

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. Matthias Frosch

**Auswirkungen von *Staphylococcus aureus*  
auf die Endothelpermeabilität  
in Ea.hy926-Zellen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Nora Isberner  
aus Gießen

Würzburg, Juni 2015



---

**Referentin:** Prof. Dr. med. Alexandra Schubert-Unkmeir

**Koreferent:** PD Dr. Knut Ohlsen

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 6. Juli 2016

**Die Promovendin ist Ärztin**

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Staphylococcus aureus</i> – ein bedeutender Kommensale und Krankheitserreger .....	1
1.1.1	Kolonisierung mit <i>Staphylococcus aureus</i> .....	1
1.1.2	<i>Staphylococcus aureus</i> als Krankheitserreger .....	2
1.1.3	Therapie von <i>Staphylococcus aureus</i> -Infektionen und Resistenzproblematik .....	3
1.2	Endovaskuläre <i>Staphylococcus aureus</i> -Infektionen – klinische Bedeutung ...	5
1.3	Die Endothelbarriere .....	7
1.3.1	Parazelluläre Permeabilität .....	8
1.3.2	Regulation der Endothelpermeabilität .....	9
1.4	Pathogenese von endovaskulären <i>Staphylococcus aureus</i> -Infektionen .....	10
1.4.1	Adhärenz .....	10
1.4.2	Thrombusformation, Persistenz auf der endothelialen Oberfläche und lokale Gewebeerstörung .....	14
1.4.3	Invasion, Extravasation und Dissemination in andere Gewebe .....	14
1.5	Fragestellung .....	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	Verwendete Laborgeräte und Materialien .....	19
2.2	Zellkultur .....	22
2.2.1	Verwendete Zellen .....	22
2.2.2	Kultivierung und Zellpassage .....	22
2.2.3	Kryokonservierung von Zellen .....	23
2.2.4	Auftauen der Zellen .....	23
2.2.5	Aussaat der Zellen für Versuche .....	23
2.3	Bakterienkultur .....	24
2.3.1	Verwendete Bakterienstämme und Medien .....	24
2.3.2	Auftauen und Aufbewahrung der Bakterienstämme .....	25
2.3.3	Verwendung der Bakterien für Versuche .....	25
2.3.4	Einfrieren von Bakterien .....	26
2.4	Messung der transendothelialen elektrischen Impedanz .....	26
2.5	Permeabilitätsassay .....	28
2.5.1	Prinzip des Permeabilitätsassays und Vorbereitungen .....	28
2.5.2	Permeabilitätsassay mit Tyrosin-Kinase-Inhibitoren .....	32
2.5.2.1	Viabilitätsassay von Bakterien mit Tyrosin-Kinase-Inhibitoren .....	32

---

2.6	Zytotoxizitäts-Assays .....	33
2.6.1	Kristallviolett-Assay .....	33
2.6.1.1	Prinzip des Kristallviolett-Assays und Vorbereitungen.....	33
2.6.1.2	Durchführung des Kristallviolett-Assays.....	34
2.6.2	Nicoletti-Assay.....	35
2.6.2.1	Prinzip des Nicoletti-Assays und Vorbereitungen.....	35
2.6.2.2	Durchführung des Nicoletti-Assays.....	36
2.7	Immunfluoreszenz .....	37
2.7.1	Antikörperfärbung.....	37
2.7.2	Mitotracker-Färbung .....	39
2.8	Auswertung des Daten- und Bildmaterials.....	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
3.1	<i>Staphylococcus aureus</i> führt zu Veränderungen der transendothelialen elektrischen Impedanz .....	41
3.2	<i>Staphylococcus aureus</i> FnBPs erhöhen die Endothelpermeabilität 4 und 24 Stunden nach Infektion.....	43
3.3	Apoptotische Effekte durch <i>Staphylococcus aureus</i> FnBPs spielen eine Rolle in der Permeabilitäts-erhöhung nach 24 Stunden, nicht aber nach 4 Stunden .....	48
3.4	<i>Staphylococcus aureus</i> FnBPs bewirken eine Reduktion der Signalintensität von ZO-1 und VE-Cadherin in Endothelzellen 4 Stunden nach Infektion .....	58
3.5	Protein-Tyrosin-Kinasen der Src-Familie sind an der Regulation der Endothelpermeabilität nach Infektion mit <i>Staphylococcus aureus</i> beteiligt ..	61
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>64</b>
4.1	Veränderungen der transendothelialen Impedanz und Permeabilität durch <i>Staphylococcus aureus</i> FnBPs.....	64
4.2	Apoptose in Endothelzellen nach Infektion mit <i>Staphylococcus aureus</i> .....	66
4.3	Interaktion von <i>Staphylococcus aureus</i> mit Zell-Zell-Verbindungen .....	68
4.4	Rolle von Src-Kinasen in der Regulation der Endothelpermeabilität nach <i>Staphylococcus aureus</i> -Infektion .....	70
4.5	Erhöhte Endothelpermeabilität durch <i>Staphylococcus aureus</i> FnBPs – ein relevanter Mechanismus in endovaskulären Infektionen?.....	71
4.6	FnBPs als pharmakologische Zielstruktur – klinische Perspektiven.....	73
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>95</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	95
7.2	Tabellenverzeichnis .....	96
7.3	Abkürzungsverzeichnis .....	97

---

# 1 Einleitung

## 1.1 *Staphylococcus aureus* – ein bedeutender Kommensale und Krankheitserreger

Staphylokokken sind grampositive Kugelbakterien aus der Familie der *Staphylococcaceae* mit einem Durchmesser von circa 1 µm, die sich in allen Raumebenen teilen können. Aufgrund ihrer fehlenden Motilität finden sie sich daher typischerweise in traubenförmigen Haufen angeordnet. Sie sind in der Regel fakultativ anaerob und nicht sporenbildend [1]. Der Name *Staphylococcus* (Altgriechisch: Staphylé = Traube, Kókkos = Kern, Kugel) wurde durch den schottischen Chirurgen A. Ogston geprägt, der Ende des 19. Jahrhunderts zahlreiche Abszesse untersuchte, in diesen traubenartig angeordnete Bakteriencluster fand und als wichtige Eitererreger beschrieb [2]. Zwei Jahre später wurde durch den deutschen Chirurgen F. J. Rosenbach aufgrund der goldgelben Farbe der Kolonien die Speziesbezeichnung *Staphylococcus aureus* (Lateinisch: aureus = golden) eingeführt [3]. Die 1926 von J. v. Daranyi beschriebene Einteilung von Staphylokokken in koagulasepositive und -negative Stämme beschreibt die Eigenschaft verschiedener Stämme Plasma zu koagulieren und wird wegen ihrer pathogenetischen Relevanz bis heute verwendet. *S. epidermidis* gilt als wichtigster Vertreter der koagulasenegativen, *S. aureus* als wichtigster Vertreter der koagulasepositiven Staphylokokken [1].

Durch seine zahlreichen Virulenzfaktoren (siehe 1.4) kann *S. aureus* eine große Bandbreite an Erkrankungen verursachen. So zählt *S. aureus* noch heute zu den bedeutendsten humanpathogenen Erregern und *S. aureus*-bedingte Erkrankungen zu den größten therapeutischen Herausforderungen überhaupt [4].

### 1.1.1 Kolonisierung mit *Staphylococcus aureus*

Der Mensch stellt ein natürliches Reservoir für *S. aureus* dar. Es handelt sich also nicht nur um einen bedeutenden Krankheitserreger, sondern gleichzeitig auch um einen Kommensalen. Die mit Abstand häufigste Besiedlungsstelle sind die Nasenvorhöfe, aber auch Haut, Vagina und Perineum, Pharynx oder der Gastrointestinaltrakt sind mögliche ökologische Nischen. Insgesamt sind circa 20 % der Menschen dauerhaft besiedelt, weitere 30 % weisen eine transiente Besiedlung mit dem Erreger auf [5]. Eine Kolonisierung erhöht das Risiko, in der Folge eine *S. aureus*-Infektion zu erleiden. Wenn es beispielweise durch Verletzungen, Operationen, Einbringen von Fremdmaterial oder eine das Immunsystem schwächende Grunderkrankung zu einem Zusammenbruch der Wirtsabwehr kommt, kann das eigene Reservoir als Quelle für Infektionen dienen [6]. So hat sich gezeigt, dass über 80 % der *S. aureus*-Bakteriämien einen endogenen Ursprung haben [7].

Für die Besiedlung spielen verschiedene Faktoren eine Rolle, die zum Teil noch nicht gänzlich verstanden werden. Ein komplexes Zusammenspiel aus Wirtsfaktoren und Eigenschaften des Erregers scheint ursächlich zu sein. Auf der Seite des Wirts spielen unter anderem vorbestehende Erkrankungen (z. B. Diabetes mellitus oder HIV), Alter, sozioökonomischer Status, enger Kontakt zu kolonisierten Patienten, Krankenhausaufenthalte in der Vorgeschichte, Adhärenzrezeptoren auf Epithelien sowie die Immunantwort auf den Erreger eine Rolle. Auf der Seite des Bakteriums sind verschiedene Virulenzfaktoren wie Adhäsine oder eine Polysaccharidkapsel, aber auch eine Resistenz gegen antimikrobielle Substanzen oder die Möglichkeit zur Wirtszellinvasion entscheidend [5].

### 1.1.2 *Staphylococcus aureus* als Krankheitserreger

*S. aureus* ist weltweit ein bedeutsamer Krankheitserreger. Das Erkrankungsspektrum kann von unkomplizierten Hautinfektionen über Lebensmittelvergiftungen bis hin zur lebensbedrohlichen Sepsis reichen [4]. Die Transmission erfolgt klassischerweise über eine Schmierinfektion. Da eine beträchtliche Anzahl an Infektionen im nosokomialen Bereich stattfindet, kommt vor allem dem Gesundheitspersonal als Überträger eine große Bedeutung zu [8]. Eine Risikogruppe sind insbesondere Patienten mit bestimmten Prädispositionsfaktoren. Hierzu gehören unter anderem Hämo- und Peritonealdialyse, immunsupprimierende Krankheiten, i.v.-Drogenabusus oder auch kardiale Grunderkrankungen [9]. *S. aureus*-Infektionen lassen sich in invasive und toxinvermittelte Infektionen unterteilen

#### **Invasive *S. aureus*-Erkrankungen**

In rund 90 % der Fälle invasiver *S. aureus*-Infektionen handelt es sich um eitrige Infektionen der Haut und ihrer Anhangsgebilde wie Furunkel, Karbunkel oder Abszesse [10]. Während lokale, auf die Haut beschränkte Infektionen meist nicht lebensbedrohlich sind, ist eine metastatische Absiedlung des Herdes sehr gefürchtet. Es kann zu Pneumonien, Osteomyelitiden, Abzessbildung in zahlreichen weiteren inneren Organen oder schweren endovaskulären Erkrankungen wie Sepsis oder Endokarditis kommen [4].

Eine zunehmende Bedeutung haben Infektionen, die durch in den Körper eingebrachtes Fremdmaterial verursacht werden. *S. aureus* ist in der Lage, an der Grenzfläche zu Plastikfremdkörpern wie Kathetern, Shunts oder künstlichen Herzklappen, Biofilme zu bilden. Diese bestehen aus extrazellulären polymeren Kohlenhydraten, die von den Bakterien sezerniert werden. Darin eingebettet sind sie geschützt vor der Immunantwort des Wirts sowie vor antimikrobiellen Substanzen. Hiervon ausgehend kann es wieder zu

einer Metastasierung sowie zu einer Bakteriämie und in der Folge zu einer Sepsis kommen [11].

### **Toxinvermittelte *S. aureus*-Erkrankungen**

Darüber hinaus ist *S. aureus* auch Erreger zahlreicher Toxikosen. Hierbei verursachen die von *S. aureus* sezernierten Toxine den Ausbruch der Erkrankung.

Durch Toxic shock syndrom toxin-1 (TSST-1) wird das toxische Schocksyndrom ausgelöst. TSST-1 fungiert als Superantigen und führt so zu einer fulminanten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und einer Aktivierung von T-Lymphozyten. Die Erkrankung betrifft überwiegend junge Frauen während der Menstruation und verläuft foudroyant mit Fieber, Hypotension, einem generalisierten Hautausschlag und kann verschiedene Organsysteme miteinbeziehen. Im Verlauf kann es zum Multiorganversagen kommen, in circa 3,5 % der Fälle endet die Erkrankung letal [12].

Staphylokokken-Enterotoxine (SEs) sind eine der häufigsten Verursacher von Lebensmittelvergiftungen. SEs weisen eine hohe Stabilität gegenüber Hitze auf, besitzen Resistenzen gegen proteolytische Enzyme im Gastrointestinaltrakt und können ebenfalls als Superantigene fungieren [13]. Der Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln führt typischerweise nach einer sehr kurzen Inkubationszeit von wenigen Stunden zu Übelkeit, Erbrechen, abdominellen Krämpfen und Diarrhoe. In der Regel sind die Symptome selbstlimitierend [14].

Exfoliativtoxine (ETs) sind Verursacher des Staphylococcal scaled skin syndrome (SSSS). Durch Spaltung von Desmoglein-1 in der Epidermis werden Desmosomen geschädigt, wodurch es zu einem Verlust der Keratinozytenadhärenz im Stratum granulosum der Epidermis kommt. Die Erkrankung betrifft in erster Linie Säuglinge und Kinder und kann von einer harmlosen lokalisierten, gut therapierbaren Blasenbildung bis hin zu einer großflächigen lebensbedrohlichen Epidermolysen mit massivem Flüssigkeits- und Elektrolytverlust reichen [15].

### **1.1.3 Therapie von *Staphylococcus aureus*-Infektionen und Resistenzproblematik**

In der Behandlung von *S. aureus*-Infektionen kommt neben der Fokussanierung (z. B. Abszessdrainage, Entfernung von infizierten Kathetern, operative Beseitigung von Herzklappenvegetationen [16]) und symptomatischen Maßnahmen (z. B. Rehydrierung bei einer Lebensmittelvergiftung) der antibiotischen Therapie die größte Bedeutung zu. Die Entstehung zahlreicher neuer Resistenzen hat die Therapie in den letzten Jahrzehnten deutlich erschwert. Grund hierfür ist die große genomische Plastizität von *S. aureus*, die sich in zahlreichen mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden, Phagen, Transposons oder Pathogenitätsinseln widerspiegelt und so den

horizontalen Gentransfer zwischen verschiedenen Stämmen und Spezies ermöglicht [17, 18]. Schon ein Jahr nach der Einführung von Penicillin wurden 1944 erste Resistenzen durch Penicillinase-bildende Staphylokokken beschrieben, die mit Hilfe von Plasmid-kodierten Penicillinasen in der Lage sind, den  $\beta$ -Laktam-Ring von Penicillin zu hydrolysieren [19, 20]. Bereits 1980 wiesen über 80 % sowohl der nosokomial als auch der ambulant erworbenen *S. aureus*-Stämme eine Penicillinresistenz auf [21]. Anfang der 1960er Jahre wurde das Penicillinase-feste Methicillin eingeführt, dessen therapeutische Erfolge allerdings ebenfalls schnell durch das Auftreten von resistenten Stämmen eingeschränkt wurden. Als Auslöser der Resistenz konnte das Gen *mecA* ausfindig gemacht werden, welches sich auf dem mobilen genetischen Element SCCmec (SCC = staphylococcal cassette chromosome) befindet und für das Penicillin-bindende Protein 2a (PBP2a), eine modifizierte Transpeptidase, kodiert [22]. PBP2a besitzt nur eine geringe Affinität zu  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und behindert so die Penicillin-vermittelte Hemmung der Zellwandsynthese [23]. Der sogenannte Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) weist eine Resistenz gegenüber allen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme, Monobactame) auf und besitzt darüber hinaus häufig noch weitere Plasmide und Transposons, die für Resistenzen kodieren. So weisen über 90 % der mitteleuropäischen MRSA-Stämme eine Resistenz gegen Fluorchinolone, 72 % eine Resistenz gegen Erythromycin und 66 % eine Clindamycin-Resistenz auf [24].

Während MRSA-Infektionen in den Jahrzehnten nach der Einführung von Methicillin vor allem nosokomial erworben wurden (das heißt 48 Stunden nach Aufnahme in ein Krankenhaus; HA-MRSA = hospital acquired MRSA), treten seit Ende der 1990er Jahre vermehrt auch ambulant erworbene MRSA-Infektionen (CA-MRSA = community acquired MRSA) auf [25]. Heute stellen MRSA-Infektionen eine enorme Gesundheitsbedrohung und eine immense finanzielle Last für öffentliche Gesundheitssysteme dar. So lag 2010 die Rate an MRSA in Blutkulturisolaten in Deutschland bei 20,8 %. Andere EU-Länder wie Portugal weisen mit Prävalenzen von über 50 % noch deutlich höhere Zahlen auf; die Niederlande, Norwegen und Schweden hingegen zeigen Prävalenzen im niedrigen einstelligen Bereich [26]. Alleine in der EU kommt es jährlich durch MRSA-Infektionen zu einer Millionen zusätzlichen Krankenhaustagen [27].

Die Gefahr von MRSA liegt in den limitierten therapeutischen Möglichkeiten.  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sind wegen ihrer Potenz und ihres günstigen Nebenwirkungsprofils (geringe Nephrotoxizität) noch immer Therapeutika der ersten Wahl [16, 20]. Aufgrund der hohen Inzidenz an MRSA wird jedoch zunehmend auf



Reservetherapeutika wie das Glykopeptid Vancomycin zurückgegriffen. Leider konnten auch hier infolge des vermehrten Gebrauchs bereits Klone mit dem *vanA*-Gen, das für eine herabgesetzte Suszeptibilität kodiert, selektioniert werden [28]. Neben Vancomycin kommen Linezolid, Daptomycin und Tigecycline zum Einsatz. Auch hier wurde bereits über einzelne Resistenzentwicklungen berichtet, sodass die therapeutischen Möglichkeiten immer weiter eingeschränkt werden [29–31].

Eine mögliche Option für die Zukunft könnte eine Impfung gegen *S. aureus* oder eine gezielte Therapie gegen bestimmte Virulenzfaktoren darstellen. Die bislang durchgeführten klinischen Studien führten leider noch nicht zum erhofften Durchbruch. *S. aureus* verfügt als Kommensale und sehr häufiges Humanpathogen über zahlreiche Mechanismen, die Immunantwort zu umgehen. Zudem gibt es eine extrem große Bandbreite an Pathogenitätsfaktoren, von denen kein einzelner als allein ursächlich identifiziert werden konnte. Deshalb ist bislang noch völlig unklar, welche Immunantwort getriggert werden muss, um einen suffizienten Schutz vor *S. aureus*-Infektionen zu bewirken [32–34]. Bis dahin verbleiben die Verbesserung von Surveillance-Systemen und hygienischen Maßnahmen sowie die Entwicklung weiterer antimikrobieller Substanzen, um die voranschreitende *S. aureus*-Endemie zu begrenzen.

### **1.2 Endovaskuläre *Staphylococcus aureus*-Infektionen – klinische Bedeutung**

Eine besondere Bedeutung kommt *S. aureus*-Infektionen zu, bei denen der Erreger Zugang zum Blutssystem gewinnt und eine Bakteriämie auslöst. *S. aureus* zählt mit rund 20 % weltweit zu den häufigsten Auslösern sowohl einer nosokomial als auch einer ambulant erworbenen Bakteriämie [35, 36]. Die hierdurch verursachte Letalität wird in der Literatur mit 13 bis 40 % angegeben [16, 37, 38].

Zu den am meisten gefürchteten Komplikationen der Bakteriämie zählt die Sepsis. Im Zentrum der Pathogenese steht eine Schädigung des Endothels, im Rahmen derer es zu einer vaskulären Dysfunktion mit erhöhter kapillärer Durchlässigkeit, gestörter Mikrozirkulation, verminderter Perfusion und Gewebshypoxie kommt [39]. Klinisch zeigt sich eine schwere Symptomatik mit Fieber, Hypotension, Tachykardie und Tachypnoe bis hin zu metabolischer Entgleisung, Verbrauchskoagulopathie, Multiorganversagen, Schock und Tod [40]. Bei Patienten, die in Folge der Bakteriämie einen septischen Schock entwickeln, kommt es in 38 bis 86 % der Fälle zu einem tödlichen Ausgang [38].

Weitere Komplikationen können dadurch entstehen, dass *S. aureus* die Blutgefäße wieder verlässt und so metastatische Infektionen in anderen Geweben entstehen. Ein besonders dramatisches Beispiel hierfür ist die infektiöse Endokarditis. Auch hier ist

*S. aureus* je nach Risikogruppe mit 20 bis 68 % einer der häufigsten Verursacher [41-43]. Insbesondere *S. aureus*-Endokarditiden nehmen häufig auch bei vorher gesunden Patienten einen fulminanten und rasch lebensbedrohlichen Verlauf (Krankenhausletalität: 34 % vs. 10 % bei anderen Erregern, 3-Jahres-Überlebenszeit: 47 vs. 68 %) [44]. Klinisch wegweisend sind ein neu aufgetretenes Herzgeräusch sowie Fieber und ein allgemeines Krankheitsgefühl. Eines der wichtigsten diagnostischen Kriterien stellen Vegetationen an den Herzklappen dar [45]. Im Verlauf kann es zu septischen Embolien, z. B. im ZNS (Amaurosis fugax, Apoplex, Herdenzephalitis) oder der Niere (Niereninsuffizienz) kommen. Durch embolische und vaskulitische Herde in der Haut kommt es hier zu typischen klinischen Zeichen wie Petechien, subungualen Splinter-Hämorrhagien, Osler-Knötchen und Janeway-Läsionen [40, 45].

Ein besonders hohes Risiko für eine Endokarditis haben Menschen mit prädisponierenden Herzerkrankungen wie beispielsweise degenerativen Klappenerkrankungen, Mitralklappenprolaps, kongenitalen Herzerkrankungen oder rheumatischem Fieber. Die Vorschädigung des Herzklappenendothels begünstigt die Adhärenz von im Blutstrom zirkulierenden Erregern und eine nachfolgende Infektion der Gefäßwand. Eine weitere große Risikogruppe stellen Patienten mit künstlichen Herzklappen dar, da hier neben der Endothelschädigung das implantierte Fremdmaterial die Adhärenz begünstigt [41, 43, 46].

Im Gegensatz zu anderen Endokarditis-Erregern ist insbesondere *S. aureus* in der Lage, auch bei intakten Endothelverhältnissen eine Endokarditis auszulösen [44, 47, 48]. Der Anteil an Endokarditiden ohne zugrunde liegende Herzerkrankung hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Dies ist teilweise durch den vermehrten i.v.-Drogenabusus und die damit einhergehende Injektion von großen Erregermengen zu erklären [41]. Allerdings wird das Vorkommen von Endokarditiden, denen weder eine Herzerkrankung noch ein i.v.-Drogenabusus zugrunde liegt, mit 18 bis 41 % angegeben [47, 49–53]. Der zunehmende Gebrauch von intravaskulären Kathetern sowie die steigende Anzahl vorbestehender Grunderkrankungen wie hämodialysepflichtige Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus oder maligne Erkrankungen scheinen hier eine Rolle zu spielen [41, 50, 54].

Unbehandelt endet eine Endokarditis immer letal [40]. Trotz vieler therapeutischer Fortschritte stagniert die Inzidenz und Mortalität von Endokarditiden seit einigen Jahrzehnten. Als Grund hierfür wird hauptsächlich die veränderte Epidemiologie mit einem vermehrten Auftreten des Erregers *S. aureus* genannt, da dieser durch zahlreiche Virulenzfaktoren zu fulminanten Verläufen führt und durch die Resistenzentwicklungen der letzten Jahre oft schwer therapierbar ist [46, 55, 56].

Neben einer Endokarditis können durch den Austritt von *S. aureus* aus dem Blutkreislauf zahlreiche weitere sekundäre Infektionsfoki wie Abszesse innerer Organe, septische Arthritiden oder Osteomyelitiden entstehen [57].

Endovaskulären *S. aureus*-Infektionen kommt also aufgrund ihrer hohen Mortalität eine besondere Bedeutung zu. Oft kommt es trotz adäquater antibiotischer Therapie zum Persistieren der Infektion und zu Rezidiven [4]. Ursachen hierfür sind die effiziente Immunevasion von *S. aureus* durch zahlreiche Virulenzfaktoren [58] sowie die zunehmende Resistenzentwicklung gegen gängige Antibiotika. Im Kern der Pathogenese steht eine komplexe Interaktion zwischen *S. aureus* und Endothelzellen (siehe 1.4). Diese besser zu verstehen könnte helfen, zukünftig neue therapeutische Ansätze zu entwickeln.

### 1.3 Die Endothelbarriere

Das Endothel besteht aus einem Monolayer von platten polygonalen Zellen, die das komplette vaskuläre System und das Herz von innen auskleiden. An ihrer basolateralen Seite sind diese an der Basallamina angeheftet und haben Kontakt zur Extrazellulärmatrix (EZM) [59]. Während man früher annahm, dass die Hauptfunktion des Endothels darin lag, eine nicht-thrombogene Oberfläche zu schaffen, weiß man heute, dass es darüber hinaus eine Vielzahl von metabolischen Funktionen und Syntheseleistungen übernimmt und eine entscheidende Diffusionsbarriere darstellt [59, 60]. Das Endothel reguliert über myoendotheliale Kontakte mit der Tunica media (glatte Muskelschicht) und die Synthese von vasoaktiven Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) den Vasotonus; es kontrolliert die Koagulation durch Sekretion verschiedener Substanzen wie Prostacyclin (Hemmung der Thrombozytenaggregation) oder von-Willebrand-Faktor (Förderung der Thrombozytenaggregation); außerdem ist es an der Regulation der Angiogenese beteiligt und spielt bei inflammatorischen Prozessen eine wesentliche Rolle, indem es unter anderem die Leukodiapedese aktiviert [59].

Darüber hinaus trennt das Endothel den Intravasalraum von der EZM und anderen Geweben – ein entscheidender Mechanismus, um das Austreten von Erregern aus dem Blutstrom zu verhindern. Eine gestörte Mikrozirkulation gilt bei endovaskulären Infektionen wie der Sepsis als maßgeblich an der Pathogenese beteiligt und als ursächlich für schwere Komplikationen wie Organdysfunktionen und Schock [39, 61, 62]. Auch in der Pathogenese der Endokarditis und in der Entstehung metastatischer Infektionen ist eine Schädigung des Endothels ein entscheidender Faktor [41]. Die Barrierefunktion des Endothels beruht auf einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Mechanismen. Erstens scheint eine Interaktion zwischen intramuralen

Zellen wie Perizyten, glatten Muskelzellen und Makrophagen mit Endothelzellen für die Aufrechterhaltung einer Diffusionsbarriere elementar zu sein. Insbesondere Perizyten können über eine Veränderung der endothelialen Genexpression und eine Regulation des transendothelialen Transports die Diffusionsbarriere stabilisieren [63-65]. Ein zweiter wichtiger Mechanismus ist der transzelluläre Transport. Durch Caveolae (winzige Invaginationen der Plasmamembran), vesikulo-vakuoläre Organellen und transzelluläre Kanäle wird die Transzytose vom apikalen zum basalen Zellpol reguliert [63]. Die dritte ausschlaggebende Komponente ist die Restriktion des parazellulären Transports. Hier spielt die Integrität von interendothelialen Junctionen und Zell-Matrix-Kontakten die ausschlaggebende Rolle (siehe 1.3.1).

### 1.3.1 Parazelluläre Permeabilität

Adhärens-Kontakte, Tight Junctions und fokale Adhäsionen sind elementar für die Regulation der parazellulären Permeabilität [66]. Je nach Organ finden sich große Unterschiede in der Kapillarpermeabilität. Im Gehirn wird unter anderem durch die vermehrte Expression von Tight Junctions eine dichte Blut-Hirn-Schranke aufrechterhalten [67], in anderen Organen wie der Leber wiederum wird durch eine andere Architektur der Adhärens und Tight Junctions eine erhöhte Durchlässigkeit zugelassen [68].

Integraler Bestandteil von Adhärens-Verbindungen sind transmembranäre Glykoproteine aus der Familie der Cadherine ( $\text{Ca}^{2+}$ -dependent adhesion molecules). VE-Cadherin ist darunter das einzige Endothel-spezifische Cadherin und findet sich in allen Endothelarten [69]. Cadherine gehen mit ihrer extrazellulären Domäne homophile Verbindungen mit Cadherinen anderer Endothelzellen ein, mit ihrem zytoplasmatischen Ende können sie an  $\beta$ -Catenin and Plakoglobin binden. Diese Signalproteine wiederum stellen über die Ankerproteine  $\alpha$ -Catenin,  $\alpha$ -Actinin und Vinculin eine Verbindung zum Aktin-Zytoskelett her – eine Verankerung, die für die dauerhafte Integrität von Adhärens Junctions unabdingbar ist [70, 71]. Weiter proximal an der zytoplasmatischen Domäne von Cadherinen bindet p120. Dieses Protein spielt eine komplexe Rolle in der Regulation von Adhärens Junctions und führt unter anderem zu einer Stabilisierung von Cadherinen in der Plasmamembran [72]. Auch ZO-1, das klassischerweise als zytoplasmatischer Bestandteil von Tight Junctions gilt, kolokalisiert in frühen Organisationsschritten über  $\alpha$ -Catenin mit Adhärens-Verbindungen [73].

Die Transmembranproteine in Tight Junctions gehören zur Familie der Occludine [74] oder Claudine [75]. JAM (Junction adhesion molecules) sind ebenfalls Transmembranproteine, die mit Tight Junctions kolokalisieren und an der Regulation deren Durchlässigkeit beteiligt sind [76, 77]. Mit ihrem intrazellulären C-terminalen Ende

binden Occludin und Claudin an zahlreiche zytoplasmatische Signalmoleküle, unter anderem an ZO-(Zonula occludens)-Proteine [78]. Über ZO (1-3) erfolgt eine Verankerung der Tight Junctions am Aktin-Zytoskelett, außerdem sind ZO-Proteine an der intrazellulären Signaltransduktion und Genregulation beteiligt.

Über fokale Adhäsionen sind Endothelzellen in der EZM verankert. Integrale Komponente von fokalen Adhäsionen sind Integrine – Transmembranproteine, die mit ihrer extrazellulären Seite an Bestandteile der EZM wie Kollagen, Fibronectin, Vitronectin, Laminin oder Thrombospondin binden [79]. Auf intrazellulärer Seite interagieren sie über verschiedene Signalmoleküle ( $\alpha$ -Actinin, Vinculin, Talin, Tensin, Paxillin) mit dem Zytoskelett [80]. Integrine sind heterodimere Rezeptoren, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen und keine Enzymaktivität besitzen [81]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der Integrin-Verankerung an der EZM zu einer endothelialen Hyperpermeabilität führt [82].

### 1.3.2 Regulation der Endothelpermeabilität

In der Regulation der parazellulären Permeabilität durch Adhärens-Verbindungen, Tight Junctions und fokale Adhäsionen spielen Phosphorylierungen durch intrazelluläre Protein-Tyrosin-Kinasen aus der Src-Familie (im Folgenden Src-Kinasen genannt) eine zentrale Rolle [83]. Die Src-Familie beinhaltet mittlerweile neun verschiedene Proteine, wobei c-Src, Fyn und Yes ubiquitär vorkommen [84]. Durch die Phosphorylierung von Tyrosinresten sind Src-Kinasen in der Signaltransduktion zahlreicher Signalwege beteiligt [85].

So kann beispielsweise durch eine Src-vermittelte Phosphorylierung von VE-Cadherin an den Tyrosinresten Tyr-658 und Tyr-731 die Bindung von  $\beta$ -Catenin und p120 verhindert werden. Dies resultiert in einer erhöhten Permeabilität [86]. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass in venösen Gefäßen die Phosphorylierung von VE-Cadherin an den Tyrosinresten Tyr-658 und Tyr-685 durch Src-Kinasen im Zusammenspiel mit Zytokinen wie Bradykinin die endotheliale Durchlässigkeit erhöht [87]. Als weiterer Mechanismus zur Erhöhung der parazellulären Permeabilität konnte die  $\beta$ -Arrestin-abhängige Endozytose von VE-Cadherin identifiziert werden. Entscheidend ist hier die Rekrutierung von Src-Kinasen durch vascular endothelial growth factor (VEGF) [88]. Src-Kinasen sind ebenfalls elementar für die VEGF-vermittelte Spaltung von VE-Cadherin-VEGFR2 (VEGF-Rezeptor)- $\beta$ -Catenin-Komplexen. Durch eine Src-Aktivierung kommt es zu einer raschen Dissoziation dieser präformierten Komplexe und einem Anstieg der transendothelialen Permeabilität [89]. Auch für ZO-1 und Occludin konnte gezeigt werden, dass VEGF über eine Src-Rekrutierung zu einer Auflösung von Tight Junctions führt [90]. Eine Occludin-

Phosphorylierung durch c-Src bewirkt außerdem eine Abnahme der Kolokalisation von ZO-1 mit Occludin und eine Destabilisierung von Tight Junctions [91, 92].

In der Regulation von fokalen Adhäsionen spielt die fokale Adhäsionskinase (FAK, focal adhesion kinase) eine herausragende Rolle. Diese bewirkt wiederum ebenfalls eine Aktivierung von Src-Kinasen [80]. So wird beispielsweise ein VEGF-vermittelter Permeabilitätsanstieg auch durch die Kolokalisation von FAK und  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin vermittelt und ist in Src-defizienten Mäusen nicht mehr nachweisbar [93].

Die Relevanz von Src-Kinasen wird dadurch unterstrichen, dass in verschiedenen *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten gezeigt werden konnte, dass Src-Kinase-Inhibitoren zu einer Abnahme der erhöhten endothelialen Permeabilität führen [94, 95].

### 1.4 Pathogenese von endovaskulären *Staphylococcus aureus*-Infektionen

Die Pathogenese von endovaskulären Infektionen erfolgt in mehreren Schritten [48]:

- 1) Adhärenz von *S. aureus* an Endothelzellen
- 2) Thrombusformation, Persistenz auf der endothelialen Oberfläche und lokale Gewebszerstörung
- 3) Invasion, Extravasation und Dissemination in andere Gewebe

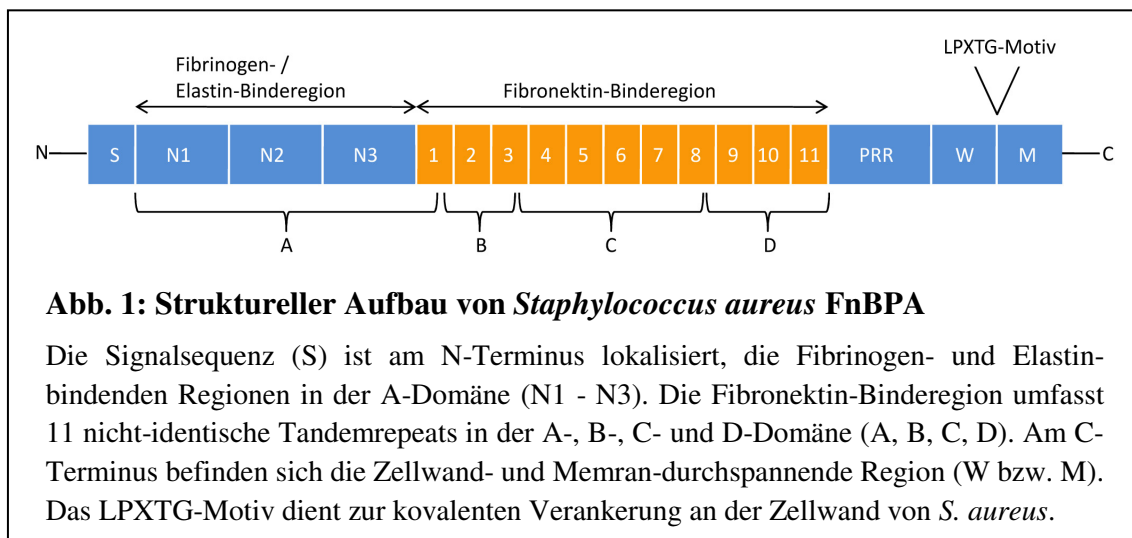
#### 1.4.1 Adhärenz

Der initiale Schritt in der Entstehung von metastatischen Infektionen aus einer Bakteriämie ist die Adhärenz von *S. aureus* an Endothelzellen. Die Adhäsion von *S. aureus* an Endothelzellen, Plasmaproteine und Bestandteile der EZM wird durch zahlreiche Adhäsine vermittelt. Diese lassen sich unterteilen in zellwandständige (MSCRAMM, microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) und lösliche Adhäsine (SERAM, secretable expanded repertoire adhesive molecules), die nach deren Sekretion nicht kovalent an die Bakterienoberfläche binden [96]. Tab. 1 gibt eine Übersicht über *S. aureus*-Virulenzfaktoren, die bei der Adhärenz an Endothelzellen eine Rolle spielen.

Tab. 1: *S. aureus*-Adhäsine mit Relevanz für die Adhärenz an Endothelzellen

<i>S. aureus</i> -Adhäsine	Ligand	Funktionen	Quellen
<b>MSCRAMMs</b>			
Fibronektin-Bindproteine A / B (FnBPA / FnBPB)	Fibronektin, Fibrinogen, Elastin	Adhärenz, Inflammation, Invasion, Thrombozytenaggregation, T-Zell-Aktivierung / -Adhärenz, Biofilmbildung	[97–104]
Clumpingfaktor A / B (ClfA / ClfB)	Fibrinogen, Fibrin, Zytokeratin (ClfB)	Adhärenz, Thrombozytenaggregation	[105–107]
Protein A (SpA)	Von-Willebrand-Faktor (vWF), Immunglobulin, TNFR-1	Adhärenz, Schutz vor Phagozytose, Inflammation	[58, 108-110]
Iron-regulated surface determinant (Isd)	Fibrinogen, Fibronektin, Transferrin, Häm	Adhärenz unter Eisenmangelbedingungen (IsdA)	[111–113]
Plasmin sensitive protein (PI)	unbekannt	Je nach Bedingung antiadhäsiv / -invasiv oder adhäsiv, (nur in MRSA)	[96, 114-118]
<b>SERAMs</b>			
Extracellular adherence protein (Eap)	Fibronektin, Fibrinogen, Vitronektin, Kollagen, Prothrombin, ICAM-1	Adhärenz, Invasion, antiinflammatorisch, antiphagozytotisch, immunmodulatorisch	[96, 119-122]
Extracellular matrix protein-binding protein (Emp)	Fibrinogen, Fibronektin, Vitronektin, Kollagen	Adhärenz	[123]
<b>Zellwandbestandteile</b>			
Wandteichonsäure (WTA)		Adhärenz, Inflammation	[124, 125]
Lipoteichonsäure (LTA)		Möglicherweise Bindestruktur für SERAMs	[96]

Von elementarer Bedeutung ist die Bindung von Fibronektin-Bindeproteinen (FnBPs) an das Plasma- und Extrazellulärmatrixprotein Fibronektin. FnBPs besitzen am C-terminalen Ende eine *S. aureus*-bindende Domäne [126] und sind über ein LPXTG- (Leu-Pro-X-Thr-Gly)-Motiv kovalent in dessen Zellwand verankert [127]. Die D-Domäne mit dreieinhalb Tandemrepeats sowie ein weiteres Repeat in der C-Domäne ( $D_u$ ) gelten klassischerweise als verantwortlich für die Bindung an Fibronektin. Mittlerweile weiß man jedoch, dass für FnBPA darüber hinaus noch Motive aus der A- und B-Domäne in die Fibronektinbindung involviert sind. Deshalb wird postuliert, dass für FnBPA eine Sequenz aus elf nicht-identischen Tandemrepeats zur Fibronektin-bindenden Domäne gehört [96, 128]. Die Gene für FnBPA und FnBPB (*fnbA* bzw. *fnbB*) sind vermutlich durch Genduplikation entstanden [96], was sich in deren großen Homologie, insbesondere in den Fibronektin-bindenden Regionen, widerspiegelt [129]. Neben Fibronektin können FnBPs außerdem noch Fibrinogen und Elastin binden [97, 98].



Abgesehen von ihrer Funktion als Adhäsion sind FnBPs in der Lage, in Endothelzellen eine proinflammatorische Reaktion mit einer Aktivierung der Leukozyten-Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) und VCAM-1 (vascular adhesion molecule 1) und einer vermehrten Ausschüttung der Zytokine Interleukin 6 und 8 zu induzieren [130]. Außerdem können sie die Invasion in Wirtszellen triggern [99]. Gerade dieser Eigenschaft kommt eine herausragende Bedeutung in der Pathogenese invasiver Infektionen zu (siehe 1.4.3). Darüber hinaus interagieren FnBPs mit Thrombozyten und stimulieren deren Aggregation, vermitteln kostimulatorische Signale in der Aktivierung und Adhärenz von T-Lymphozyten [101] und sind an der Bildung von Biofilmen beteiligt [102].



Die Tatsache, dass nahezu alle klinischen Isolate mindestens ein *fnb*-Gen exprimieren, unterstreicht deren klinische Relevanz [96, 131, 132]. In einem *in vivo*-Endokarditis-Modell hat sich gezeigt, dass die Bindung an Fibronektin und Fibrinogen durch FnBPs und ClfA entscheidend für die Besiedlung von Herzklappen ist, und FnBPs für die Invasion und dauerhafte Persistenz im Herzklappenendothel verantwortlich sind. So war die Expression von FnBPs mit schwereren klinischen Verläufen und Sepsis assoziiert [133]. In einem septische Arthritis-Modell führten FnBPs zu systemischer Inflammation und erhöhter Mortalität [133]. Die Fähigkeit von *S. aureus*, das Gefäßsystem zu verlassen, zeigt ebenfalls eine Verbindung zu FnBPs: Metastatische Absiedlungen in die Niere in einem murinen Bakteriämie-Modell zeigten eine Assoziation zu FnBPs [134], genauso wie eine Dissemination in die Milz in einem weiteren Endokarditis-Modell [135].

ClfA, ebenfalls ein in der Zellwand verankertes Adhäsion, kann an Fibrinogen und Fibrin binden und führt in Fibrinogen-Lösung zu einer Verklumpung [105, 106]. Über eine Interaktion mit dem Glykoprotein GPIIb/IIIa auf der Oberfläche von Thrombozyten kann ClfA eine Thrombozytenaggregation induzieren und ist somit wichtig bei der Thrombusformation an der Endotheloberfläche [136, 137]. ClfA scheint ebenfalls von großer klinischer Relevanz zu sein und findet sich in bis zu 100 % der invasiven Stämme [138]. Aus tierexperimentellen Untersuchungen lässt sich eine wichtige Rolle bei der Entstehung der septischen Arthritis (Zunahme von Schwere und Häufigkeit) sowie der infektiösen Endokarditis (Kolonisierung des Klappenendothels) ableiten [133, 139, 140]. Im Gegensatz zu FnBPs ist ClfA alleine aber nicht suffizient, um eine dauerhafte Persistenz des Erregers oder eine Invasion in Endothelzellen zu gewährleisten [130, 139].

Interessanterweise ist *S. aureus* auch in der Lage, an intaktes Endothel zu adhären. Während für viele Erreger zum Beispiel für die Entstehung einer Endokarditis eine endotheliale Vorschädigung postuliert wird [41], scheint dies für *S. aureus* nicht zwingend notwendig zu sein. In einem *in vivo*-Modell konnte demonstriert werden, dass *S. aureus* FnBP-abhängig an intaktes Endothel adhärert [141]. Es konnte außerdem elektronenmikroskopisch gezeigt werden, dass *in vitro* die Infektion von intaktem Endothel mit *S. aureus* zu einer initialen Schädigung führt und es erst in der Folge zur Adhärenz kommt [142]. Diese Fähigkeit erklärt möglicherweise, dass *S. aureus* im Gegensatz zu anderen Erregern auch bei Patienten ohne vorangehende Endothelschädigung schwere endovaskuläre Infektionen wie eine Endokarditis auslösen kann.

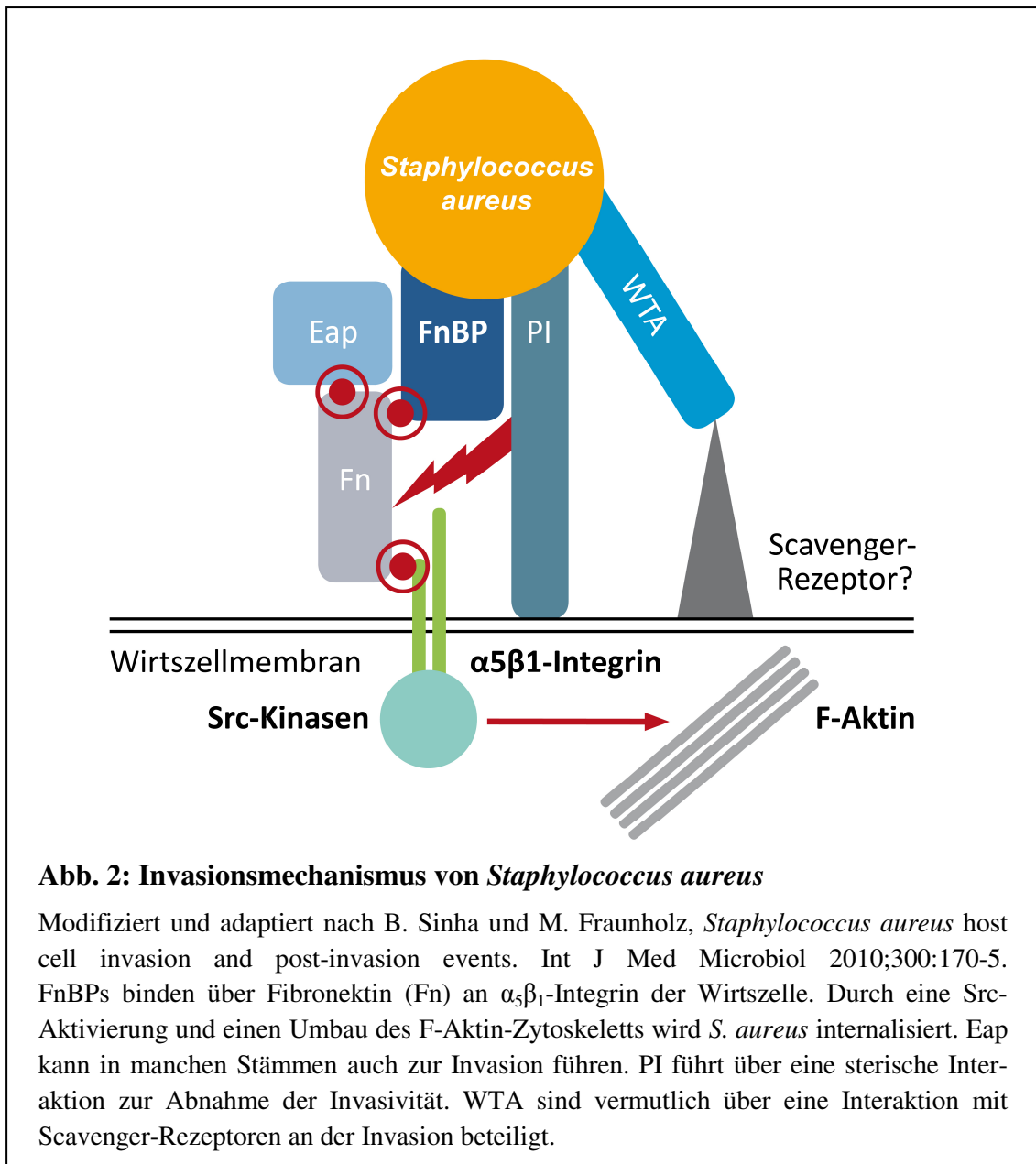
### **1.4.2 Thrombusformation, Persistenz auf der endothelialen Oberfläche und lokale Gewebeerstörung**

Eine wichtige Voraussetzung für die dauerhafte Adhärenz und Etablierung der intravaskulären Infektion ist die Aggregation von Thrombozyten und die Aktivierung der Gerinnungskaskade. Die prokoagulatorischen Eigenschaften von FnBPs, ClfA und ClfB [100, 130, 137, 143–145] sowie die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin durch die Sekretion der Prothrombinaktivatoren Von-Willebrand-Faktor-Bindeprotein (vWbp) und Staphylokoagulase (Coa) führen zur Thrombusformation [146, 147]. Innerhalb des Thrombus kommt es zur lokalen Ausbreitung und zur Schädigung des Endothels. Hierbei spielen bakterielle Proteasen und zytolytische Toxine sowie die inflammatorische Reaktion des Endothels eine Rolle. Im Verlauf werden weitere Extrazellulärmatrixproteine freigelegt, was wiederum die Adhärenz von neuen Erregern und somit die Persistenz der Infektion forciert [57, 148]. Eingebettet in ein Fibrinnetzwerk kann *S. aureus* damit erfolgreich der Immunantwort des Wirts entgehen, die Infektion vorantreiben und weitere thrombembolische Infektionsherde etablieren [149–151].

### **1.4.3 Invasion, Extravasation und Dissemination in andere Gewebe**

Der Progress von einer primären Adhärenz und Thrombusformation bis hin zur manifesten Sekundärinfektion erfordert den Austritt von *S. aureus* aus der Blutbahn und die Dissemination in andere Gewebe [57]. Ein möglicher relevanter Mechanismus könnte die Invasion in Endothelzellen darstellen. *S. aureus* zählt klassischerweise zu den extrazellulären Pathogenen. Die Tatsache, dass der Erreger bevorzugt endovaskuläre Infektionen hervorruft, schnell zu sekundären Infektionsmanifestationen führt und oft auch durch adäquate antibiotische Therapie nicht zufriedenstellend therapierbar ist, hat zu der Annahme geführt, dass hierfür die Invasion entscheidend ist [152].

Auf molekularer Ebene liegt der Invasion ein modifizierter Reißverschlussmechanismus, sogenannter „Zipper“-Mechanismus, zugrunde: FnBPs binden über Fibronectin an  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine [153]. In Versuchen mit heterolog exprimierten FnBPs in den apathogenen Spezies *Staphylococcus carnosus* (TM300) und *Lactococcus lactis* sowie mit FnBP-beschichteten Polystyrenkugeln konnte gezeigt werden, dass außer FnBPs keine weiteren Kofaktoren für die Invasion notwendig sind [99]. Neben FnBPs kann Eap eine FnBP-unabhängige Invasion bewirken und hat vermutlich eine kompensatorische Funktion in FnBP-defizienten Stämmen [122, 154, 155]. Auch die Zellwandbestandteile WTA und LTA scheinen an der Invasion beteiligt zu sein [125, 156]. ClfA, Spa und Coa besitzen keine invasiven Eigenschaften [153] und PIs führen über eine sterische Interaktion sogar zur Abnahme der Invasivität [115].



Durch die Bindung von Fibronectin an  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin kommt es zu einer intrazellulären Signalkaskade, an deren Ende eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts steht. In der Signaltransduktion spielen Src-Kinasen eine besondere Rolle. So bewirkten Src-Kinase-Inhibitoren in Invasionsexperimenten eine Abnahme der Invasivität. Der gleiche Effekt zeigte sich in Versuchen mit Src-defizienten Fibroblasten. Außerdem konnte ein signifikanter Anstieg der Src-Aktivität nach einer Infektion mit *S. aureus*, nicht aber nach einer Infektion mit *S. carnosus*, gemessen werden. Durch eine Kooperation von Src-Kinasen mit FAK kommt es zur Tyrosinphosphorylierung des Aktin-assoziierten Signalproteins Cortactin und zu einer Reorganisation der Aktinzytoskeletts, welche letztendlich die Internalisation von *S. aureus* triggert [157–160].

Die Fähigkeit von *S. aureus* zur Invasion und intrazellulären Persistenz konnte *in vitro* für Endothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten, Osteoblasten, Keratinozyten, Makrophagen und Neutrophile belegt werden [161]. Die pathogenetische Relevanz ist jedoch noch Gegenstand von Diskussionen. Einerseits kann man die Internalisierung als Form der Immunevasion und als Schutz vor nicht zellwandgängigen Antibiotika interpretieren. Auf der anderen Seite könnte die Invasion auch als Schutzmechanismus des Wirtsorganismus gesehen werden, bei der Fibronektin als Opsonin und  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine als Phagozytose-Rezeptoren fungieren [162]. Die Tatsache, dass in fast allen klinischen Isolaten Invasivität eine hoch konservierte Eigenschaft ist und zumindest ein *fnb*-Gen exprimiert wird, legt jedoch eine Relevanz für die Pathogenese von *S. aureus*-Infektionen nahe [96, 131, 132, 153]. Insbesondere für endovaskuläre Infektionen konnte dies in verschiedenen *in vivo*-Modellen bestätigt werden. In einem murinen Sepsis-Modell konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der FnBPA-vermittelten Invasion und der Dissemination von *S. aureus* in die Nieren aufgezeigt werden [134]. Ein Ratten-Endokarditis-Modell belegte, dass die FnBP-vermittelte Invasion in Endothelzellen zur Persistenz der Erkrankung und zu einer Streuung in die Milz führt [139]. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass die Invasion entscheidend für die Transzytose von *S. aureus* durch die Endothelbarriere und die Invasion in andere Gewebe ist. Während Transzytose bei anderen Pathogenen wie *Streptococcus pneumoniae* schon lange ein bekannter Mechanismus der Extravasation ist, konnte dies bislang für *S. aureus* nicht demonstriert werden [57, 163]. Grund hierfür ist unter anderem, dass noch nicht abschließend geklärt ist, was nach der Internalisierung von *S. aureus* passiert. In einigen Fällen kommt es zur intrazellulären Persistenz und sogar zur Vermehrung von *S. aureus* in Phagosomen oder im Zytoplasma, zum Teil in Form von small colony variants (SCV) [164]. Die Persistenz und der Transport in professionellen Phagozyten („trojanisches Pferd“) werden sogar als möglicher Mechanismus für eine Migration durch das Endothel und eine Dissemination zu sekundären Infektionsorten diskutiert [57]. Andererseits kann die Invasion auch mit einer raschen phagosomalen Destruktion und Apoptose der Wirtszelle einhergehen [165]. Neben der Transzytose wird auch die Parazytose als möglicher Mechanismus für den Austritt aus Blutgefäßen postuliert [57]. So konnte beispielsweise für *Neisseria meningitidis* gezeigt werden, dass der Erreger das Tight Junction-Protein Occludin gezielt spaltet und so die parazelluläre Permeabilität erhöht, um möglicherweise die Bluthirnschranke zu überwinden [166]. Auch für *S. aureus* gibt es Hinweise auf eine mögliche Interaktion mit Zell-Zell-Verbindungen: *S. aureus* kann eine Herabregulierung von Tight Junctions, Adhärenzjunctionen und Desmosomen zwischen

Keratinocyten bewirken [167]. Denkbar wäre also auch eine Interaktion mit endothelialen Zell-Zell-Verbindungen.

Seit einigen Jahren ist außerdem bekannt, dass *S. aureus* über eine Gruppe von Toxinen (epidermal cell differentiation inhibitors, EDINs) sogenannte transiente Makroaperturen in Endothelzellen bilden kann. Über eine Inaktivierung der GTPase RhoA und der daraus resultierenden zytoskelettalen Veränderungen kommt es zur Entstehung von transzellulären Tunneln, durch die der Erreger auf die basolaterale Seite der Endothelbarriere gelangen kann [168].

### 1.5 Fragestellung

*S. aureus* gehört zu den häufigsten Verursachern von schweren endovaskulären Infektionen, die oft mit lebensbedrohlichen Komplikationen wie Endokarditis, Osteomyelitis oder Abszessbildung assoziiert sind [4]. Insbesondere *S. aureus* ist in der Lage, auch an primär intaktes Endothel zu adhären [141] und bei Menschen ohne bekannte endotheliale Vorschädigung schwere endovaskuläre Infektionen mit sekundären Infektionsmanifestationen in anderen Organen zu verursachen [44, 47, 48]. Unklar ist bislang jedoch, welche Mechanismen *S. aureus* nutzt, um das Gefäßsystem zu verlassen. Es ist bekannt, dass *S. aureus* über die indirekte Bindung von FnBPs an  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine Endothelzellen invadieren kann [153] und dass Invasivität eine hoch konservierte Eigenschaft in nahezu allen klinischen Isolaten ist [96, 131, 132]. Gleichzeitig konnte in verschiedenen Tiermodellen ein Zusammenhang zwischen der FnBP-vermittelten Invasion in Endothelzellen und der Dissemination des Erregers in andere Organe nachgewiesen werden [134, 139]. Dies legt nahe, dass die Überwindung der Endothelbarriere über Transzytose erfolgen könnte. Andere Studien lieferten hingegen erste Hinweise darauf, dass *S. aureus* auch mit Zell-Zell-Verbindungen interagieren kann, was die Grundlage für eine paraendotheliale Extravasation sein könnte [167, 169, 170].

In dieser Arbeit sollte die Hypothese untersucht werden, ob *S. aureus* über Interaktionen mit dem Endothel zur Schädigung der endothelialen Integrität beiträgt und so wichtige weitere Schritte in der Pathogenese wie Invasion oder Extravasation begünstigt.

Folgende Fragestellungen sollten bearbeitet werden:

- Führt die Infektion mit *S. aureus* zu Veränderungen der transendothelialen elektrischen Impedanz?
- Können Veränderungen der Integrität der Endothelbarriere durch eine erhöhte Fluoreszenz-Marker-Diffusion erfasst werden und welche Virulenzfaktoren sind hierfür verantwortlich?
- Spielen indirekte Effekte wie z. B. Zytotoxizität eine Rolle?
- Lassen sich morphologische Veränderungen in wichtigen Strukturproteinen in Zell-Zell-Verbindungen nachweisen?
- Welche Signaltransduktionsprozesse sind involviert?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Laborgeräte und Materialien

**Tab. 2: Geräte**

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe	Ilmvac
Autoklav	Fedegari
Brutschränke	Heraeus
Bunsenbrenner	schütt-biotec
Durchflusszytometer	FACScalibur, BD
Elisa-Reader	GENios, Tecan; Infinite Pro, Tecan
Feinwaage	Kern
Fluoreszenz-Mikroskop	Keyence BZ-9000
Gefrierschränke	Liebherr (-20°C), Thermo Scientific Forma (-80°C)
Kühlschrank	Liebherr
Lichtmikroskop	Olympus CKX31
Magnetrührer	Heidolph
Photometer	Hitachi
Pipetten	Sarstedt
Schüttelinkubator	Eppendorf
Schüttler	SK-Laborbedarf
Sterilbänke	Nuaire, Heraeus
Stickstofftank	K Series
Tischzentrifuge	Heraeus
Vortexer	Heidolph
Wasserbad	Memmert
xCELLigence System	Roche Applied Science und ACEA Biosciences
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0R

**Tab. 3: Material**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Ampuwa-Wasser	Fresenius KabiDeutschland GmbH
Blutagarplatten (20 ml)	bioMérieux, Nürtingen
Calciumchlorid-Lösung (0,1 M)	Merck KGaA, Darmstadt
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DAPI	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Deckgläschen (Ø 10 mm)	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-rot / weiß)	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
VECTASHIELD HardSetMounting Medium Eindeckmedium	Vectorlabs, Burlingame, CA, USA
Einwegküvetten	Sarstedt AG, Hannover AG, Hannover
ELISA-Platten (schwarz, 96 Vertiefungen)	Nunc GmbH, Wiesbaden
Erythromycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol absolute	AppliChem GmbH, Darmstadt
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
FITC-Dextran	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Formaldehyd (36,5 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Gelatine	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Genistein	Calbiochem, La Jolla, CA, USA, La Jolla, CA, USA
Glucose-Lösung (1 M)	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HEPES	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Humanes Serumalbumin (HSA)	CSL Behring GmbH, Hattersheim
Kristallviolett	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kryoröhrchen	Nunc GmbH, Wiesbaden
Lysostaphin	AMBI Products, Lawrence, NY, USA
Matrigel	BD Transduction Laboratories (San Jose, CA, USA)
Miktortiterplatten (24 / 96 Vertiefungen)	Sarstedt AG, Hannover
MitoTracker Red CMXRosLife	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Mueller-Hinton-Bouillon (MHB)	Becton Dickinson, Heidelberg
Natriumchlorid-Lösung (1 M)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumcitrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumpyruvat (0,1 M)	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld GmbH, Lauda Königshofen
Normal donkey serum (NDS)	Calbiochem, La Jolla, CA, USA



Objektträger	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Penicillin	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Dulbecco's PBS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
PP2	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
PP3	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Propidiumiodid	Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
SDS	AppliChem GmbH, Darmstadt
Staurosporin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sterile Impfösen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Streptomycin	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Tetrazyklin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Transwell-24 System	Corning, life sciences, Tewksbury MA, USA
Triton X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypanblau-Lösung (0,5 %)	Biochrom GmbH, Berlin
Trypsin-EDTA (weiß / rot)	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Zellkulturflaschen (25 / 75 m <sup>2</sup> ) (Cellstar Tissue Culture Flask)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15 / 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Z-VAD-fmk	Bachem AG, Bubendorf, CH

**Tab. 4: Antikörper**

Antikörper	Hersteller
VE-Cadherin	VE-Cadherin Goat Polyclonal Antibody (C-19), sc-6458, Santa Cruz, Biotechnology, Dallas, TX, USA
ZO-1	ZO-1 Mouse Monoclonal Antibody (ZO1-1A12), 339100, Life Technologies, Grand Island, NY, USA
Esel-anti-Ziege-IgG	Esel anti-Ziege IgG-Cy3, Dianova GmbH, Hamburg
Esel-anti-Maus-IgG	Alexa Fluor® 594 Donkey Anti-Mouse IgG, Life Technologies, Grand Island, NY, USA

### 2.2 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an der Sterilbank.

#### 2.2.1 Verwendete Zellen

Für die meisten Experimente wurden EA.hy926-Zellen verwendet [171]. Dabei handelt es sich um eine humane Endothelzelllinie, die durch Fusion von humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) mit der humanen Lungenadenokarzinom-Zelllinie A549 [172] entstanden ist. Diese Zelllinie wird häufig verwendet, um die Funktion von menschlichem Endothel *in vitro* zu simulieren und zu untersuchen. Für einzelne Experimente wurden darüber hinaus noch primäre humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (human dermal microvascular endothelial cells, HDMEC, PromoCell) verwendet. HDMEC bestehen sowohl aus Blut- als auch aus Lymphendothelzellen der Dermis. Diese Zellen wurden freundlicherweise von PD Dr. Nicolas Schlegel (Universitätsklinikum Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Wenn nicht explizit anders erwähnt, sind mit „Zellen“ im Folgenden immer EA.hy926-Zellen gemeint.

#### 2.2.2 Kultivierung und Zellpassage

EA.hy926-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 75 cm<sup>2</sup> kultiviert. Als Medium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-rot) verwendet, dem 10 % fetales Kälberserum (FCS) sowie 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin zugesetzt wurden. Die Zellen wurden bei 37 °C in einer 5%-CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert und zwei Mal pro Woche, im Stadium vollständiger Konfluenz, passagiert. Vor der Passagierung wurden Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) und das Vollmedium auf 37°C erwärmt, Trypsin-EDTA (0,05 %) hatte Raumtemperatur. Zunächst wurde das Vollmedium mit einer Absaugpumpe abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, um bereits abgestorbene Zellen zu lösen. Hierbei wurde insbesondere darauf geachtet, die adhärenzte Zellschicht nicht durch PBS abzuspülen. PBS wurde abgesaugt und 1 ml Trypsin-EDTA hinzugefügt. Die Zellen wurden für 1 Minute bei 37 °C inkubiert und danach durch Klopfen gegen die Kulturflasche abgelöst. Die Trypsinierung wurde mit 9 ml Vollmedium gestoppt; nach gründlicher Resuspension wurden der Inhalt der Flasche im Verhältnis 1:5 gesplittet und die Zellen in frisches Vollmedium aufgenommen. Für die Versuche wurden Zellen bis zur Passage 38 verwendet.

### 2.2.3 Kryokonservierung von Zellen

In regelmäßigen Abständen wurden EA.hy926-Zellen kryokonserviert. Hierzu wurden mehrere Flaschen einer möglichst frischen Passage abtrypsiniert und jeweils die Suspension aus zwei Flaschen in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden bei 1000 rpm und Raumtemperatur fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und pro Röhrchen 6 ml Einfriermedium (DMEM-rot, 20 % FCS, 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)) mit einer Temperatur von 4 °C zum Zellpellet hinzugefügt und dieses zügig resuspendiert. Dann wurde jeweils 1 ml der Suspension in ein Kryoröhrchen überführt und dieses rasch bei -20 °C eingefroren. Am zweiten Tag wurden die Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert und ab dem dritten Tag dauerhaft im Stickstofftank bei -196 °C.

### 2.2.4 Auftauen der Zellen

Das Auftauen frischer Zellen erfolgte mit gekühltem Medium. Zunächst wurden in einem 50 ml-Röhrchen 5 ml Vollmedium vorgelegt. Anschließend wurde ein Kryoröhrchen der Passage 8 leicht im Wasserbad bei 37 °C angetaut, vorsichtig resuspendiert und sehr rasch in das Vollmedium überführt. Das Kryoröhrchen wurde nochmals mit 5 ml Vollmedium gespült und der Rest ebenfalls in das 50 ml-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden dann bei 900 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet vorsichtig in 10 ml Vollmedium resuspendiert und in einer 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche aufgenommen. Es erfolgte die Inkubation der Flasche für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Nach genau 24 Stunden wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, mit 0,5 ml Trypsin-EDTA abgelöst und dann in 4,5 ml Vollmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in eine 75 cm<sup>2</sup>-Flasche, in der 20 ml Vollmedium vorgelegt waren, überführt und von nun an zwei Mal pro Woche gesplittet. Ab der dritten Passage nach Auftauen der Zellen wurden diese zur Aussaat für Experimente verwendet.

### 2.2.5 Aussaat der Zellen für Versuche

Die Verwendung der Zellen für die Versuche fand zwischen zwei und vier Tagen nach der letzten Passage statt. Die Zellen wurden wie unter 2.2.2 beschrieben abgelöst und in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Je nach Zelldichte erfolgte die Herstellung einer entsprechenden Verdünnung mit DMEM. Anschließend wurden jeweils 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl 0,5 %-Trypanblau-Lösung verdünnt und die Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Je nach Versuch wurde dann durch Verdünnung die entsprechende Zellzahl ausgesät.

## 2.3 Bakterienkultur

### 2.3.1 Verwendete Bakterienstämme und Medien

Tab. 5: Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	FnBPA	FnBPB	Quelle / Referenz
<i>S. aureus</i>				
Cowan I	Wildtyp	+	+	ATCC 12598
6850	Wildtyp $\alpha$ -Toxin +	+	+	[173]
P1	Wildtyp	+	+	[174]
DU5947 (P1 $\Delta$ FNBA/B)	P1 <i>fnbA::tet<sup>R</sup>, fnbB::erm<sup>R</sup></i>	-	-	[153]
Newman	Wildtyp	+*	+*	[175]
<i>S. carnosus</i>				
TM300	Wildtyp	-	-	[176]
TM300(pFNBA4)	TM300 pFNBA4: <i>fnbA<sup>+</sup>::cm<sup>R</sup></i>	+	-	[99]
TM300(pFNBB4)	TM300 pFNBB4: <i>fnbB<sup>+</sup>::cm<sup>R</sup></i>	-	+	[99]
TM300(pCF4)	TM300 pCF4: <i>clfA<sup>+</sup>::cm<sup>R</sup></i>	-	-	[99]

Die Kürzel beziehen sich auf das zur Anzucht verwendete Antibiotikum:  
tet = Tetrazyklin, erm = Erythromycin, cm = Chloramphenicol

\* Newman exprimiert keine funktionellen FnBPs wegen eines Kettenabbruchs in der FnBP-Synthese

Als Anzuchtmedium wurde stets Mueller-Hinton-Bouillon (MHB) verwendet. Je nach Stamm wurden die oben genannten Antibiotika in einer Konzentration von 10  $\mu\text{g} / \text{ml}$  als Medienzusatz hinzugefügt, um zu verhindern, dass es in komplementierten bzw. mutierten Stämmen zum Plasmidverlust und wieder zur Entstehung des Wildtyps kommt.

### 2.3.2 Auftauen und Aufbewahrung der Bakterienstämme

Die Stämme wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt, zur Verwendung aufgetaut und auf Blutagarplatten (20 ml) ausgestrichen. Für komplementierte bzw. mutierte Stämme wurden Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum hergestellt (Tab. 5). Zum Auftauen erfolgte der Transport der Kryoröhrchen auf Trockeneis. Unter sterilen Bedingungen wurde die Oberfläche des gefrorenen Bakterienpellets vorsichtig mit einer sterilen Impföse angekratzt und mit einem Dreiösen-Austrich ausgestrichen. Die Platten wurden für circa 16 Stunden bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert und danach im Kühlschrank gelagert. Die Platten wurden stets bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Jede Platte wurde mindestens alle zwei Wochen neu überstrichen. Dabei wurde stets darauf geachtet, keine Einzelkolonien zu überstreichen, um eine Selektion von Subklonen zu vermeiden. Nach höchstens dreimaligem Überstreichen wurde der Stamm frisch aufgetaut.

### 2.3.3 Verwendung der Bakterien für Versuche

#### Übernachtkultur

Für alle Versuche wurden am Vortag Übernachtskulturen in 20 ml MHB in 50 ml-Röhrchen angefertigt. Mutanten bzw. Komplementanten wurden unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums herangezogen. Es wurden circa zwei bis vier Einzelkolonien mit einem sterilen Wattestäbchen gepickt und am Rand des Röhrchens ausgestrichen. Danach wurde das Röhrchen für einige Sekunden mit dem Vortexer durchgemischt. Die Bakterien wurden stehend für 16 bis 20 Stunden mit leicht geöffnetem Deckel bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

#### Einstellen der optischen Dichte für die Infektion

Nach der Inkubationszeit von 16 bis 20 Stunden wurden die Röhrchen für fünf Minuten bei 4.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Bakterienpellets mit 5 ml PBS gewaschen und in 2 bis 3 ml PBS mit 1 % humanem Serumalbumin (HSA) resuspendiert. Zur Bestimmung der optischen Dichte (OD) am Photometer wurde eine 1:10-Verdünnung mit HSA / PBS hergestellt und die OD bei einer Wellenlänge von 540 nm in Einwegküvetten gemessen. Anschließend erfolgte die entsprechende Verdünnung der Bakteriensuspension mit HSA / PBS und die Einstellung einer  $\text{OD}_{540}$  von 1. Für alle Versuche wurde eine Infektionsdosis von  $\text{OD}_{540} = 0,1$  verwendet, was einer Multiplicity of Infection (MOI) von 30 entspricht. Je nach Versuch wurde hierzu entweder die Bakteriensuspension im Verhältnis 1:10 mit Invasionsmedium verdünnt oder die unverdünnte Bakteriensuspension zu bereits in der Vertiefung einer Mikrotiterplatte vorgelegtem Invasionsmedium hinzupipettiert.

### 2.3.4 Einfrieren von Bakterien

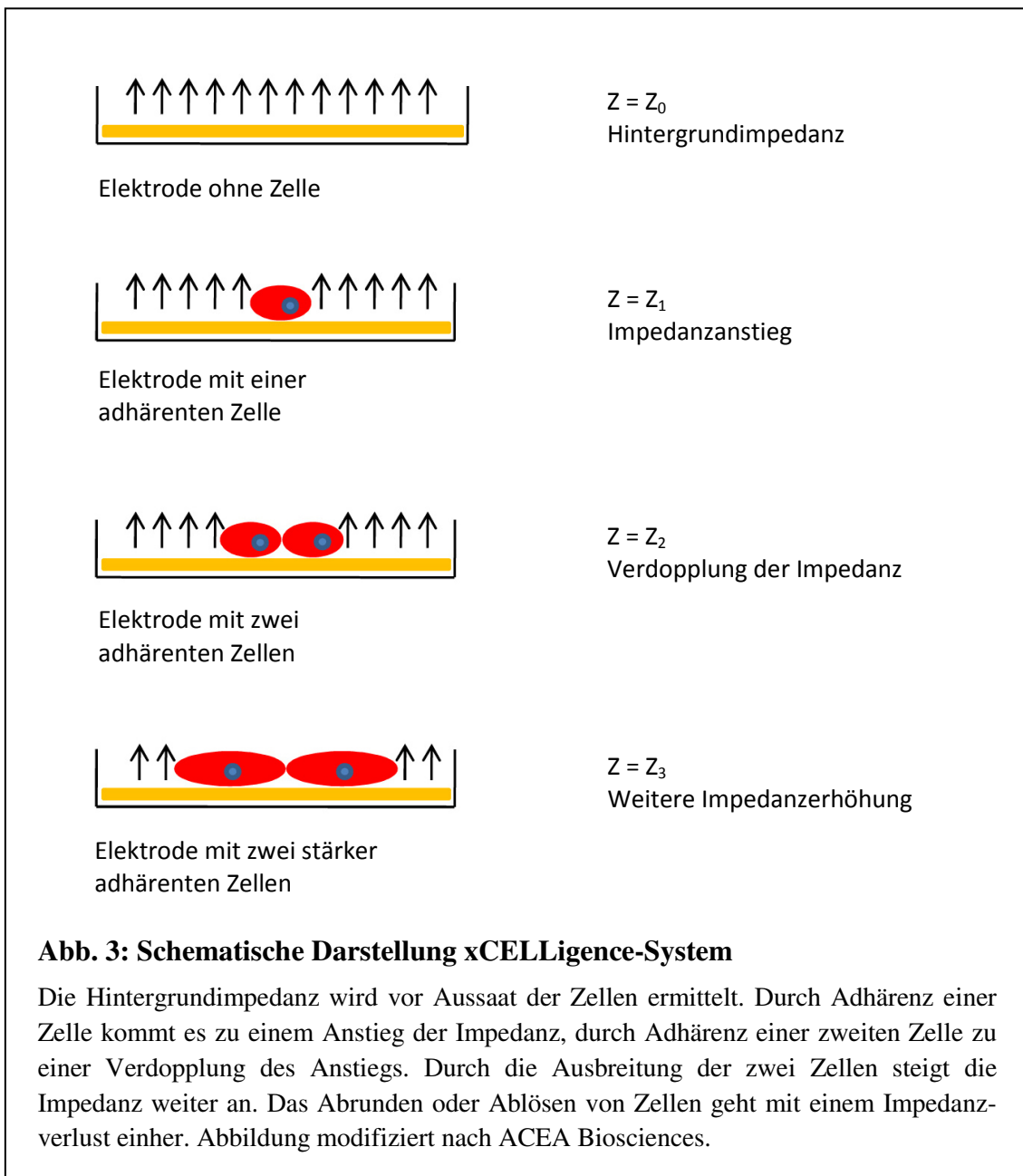
In regelmäßigen Abständen wurden Einfrierkulturen der Bakterienstämme hergestellt. Hierzu wurde eine Übernachtkultur in 20 ml MHB angesetzt und bei 37°C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml der Bakteriensuspension in ein Kryoröhrchen überführt und bei 4.000 rpm und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Bakterienpellet mit einem weiteren Milliliter der Bakteriensuspension resuspendiert. Dann wurden 500 µl steriles Glycerin (70 % in ddH<sub>2</sub>O) hinzugefügt, mit der Bakteriensuspension durchmischt und das Röhrchen sofort bei -80 °C eingefroren.

### 2.4 Messung der transendothelialen elektrischen Impedanz

Zur Erfassung von funktionellen Veränderungen der Endothelbarriere wurden mit dem xCELLigence-System Analysen der transendothelialen elektrischen Impedanz in Echtzeit durchgeführt. EA.hy926-Zellen wurden auf sogenannten E-Plates 96 ausgesät und mit verschiedenen Stämmen infiziert. Bei E-Plates handelt es sich um 96-Loch-Mikrotiterplatten, deren Boden mit Elektroden bedeckt ist. Wechselwirkungen zwischen den Zellen und den Elektroden zeigen sich in einer Änderung der elektrischen Impedanz (Abb. 3). Adhärenente Zellen fungieren dabei als Isolator und erhöhen die Impedanz. Vermehrte Proliferation und Adhärenz spiegelt sich somit in einem Impedanzanstieg wider, eine Lockerung der Zell-Zell-Verbindungen in einer Abnahme der Impedanz. Durch die Erfassung der Impedanzänderungen in Echtzeit konnten Einflüsse der Infektion wie zum Beispiel Veränderungen von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten, Abrundung der Zellen oder Zelltod untersucht werden [177].

#### Aufbau des xCELLigence Systems

Das xCELLigence-System setzt sich aus dem Real-Time Cell Analyzer (RTCA), dem RTCA Computer, der RTCA Single Plate (SP) Station und oben erwähnten E-Plates 96 zusammen. Das Heranziehen der Zellen und die Infektion fanden in E-Plates bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> statt. Die E-Plates besitzen einen Glasboden, der zu 80 % mit Goldelektroden bedeckt ist, durch welche die transendotheliale elektrische Impedanz gemessen wird. Die RTCA SP Station befindet sich ebenfalls im Brutschrank und dient dazu, Signale der Elektroden an den RTCA weiterzuleiten. Der RTCA befindet sich außerhalb des Brutschranks. Durch ihn wurden alle 15 Minuten in den ausgewählten Vertiefungen der E-Plates Messungen mit einer Spannung von 20 mV und einer Frequenz von 10 kHz durchgeführt und anschließend die gemessenen Werte an den RTCA Computer übermittelt.



### Beschichtung der E-Plates und Aussaat der Zellen

Die E-Plates wurden vor Aussaat der Zellen mit Matrigel beschichtet. Matrigel wird aus dem Engelbreth-Holm-Swarm-Tumor gewonnen und enthält zahlreiche Proteine der Extrazellulärmatrix sowie Wachstumsfaktoren. Es dient somit als ideale Matrix für das dreidimensionale Wachstum und die Differenzierung der darauf ausgesäten Zellen. Matrigel wurde über Nacht auf Eis bei 4 °C aufgetaut. Dann wurde ein Mastermix mit DMEM hergestellt (10 µg/ml) und zur Beschichtung verwendet. Pro Vertiefung wurden 50.000 Zellen in 200 µl DMEM (10 % FCS) ausgesät.

### **Infektion**

Die Infektion fand stets nach circa 48 Stunden, zum Zeitpunkt der höchsten Impedanz, statt. Hierzu wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer MOI von 30 in Invasionsmedium (siehe 2.5.1) infiziert.

### **Messung**

Durch die xCELLigence-Software wird ein einheitsloser „Cell Index“ (CI) berechnet:  $CI = (C_t - C_0) / 15$ , wobei die Hintergrundimpedanz  $Z_0$  bei Beginn der Messung berücksichtigt wird. Um die Auswirkung der Infektion mit verschiedenen *S. aureus*-Stämmen auf die Impedanz zu untersuchen, wurde ein normalisierter Zell-Index verwendet. Alle Vertiefungen der E-Plate wurden zum Zeitpunkt der Infektion auf einen gemeinsamen Startpunkt genormt. Anschließend wurde der „Normalized Cell Index“ (NCI) berechnet, ( $NCI = CI_{ti} / CI_{nml\_time}$ ). Bei  $CI_{ti}$  handelt es sich um die Impedanz zu einem bestimmten Zeitpunkt, bei  $CI_{nml\_time}$  um den normalisierten Zeitpunkt. So konnten Auswirkungen auf die elektrische Impedanz durch die Infektion mit verschiedenen Stämmen verglichen werden. Vor den Impedanzmessungen erfolgte im Gegensatz zu allen im Folgenden beschriebenen Untersuchungen keine Abtötung der extrazellulären Staphylokokken nach 4 Stunden mit Lysostaphin.

## **2.5 Permeabilitätsassay**

### **2.5.1 Prinzip des Permeabilitätsassays und Vorbereitungen**

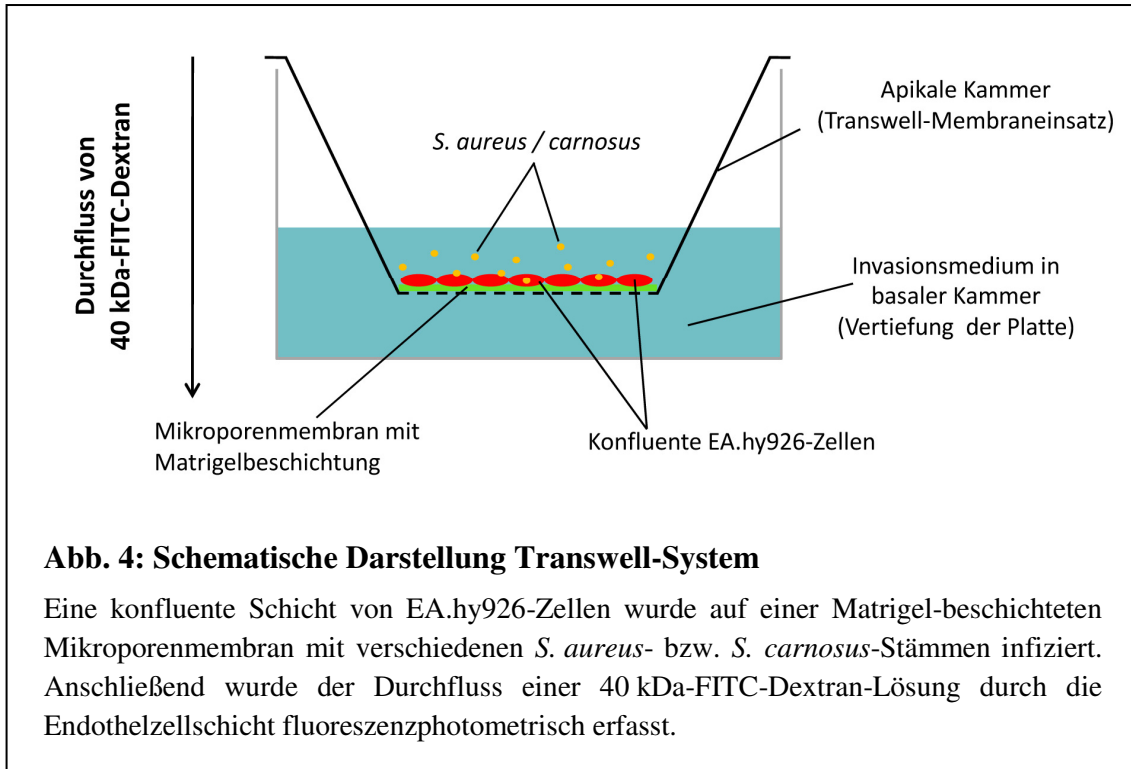
Zur Untersuchung der Endothelpermeabilität nach Infektion wurden konfluente EA.hy926-Zellen auf einer Mikroporenmembran in sogenannten Transwell-Membraneinsätzen infiziert und anschließend die Durchlässigkeit des Zellrasens mit Hilfe des Durchflusses eines Dextran-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffs quantifiziert [166]. Abb. 4 zeigt schematisch den Versuchsaufbau. Für alle Permeabilitätsassays wurden Transwell-Membraneinsätze mit einer Membrandicke von 10  $\mu\text{m}$ , einer Porengröße von 3  $\mu\text{m}$  und einer Fläche von 0,33  $\text{cm}^2$  verwendet.

### **Beschichtung der Transwellfilter und Aussaat der Zellen**

Zur Beschichtung der Mikroporenmembran wurde Matrigel in DMEM in einer Konzentration von 20  $\mu\text{l}$  / ml verwendet. Zu jeder apikalen Kammer wurden 50  $\mu\text{l}$  der Suspension hinzugefügt und die Transwell-Einsätze bei 37 °C für eine halbe Stunde inkubiert. Zum Ablösen und Verdünnen der Zellen wurde ausschließlich DMEM (10 % FCS) ohne Antibiotika verwendet, um die Integrität der Mikroporenmembran nicht zu beschädigen. In den basalen Kammern des Transwellsystems wurden 800  $\mu\text{l}$  DMEM (10 % FCS) vorgelegt. Pro Transwell-Membraneinsatz wurden 50.000 Zellen in 200  $\mu\text{l}$  DMEM (10 % FCS) ausgesät und diese für vier Tage bei 37°C und 5 %  $\text{CO}_2$



bebrütet, sodass die Zellen einen konfluenten Monolayer bildeten. Die obere und untere Reihe der Transwell-Platte wurden stets freigelassen und während des Versuchs zum Umsetzen der Transwell-Einsätze verwendet.



### Verwendete Medien

Folgende Medien wurden für jeden Permeabilitätsassay am Versuchstag frisch angesetzt:

#### Invasionsmedium

19 ml DMEM-rot  
1 ml HSA (20 %)  
200 µl 1 M HEPES

#### P-Puffer

Ansatz für 12,5 ml:

125 µl 1 M Glucose-Lösung  
125 µl 0,1 M Natriumpyruvat  
125 µl 1 M HEPES  
375 µl 0,1 M Calciumchlorid-Lösung  
1,8 ml 1 M Natriumchlorid-Lösung  
9,9 ml Ampuwa-Wasser

### Durchführung des Permeabilitätsassays

#### Infektion

Zunächst wurde von der Bakteriensuspension mit der  $OD_{540} = 1$  eine 1:10-Verdünnung mit Invasionsmedium hergestellt. Zur Vorbereitung der Infektion wurden die Transwell-Membraneinsätze mit einer sterilen Pinzette in eine freie Vertiefung der Transwell-Platte gesetzt. Das Medium in der basalen Kammer wurde abgesaugt und durch 500  $\mu$ l Invasionsmedium ersetzt. Die Transwell-Membraneinsätze wurden ein Mal vorsichtig mit 200  $\mu$ l P-Puffer gewaschen ohne den Zellrasen zu beschädigen oder auszutrocknen. Für die Infektion wurden 200  $\mu$ l der mit Invasionsmedium verdünnten Bakteriensuspension ( $OD_{540} = 0,1$ ) bzw. 200  $\mu$ l Invasionsmedium (10 % HSA / PBS) für die Kontrollen in der apikalen Kammer vorgelegt und die Transwell-Einsätze zurückgesetzt. Die Infektionszeit betrug 4 Stunden bei 37 °C und 5 %  $CO_2$ . Für alle Stämme wurden Duplikate angefertigt, für die Kontrolle immer eine Vierfachbestimmung.

#### Lyse der extrazellulären Bakterien

Nach 4-stündiger Infektionszeit wurden die Transwell-Membraneinsätze erneut zur Seite gesetzt. Das Invasionsmedium in der basalen und apikalen Kammer wurde nach einmaligem Waschen mit P-Puffer durch 500 bzw. 200  $\mu$ l einer 28,6  $\mu$ g / ml Lysostaphin-Lösung in DMEM (10 % FCS) ersetzt. Bei Lysostaphin handelt es sich um eine Zink-Metalloprotease, die unter anderem Glycylglycin-Endopeptidase-Aktivität besitzt [178]. Es ist somit in der Lage Glycin-Glycin-Bindungen, die als Interpeptidbrücken in der Peptidoglycan-Zellwand von *S. aureus* fungieren, zu spalten und die Bakterien zu lysieren. Da die Zellwand von *S. aureus* sehr reich an Pentaglycinbrücken ist, ist Lysostaphin hier besonders wirksam [179]. Die Lyse der extrazellulären Bakterien erfolgte für 10 Minuten bei 37 °C und 5 %  $CO_2$ . Im Anschluss wurden die Transwellplatten entweder sofort aufbereitet (Messung nach 4 Stunden) oder für weitere 4 bzw. 20 Stunden inkubiert (Messung nach 8 bzw. 24 Stunden).

#### Aufbereitung

In neuen 24-Loch-Mikrotiterplatten wurden 500  $\mu$ l P-Puffer vorgelegt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Transwell-Membraneinsätze zur Seite gesetzt und zwei Mal mit 200  $\mu$ l P-Puffer gewaschen, wobei der P-Puffer nach dem zweiten Waschschrift auf den Zellen verblieb. Die Transwell-Einsätze wurden mit P-Puffer in die entsprechenden Vertiefungen der neuen Mikrotiterplatten eingesetzt. Der P-Puffer in der apikalen Kammer wurde nun abgesaugt und durch 200  $\mu$ l einer 1 mg / ml 40kDa-FITC-Dextran-Lösung in P-Puffer ersetzt. Die Platten inkubierten für 30 Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur, sodass FITC-Dextran durch die Mikroporenmembran der Transwell-Einsätze und den Zellrasen in die basale Kammer

diffundieren und sich verteilen konnte. Bei FITC-Dextran handelt es sich um Dextrane unterschiedlichen Molekulargewichts (bei diesen Versuchen 40 kDa), die an den fluoreszierenden Farbstoff Fluorescein-Isothiocyanat gekoppelt sind. Mit Hilfe des Durchflusses der FITC-Dextran-Lösung von der oberen in die untere Kammer des Transwellsystems konnten Rückschlüsse auf die Durchlässigkeit der Zellbarriere gezogen werden, wobei die Fluoreszenzintensität bei der Messung als Marker für die Permeabilität des Zellmonolayers diene.

Die Versuche wurden zeitlich gestaffelt, sodass die Inkubationszeit von 30 Minuten für alle Transwell-Kammern exakt eingehalten werden konnte. Nach Ende der 30-minütigen Einwirkzeit wurden die Transwell-Einsätze sofort zur Seite gesetzt und die FITC-Dextran-Verteilung zwischen apikaler und basaler Kammer somit gestoppt. Danach wurden die Vertiefungen der Transwellplatte kräftig resuspendiert, um für die Messung eine gleichmäßige FITC-Dextran-Verteilung zu gewährleisten.

### **Messung**

Für die Messungen am Gerät Tecan, GENios wurden in einer schwarze 96-Loch-ELISA-Platte in allen Reihen 95  $\mu$ l P-Puffer vorgelegt und 5  $\mu$ l aus jeder apikalen bzw. basalen Kammer des Transwellsystems hinzupipettiert. Die Lösungen wurden vor jeder Messung resuspendiert. Die Messungen am Gerät Tecan, Infinite 200 PRO erforderten ein anderes Protokoll. Hier wurden aus jeder basalen Kammer 5  $\mu$ l ad 95  $\mu$ l P-Puffer bzw. aus jeder apikalen Kammer 1  $\mu$ l ad 199  $\mu$ l P-Puffer auf der ELISA-Platte zusammenpipettiert. Diese Änderung war erforderlich, da der Mikroplatten-Reader ausgetauscht wurde und der Versuch an die Bedingungen des neuen Geräts angepasst werden musste. Bei der Auswertung wurde dies berücksichtigt, indem anschließend die Werte im Transwell-Einsatz mit dem Faktor 10 multipliziert wurden. Als Mock-Kontrolle wurden immer auch einige Vertiefungen der ELISA-Platte nur mit 100 bzw. 200  $\mu$ l P-Puffer befüllt und mitgemessen. So konnte die Eigenfluoreszenz des P-Puffers quantifiziert und bei der Auswertung berücksichtigt werden. Für alle Messungen wurde ein Fluoreszenzfilter verwendet. Die Messungen am Mikroplatten-Reader wurden bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm durchgeführt.

**2.5.2 Permeabilitätsassay mit Tyrosin-Kinase-Inhibitoren**

In einigen Versuchsreihen wurde der Permeabilitätsassay in Anwesenheit verschiedener Tyrosin-Kinase-Inhibitoren durchgeführt. Die verwendeten Substanzen sind in Tab. 6 aufgelistet.

**Tab. 6: Tyrosin-Kinase-Inhibitoren**

Inhibitor	verwendete Konzentration
Genistein	10 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 250 mM
PP2 / PP3	0,1 mM, 0,3 mM, 1 mM, 3 mM, 10 mM

Genistein inhibiert ein breites Spektrum an Tyrosin-spezifischen Proteinkinasen [180]. PP2 hingegen ist ein spezifischer Inhibitor für Protein-Tyrosin-Kinasen der Src-Familie [181]. Bei PP3 handelt es sich um einen selektiven EGFR-Kinase-Inhibitor, der als Negativkontrolle für PP2 diente. Die Zellen wurden vor Infektion für eine Stunde mit den in Invasionsmedium verdünnten Inhibitoren in den oben genannten Konzentrationen vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion mit der üblichen MOI von 30. Nach der Lysostaphinbehandlung wurde das Medium ausgetauscht und die Inhibitoren nicht erneut hinzugefügt.

**2.5.2.1 Viabilitätsassay von Bakterien mit Tyrosin-Kinase-Inhibitoren**

Um toxische Effekte der Inhibitoren auf die Bakterien auszuschließen, wurde ein Viabilitätsassay in Anwesenheit von Genistein bzw. PP2 durchgeführt. Hierzu wurden zunächst Verdünnungen der Inhibitoren in Invasionsmedium hergestellt. Es wurden nur die höchsten im Permeabilitätsassay verwendeten Konzentrationen (250 mM bzw. 10  $\mu$ M) sowie DMSO, das zu Herstellung der Stammlösung diente, verwendet. 450  $\mu$ l der Verdünnung wurden in einer 24-Loch-Mikrotiterplatte vorgelegt und anschließend 50  $\mu$ l Bakteriensuspension ( $OD_{540} = 1$ ) hinzugefügt und resuspendiert. Danach folgte analog zum Permeabilitätsassay eine 4-stündige Inkubationszeit bei 37 °C und 5 %  $CO_2$ . Nach Ende der Inkubationszeit wurde aus den jeweiligen Vertiefungen eine Verdünnungsreihe in 1 % HSA / PBS angefertigt. Es wurden jeweils 100  $\mu$ l aus den Verdünnungsstufen  $10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-4}$  und  $10^{-5}$  auf Mueller-Hinton-Agar-Platten ausplattiert. Die Bestimmung erfolgte in Duplikaten. Zusätzlich wurden das verwendete HSA / PBS sowie das Kontrollinvasionsmedium ausplattiert, um eine Kontamination auszuschließen. Die Platten inkubierten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank und wurden am Folgetag manuell ausgezählt.

### 2.6 Zytotoxizitäts-Assays

Das Ausmaß des zytotoxischen Effekts von *S. aureus* auf die Zellen wurde mit Hilfe verschiedener Zelltod-Experimente quantifiziert. Als Positivkontrollen wurden für diese Experimente Staurosporin in einer Konzentration von 1  $\mu$ M und 3  $\mu$ M sowie Triton X-100 (1 %) verwendet. Staurosporin ist ein Alkaloid, das ein breites Spektrum an Proteinkinasen inhibiert [182–185] und Apoptose sowohl auf Caspase-abhängigem als auch auf Caspase-unabhängigem Weg induzieren kann [186]. Bei Triton X-100 handelt es sich um ein nicht-ionisches Detergenz, das nach entsprechend langem Einwirken durch Lösen diverser Membranbestandteile zur Lyse der Zellen führt [187].

#### 2.6.1 Kristallviolett-Assay

##### 2.6.1.1 Prinzip des Kristallviolett-Assays und Vorbereitungen

Beim Kristallviolett-Assay wurden die adhärenenten Zellen nach Infektion mit Kristallviolett angefärbt. Anschließend wurde die Absorption des Farbstoffs photometrisch gemessen, wobei das Ausmaß der Absorption als Indikator für die Anzahl nicht abgelöster Zellen diente.

#### Verwendete Medien

##### Invasionsmedium

Siehe 2.5.1

##### Kristallviolett-Lösung

3,75 g Kristallviolett  
250 ml Ethanol absolut  
1,25 g Natriumchlorid  
24 ml Formaldehyd (36,5 %)  
Ad 500 ml ddH<sub>2</sub>O

##### Eluationslösung

1 % SDS ad 500 ml PBS

#### Aussaat der Zellen

In einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden 50.000 Zellen / Vertiefung in 200  $\mu$ l Vollmedium ausgesät. Die Zellen wurden nach vier Tagen Bebrütung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für den Versuch verwendet. In einer Reihe wurde nur Vollmedium ohne Zellen vorgelegt, diese diente während des Versuchs als Blank und wurde wie alle anderen Reihen behandelt.

### 2.6.1.2 Durchführung des Kristallviolett-Assays

#### **Infektion**

Die Zellen wurden ein Mal mit 180  $\mu$ l PBS gewaschen, anschließend wurden 180  $\mu$ l Invasionsmedium pro Vertiefung vorgelegt. Es folgte eine Inkubation bei 4 °C für 30 Minuten zum Vorkühlen der Zellen. Dann wurden in die jeweiligen Vertiefungen 20  $\mu$ l HSA / PBS (Kontrolle und Blank), 20  $\mu$ l Bakteriensuspension ( $OD_{540} = 1$ ), 20  $\mu$ l Staurosporin-Lösung (10  $\mu$ M), 20  $\mu$ l Staurosporin-Lösung (30  $\mu$ M) bzw. 20  $\mu$ l Triton X-100 (10 % in PBS) pipettiert und die Platten zur Sedimentation der Bakterien für eine Stunde bei 4 °C aufbewahrt. So wurde sichergestellt, dass die Bakterien sich zunächst auf den Zellen absetzen konnten und die Invasion überall zeitgleich startete. Nach einer Stunde wurden die Platten für 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Kontrollen wurden in 12-facher Bestimmung und die infizierten Vertiefungen in 6-facher Bestimmung durchgeführt.

#### **Abtöten der extrazellulären Bakterien**

Nach Ende der Infektionszeit wurden die Platten ein Mal mit 200  $\mu$ l PBS gewaschen. Zum Lysieren der Bakterien wurde wie beim Permeabilitätsassay Lysostaphin verwendet; Staurosporin und Triton X-100 wurden erneut in den entsprechenden Konzentrationen hinzugesetzt. Nach zehnmütiger Inkubation wurden die Platten entweder für weitere 20 Stunden inkubiert (24-Stunden-Messung) oder sofort aufgearbeitet (4-Stunden-Messung).

#### **Aufarbeitung**

Das Vollmedium wurde abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit 200  $\mu$ l PBS mit der Multipette gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Platten für zehn Minuten bei höchster Stufe auf den Schüttler gestellt, um nicht adhärenente Zellen zu lösen. Danach wurde erneut mit 200  $\mu$ l PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden zum Anfärben der Zellen 50  $\mu$ l der Kristallviolett-Lösung auf die Zellen pipettiert. Es folgte eine 30-minütige Einwirkzeit bei Raumtemperatur, dann wurden die Zellen weitere vier Mal mit PBS gewaschen. Wichtig war, dass die zellfreien Vertiefungen (Blank) gänzlich farblos erschienen, um sicherzustellen, dass ausschließlich die Zellen, nicht aber die Platte selbst angefärbt war. Die Platten trockneten über Nacht im Dunklen.

#### **Mikroskopie**

Am Tag nach der Aufarbeitung wurden die Platten mikroskopiert und der verbliebene Anteil an Zellmasse in den verschiedenen Proben fotografisch festgehalten.

### **Eluation**

Nach der Mikroskopie erfolgte die Eluation der Farbe aus den Zellen. Hierzu wurden 200 µl der Eluationslösung in jede Vertiefung pipettiert. Es folgte eine Einwirkzeit über Nacht im Dunklen und bei Raumtemperatur. Je niedriger die Anzahl der Zellen pro Vertiefung war, desto weniger Farbe wurde gelöst und desto niedriger war die Absorption in der anschließenden Messung.

### **Messung**

Nach Einwirken der Eluationslösung wurde am Folgetag die Messung unter Verwendung des Absorptionsfilters bei einer Wellenlänge von 620 nm am Mikropplatten-Reader durchgeführt.

### **2.6.2 Nicoletti-Assay**

#### **2.6.2.1 Prinzip des Nicoletti-Assays und Vorbereitungen**

Späte Stadien der Apoptose zeichnen sich durch eine DNA-Fragmentierung durch Caspase-abhängige Aktivierung spezifischer Endonukleasen aus [188, 189]. Der Nicoletti-Assay diente dazu, mit Hilfe eines fluorochromen Farbstoffs den Anteil an fragmentiertem Kernmaterial in der Zellpopulation zu quantifizieren [190], um so Rückschlüsse auf den Anteil der apoptotischen Zellen ziehen zu können.

#### **Aussaat der Zellen**

In einer 24-Loch-Mikrotiterplatte wurden 300.000 Zellen / Vertiefung in Vollmedium ausgesät und vor Verwendung für vier Tage bebrütet.

#### **Verwendete Medien**

##### Invasionsmedium

Siehe 2.5.1

##### Stopmedium

45 ml DMEM-weiß

5 ml FCS

##### Nicoletti-Puffer

0,1 % Natriumcitrat

0,1 % Triton X-100

in ddH<sub>2</sub>O

Vor jedem Versuch wurde ein Ansatz mit Propidiumiodid-Lösung (2,5 mg / ml in PBS) hergestellt (28 ml Nicoletti-Puffer + 560 µl Propidiumiodid-Lösung). Propidiumiodid (PI) ist ein fluorochromer DNA-Interkalator, der nach Anregung rotes Licht mit einem Emissionsmaximum von 590 nm emittiert. Die Fluoreszenzintensität von PI wurde später per Durchflusszytometrie gemessen.

### 2.6.2.2 Durchführung des Nicoletti-Assays

#### **Infektion**

Die Zellen wurden mit 1 ml Invasionsmedium gewaschen, dann wurden 450  $\mu$ l Invasionsmedium vorgelegt und die Mikrotiterplatte für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Danach wurden in den entsprechenden Vertiefungen 50  $\mu$ l HSA / PBS, 50  $\mu$ l Bakteriensuspension ( $OD_{540} = 1$ ) und 50  $\mu$ l Staurosporin 10  $\mu$ M bzw. 30  $\mu$ M hinzugefügt. Es folgte eine Sedimentationsphase bei 4 °C für eine Stunde. Danach wurden die Platten wie üblich für 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bebrütet.

#### **Abtöten der extrazellulären Bakterien**

Die Zellen wurden nach Ende der Invasion ein Mal mit 500  $\mu$ l PBS gewaschen, dann wurde Lysostaphin-Lösung mit bzw. ohne Staurosporin in Vollmedium in die jeweiligen Vertiefungen pipettiert. Es folgte eine weitere Inkubationszeit für 20 Stunden.

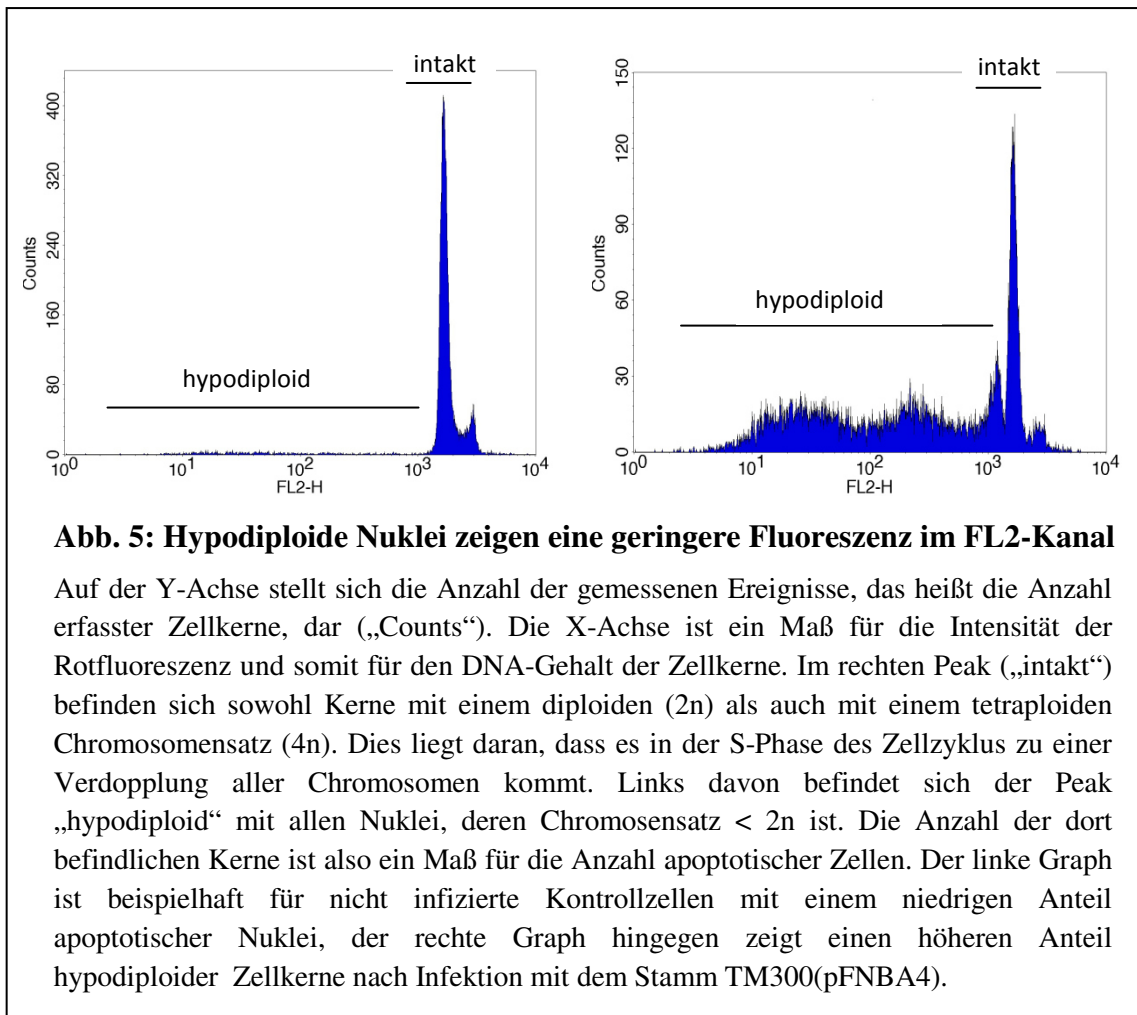
#### **Aufarbeitung**

Nach 24 Stunden wurden die Überstände aus allen Vertiefungen in FACS-Röhrchen überführt, die Zellen ein Mal mit 500  $\mu$ l PBS gewaschen und die Überstände gesammelt. Die Zellen wurden mit 200  $\mu$ l Trypsin-EDTA (weiß, 0,05 % in PBS) abgelöst, die Trypsinwirkung mit 1 ml Stoppmedium gestoppt und die Zellsuspension kräftig resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen ebenfalls in das entsprechende FACS-Röhrchen überführt. Die FACS-Röhrchen wurden bei 4.000 rpm und Raumtemperatur für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand bis auf einen sehr kleinen Rest abgesaugt. Das Pellet wurde in 500  $\mu$ l Nicoletti-Puffer (+ PI) aufgenommen, resuspendiert und mit dem Vortexer durchmischt. Der Nicoletti-Puffer bewirkt eine Permeabilisierung der Zellmembran, sodass anschließend PI in den Zellkern eindringen und in die DNA interkalieren konnte. Es folgte eine einstündige Inkubationszeit bei 4 °C.

#### **Messung**

Während der Messzeit standen die Proben immer auf Eis. Mit Hilfe des Durchflusszytometers wurde der Anteil an intakten bzw. hypodiploiden Nuklei analysiert. PI bindet an unbeschädigte DNA. Somit ist das Ausmaß der PI bedingten Rotfluoreszenz ein Marker für den Anteil der intakten DNA der Zellen. Die Intensität der Rotfluoreszenz wurde im FL2-Kanal bei einer Wellenlänge von 585 nm gemessen und die unterschiedlichen Zellkernpopulationen stellten sich in Form von zwei verschiedenen Gipfeln („Peaks“) dar. Eine beispielhafte Darstellung der Messung zeigt Abb. 5.





**Abb. 5: Hypodiploide Nuklei zeigen eine geringere Fluoreszenz im FL2-Kanal**

Auf der Y-Achse stellt sich die Anzahl der gemessenen Ereignisse, das heißt die Anzahl erfasster Zellkerne, dar („Counts“). Die X-Achse ist ein Maß für die Intensität der Rotfluoreszenz und somit für den DNA-Gehalt der Zellkerne. Im rechten Peak („intakt“) befinden sich sowohl Kerne mit einem diploiden ( $2n$ ) als auch mit einem tetraploiden Chromosomensatz ( $4n$ ). Dies liegt daran, dass es in der S-Phase des Zellzyklus zu einer Verdopplung aller Chromosomen kommt. Links davon befindet sich der Peak „hypodiploid“ mit allen Nuklei, deren Chromosomensatz  $< 2n$  ist. Die Anzahl der dort befindlichen Kerne ist also ein Maß für die Anzahl apoptotischer Zellen. Der linke Graph ist beispielhaft für nicht infizierte Kontrollzellen mit einem niedrigen Anteil apoptotischer Nuklei, der rechte Graph hingegen zeigt einen höheren Anteil hypodiploider Zellkerne nach Infektion mit dem Stamm TM300(pFNBA4).

### Anmerkung

Eine Versuchsreihe fand in Gegenwart des Pan-Caspase-Inhibitors Z-VAD-fmk statt. So sollte zwischen Caspase-abhängiger und -unabhängiger Apoptose differenziert werden. Z-VAD-fmk wurde während des gesamten Versuchs in einer Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  verwendet.

## 2.7 Immunfluoreszenz

### 2.7.1 Antikörperfärbung

Um festzustellen, ob die Integrität von Zell-Zell-Verbindungen durch die Infektion beschädigt wird, wurden verschiedene Proteine, die an Adherens und Tight Junctions beteiligt sind, mit Hilfe von indirekter Immunfluoreszenz dargestellt. Der Primärantikörper diente dazu, die gewünschte Zielstruktur zu erkennen, während der Sekundärantikörper wiederum in der Lage war, an ein Epitop des Primärantikörpers zu binden. Durch Kopplung des Zweitantikörpers an die fluoreszierenden Farbstoffe

Indocarbocyanin (Cy3) bzw. Alexa Fluor 594 konnte das Zielprotein durch Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge sichtbar gemacht werden.

**Tab. 7: Primär- und Sekundärantikörper**

Antikörper	Typ	Verdünnung
<b>Primärantikörper</b>		
VE-Cadherin	polyklonal, Ziege IgG	1:100
ZO-1	monoklonal, Maus IgG	1:150
<b>Sekundärantikörper</b>		
Cy3-Esel-anti-Ziege-IgG	polyklonal	1:600
Alexa 594-Esel-anti-Maus-IgG	polyklonal	1:150

Alle in Tab. 7 genannten Verdünnungen wurden in PBS hergestellt.

### Beschichtung der Deckgläschen

Vor Verwendung wurden alle Deckgläschen (Ø 10 mm) in Ethanol absolut getaucht, abgeflammt und anschließend in einer 24-Loch-Mikrotiterplatte beschichtet. Hierzu wurde wie im Permeabilitätsassay Matrigel (20 µg / ml in DMEM) verwendet, wobei 200 µl der Lösung in jede Vertiefung pipettiert wurden. Es erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C, im Anschluss wurde die überschüssige Matrigel-Suspension vorsichtig abgesaugt.

### Aussaat der Zellen

Pro Vertiefung wurden 25.000 EA.hy926-Zellen in 1 ml Vollmedium ausgesät. Diese wurden, im Stadium vollständiger Konfluenz, nach sieben Tagen verwendet, wobei nach drei bis vier Tagen ein Medienwechsel stattfand.

Für bestimmte Experimente wurden HDMEC verwendet. Diese wurden freundlicherweise von PD Dr. Nicolas Schlegel zur Verfügung gestellt. Es wurden vollständig konfluente Zellen auf Gelatine-beschichteten Deckgläschen nach zehn Tagen Wachstum verwendet. HDMEC wurden stets maximal bis zur Passage sechs verwendet.

### Infektion

Die Zellen wurde vor der Infektion ein Mal mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 450 µl Invasionsmedium pro Plattenvertiefung vorgelegt und 50 µl Bakteriensuspension (OD<sub>540</sub> = 1) bzw. 50 µl 10 % HSA / PBS für die Kontrollen hinzupipettiert. Nach 4-stündiger Infektion erfolgte die Lyse extrazellulärer Staphylokokken mit Lysostaphin. Dann wurde entweder direkt eine Antikörperfärbung durchgeführt oder es folgte eine weitere Inkubation für 20 Stunden.

### **Durchführung der Antikörperfärbung**

Die Deckgläschen wurden ein Mal mit 1 ml PBS gewaschen und die Zellen mit 1 ml Paraformaldehyd-Lösung (2 % in PBS) für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Permeabilisierung mit Triton X-100 (0,1 % in PBS) für 8 Minuten. Nach einem weiteren gründlichen Waschschrift wurden die Deckgläschen auf einen Objektträger überführt. Durch Hinzupipettieren von 30  $\mu$ l NDS (10 % normal donkey serum in PBS) wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das Blockmedium abgesaugt und 30  $\mu$ l des verdünnten Primärantikörpers (Tab. 7) hinzupipettiert. Es folgte die Inkubation über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Nach Ende der Einwirkzeit wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und für 60 Minuten mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (Tab. 7) bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschschrift mit PBS und entweder das sofortige Eindecken der Deckgläschen oder die Färbung der Zellkerne mit dem fluoreszierenden Farbstoff DAPI (Diamidinphenylindol). Hierzu wurden auf jedes Deckgläschen 20  $\mu$ l DAPI (0,2  $\mu$ g / ml in PBS) pipettiert. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur wurden die Deckgläschen ebenfalls eingedeckt. Die fertigen Präparate wurden stets bei 4 °C und dunkel gelagert.

### **2.7.2 Mitotracker-Färbung**

Um zytotoxische Effekte der Infektion auf morphologischer Ebene zu untersuchen, wurden die Mitochondrien mit Mitotracker und die Nuklei mit DAPI gefärbt. So konnten Veränderungen in deren Integrität morphologisch beurteilt werden. Mitotracker reichert sich in Mitochondrien mit intaktem Membranpotenzial an und wird durch eine anschließende Fixierung nicht ausgewaschen, sodass viable und nicht viable Mitochondrien differenziert werden können [191].

### **Beschichtung und Aussaat**

Die Zellen wurden wie unter 2.7.1 beschrieben auf beschichteten Deckgläschen ausgesät und im subkonfluenten Stadium verwendet. So war in der Mikroskopie eine überlagerungsfreie und bessere Darstellung der entsprechenden Strukturen möglich.

### **Infektion**

Die ersten Schritte der Infektion fanden ebenfalls wie oben beschrieben statt. Für die Färbung nach 4-stündiger Inkubation wurden nach dreieinhalb Stunden 10  $\mu$ l einer 10  $\mu$ M-Mitotracker-Lösung in jede Plattenvertiefung pipettiert, sodass eine Endkonzentration von 200 mM entstand. Anschließend wurde das Medium in der Vertiefung vorsichtig durchmischt und es erfolgte eine weitere Inkubation für 30

Minuten. Für die Färbung nach 24 Stunden wurde nach 4 Stunden Lysostaphin hinzugegeben. Nach weiteren 19,5 Stunden fand dann eine 30-minütige Inkubation mit Mitotracker statt.

### **Durchführung der Färbung**

Analog zur Antikörperfärbung wurden die Zellen nach Ende der 4- bzw. 24-stündigen Inkubationszeit mehrmals gewaschen, fixiert und permeabilisiert. Dann erfolgten direkt die Färbung mit DAPI sowie das Eindecken.

## **2.8 Auswertung des Daten- und Bildmaterials**

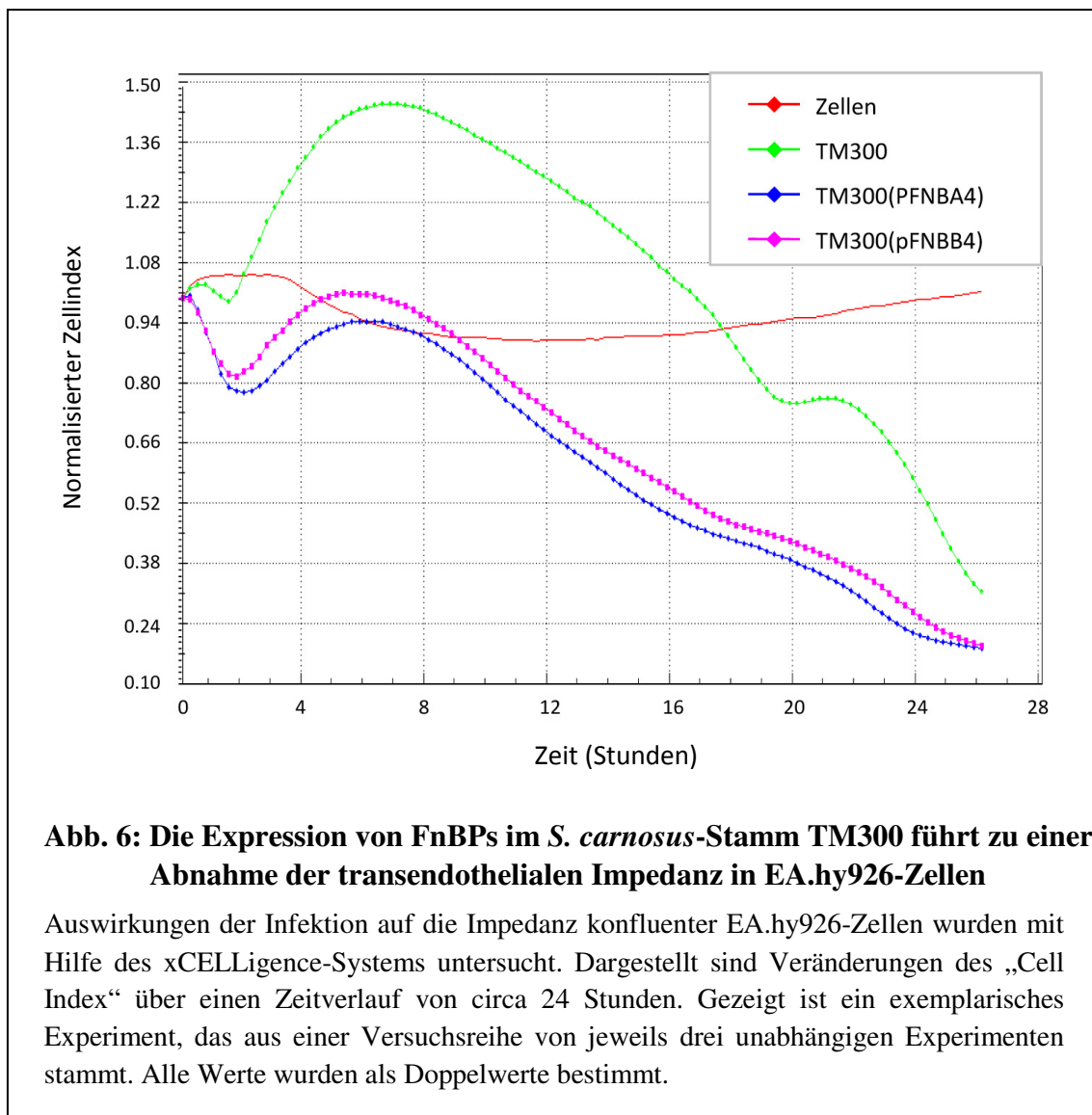
Die Auswertung des Permeabilitäts-, Kristallviolett- und Nicoletti-Assay erfolgte mit Hilfe von Excel 2007. Beim Permeabilitäts- und Kristallviolett-Assay wurde zunächst der gemittelte Rohwert der Mock-Kontrollen abgezogen und anschließend die Kontrollzellen auf 100 % genormt, sodass sich die infizierten Zellen als Vielfaches hiervon darstellten. Beim Nicoletti-Assay wurde jeweils der Prozentsatz intakter Kerne an der Gesamtzahl erfasster Ereignisse ermittelt. Bei allen Experimenten wurden aus drei unabhängigen Versuchen der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) gebildet. Die Signifikanz wurde durch einen ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test ermittelt, wobei p-Werte  $\leq 0,05$  als signifikant und  $\leq 0,01$  als hochsignifikant angesehen wurden. Die Analyse und Visualisierung der Impedanzmessungen erfolgte mit einer speziellen xCELLigence-Software (RTCA Software 1.2) und den unter 2.4 beschriebenen Berechnungsprinzipien. Alle Bilder wurden am Fluoreszenzmikroskop (Keyence BZ-9000) in 20-, 60- bzw. 100-facher Vergrößerung erstellt. Die initiale Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Hilfe der BZ-II Analyzer Software (Keyence), anschließend wurden die Bilder mit Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems, San Jose, USA) weiterverarbeitet und zusammengestellt. Die Textverarbeitung erfolgte mit Word 2007. Sämtliche Grafiken wurden mit Power Point 2007 erstellt. Die Verwaltung der Referenzen erfolgte mit Zotero 4.0.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 *Staphylococcus aureus* führt zu Veränderungen der transendothelialen elektrischen Impedanz

Um erste Erkenntnisse über den Einfluss der *S. aureus*-Infektion auf die Integrität einer dichten Endothelbarriere zu gewinnen, wurde die transendotheliale elektrische Impedanz analysiert. Hierzu wurden Veränderungen in der Impedanz konfluenter EA.hy926-Zellen nach Infektion untersucht.

Zunächst wurden konfluente EA.hy926-Zellen mit dem *S. carnosus*-Wildtyp TM300 und den heterolog mit *fnbA* bzw. *fnbB* komplementierten Stämmen TM300(pFNBA4) und TM300(pFNBB4) infiziert. *S. carnosus* gilt als apathogen und besitzt auch keine *S. aureus*-typischen Virulenzfaktoren [192]. Zwischen dem Wildtyp und den *fnb*-exprimierenden Transformanten zeigte sich ein deutlicher Unterschied (Abb. 6).

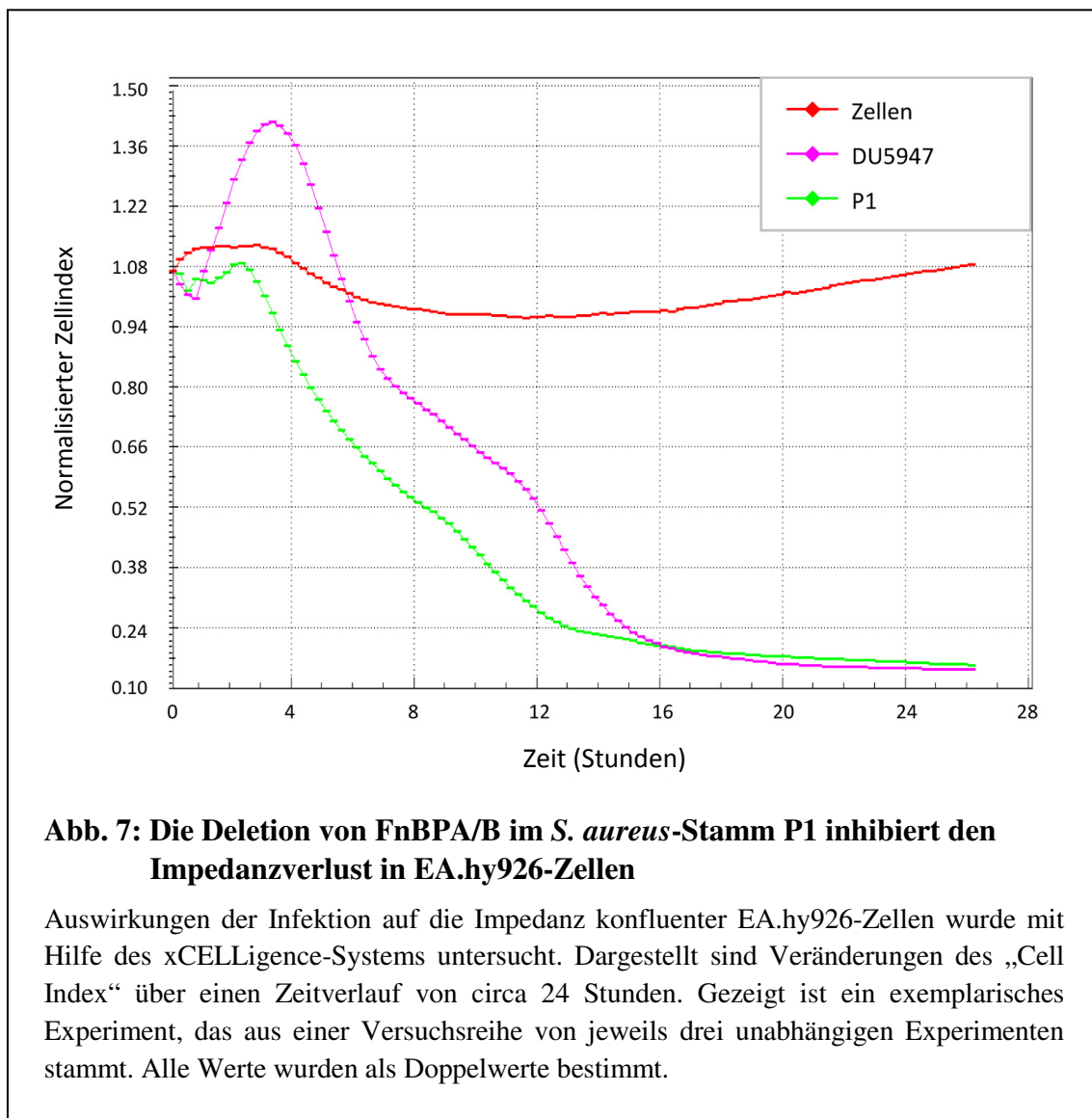


**Abb. 6: Die Expression von FnBPs im *S. carnosus*-Stamm TM300 führt zu einer Abnahme der transendothelialen Impedanz in EA.hy926-Zellen**

Auswirkungen der Infektion auf die Impedanz konfluenter EA.hy926-Zellen wurden mit Hilfe des xCELLigence-Systems untersucht. Dargestellt sind Veränderungen des „Cell Index“ über einen Zeitverlauf von circa 24 Stunden. Gezeigt ist ein exemplarisches Experiment, das aus einer Versuchsreihe von jeweils drei unabhängigen Experimenten stammt. Alle Werte wurden als Doppelwerte bestimmt.

Während die Kontrollzellen über einen Zeitraum von 24 Stunden eine weitgehend stabile Impedanz aufwiesen, führte TM300 anfänglich zu einem deutlichen Anstieg des Zell-Indexes. Das Maximum der Impedanz wurde nach circa sieben Stunden erreicht, anschließend kam es zu einem Abfall, sodass 18 Stunden *post infectionem* (*p. i*) auch der Zell-Index der Kontrollzellen unterschritten wurde. Die beiden transformanten Stämme TM300(pFNBA4) und TM300(pFNBB4) hingegen führten bereits initial zu einem starken Impedanzverlust.

In einem weiteren Experiment wurden EA.hy926-Zellen mit dem *fnb*-exprimierenden *S. aureus* Wildtypstamm P1 und dessen *fnbA/B*-defizienter Mutante DU5947 infiziert. Während P1 sofort einen Verlust der Impedanz bewirkte, verursachte DU5947 zunächst einen Impedanzanstieg. Sieben Stunden nach Infektion fiel das Impedanzniveau der mit DU5947 infizierten Zellen ebenfalls unter das der Kontrollzellen (Abb. 7).



**Abb. 7: Die Deletion von FnBPA/B im *S. aureus*-Stamm P1 inhibiert den Impedanzverlust in EA.hy926-Zellen**

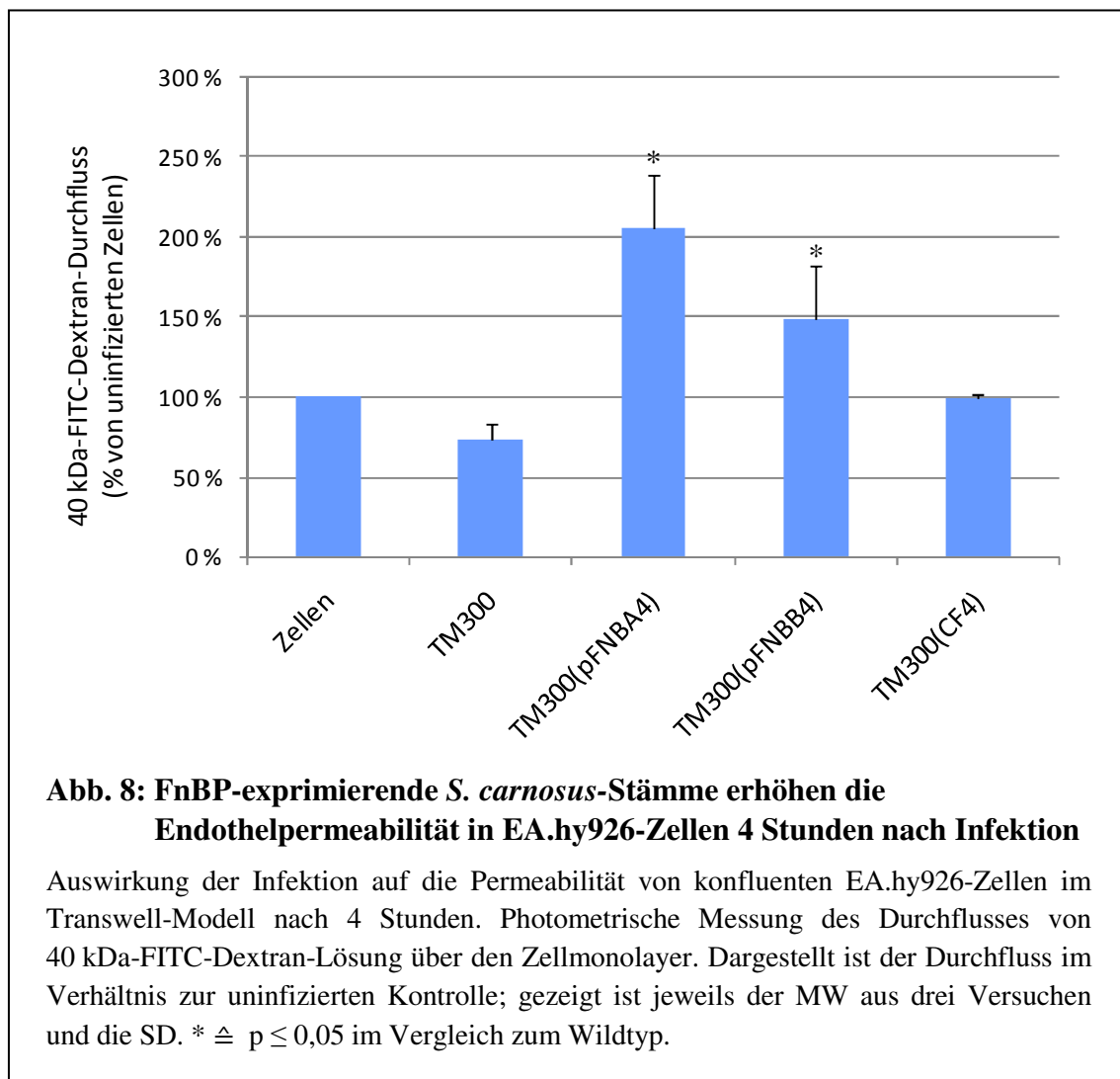
Auswirkungen der Infektion auf die Impedanz konfluenter EA.hy926-Zellen wurde mit Hilfe des xCELLigence-Systems untersucht. Dargestellt sind Veränderungen des „Cell Index“ über einen Zeitverlauf von circa 24 Stunden. Gezeigt ist ein exemplarisches Experiment, das aus einer Versuchsreihe von jeweils drei unabhängigen Experimenten stammt. Alle Werte wurden als Doppelwerte bestimmt.

Insgesamt zeigen die Impedanzmessungen, dass es *fnb*-abhängig zu einer Abnahme der transendothelialen elektrischen Impedanz kommt. Interessanterweise führte die Infektion mit den *fnb*-defizienten Stämme TM300 und DU5947 initial sogar zu einer Impedanzzunahme, bevor es ebenfalls zu einer Reduktion der Impedanz im Vergleich zu den Kontrollzellen kam.

### 3.2 *Staphylococcus aureus* FnBPs erhöhen die Endothelpermeabilität 4 und 24 Stunden nach Infektion

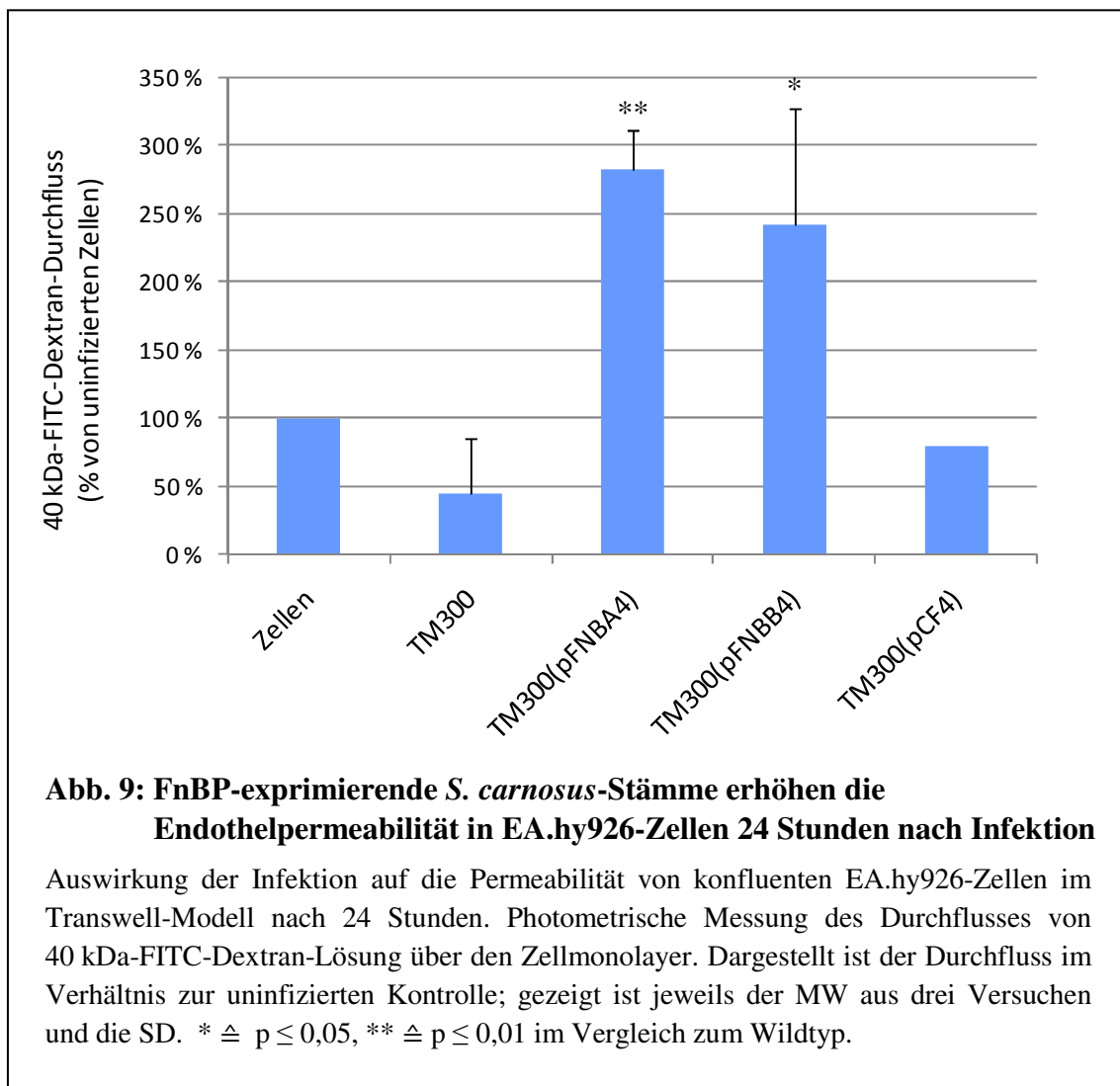
Veränderungen der transendothelialen Durchlässigkeit durch eine *S. aureus*-Infektion wurden mit Hilfe des Permeabilitätsassays untersucht.

Zunächst wurden Veränderungen der Endothelpermeabilität nach 4 Stunden erfasst (Abb. 8). Es erfolgte die Infektion von EA.hy926-Zellen mit dem apathogenen *S. carnosus*-Stamm TM300 sowie dessen *fnbA*- bzw. *fnbB*-Komplementanten, zusätzlich diente ein mit ClfA komplementierter TM300-Stamm als Kontrolle.



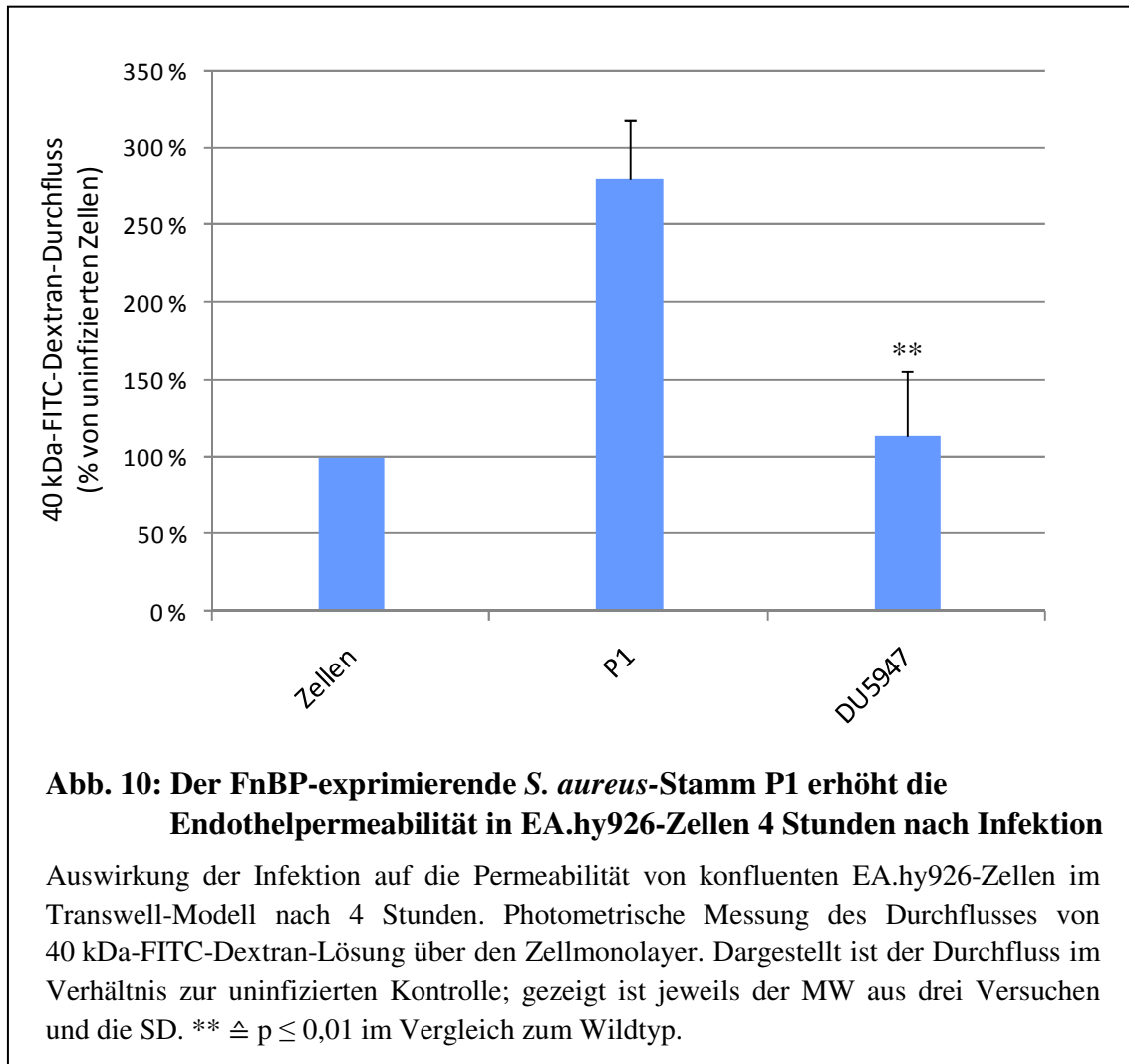
4 Stunden *p. i.* kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Endothelpermeabilität durch *fnb*-exprimierende TM300-Stämme. Während TM300 die Durchlässigkeit des Zellmonolayers stabilisierte, führten sowohl TM300(pFNBA4) als auch TM300(pFNBB4) zu einer signifikanten Erhöhung des FITC-Dextran-Durchflusses über der Endothelbarriere. TM300(pCF4) bewirkte wie der Wildtyp eine Abnahme der Permeabilität.

In einer weiteren Messreihe wurden Permeabilitätsveränderungen durch die gleichen Stämme nach 24 Stunden quantifiziert (Abb. 9). Es zeigte sich ebenfalls eine *fnb*-abhängige Erhöhung der Permeabilität. Während die *fnb*-exprimierenden Stämme TM300(pFNBA4) und TM300(pFNBB4) zu einem (hoch-)signifikanten Anstieg des transendothelialen Durchflusses führten, bewirkten der Wildtypstamm TM300 sowie TM300(pCF4) wie in der 4-Stunden-Messung eine Verminderung der Endotheldurchlässigkeit.





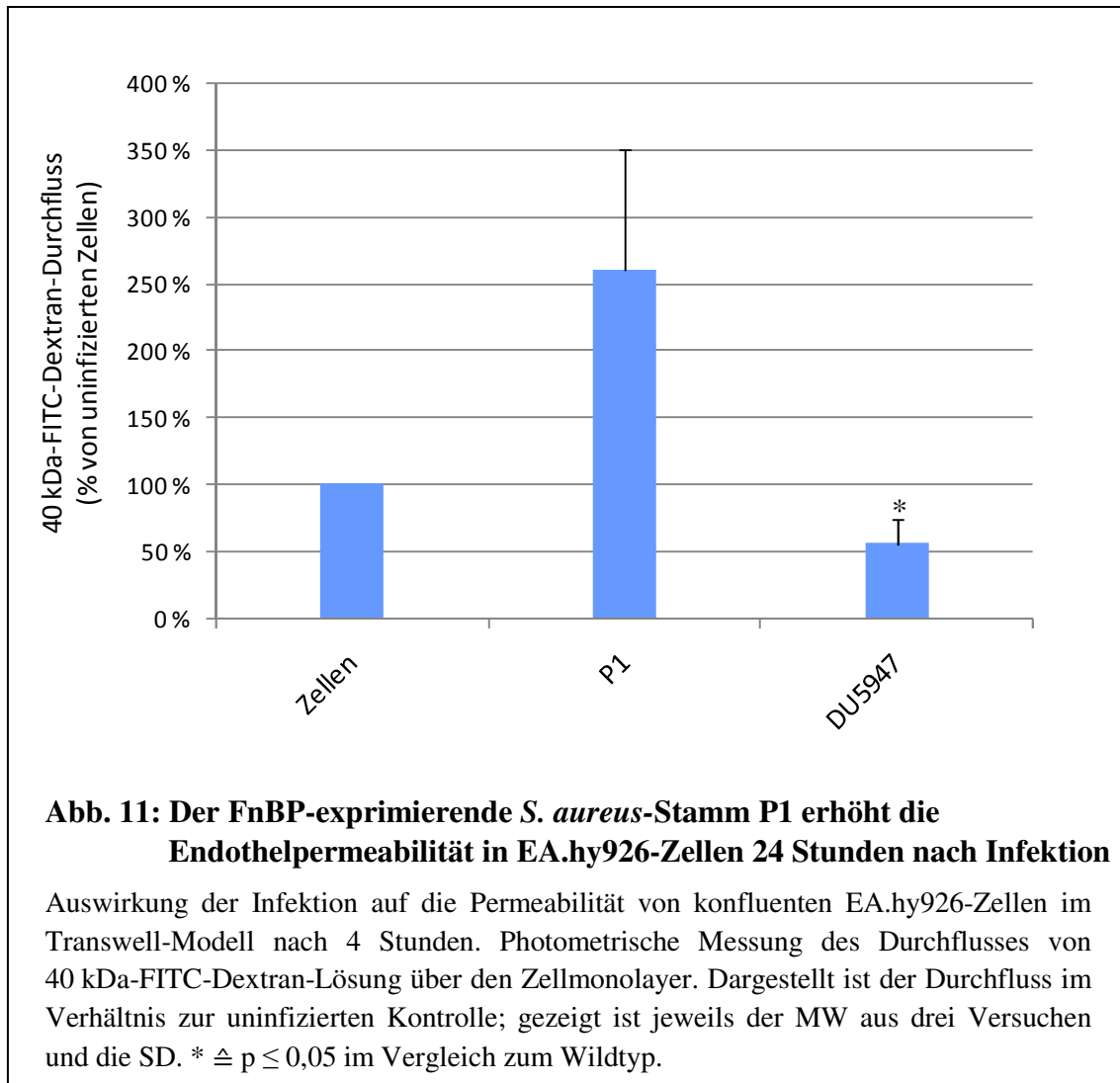
Die Versuchsreihe wurde mit dem *S. aureus*-Wildtypstamm P1 und der dazugehörigen Knock out-Mutante DU5947 wiederholt (Abb. 10). 4 Stunden nach Infektion mit P1 stieg die Endothelpermeabilität im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich an. DU5947 hingegen verursachte eine hochsignifikante Abnahme der FITC-Dextran-Diffusion im Vergleich zum Wildtyp.



**Abb. 10: Der FnBP-exprimierende *S. aureus*-Stamm P1 erhöht die Endothelpermeabilität in EA.hy926-Zellen 4 Stunden nach Infektion**

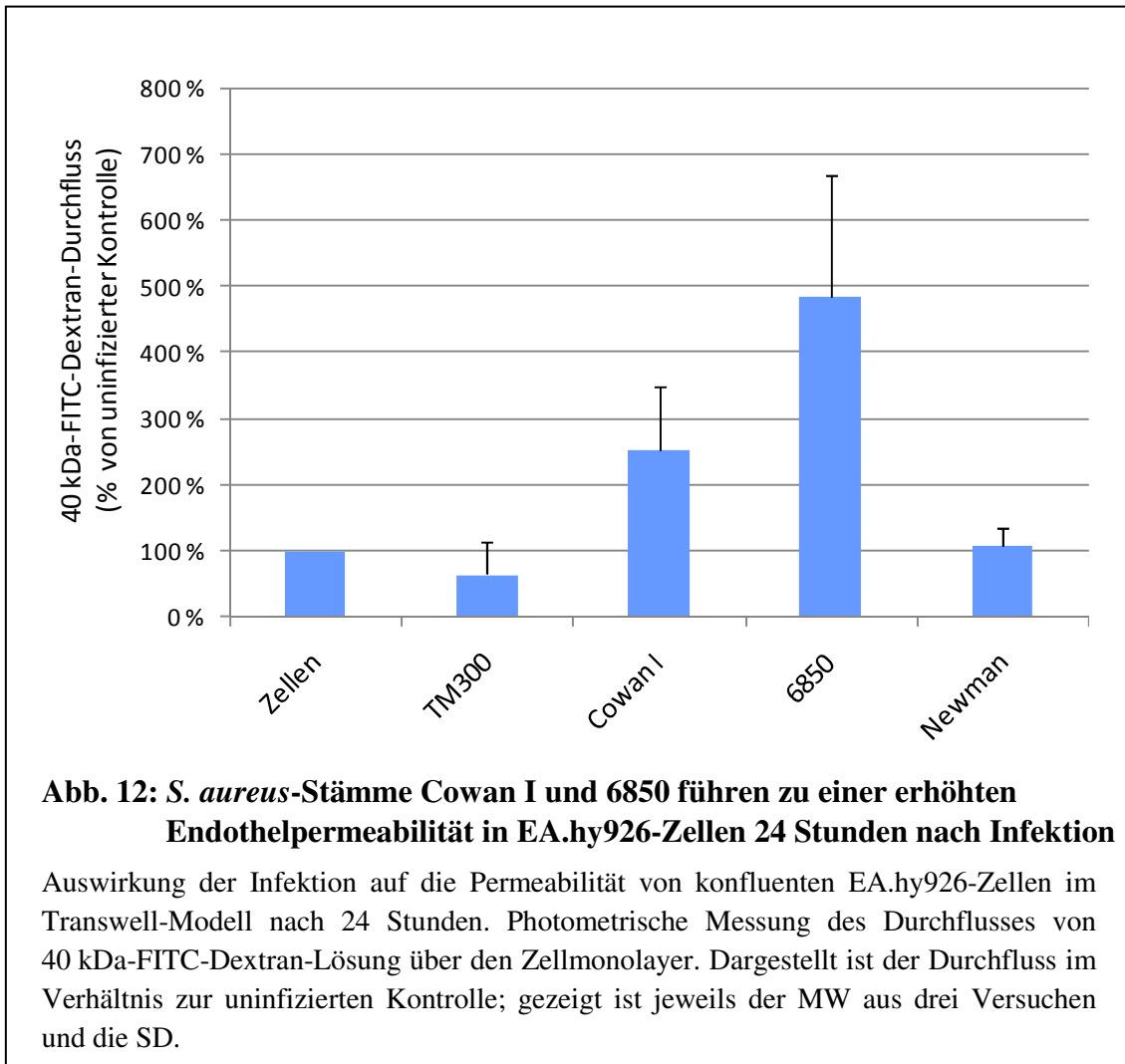
Auswirkung der Infektion auf die Permeabilität von konfluenten EA.hy926-Zellen im Transwell-Modell nach 4 Stunden. Photometrische Messung des Durchflusses von 40 kDa-FITC-Dextran-Lösung über den Zellmonolayer. Dargestellt ist der Durchfluss im Verhältnis zur uninfizierten Kontrolle; gezeigt ist jeweils der MW aus drei Versuchen und die SD. \*\*  $\triangleq p \leq 0,01$  im Vergleich zum Wildtyp.

Auch nach 24 Stunden bewirkte P1 einen deutlichen Anstieg der transendothelialen Permeabilität. DU5947 wiederum führte zu einer signifikanten Reduktion des FITC-Dextran-Durchflusses im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 11).



Neben den Stämmen TM300 und P1 und deren *fnb*-Komplementanten bzw. -Mutanten wurden in weiteren Experimenten verschiedene *S. aureus*-Wildtypstämme zur Infektion verwendet und der FITC-Dextran-Durchfluss nach 24 Stunden gemessen (Abb. 12). 6850 und Cowan I bewirkten eine deutliche Erhöhung der Endothelpermeabilität im Vergleich zu den nicht infizierten Zellen, Newