch dokumentiert.

Im Anschluss an die Charakterisierung des *in-vitro*-Wachstums wurde die Virulenz aller Mutanten der Purinsynthese ($\Delta purA$ - $\Delta purS$) *in vivo* in *Galleria mellonella* untersucht.

Für diese Analyse wurden 10 Tiere pro Gruppe mit einer Infektionsdosis von 5×10^6 Bakterien/Mottenlarve infiziert und über einen Zeitraum von 29 h beobachtet. Die

Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 48 zusammengestellt. Die Virulenz der Mutanten mit einem Defekt in der Purin-Synthese sind mit der Virulenz des wildtypischen Stammes weitestgehend vergleichbar, obwohl für die Stämme von $\Delta purF$, $\Delta purH$, $\Delta purK$, $\Delta purL$ und $\Delta purS$ ein attenuiertes *in-vitro*-Wachstum beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 45 und Abbildung 46) Lediglich bei der $\Delta purA$ Mutante konnte ein reduziertes Virulenzpotential beobachtet werden.

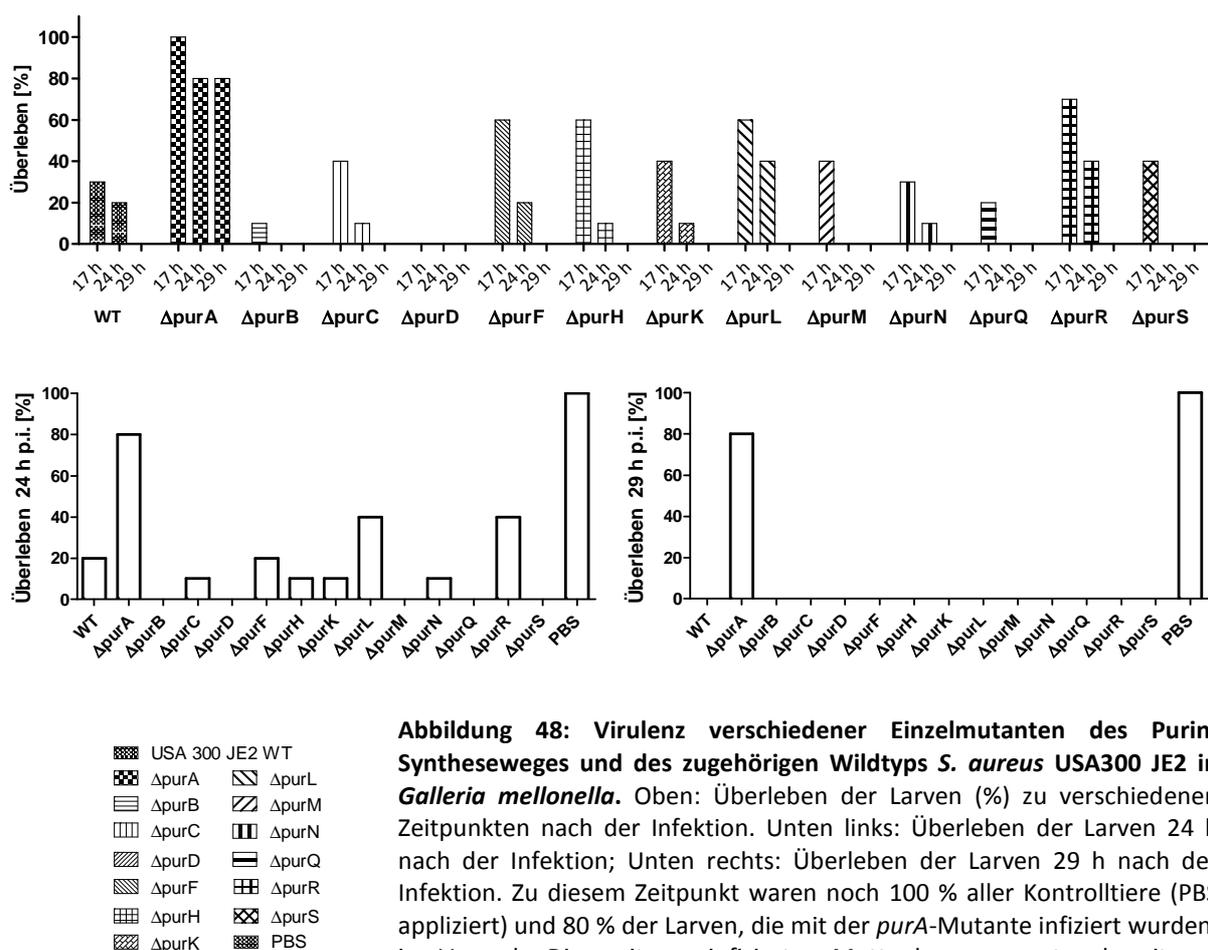


Abbildung 48: Virulenz verschiedener Einzelmutanten des Purin-Syntheseweges und des zugehörigen Wildtyps *S. aureus* USA300 JE2 in *Galleria mellonella*. Oben: Überleben der Larven (%) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion. Unten links: Überleben der Larven 24 h nach der Infektion; Unten rechts: Überleben der Larven 29 h nach der Infektion. Zu diesem Zeitpunkt waren noch 100 % aller Kontrolltiere (PBS appliziert) und 80 % der Larven, die mit der *purA*-Mutante infiziert wurden, im Versuch. Die weiteren infizierten Mottenlarven mussten bereits an vorherigen Zeitpunkten aus dem Versuch genommen werden.

Zusammenfassend betrachtet zeigte die Charakterisierung der untersuchten Mutanten einen Zusammenhang zwischen der Deletion einzelner für den Purin-Stoffwechsel verantwortlichen Gene und dem *in-vitro*-Wachstum. Neben $\Delta purA$ konnten fünf weitere Gene identifiziert werden ($\Delta purF$, $\Delta purH$, $\Delta purK$, $\Delta purL$ und $\Delta purS$), deren Deletion zu einem vermindertem Wachstum in TSB-Medium führt (siehe Abbildung 45). Zusätzlich dazu wurde das Virulenzpotential der bereits *in vitro* charakterisierten Stämme untersucht. Die Virulenz

in *Galleria mellonella* war in allen Stämmen, mit Ausnahme von $\Delta purA$, unverändert. Demnach scheint der Defekt im *in-vitro*-Wachstum keinen Einfluss auf den Infektionsverlauf zu haben. Eventuell stehen *in vivo* andere Nährstoffe zur Verfügung, so dass ein Defekt an bestimmten Stellen in der Purin-Biosynthese für das Überleben *in vivo* nicht relevant ist. Demzufolge besteht wahrscheinlich kein direkter Zusammenhang zwischen der verminderten Virulenz in *Galleria mellonella* und dem Defekt im Metabolismus, der durch die Mutation in *purA* entsteht.

4.3.14 Virulenz *purA*-defizienter *S. aureus*-Stämme im Mausmodell

Im alternativen Tiermodell *Galleria mellonella* wurde, wie in Kapitel 4.3.12 gezeigt, eine deutliche Attenuation der Virulenz von *purA*-defizienten Stämmen beobachtet. Diese verminderte Virulenz scheint von der Beeinträchtigung im Metabolismus unabhängig zu sein. Aus diesem Grund wurde das Virulenzpotential der *purA*-Mutante im Mausmodell untersucht. Dabei sollte analysiert werden, ob sich die Beobachtungen hinsichtlich des Virulenzpotentials der *purA*-defizienten Stämme aus dem *Galleria*-Modell auch auf ein Säugetiermodell übertragen lassen. Dazu wurden weibliche Balb/c Mäuse (n=10) intranasal mit 1×10^8 *S. aureus* Newman Wildtyp bzw. Newman $\Delta purA$ infiziert, um eine Infektion der Lunge hervorzurufen (Pneumonie-Überlebensversuch). Während des Versuches wurde einmal täglich das Gewicht überprüft und die Tiere hinsichtlich Belastung und allgemeinem Gesundheitszustand untersucht (siehe Methoden 3.16.5). Mit Hilfe der gewonnenen Daten wurde eine Überlebenskurve nach Kaplan-Meier angefertigt und die Daten mittels eines LogRank-Tests ausgewertet (siehe Abbildung 49).

Betrachtet man das Gewicht der Versuchstiere in Abbildung 49 (links), so ist zu erkennen, dass die Versuchstiere beider Gruppen im Verlauf der Infektion zunächst an Gewicht verlieren. Während sich das Gewicht der Kontrollgruppe jedoch innerhalb von 3 Tagen stetig reduzierte, ist eine deutliche Gewichtszunahme in der Gruppe, die die *purA*-Mutante appliziert bekam, erkennbar. Dieser deutlich mildere Infektionsverlauf spiegelt sich auch in der Überlebenskurve wider (siehe Abbildung 49, rechts). Es ist zu erkennen, dass in der *purA*-Gruppe, 90 % der Tiere den Versuchszeitraum überlebten, während in der Vergleichsgruppe, die mit dem Wildtyp infiziert wurde, nur 20 % der Tiere nach drei Tagen noch vital waren.

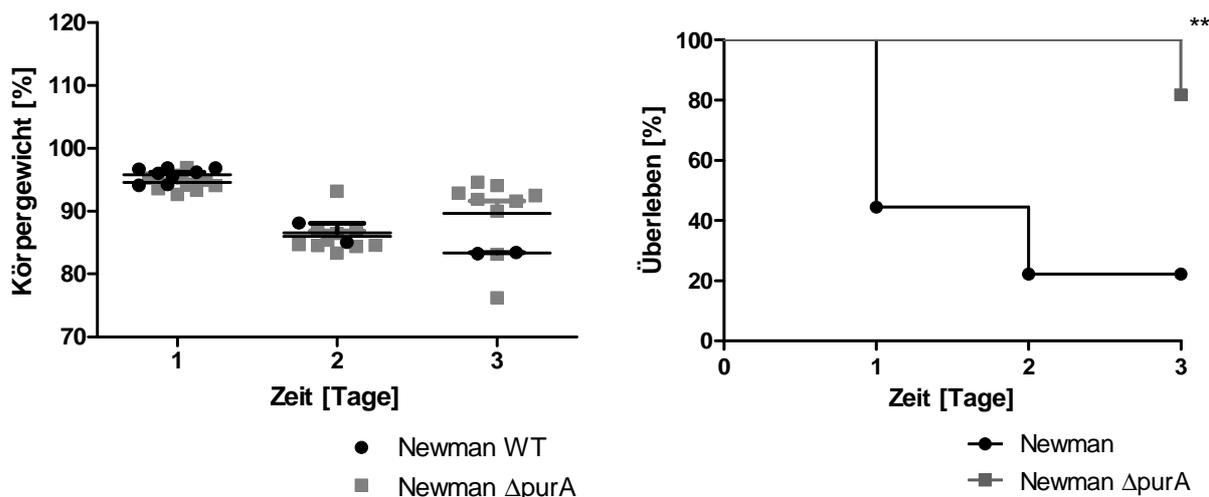


Abbildung 49: Virulenz von *S. aureus* Newman und Newman $\Delta purA$ im Pneumonie-Überlebensversuch in Balb/c Mäusen (n=10). Die Versuchstiere wurden mit 1×10^8 CFU inokuliert und das Gewicht und das Überleben in 24h-Intervallen dokumentiert. Links: Körpergewicht der im Versuch befindlichen Tiere 1-3 Tage nach der Infektion. Rechts: Kaplan-Meier-Überlebenskurven über einen Versuchszeitraum von 3 Tagen. Die Signifikanz wurde mit einem Log-Rank-Tests (Mantel-Cox) ermittelt [$p=0,0019$ (***)].

Weiterhin wurde untersucht, ob die Deletion von *purA* auch einen Einfluss auf die Virulenz im systemischen Infektionsmodell (Sepsis-Modell) hat, bei dem die Bakterien direkt in den Blutkreislauf appliziert werden, so dass sie direkt mit dem Komplementsystem in Kontakt kommen. Dazu wurden 5×10^7 Bakterien über die Schwanzvene von weiblichen Balb/c Mäusen (n=10) injiziert. Für diesen Versuch wurden die Stämme *S. aureus* USA300 LAC* Wildtyp und die isogene *purA*-Mutante verwendet. Wie zuvor beschrieben, wurde während des gesamten Versuches das Gewicht und der Gesundheitszustand der Tiere überprüft, dokumentiert und diese konform den Abbruchkriterien aus dem Versuch genommen (siehe Methoden 3.16.5). Wie in Abbildung 50 gezeigt, gibt es signifikante Unterschiede ($p < 0,001$ ***, Mann-Whitney-Test) zwischen den Gewichten der beiden Versuchsgruppen. Innerhalb von zwei Tagen nach der Infektion ist eine Gewichtsreduktion der mit dem wildtypischen Stamm infizierten Tiere zu erkennen. In der Gruppe, die mit der Mutante infiziert wurde, konnte zu dem Zeitpunkt bereits wieder eine Gewichtszunahme im Vergleich zum Vortag beobachtet werden. Die erstellten Überlebenskurven der Tiere in diesem Versuch bestätigen die bereits aus den Gewichten resultierenden Ergebnisse. Während alle mit der Mutante infizierten Tiere bis drei Tage nach der Infektion überlebt haben, mussten bis zu diesem Zeitpunkt bereits 80 % der Kontrolltiere aus dem Versuch genommen werden, die mit dem Wildtyp-Stamm *S. aureus* USA300 LAC* infiziert wurden.

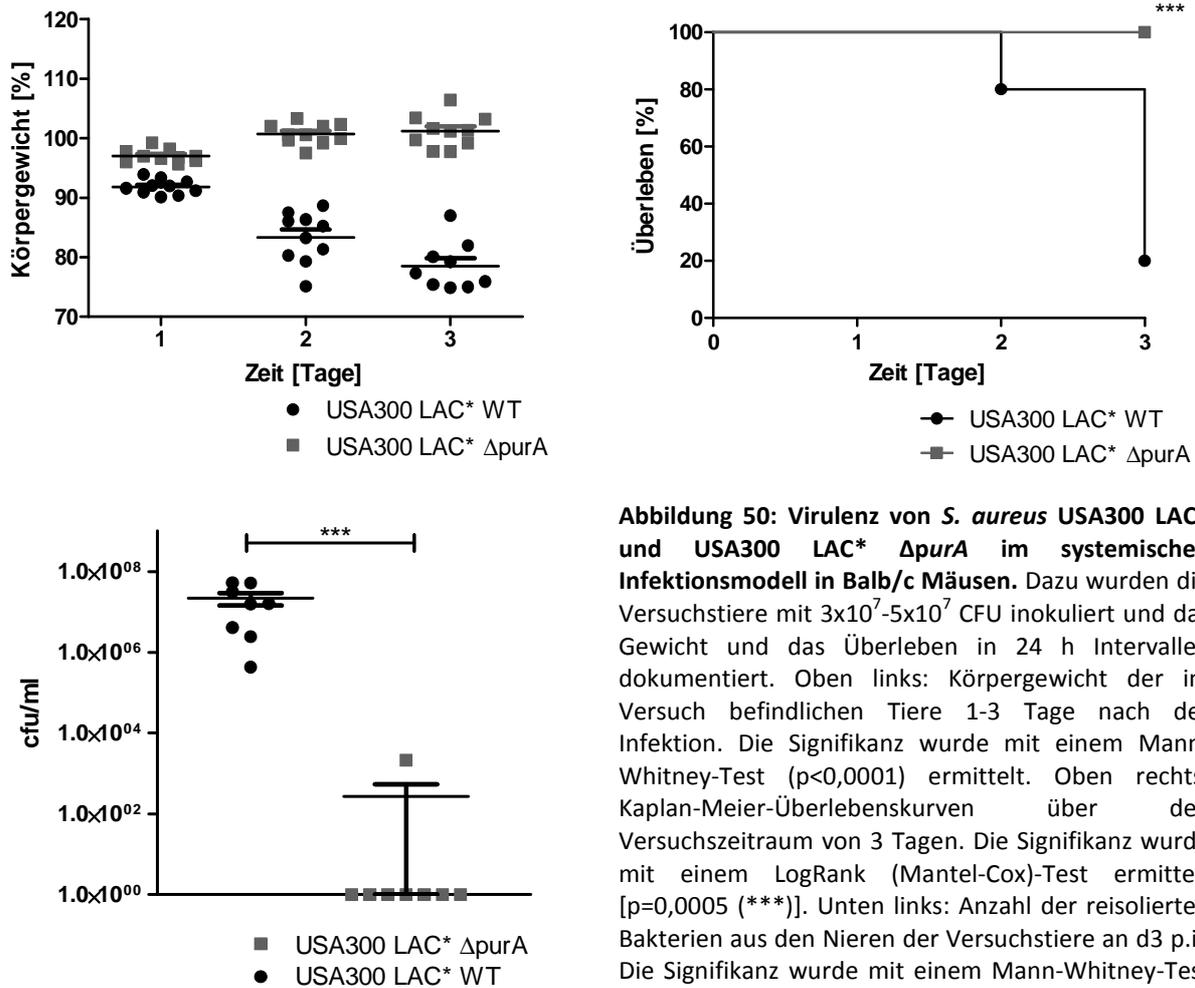


Abbildung 50: Virulenz von *S. aureus* USA300 LAC* und USA300 LAC* ΔpurA im systemischen Infektionsmodell in Balb/c Mäusen. Dazu wurden die Versuchstiere mit 3×10^7 – 5×10^7 CFU inokuliert und das Gewicht und das Überleben in 24 h Intervallen dokumentiert. Oben links: Körpergewicht der im Versuch befindlichen Tiere 1–3 Tage nach der Infektion. Die Signifikanz wurde mit einem Mann-Whitney-Test ($p < 0,0001$) ermittelt. Oben rechts: Kaplan-Meier-Überlebenskurven über den Versuchszeitraum von 3 Tagen. Die Signifikanz wurde mit einem LogRank (Mantel-Cox)-Test ermittelt [$p = 0,0005$ (***)]. Unten links: Anzahl der reisolierten Bakterien aus den Nieren der Versuchstiere an d3 p.i.. Die Signifikanz wurde mit einem Mann-Whitney-Test [$p = 0,0002$ (***)] ermittelt.

In einem weiteren Ansatz wurde Balb/c Mäusen ($n=8$) eine geringe Bakterien-Dosis (3×10^7 /Maus) ebenfalls im systemischen Infektionsmodell über die Schwanzvene appliziert, um zu überprüfen, ob sich die aus den Überlebensversuchen gewonnenen Ergebnisse auch in der bakteriellen Belastung der Organe widerspiegeln. Die infizierten Tiere wurden erneut nach den oben genannten Kriterien (Gewicht, Belastung, Krankheitsverlauf) beurteilt. Keines der Tiere erfüllte in diesem Versuch eines der Abbruchkriterien. Drei Tage nach der Infektion wurde der Versuch beendet und die Nieren der Tiere entnommen. Aus früheren Versuchen ist bereits bekannt, dass *S. aureus* in diesem Infektionsmodell hauptsächlich große oberflächliche Abszesse in den Nieren bildet. [150] Beide Nieren eines Tieres wurden in PBS aufgenommen, homogenisiert und entsprechende Verdünnungen auf LB-Agar ausplattiert. In den Mäusen, denen der wildtypische Stamm appliziert wurde, konnten im Mittel 2×10^7 Bakterien aus den Nieren reisoliert werden (siehe Abbildung 50). In der Vergleichsgruppe konnten lediglich aus einer von acht Mäusen Bakterien (2×10^3) reisoliert werden. In den

Nieren der anderen Tiere konnten keine Bakterien gefunden werden, d.h. die Anzahl der Bakterien in den Organen liegt unterhalb des Detektionslimits von 4×10^1 . Hier wurden die Bakterien wahrscheinlich durch das Immunsystem komplett abgetötet. Somit kam es nicht zur Etablierung einer längerfristigen Kolonisierung bzw. Infektion.

Zusammenfassend hat die Deletion von PurA einen Einfluss auf die Infektion von Balb/c Mäusen sowohl im Lungeninfektionsmodell als auch während einer systemischen Infektion mit *S. aureus*. In beiden Modellen war durch die Deletion von PurA eine stark verminderte Virulenz zu beobachten. Zudem war der Gewichtsverlust der Δ purA-infizierten Tiere gering. Die Untersuchung der Bakterienlast der Nieren in systemisch infizierten Tieren ergab eine fast vollständige Abtötung der PurA-defizienten Bakterien drei Tage nach der Infektion.

4.3.15 **Kompetition zwischen Wildtyp und *purA*-Mutante *in vivo***

Für die Bewertung des Virulenzpotentials von Wildtyp und Mutante in direkter Konkurrenz zueinander, wurden beide Stämme im Verhältnis 1:1 in das Versuchstier appliziert. Nach einer Inkubationszeit wurden die Bakterien aus dem Tier reisoliert und mit Hilfe von Antibiotika zwischen Mutante und Wildtyp diskriminiert. Da die *purA*-Mutante eine Erythromycin-Resistenzkassette (*ermR*) trägt, kann lediglich die Mutante auf einer antibiotikahaltigen Platte wachsen. Für dieses Experiment wurden die *S. aureus*-Stämme Newman und USA300 LAC* zusammen mit den jeweiligen *purA* Mutanten verwendet.

In einem ersten Ansatz wurden wiederum *Galleria mellonella* Larven im letzten Larvenstadium mit einer Kombination aus Wildtyp und Mutante infiziert. Dazu wurden beide Stämme getrennt angezogen und direkt vor der Infektion zu gleichen Teilen gemischt und anschließend in das letzte Beinsegment der Larven injiziert. Nach vier bzw. acht Stunden wurden einzelne Larven (n=3) abgetötet, in PBS homogenisiert und die Suspension auf TSB-Agarplatten plattiert. Nach der Inkubation bei 37 °C wurden jeweils 100 Einzelkolonien zufällig gewählt und diese erneut auf TSB-Agarplatten und auf Antibiotika-haltige TSB-Agarplatten (10 µg/ml Erythromycin) ausgestrichen. Nach erneuter Inkubation wurden die Kolonien auf den Platten gezählt und das Verhältnis zwischen Wildtyp und Mutante bestimmt.

Wie in Abbildung 51 gezeigt, wird im *S. aureus* Newman Stammhintergrund deutlich, dass 4 Stunden nach der Infektion der Larven das Verhältnis von Wildtyp zu Mutante noch sehr ausgewogen ist. Zu diesem Zeitpunkt wurde im Mittel zu 46 % der wildtypische Stamm und zu 50 % der *purA*-defiziente Stamm isoliert. Nach acht Stunden verschiebt sich das Verhältnis deutlich auf die Seite des wildtypischen Stammes, d.h. dass die wildtypischen Bakterien bereits ca. 68 % aller re-isolierten Bakterien ausmachen. Im Vergleich dazu wurden Mottenlarven auch mit *S. aureus* USA300 LAC* und der zugehörigen Mutante infiziert. Hier war die Mutante bereits nach vier Stunden nur noch zu ca. 27 % vertreten, wohingegen 73 % der re-isolierten Bakterien wildtypischen Ursprungs waren. Acht Stunden nach der Infektion verschiebt sich das Verhältnis noch weiter in Richtung des Wildtyps, da bereits 85 % wildtypische Bakterien re-isoliert. Durch die Wettbewerbsversuche konnte gezeigt werden, dass der Wildtyp gegenüber der Mutante in *Galleria mellonella* einen deutlichen Wachstumsvorteil hat und sich *in vivo* besser etablieren kann.

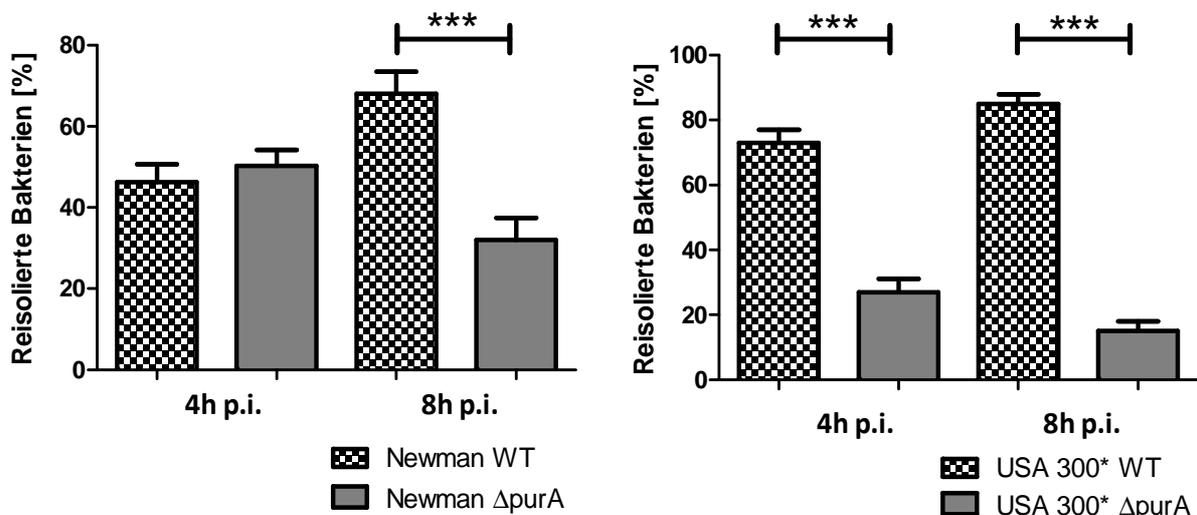


Abbildung 51: In-vivo-Kompetition von *S. aureus* Newman bzw. USA300 LAC* und den isogenen $\Delta purA$ -Mutanten in *Galleria mellonella*. Anteil reisolierter Bakterien (%) vier bzw. acht Stunden nach der Infektion (p.i.) der Larven. Signifikanz wurde mittels ungepaartem t-Test ermittelt [Newman 8 h: $p = 0,0099$ (***)]; USA300 4 h: $p = 0,0012$ (***)]; 8h: $p < 0,0001$ (***)]. Dargestellt ist der Mittelwert mit dem zugehörigen Standardfehler aus $n = 3$.

Um das Ergebnis im Säugetiermodell zu überprüfen, wurde in Balb/c-Mäusen ein analoger Versuchsansatz verfolgt. Dazu wurden jeweils 5 Mäuse mit einer Mischung aus *S. aureus* Wildtyp und *purA*-Mutante intranasal bzw. intravenös infiziert. Nach 24 h wurden die Lungen bzw. die Nieren entnommen, in PBS homogenisiert und auf TSB-Agarplatten

ausplattiert. Am nachfolgenden Tag wurden je 100 Einzelkolonien ausgewählt und entsprechend zwischen Mutante und Wildtyp mit Hilfe von Erythromycin selektioniert.

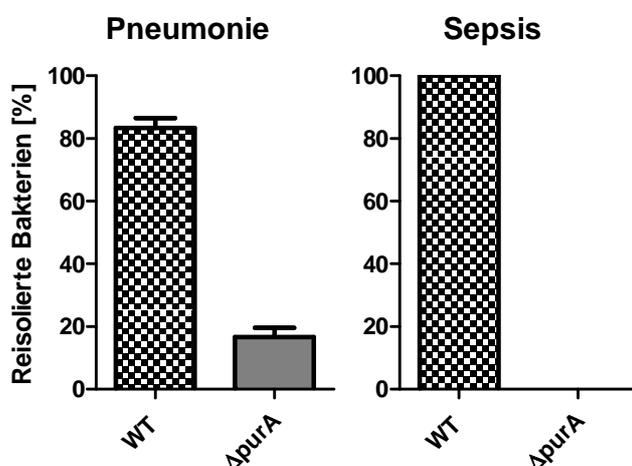


Abbildung 52: *In-vivo*-Kompetition von *S. aureus* Newman bzw. USA300 LAC* und der dazugehörigen *purA*-Mutante in Balb/c Mäusen. Anteil reisolierter Bakterien (%) 24 h Stunden nach der Infektion der Tiere aus den Lungen (Pneumonie-Modell) bzw. den Nieren (Sepsis-Modell). Dargestellt ist der Mittelwert mit dem zugehörigen Standardfehler aus n=5.

Wie in Abbildung 52 dargestellt, wurde aus den Lungen der intranasal infizierten Tiere 24 Stunden nach der Infektion zu über 80 % der Wildtyp *S. aureus* Newman isoliert. Bei den systemisch infizierten Mäusen, konnte ausschließlich der Wildtyp des Stammes USA300 LAC* isoliert werden. Auch in diesem Modell, in dem beide Stämme in direkter Konkurrenz zueinander stehen, hat sich der Wildtyp in der *in-vivo*-Situation gegenüber der Mutante durchsetzen können.

Zusammenfassend betrachtet hat der wildtypische *S. aureus*-Stamm im komparativen Ansatz einen klaren Wachstumsvorteil gegenüber der $\Delta purA$ -Mutante. Das könnte bedeuten, dass sich der Wildtyp besser an die *in-vivo*-Situation adaptieren kann und dies zu einer schnellen Etablierung der Infektion führt. Der deutliche Unterschied zwischen beiden Stämmen wurde sowohl bei der Infektion von *Galleria mellonella* als auch bei intranasaler und intravenöser Infektion von Balb/c Mäusen beobachtet.

4.3.16 Inhibition der bakteriellen Adenylosuccinat-Synthase mit Hadacidin

Aufgrund der stark verminderten Virulenz der *purA*-defizienten Stämme, wurde im Folgenden untersucht, ob sich die von *purA* codierte Adenylosuccinat-Synthase als mögliche Zielstruktur für die therapeutische Behandlung einer *S. aureus* Infektion eignet. Es wurde angenommen, dass eine spezifische Inhibierung von PurA ebenfalls eine Verminderung der Virulenz zur Folge hat. Dies würde neue Möglichkeiten für die Therapie von Patienten mit schweren *S. aureus* Infektionen bieten.

Als Inhibitor wurde die chemische Verbindung Hadacidin (CAS-Nummer: 689-13-4) verwendet, die laut Datenbanken (ChEMBL: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>, 01.10.2015 und DrugBank: www.drugbank.ca/, 01.10.2015) ein spezifischer Inhibitor von PurA ist.

Zunächst wurde in einem ersten Versuchsansatz die minimale Hemmkonzentration (MHK) von Hadacidin für verschiedene *S. aureus*-Stämme bestimmt. Die verwendeten *S. aureus*-Stämme HG003, Newman, 8325, N315, NewHG und COL wurden jeweils in B-Medium bzw. TSB-Medium, das mit 0,5 µg/ml bis 256 µg/ml Hadacidin supplementiert wurde, über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei keinem der getesteten Stämme konnte das Wachstum *in vitro* durch die verwendeten Hadacidin-Konzentrationen gehemmt werden. Im Gegensatz dazu, wurde in früheren Studien gezeigt, dass Hadacidin in höheren Dosen eine antimikrobielle Wirkung aufweist. [151–153] Aus diesem Grund wurde das antimikrobielle Potential der Substanz Hadacidin *in vivo* charakterisiert.

In einem weiteren Tierexperiment sollte untersucht werden, ob es mit Hilfe von Hadacidin möglich ist, die Adenylosuccinat-Synthase in ihrer Funktion zu hemmen und den Krankheitsverlauf einer schweren systemischen Infektion mit *S. aureus* zu mildern. Dazu wurden Balb/c Mäuse mit einem lumineszenten *S. aureus* Newman *lux* intravenös infiziert (Sepsis-Modell). Anschließend wurden die Tiere (n=10) zweimal täglich mit 10 mg/kg bzw. 50 mg/kg Hadacidin intravenös behandelt. Von den so behandelten Tieren wurden täglich dorsale und ventrale Biolumineszenz-Aufnahmen angefertigt (siehe Methoden 3.16.6). Anhand der gemessenen Signale wurden drei Regionen definiert (Herz-, Leber- und Nierenregion), in denen über den gesamten Versuchszeitraum die Lumineszenz-Signale verglichen wurden. Drei Tage nach der Infektion wurden die Organe entnommen und *ex vivo* das Lumineszenzsignal und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten bestimmt. Der experimentelle Ablauf ist in Abbildung 53 schematisch dargestellt.

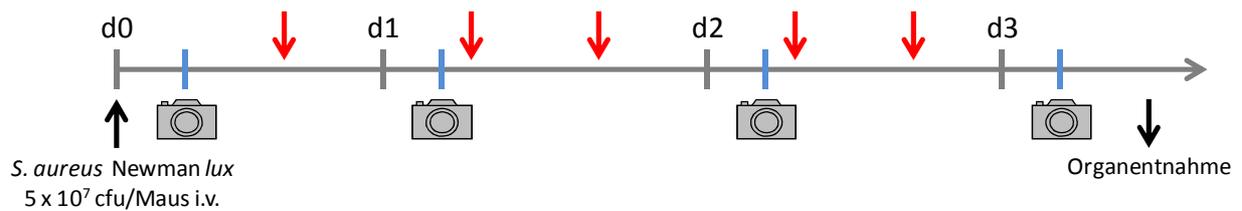


Abbildung 53: Experimenteller Ablauf für die Behandlung einer systemischen Infektion mit Hadacidin. Die Balb/c Mäuse wurden mit jeweils 5×10^7 CFU *S. aureus* Newman *lux* i.v. infiziert. Nach der Infektion wurden nach 24, 48 und 72 Stunden Echtzeit-Biolumineszenz-Aufnahmen mittels IVIS® Lumina II (Caliper Life Sciences) angefertigt (Kamera-Symbol). Zusätzlich wurden nach 72-stündiger Infektionsdauer die inneren Organe entnommen und *ex vivo* Biolumineszenz-Aufnahmen angefertigt. Die Behandlung der Tiere erfolgte zweimal täglich (roter Pfeil) mit 10 mg/kg bzw. 50 mg/kg Hadacidin intravenös. Die Kontrolltiere wurden mit steriler Kochsalzlösung behandelt.

Die Übersichtsaufnahmen der Biolumineszenz-Bildgebung der behandelten Tiere sind in Abbildung 54 für die Kontrollgruppe und die mit Hadacidin behandelten Gruppen zusammengefasst. 48 Stunden nach der Injektion von 5×10^7 *S. aureus* Newman *lux* konnte das Lumineszenz-Signal der Bakterien erstmals detektiert werden. Wie in Abbildung 54 zu erkennen, ist das Lumineszenz-Signal vor allem in den Mäusen deutlich, die mit 10 mg/kg Hadacidin behandelt wurden und dort vor allem in der Nierenregion (dorsale Ansicht) und in der Herz- und Leberregion (ventrale Ansicht). In der Kontrollgruppe (mit 0,9 % NaCl-Lösung behandelt) und der mit 50 mg/kg Hadacidin behandelten Gruppe waren die ersten Lumineszenz-Signale erst 72 Stunden nach der Infektion detektierbar und waren verglichen mit der mit 10 mg/kg behandelten Gruppe deutlich geringer.

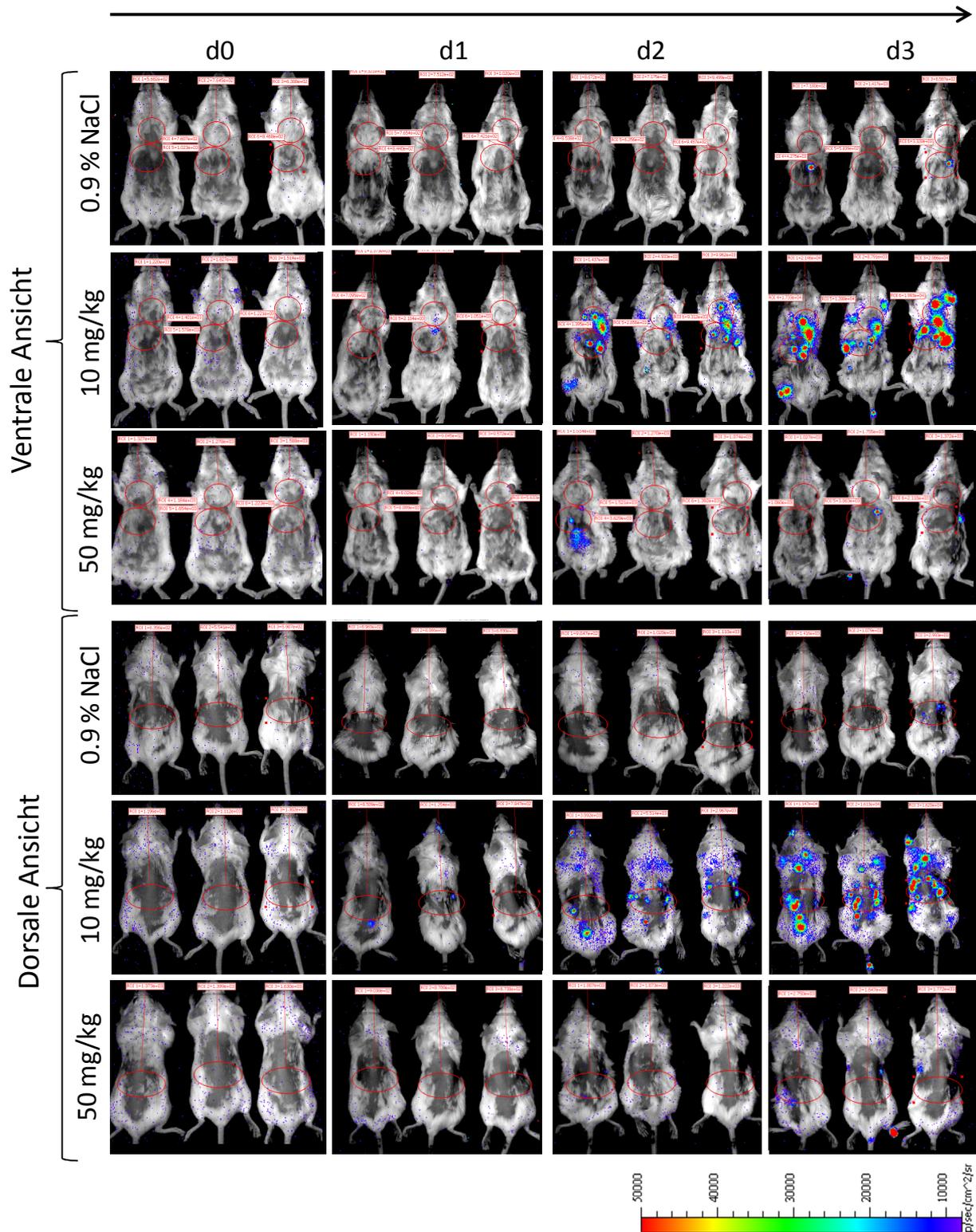
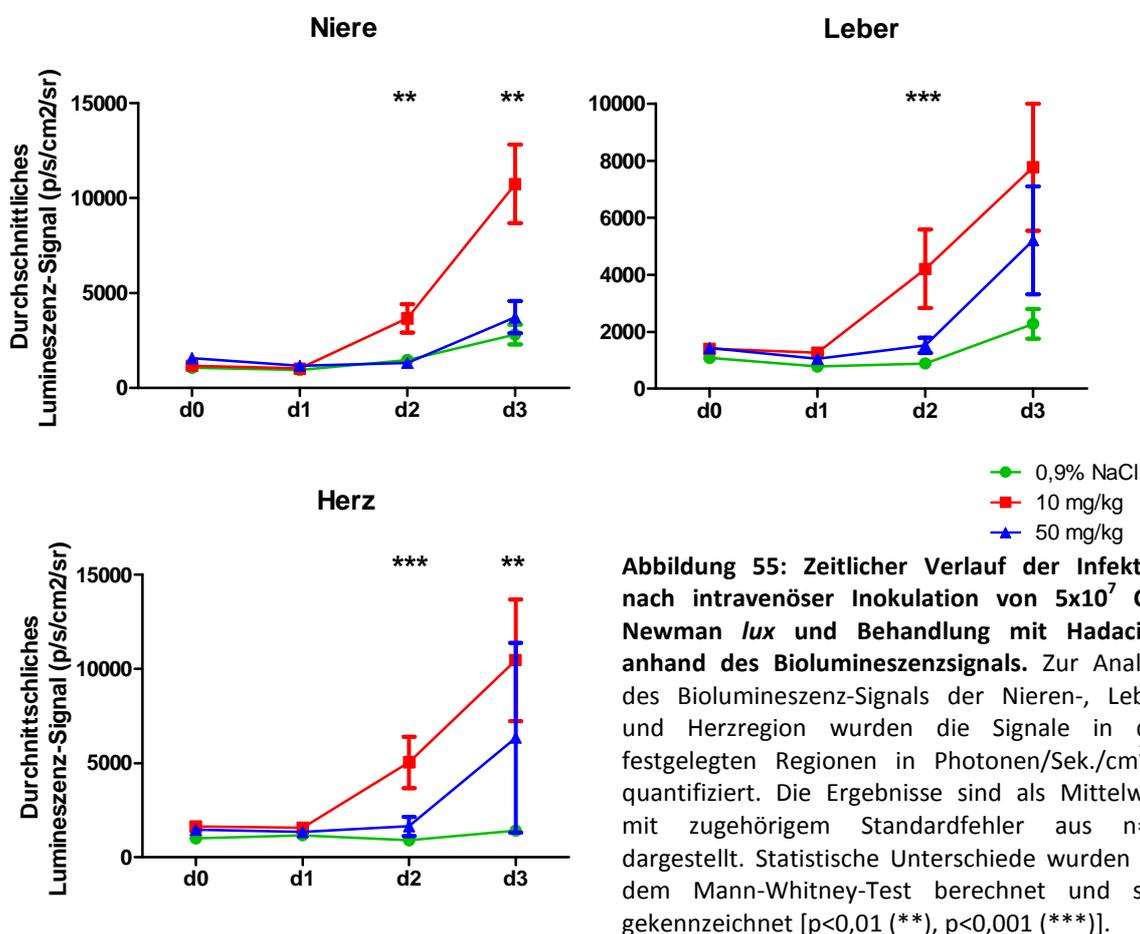


Abbildung 54: In-vivo-Imaging einer systemischen Infektion mit *S. aureus Newman lux* unter Behandlung mit Hadacidin. Je 5×10^7 CFU Newman *lux* wurden in die Schwanzvene von Balb/c Mäusen appliziert. Die Tiere wurden im Anschluss zweimal täglich mit 10 mg/kg bzw. 50 mg/kg Hadacidin i.v. behandelt. Den Kontrollmäusen wurde sterile Kochsalzlösung appliziert. Direkt nach der Infektion sowie 24, 48 und 72 h p.i. wurden Biolumineszenz-Messungen sowohl in dorsaler als auch ventraler Position mit einer Belichtungszeit von 2 min durchgeführt. Gezeigt sind aus der Kontrollgruppe (0.9 % NaCl) und den Hadacidin-behandelten Gruppen (10 mg/kg und 50 mg/kg) jeweils 3 repräsentative Tiere über den Versuchszeitraum von 72 h.

Neben den Übersichtsaufnahmen wurde das Lumineszenz-Signal in allen untersuchten Gruppen über den gesamten Zeitraum für die drei zuvor festgelegten Regionen quantifiziert (Niere, Leber, Herz). Wie in Abbildung 55 zu erkennen, ist das Signal für alle definierten Regionen 48 h nach der Infektion statistisch signifikant unterschiedlich zwischen der Kontrollgruppe und der mit 10 mg/kg Hadacidin behandelten Gruppe. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ist ab Tag 2 nach der Infektion ein stärkeres Lumineszenz-Signal bei den Hadacidin-behandelten Gruppen zu erkennen, was ein Indiz für eine stärkere Vermehrung der Bakterien ist. Insgesamt ist das Lumineszenz-Signal in der mit 50 mg/kg in allen drei Regionen geringer als das der mit der geringeren Dosis Hadacidin behandelten Gruppe.



Wie in Abbildung 56 dargestellt, korrelieren die Ergebnisse aus den *ex vivo* Biolumineszenz-Aufnahmen der peripheren Organe mit den zuvor gezeigten Ergebnissen, die aus den *in-vivo-Imaging*-Aufnahmen 72 h nach der Infektion generiert wurden. Auch hier zeigt sich ein signifikant höheres Signal in der Hadacidin (10 mg/kg) behandelten Gruppe für die entnommenen Nieren und das Herz verglichen mit der Kontrollgruppe. Aufgrund der hohen Varianz zwischen den Einzelwerten war der Unterschied des *ex vivo* Biolumineszenz-Signals

der Lebern nicht signifikant unterschiedlich. Darüber hinaus ist das detektierte Signal in der mit der höheren Dosis (50 mg/kg) behandelten Gruppe in der Niere und der Leber geringer als in der mit 10 mg/kg behandelten Gruppe.

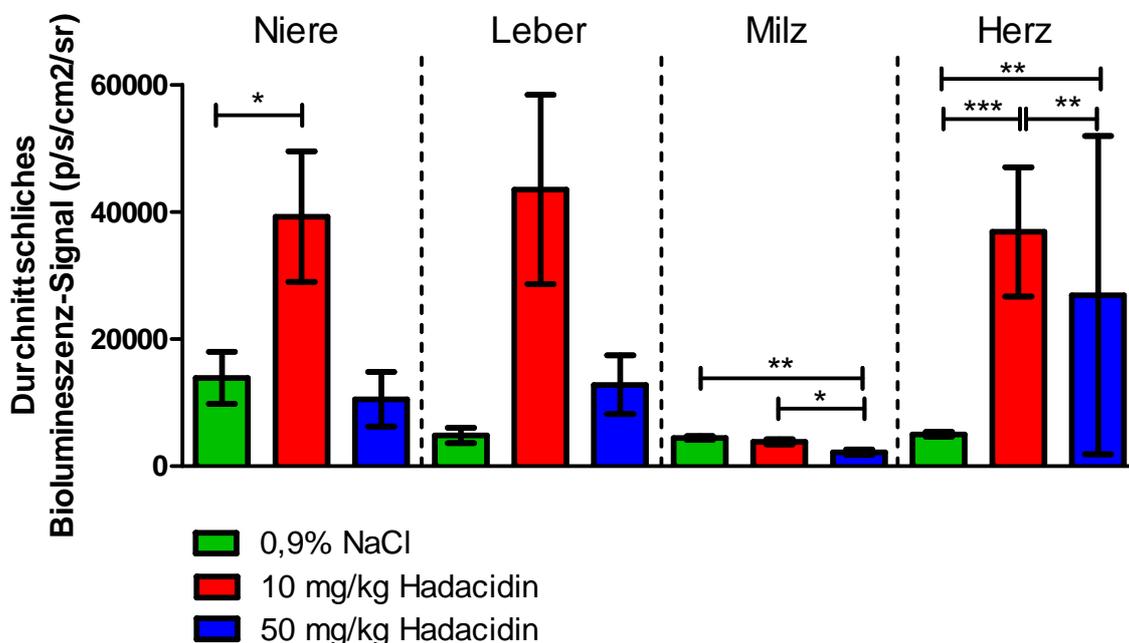


Abbildung 56: Ex vivo Biolumineszenz-Imaging der isolierten Organe. 72 h nach der Infektion wurden die Organe aseptisch entnommen und das Lumineszenz-Signal direkt nach der Entnahme mit einer Belichtungszeit von 2 min gemessen. Zur Analyse des Biolumineszenz-Signals der Nieren-, Leber-, Milz- und Herzregion wurden die Signale in den festgelegten Regionen in Photonen/Sek./cm²/sr quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert [±SEM]. Signifikante Unterschiede nach Mann-Whitney-Test sind angegeben. [p<0,05 (*); p<0,01 (**); p<0,001 (***)]

Zusätzlich zu Herz, Leber und Niere konnte *ex vivo* auch das Lumineszenz-Signal der Milz gemessen werden. Die Milz lieferte kaum Lumineszenz-Signale, was für eine geringe Vermehrung der Bakterien in dem Organ spricht. Jedoch war das Signal in der Kontrollgruppe höher als in beiden behandelten Gruppen.

Für die Quantifizierung der bakteriellen Belastung der peripheren Organe, wurden diese homogenisiert und verschiedene Verdünnungsstufen ausplattiert. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro Organ sind in Abbildung 57 dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass in den mit 10 mg/kg Hadacidin behandelten Mäusen in allen Organen eine signifikant höhere Bakterienzahl isoliert werden konnte. Aus Niere, Milz und Herz der Mäuse, die mit 50 mg/kg Hadacidin behandelt wurden, konnten dabei deutlich weniger Bakterien reisoliert werden. Die Anzahl der isolierten Bakterien in dieser Gruppe war geringer als in der Kontrollgruppe oder damit vergleichbar.

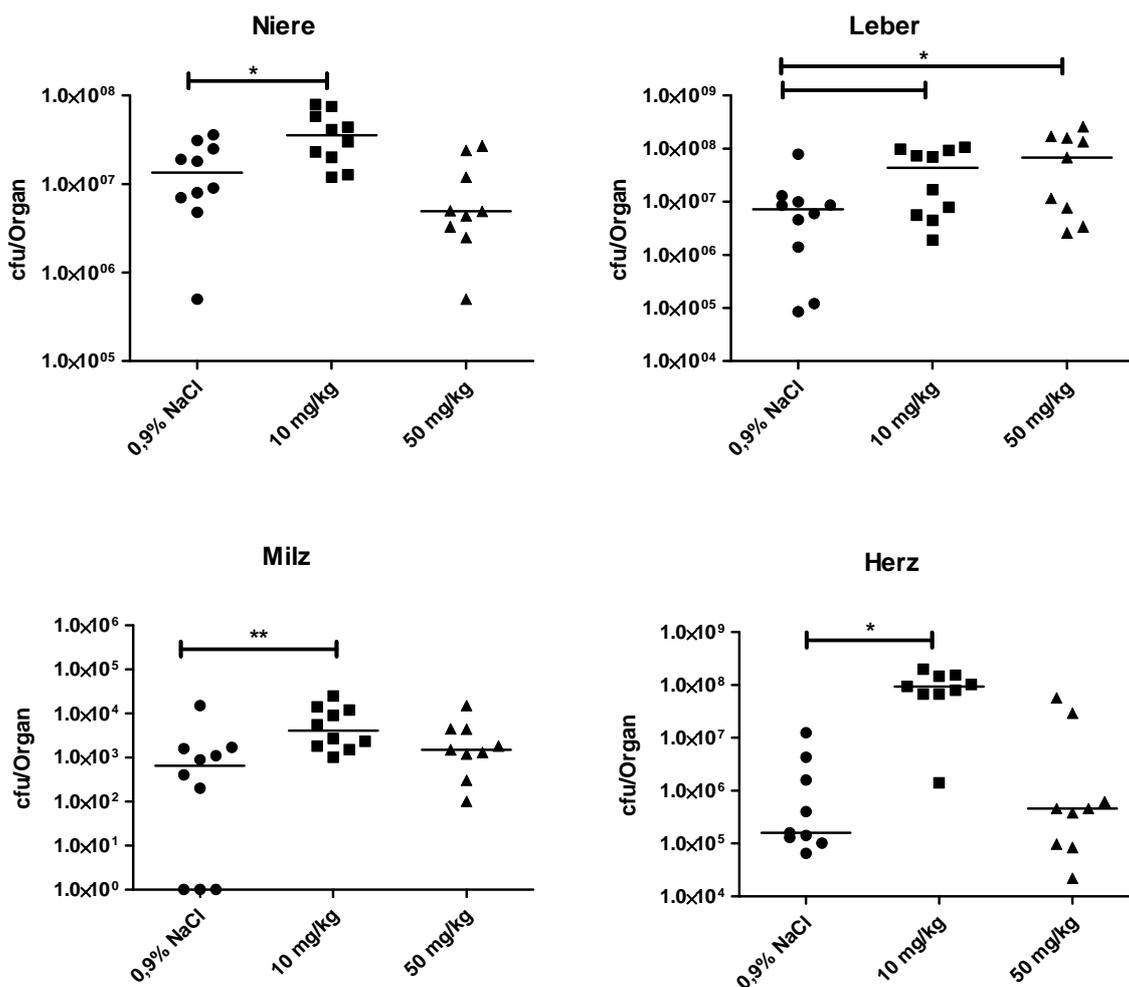


Abbildung 57: Bestimmung der koloniebildenden Einheiten in den peripheren Organen. 72 h nach intravenöser Inokulation von 5×10^7 CFU Newman *lux* und Behandlung mit Hadacidin bzw. NaCl-Lösung (Kontrollgruppe), wurden die peripheren Organe entnommen, homogenisiert und die enthaltenen Bakterien reisoliert. Hieraus wurde die bakterielle Belastung der einzelnen Organe bestimmt. Dargestellt sind die CFU/Organ als Median aus 10 Tieren pro Gruppe. Statistische Unterschiede wurden mit einem Mann-Whitney-Test berechnet und sind entsprechend markiert [$p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**)].

Aufgrund der auffälligen Veränderungen an den entnommenen Organen der Tiere, vor allem das Auftreten von großen oberflächlichen Abszessen am Herzen, wurden repräsentative Organe zusätzlich histopathologisch untersucht.

Für eine vergleichende histopathologische Untersuchung von Herz, Niere, Leber und Milz wurden die Organe einer Maus aus der Kontrollgruppe (0,9 % NaCl) und einer mit 10 mg/kg Hadacidin behandelten Maus verwendet. Die Organe wurden zunächst in wässriger Formalinlösung fixiert, anschließend entwässert und dann in Paraffin-Blöcke eingebettet. Im Anschluss wurden feingewebliche Schnitte angefertigt und diese mit Hämatoxylin-Eosin zur Unterscheidung von verschiedenen Gewebestrukturen gefärbt (HE-Färbung).

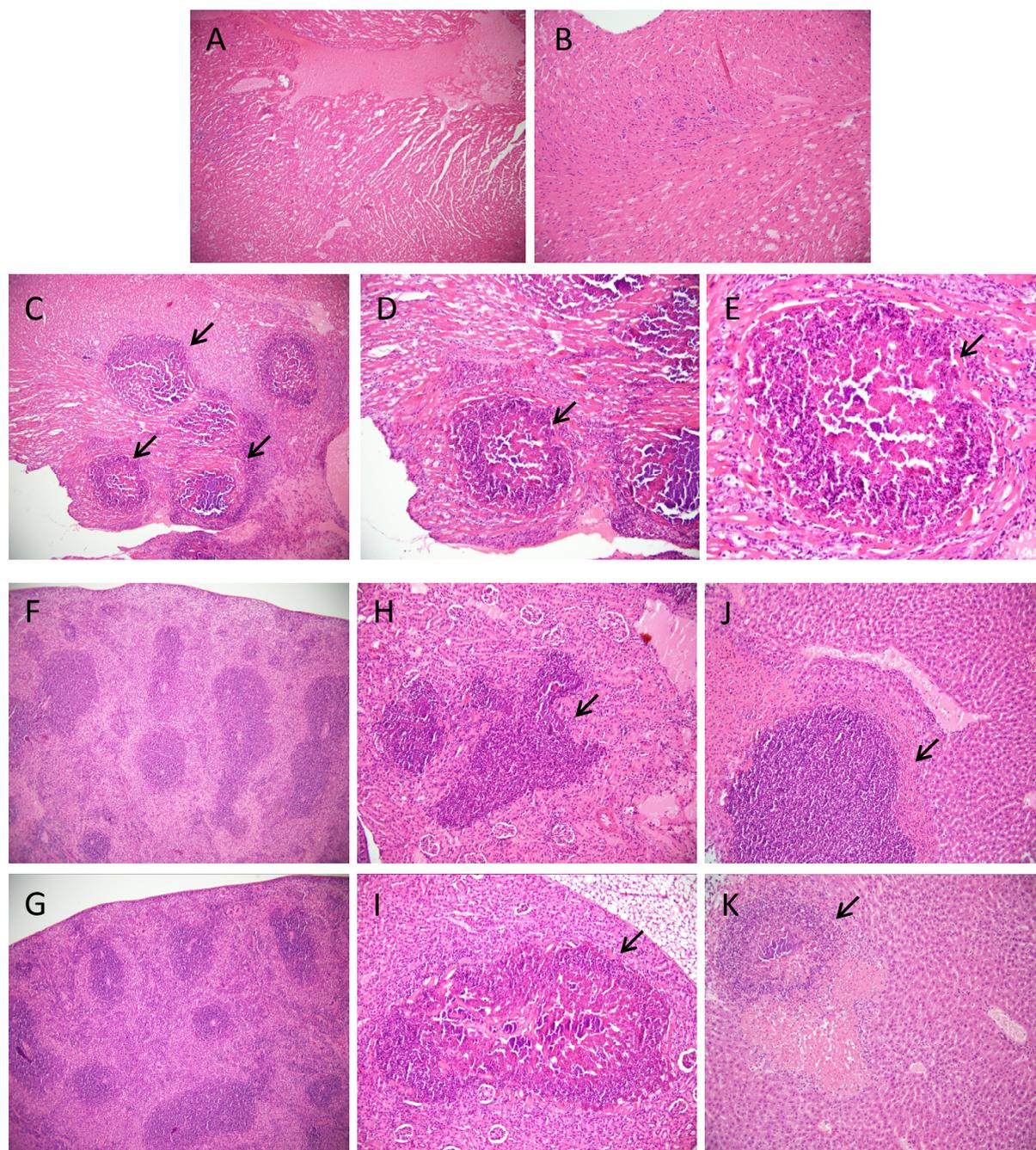


Abbildung 58: Histologische Untersuchung der peripheren Organe (Herz, Milz, Niere und Leber) nach systemischer Infektion mit *S. aureus Newman lux* und Behandlung der Tiere mit Hadacidin. 72 h nach intravenöser Inokulation von 5×10^7 CFU Newman *lux* und Behandlung mit 10 mg/kg Hadacidin bzw. NaCl-Lösung (Kontrollgruppe), wurden die Organe entnommen, in wässriger Formalin-Lösung fixiert und H&E gefärbte histologische Schnitte angefertigt. A+B: Herz der Kontrollgruppe, C-E: Herz der Hadacidin-behandelten Gruppe; A+C: 100fache Vergrößerung, B+D: 200fache Vergrößerung, E: 400fache Vergrößerung, F+G: Milz, 100fache Vergrößerung, H+I: Niere, 200fache Vergrößerung, J+K: Leber, 200fache Vergrößerung; F+H+J: Organe der Kontrollgruppe (NaCl-Lösung), G+I+K: Organe der behandelten Gruppe (10 mg/kg Hadacidin)

Wie in Abbildung 58 dargestellt, sind in beiden Gruppen Abszesse in der Leber, der Niere und im Herzen sichtbar. Diese sind in der Hadacidin-behandelten Maus deutlich ausgeprägter und großflächiger. Insbesondere die typischen Ansammlungen von

Lymphozyten und Granulozyten sind exemplarisch für die Größe der gebildeten Abszesse und die Schwere der Entzündungsreaktion. Zudem konnten in einem Teil der großflächigen Abszesse der behandelten Mäuse die Bakterien in großer Zahl dargestellt werden. Besonders im Herzen wurden deutliche Unterschiede hinsichtlich der Ausprägung der Abszesse, der Zerstörung von Herzmuskelgewebe und der Schwere der Entzündungsreaktion zwischen den beiden Gruppen sichtbar. In der Milz waren in beiden Gruppen kaum morphologische Veränderungen erkennbar. Die Beobachtung deckt sich mit vorherigen Ergebnissen bezüglich der Anzahl an koloniebildenden Einheiten.

4.4 α -*S. aureus* Antikörperantwort während einer Infektion - Ermittlung von Antikörperspezifitäten mittels *Staph-Toxin-Array*

Neben der Analyse der Antikörperprofile der unterschiedlich infizierten Tiere mittels ELISA (siehe 4.2, Abbildung 23) wurden diese zusätzlich mittels *Staph-Toxin-Array* untersucht. Dies diente einer umfangreicheren Analyse der Antikörperprofile. Um die Aussagekraft der Untersuchung zu erhöhen, wurde die Anzahl an untersuchten Antigenen und die Stichprobenzahl (n) erhöht. Mit Hilfe des Arrays konnte die Antikörperantwort gegen ein breiteres Spektrum an Antigenen getestet werden. Zusätzlich dazu war bei dieser Untersuchung der Zusammenhang zwischen Antikörperprofil und dem Infektions-Modell von besonderem Interesse.

Beim *Staph-Toxin-Array* handelt es sich um einen Proteinarray der in Zusammenarbeit mit der Firma Alere Technologies GmbH (Jena) entwickelt wurde. Der *Staph-Toxin Array* dient der Bestimmung des Antikörperprofils beispielweise in Serumproben und liefert weitreichendere Erkenntnisse über die gebildeten Antikörperspezifitäten. Mit Hilfe des Arrays lässt sich die Antikörperantwort gegen bis zu 63 bakterielle Proteine parallel bestimmen.

Der für diesen Versuch eingesetzte Array der dritten Generation wurde mit 63 *S. aureus*-spezifischen Antigenen im Konzentrationsbereich von 0,01 – 0,5 mg/ml beschichtet. Neben den in dieser Arbeit beschriebenen Proteinen P1-P5, P7 und PurA handelt es sich bei den weiteren Antigenen um cytoplasmatische Proteine, bereits bekannte Virulenzfaktoren und anderen Proteinen aus *S. aureus* mit bislang unbekannter Funktion. Ähnlich wie die in dieser Arbeit analysierten Proteine P1-P10 wurden die uncharakterisierten Proteine anhand von Sekretom- und Surfacome-Daten ausgewählt, in *E. coli* überexprimiert, aufgereinigt und der Firma Alere für die Beschichtung des Arrays zur Verfügung gestellt. Alle Antigene wurden kovalent an eine *Microarray*-Glasoberfläche mit einer Größe von 4.2 mm x 4.2 mm gebunden. [154]

Das Antigenrepertoire des *Staph-Toxin-Arrays* umfasst dabei verschiedene Virulenzfaktoren wie beispielweise 11 Toxine und Superantigene. Des Weiteren wurden fünf verschiedene porenbildende Proteine und fünf Komplement-inhibierende Proteine auf dem Array immobilisiert. Zusätzlich dazu wurden sieben cytosolische Proteine und elf extrazelluläre

Enzyme an die Array-Oberfläche gebunden. Neben den bereits bekannten Proteinen wurden auch 12 putativ sekretierte Proteine mit bislang unbekannter Funktion auf dem Array platziert. Eine Übersicht aller Antigene befindet sich im Abschnitt Methoden (siehe Tabelle 20).

Für die Detektion der Antikörperantwort wurde der Protein-Array mit dem zu untersuchenden Serum inkubiert und die an die immobilisierten Antigene gebundenen Antikörper aus dem Serum anschließend mit einem spezifischen HRP-konjugierten Antikörper detektiert. Die Visualisierung der gebundenen Antikörper erfolgte mit einem von der Firma Alere Technologies GmbH zur Verfügung gestellten Substrat. Ähnlich wie bei einer ELISA-basierten Analyse wurde ein Substrat eingesetzt, welches durch die am Sekundär-Antikörper konjugierte Peroxidase zu einem blauen Präzipitat umgesetzt wurde. Die Intensität der Farbreaktion wurde mit Hilfe des Gerätes *ARRAYMATE* und der Software *Iconoclust* detektiert. Das Gerät misst für jedes Antigen die Signalintensität in einem definierten Bereich auf dem Array und ermittelt mit Hilfe der Software die Farbintensität relativ zum Hintergrundsignal in arbiträren Einheiten (AU).

Für diese Untersuchungen wurden Seren von Balb/c-Mäusen verwendet, in denen zuvor bereits im Abschnitt 4.2 in einem ELISA-basierten Ansatz der spezifische Antikörpertiter gegen die Proteine P1-P5 und P7-P10 ermittelt wurden. Für die Herstellung der Seren wurden jeweils 10 Versuchstiere im systemischen Infektionsmodell, Pneumonie-Modell und Muskelabszess-Modell mit *S. aureus* Newman über einen Zeitraum von ca. 6 Wochen wiederholt infiziert. Dazu wurde eine sublethale Dosis dreimal jeweils im Abstand von zwei Wochen appliziert. Dies sollte zu einer starken *S. aureus*-spezifischen Antikörperantwort führen. Zehn Tage nach der letzten Applikation wurden die Tiere euthanasiert und das Blut mittels Herzpunktion entnommen. Die daraus gewonnenen Seren wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Susanne Engelmann und Peggy Kloppot am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Greifswald analysiert.

Um die Ergebnisse des Staph-Toxin-Arrays einfacher bewerten und gruppieren zu können, wurde eine Wertung der Ergebnisse („Score“) anhand eines Bewertungsschlüssels vorgenommen, der Aufschluss über die Intensität der Antikörperantwort einer ganzen Gruppe gibt. Wie bereits in früheren Studien von P. Kloppot evaluiert, wurde eine Signalintensität von mindestens 0,1 als spezifische Antikörperantwort festgelegt. [144] Daran orientiert erfolgte die Einteilung einer niedrigen Antikörperantwort bei

Signalintensitäten zwischen 0,1 und 1 sowie einer mittleren Antwort im Bereich zwischen 1 und 4 und eine hohe Antikörperantwort ab einer Signalintensität von 4 für jedes einzelne Antigen in einem Serum. Das maximale Detektionslimit lag aufgrund der gewählten Verdünnungen der Seren bei dieser Versuchsreihe bei ca. 8.

Der Score wurde nach folgender Formel berechnet, wobei n_x für die Anzahl der Tiere mit entsprechender zuvor klassifizierter Antikörperantwort steht.

$$Score = (n_{gering} \times 1) + (n_{mittel} \times 2) + (n_{hoch} \times 3) \tag{1}$$

Der jeweilige Faktor von 1-3 dient der Gewichtung der Antikörperantwort der Einzeltiere für die Gesamtantwort einer ganzen Gruppe. Um die Antikörperantwort einer Versuchsgruppe von 10 Tieren zu bestimmen, wurden die Einzelwerte nach Gleichung (1) aufsummiert. Lag der Score der Gesamt-Antikörperantwort im Bereich zwischen 3 und 10, wurde die Antwort als gering gewertet. Die Antwort einer Gruppe wurde als „mittel“ eingestuft, wenn der Score zwischen 10 und 20 lag und eine hohe Antikörperantwort lag bei einem Wert über 20 vor.

Der so erhaltene Score-Wert gibt damit Aufschluss über die Stärke der Antikörperantwort gegen ein Antigen innerhalb der gesamten Gruppe. Die Bewertung der Antikörperantwort der einzelnen Versuchstiere sowie die Berechnung der Antikörperantwort für eine ganze Gruppe von Tieren (Score) sind abschließend nochmal in Tabelle 29 zusammengefasst.

Tabelle 29: Übersicht über den Bewertungsschlüssel von Antikörperantwort und Score. Zunächst wurde die Signalintensität für jedes einzelne Antigen pro Maus als gering, mittel oder hoch bewertet. Die jeweilige Antikörperantwort wurde über einen Faktor (1-3) gewichtet (Erklärung siehe Text). Die Summe aus allen ermittelten Werten von 10 Tieren einer Gruppe definierte den Score und damit die Antikörperantwort der gesamten Gruppe gegen ein einzelnes Antigen.

	Signalintensität	Faktor		Σ Score (n=10)
Bewertung der Antikörperantwort für ein Antigen in einer Serumprobe	gering	$0,1 < x \leq 1$	1	$3 \leq x < 10$ gering
	mittel	$1 < x \leq 4$	2	$10 \leq x < 20$ mittel
	hoch	$4 < x$	3	$20 \leq x \leq 30$ hoch
				Bewertung des errechneten Scores für eine Gruppe von Mäusen (n=10)

Die Eingruppierung der einzelnen Antigene erfolgte anhand des zuvor beschriebenen Scores. Dies war notwendig da die Varianz der Einzelwerte oft sehr groß war, vor allem wenn die Antikörperantwort relativ gering ausfiel. Die gemessenen Einzelwerte resultierend aus dem Staph-Toxin-Array sind im Anhang dieser Arbeit im Abschnitt 7.2 behandelt.

	hohe Antikörper- Antwort	mittlere Antikörper- Antwort	niedrige Antikörper- Antwort	keine Antikörper- Antwort
Σ	14	8	17	24
	Efb-C	GlpQ	Hlb	SACOL0479
	Sbi_I-IV	GreA	Hly	SACOL0480
	Sbi_III-IV	LukF-PV	SACOL0021	SACOL0908
	HlgA	SACOL1065	SACOL0129	CitC
	HlgB	SACOL1169	SACOL0444	Geh
	IsaA	SACOL2295	SACOL0723	HlgC
	Plc	Tuf	SACOL0742	PknB
	SACOL0985	nuc	SACOL1788	PurA
	SACOL1164		SpIC	SACOL0669
	SpID		SEB	SACOL0755
	SCIN		SEC	SACOL0820
	SSL7		SEI	SACOL1802
	SaurJH1_2034		SEL	SACOL1870
	SpIB		Sbi_I-II	SACOL2197
			Ssl-11	SACOL2661
			Tig	SEC-bov
			lip	SEK
				SEM
				SEQ
				SpIA
				SspA
				SspB
				Stp
				TSST-1

Abbildung 59: Übersicht über die Antikörperantworten gegen 63 verschiedene *S. aureus* Antigene in murinen Seren. Die Gruppierung der Antikörperantworten erfolgte mit Hilfe der in Tabelle 29 beschriebenen Einteilung. Zeigte mindestens eine der 3 Gruppen (Sepsis-, Pneumonie- und Abszessmodell) eine entsprechende Gesamt-Antikörperantwort gegen ein bestimmtes Antigen, so ist dieses hier bereits in der entsprechenden Gruppe aufgeführt. Die Proteine dieser Arbeit sind in rot hervorgehoben (P1-P3, P5, P7 und PurA)

Wie in Abbildung 59 dargestellt, konnte insgesamt gegen 29 der 63 *S. aureus* Antigene eine Antikörperantwort innerhalb von mindestens einer der drei Versuchsgruppen (Sepsis-, Pneumonie- bzw. Abszessmodell) gefunden werden. Darunter waren 14 Antigene, gegen die eine sehr starke Antikörperantwort durch die wiederholten Infektionen entwickelt wurde. Unter den Antigenen mit hoher Antwort waren hauptsächlich bereits bekannte Virulenzfaktoren von *S. aureus*. Diese konnten den Komplement-Regulatoren (SCIN, SaurJH1_2034), porenbildenden Toxinen (HlgA, HlgB), Superantigen (SSL7) bzw. extrazellulären Enzymen (Efb, Sbi, IsaA, Plc, SpIB, SpID) zugeordnet werden. Zusätzlich zu den

bekannten Proteinen konnten auch sehr hohe Antikörperantworten gegen bisher uncharakterisierte Proteine wie z.B. SACOL0985 und SACOL1164 detektiert werden.

Eine mittlere Antikörperantwort wurde gegen acht der 63 Proteine gemessen. Darunter befanden sich viele cytosolische Proteine wie beispielweise GreA (Transkriptions-Elongationsfaktor), Tuf (Elongationsfaktor Tu) und Nuc (Thermonuklease), aber auch bisher uncharakterisierte Antigene. Bei diesen Antigenen mit unbekannter Funktion handelte es sich um SACOL1065, SACOL1169, SACOL2295.

Gegen 17 der 63 Proteine wurde eine geringe Antikörperantwort detektiert und gegen 24 Antigene wurde keine Antikörperantwort gemessen.

Betrachtet man die in Abbildung 60 dargestellte Antikörperantwort für die einzelnen Antigene und vergleicht sie hinsichtlich der unterschiedlichen Infektionsarten so sind innerhalb der murinen Infektionsmodelle Unterschiede erkennbar. Es gibt Antigene, für die die Antwort in allen Tieren sehr stark ist unabhängig von der Art der Infektion. Dabei handelt es sich um die Proteine Efb, Sbi, HlgA (γ -Hämolyisin A), SCIN bzw. Varianten von SCIN und zwei bisher uncharakterisierte Proteine: SACOL0985 und SACOL1164.

Daneben gibt es eine umfangreiche zweite Gruppe bestehend aus 13 Antigenen, für die die Antikörperantwort im Serum der systemisch infizierten Tiere deutlich höher ist, als in den Pneumonie- bzw. Abszess-Modell infizierten Tieren (siehe Abbildung 60 B). Statistisch signifikante Unterschiede konnten für die Antigene HlgB (γ -Hämolyisin B), Plc (Phospholipase C), SplB und SplC (Serin-Proteasen) und das Superantigen SSL7 ermittelt werden.

Die dritte Gruppe umfasst die Antigene, für die im Serum der systemisch infizierten Tiere geringere Signalintensitäten als in einer der beiden anderen Versuchsgruppen gemessen wurden. Hier fallen besonders die Antigene GlpQ (Glycerophosphoryl-Diester Phosphodiesterase), GreA (Transkriptions-Elongationsfaktor), SACOL1065, Tig (Trigger-Faktor), Tuf (Elongationsfaktor Tu) und Lip (Lipase) auf. Für GreA sind die Unterschiede zwischen den intravenös (Sepsis) und den intranasal (Pneumonie) infizierten Tieren statistisch signifikant.

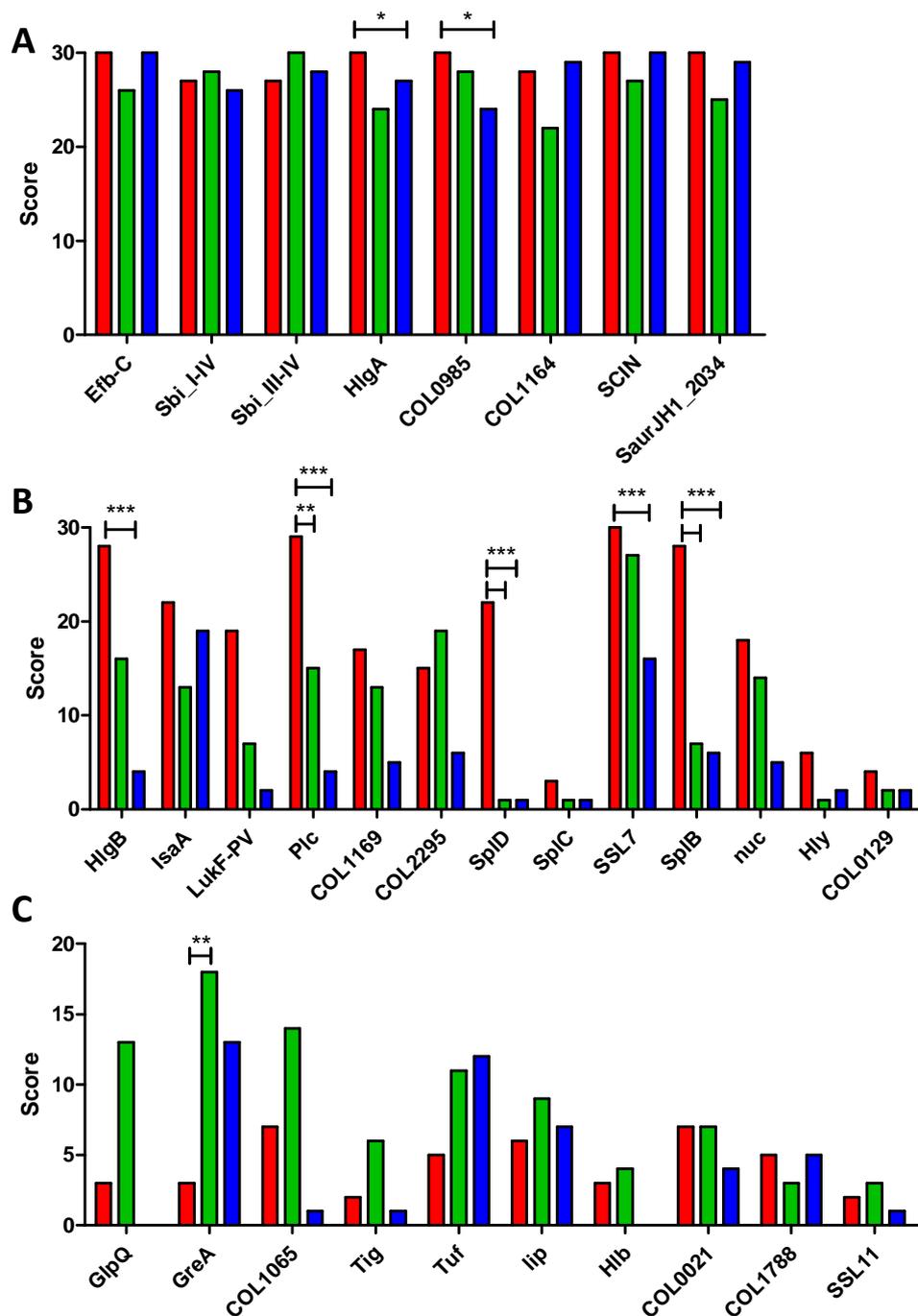


Abbildung 60: Mittels *Staph-Toxin-Array* bestimmte Antikörperantwort in den Seren der unterschiedlich immunisierten Tiere. A: Score aller Antigene für die in allen drei gewählten Gruppen (Sepsis-, Pneumonie- und Abszessmodell) eine hohe Antikörperantwort detektiert werden konnte. B: Score aller Antigene gegen die im Serum der intravenös (Sepsis-Modell) infizierten Tiere deutlich mehr Antikörper gefunden wurden, als in den beiden anderen Versuchsgruppen. C: Antigene gegen die ebenfalls eine Antikörperantwort gefunden werden konnte, die aber keiner der beiden zuvor genannten Gruppen zugeordnet werden konnten. Die Signifikanz wurde mittels *Two-way Anova* und angeschlossener Bonferroni-Korrektur auf der Grundlage der Einzelwerte der Signalintensitäten auf dem Proteinarray ermittelt [$p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***)]. Die gemessenen Einzelwerte sind im Anhang dieser Arbeit im Abschnitt 7.2 dargestellt.

- Sepsis
- Pneumonie
- Abszess

Die Bildung von spezifischen Antikörperprofilen für die jeweilige Immunisierungsart spricht für eine unterschiedliche Verfügbarkeit bzw. Expression der Proteine während der Infektion. Dies spiegelt sich vor allem in den Antigenen wider, für die nur jeweils in einem der drei Infektionsmodelle eine erhöhte Antikörperantwort detektiert werden konnte. Auffallend bei dieser Analyse war zudem die hohe Anzahl an Antigenen gegen die während einer systemischen Infektion deutlich höhere Antikörpertiter gebildet werden.

Um die Gesamt-Antikörper Antwort aller Tiere eines Infektionsmodells besser vergleichen zu können und die Reproduzierbarkeit der Vakzinierung zu zeigen, wurde wie in Abbildung 61 dargestellt, die Summe aller Signalintensitäten für alle auf dem Array immobilisierten Antigene pro Maus berechnet. Dies sollte auch dazu dienen, die Varianz der Antikörperantworten innerhalb einer Gruppe zu verdeutlichen. In Abbildung 61 wird deutlich, dass die Gesamt-Antwort in allen Sepsis-Mäusen signifikant höher ist als in den Muskelabszess-infizierten Tieren. Dies spiegelt auch die Ergebnisse aus den Antikörperantworten für die Einzelantigene wider (siehe Abbildung 60 B). Hier lieferten die Seren der Sepsis-infizierten Tiere für deutlich mehr Antigene eine hohe Antikörperantwort im Vergleich zu den intranasal und intramuskulär infizierten Tieren. Des Weiteren wird deutlich, dass die Varianz innerhalb der intravenös und intramuskulär infizierten Tiere relativ gering ist und die Gesamt-Antikörperantwort relativ gleichmäßig ausfällt. Betrachtet man im Gegensatz dazu die Antikörper-Antworten der Pneumonie-infizierten Tiere, so wird deutlich dass die Varianz innerhalb der Gruppe hoch ist.

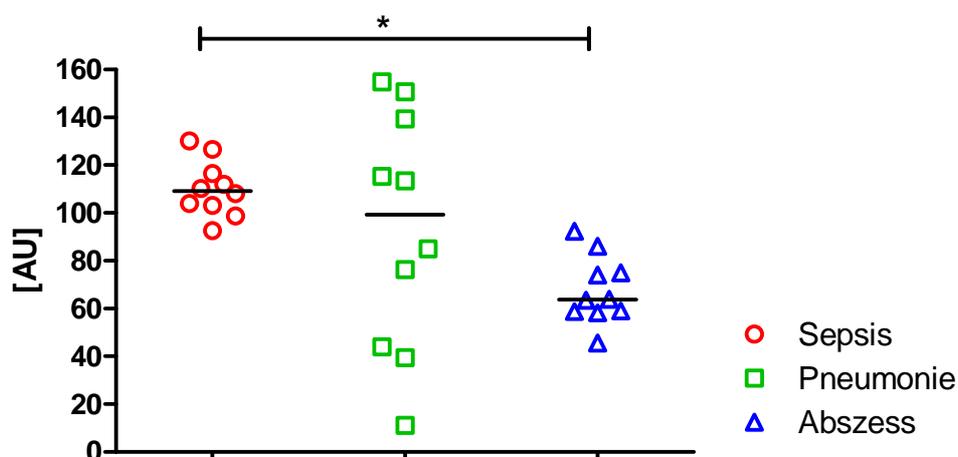


Abbildung 61: Übersicht über die Gesamt-Antikörper Antwort gegen alle 63 Antigene je Maus. Jeder Datenpunkt entspricht der Summe aller Signalintensitäten für die 63 auf dem *Staph-Toxin-Array* immobilisierten Antigene einer Einzelmaus mit dem zugehörigen Median für das jeweilige Infektionsmodell. Es gibt signifikante Unterschiede zwischen den intravenös und den intramuskulär immunisierten Tieren. Die Signifikanz wurde mittels *One-way Anova* und angeschlossener Bonferroni-Korrektur ermittelt [$p < 0,05$ (*)]

5. Diskussion

5.1 Auswahl von sekretierten und Oberflächen-assoziierten Proteinen aus *S. aureus* mit bislang unbekannter Funktion

Virulenzfaktoren stellen wichtige Zielstrukturen für therapeutische Ansätze insbesondere für die Vakzin-Entwicklung dar. Zudem sind sie für das grundsätzliche Verständnis von Pathogenitätsmechanismen essentiell und helfen den Zusammenhang der Interaktionen zwischen *S. aureus* mit dem Wirt und dem daraus resultierenden Krankheitsbild zu verdeutlichen. Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von bislang uncharakterisierten Proteinen, die als potentielle neue Virulenzfaktoren in Frage kommen. Dies sollte das grundlegende Verständnis für die während einer *S. aureus*-Infektion ablaufenden Mechanismen verbessern.

Bakterielle Proteine lassen sich generell in vier Gruppen einteilen: cytosolische Proteine, membranständige Proteine, Zellwand-assoziierte und sekretierte Proteine. Die meisten bisher bekannten Virulenzfaktoren von *S. aureus* sind sekretierte Proteine, die löslich im Kulturüberstand oder an die Zellwand-assoziiert vorzufinden sind. Allerdings sind 70 % aller extrazellulär vorliegenden Proteine bislang noch funktionell uncharakterisiert. [71] Diese Klasse von Proteinen bildet somit ein Reservoir für potentielle neue Virulenzfaktoren. [71,74,75] Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit zwölf bislang uncharakterisierte Exoproteine ausgewählt und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* funktionell charakterisiert. Als Grundlage für die Auswahl der Proteine diente eine Reihe von Studien, die das Exoproteom verschiedener *S. aureus*-Stämme unter verschiedenen Wachstumsbedingungen analysierten.

Eine Studie, die zur Auswahl der in dieser Arbeit verwendeten Proteine herangezogen wurde, untersuchte insbesondere das sogenannte „*Surfacome*“. Darunter versteht man die Gesamtheit aller Proteine, die an der Oberfläche der Bakterienzelle exponiert sind. [76,77] Zur Analyse des *Surfacomes* wurden von Dreisbach *et al.* vier verschiedene *S. aureus*-Stämme verwendet, bei denen die Proteine der Bakterienoberfläche durch proteolytische Spaltung isoliert wurden. [76] Alle auf diesem Wege generierten Peptide wurden mittels Massenspektrometrie analysiert. Ergänzend dazu gab es eine Arbeit zum Proteom verschiedener MRSA-Stämme, die unter Eisen-limitierenden Bedingungen kultiviert wurden, wodurch die *in-vivo*-Situation nachempfunden werden sollte. [155] Für die Auswahl der zu

untersuchenden Proteine in dieser Arbeit wurden weiterhin die Ergebnisse einer dritten, sehr umfangreiche Studie von Hecker *et al.* genutzt. [71] Hier wurde das Proteom von mehr als 20 verschiedenen *S. aureus*-Stämmen in einer Kombination aus 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie analysiert. Da eine Vielzahl unterschiedlichster Kulturbedingungen untersucht wurde, wie z.B. Sauerstoff-Limitation (anaerobes Wachstum) und Stress durch chemische Substanzen wie Wasserstoffperoxid oder verschiedene Diamide war es möglich, die Mehrheit aller exprimierten Gene zu identifizieren. [71] Zudem konnten in einer quantitativen Proteomstudie von Becher *et al.* etwa 75 % des Gesamtproteoms identifiziert und annähernd 65 % der Proteine quantifiziert werden. [74] In einem weiteren Ansatz von Ziebandt *et al.* wurden 25 klinische *S. aureus*-Isolate auf ähnliche Weise analysiert, um einen Einblick in das Proteom von klinisch relevanten und an die Situation im Krankenhaus adaptierten Stämmen zu gewinnen. [72]

Die Erkenntnisse hinsichtlich der Exoproteom-Komposition von *S. aureus* aus den zuvor beschriebenen Proteomstudien und eine anschließende *in silico* Analyse diente als Grundlage für die Auswahl der 12 Proteine (siehe Tabelle 21-23) zur funktionellen Charakterisierung innerhalb dieser Arbeit.

5.2 Vermittlung von Adhärenz durch sekretierte Proteine

Die anhand von Exoproteom-Studien ausgewählten Proteine wurden zunächst rekombinant in *E. coli* exprimiert und Insertionsmutanten in verschiedenen *S. aureus*-Stammhintergründen hergestellt. Im Anschluss folgte die funktionelle Charakterisierung der Proteine hinsichtlich Adhärenzvermittlung, Beteiligung an der Invasion in eukaryotische Zellen, Komplementinteraktion und *in-vivo*-Aktivität.

Während der Kolonisierung und Infektion des Wirtes ist eine effektive Adhärenz an wirtseigene Oberflächen für das Pathogen essentiell. Dadurch sind die Bakterien in der Lage aus dem Blutstrom zu entkommen, in eukaryotische Zellen zu invadieren und auch in tiefer liegende Gewebsschichten vorzudringen. Um den Vorgang der Adhäsion bzw. Invasion zu ermöglichen, exprimiert *S. aureus* eine Vielzahl von Proteinen, die unter dem Begriff MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) zusammengefasst werden.

Aus diesem Grund lag ein Schwerpunkt bei der Analyse der funktionalen Eigenschaften der bislang uncharakterisierten Proteine auf der potentiellen Vermittlung von besonderen Adhärenzeigenschaften an wirtsspezifische Strukturen und Proteine durch die Targetproteine.

Dazu wurden in dieser Arbeit die aufgereinigten Proteine u.a. hinsichtlich ihrer Bindung an Fibronectin und weitere Proteine der extrazellulären Matrix (Laminin, Kollagen Typ IV und Entactin) in einem ELISA-basierten Ansatz untersucht. Dabei fiel auf, dass die Proteine P2, P4, P9 und P10 verstärkt an Fibronectin und die Proteine P2, P9 und P10 an Matrigel, das aus 56 % Laminin, 31 % Kollagen Typ IV und 8 % Entactin besteht, binden. Dies sind Hinweise für eine Beteiligung der Proteine P2, P4, P9 und P10 an der Adhärenzvermittlung.

Das bisher uncharakterisierte Protein P2 besteht aus einer LysM- und einer CHAP-Domäne und bindet sowohl an Fibronectin und Matrigel (siehe Abbildung 17). Beide Domänen sind bisher aus anderen Proteinen bekannt und erfüllen dort unterschiedliche Aufgaben. Die LysM-Domäne wurde erstmals in lytischen bakteriellen Proteinen, sogenannten Lysinen, identifiziert und wurde aufgrund seiner Struktur LysM (Lysin-Motiv)-Domäne genannt. Die LysM-Domäne variiert in der Länge zwischen 44 und 65 Aminosäuren und ist sowohl in bakteriellen als auch eukaryotischen Proteinen weit verbreitet. [156] In Bakterien findet man sie beispielsweise in der membrangebundenen lytischen Murein-Transglykosylase MltD von *E. coli*, in Lysozym, in Autolysinen oder auch in Protein A (SpA) von *S. aureus*. Die LysM-Domäne hat daher wahrscheinlich eine Zellwand-degradierende Funktion und kann an verschiedene Typen von Peptidoglykan und Chitin binden. Zudem wird diskutiert, ob es einen Einfluss auf die bakterielle Virulenz hat. [156,157] Außerdem konnte gezeigt werden, dass LysM-Domänen für die Lokalisation der bakteriellen Proteine entscheidend sind. Dabei werden die Proteine über LysM-Domänen nicht-kovalent an die Zellwand verankert. Dieser Vorgang wird hauptsächlich über die Bindung an Peptidoglykan vermittelt, wobei insbesondere die N-Acetylglucosamin-Untereinheit erkannt wird. [156]

Neben der LysM –Domäne besitzt das in dieser Arbeit untersuchte P2 auch noch eine CHAP-Domäne. Dieses Motiv kommt außerdem in P4 vor, für das hier ebenfalls eine Fibronectin-Bindung gezeigt werden konnte. CHAP-Domänen sind funktionell aktive Cystein, Histidin-abhängige Amidohydrolase/Peptidase-Domänen (*Cysteine, Histidine-dependent Amidohydrolase/ Peptidase domain*), die entweder N- oder C-terminal vorliegen. [158] Man unterscheidet zwei große Gruppen an CHAP-Domänen-Proteinen. Zur ersten Gruppe

gehören Proteine, die von Phagen oder Prophagen codiert sind. Innerhalb dieser Gruppe liegt die CHAP-Domäne meist N-terminal in den einzelnen Proteinen vor. Zur zweiten Gruppe gehören die bakteriellen CHAP-Proteine, bei denen die Domäne ausschließlich im C-terminalen Bereich der Proteine lokalisiert ist. [159] Das am besten charakterisierte Protein mit CHAP-Domäne ist LysK. Dabei handelt es sich um ein Endolysin, das von einem Bakteriophagen K in *S. aureus* codiert wird. Das Protein wird vom Phagen genutzt, um Wirtszellen zu lysieren, in dem es die Interpeptid-Brücke im Peptidoglykan-Rückgrat spaltet. [160–162] Es konnte gezeigt werden, dass die CHAP-Domäne von LysK *in vitro* sehr effizient gegen verschiedene *S. aureus*-Stämme wirkt. Diese Eigenschaft klassifiziert diese Art von Proteinen zu einem vielversprechenden Therapeutikum gegen *S. aureus*-Infektionen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass mit Hilfe von LysK *S. aureus* aus kolonisierten Nasen von Balb/c Mäusen komplett eliminiert werden konnte. [163–165] Da eine große Anzahl an bakteriellen Proteinen mit CHAP-Domänen bekannt ist, wird diesen, aufgrund der Peptidoglykan-spaltenden Eigenschaften, eine Rolle in der Zellteilung und im Wachstum der Bakterienzelle zugesprochen. Darüber hinaus wird eine kooperative Zusammenarbeit von mehreren Zellwandhydrolasen während der Zellteilung vermutet. [166–168]

Innerhalb des Genoms von *S. aureus* und bei anderen Staphylokokken-Spezies finden sich Proteine, die wie P2 und P4 ebenfalls LysM- und CHAP-Domänen beinhalten. Dazu zählt beispielsweise das Autolysin Aaa aus *S. aureus* bzw. Aae aus *S. epidermidis*. Beide Proteine enthalten jeweils drei LysM-Domänen und eine CHAP-Domäne. Für beide Autolysine konnte in *in-vitro*-Experimenten bzw. mittels *surface plasmon resonance* eine Bindung an Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Vitronektin, Fibronektin und Fibrinogen gezeigt werden. In diesen Studien wurde erstmals nachgewiesen, dass LysM- und CHAP-Domänen auch an der Bindung von Wirtsfaktoren beteiligt sind. [169–171] Die Erkenntnisse aus den Studien mit Autolysin (Aaa) lassen sich möglicherweise auch auf die hier untersuchten Proteine P2 und P4 übertragen, da beide ebenfalls LysM- und CHAP-Domänen enthalten. Wahrscheinlich wird die Bindung von P2 und P4 an Wirtsfaktoren ebenfalls über eine der beiden Domänen vermittelt.

Neben P2 und P4 wurden in dieser Arbeit auch die Bindungseigenschaften von P3 untersucht, das eine ähnliche Domänenstruktur wie P2, P4 und Autolysin Aaa besitzt. P3 beinhaltet zwei LysM-Domänen und eine CHAP-Domäne. Wie in Kapitel 4.1.4.5 dargestellt, konnte keine Bindung von P3 an Fibronektin gezeigt werden. Demzufolge ist nicht die Anzahl

der entsprechenden Domänen für die Bindungseigenschaften entscheidend, sondern vielmehr ein Zusammenspiel der einzelnen Domänen bzw. die native Konformation des Proteins. In *Treponema denticola* wurde gezeigt, dass die Fähigkeit von Proteinen mit M23-Peptidase-Domänen zur Bindung an Matrix- oder Plasmafibronektin nicht mit der Anzahl der LysM-Domänen innerhalb des Proteins korreliert. [172] Demnach muss P3 nicht zwingend an Fibronektin binden, obwohl es mehr LysM-Domänen besitzt als das in dieser Arbeit untersuchte Proteine P2. Möglicherweise bindet P3 andere, bislang nicht untersuchte Wirtsfaktoren und hat somit im Vergleich zu P2, P4 und Aaa lediglich eine veränderte Spezifität. Hinzu kommt, dass die bereits sehr gut charakterisierten Fibronektin-Bindeproteine FnbpA und FnbpB weder LysM- noch CHAP-Domänen besitzen. Demnach wird die Bindung an Fibronektin nicht ausschließlich über diese Domärentypen vermittelt.

Im Gegensatz zu den Exoproteinen P2, P3 und P4 ist die Domänen-Struktur der Proteine P9 und P10 anders. Beide Proteine beinhalten vier bzw. sechs MAP-Domänen. Jede MAP-Domäne besteht aus 110 Aminosäuren, wobei darin eine Subdomäne von 31 Aminosäureresten enthalten ist. Diese besitzt eine große Ähnlichkeit mit dem N-terminalen Ende der γ -Kette von eukaryotischen MHC Klasse II Molekülen und wird als MAP (*Major histocompatibility complex class II analog*)-Domäne bezeichnet. [173] Trotz der strukturellen Unterschiede konnte für beide Zielproteine eine Interaktion mit Fibronektin und anderen Wirtspoteinen gezeigt werden (siehe Kapitel 4.1.4.5).

In *S. aureus* sind Proteine mit MAP-Domänen weit verbreitet. Insbesondere das Protein Eap (*extracellular adhesion protein*) wurde in zahlreichen Studien genauer untersucht. Dieses besitzt mehrere dieser MAP-Domänen und bindet an ein breites Spektrum von Wirtsfaktoren, wie beispielsweise Fibronektin, Vitronektin, Thrombospondin und Kollagen. [174] Zudem wurde gezeigt, dass sich mehrere Eap-Moleküle zu Oligomeren zusammenschließen, diese nach der Sekretion an die Zelloberfläche von *S. aureus* zurück binden und die Agglutination von bestimmten *S. aureus*-Stämmen bewirken. [175,176] Es konnten neben der Bindung von Wirtspoteinen auch weitere Funktion von Eap gezeigt werden. So wirkt es auch inhibitorisch auf den Lektin-abhängigen und klassischen Weg der Komplement-Aktivierung und fungiert zudem als Proteaseinhibitor für infektionsrelevante Serinproteasen aus neutrophilen Granulozyten wie z.B. Elastase, Proteinase 3 und Cathepsin G. [177,178] Des Weiteren hat Eap einen Einfluss auf die Ausschüttung von Cytokinen, vermittelt die Bindung an Endothelzellen und aktiviert Blutplättchen. [179,180] Eap ist somit

ein multifunktionales Protein, das entscheidend für die Kolonisierung und Infektion des Wirtes ist, da es hauptsächlich Immunevasionsmechanismen vermittelt.

Wie bei dem Protein Eap handelt es sich bei den in dieser Arbeit analysierten Proteinen P9 und P10 ebenfalls um Proteine mit mehreren MAP-Domänen. Die Sequenz-Homologie zwischen Eap, P9 und P10 ist sehr hoch. Sie unterscheiden sich lediglich im N-terminalen Bereich und in der Anzahl der MAP-Domänen. Ein Sequenzvergleich der Proteinstrukturen befindet sich im Anhang dieser Arbeit im Abschnitt 7.4. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Proteine handelt es sich bei P9 und P10 sehr wahrscheinlich um Eap Analoge, wobei die MAP-Domänen höchstwahrscheinlich entscheidend für die Bindung an Fibronectin und andere Komponenten der extrazellulären Matrix sind. Hierbei ist auffällig, dass P9 weniger stark an Fibronectin bindet als P10. Hierfür könnte die Anzahl der MAP-Domänen verantwortlich sein, in der sich P9 von P10 unterscheidet. So besitzt P9 vier und P10 sechs MAP-Domänen. Demnach korreliert die Anzahl der entsprechenden Domänen mit der Fähigkeit an Wirtsproteine zu binden.

Zusammengefasst besitzen die in dieser Arbeit untersuchten Proteine P2, P4, P9 und P10 die Fähigkeit spezifisch an Komponenten der extrazellulären Matrix und insbesondere Fibronectin zu binden. Dies lässt sich durch die vorliegende Domänen-Struktur der Proteine erklären, die entweder LysM- und CHAP-Domänen bzw. MAP-Domänen beinhaltet. Jede dieser Domänen wurde bereits in der Literatur mit der Vermittlung von Adhärenzeigenschaften in Zusammenhang gebracht und ist somit wahrscheinlich für die Bindungseigenschaften der Proteine verantwortlich. Der Einfluss der einzelnen Domänen für die Adhärenz der hier untersuchten Proteine wurde bisher nicht detailliert analysiert und bedarf weiterer experimenteller Untersuchungen.

Neben der Bindung der Zielproteine an aufgereinigte Proteine bzw. Proteinmischungen *in vitro*, wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss dieser Proteine auf die Adhäsion an eukaryotische Wirtszellen untersucht. Dazu wurden Einzelmutanten hergestellt, bei denen die Gene der zu untersuchenden Proteine durch die Insertion eines Transposons deletiert wurden. Das Adhäsionsverhalten der Insertionsmutanten wurde mit dem isogenen wildtypischen Stamm verglichen. Hier konnte kein Effekt auf die Adhäsion an eukaryotische Zellen beobachtet werden.

Eventuell ist dies in der Redundanz der Adhärenz-vermittelnden Proteine begründet. *S. aureus* codiert für eine Vielzahl von Proteinen, die die Adhärenz und damit die

Kolonisierung von Wirtsgewebe vermitteln. Eine Redundanz der funktionellen Virulenzfaktoren von *S. aureus* ist bereits mehrfach beschrieben worden. [181–183] Die Proteine, die unter anderem die Adhäsion vermitteln, werden unter dem Begriff MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) zusammengefasst. Alle Proteine dieser Klasse besitzen einige strukturelle Gemeinsamkeiten, die vor allem den Transport über die Membran und die Verankerung an der Zellwand begünstigen. [173] Zahlreiche Vertreter dieser Gruppe wie beispielsweise Spa (*staphylococcal protein A*), ClfA (*Clumping factor A*) und FnbpA/B (Fibronektin-Bindeproteine) sind bereits detailliert beschrieben worden.

Vermutlich konnte durch die Redundanz der Adhärenz-vermittelnden Proteine keine veränderte Adhäsion an bzw. Invasion in Wirtszellen mit dem in dieser Arbeit durchgeführten Ansatz gezeigt werden. In weiterführenden Experimenten könnte daher untersucht werden, ob eine Zugabe des aufgereinigten Zielproteins die Adhäsion an eukaryotische Wirtszellen gegenüber dem wildtypischen Stamm deutlich verbessern würde. So könnte möglicherweise indirekt ein Einfluss der Zielproteine auf die Adhäsion an eukaryotische Wirtszellen gezeigt werden. Darüber hinaus wäre es weiterführend auch möglich, den Einfluss der Bindeproteine auf die Invasion in die eukaryotischen Zellen in diesem veränderten Ansatz zu untersuchen.

5.3 Komplement-inhibierende Eigenschaften der Zielproteine

Überwinden Mikroorganismen die erste physikalische Barriere des Wirtes, d.h. Haut oder Schleimhäute, werden sie direkt mit den Mechanismen des Immunsystems konfrontiert. [47,48] Gelingt es den Bakterien bis in den Blutstrom vorzudringen, werden diese in der Regel direkt durch das Komplementsystem eliminiert. Einige Pathogene haben allerdings effektive Mechanismen entwickelt, um der Opsonisierung und der direkten Lyse durch das Komplementsystem zu entgehen. Dafür sekretieren sie einerseits spezifische Proteasen, die Teile des Komplementsystems spalten. Andererseits exprimieren einige Pathogene auch Proteine, die die Tarnung vor dem Komplementsystem vermitteln. Beide Strategien verhindern somit gezielt den Ablauf der proteolytischen Komplement-Kaskade. Die Komplement-Inhibierung ist ein wichtiger Mechanismus, der für die Pathogene während der Infektion und Ausbreitung im Blutstrom essentiell ist. Beispiele für Komplement-

inhibierende Proteine sind bereits aus Gram-negativen Pathogenen (*Escherichia coli*, *Borrelia burgdorferi*, *P. aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*), Gram-positiven Bakterien (*S. pyogenes*, *S. pneumoniae*) und in Pilzen (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*) bekannt. [56–58,62,64–69]

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Sascha Böhm (HKI, Jena) die Komplement-inhibitorischen Eigenschaften der Proteine P1-P5 und P7-P10 untersucht. Dazu wurden die Proteine zusammen mit Erythrozyten und humanem Serum inkubiert. Unter Zugabe eines Kontrollproteins (z.B. Albumin), das keinen Einfluss auf das Komplementsystem hat, würden die im Serum enthaltenen Komplement-Proteine die Erythrozyten innerhalb kürzester Zeit lysieren. Durch Zugabe eines Komplement-inhibierenden Faktors könnte die Lyse der Erythrozyten hingegen verhindert werden.

Wie in Kapitel 4.1.4.7 beschrieben, konnte eine Komplement-inhibierende Aktivität für die Proteine P1 und P5, das identisch mit dem gut charakterisierten Protein SCIN ist, gezeigt werden. Eine weiterführende Analyse, in der die Zielproteine P1 und P5 in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt wurden, machte zudem einen Vergleich der Aktivität der beiden Komplement-Inhibitoren möglich. Durch diese Analyse konnte gezeigt werden, dass P1 bereits ab einer Konzentration von 0,5 μM die Lyse der Erythrozyten vollständig verhindert. Im Vergleich dazu inhibiert SCIN (P5) das Komplementsystem bereits bei einer Konzentration von 0,25 μM sehr effizient. Dies zeigt, dass P1 ähnliche Eigenschaften wie SCIN (P5) besitzt, aber SCIN das wesentlich potentere Protein in Bezug auf Komplement-Inhibition ist.

Das Protein P1 ist in Datenbanken (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>, 28.10.15) als Fibrinogen-Bindeprotein Vorläufer annotiert. Das für P1 codierende Gen liegt mindestens 20 verschiedenen *S. aureus*-Genomen identisch vor (KEGG-Datenbank, Stand: 09.11.15) und befindet sich in unmittelbarer Nähe weiterer Gene, die für Fibrinogen-Bindeproteine wie beispielsweise Efb codieren. Eine *in silico* Analyse der Domänenstruktur von P1 ergab zudem Ähnlichkeiten zur aktiven Domäne des Komplement Inhibitors SCIN (P5). P1 und SCIN haben eine Länge von 116 Aminosäuren, wobei die Aminosäuresequenz der beiden Proteine zu mindestens 44 % identisch ist und der Konsensus 58 % beträgt. Dieser Vergleich ist in Abbildung 62 dargestellt. Beide Proteine weisen eine hohe Homologie in dem Bereich zwischen Aminosäure 60 und 80 auf. Dieser Bereich wurde für die Komplement-inhibierende Funktion von SCIN als essentiell beschrieben. [184]

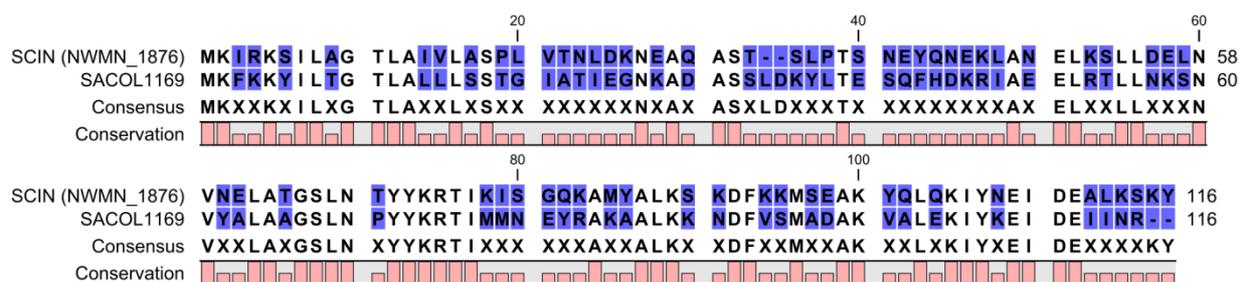


Abbildung 62: Sequenz-Homologie zwischen den Proteinen SCIN (NWMN_1876, P5) und P1 (SACOL1169). Die Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind in blau dargestellt.

Das Protein SCIN kommt in über 80 % aller *S. aureus*-Stämme konserviert vor und wird zusammen mit anderen Virulenz-assoziierten Proteine wie beispielsweise CHIPS und Sak von einem Phagen codiert, der in das Gen *hly* (β -Hämolyisin) inseriert ist. Da sich in diesem Genabschnitt viele für die Virulenz relevante Gene befinden, wurde der Bereich auch als IEC (*innate immune evasion cluster*) bezeichnet. [185] SCIN wird vom globalen Regulator Sae reguliert und hauptsächlich während der exponentiellen Wachstumsphase produziert. Damit ist SCIN ein Modulator der frühen Immunantwort. [186]

SCIN ist ein human-spezifischer Faktor, der die Fähigkeit besitzt, die Aktivierung des Komplementsystems zu inhibieren. [34] Hierbei verhindert SCIN aktiv die Formation einer aktiven C3-Konvertase C3bBb (alternativer Weg) und C4b2a (klassischer Weg) und blockiert dadurch das vollständige Ablaufen der Komplement-Kaskade. Weiterhin verhindert SCIN die Phagozytose der Bakterien durch neutrophile Granulozyten, indem es die Opsonisierung durch Peptide des Komplementsystems (vor allem C3b) verhindert. [34] Aufgrund dieser Eigenschaften wurde bereits vorgeschlagen, SCIN als entzündungshemmendes Therapeutikum einzusetzen. [187]

In der Literatur sind bereits mehrere Proteine als Varianten von SCIN beschrieben, die zusätzlich im Genom von *S. aureus* codiert sind. Diese wurden mit SCIN-B, SCIN-C und SCIN-D (oder auch ORF-D) bezeichnet. Für die Varianten SCIN-B und SCIN-C konnte ebenfalls eine Komplement-inhibierende Wirkung gezeigt werden. Bei SCIN-D handelt es sich wahrscheinlich um eine inaktive Form. [187]

Aufgrund der Homologie von P1 und SCIN (P5) und der ähnlichen Aktivität hinsichtlich des Komplementsystems handelt es sich bei dem hier untersuchten Protein P1 möglicherweise um eine Variante des Proteins SCIN: SCIN-B oder SCIN-C.

5.4 PurA - ein multifunktionales *Moonlighting*-Protein?

Das Protein PurA codiert für eine Adenylosuccinat-Synthase, die eine zentrale Rolle im Purin-Synthese-Weg von Prokaryoten und Eukaryoten übernimmt. [188] Dabei katalysiert es in einer GTP-abhängigen Reaktion die Umsetzung von Inosin-5-Monophosphat (IMP) und Aspartat zu Adenylosuccinat (sAMP). Das Enzym PurA steht somit zusammen mit PurB am Ende einer Reihe von Reaktionen, die ausschließlich durch Proteine des *pur*-Operons katalysiert werden. Das Enzym katalysiert damit die zentrale Reaktion an einem Knotenpunkt der Purin- und AMP-Synthese. Dabei wird das Endprodukt der *de novo* Purin-Nukleotid-Biosynthese IMP zu sAMP umgesetzt, wodurch der erste Schritt der AMP-Biosynthese vollzogen wird. Die weitere Umsetzung von sAMP zu AMP erfolgt dann durch das Enzym PurB, das sowohl in der *de novo* Purin-Biosynthese als auch während der AMP-Synthese die Abspaltung von Fumarat katalysiert. Neben dieser wichtigen Aufgabe übernimmt PurA zusätzliche Funktionen innerhalb von Abbau- und Umwandlungswegen von Purinnukleotiden (*salvage pathway*). [148,188,189] PurA stellt somit ein Schlüsselenzym des Anabolismus von Purinen und Signalmolekülen dar. Die wichtigsten Reaktionen sind in Abbildung 63 zusammenfassend dargestellt.

Die Regulation der Adenylosuccinat-Synthase-Aktivität wurde im Bereich der Prokaryoten hauptsächlich in *E. coli* untersucht. Wie in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, erfolgt die Regulation des Enzyms auf unterschiedlichen Ebenen. Auf der transkriptionellen Ebene steht PurA unter negativer Kontrolle des Repressors PurR und des Ko-Repressors ATP. [188,190] Des Weiteren ist die Enzym-Aktivität direkt von der Substratverfügbarkeit abhängig. [191]

Die Funktion von PurA in der Purin-Synthese konnte in verschiedensten Organismen homolog nachgewiesen werden. Beim Menschen ist die Adenylosuccinat-Synthase-Aktivität beispielsweise gewebespezifisch. Dabei konnte in fast allen Geweben, mit Ausnahme von Erythrozyten, zumindest ein basales Aktivitätslevel nachgewiesen werden. [192] Die höchsten Aktivitäten wurden in der Skelett- und Herzmuskulatur und im Hoden gemessen. [193]

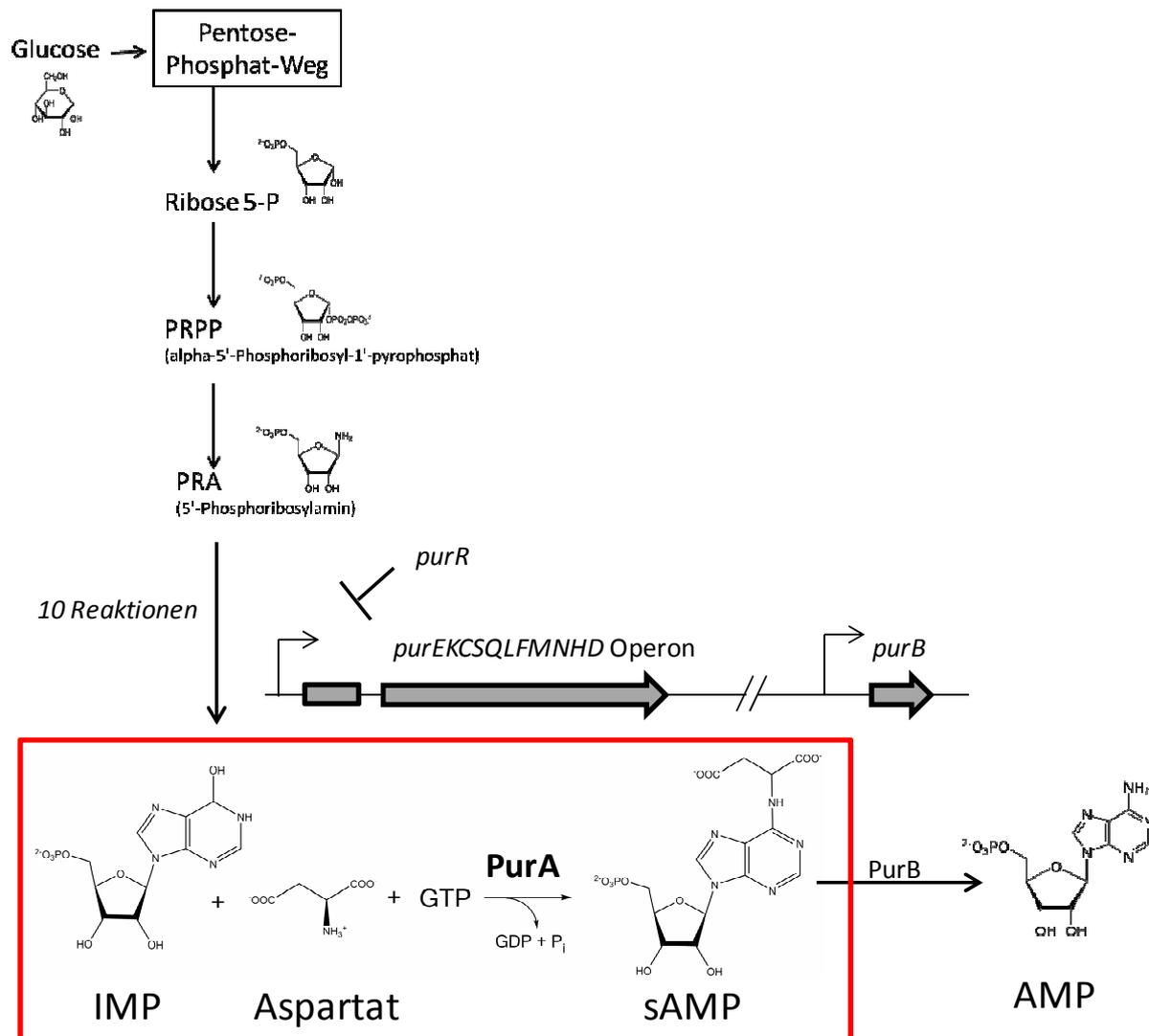


Abbildung 63: Schematische Darstellung der Purin-Biosynthese und AMP-Synthese. Die Pur-Proteine (PurE-PurD), die innerhalb des *pur*-Operons organisiert sind, sind zusammen mit PurB für die Umsetzung von PRA zu IMP verantwortlich. Besonders hervorgehoben ist der nachfolgende Schritt, der die Umsetzung von IMP und Aspartat zu sAMP durch PurA darstellt. Der letzte Schritt in der *de novo* Purin-Synthese wird im Anschluss daran wiederum von PurB (bifunktionelles Enzym) katalysiert.

Neben dem Nachweis der Aktivität und der Regulation von PurA konnte gezeigt werden, dass die Gensequenz in Prokaryoten wie auch in Eukaryoten hochkonserviert vorliegt. Beim Vergleich zwischen acht verschiedenen Staphylokokken-Spezies sind die Aminosäure-Sequenzen zu 81 % identisch, wobei der Konsensus über 98 % beträgt. Die Unterschiede zwischen den einzelnen PurA-Varianten sind im Anhang dieser Arbeit in Abbildung 69 dargestellt.

Über die bisher bekannte Funktion im Stoffwechselweg hinaus, konnte in dieser Arbeit erstmals eine Komplement-inhibierende Funktion von PurA nachgewiesen werden. Diese

inhibierende Funktion beruht wahrscheinlich auf der spezifischen Bindung des humanen Komplement-Regulators Faktor H (siehe Kapitel 4.3.4). Darauf deuten vor allem die ELISA-basierten Experimente, bei denen die Bindung von PurA an Faktor H eindeutig gezeigt werden konnte. Zusätzlich dazu konnte Anika Westphal (HKI, Jena, AG Zipfel) in Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe die Komplement-inhibierenden Eigenschaften von PurA weiterführend analysieren. Dabei konnte zusätzlich zur Faktor H-Bindung die Interaktion von PurA mit CFRH1 (*complement factor H related protein 1*) und FHL-1 (*Factor H-like protein 1*) nachgewiesen werden.

Neben den Interaktionsstudien identifizierte A. Westphal zudem die spezifische Bindestelle von PurA innerhalb von Faktor H. Faktor H besteht aus einer Kette von 20 Domänen (siehe Abbildung 64). Jede dieser Domänen ist identisch aufgebaut und wird als CCP-Modul (*complement control protein module*) bezeichnet. Die unterschiedlichen Module übernehmen dabei spezifische Funktionen. Insbesondere die Domänen CCPs 6-8 und CCPs 19-20 sind für die Erkennung und Bindung von körpereigenen Strukturen wie beispielsweise Glykosaminoglykane und Sialinsäure als Bestandteil von Proteoglykanen, Glykoproteinen und der extrazellulären Matrix essentiell. Liegt Faktor H an der Zelloberfläche in gebundener Form vor, so verhindert es dort die Amplifikation der aktiven C3-Convertase, wodurch sowohl die Opsonisierung als auch die Lyse der Faktor H-markierten Zelle inhibiert wird (siehe auch Kapitel 1.2.1 und 1.3). [47] Die Bindung von PurA konnte an die CCP-Domänen gezeigt werden, die für die Erkennung von körpereigenen Strukturen entscheidend sind (A. Westphal, persönlich).

Neben der Bindestelle der Interaktionspartner in Faktor H, wurde hier die Bindestelle innerhalb von PurA identifiziert (siehe Kapitel 4.3.6 und 4.3.7). Hierbei konnte eine Interaktion von Faktor H mit dem aktiven Zentrum der Adenylosuccinat-Synthase-Funktion von PurA ausgeschlossen werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die ersten 200 N-terminal vorliegenden Aminosäuren von PurA essentiell für die Interaktion mit Faktor H sind. Die Untersuchungen zur Bindestelle in Faktor H und PurA untermauern die Interaktion der beiden Proteine zusätzlich.

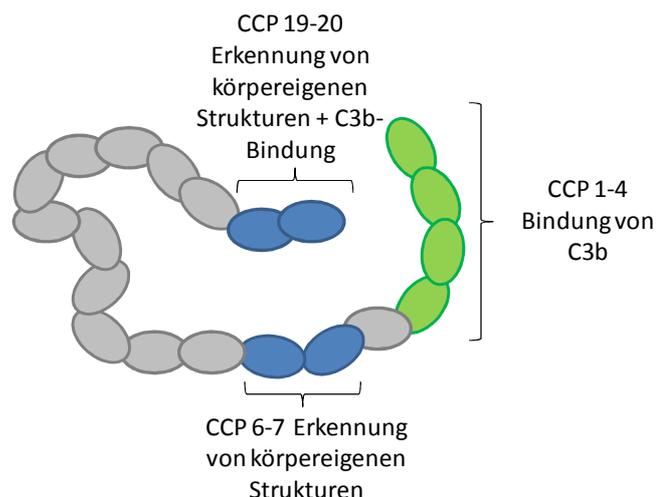


Abbildung 64: Schematische Darstellung von Faktor H des Komplementsystems. Faktor H ist aus 20 Untereinheiten (sog. CCP-Modulen) aufgebaut. Dabei sind insbesondere die CCPs 6-7 und 19-20 (blau) an der Erkennung von körpereigenen Oberflächenmarkern beteiligt. Die Bindung von C3b und die damit einhergehende Blockade der Komplement-Kaskade wird hauptsächlich von CCP 1-4 (in grün) und CCP 19-20 übernommen. Modifiziert nach [47]

Neben der Interaktion von PurA mit verschiedenen Komplement-Regulatoren wie Faktor H, CFRH1 und FHL-1 wurde PurA hinsichtlich weiterer Komplement-regulatorischer Eigenschaften durch A. Westphal untersucht. Dabei konnte sie zeigen, dass der Komplex aus PurA und Faktor H als Ko-Faktor für Faktor I fungiert. Dadurch ist Faktor I in der Lage C3b in iC3b und C3d zu spalten und es auf diesem Wege vollständig zu inaktivieren (siehe auch Kapitel 1.3). Darüber hinaus besitzt PurA einen starken inhibitorischen Effekt auf die Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg und verhindert zudem die Ausbildung des MAC (*Membrane attack complex*) bestehend aus den Proteinen C5b6-9. Basierend auf den Ergebnissen zur Faktor H-Bindung von PurA und dessen Einfluss auf weitere Komponenten des Komplementsystems wurde ein umfangreiches Modell zur Komplementevasion von *S. aureus* mittels PurA entwickelt. Dieses in Abbildung 65 dargestellt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit und von A. Westphal, dass es sich bei PurA um ein Faktor H bindendes Protein handelt. Demzufolge existiert für dieses von *S. aureus* sekretierte Protein noch eine vom Metabolismus unabhängige Funktion. Bei PurA handelt es sich demnach um ein multifunktionales *Moonlighting*-Protein. Unter *Moonlighting*-Proteinen versteht man Polypeptide, die zwei oder mehr unterschiedliche Funktionen übernehmen können. Dabei werden sie von einem Gen codiert und resultieren aus einem Transkript. [194,195] Die multifunktionalen Proteine sind demnach keine Produkte von Gen-Fusionen, alternativem Spleißen oder mehrfacher Proteolyse. [196] Die meisten *Moonlighting*-Proteine sind evolutionär hochkonservierte Enzyme. [94,197] Bis heute sind ca. 300 dieser Proteine bekannt. Sie wurden in unterschiedlichen Organismen

identifiziert, zählen zu verschiedenen Proteinklassen und übernehmen eine Vielzahl von biologischen Funktionen. [198,199] Dabei ist noch nicht eindeutig geklärt, welche evolutionäre Bedeutung die Entwicklung von multifunktionalen Proteinen hat. Es wird diskutiert, dass für die Funktion irrelevante Domänen so verändert wurden, dass das Protein eine zweite unabhängige Funktion ausüben kann. Zumindest für prokaryotische Proteine geht man davon aus, dass *Moonlighting*-Proteine aus energetischen Gründen entstanden sind, da auf diesem Wege weniger Proteinbiosynthese nötig ist. Des Weiteren bleibt das Genom hinsichtlich seiner Größe stabil, was dazu führt, dass für die Replikation keine zusätzliche Energie aufgewendet werden muss. [200,201] Die Multifunktionalität der Proteine wurde ausschließlich zufällig entdeckt, da keine bioinformatische Identifikation möglich ist. [196]

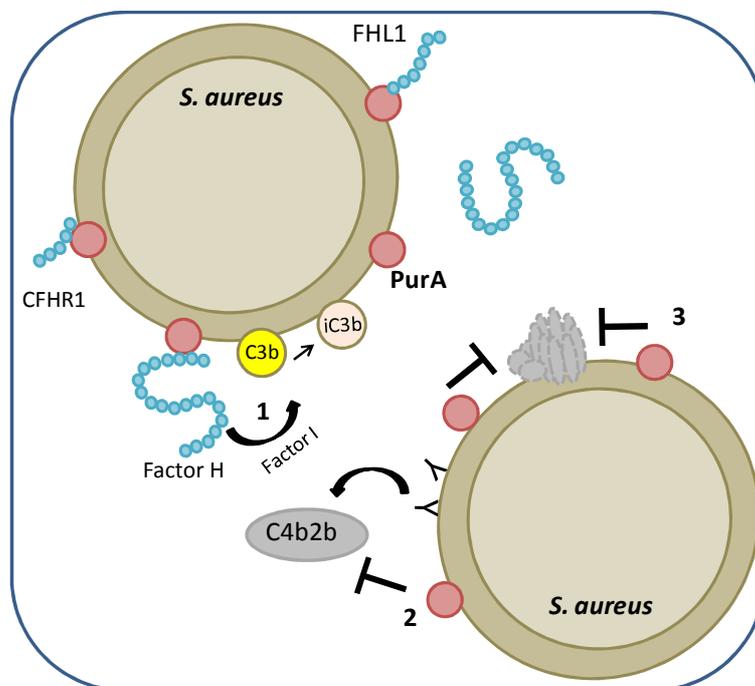


Abbildung 65: Modell zur Komplementevasion von *S. aureus* durch PurA. PurA (roter Kreis) befindet sich auf der Oberfläche der Bakterienzelle. Dort bindet es Faktor H und CFHR1. Dadurch trägt es im Zusammenspiel mit Faktor I zur Inaktivierung von C3b bei (1). Des Weiteren verhindert es die Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg, indem es die C3-Konvertase C4b2b inhibiert (2). Zudem blockiert PurA die Ausbildung des MAC und verhindert somit direkt die Lyse der Bakterien (3) (A. Westphal, persönlich).

Zusammengefasst handelt es sich bei PurA um ein multifunktionales *Moonlighting*-Protein, das eine evolutionär konservierte Funktion im Purin-Stoffwechsel übernimmt und gleichzeitig als Komplement-Inhibitor fungiert und somit aktiv an der Immunevasion beteiligt ist.

5.5 Transport von PurA in das extrazelluläre Milieu

In dieser Arbeit konnte PurA als Faktor H-bindendes Protein in *S. aureus* identifiziert werden. Aufgrund seiner bekannten Funktion in der Purin-Biosynthese ist PurA bisher in der Literatur als cytosolisches Protein bekannt. Diese cytoplasmatische Lokalisation ist in unabhängigen Studien in verschiedenen Organismen bestätigt worden. [74,202] Wie in Kapitel 4.3.4 gezeigt, übernimmt PurA neben der Funktion in der Purin-Synthese noch eine weitere Funktion als Komplement-Inhibitor. Für diese Funktion ist eine extrazelluläre Lokalisation essentiell, da die Komplement-Inhibition an der Zelloberfläche erfolgen muss. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob PurA auch außerhalb der Bakterienzelle lokalisiert vorzufinden ist. Dazu wurden Methoden wie fraktionierende Western Blot-Analyse, FACS und Mikroskopie angewendet.

Alle durchgeführten Analysen zeigen, dass PurA Oberflächen-assoziiert vorliegt (siehe Kapitel 4.3.9). Eine Oberflächen-assoziierte Lokalisation von PurA wurde auch für *E. coli* und *S. aureus* in früheren Studien beschrieben. In einem 2D-Gel basierten Ansatz in *E. coli* wurde PurA sowohl im Cytoplasma als auch in der Membranfraktion gefunden. [202] Darüber hinaus wurde in einer globalen Proteomstudie in *S. aureus* COL PurA in der cytosolischen Fraktion, Oberflächen-assoziiert und extrazellulär gefunden. [74] Dabei wurde beobachtet, dass sich die extrazelluläre Proteinmenge während der stationären Phase im Vergleich zur logarithmischen Wachstumsphase nicht ändert. Die beobachtete konstante Proteinmenge in *S. aureus* spricht für einen Lyse-unabhängigen Transportmechanismus von PurA. Darüber hinaus konnte in dieser Studie eine Integration von PurA in die Membran ausgeschlossen werden. [74] Zusammengefasst deuten sowohl die früheren Studien als auch die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass PurA auch Oberflächen-assoziiert vorliegt.

Obwohl es zahlreiche Studien gibt, die die Sekretion von cytoplasmatischen Proteinen untersuchen, konnte bislang kein genereller Mechanismus für den Transport identifiziert werden. Deutlich für eine gezielte Exkretion von cytoplasmatischen Proteinen spricht die Beobachtung, dass lediglich ein definiertes Spektrum an Proteinen transportiert wird. [203] Das deutet auf eine Vorselektion der zu transportierenden Proteine hin. Das Vorhandensein dieser Vorselektion wurde in einer Untersuchung mit einer Enolase aus *E. coli* gezeigt. [204] Dieses Enzym hat eine Funktion im Stoffwechsel der Zelle und wird zusätzlich sekretiert. Während der cytoplasmatisch ablaufenden enzymatischen Reaktion bindet das Substrat 2-

Phosphoglycerat an Lysin341 im aktiven Zentrum der Enolase. Wird die entscheidende Aminosäure Lys341 durch eine andere ersetzt, wird nicht nur die Substratbindung sondern auch die Exkretion der Enolase verhindert. [204] Diese Ergebnisse zeigen, dass der Transport von cytoplasmatischen Proteinen über die Membran selektiv ist und von der Modifikation des Zielproteins abhängig sein kann.

Da der Transportmechanismus von cytoplasmatischen Proteinen bisher ungeklärt ist, sind keine Informationen über den Translokationsmechanismus von PurA über die Membran in der Literatur bekannt. Durch *in silico* Analysen konnte bisher lediglich ausgeschlossen werden, dass die Proteinstruktur von PurA eine typische Signalsequenz für den Proteinexport aufweist. Des Weiteren findet sich kein bisher bekanntes Motiv bzw. Domäne, die eine kovalente oder nicht-kovalente Verankerung an der Membran ermöglicht (<http://smart.embl-heidelberg.de/>, 01.11.2015).

Generell gibt es für den Proteintransport in Gram-positiven Bakterien Signalpeptid-abhängige und –unabhängige Mechanismen, die potentiell für den Transport von PurA in Frage kommen. Signalpeptid-abhängige Systeme sind das Sec- und das Tat-Translokationssystem. Beide Systeme sind in Abschnitt 1.5 detaillierter beschrieben. Allerdings kommen sowohl das Sec- als auch das Tat-Sekretionssystem eher nicht für den Transport cytoplasmatischer Proteine in Frage. [94] Gegen den Transport cytoplasmatischer Proteine durch Sec-abhängige Mechanismen sprechen Untersuchungen in *Bacillus subtilis*, in denen im Überstand einer SecA-Mutante weiterhin cytosolische Proteine zu finden waren. [205] Außerdem benötigen beide Systeme spezifische Signalsequenzen am N-Terminus des zu transportierenden Proteins für die Translokation [94], die in PurA nicht vorzufinden sind.

Neben den Signalpeptid-abhängigen Proteinsekretionsmechanismen können Proteine generell auch über Signalpeptid-unabhängigen Mechanismen transportiert werden (siehe Abbildung 66). Dazu zählt u.a. das Holin-Antiholin-System, welches in *S. aureus* vermutlich nicht an der Freisetzung von cytoplasmatischen Proteinen beteiligt ist. [206] Mutanten der Holin-Antiholin-Systeme LrgAB und CidAB zeigten keine Unterschiede in der Sekretion von cytoplasmatischen Proteinen. Ein weiteres Signalpeptid-unabhängiges System ist das ESAT-6 Transportsystem (T7SS). Darüber werden die Proteine EsxA, EsxB und EsaC transportiert, welche teilweise an der Virulenz von *S. aureus* beteiligt sind. [90,207] Da eine Beteiligung von ESAT-6 am Transport von funktionellen cytoplasmatischen Proteinen bisher nicht untersucht wurde, kann eine Mitwirkung am Transport von PurA nicht vollständig

ausgeschlossen werden. Neben den Holin-Antiholin-Systemen und dem ESAT-6 Transporter können Proteine ohne Signalsequenz auch über ABC-Transporter über die Membran transloziert werden. Diese sind in Gram-positiven Bakterien weit verbreitet und oft am Nährstofftransport oder am Efflux von Antibiotika beteiligt. [94] Darüber hinaus ist der Pmt ABC-Transporter in den Transport von Virulenz-assoziierten PSMs (*phenol-soluble modulins*) involviert. [208] Bei ABC-Transportern kann eine generelle Beteiligung am Transport cytosolischer Proteine wie beispielweise PurA nicht ausgeschlossen werden.

Zusätzlich zu den gängigen Transportmechanismen sind in Abbildung 66 die Phagen-induzierte Lyse und die Autolyse als weitere potentielle Transportwege cytoplasmatischer Proteine dargestellt. Die Beteiligung der beiden Systeme am Transport von cytoplasmatischen Proteinen wurde in der Literatur vielfach diskutiert. Man ging davon aus, dass extrazelluläre cytoplasmatische Proteine lediglich aus der Lyse der Zellen resultieren, da Phagen, Autolysine und die Zellwand-Integrität einen Einfluss auf den Grad der Sekretion bestimmter Proteine haben. Das Genom von *S. aureus* codiert für bis zu vier bekannte Prophagen [209]. Bei einem Vergleich zwischen einem *S. aureus*-Stamm mit Phagen und einem Stamm, bei dem alle Phagen eliminiert wurden, konnte kein Unterschied in der Zusammensetzung der extrazellulären cytoplasmatischen Proteine gefunden werden. [203] Dies deutet darauf hin, dass die Phagen-induzierte Lyse keinen Einfluss auf das Exoproteom hat.

Autolyse wird in *S. aureus* hauptsächlich durch das Protein Atl ausgelöst. Dabei handelt es sich um eine Peptidoglykan-Hydrolase. In einer Atl-Deletionsmutante ist die Autolyse stark verringert. [203,210] Zudem konnte gezeigt werden, dass die Menge an typischen cytoplasmatischen Proteinen im Sekretom signifikant geringer ist. [203,210] Dennoch wurde festgestellt, dass die cytoplasmatischen Proteine weiterhin sekretiert wurden, diese jedoch im extrazellulären Bereich zwischen den für die Mutante typischen Zellaggregaten eingeschlossen sind. [203] Die zufällige Autolyse-vermittelte Freisetzung cytoplasmatischer Proteine in das extrazelluläre Milieu ist somit als möglicher Transportmechanismus von PurA unwahrscheinlich.

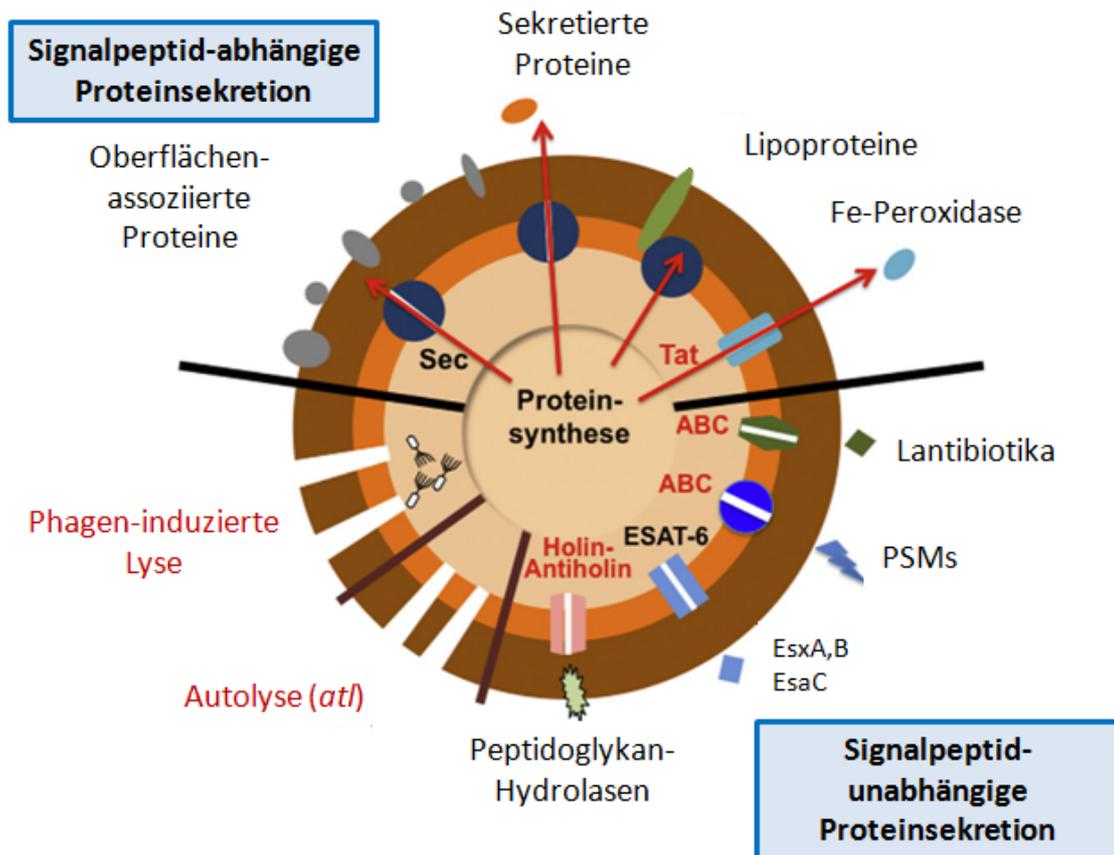


Abbildung 66: Übersicht über Proteintransport-Systeme in Staphylokokken. Die obere Hälfte zeigt die Signalpeptid-abhängigen Transportwege (Sec- und Tat-Transportweg). Der untere Teil zeigt die Signalpeptid-unabhängigen Transportmechanismen (ABC-Transporter, ESAT-6 Transporter und Holin-Antiholin-System), wobei Autolyse und Phagen-induzierte Lyse keine klassischen Transportmechanismen darstellen. Modifiziert nach [94]

Da klassische Signalpeptid-abhängige und –unabhängige Transportmechanismen sowie Phagen-induzierte Lyse und Autolyse für die Freisetzung cytoplasmatischer Proteine nicht in Frage kommen, werden in der Literatur alternative Mechanismen diskutiert. [94] So wurde für die Exkretion von cytoplasmatischen Proteinen ein Vesikel-vermittelter Transportmechanismus vorgeschlagen, ähnlich den aus höheren Eukaryoten bekannten „nicht-klassischen“ Proteinexport-Mechanismen. Diese „nicht-klassischen“ Proteinexport-Mechanismen sind in Eukaryoten evolutionär konserviert und im Gegensatz zu klassischen Proteinexportwegen unabhängig vom endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat. [211] In Säugetieren konnte bereits der Transport von einigen Proteinen wie z.B. IL-1, FGF-1/-2 (*fibroblast growth factor-1/-2*) und HMGB1 (*high mobility group chromatin-binding proteins*) über die „nicht-klassischen“ Wege gezeigt werden. [212,213]

Vereinzelt gibt es in der Literatur auch Hinweise für die Existenz dieses nicht-klassischen Vesikel-vermittelten Transports in Prokaryoten. So wurde gezeigt, dass sich in *Salmonella* Membranvesikel am Septum und entlang des Zellkörpers anlagern und dort die vesikulär enthaltenen cytoplasmatischen Proteine freigesetzt werden. Die Proteinzusammensetzung und die Proteinmenge der Membranvesikel am Septum unterscheiden sich dabei von der Zusammensetzung der Vesikel, die entlang des Zellkörpers angelagert werden. [214]

Neben dem Vesikel-vermittelten Transport wurde in einer anderen Studie ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem der Transport der cytoplasmatischen Proteine mit der Zellteilung assoziiert ist. [95] Dabei werden die cytoplasmatischen Proteine gezielt in den sich bildenden Septum-Spalt transloziert, wo sie sich transient im Geflecht der neuformierenden Zellwand verfangen. Mit dem Fortschreiten der Zellteilung werden sie langsam in das extrazelluläre Milieu freigesetzt.

Da es in der Literatur Hinweise auf die Existenz von nicht-klassischen Proteinexkretionsmechanismen sowohl in Bakterien als auch in Säugetierzellen gibt, könnte es sich bei dieser Sekretionsart um einen evolutionär konservierten Vorgang handeln. [94]

Zusammen genommen sprechen die Ergebnisse aus dieser Arbeit und die Resultate aus bereits durchgeführten Proteomstudien einerseits für den gerichteten und regulierten Transport von PurA über die Membran und andererseits für eine mögliche Funktion von PurA außerhalb der Zelle. Sowohl der Transport mittels Membranvesikel als auch die gezielte Translokation am Septum während der Zellteilung könnten als mögliche Mechanismen für den Transport von PurA in das extrazelluläre Milieu in Frage kommen. Jedoch kann eine Beteiligung des ESAT-6-Transporters und der ABC-Transporter nicht vollständig ausgeschlossen werden, die somit ferner für die Freisetzung von PurA in Frage kommen.

5.6 PurA ist ein entscheidender Virulenzfaktor

Nachdem die Funktion von PurA als Komplement-regulierendes Protein und seine Lokalisation im extrazellulären Milieu deutlich wurde, sollte die Relevanz von PurA im Infektionsgeschehen untersucht werden.

Jede Zelle, auch jede körpereigene Zelle, die mit Blutserum und den darin zirkulierenden Proteinen in Kontakt kommt, ist potentiell gefährdet durch das enthaltene

Komplementsystem lysiert bzw. opsonisiert zu werden. [47,50,51] Wären keine Schutzmechanismen vorhanden, so hätte dies eine massive Schädigung des eigenen Gewebes zur Folge. Schutz bietet in diesem Fall das im Blut zirkulierende Protein Faktor H. [52] Dieser wirkt sowohl an körpereigenen Oberflächen als auch an der extrazellulären Matrix. Diese Schutzfunktion erfüllt Faktor H, indem es bestimmte Glukosaminoglykane und Sialinsäure auf der Oberfläche von Zellen erkennt und dort bindet. Anschließend wird das Oberflächen-assoziierte Komplement-Protein C3b aktiv von Faktor H gebunden und inaktiviert. Dadurch wird ein Fortschreiten der Komplement-Kaskade aktiv verhindert. [53,54] Im Kapitel 1.3 dieser Arbeit wurde der Prozess der Komplement-Aktivierung bereits detailliert beschrieben.

Bei der Invasion in den Wirt werden Pathogene direkt vom Komplementsystem erkannt und das Protein C3b an der Bakterienoberfläche angereichert. Dies führt zur Opsonisierung und Lyse der Bakterien (siehe Kapitel 1.3). Mikroorganismen wie *S. aureus* haben allerdings Mechanismen entwickelt, um sich vor dem Komplementsystem zu schützen. Sie tarnen sich als „körpereigen“, indem sie ebenfalls den Komplement-inaktivierenden Faktor H aktiv an ihre Zelloberfläche binden. Dies führt, wie an körpereigenen Oberflächen auch, zu einer Inaktivierung von C3b und damit zur Inaktivierung der Komplement-Kaskade.

In der Literatur sind zahlreiche Pathogene beschrieben, die Faktor H-bindende Proteine für die Immunevasion bzw. für die Virulenz nutzen. So konnte in *S. aureus* das Protein Ecb (*extracellular complement binding protein*) identifiziert werden, welches die Anreicherung von Faktor H an die bakterielle Oberfläche begünstigt. [215] Darüber hinaus wurde für das Oberflächen-assoziierte Protein Sbi (*second immunoglobulin-binding protein*) ebenfalls eine Bindung an Faktor H nachgewiesen. Sbi bildet einen Komplex mit Faktor H und C3b, wodurch es die Komplement-abhängige Lyse der Bakterien verhindert. [216]

Auch in anderen Pathogenen sind Faktor H-bindende Proteine identifiziert worden. Zum Beispiel trägt das Shiga-Toxin 2 (Stx2) aus EHEC-Stämmen über seine Komplement-inhibierende Funktion maßgeblich zur Virulenz des Pathogens bei. [217] Darüber hinaus konnten Faktor-H bindende Proteine in *Borrelia burgdorferi*, *Pseudomonas aeruginosa* und in Streptokokken identifiziert werden. [218–221]

Die Expression von Faktor H-bindenden Proteinen ist nicht ausschließlich auf prokaryotische Pathogene beschränkt. Auch in eukaryotischen Parasiten wie *Plasmodium falciparum* wurde ein Protein identifiziert, welches die Lyse des Malaria-Parasiten im Mitteldarm der

Stechmücke verhindert, indem es Faktor H zur Oberfläche des Parasiten rekrutiert. [222] Wie die zahlreichen Beispiele bekannter Faktor H-bindender Proteine in prokaryotischen Pathogenen und Parasiten zeigen, stellt die Tarnung vor dem Komplementsystem eine wichtige Strategie zur Immunevasion dar und verdeutlicht zudem die Bedeutung eines Faktor H-bindenden Proteins für die Virulenz des Pathogens.

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, erfüllt PurA eine Funktion als Faktor H-bindendes Protein. In einem nächsten Schritt wurde nun untersucht, ob PurA das Virulenzpotential von *S. aureus* beeinflusst. Dafür wurde die Virulenz einer $\Delta purA$ -Mutante im Vergleich zum isogenen wildtypischen *S. aureus*-Stamm zunächst im alternativen Tiermodell *Galleria mellonella* analysiert (siehe Kapitel 4.3.12). Dort konnte beobachtet werden, dass die Mutante hinsichtlich ihrer Virulenz stark attenuiert war. Daneben wurde die Virulenz in zwei verschiedenen Mausmodellen untersucht (siehe Kapitel 4.3.14). Auch hier war der PurA-defiziente *S. aureus*-Stamm in beiden Mausmodellen in seiner Virulenz attenuiert. Dies deutet darauf hin, dass PurA einen Einfluss auf die Virulenz und damit auf die Etablierung einer Infektion nimmt. Als mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre ein verlangsamtes Wachstum der Bakterien aufgrund des Defektes in der Purin-Biosynthese denkbar, da unter bestimmten Kulturbedingungen auch ein *in-vitro*-Wachstumsdefekt der $\Delta purA$ -Mutante beobachtet werden konnte (siehe Kapitel 4.3.11). Daher wurde in nachfolgenden Versuchen untersucht, ob der Virulenzdefekt mit der metabolischen Funktion oder den Komplementevasionseigenschaften von PurA assoziiert ist. Dazu wurden zwölf weitere Mutanten der Purin-Biosynthese bezüglich ihres Wachstums getestet. Hierbei konnte ein, mit der *purA*-Mutante vergleichbarer Wachstumsdefekt für die Mutanten $\Delta purF$, $\Delta purH$, $\Delta purK$, $\Delta purL$ und $\Delta purS$ beobachtet werden (siehe Kapitel 4.3.13). Daraufhin wurde das Virulenzpotential der Einzelmutanten in *Galleria mellonella* untersucht. Hier konnte lediglich für die PurA-Mutante ein vermindertes Virulenzpotential beobachtet werden. Die Virulenz aller weiteren Mutanten war mit dem Wildtyp-Stamm vergleichbar (siehe Kapitel 4.3.13).

Da die weiteren Mutanten des *pur*-Operons trotz ihres Wachstumsdefekts in der Virulenz in *Galleria mellonella* mit dem Wildtyp vergleichbar sind, deutet dies darauf hin, dass die verminderte Virulenz der $\Delta purA$ -Mutante nicht allein in dem Defekt im Stoffwechselweg begründet ist. Allerdings kann eine Beteiligung des Stoffwechseldefekts an der

Verminderung des Virulenzpotentials durch die bisher gesammelten Ergebnisse nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Darüber hinaus wurde sowohl in *Galleria mellonella* als auch in Balb/c Mäusen überprüft, ob die PurA-Mutante das von wildtypischen *S. aureus*-Zellen sekretierte PurA für seinen eigenen Vorteil nutzen kann. Aus dem Grund wurde eine Ko-Infektion (Kompetition) durchgeführt (siehe Kapitel 4.3.15). Wenn das vom wildtypischen Stamm produzierte PurA von der Mutante genutzt werden könnte, würden sich beide Stämme gleich gut *in vivo* etablieren. In beiden Infektionsmodellen wurde allerdings fast ausschließlich der wildtypische *S. aureus*-Stamm re-isoliert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das vom Wildtyp produzierte PurA nicht von der Mutante genutzt werden kann, um die Virulenzeigenschaften zu komplementieren. Möglicherweise wird das vom wildtypischen Stamm sekretierte PurA-Protein sehr schnell an dessen Oberfläche rekrutiert, so dass es für den *purA*-defizienten Stamm nicht verfügbar ist.

Neben seiner Rolle in der Purin-Synthese besitzt PurA zusätzlich Komplement-inhibierende Eigenschaften. Demnach kann PurA auch als Virulenzfaktor klassifiziert werden. Insbesondere die deutliche Attenuation des *purA*-defizienten Stammes in der *in-vivo*-Situation untermauert die Relevanz von PurA für die Virulenz und die Etablierung einer *S. aureus*-Infektion. Des Weiteren verdeutlichen Beispiele für Faktor H-bindende Proteine aus anderen Pathogenen die Bedeutung eines solchen Immunevasionsmechanismus. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass ein genereller Defekt in der Purin-Synthese keinen Einfluss auf die Virulenzeigenschaften hat. Somit ist wahrscheinlich die immuninhibierende Funktion von PurA für die Attenuation *in vivo* verantwortlich.

Für weiterführende Experimente könnte eine Komplementante genutzt werden. Dazu könnte die bereits vorhandene PurA-Mutante mit dem wildtypischen *purA* bzw. mit einer Adenylosuccinat-Synthase-inaktiven Variante des *purA*-Gens komplementiert werden. Eine Charakterisierung dieser Stämme vor allem hinsichtlich des Virulenzpotentials könnte weiteren Aufschluss über die Relevanz des Tarnmechanismus ermöglichen.

5.7 Untersuchung der Eignung von Adenylosuccinat-Synthase-Inhibitoren als potentielle Therapeutika bei *S. aureus*-Infektionen

Aufgrund der Attenuation hinsichtlich der Virulenz der $\Delta purA$ -Mutante sowohl in *Galleria mellonella* als auch in verschiedenen murinen Infektionsmodellen (siehe Kapitel 4.3.12 und 4.3.14), besitzt PurA das Potential als Zielprotein für eine Therapie genutzt zu werden. Um dieses Potential zu ergründen, wurde untersucht, ob sich die Funktion von PurA mit geeigneten Substanzen pharmakologisch inhibieren lässt. Da die verminderte Virulenz eines *purA*-defizienten Stammes nicht eindeutig einer der beiden Funktionen von PurA zugeordnet werden konnte, könnte der Defekt in der Purin-Synthese ebenfalls an der Attenuation *in vivo* beteiligt sein. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit zunächst nach Inhibitoren der Adenylosuccinat-Synthase-Funktion von PurA gesucht.

In Literatur und Datenbanken (<http://www.drugbank.ca/>, 01.10.2015) sind zahlreiche Inhibitoren der Adenylosuccinat-Synthase-Funktion von PurA beschrieben. Zu den PurA-inhibierenden Substanzen gehört beispielsweise Adenylosuccinat (sAMP), wobei es sich um das Reaktionsprodukt der von PurA katalysierten Reaktion handelt. [223–225] Da jedoch sAMP auch natürlicherweise in tierischen Zellen und Bakterien vorliegt, kommt es daher nicht als Inhibitor von PurA während einer Therapie in Frage.

Neben den Produkten der von PurA katalysierten Reaktion eignen sich potentiell auch Strukturanaloga von PurA-Substraten für eine Inhibition. Bisher sind drei dieser Substratanaloga bekannt, die zwar in der Substrat-Bindetasche von PurA binden, aber nicht weiter umgesetzt werden können. Dazu zählen Alanosin (L(-)-2-amino-3-(hydroxynitrosamino)propion-Säure), 6-Mercaptopurin-Ribonukleotid und Hadacidin (N-Formyl-N-Hydroxyaminoessig-Säure). [188,226,227]

Bei Alanosin handelt es sich um ein extrazelluläres Produkt von *Streptomyces alanosinicus*. Es inhibiert den Purin-Metabolismus, hat aber keinen direkten Effekt auf die katalytische Aktivität von PurA. [226] 6-Mercaptopurin-Ribonukleotid inhibiert neben PurA mehrere Enzyme des Nukleotid-Metabolismus. [227] Aufgrund der geringen Spezifität von Alanosin und 6-Mercaptopurin-Ribonukleotid, eignen diese Substanzen für eine mögliche Therapie im Mausmodell nicht. Das dritte Substratanalogon hingegen, Hadacidin, eignet sich als

spezifischer Inhibitor von PurA, da es keine weitere bekannte physiologische Funktion besitzt. [228]

Hadacidin ist ein Aspartat-Strukturanalogon und verhält sich bezüglich der Bindung an PurA wie ein kompetitiver Inhibitor. [224,229] Die Umsetzung von IMP zu sAMP wird durch die Bindung von Hadacidin vollständig inhibiert. [230] In Abbildung 67 ist ein struktureller Vergleich von Aspartat und Hadacidin dargestellt.

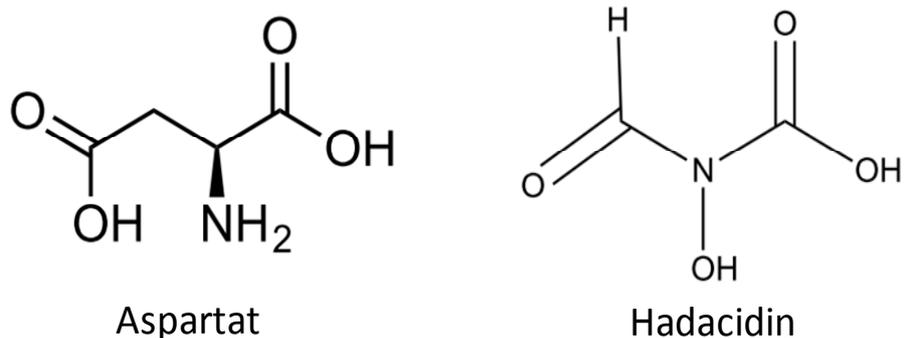


Abbildung 67: Strukturvergleich zwischen der Aminosäure Aspartat (links) und dem Strukturanalogon Hadacidin (rechts).

Hadacidin wurde ursprünglich aus *Penicillium frequentans* isoliert. Es konnte in Studien früh gezeigt werden, dass der Überstand einer *P. frequentans* Kultur eine zytostatische Wirkung auf humane Adenokarzinomzellen (HAD) aufweist. Die für diesen Effekt verantwortliche Substanz wurde schließlich aus dem Kulturüberstand isoliert und aufgrund der Wirkung auf den verwendeten Tumortyp Hadacidin genannt. [228,231]

In ersten Studien wurden eine tumorsupprimierende und eine antibakterielle Wirkung von Hadacidin untersucht. Dabei wurde deutlich, dass die Substanz beispielweise die Sporulation in *Bacillus subtilis* induziert. [151] Zudem konnte in einer Arbeit mit *E. coli* eine antimikrobielle Wirkung bei einer Konzentration von 0,7 mg/ml Hadacidin gezeigt werden. [152]. Des Weiteren wurde in einer Kombinationstherapie mit ionisierender Strahlung gezeigt, dass sich die antimikrobielle Wirkung der Strahlungstherapie auf teilende *E. coli*, *Salmonella typhimurium* und *Serratia marescens* durch Gabe von Hadacidin potenzieren lässt. [153] Somit gibt es mehrere Hinweise auf eine antibakterielle Wirkung von Hadacidin. Im Gegensatz zur ausgeprägten antimikrobiellen Wirkung konnte eine tumorsupprimierende Wirkung nicht nachgewiesen werden. In einer Studie mit 98 Patienten wurde in seltenen Fällen lediglich eine geringe Rückbildung des Tumors in beobachtet. [232]

Aufgrund der bekannten antibakteriellen Eigenschaften und seiner hohen Spezifität gegen PurA wurde Hadacidin als Inhibitor im Mausmodell getestet (siehe Kapitel 4.3.16). Dazu wurden Balb/c Mäuse intravenös jeweils zweimal täglich mit 10 mg/kg bzw. 50 mg/kg Hadacidin behandelt. Die Kontrollgruppe erhielt 0,9 %ige Kochsalzlösung. Sowohl die Ergebnisse der Biolumineszenzmessungen als auch die Analyse der bakteriellen Belastung und die histopathologische Untersuchung der peripheren Organe ergaben einen deutlich schwereren Infektionsverlauf in den mit 10 mg/kg Hadacidin behandelten Mäusen. Dies deutet darauf hin, dass eine Behandlung mit Hadacidin in den verwendeten Konzentrationen eher einen Virulenz-verstärkenden Effekt hat und die Schwere der Infektion zusätzlich erhöht wird. Eine Inhibierung von PurA durch Hadacidin konnte somit *in vivo* den Infektionsverlauf nicht positiv beeinflussen.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen könnte sein, dass die Bakterien auf die Blockierung von PurA mit genregulatorischen Gegenmaßnahmen reagieren. Eventuell wurden Virulenz-assoziierte Gene als Antwort auf die Hadacidin-Behandlung stärker exprimiert, die die Invasivität von *S. aureus* erhöhen oder die Degradation von Wirtszellen zur Gewinnung von Nährstoffen beschleunigen. Darüber hinaus wäre es möglich, dass Hadacidin auch Einfluss auf die eukaryotische Adenylosuccinat-Synthase nimmt, da es sich bei PurA um ein hochkonserviertes Enzym handelt. Die Vermutung konnte teilweise auch durch die Ergebnisse früherer Studien bestätigt werden. So war in einer klinischen Studie mit 17 Patienten mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen besonders auffällig, dass etwa 2/3 der mit Hadacidin behandelten Patienten an einer akuten Leukozytopenie erkrankten. [233] Dabei handelt es sich um einen Mangel an Leukozyten, wobei in den meisten Fällen eine Verminderung von neutrophilen Granulozyten vorliegt. Dies geht einher mit einer erhöhten Infektionsgefahr. [234] Die Häufung der akuten Leukozytopenie nach Hadacidin-Behandlung könnte bedeuten, dass die Applikation von Hadacidin das Immunsystem beeinträchtigt und sich eine bakterielle Infektion viel stärker etablieren kann. Die in dieser Arbeit beobachtete Erhöhung der Pathogenität von *S. aureus* nach Behandlung mit Hadacidin könnte demnach durch die immunsupprimierende Wirkung von Hadacidin verursacht werden. Des Weiteren würde dies auch das deutlich erhöhte Biolumineszenzsignal, die verstärkte bakterielle Belastung in den Organen und das vermehrte Auftreten großflächiger Abszesse in den mit 10 mg/kg behandelten Tieren erklären (siehe Kapitel 4.3.16). In einer Konzentration von

10 mg/kg könnte demnach die immunsupprimierende Wirkung erheblich stärker sein, als die antibakterielle Wirkung von Hadacidin.

Bei den mit 50 mg/kg Hadacidin behandelten Tieren (siehe Kapitel 4.3.16), konnte hingegen ab dem zweiten Versuchstag ein deutlich geringeres Lumineszenz-Signal detektiert werden (siehe Abbildung 54 und Abbildung 55). Zudem war das Signal bei den *ex vivo* Aufnahmen in Niere und Leber vergleichbar mit der unbehandelten Kontrollgruppe. Die *in-vivo-Imaging* Daten werden außerdem durch die Ergebnisse der re-isolierten Bakterien aus den Einzelorganen bestätigt, da auch hier die CFU aus Niere, Milz und Herz vergleichbar mit der Kontrollgruppe sind. Zusammengenommen sprechen die Ergebnisse dafür, dass die bakterielle Belastung bei der Behandlung mit 50 mg/kg Hadacidin wesentlich geringer und der Infektionsverlauf milder ist, als in der Gruppe, die mit der geringeren Dosis von 10 mg/kg Hadacidin behandelt wurde. Dies spricht dafür, dass eine Applikation von höheren Dosen Hadacidin eine bessere antibakterielle Wirkung erzielen könnte. Des Weiteren könnte eine intraperitoneale Verabreichung des Medikaments zu einer Verbesserung des antibakteriellen Effektes führen, da bei dieser Applikationsart die durchschnittliche Verweildauer des Medikamentes, verglichen mit einer intravenösen Applikation, im Blut wesentlich höher ist. [235] Die fehlende Selektivität verbunden mit erhöhten Nebenwirkungen lässt eine Anwendung von Hadacidin für die Behandlung von *S. aureus* Infektionen beim Menschen als nicht vertretbar erscheinen. Geeigneter wäre ein Wirkstoff der ausschließlich das bakterielle PurA-Protein inhibiert.

Ein Vergleich des humanen PurA-Proteins mit dem orthologen Enzym aus *S. aureus* ergab einen allgemeinen Konsensus von 49 % (davon identisch: 36,9 %). Demzufolge bietet der Unterschied in den beiden Enzymen womöglich ausreichend Möglichkeiten, um mittels Wirkstoffdesign einen Inhibitor zu entwickeln, der ausschließlich mit dem bakteriellen PurA interagiert. Dadurch wäre auch der Einfluss auf das Immunsystem geringer oder ausgeschlossen.

Die Inhibition von PurA als neues Target, um *S. aureus*-Infektionen gezielt zu behandeln, besitzt ein großes Potential. Um dieses Potential auszuschöpfen, sind allerdings spezifische Inhibitoren nötig, die insbesondere die Speziesunterschiede zwischen dem bakteriellen und dem humanen PurA-Protein berücksichtigen und bakterielles PurA spezifisch inhibieren. Dieser Ansatz könnte dann auch auf andere bakterielle Pathogene übertragen werden, wodurch PurA als universelles Target für eine Antibiotika-Therapie in den Vordergrund rückt.

5.8 Anti- *S. aureus* Antikörperantwort

Die vom Wirt gebildete Antikörperantwort ermöglicht einen indirekten Einblick in das Expressionsmuster von *S. aureus*-Proteinen während der asymptomatischen Kolonisierung und Infektion. Dadurch wird es möglich die Expression einzelner Proteine unter *in-vivo*-Bedingungen zu analysieren. Gleichzeitig hilft diese Methode beim Verständnis von komplexen Pathogenitätsmechanismen und liefert ein Abbild der adaptiven Immunantwort gegen *S. aureus*.

Um einen Einblick in die humane Antikörperantwort gegen die *S. aureus*-Proteine P1-P5, P7-P10, PurA und IsaA (*immunodominant staphylococcal antigen A*, Kontrollprotein) zu erhalten, wurde der spezifische Antikörpertiter für die jeweiligen Antigene in verschiedenen Plasmen bzw. Seren in einem ELISA-basierten Ansatz bestimmt (siehe Kapitel 4.3.10 und 4.2). Dazu wurden Plasmen von 16 Trägern und 16 Nicht-Trägern verwendet, um den Einfluss des Kolonisierungsstatus auf das Antikörperprofil zu untersuchen. Im Allgemeinen unterscheiden sich die Antikörperprofile gegen die elf hier untersuchten Antigene zwischen Trägern und Nicht-Trägern kaum. Diese Beobachtung wird durch frühere Studien zum Immunproteom von nasalen Trägern und Nicht-Trägern bestätigt [113]. In diesen Studien konnte ein höherer Antikörpertiter für einige wenige Virulenzfaktoren in der Gruppe der Träger gefunden werden. Darunter waren hauptsächlich Toxine und Superantigene wie TSST-1 (*Toxic-shock-syndrome-toxin 1*) und SEA (*staphylococcal enterotoxin A*). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der hier durchgeführten Analyse, in der lediglich für die Proteine P4, P7 und PurA ein signifikanter Unterschied zwischen Trägern und Nicht-Trägern ermittelt werden konnte. Zudem wurde deutlich, dass es innerhalb einer Gruppe oft sehr große individuelle Schwankungen in der Antikörperantwort gegen ein Antigen gab. Diese Beobachtung wird durch frühere Studien bestätigt, in denen das humane anti-*S. aureus*-Antikörperprofil als sehr heterogen beschrieben wurde. [108,112,113,236–238]

Eine weitere Ursache für die geringen Unterschiede im Antikörperprofil von Trägern und Nicht-Trägern könnte in der kurzfristigen Beobachtung des Kolonisierungsstatus der Probanden liegen. Dieser wurde für diese Studie nur über einen Zeitraum von 4 Wochen beobachtet. Aus anderen Arbeiten ist bereits bekannt, dass lediglich 20 % aller Menschen dauerhaft und weitere 30 % nur zeitweise mit *S. aureus* vorwiegend in der Nase besiedelt sind. [106,239,240] Demnach kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass einige hier

als Träger klassifizierte Probanden nur zeitweise mit *S. aureus* kolonisiert waren. Träger mit kurzfristiger oder periodisch wiederkehrender nasaler Kolonisierung weisen ein mit Nicht-Trägern vergleichbares Staphylokokken-spezifisches Antikörperprofil auf [239] und sind demnach nicht anhand ihres Antikörpertiters von Nicht-Trägern zu unterscheiden.

Des Weiteren gibt es keine genauen Angaben zum kolonisierenden Stamm der einzelnen Probanden. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass das gebildete Antikörperprofil und die Funktionalität von neutralisierenden Antikörpern sehr spezifisch gegen den jeweiligen kolonisierenden Stamm gerichtet sind. [111–113,241] . Aufgrund der hohen Variabilität der verschiedenen *S. aureus*-Stämme, könnten die in dieser Arbeit verwendeten Proteine nicht in identischer Form vom jeweiligen kolonisierenden *S. aureus*-Stamm exprimiert werden. Dadurch würde demnach auch keine Antikörperantwort gegen die hier untersuchten Proteine P1-P5, P7-P10, IsaA und PurA generiert werden können.

Personen, die dauerhaft mit *S. aureus* kolonisiert sind, haben ein weit höheres Risiko eine *S. aureus*-Infektion oder sogar eine Bakteriämie zu entwickeln. [242–244] Allerdings ist das Risiko an dieser Erkrankung zu versterben, für nasale Träger deutlich geringer. [106,243] Dies könnte darauf hinweisen, dass das Immunsystem von *S. aureus*-Trägern anders auf die Infektion reagiert, als das von Nicht-Trägern. Eventuell wird das Immunsystem während der Kolonisierung auf *S. aureus* eingestimmt, was einen Vorteil für die Bekämpfung einer akuten Infektion mit sich bringt. [241] Da ca. 80 % der Stämme, die eine Bakteriämie in Trägern auslösen endogene Stämme sind, wird vermutet, dass über die Zeitspanne der Kolonisierung eine Antikörperantwort spezifisch gegen den eigenen Stamm entwickelt wird. Diese könnte einen milderen Verlauf einer nachfolgenden *S. aureus*-Infektion bewirken. [113,243,245] Auf der anderen Seite gibt es auch gegenteilige Studien. So wurden beispielsweise Freiwillige künstlich mit *S. aureus* 8325-4 kolonisiert und deren Antikörperantwort über einen längeren Zeitraum beobachtet. Die Kolonisierung löste dabei weder die Bildung von neuen Antikörperspezifitäten noch eine Steigerung der bisher bestehenden humoralen Immunantwort aus. [111] Den Ergebnissen dieser Studie zufolge scheint die anti-*S. aureus* Antikörperantwort im Menschen nicht durch die Kolonisierung induziert zu werden. In gegensätzlichen Untersuchungen wird hingegen vermutet, dass Nicht-Träger Antikörper besitzen, die sie vor einer Kolonisierung schützen und somit das Risiko senken, an einer *S. aureus*-Infektion zu erkranken. [113,246] Dafür sprechen Studien, die zeigen, dass Nicht-

Träger höhere Antikörpertiter gegen α -Hämolysin, Autolysin, IsdA/H (*iron-responsive surface determinant*) und ClfB besitzen. [237,246]

In weiterführenden Untersuchungen wurden Seren von immunsupprimierten Patienten bezüglich des Antikörper-Profiles gegen die Proteine P1-P5 und P7-P10 und IsaA untersucht. Dabei handelte es sich um Seren von Patienten mit einer arteriellen Verschlusskrankheit (AOD), Diabetes-Patienten und Patienten mit terminaler Nieren-Insuffizienz (ESRD) (siehe Kapitel 4.2). Keiner der Patienten war an einer akuten *S. aureus*-Infektion erkrankt, allerdings bringen alle untersuchten Patienten-Gruppen ein erhöhtes Risiko für eine *S. aureus*-Infektion mit. [131,139–142] Das erhöhte Risiko einer *S. aureus*-Infektion liegt bei diesen Patienten vor allem an der Beeinträchtigung des angeborenen Immunsystems.

Wie die Analysen dieser Arbeit zeigen, ist das Antikörperprofil der AOD- und Diabetes-Patienten mit dem Profil der gesunden Spender vergleichbar. Sowohl das ausgebildete Antikörperprofil als auch die einzelnen Antikörperkonzentrationen entsprechen im Wesentlichen den Profilen der gesunden Probanden.

Ein anderes Bild zeigt sich allerdings in den Patienten mit terminaler Nieren-Insuffizienz. Hier sind die Antikörpertiter geringer, als in den zuvor untersuchten Gruppen. Gegen die Proteine P2, P10 und IsaA wurden in den Proben der gesunden Spender wie auch in den AOD- und Diabetes-Patienten durchgehend relativ hohe Titer bestimmt. Dies könnte darauf hindeuten, dass diese Proteine besonders immunogen sind. In den ESRD-Patienten wurde allerdings für keines der drei Proteine ein höherer Antikörpertiter bestimmt.

Aus Vakzinierungsstudien gegen Hepatitis B ist bekannt, dass die Immunantwort in Dialyse-Patienten oft geringer ausfällt als bei gesunden Menschen. [247] Die geringere Antikörperantwort in Folge einer Vakzinierung scheint zwar mit dem Schweregrad der Niereninsuffizienz zu korrelieren, ist aber keine Folge der Dialyse. [248] Es wird vermutet, dass die geringe Antikörperantwort in einer generellen Unterdrückung des Immunsystems durch die aus der Nieren-Insuffizienz resultierenden Urämie (Harnvergiftung) begründet ist, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen sehr vielseitig sind. [249,250] ESRD-Patienten besitzen generell geringere Antikörpertiter und sind zudem nicht in der Lage ausreichend hohe Antikörpertiter über einen längeren Zeitraum aufrechtzuerhalten. [251]

Da die Antikörperprofile der gesunden Probanden und zwei der drei Patienten-Gruppen vergleichbar sind, scheinen die im Serum befindlichen Antikörpertiter gegen die hier

untersuchten Proteine nicht primär für die Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Infektionen in den Patienten-Gruppen verantwortlich zu sein. In den ERDS-Patienten könnte die geringere Antikörperkonzentration allerdings zur häufig beobachteten Immunsuppression beitragen.

Die Analyse der Antikörperprofile von gesunden humanen Spendern sowie von drei Patientengruppen hat gezeigt, dass die asymptomatische Kolonisierung des Menschen nicht maßgeblich zur Generierung eines anti-*S. aureus*-spezifischen Antikörperprofils führt.

Um einen Einblick in die während einer Infektion gebildete Antikörperantwort zu erhalten, wurde dies in einem Vakzinierungsansatz mit lebenden *S. aureus* Bakterien in Mäusen untersucht. Des Weiteren sollte der Zusammenhang zwischen der Art der Infektion und dem gebildeten Antikörperprofil untersucht werden.

Da das Immunsystem für die Generierung von spezifischen Antikörpern mehrfachen Kontakt zum jeweiligen Antigen und Zeit benötigt, wurde für diesen Versuchsansatz von einer einmaligen schweren Infektion abgesehen und stattdessen eine wiederholte sublethale Infektion induziert. Darüber hinaus wurden verschiedene Infektionsarten induziert, um später das gebildete Antikörperprofil von Tieren mit systemischer Infektion (Sepsis-Modell), Lungeninfektion (Pneumonie-Modell) und Muskelabszess bzw. Weichteilinfektion (Abszess-Modell) vergleichen zu können. Durch die Behandlung sollten die Tiere gezielt mit *S. aureus* immunisiert und ein für die Infektion mit *S. aureus*-spezifisches Antikörperprofil gegen das Pathogen generiert werden.

Im Verlauf der Vakzinierungsstudie konnte eine Zunahme des Gesamt-Antikörpertiters beobachtet werden [252]. Dies entspricht der Beobachtung, dass Patienten, die sich von einer *S. aureus*-Infektion erholt hatten, auch einen höheren anti-*S. aureus* Antikörpertiter besaßen als noch vor der Infektion. Das gebildete Antikörperrepertoire richtete sich dabei gegen eine Vielzahl von *S. aureus*-Proteinen. [108] Diese Beobachtung konnte auch in der Untersuchung der Antikörperantwort der vakzinierten Tiere bestätigt werden. Scheinbar ist eine Infektion zwingend notwendig, um eine humorale Immunantwort auszubilden. Dies wird zudem durch Studien belegt, die zeigen, dass die asymptomatische Kolonisierung mit *S. aureus* nicht zwangsläufig zu einer Antikörperantwort führt. [111,114] Zusätzlich dazu konnte in früheren Arbeiten nachgewiesen werden, dass die Menge der im Serum befindlichen Antikörper, die gegen sekretierte Proteine von *S. aureus* gerichtet sind, während einer Infektion signifikant zunimmt. [112]

Für die Ermittlung der Antikörperspezifitäten wurde zunächst in einem ELISA-basierten Ansatz das gegen die Proteine P1-P5, P7-P10 und IsaA gebildete Antikörperprofil untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass die Titer der jeweiligen spezifischen Antikörper deutlich höher waren, als in den humanen Proben der Träger, Nicht-Träger und Patienten. Teilweise erreichten diese 100mal höhere Konzentrationen (siehe *Heatmap*, Abbildung 24). Diese stark erhöhten Titer lassen sich damit erklären, dass vermutlich die Aktivierung der humoralen Immunantwort während einer Infektion deutlich stärker ist, als während einer dauerhaften Kolonisierung mit *S. aureus*. Wie in Abbildung 23 gezeigt, konnten die höchsten Antikörperkonzentrationen gegen die Proteine P1, P5, P9, P10 und IsaA gemessen werden. Bei der Betrachtung der Einzelwerte (n=3) wurde deutlich, dass die Immunantwort innerhalb einer Gruppe sehr heterogen ist. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen aus Untersuchungen mit humanen Seren von gesunden Spendern bzw. aus unterschiedlichen Patienten-Gruppen. [108,237]

Neben der Bildung von verschiedenen Antikörperspezifitäten gegen unterschiedliche *S. aureus*-Proteine konnte zudem ein Einfluss der Infektionsart auf die Ausbildung des Antikörperprofils beobachtet werden. Die höchsten Titer wurden bei den intravenös immunisierten Tieren ermittelt. Die Pneumonie-vakzinierten Tiere entwickelten im Vergleich zu den Sepsis-immunisierten eine wesentlich geringere Antikörperantwort gegen die Proteine P9, P10 und IsaA. Das Antikörperprofil der intramuskulär vakzinierten Tiere ähnelte sehr dem Profil der intravenös vakzinierten Tiere. Es wurde hier lediglich ein geringerer Antikörpertiter gegen IsaA bestimmt.

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass in den unterschiedlichen Infektionsmodellen, Sepsis-, Pneumonie- und Abszess-Modell, unterschiedlich gerichtete Antikörperantworten ausgelöst wurden. Die unterschiedliche humorale Immunantwort könnte aus einer unterschiedlichen Expression der Proteine während der Infektion resultieren und wäre ein Hinweis auf die spezialisierte Anpassung des Pathogens an die jeweils vorherrschende *in-vivo*-Situation. Zum anderen könnten die Unterschiede im Profil auch in der unterschiedlichen Sichtbarkeit bzw. Verfügbarkeit der Antigene für das Immunsystem begründet sein.

Um einen globaleren Überblick über die Antikörperantwort während einer *S. aureus*-Infektion zu erhalten, wurden die murinen Seren aus den drei unterschiedlichen Infektionsmodellen auf einem Proteinarray untersucht (siehe Kapitel 4.4). [144] Auf diesem

sogenannten *Staph-Toxin-Array* (3. Generation) sind 63 verschiedene Antigene von *S. aureus* immobilisiert. Darunter befinden sich einige cytoplasmatische Proteine und zahlreiche sekretierte Proteine. Unter den sekretierten Proteinen sind sowohl bereits bekannte Virulenzfaktoren von *S. aureus* sowie bisher uncharakterisierte putativ sekretierte Proteine. Es konnte eine Antikörperantwort gegen 29 der 63 Proteine in mindestens einer der Gruppen detektiert werden.

Die Ergebnisse aus den Seren, der unterschiedlich infizierten Tiere, ließen eine Einteilung der Antigene mit Antikörperantwort in drei Gruppen zu (siehe Abbildung 60): Zum einen wurden Antigene gefunden, gegen die in allen drei Vakzinierungsmodellen eine sehr hohe Antikörperantwort generiert wurde. Dazu zählten vor allem bekannte Virulenzfaktoren wie Efb, Sbi, HlgA, SCIN und Varianten von SCIN. Des Weiteren wurde ebenfalls in allen drei Vakzinierungsmodellen ein hoher Antikörper-Titer gegen 2 bislang uncharakterisierte Proteine, SACOL0985 und SACOL1164, gefunden. Darüber hinaus wurde eine weitere Gruppe an Antigenen identifiziert, die ausschließlich in den intravenös vakzinierten Tieren eine starke Antikörperantwort auslösten. Die Gruppe umfasst 13 Proteine und damit fast die Hälfte aller Antigene, gegen die eine Antikörperantwort gemessen wurde. Zu dieser Gruppe gehören einige bereits bekannte Virulenzfaktoren wie beispielsweise HlgB (β -Hämolysin), Plc (Phospholipase C), die Serin-Protease SplB und SplC, das Superantigen SSL7 und das Leukocidin LukF-PV. Des Weiteren umfasst diese sehr heterogene Gruppe auch klassische cytoplasmatische Proteine wie Nuc und einige bisher uncharakterisierte Proteine wie SACOL2255, SACOL0129 und SACOL1169. Die dritte Gruppe umfasst Antigene, für die in den intranasal und intramuskulär immunisierten Tieren eine höhere Signalintensität ermittelt wurde, als in den intravenös vakzinierten Tieren. Dabei handelt es sich häufig um cytoplasmatische Proteine. Hier konnte eine höhere Antikörper-Antwort in den Pneumonie-vakzinierten und in den intramuskulär immunisierten Tieren für die Proteine GreA, Tuf und Lip gefunden werden. Des Weiteren wurden im Vergleich zu den intravenös vakzinierten Tieren höhere Antikörper-Titer in den intranasal immunisierten Tieren für die Proteine GlpQ, Tig, Hlb, SSL11 und SACOL1065 ermittelt.

Durch die Untersuchung des Antikörperprofils der unterschiedlich vakzinierten Tiere konnten eine Abhängigkeit der Antikörperantwort von der Art der Infektion beobachtet werden. So bildeten die intravenös vakzinierten Tiere das umfangreichste Spektrum an Antikörperspezifitäten während der Vakzinierung aus. Auf der anderen Seite wurden auch in

den intranasal und intramuskulär vakzinierten Tieren gegen einige Antigene eine höhere Antikörperantwort gemessen, als in den intravenös infizierten Tieren. Dies bestätigt die Untersuchungen der Antikörpertiter gegen die Proteine P1-P5, P7-P10 und IsaA (siehe Abbildung 23). Auch hier wurden Unterschiede im Antikörperprofil zwischen den Vakzinierungsmodellen beobachtet. Zusammengenommen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Infektionsart die Entwicklung des Antikörperrepertoires beeinflusst. Die hier gewonnenen Ergebnisse werden zudem durch Studien bestätigt, die ebenfalls Unterschiede in der Antikörperantwort nach einer Lungen- bzw. Hautinfektion beobachteten. [253] Wie bereits zuvor diskutiert, könnten die für die jeweilige Infektionsart spezifischen Antikörperantworten durch eine veränderte Verfügbarkeit der Antigene für das Immunsystem erklärt werden. Gleichzeitig könnten die Unterschiede auch auf eine differentielle Genexpression hindeuten, die vermuten lässt, dass sich die Bakterien speziell an die jeweilige Situation *in vivo* anpassen. Durch die hier gewonnenen Ergebnisse, wird zudem die Beobachtung aus früheren Studien bestätigt, dass auch das während einer Immunisierung mit lebenden *S. aureus* Bakterien bzw. einer Infektion gebildete Antikörperprofil sehr heterogen und variabel ist. [112,254]

Das deutlich breitere Spektrum an Antikörperspezifitäten in den intravenös vakzinierten Tieren könnte zudem einen Einfluss auf den Verlauf einer Infektion ausüben. So wurde in früheren Studien mit humanen Bakteriämie-Patienten bereits gezeigt, dass diese Patienten zum einen signifikant höhere IgG-Antworten gegen verschiedene Antigene von *S. aureus* entwickeln. [255] Zu diesen Antigenen zählten beispielsweise Immunmodulatoren wie SSL1 (*staphylococcal superantigen-like protein*), SSL5 und SCIN (*staphylococcal complement inhibitor*), bekannte Toxine wie γ -Hämolysin (HlgB) und das Leukocidin LukF, ein putativer ABC-Transporter SA0688 und das Membran-assoziierte Chaperon PrsA. Zudem konnte in einer weiteren Patientenstudie der Zusammenhang zwischen dem Verlauf einer Infektion und der Antikörper-Antwort hergestellt werden. [256] Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem milderem Infektionsverlauf deutlich höhere Antikörpertiter gegen die Antigene Plc (Phospholipase C), SspB (Staphopain B), IsaA, SEM (Enterotoxin M), GlpQ (Glycerophosphoryl-Diester Phosphodiesterase), HlgC (γ -Hämolysin), SACOL0444 und SACOL0985 entwickelten. Die Ergebnisse der Patientenstudien bestätigen die Analysen dieser Arbeit bezüglich des Antikörperprofils, das als Antwort auf eine Infektion gebildet wird. Die intravenös vakzinierten Tiere entwickelten ebenfalls eine höhere

Antikörperantwort gegen viele der Antigene, die auch in Bakteriämie-Patienten höhere Antikörpertiter verursachen. Dazu zählen vor allem SSL7, SCIN, LukF, Plc, IsaA, GlpQ, HlgA und HlgB und das bislang uncharakterisierte Proteine SACOL0985. Die gebildeten Antikörperspezifitäten deuten auf eine *in-vivo*-Expression dieser Virulenzfaktoren in Mensch und Maus hin. Des Weiteren zeigen diese Ergebnisse deutliche Übereinstimmungen in der Antikörperantwort von Bakteriämie-Patienten und intravenös vakzinierten Mäusen. Diese Beobachtung unterstreicht zudem, dass einige Virulenzfaktoren sowohl im Menschen als auch in Mausmodellen für die Ausbildung einer Infektion und den Verlauf der Krankheit wichtig sind. Diese universellen, vom Wirtsorganismus unabhängig exprimierten Antigene stellen zudem potentielle Targets für eine Vakzinentwicklung dar. Die Kombination dieser Ergebnisse mit den Erkenntnissen aus Studien zur Antikörperantwort von Bakteriämie-Patienten mit unterschiedlich schwerem Krankheitsverlauf [256] grenzt die Auswahl der potentiellen Vakzinkandidaten weiter ein. Demnach wären die Antigene Plc, GlpQ, SACOL0985 und IsaA sehr gut als Targets für eine Vakzinierung geeignet, da gegen diese in Mensch und Maus eine starke Antikörper-Antwort generiert wird. Gleichzeitig besitzen Bakteriämie-Patienten mit einem milderen Infektionsverlauf einen deutlich höheren Antikörper-Titer gegen diese Antigene als Patienten, die in Folge der Bakteriämie an einer Sepsis erkranken. Die die Ähnlichkeiten im gebildeten Antikörperprofil von Bakteriämie-Patienten und intravenös vakzinierten Tieren bestärkt darüber hinaus die Relevanz von Mausmodellen für die Vakzinentwicklung, obwohl die Immunantwort auf Toxine und Superantigene zwischen Mensch und Maus nicht einheitlich abläuft. [257,258]

Um einen Einblick über die Reproduzierbarkeit der hier durchgeführten Vakzinierungsstudie zu bekommen, wurde abschließend die Summe aller ermittelten Signalintensitäten der 63 Antigene für jede Maus berechnet (siehe Abbildung 61). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Varianz innerhalb der intravenös vakzinierten Tiere und der intramuskulär immunisierten Tiere sehr gering war. Das bedeutet, dass die ausgelöste humorale Immunantwort in allen Tieren vergleichbar ist. Des Weiteren liegt die Summe der Signalintensitäten der intravenös vakzinierten Tiere höher, als die der intramuskulär vakzinierten Tiere. Dies zeigt sich auch darin, dass gegen viele Antigene nur während der systemischen Infektion eine entsprechend hohe Antikörperantwort generiert wurde. Im Gegensatz dazu wird durch die Summierung der Signalintensitäten der intranasal immunisierten Tiere deutlich, wie enorm hoch die Varianz der Antikörperantwort innerhalb

dieser Gruppe ist. Dies spricht dafür, dass die Tiere während der intranasalen Infektion nicht einheitlich mit den Bakterien konfrontiert wurden, so dass in manchen Tieren der Gruppe keine angemessene Antikörperantwort generiert werden konnte.

Zusammengefasst führen sublethale wiederholte Infektionen mit *S. aureus* zur Ausbildung eines spezifischen Antikörperprofils gegen das Pathogen. Dabei wird das Antikörperprofil in Abhängigkeit von der jeweiligen Infektionsart gebildet. Die ermittelten Antikörperspezifitäten bilden zudem die *in vivo* exprimierten bakteriellen Proteine ab. Daraus können Rückschlüsse zur Relevanz der einzelnen Proteine während der Infektion gezogen werden und Erkenntnisse über die gezielte Anpassung des Pathogens an die vorherrschenden lokalen Bedingungen im Wirtsorganismus gewonnen werden. Des Weiteren verdeutlichen die Ergebnisse des *Staph-Toxin-Arrays* die Komplexität und Variabilität der Interaktion zwischen *S. aureus* und seinem Wirt. Diese Studie umfasst die grundlegende Charakterisierung des Antikörperprofils während einer Infektion und liefert wichtige Hinweise, die zur Entwicklung einer Antikörpertherapie bzw. eines Impfstoffs genutzt werden können. Darüber hinaus kann das globale Verständnis bezüglich des gebildeten Antikörperprofils je nach Infektionsart zur Verbesserung der serologischen Diagnostik von *S. aureus*-Infektionen beitragen.

6. Literaturverzeichnis

- [1] S.H.M. Rooijackers, K.P.M. van Kessel, J.A.G. van Strijp, Staphylococcal innate immune evasion, *Trends Microbiol.* 13 (2005) 596–601. doi:10.1016/j.tim.2005.10.002.
- [2] F.D. Lowy, Staphylococcus aureus infections, *N. Engl. J. Med.* 339 (1998) 520–532. doi:10.1056/NEJM199808203390806.
- [3] A. Lyell, Alexander Ogston, micrococci, and Joseph Lister, *J. Am. Acad. Dermatol.* 20 (1989) 302–310.
- [4] L.G. Harris, S.J. Foster, R.G. Richards, An introduction to Staphylococcus aureus, and techniques for identifying and quantifying S. aureus adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review, *Eur. Cell. Mater.* 4 (2002) 39–60.
- [5] M. Otto, Staphylococcus colonization of the skin and antimicrobial peptides, *Expert Rev. Dermatol.* 5 (2010) 183–195. doi:10.1586/edm.10.6.
- [6] G.R. Corey, Staphylococcus aureus Bloodstream Infections: Definitions and Treatment, *Clin. Infect. Dis.* 48 (2009) S254–S259. doi:10.1086/598186.
- [7] JAMA Network | JAMA Internal Medicine | SIGNIFICANCE OF BACTEREMIA CAUSED BY STAPHYLOCOCCUS AUREUS: A STUDY OF ONE HUNDRED AND TWENTY-TWO CASES AND A REVIEW OF THE LITERATURE CONCERNED WITH EXPERIMENTAL INFECTION IN ANIMALS, (n.d.). <http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=547726> (accessed July 9, 2015).
- [8] Rammelkamp CH, Maxon T, Resistance of Staphylococcus aureus to the Action of Penicillin., *Exp. Biol. Med.* (1942) 386–89.
- [9] F.D. Lowy, Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus, *J. Clin. Invest.* 111 (2003) 1265–1273. doi:10.1172/JCI200318535.
- [10] Jevons MP, Celbenin-resistant staphylococci, *BMJ.* (n.d.) 124–25.
- [11] G.A. Ayliffe, The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 24 Suppl 1 (1997) S74–79.
- [12] H. Grundmann, M. Aires-de-Sousa, J. Boyce, E. Tiemersma, Emergence and resurgence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus as a public-health threat, *The Lancet.* 368 (2006) 874–885. doi:10.1016/S0140-6736(06)68853-3.
- [13] R. Dantes, Y. Mu, R. Belflower, D. Aragon, G. Dumyati, L.H. Harrison, et al., National burden of invasive methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections, United States, 2011, *JAMA Intern. Med.* 173 (2013) 1970–1978. doi:10.1001/jamainternmed.2013.10423.
- [14] I.M. Gould, J. Reilly, D. Bunyan, A. Walker, Costs of healthcare-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus and its control, *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16 (2010) 1721–1728. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03365.x.
- [15] S.J. Peacock, G.K. Paterson, Mechanisms of Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus, *Annu. Rev. Biochem.* 84 (2015) 577–601. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034516.
- [16] A.M. Edwards, R.C. Massey, How does Staphylococcus aureus escape the bloodstream?, *Trends Microbiol.* 19 (2011) 184–190. doi:10.1016/j.tim.2010.12.005.
- [17] S.D. Kobayashi, N. Malachowa, F.R. DeLeo, Pathogenesis of Staphylococcus aureus Abscesses, *Am. J. Pathol.* 185 (2015) 1518–1527. doi:10.1016/j.ajpath.2014.11.030.
- [18] T.J. Foster, Immune evasion by staphylococci, *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (2005) 948–958. doi:10.1038/nrmicro1289.
- [19] C. Janeway, P. Travers, M. Walport, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition., Garland Science, New York, 2001.

- [20] W. de M. Cruvinel, D. Mesquita, J.A.P. Araújo, T.T.T. Catelan, A.W.S. de Souza, N.P. da Silva, et al., Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response, *Rev. Bras. Reumatol.* 50 (2010) 434–461.
- [21] C. Murdoch, A. Finn, Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases, *Blood.* 95 (2000) 3032–3043.
- [22] C.J.C. de Haas, K.E. Veldkamp, A. Peschel, F. Weerkamp, W.J.B. Van Wamel, E.C.J.M. Heezius, et al., Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent, *J. Exp. Med.* 199 (2004) 687–695. doi:10.1084/jem.20031636.
- [23] B. Postma, M.J. Poppelier, J.C. van Galen, E.R. Prossnitz, J.A.G. van Strijp, C.J.C. de Haas, et al., Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 172 (2004) 6994–7001.
- [24] T. Chavakis, M. Hussain, S.M. Kanse, G. Peters, R.G. Bretzel, J.-I. Flock, et al., *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes, *Nat. Med.* 8 (2002) 687–693. doi:10.1038/nm728.
- [25] A.N. Athanasopoulos, M. Economopoulou, V.V. Orlova, A. Sobke, D. Schneider, H. Weber, et al., The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms, *Blood.* 107 (2006) 2720–2727. doi:10.1182/blood-2005-08-3140.
- [26] M. Uhlén, M. Lindberg, L. Philipson, The gene for staphylococcal protein A, *Immunol. Today.* 5 (1984) 244–248. doi:10.1016/0167-5699(84)90098-7.
- [27] M. Uhlén, B. Guss, B. Nilsson, S. Gatenbeck, L. Philipson, M. Lindberg, Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 1695–1702.
- [28] D. McDevitt, T. Nanavaty, K. House-Pompeo, E. Bell, N. Turner, L. McIntire, et al., Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen, *Eur. J. Biochem. FEBS.* 247 (1997) 416–424.
- [29] D. McDevitt, P. Francois, P. Vaudaux, T.J. Foster, Identification of the ligand-binding domain of the surface-located fibrinogen receptor (clumping factor) of *Staphylococcus aureus*, *Mol. Microbiol.* 16 (1995) 895–907.
- [30] J.S. Nanra, S.M. Buitrago, S. Crawford, J. Ng, P.S. Fink, J. Hawkins, et al., Capsular polysaccharides are an important immune evasion mechanism for *Staphylococcus aureus*, *Hum. Vaccines Immunother.* 9 (2013) 480–487.
- [31] I.M. Nilsson, J.C. Lee, T. Bremell, C. Rydén, A. Tarkowski, The role of staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis, *Infect. Immun.* 65 (1997) 4216–4221.
- [32] M. Thakker, J.S. Park, V. Carey, J.C. Lee, *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model, *Infect. Immun.* 66 (1998) 5183–5189.
- [33] B.L. Garcia, K.X. Ramyar, D. Ricklin, J.D. Lambris, B.V. Geisbrecht, Advances in understanding the structure, function, and mechanism of the SCIN and Efb families of *Staphylococcal* immune evasion proteins, *Adv. Exp. Med. Biol.* 946 (2012) 113–133. doi:10.1007/978-1-4614-0106-3_7.
- [34] S.H.M. Rooijackers, M. Ruyken, A. Roos, M.R. Daha, J.S. Presanis, R.B. Sim, et al., Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases, *Nat. Immunol.* 6 (2005) 920–927. doi:10.1038/ni1235.

- [35] I. Jongerius, J. Köhl, M.K. Pandey, M. Ruyken, K.P.M. van Kessel, J.A.G. van Strijp, et al., Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules, *J. Exp. Med.* 204 (2007) 2461–2471. doi:10.1084/jem.20070818.
- [36] J. Kwieciński, E. Josefsson, J. Mitchell, J. Higgins, M. Magnusson, T. Foster, et al., Activation of plasminogen by staphylokinase reduces the severity of *Staphylococcus aureus* systemic infection, *J. Infect. Dis.* 202 (2010) 1041–1049. doi:10.1086/656140.
- [37] S.H.M. Rooijackers, W.J.B. van Wamel, M. Ruyken, K.P.M. van Kessel, J. a. G. van Strijp, Anti-opsionic properties of staphylokinase, *Microbes Infect. Inst. Pasteur.* 7 (2005) 476–484. doi:10.1016/j.micinf.2004.12.014.
- [38] A. Peschel, M. Otto, R.W. Jack, H. Kalbacher, G. Jung, F. Götz, Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 8405–8410.
- [39] L.V. Collins, S.A. Kristian, C. Weidenmaier, M. Faigle, K.P.M. Van Kessel, J.A.G. Van Strijp, et al., *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice, *J. Infect. Dis.* 186 (2002) 214–219. doi:10.1086/341454.
- [40] A. Clauditz, A. Resch, K.-P. Wieland, A. Peschel, F. Götz, Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress, *Infect. Immun.* 74 (2006) 4950–4953. doi:10.1128/IAI.00204-06.
- [41] G.Y. Liu, A. Essex, J.T. Buchanan, V. Datta, H.M. Hoffman, J.F. Bastian, et al., *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity, *J. Exp. Med.* 202 (2005) 209–215. doi:10.1084/jem.20050846.
- [42] D. Das, B. Bishayi, Contribution of Catalase and Superoxide Dismutase to the Intracellular Survival of Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* in Murine Macrophages, *Indian J. Microbiol.* 50 (2010) 375–384. doi:10.1007/s12088-011-0063-z.
- [43] C.S. Goodyear, G.J. Silverman, Staphylococcal toxin induced preferential and prolonged in vivo deletion of innate-like B lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 11392–11397. doi:10.1073/pnas.0404382101.
- [44] N.T. Pauli, H.K. Kim, F. Falugi, M. Huang, J. Dulac, C. Henry Dunand, et al., *Staphylococcus aureus* infection induces protein A-mediated immune evasion in humans, *J. Exp. Med.* 211 (2014) 2331–2339. doi:10.1084/jem.20141404.
- [45] A.R. Lussow, H.R. MacDonald, Differential effects of superantigen-induced “anergy” on priming and effector stages of a T cell-dependent antibody response, *Eur. J. Immunol.* 24 (1994) 445–449. doi:10.1002/eji.1830240227.
- [46] M. Llewelyn, J. Cohen, Superantigens: microbial agents that corrupt immunity, *Lancet Infect. Dis.* 2 (2002) 156–162.
- [47] E. Makou, A.P. Herbert, P.N. Barlow, Functional Anatomy of Complement Factor H, *Biochemistry (Mosc.)*. 52 (2013) 3949–3962. doi:10.1021/bi4003452.
- [48] D. Ricklin, G. Hajishengallis, K. Yang, J.D. Lambris, Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis, *Nat. Immunol.* 11 (2010) 785–797. doi:10.1038/ni.1923.
- [49] P. Gros, In self-defense, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18 (2011) 401–402. doi:10.1038/nsmb.2036.
- [50] J.M. Weiler, M.R. Daha, K.F. Austen, D.T. Fearon, Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73 (1976) 3268–3272.
- [51] R.B. Sim, R.G. DiScipio, Purification and structural studies on the complement-system control protein beta 1H (Factor H), *Biochem. J.* 205 (1982) 285–293.

- [52] S. Meri, M.K. Pangburn, Discrimination between activators and nonactivators of the alternative pathway of complement: regulation via a sialic acid/polyanion binding site on factor H, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 3982–3986.
- [53] M.K. Pangburn, R.D. Schreiber, H.J. Müller-Eberhard, Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution, *J. Exp. Med.* 146 (1977) 257–270.
- [54] M.K. Pangburn, Host recognition and target differentiation by factor H, a regulator of the alternative pathway of complement, *Immunopharmacology.* 49 (2000) 149–157.
- [55] P.F. Zipfel, R. Würzner, C. Skerka, Complement evasion of pathogens: common strategies are shared by diverse organisms, *Mol. Immunol.* 44 (2007) 3850–3857. doi:10.1016/j.molimm.2007.06.149.
- [56] J.F. Bohnsack, S. Takahashi, L. Hammitt, D.V. Miller, A.A. Aly, E.E. Adderson, Genetic polymorphisms of group B streptococcus scpB alter functional activity of a cell-associated peptidase that inactivates C5a, *Infect. Immun.* 68 (2000) 5018–5025.
- [57] P.P. Cleary, J. Handley, A.N. Suvorov, A. Podbielski, P. Ferrieri, Similarity between the group B and A streptococcal C5a peptidase genes, *Infect. Immun.* 60 (1992) 4239–4244.
- [58] M. Mishra, A. Ressler, L.S. Schlesinger, D.J. Wozniak, Identification of OprF as a Complement Component C3 Binding Acceptor Molecule on the Surface of *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect. Immun.* 83 (2015) 3006–3014. doi:10.1128/IAI.00081-15.
- [59] A. Laarman, F. Milder, J. van Strijp, S. Rooijackers, Complement inhibition by gram-positive pathogens: molecular mechanisms and therapeutic implications, *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 88 (2010) 115–120. doi:10.1007/s00109-009-0572-y.
- [60] Y.Q. Hong, B. Ghebrehiwet, Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 62 (1992) 133–138.
- [61] M.F. Tosi, H. Zakem, M. Berger, Neutrophil elastase cleaves C3bi on opsonized pseudomonas as well as CR1 on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch, *J. Clin. Invest.* 86 (1990) 300–308. doi:10.1172/JCI114699.
- [62] T.K. Koch, M. Reuter, D. Barthel, S. Böhm, J. van den Elsen, P. Krawczyk, et al., *Staphylococcus aureus* proteins Sbi and Efb recruit human plasmin to degrade complement C3 and C3b, *PLoS One.* 7 (2012) e47638. doi:10.1371/journal.pone.0047638.
- [63] N.S. Laursen, N. Gordon, S. Hermans, N. Lorenz, N. Jackson, B. Wines, et al., Structural basis for inhibition of complement C5 by the SSL7 protein from *Staphylococcus aureus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 3681–3686. doi:10.1073/pnas.0910565107.
- [64] H. Jarva, S. Ram, U. Vogel, A.M. Blom, S. Meri, Binding of the complement inhibitor C4bp to serogroup B *Neisseria meningitidis*, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 174 (2005) 6299–6307.
- [65] J. Ngampasutadol, S. Ram, A.M. Blom, H. Jarva, A.E. Jerse, E. Lien, et al., Human C4b-binding protein selectively interacts with *Neisseria gonorrhoeae* and results in species-specific infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 17142–17147. doi:10.1073/pnas.0506471102.
- [66] T. Meri, A. Hartmann, D. Lenk, R. Eck, R. Würzner, J. Hellwage, et al., The yeast *Candida albicans* binds complement regulators factor H and FHL-1, *Infect. Immun.* 70 (2002) 5185–5192.
- [67] G. Rambach, M. Hagleitner, I. Mohsenipour, C. Lass-Flörl, H. Maier, R. Würzner, et al., Antifungal activity of the local complement system in cerebral aspergillosis, *Microbes Infect. Inst. Pasteur.* 7 (2005) 1285–1295. doi:10.1016/j.micinf.2005.04.014.

- [68] C. Sandin, F. Carlsson, G. Lindahl, Binding of human plasma proteins to *Streptococcus pyogenes* M protein determines the location of opsonic and non-opsonic epitopes, *Mol. Microbiol.* 59 (2006) 20–30. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04913.x.
- [69] P.F. Zipfel, C. Skerka, J. Hellwage, S.T. Jokiranta, S. Meri, V. Brade, et al., Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases, *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2002) 971–978. doi:10.1042/.
- [70] M. Kuroda, T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, et al., Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Lancet Lond. Engl.* 357 (2001) 1225–1240.
- [71] M. Hecker, D. Becher, S. Fuchs, S. Engelmann, A proteomic view of cell physiology and virulence of *Staphylococcus aureus*, *Int. J. Med. Microbiol.* 300 (2010) 76–87. doi:16/j.ijmm.2009.10.006.
- [72] A.-K. Ziebandt, H. Kusch, M. Degner, S. Jaglitz, M.J.J.B. Sibbald, J.P. Arends, et al., Proteomics uncovers extreme heterogeneity in the *Staphylococcus aureus* exoproteome due to genomic plasticity and variant gene regulation, *Proteomics.* 10 (2010) 1634–1644. doi:10.1002/pmic.200900313.
- [73] J.A. Lindsay, *Staphylococcus: Molecular Genetics*, Horizon Scientific Press, 2008.
- [74] D. Becher, K. Hempel, S. Sievers, D. Zühlke, J. Pané-Farré, A. Otto, et al., A proteomic view of an important human pathogen--towards the quantification of the entire *Staphylococcus aureus* proteome, *PloS One.* 4 (2009) e8176. doi:10.1371/journal.pone.0008176.
- [75] H. Kusch, S. Engelmann, Secrets of the secretome in *Staphylococcus aureus*, *Int. J. Med. Microbiol. IJMM.* 304 (2014) 133–141. doi:10.1016/j.ijmm.2013.11.005.
- [76] A. Dreisbach, K. Hempel, G. Buist, M. Hecker, D. Becher, J.M. van Dijk, Profiling the surfacome of *Staphylococcus aureus*, *Proteomics.* 10 (2010) 3082–3096. doi:10.1002/pmic.201000062.
- [77] A. Dreisbach, J.M. van Dijk, G. Buist, The cell surface proteome of *Staphylococcus aureus*, *Proteomics.* 11 (2011) 3154–3168. doi:10.1002/pmic.201000823.
- [78] N. Solis, M.R. Larsen, S.J. Cordwell, Improved accuracy of cell surface shaving proteomics in *Staphylococcus aureus* using a false-positive control, *PROTEOMICS.* 10 (2010) 2037–2049. doi:10.1002/pmic.200900564.
- [79] M.J.J.B. Sibbald, A.K. Ziebandt, S. Engelmann, M. Hecker, A. de Jong, H.J.M. Harmsen, et al., Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics, *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR.* 70 (2006) 755–788. doi:10.1128/MMBR.00008-06.
- [80] H. Tjalsma, H. Antelmann, J.D.H. Jongbloed, P.G. Braun, E. Darmon, R. Dorenbos, et al., Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the “secrets” of the secretome, *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR.* 68 (2004) 207–233. doi:10.1128/MMBR.68.2.207-233.2004.
- [81] B.A. Bensing, P.M. Sullam, An accessory sec locus of *Streptococcus gordonii* is required for export of the surface protein GspB and for normal levels of binding to human platelets, *Mol. Microbiol.* 44 (2002) 1081–1094.
- [82] B.A. Bensing, P.M. Sullam, Characterization of *Streptococcus gordonii* SecA2 as a paralogue of SecA, *J. Bacteriol.* 191 (2009) 3482–3491. doi:10.1128/JB.00365-09.
- [83] U.A. Ochsner, A. Snyder, A.I. Vasil, M.L. Vasil, Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 8312–8317. doi:10.1073/pnas.082238299.
- [84] K. Dilks, R.W. Rose, E. Hartmann, M. Pohlschröder, Prokaryotic utilization of the twin-arginine translocation pathway: a genomic survey, *J. Bacteriol.* 185 (2003) 1478–1483.

- [85] M.-R. Yen, Y.-H. Tseng, E.H. Nguyen, L.-F. Wu, M.H. Saier, Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system, *Arch. Microbiol.* 177 (2002) 441–450. doi:10.1007/s00203-002-0408-4.
- [86] L. Biswas, R. Biswas, C. Nerz, K. Ohlsen, M. Schlag, T. Schäfer, et al., Role of the twin-arginine translocation pathway in *Staphylococcus*, *J. Bacteriol.* 191 (2009) 5921–5929. doi:10.1128/JB.00642-09.
- [87] M.J. Fath, R. Kolter, ABC transporters: bacterial exporters, *Microbiol. Rev.* 57 (1993) 995–1017.
- [88] I.-M. Jonsson, J.T. Juuti, P. François, R. AlMajidi, M. Pietiäinen, M. Girard, et al., Inactivation of the Ecs ABC transporter of *Staphylococcus aureus* attenuates virulence by altering composition and function of bacterial wall, *PLoS One*. 5 (2010) e14209. doi:10.1371/journal.pone.0014209.
- [89] L. Remy, M. Carrière, A. Derré-Bobillot, C. Martini, M. Sanguinetti, E. Borezée-Durant, The *Staphylococcus aureus* Opp1 ABC transporter imports nickel and cobalt in zinc-depleted conditions and contributes to virulence, *Mol. Microbiol.* 87 (2013) 730–743. doi:10.1111/mmi.12126.
- [90] M.L. Burts, W.A. Williams, K. DeBord, D.M. Missiakas, EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 1169–1174. doi:10.1073/pnas.0405620102.
- [91] Y.-H. Chen, M. Anderson, A.P.A. Hendrickx, D. Missiakas, Characterization of EssB, a protein required for secretion of ESAT-6 like proteins in *Staphylococcus aureus*, *BMC Microbiol.* 12 (2012) 219. doi:10.1186/1471-2180-12-219.
- [92] G. Grandi, Bacterial surface proteins and vaccines, *F1000 Biol. Rep.* 2 (2010). doi:10.3410/B2-36.
- [93] M. Schmalzer, N.J. Jann, F. Götz, R. Landmann, Staphylococcal lipoproteins and their role in bacterial survival in mice, *Int. J. Med. Microbiol. IJMM.* 300 (2010) 155–160. doi:10.1016/j.ijmm.2009.08.018.
- [94] F. Götz, W. Yu, L. Dube, M. Prax, P. Ebner, Excretion of cytosolic proteins (ECP) in bacteria, *Int. J. Med. Microbiol. IJMM.* 305 (2015) 230–237. doi:10.1016/j.ijmm.2014.12.021.
- [95] P. Ebner, M. Prax, M. Nega, I. Koch, L. Dube, W. Yu, et al., Excretion of cytoplasmic proteins (ECP) in *Staphylococcus aureus*, *Mol. Microbiol.* (2015). doi:10.1111/mmi.13065.
- [96] P. Ebner, J. Rinker, F. Götz, Excretion of cytoplasmic proteins in *Staphylococcus* is most likely not due to cell lysis, *Curr. Genet.* (2015). doi:10.1007/s00294-015-0504-z.
- [97] Y. Feng, X. Pan, W. Sun, C. Wang, H. Zhang, X. Li, et al., *Streptococcus suis* enolase functions as a protective antigen displayed on the bacterial cell surface, *J. Infect. Dis.* 200 (2009) 1583–1592. doi:10.1086/644602.
- [98] J. Kolberg, A. Aase, S. Bergmann, T.K. Herstad, G. Rødal, R. Frank, et al., *Streptococcus pneumoniae* enolase is important for plasminogen binding despite low abundance of enolase protein on the bacterial cell surface, *Microbiol. Read. Engl.* 152 (2006) 1307–1317. doi:10.1099/mic.0.28747-0.
- [99] A. Zhang, B. Chen, X. Mu, R. Li, P. Zheng, Y. Zhao, et al., Identification and characterization of a novel protective antigen, Enolase of *Streptococcus suis* serotype 2, *Vaccine.* 27 (2009) 1348–1353. doi:10.1016/j.vaccine.2008.12.047.
- [100] M.N. Khan, D. Shukla, A. Bansal, S. Mustoori, G. Ilavazhagan, Immunogenicity and protective efficacy of GroEL (hsp60) of *Streptococcus pneumoniae* against lethal infection in mice, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 56 (2009) 56–62.

- [101] C.R.W. Carneiro, E. Postol, R. Nomizo, L.F.L. Reis, R.R. Brentani, Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of *Staphylococcus aureus*, *Microbes Infect. Inst. Pasteur.* 6 (2004) 604–608. doi:10.1016/j.micinf.2004.02.003.
- [102] J. Antikainen, V. Kuparinen, K. Lähteenmäki, T.K. Korhonen, Enolases from Gram-positive bacterial pathogens and commensal lactobacilli share functional similarity in virulence-associated traits, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51 (2007) 526–534. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00330.x.
- [103] G. Wang, Y. Xia, J. Cui, Z. Gu, Y. Song, Y.Q. Chen, et al., The Roles of Moonlighting Proteins in Bacteria, *Curr. Issues Mol. Biol.* 16 (2013) 15–22.
- [104] A. Lebon, J.A.M. Labout, H.A. Verbrugh, V.W.V. Jaddoe, A. Hofman, W. van Wamel, et al., Dynamics and determinants of *Staphylococcus aureus* carriage in infancy: the Generation R Study, *J. Clin. Microbiol.* 46 (2008) 3517–3521. doi:10.1128/JCM.00641-08.
- [105] S. Holtfreter, J. Kolata, B.M. Bröker, Towards the immune proteome of *Staphylococcus aureus* - The anti-*S. aureus* antibody response, *Int. J. Med. Microbiol. IJMM.* 300 (2010) 176–192. doi:10.1016/j.ijmm.2009.10.002.
- [106] H.F.L. Wertheim, D.C. Melles, M.C. Vos, W. van Leeuwen, A. van Belkum, H.A. Verbrugh, et al., The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections, *Lancet Infect. Dis.* 5 (2005) 751–762. doi:10.1016/S1473-3099(05)70295-4.
- [107] A.H. Lee, A.I. Levinson, H.R. Schumacher, Hypogammaglobulinemia and rheumatic disease, *Semin. Arthritis Rheum.* 22 (1993) 252–264.
- [108] B.M. Bröker, A. van Belkum, Immune proteomics of *Staphylococcus aureus*, *Proteomics.* 11 (2011) 3221–3231. doi:10.1002/pmic.201100010.
- [109] U. Ryding, F. Espersen, B. Söderquist, B. Christensson, Evaluation of seven different enzyme-linked immunosorbent assays for serodiagnosis of *Staphylococcus aureus* bacteremia, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 42 (2002) 9–15.
- [110] P. Colque-Navarro, M. Palma, B. Söderquist, J.I. Flock, R. Möllby, Antibody responses in patients with staphylococcal septicemia against two *Staphylococcus aureus* fibrinogen binding proteins: clumping factor and an extracellular fibrinogen binding protein, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7 (2000) 14–20.
- [111] S. Holtfreter, T.T.H. Nguyen, H. Wertheim, L. Steil, H. Kusch, Q.P. Truong, et al., Human immune proteome in experimental colonization with *Staphylococcus aureus*, *Clin. Vaccine Immunol. CVI.* 16 (2009) 1607–1614. doi:10.1128/CVI.00263-09.
- [112] J. Kolata, L.G.M. Bode, S. Holtfreter, L. Steil, H. Kusch, B. Holtfreter, et al., Distinctive patterns in the human antibody response to *Staphylococcus aureus* bacteremia in carriers and non-carriers, *Proteomics.* 11 (2011) 3914–3927. doi:10.1002/pmic.201000760.
- [113] N.J. Verkaik, C.P. de Vogel, H.A. Boelens, D. Grumann, T. Hoogenboezem, C. Vink, et al., Anti-staphylococcal humoral immune response in persistent nasal carriers and noncarriers of *Staphylococcus aureus*, *J. Infect. Dis.* 199 (2009) 625–632. doi:10.1086/596743.
- [114] N.J. Verkaik, A. Lebon, C.P. de Vogel, H. Hooijkaas, H.A. Verbrugh, V.W.V. Jaddoe, et al., Induction of antibodies by *Staphylococcus aureus* nasal colonization in young children, *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16 (2010) 1312–1317. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03073.x.
- [115] F.W. Studier, Protein production by auto-induction in high density shaking cultures, *Protein Expr. Purif.* 41 (2005) 207–234.

- [116] S. Warming, N. Costantino, D.L. Court, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) e36. doi:10.1093/nar/gni035.
- [117] K.G. Dyke, M.P. Jevons, M.T. Parker, Penicillinase production and intrinsic resistance to penicillins in *Staphylococcus aureus*, *Lancet Lond. Engl.* 1 (1966) 835–838.
- [118] S. Herbert, A.-K. Ziebandt, K. Ohlsen, T. Schäfer, M. Hecker, D. Albrecht, et al., Repair of Global Regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and Comparative Analysis with Other Clinical Isolates, *Infect Immun.* 78 (2010) 2877–2889. doi:10.1128/IAI.00088-10.
- [119] R. Novick, Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*, *Virology.* 33 (1967) 155–166.
- [120] E.S. Duthie, Variation in the antigenic composition of staphylococcal coagulase, *J. Gen. Microbiol.* 7 (1952) 320–326.
- [121] L.K. McDougal, C.D. Steward, G.E. Killgore, J.M. Chaitram, S.K. McAllister, F.C. Tenover, Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database, *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003) 5113–5120.
- [122] P.D. Fey, J.L. Endres, V.K. Yajjala, T.J. Widhelm, R.J. Boissy, J.L. Bose, et al., A Genetic Resource for Rapid and Comprehensive Phenotype Screening of Nonessential *Staphylococcus aureus* Genes, *mBio.* 4 (2013). doi:10.1128/mBio.00537-12.
- [123] C.T. Chung, S.L. Niemela, R.H. Miller, One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86 (1989) 2172–2175.
- [124] T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [125] R.K. Saiki, D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, et al., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science.* 239 (1988) 487–491.
- [126] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* 227 (1970) 680–685.
- [127] U.B. Ericsson, B.M. Hallberg, G.T. Detitta, N. Dekker, P. Nordlund, Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies, *Anal. Biochem.* 357 (2006) 289–298. doi:10.1016/j.ab.2006.07.027.
- [128] K. Phillips, A.H. de la Peña, The Combined Use of the Thermofluor Assay and ThermoQ Analytical Software for the Determination of Protein Stability and Buffer Optimization as an Aid in Protein Crystallization, in: *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, John Wiley & Sons, Inc., n.d. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142727.mb1028s94/abstract> (accessed March 27, 2012).
- [129] J.J. Lavinder, S.B. Hari, B.J. Sullivan, T.J. Magliery, High-throughput thermal scanning: a general, rapid dye-binding thermal shift screen for protein engineering, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 3794–3795. doi:10.1021/ja8049063.
- [130] R.M. Lequin, Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), *Clin. Chem.* 51 (2005) 2415–2418. doi:10.1373/clinchem.2005.051532.
- [131] B. Oesterreich, B. Lorenz, T. Schmitter, R. Kontermann, M. Zenn, B. Zimmermann, et al., Characterization of the biological anti-staphylococcal functionality of hUK-66 IgG1, a humanized monoclonal antibody as substantial component for an immunotherapeutic approach, *Hum. Vaccines Immunother.* 10 (2014) 926–937.
- [132] F. Lottspeich, H. Zorbas, *Bioanalytik, Spektrum, Akad. Verlag*, 1998.

- [133] A.L. Lucas, A.C. Manna, Phenotypic characterization of sarR mutant in *Staphylococcus aureus*, *Microb. Pathog.* 57 (2013) 52–61. doi:10.1016/j.micpath.2012.11.008.
- [134] G. Koch, A. Yepes, K.U. Förstner, C. Wermser, S.T. Stengel, J. Modamio, et al., Evolution of resistance to a last-resort antibiotic in *Staphylococcus aureus* via bacterial competition, *Cell.* 158 (2014) 1060–1071. doi:10.1016/j.cell.2014.06.046.
- [135] S. Krieger geb. Donat, Molekulare und funktionelle Charakterisierung der Ser/Thr-Kinase PknB und –Phosphatase Stp von *Staphylococcus aureus*, (2009).
- [136] B.B. Fuchs, E. O'Brien, J.B.E. Khoury, E. Mylonakis, Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis, *Virulence.* 1 (2010) 475–482.
- [137] P. Mak, A. Zdybicka-Barabas, M. Cytryńska, A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi, *Dev. Comp. Immunol.* 34 (2010) 1129–1136. doi:10.1016/j.dci.2010.06.005.
- [138] N. Ramarao, C. Nielsen-Leroux, D. Lereclus, The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis, *J. Vis. Exp. JoVE.* (2012) e4392. doi:10.3791/4392.
- [139] A.K. Daoud, M.A. Tayyar, I.M. Fouda, N.A. Harfeil, Effects of diabetes mellitus vs. in vitro hyperglycemia on select immune cell functions, *J. Immunotoxicol.* 6 (2009) 36–41. doi:10.1080/15476910802604564.
- [140] H. Yano, M. Kinoshita, K. Fujino, M. Nakashima, Y. Yamamoto, H. Miyazaki, et al., Insulin treatment directly restores neutrophil phagocytosis and bactericidal activity in diabetic mice and thereby improves surgical site *Staphylococcus aureus* infection, *Infect. Immun.* 80 (2012) 4409–4416. doi:10.1128/IAI.00787-12.
- [141] J.M. Mylotte, A. Tayara, *Staphylococcus aureus* bacteremia: predictors of 30-day mortality in a large cohort, *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 31 (2000) 1170–1174. doi:10.1086/317421.
- [142] B.L. Jaber, Bacterial infections in hemodialysis patients: pathogenesis and prevention, *Kidney Int.* 67 (2005) 2508–2519. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00364.x.
- [143] K. Burton, The limitation of glycolysis in adenine-deficient *Escherichia coli*, *Biochem. J.* 123 (1971) 585–590.
- [144] Microarray-based identification of human antibodies against *Staphylococcus aureus* antigens - Kloppot - 2015 - PROTEOMICS - Clinical Applications - Wiley Online Library, (n.d.). <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prca.201400123/suppinfo> (accessed August 3, 2015).
- [145] S. Hanessian, P.P. Lu, J.Y. Sanceau, P. Chemla, K. Gohda, R. Fonne-Pfister, et al., An enzyme-bound bisubstrate hybrid inhibitor of adenylosuccinate synthetase, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* 38 (1999) 3159–3162. doi:10.1002/(SICI)1521-3773(19991102)38:21<3159::AID-ANIE3159>3.0.CO;2-2.
- [146] C.V. Iancu, Y. Zhou, T. Borza, H.J. Fromm, R.B. Honzatko, Cavitation as a mechanism of substrate discrimination by adenylosuccinate synthetases, *Biochemistry (Mosc.).* 45 (2006) 11703–11711. doi:10.1021/bi0607498.
- [147] F. Liu, Q. Dong, H.J. Fromm, Site-directed mutagenesis of the phosphate-binding consensus sequence in *Escherichia coli* adenylosuccinate synthetase, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 2388–2392.
- [148] C. Kang, N. Sun, B.W. Poland, A. Gorrell, R.B. Honzatko, H.J. Fromm, Residues Essential for Catalysis and Stability of the Active Site of *Escherichia coli* Adenylosuccinate Synthetase as Revealed by Directed Mutation and Kinetics, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 11881–11885. doi:10.1074/jbc.272.18.11881.

- [149] Q. Dong, F. Liu, A.M. Myers, H.J. Fromm, Evidence for an arginine residue at the substrate binding site of *Escherichia coli* adenylsuccinate synthetase as studied by chemical modification and site-directed mutagenesis, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 12228–12233.
- [150] Tina Schäfer, Biolumineszenz-basierte Untersuchungen zur Dynamik klinisch relevanter *Staphylococcus aureus*-Infektionen und zum Virulenzpotenzial ausgewählter Pathogenitätsfaktoren, (2010).
- [151] T. Mitani, J.E. Heinze, E. Freese, Induction of sporulation in *Bacillus subtilis* by decoyinine or hadacidin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77 (1977) 1118–1125.
- [152] H.T. Shigeura, 6-Azauracil inhibition of *Escherichia coli* B and its reversal by hadacidin, *Arch. Biochem. Biophys.* 100 (1963) 472–477.
- [153] R.F. Pittillo, F.C. Moncrief, HADACIDIN POTENTIATION OF LETHAL ACTION OF IONIZING IRRADIATION. II. EFFECT ON PROLIFERATING GRAM-NEGATIVE BACTERIA, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N.* 118 (1965) 525–529.
- [154] D.U. Bilitewski, ed., Application of Protein ArrayTubes to Bacteria, Toxin, and Biological Warfare Agent Detection - Springer, in: Humana Press, 2009.
http://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-59745-372-1_6#page-1 (accessed August 3, 2015).
- [155] K. Hempel, F.-A. Herbst, M. Moche, M. Hecker, D. Becher, Quantitative proteomic view on secreted, cell surface-associated, and cytoplasmic proteins of the methicillin-resistant human pathogen *Staphylococcus aureus* under iron-limited conditions, *J. Proteome Res.* 10 (2011) 1657–1666. doi:10.1021/pr1009838.
- [156] G. Buist, A. Steen, J. Kok, O.P. Kuipers, LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans, *Mol. Microbiol.* 68 (2008) 838–847. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06211.x.
- [157] A. Bateman, M. Bycroft, The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD)1, *J. Mol. Biol.* 299 (2000) 1113–1119. doi:10.1006/jmbi.2000.3778.
- [158] M. Sanz-Gaitero, R. Keary, C. Garcia-Doval, A. Coffey, M.J. van Raaij, Crystallization of the CHAP domain of the endolysin from *Staphylococcus aureus* bacteriophage K, *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 69 (2013) 1393–1396. doi:10.1107/S1744309113030133.
- [159] Y. Zou, C. Hou, Systematic analysis of an amidase domain CHAP in 12 *Staphylococcus aureus* genomes and 44 staphylococcal phage genomes, *Comput. Biol. Chem.* 34 (2010) 251–257. doi:10.1016/j.compbiolchem.2010.07.001.
- [160] S.C. Becker, S. Swift, O. Korobova, N. Schischkova, P. Kopylov, D.M. Donovan, et al., Lytic activity of the staphylolytic Twort phage endolysin CHAP domain is enhanced by the SH3b cell wall binding domain, *FEMS Microbiol. Lett.* 362 (2015) 1–8. doi:10.1093/femsle/fnu019.
- [161] M. Sanz-Gaitero, R. Keary, C. Garcia-Doval, A. Coffey, M.J. van Raaij, Crystal structure of the lytic CHAP(K) domain of the endolysin LysK from *Staphylococcus aureus* bacteriophage K, *Viol. J.* 11 (2014) 133. doi:10.1186/1743-422X-11-133.
- [162] S. Sundarajan, J. Raghupatil, A. Vipra, N. Narasimhaswamy, S. Saravanan, C. Appaiah, et al., Bacteriophage-derived CHAP domain protein, P128, kills *Staphylococcus* cells by cleaving interpeptide cross-bridge of peptidoglycan, *Microbiol. Read. Engl.* 160 (2014) 2157–2169. doi:10.1099/mic.0.079111-0.
- [163] M. Fenton, P.G. Casey, C. Hill, C.G. Gahan, R.P. Ross, O. McAuliffe, et al., The truncated phage lysin CHAP(k) eliminates *Staphylococcus aureus* in the nares of mice, *Bioeng. Bugs.* 1 (2010) 404–407. doi:10.4161/bbug.1.6.13422.

- [164] S.C. Becker, S. Dong, J.R. Baker, J. Foster-Frey, D.G. Pritchard, D.M. Donovan, LysK CHAP endopeptidase domain is required for lysis of live staphylococcal cells, *FEMS Microbiol. Lett.* 294 (2009) 52–60. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01541.x.
- [165] D.B. Gilmer, J.E. Schmitz, C.W. Euler, V.A. Fischetti, Novel bacteriophage lysin with broad lytic activity protects against mixed infection by *Streptococcus pyogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (2013) 2743–2750. doi:10.1128/AAC.02526-12.
- [166] S. Layec, J. Gérard, V. Legué, M.-P. Chapot-Chartier, P. Courtin, F. Borges, et al., The CHAP domain of Cse functions as an endopeptidase that acts at mature septa to promote *Streptococcus thermophilus* cell separation, *Mol. Microbiol.* 71 (2009) 1205–1217. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06595.x.
- [167] S. Layec, B. Decaris, N. Leblond-Bourget, Characterization of proteins belonging to the CHAP-related superfamily within the Firmicutes, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 14 (2008) 31–40. doi:10.1159/000106080.
- [168] A. Bateman, N.D. Rawlings, The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases, *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003) 234–237. doi:10.1016/S0968-0004(03)00061-6.
- [169] C. Heilmann, G. Thumm, G.S. Chhatwal, J. Hartleib, A. Uekötter, G. Peters, Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*, *Microbiol. Read. Engl.* 149 (2003) 2769–2778. doi:10.1099/mic.0.26527-0.
- [170] C. Heilmann, J. Hartleib, M.S. Hussain, G. Peters, The multifunctional *Staphylococcus aureus* autolysin aaa mediates adherence to immobilized fibrinogen and fibronectin, *Infect. Immun.* 73 (2005) 4793–4802. doi:10.1128/IAI.73.8.4793-4802.2005.
- [171] N. Hirschhausen, T. Schlesier, G. Peters, C. Heilmann, Characterization of the Modular Design of the Autolysin/Adhesin Aaa from *Staphylococcus Aureus*, *PLoS ONE.* 7 (2012) e40353. doi:10.1371/journal.pone.0040353.
- [172] C.V. Bamford, T. Francescutti, C.E. Cameron, H.F. Jenkinson, D. Dymock, Characterization of a novel family of fibronectin-binding proteins with M23 peptidase domains from *Treponema denticola*: *T. denticola* fibronectin interactions, *Mol. Oral Microbiol.* 25 (2010) 369–383. doi:10.1111/j.2041-1014.2010.00584.x.
- [173] K. Jönsson, D. McDevitt, M.H. McGavin, J.M. Patti, M. Höök, *Staphylococcus aureus* expresses a major histocompatibility complex class II analog, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 21457–21460.
- [174] M.H. McGavin, D. Krajewska-Pietrasik, C. Rydén, M. Höök, Identification of a *Staphylococcus aureus* extracellular matrix-binding protein with broad specificity, *Infect. Immun.* 61 (1993) 2479–2485.
- [175] M. Flock, J.I. Flock, Rebinding of extracellular adherence protein Eap to *Staphylococcus aureus* can occur through a surface-bound neutral phosphatase, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 3999–4003. doi:10.1128/JB.183.13.3999-4003.2001.
- [176] M. Palma, A. Haggar, J.-I. Flock, Adherence of *Staphylococcus aureus* Is Enhanced by an Endogenous Secreted Protein with Broad Binding Activity, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 2840–2845.
- [177] J.L. Woehl, D.A.C. Stapels, B.L. Garcia, K.X. Ramyar, A. Keightley, M. Ruyken, et al., The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* inhibits the classical and lectin pathways of complement by blocking formation of the C3 proconvertase, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 193 (2014) 6161–6171. doi:10.4049/jimmunol.1401600.
- [178] D.A.C. Stapels, K.X. Ramyar, M. Bischoff, M. von Köckritz-Blickwede, F.J. Milder, M. Ruyken, et al., *Staphylococcus aureus* secretes a unique class of neutrophil serine protease inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 13187–13192. doi:10.1073/pnas.1407616111.

- [179] A.M. Edwards, M.G. Bowden, E.L. Brown, M. Laabei, R.C. Massey, Staphylococcus aureus extracellular adherence protein triggers TNF α release, promoting attachment to endothelial cells via protein A, *PloS One*. 7 (2012) e43046. doi:10.1371/journal.pone.0043046.
- [180] S. Heptinstall, Platelet activation by an extracellular adherence protein from Staphylococcus aureus acting via modulation of sulfhydryl groups on platelets, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32 (2012) 1751–1752. doi:10.1161/ATVBAHA.112.252460.
- [181] F. Vandenesch, G. Lina, T. Henry, Staphylococcus aureus hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors?, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2 (2012) 12. doi:10.3389/fcimb.2012.00012.
- [182] J. Hacker, U. Dobrindt, *Pathogenomics: Genome Analysis of Pathogenic Microbes*, John Wiley & Sons, 2006.
- [183] E. Goldman, L.H. Green, *Practical Handbook of Microbiology*, Third Edition, CRC Press, 2015.
- [184] scn - Staphylococcal complement inhibitor precursor - Staphylococcus aureus (strain USA300), (n.d.). <http://www.uniprot.org/uniprot/Q2FFF8> (accessed September 15, 2015).
- [185] W.J.B. van Wamel, S.H.M. Rooijackers, M. Ruyken, K.P.M. van Kessel, J.A.G. van Strijp, The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages, *J. Bacteriol.* 188 (2006) 1310–1315. doi:10.1128/JB.188.4.1310-1315.2006.
- [186] S.H.M. Rooijackers, M. Ruyken, J. van Roon, K.P.M. van Kessel, J.A.G. van Strijp, W.J.B. van Wamel, Early expression of SCIN and CHIPS drives instant immune evasion by Staphylococcus aureus, *Cell. Microbiol.* 8 (2006) 1282–1293. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00709.x.
- [187] S.H.M. Rooijackers, F.J. Milder, B.W. Bardoel, M. Ruyken, J.A.G. van Strijp, P. Gros, Staphylococcal complement inhibitor: structure and active sites, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 179 (2007) 2989–2998.
- [188] M.M. Stayton, F.B. Rudolph, H.J. Fromm, Regulation, genetics, and properties of adenylosuccinate synthetase: a review, *Curr. Top. Cell. Regul.* 22 (1983) 103–141.
- [189] S.A. Wolfe, J.M. Smith, Nucleotide sequence and analysis of the purA gene encoding adenylosuccinate synthetase of Escherichia coli K12., *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 19147–19153.
- [190] P. Rappu, M. Leppihalme, P. Mäntsälä, Mutational analysis of the Bacillus subtilis purA operator site, *Curr. Microbiol.* 51 (2005) 322–326. doi:10.1007/s00284-005-0046-6.
- [191] J.B. Wyngaarden, R.A. Greenland, The inhibition of succinoadenylate kinosynthetase of Escherichia coli by adenosine and guanosine 5'-monophosphates, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 1054–1057.
- [192] B. Lowy, B.Z. Dorfman, Adenylosuccinase activity in human and rabbit erythrocyte lysates, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 3043–3046.
- [193] G. Weber, R.C. Jackson, J.C. Williams, F.J. Goulding, T.J. Eberts, Enzymatic markers of neoplastic transformation and regulation of purine and pyrimidine metabolism, *Adv. Enzyme Regul.* 15 (1977) 53–77. doi:10.1016/0065-2571(77)90009-7.
- [194] Piatigorsky: Gene sharing and evolution: the diversity... - Google Scholar, (n.d.). https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Gene+Sharing+and+Evolution%3A+the+Diversity+of+Protein+Functions.&author=Piatigorsky+J.&publication_year=2007 (accessed September 1, 2015).
- [195] C.J. Jeffery, Multifunctional proteins: examples of gene sharing, *Ann. Med.* 35 (2003) 28–35.
- [196] A. Espinosa-Cantú, D. Ascencio, F. Barona-Gómez, A. DeLuna, Gene duplication and the evolution of moonlighting proteins, *Front. Genet.* 6 (2015) 227. doi:10.3389/fgene.2015.00227.

- [197] B. Henderson, A. Martin, Bacterial moonlighting proteins and bacterial virulence, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 358 (2013) 155–213. doi:10.1007/82_2011_188.
- [198] M. Mani, C. Chen, V. Amblee, H. Liu, T. Mathur, G. Zwicke, et al., MoonProt: a database for proteins that are known to moonlight, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) D277–282. doi:10.1093/nar/gku954.
- [199] S. Hernández, G. Ferragut, I. Amela, J. Perez-Pons, J. Piñol, A. Mozo-Villarias, et al., MultitaskProtDB: a database of multitasking proteins, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) D517–520. doi:10.1093/nar/gkt1153.
- [200] C.J. Jeffery, Moonlighting proteins, *Trends Biochem. Sci.* 24 (1999) 8–11.
- [201] C. Gancedo, C.-L. Flores, Moonlighting proteins in yeasts, *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR.* 72 (2008) 197–210, table of contents. doi:10.1128/MMBR.00036-07.
- [202] J.-P. Lasserre, E. Beyne, S. Pyndiah, D. Lapailerie, S. Claverol, M. Bonneu, A complexomic study of *Escherichia coli* using two-dimensional blue native/SDS polyacrylamide gel electrophoresis, *Electrophoresis.* 27 (2006) 3306–3321. doi:10.1002/elps.200500912.
- [203] L. Pasztor, A.-K. Ziebandt, M. Nega, M. Schlag, S. Haase, M. Franz-Wachtel, et al., Staphylococcal major autolysin (Atl) is involved in excretion of cytoplasmic proteins, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 36794–36803. doi:10.1074/jbc.M110.167312.
- [204] G. Boël, V. Pichereau, I. Mijakovic, A. Mazé, S. Poncet, S. Gillet, et al., Is 2-phosphoglycerate-dependent automodification of bacterial enolases implicated in their export?, *J. Mol. Biol.* 337 (2004) 485–496. doi:10.1016/j.jmb.2003.12.082.
- [205] I. Hirose, K. Sano, I. Shioda, M. Kumano, K. Nakamura, K. Yamane, Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-dimensional protein electrophoretic study, *Microbiol. Read. Engl.* 146 (Pt 1) (2000) 65–75.
- [206] L. Pasztor, Untersuchungen zur Signalpeptidunabhängigen Translokationwege in *Staphylococcus aureus.*, (2011).
- [207] C.G. Korea, G. Balsamo, A. Pezzicoli, C. Merakou, S. Tavarini, F. Bagnoli, et al., Staphylococcal Esx proteins modulate apoptosis and release of intracellular *Staphylococcus aureus* during infection in epithelial cells, *Infect. Immun.* 82 (2014) 4144–4153. doi:10.1128/IAI.01576-14.
- [208] S.S. Chatterjee, H.-S. Joo, A.C. Duong, T.D. Dieringer, V.Y. Tan, Y. Song, et al., Essential *Staphylococcus aureus* toxin export system, *Nat. Med.* 19 (2013) 364–367. doi:10.1038/nm.3047.
- [209] J.A. Lindsay, Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*, *Int. J. Med. Microbiol. IJMM.* 300 (2010) 98–103. doi:10.1016/j.ijmm.2009.08.013.
- [210] C. Heilmann, M. Hussain, G. Peters, F. Götz, Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface, *Mol. Microbiol.* 24 (1997) 1013–1024.
- [211] A. Muesch, E. Hartmann, K. Rohde, A. Rubartelli, R. Sitia, T.A. Rapoport, A novel pathway for secretory proteins?, *Trends Biochem. Sci.* 15 (1990) 86–88.
- [212] A. Rubartelli, F. Cozzolino, M. Talio, R. Sitia, A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence, *EMBO J.* 9 (1990) 1503–1510.
- [213] W. Nickel, The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes, *Eur. J. Biochem. FEBS.* 270 (2003) 2109–2119.
- [214] B.L. Deatherage, J.C. Lara, T. Bergsbaken, S.L. Rassoulian Barrett, S. Lara, B.T. Cookson, Biogenesis of bacterial membrane vesicles, *Mol. Microbiol.* 72 (2009) 1395–1407. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06731.x.

- [215] H. Amdahl, I. Jongerius, T. Meri, T. Pasanen, S. Hyvärinen, K. Haapasalo, et al., Staphylococcal Ecb protein and host complement regulator factor H enhance functions of each other in bacterial immune evasion, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 191 (2013) 1775–1784. doi:10.4049/jimmunol.1300638.
- [216] K. Haupt, M. Reuter, J. van den Elsen, J. Burman, S. Hälbig, J. Richter, et al., The Staphylococcus aureus protein Sbi acts as a complement inhibitor and forms a tripartite complex with host complement Factor H and C3b, *PLoS Pathog.* 4 (2008) e1000250. doi:10.1371/journal.ppat.1000250.
- [217] K. Poolpol, D. Orth-Höller, C. Speth, P.F. Zipfel, C. Skerka, S.R. de Córdoba, et al., Interaction of Shiga toxin 2 with complement regulators of the factor H protein family, *Mol. Immunol.* 58 (2014) 77–84. doi:10.1016/j.molimm.2013.11.009.
- [218] T. Hallström, C. Siegel, M. Mörgelin, P. Kraiczy, C. Skerka, P.F. Zipfel, CspA from *Borrelia burgdorferi* inhibits the terminal complement pathway, *mBio.* 4 (2013). doi:10.1128/mBio.00481-13.
- [219] T. Hallström, M. Mörgelin, D. Barthel, M. Raguse, A. Kunert, R. Hoffmann, et al., Dihydrolipoamide dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa* is a surface-exposed immune evasion protein that binds three members of the factor H family and plasminogen, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 189 (2012) 4939–4950. doi:10.4049/jimmunol.1200386.
- [220] M. Reuter, C.C. Caswell, S. Lukomski, P.F. Zipfel, Binding of the human complement regulators CFHR1 and factor H by streptococcal collagen-like protein 1 (Scl1) via their conserved C termini allows control of the complement cascade at multiple levels, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 38473–38485. doi:10.1074/jbc.M110.143727.
- [221] P. Kraiczy, C. Hanssen-Hübner, V. Kitiratschky, C. Brenner, S. Besier, V. Brade, et al., Mutational analyses of the BbCRASP-1 protein of *Borrelia burgdorferi* identify residues relevant for the architecture and binding of host complement regulators FHL-1 and factor H, *Int. J. Med. Microbiol. IJMM.* 299 (2009) 255–268. doi:10.1016/j.ijmm.2008.09.002.
- [222] N. Simon, E. Lasonder, M. Scheuermayer, A. Kuehn, S. Tews, R. Fischer, et al., Malaria parasites co-opt human factor H to prevent complement-mediated lysis in the mosquito midgut, *Cell Host Microbe.* 13 (2013) 29–41. doi:10.1016/j.chom.2012.11.013.
- [223] J.M. Lowenstein, Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle, *Physiol. Rev.* 52 (1972) 382–414.
- [224] G.D. Markham, G.H. Reed, Adenylosuccinate synthetase from *Azotobacter vinelandii*: purification, properties and steady-state kinetics, *Arch. Biochem. Biophys.* 184 (1977) 24–35.
- [225] K. Ishii, I. Shiio, Regulation of purine ribonucleotide synthesis by end product inhibition. 3. Effect of purine nucleotides on succino-AMP synthetase of *Bacillus subtilis*, *J. Biochem. (Tokyo).* 68 (1970) 171–176.
- [226] G.R. Gale, A.B. Smith, Alanosine and hadacidin--comparison of effects on adenylosuccinate synthetase, *Biochem. Pharmacol.* 17 (1968) 2495–2498.
- [227] F.F. Snyder, J.F. Henderson, S.C. Kim, A.R. Paterson, L.W. Brox, Purine nucleotide metabolism and nucleotide pool sizes in synchronized lymphoma L5178Y cells, *Cancer Res.* 33 (1973) 2425–2430.
- [228] H.T. Shigeura, C.N. Gordon, Hadacidin, a new inhibitor of purine biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 1932–1936.
- [229] A.W. Clark, F.B. Rudolph, Regulation of purine metabolism. Adenylosuccinate synthetase from Novikoff ascites tumor cells, *Biochim. Biophys. Acta.* 437 (1976) 87–90.

- [230] E.G. Jahngen, E.F. Rossomando, Adenylosuccinate synthetase from *Dictyostelium discoideum*: effects of hadacidin analogs and binding of [¹⁴C]hadacidin, *Arch. Biochem. Biophys.* 229 (1984) 145–154.
- [231] E.A. Kaczka, C.O. Gitterman, E.L. Dulaney, K. Folkers, Hadacidin, a new growth-inhibitory substance in human tumor systems, *Biochemistry (Mosc.)*. 1 (1962) 340–343.
- [232] R.R. Ellison, S.H. Nadler, B. Shnider, G.L. Gold, J. Horton, J. Colsky, et al., Clinical trial of hadacidin (NSC-521778) at three fractionated dose levels, *Cancer Chemother. Rep.* 52 (1968) 425–431.
- [233] R.R. Ellison, Preliminary clinical trials of hadacidin, a new tumor-inhibitory substance, *Clin Pharmacol And Therapeut.* (1963) 326–329.
- [234] O.H.P. Pepper, LEUKOPENIA—A REVIEW: WITH SPECIAL REFERENCE TO AGRANULOCYTIC ANGINA, *Calif. West. Med.* 35 (1931) 82–86.
- [235] F. Zhao, B.L. Cheng, S. Boyle-Vavra, M.-L. Alegre, R.S. Daum, A.S. Chong, et al., Proteomic Identification of saeRS-Dependent Targets Critical for Protective Humoral Immunity against *Staphylococcus aureus* Skin Infection, *Infect. Immun.* 83 (2015) 3712–3721. doi:10.1128/IAI.00667-15.
- [236] S. Holtfreter, J. Kolata, B.M. Bröker, Towards the immune proteome of *Staphylococcus aureus* – The anti-*S. aureus* antibody response, *Int. J. Med. Microbiol.* 300 (2010) 176–192. doi:10.1016/j.ijmm.2009.10.002.
- [237] A. Dryla, S. Prustomersky, D. Gelbmann, M. Hanner, E. Bettinger, B. Kocsis, et al., Comparison of antibody repertoires against *Staphylococcus aureus* in healthy individuals and in acutely infected patients, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12 (2005) 387–398. doi:10.1128/CDLI.12.3.387-398.2005.
- [238] G. Jacobsson, P. Colque-Navarro, E. Gustafsson, R. Andersson, R. Möllby, Antibody responses in patients with invasive *Staphylococcus aureus* infections, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 29 (2010) 715–725. doi:10.1007/s10096-010-0919-x.
- [239] A. van Belkum, N.J. Verkaik, C.P. de Vogel, H.A. Boelens, J. Verveer, J.L. Nouwen, et al., Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types, *J. Infect. Dis.* 199 (2009) 1820–1826. doi:10.1086/599119.
- [240] M.F. VandenBergh, E.P. Yzerman, A. van Belkum, H.A. Boelens, M. Sijmons, H.A. Verbrugh, Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state, *J. Clin. Microbiol.* 37 (1999) 3133–3140.
- [241] S. Holtfreter, K. Roschack, P. Eichler, K. Eske, B. Holtfreter, C. Kohler, et al., *Staphylococcus aureus* carriers neutralize superantigens by antibodies specific for their colonizing strain: a potential explanation for their improved prognosis in severe sepsis, *J. Infect. Dis.* 193 (2006) 1275–1278. doi:10.1086/503048.
- [242] J. Kluytmans, A. van Belkum, H. Verbrugh, Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks, *Clin. Microbiol. Rev.* 10 (1997) 505–520.
- [243] H.F.L. Wertheim, M.C. Vos, A. Ott, A. van Belkum, A. Voss, J.A.J.W. Kluytmans, et al., Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers, *Lancet Lond. Engl.* 364 (2004) 703–705. doi:10.1016/S0140-6736(04)16897-9.
- [244] K. Toshkova, C. Annemüller, O. Akineden, C. Lämmler, The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as risk factor for human skin infections, *FEMS Microbiol. Lett.* 202 (2001) 17–24.

- [245] C. von Eiff, K. Becker, K. Machka, H. Stammer, G. Peters, Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group, *N. Engl. J. Med.* 344 (2001) 11–16. doi:10.1056/NEJM200101043440102.
- [246] S.R. Clarke, K.J. Brummell, M.J. Horsburgh, P.W. McDowell, S.A.S. Mohamad, M.R. Stapleton, et al., Identification of in vivo-expressed antigens of *Staphylococcus aureus* and their use in vaccinations for protection against nasal carriage, *J. Infect. Dis.* 193 (2006) 1098–1108. doi:10.1086/501471.
- [247] T.G. Evans, M. Schiff, B. Graves, J. Agosti, M.L. Barritt, D. Garner, et al., The safety and efficacy of GM-CSF as an adjuvant in hepatitis B vaccination of chronic hemodialysis patients who have failed primary vaccination, *Clin. Nephrol.* 54 (2000) 138–142.
- [248] A. Kausz, D. Pahari, The value of vaccination in chronic kidney disease, *Semin. Dial.* 17 (2004) 9–11.
- [249] H. Dobbstein, Immunmechanismen bei Urämie, *Klin. Wochenschr.* 53 (1975) 461–466. doi:10.1007/BF01468631.
- [250] N.D. Vaziri, M.V. Pahl, A. Crum, K. Norris, Effect of uremia on structure and function of immune system, *J. Ren. Nutr. Off. J. Counc. Ren. Nutr. Natl. Kidney Found.* 22 (2012) 149–156. doi:10.1053/j.jrn.2011.10.020.
- [251] M. Dinits-Pensy, G.N. Forrest, A.S. Cross, M.K. Hise, The use of vaccines in adult patients with renal disease, *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 46 (2005) 997–1011. doi:10.1053/j.ajkd.2005.08.032.
- [252] M. Selle, T. Hertlein, B. Oesterreich, T. Klemm, P. Kloppot, S. Engelmann, et al., Global antibody response against *Staphylococcus aureus* in sepsis and soft tissue infection, in preparation. (n.d.).
- [253] G. Zanetti, D. Heumann, J. Gérard, J. Kohler, P. Abbet, C. Barras, et al., Cytokine production after intravenous or peritoneal gram-negative bacterial challenge in mice. Comparative protective efficacy of antibodies to tumor necrosis factor-alpha and to lipopolysaccharide., *J. Immunol.* 148 (1992) 1890–1897.
- [254] N.J. Verkaik, H.A. Boelens, C.P. de Vogel, M. Tavakol, L.G.M. Bode, H.A. Verbrugh, et al., Heterogeneity of the humoral immune response following *Staphylococcus aureus* bacteremia, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 29 (2010) 509–518. doi:10.1007/s10096-010-0888-0.
- [255] P.M. den Reijer, N. Lemmens-den Toom, S. Kant, S.V. Snijders, H. Boelens, M. Tavakol, et al., Characterization of the humoral immune response during *Staphylococcus aureus* bacteremia and global gene expression by *Staphylococcus aureus* in human blood, *PLoS One.* 8 (2013) e53391. doi:10.1371/journal.pone.0053391.
- [256] S. Stentzel, N. Sundaramoorthy, S. Michalik, M. Nordengrün, S. Schulz, J. Kolata, et al., Specific serum IgG at diagnosis of *Staphylococcus aureus* bloodstream invasion is correlated with disease progression, *J. Proteomics.* 128 (2015) 1–7. doi:10.1016/j.jprot.2015.06.018.
- [257] W. Salgado-Pabón, P.M. Schlievert, Models matter: the search for an effective *Staphylococcus aureus* vaccine, *Nat. Rev. Microbiol.* 12 (2014) 585–591. doi:10.1038/nrmicro3308.
- [258] P.M. Schlievert, Cytolysins, superantigens, and pneumonia due to community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *J. Infect. Dis.* 200 (2009) 676–678. doi:10.1086/605333.

7. Anhang

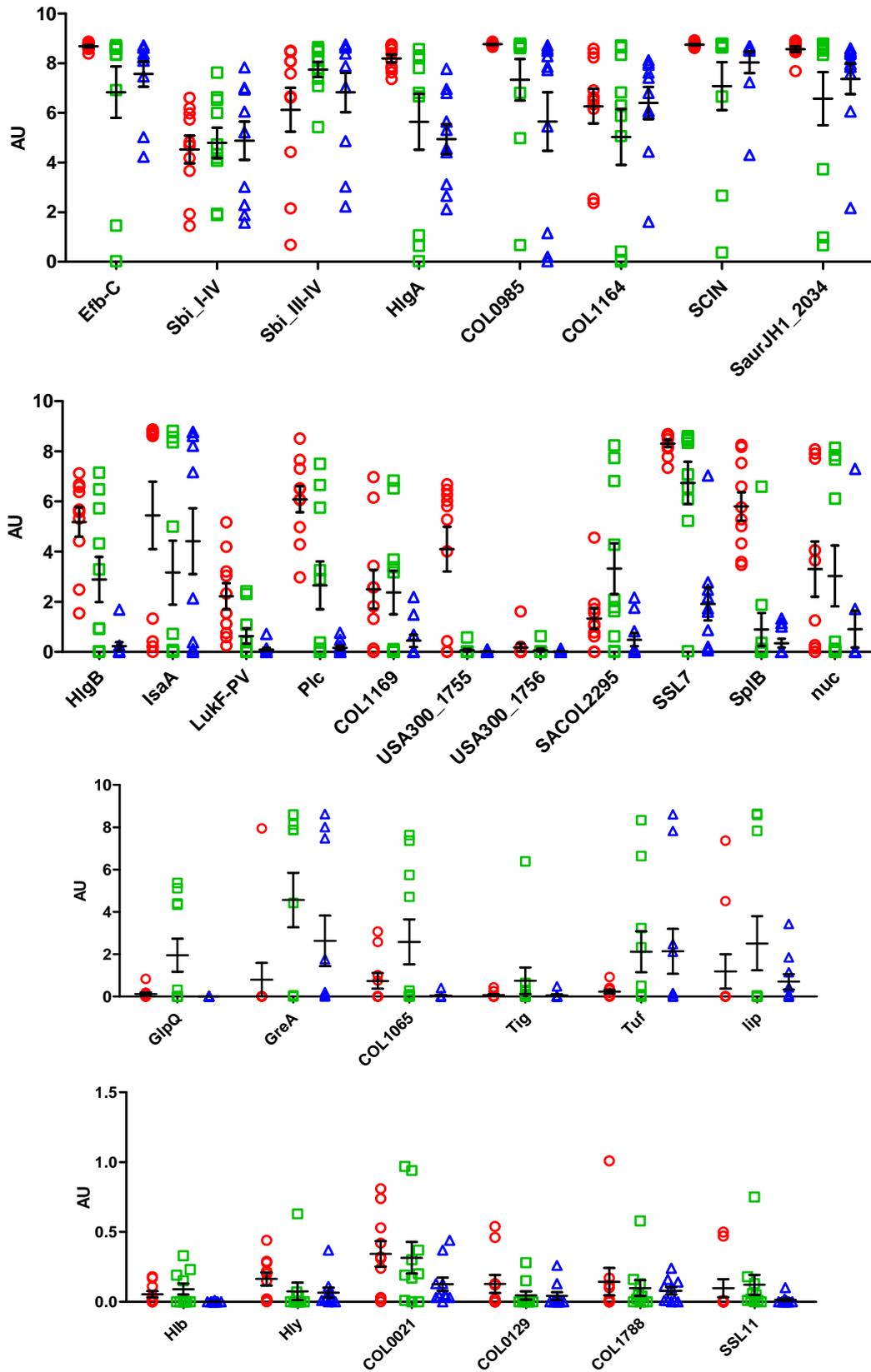
7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	IsaA	<i>Immunodominant staphylococcal antigen A</i>
AOD	<i>Peripheral arterial occlusive disease</i>		
AS	Aminosäuren	Isd	<i>iron-responsive surface determinant</i>
ATP	Adenin-5'-triphosphat	IVlg	Intravenöse Immunglobuline
AU	Arbiträre Einheit	kb	Kilobasen
bp	Basenpaare	kDa	Kilodalton
BSA	Bovines Serum Albumin	l	Liter
bzw.	beziehungsweise	LB	Luria-Bertani
CBD	Chitin-Bindedomäne	Lip	Lipase
cDNA	"copy"-DNA	LukF	Leukocidin
CFU	Koloniebildende Einheit	M	molar
CHIPS	<i>chemotaxis inhibitory protein of staphylococci</i>	mA	Milliampere
		MAC	<i>Membrane attack complex</i>
ClfA/B	<i>Clumping factor</i>	Mg	Milligramm
d.h.	das heißt	MHK	minimale Hemmkonzentration
DNase	Desoxyribonuklease	Min	Minuten
DNA	Desoxyribonukleinsäure	ml	Milliliter
DTT	Dithiothreitol	mM	Millimolar
Eap	<i>extracellular adhesive protein</i>	MOI	<i>multiplicity of infection</i>
Ecb	<i>extracellular complement binding protein</i>	MprF	<i>Multiple peptide resistance factor</i>
		mRNA	"messenger"-RNA
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>	MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
EDTA	Ethylendiamintertraacetat		
Efb	<i>extracellular fibrinogen-binding protein</i>	MSCRAMM	<i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
ESRD	<i>endstage renal disease</i>		
et al.	et altera (und andere)	MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
EtBr	Ethidiumbromid	nt	Nukleotide
EtOH	Ethanol	µg	Mikrogramm
FB	Komplement Faktor B	µl	Mikroliter
FCS	Fötale Kälberserum	ng	Nanogramm
FH	Komplement Faktor H	NHS	Humanes Serum
FI	Komplement Faktor I	OD 600	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
FnBP	Fibronektin-Bindeproteine		
g	Gramm	ORF	Offenes Leseraster (" <i>open reading frame</i> ")
GlpQ	Glycerophosphoryl-Diester Phosphodiesterase	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
GreA	Transkriptionselongationsfaktor	PCR	„ <i>Polymerase Chain Reaction</i> “
h	Stunde	PEG	Polyethylen-Glykol
HlgA/B/C	γ-Hämolyysin	pH	pH-Wert
H ₂ Od.	destilliertes/vollentsalztes Wasser	Plc	Phospholipase C
H ₂ Odd.	Bidestilliertes Wasser	PrsA	<i>posttranslocational chaperone lipoprotein</i>
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1		
IgG/IgM	Immunglobulin G/M	PSM	<i>phenol soluble modulins</i>
IMP	Inosin-5-Monophosphat	PVL	Panton-Valentine Leukocidin
IMPACT	<i>Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag</i>	RNase	Ribonuklease
		RNA	Ribonukleinsäure

Fortsetzung: Abkürzungsverzeichnis

ROS	Reaktive Sauerstoffverbindungen	TAE	Tris-Acetat-EDTA
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure	Tag	engl.: <i>Anhänger</i> , hier: Markierung eines Proteins zur Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkription	Target	engl. : <i>Ziel</i> , hier Zielgen o. -protein oder Angriffsziel
s	Sekunde	TE	Tris-EDTA
Sak	Staphylokinase	<i>Template</i>	Vorlage/Matrize
sAMP	Adenylosuccinat	Tig	Trigger-Faktor
Sbi	<i>second immunoglobulin-binding protein</i>	TRIS	Trishydroxymethyl-aminomethan
SCIN	<i>Staphylococcus complement inhibitor</i>	TSS	<i>Transformation and Storage Solution</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat	TSST-1	<i>Toxic-shock-syndrome-toxin 1</i>
SEA/SEM	<i>staphylococcal enterotoxin A/M</i>	Tuf	Elongationsfaktor Tu
SERAM	<i>Secretable expanded repertoire adhesive molecules</i>	T7SS	Typ VII Sekretionssystem
s.o.	siehe oben	U	Unit
sog.	sogenannt	u.a.	unter anderem
s.u.	siehe unten	ÜN	über Nacht
Spa	<i>Staphylococcal protein A</i>	ÜNK	Übernachtkultur
SSL	<i>Staphylococcal superantigen-like proteins</i>	V	Volt
SspB	Staphopain B	W	Watt
SV	Säulenvolumen	WT	Wildtyp
t	Zeit	z.B.	zum Beispiel
Tab.	Tabelle	z.T.	zum Teil
		2D-IB	2-dimensionaler Immunoblot

7.2 Einzelwerte aus dem *Staph-Toxin-Array*



- Sepsis
- Pneumonie
- △ Abszess

Abbildung 68: Antikörperantwort in den Seren der unterschiedlich infizierten Tiere. Ermittelte Einzelwerte der Signalintensitäten resultierend aus dem Proteinarray.

7.4 Homologie von Eap, P9 und P10

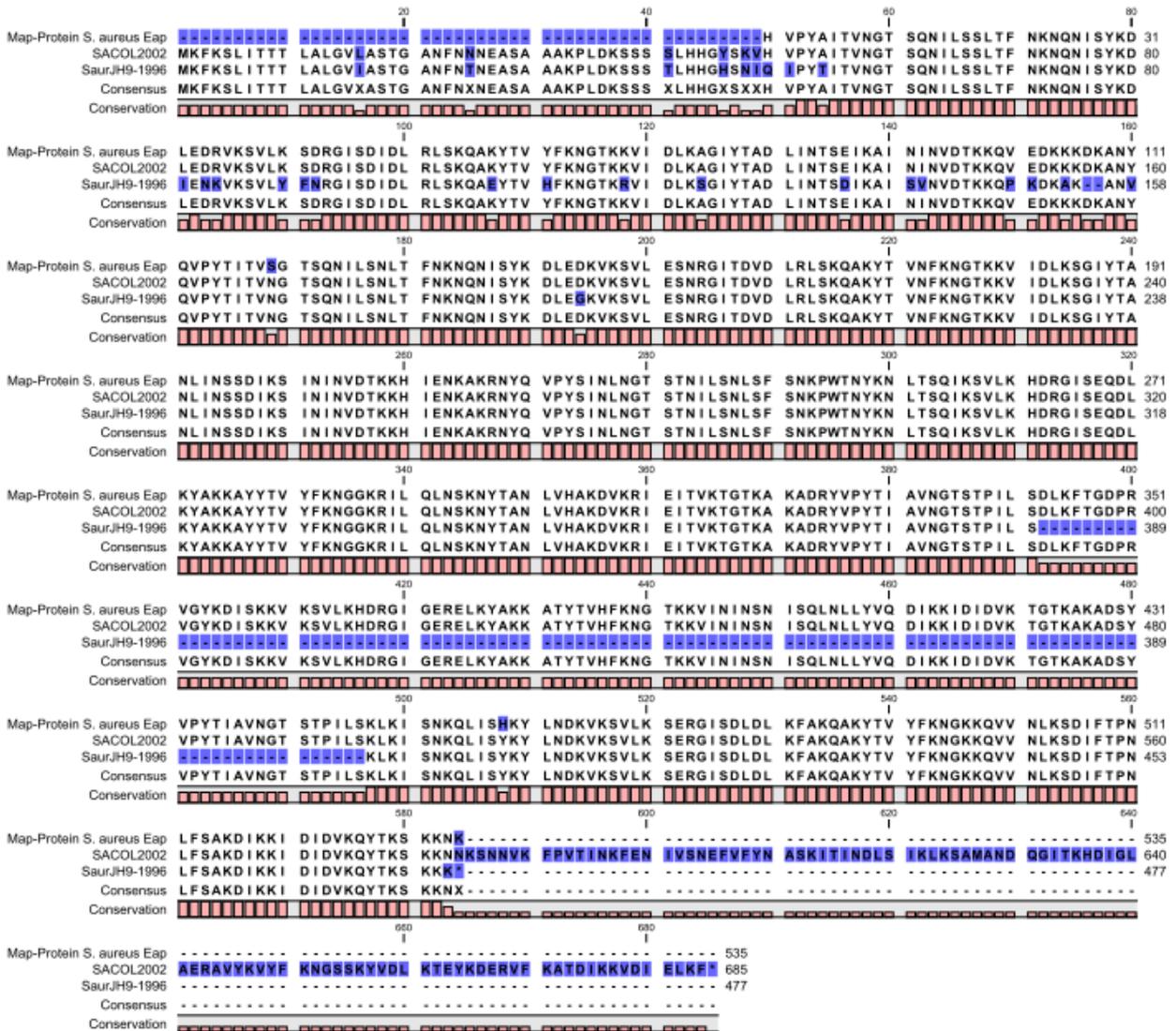


Abbildung 70: Homologie zwischen Eap (Uniprot: Q9Z4J2) und P9 und P10

Tagungsbeiträge

- 2011** **6th international Symposium organized by the students of the GSLS, Würzburg**
Poster: "Interactions between secreted proteins of *S. aureus* and host immune response", Martina Selle & Knut Ohlsen
- 2012** **DGHM, Hamburg**
Poster: "Individual characterization of unknown proteins of *S. aureus*", Martina Selle & Knut Ohlsen
- 2012** **EPOS, Würzburg**
Poster: "Individual characterization of unknown proteins of *S. aureus*", Martina Selle & Knut Ohlsen
- 2012** **Infektionsgenomik, Greifswald**
Vortrag: "Individual characterization of unknown secreted proteins of *S. aureus* – in vitro and in vivo relevance"
- 2012** **2nd International Conference on the Pathophysiology of Staphylococci in the post-genomic era, Kloster Banz, Bad Staffelstein**
Poster: "Investigation of in vivo and in vitro relevance of selected *S. aureus* proteins", Martina Selle & Knut Ohlsen
- 2013** **VAAM, Bremen**
Poster: "Investigation of *Staphylococcus aureus* exoproteins with unknown functions and their impact during infection", Martina Selle, Sascha Böhm, Peter Zipfel, Julia Kolata, Barbara Bröker & Knut Ohlsen
- 2013** **DGHM, Rostock**
Poster: "Investigation of uncharacterized exoproteins of *Staphylococcus aureus*", Martina Selle, Julia Kolata, Barbara Bröker & Knut Ohlsen
- 2013** **Infektionsgenomik, Würzburg**
Vortrag: "Interactions between secreted proteins of *Staphylococcus aureus* and host immune response"
- 2014** **MolMicro Meeting, Würzburg**
Poster: "Investigation of non-characterized proteins of *Staphylococcus aureus* and their role during infection", Martina Selle, Anika Westphal, Peter Zipfel & Knut Ohlsen

Publikationen

- 2015** **Microarray based identification of human antibodies against *Staphylococcus aureus* antigens.** Kloppot P, Selle M, Kohler C, Stentzel S, Fuchs S, Liebscher V, Müller E, Kale D, Ohlsen K, Bröker BM, Zipfel PF, Kahl BC, Ehricht R, Hecker M, Engelmann S. *Proteomics Clin Appl.* 2015 Feb 11. doi: 10.1002/prca.201400123. [Epub ahead of print]
- 2014** **Modelling antibiotic and cytotoxic isoquinoline effects in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and mammalian cells.** Cecil A, Ohlsen K, Menzel T, François P, Schrenzel J, Fischer A, Dörries K, Selle M, Lalk M, Hantzschmann J, Dittrich M, Liang C, Bernhardt J, Ölschläger TA, Bringmann G, Bruhn H, Unger M, Ponte-Sucre A, Lehmann L, Dandekar T. *Int J Med Microbiol.* 2015 Jan;305(1):96-109. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.11.006. Epub 2014 Nov 27.
- 2012** **Radiosensitizing effect of the novel Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 in human tumour cell lines silenced for Hsp90 α .** Stingl L, Niewidok N, Müller N, Selle M, Djuzenova CS, Flentje M. *Strahlenther Onkol.* 2012 Jun;188(6):507-15. doi: 10.1007/s00066-012-0080-9. Epub 2012 Mar 24.

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled ... is the result of my own work. I did not receive any help of support from commercial consultants. All sources and / or materials plied are listed and specified in this thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die Dissertation „titel“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift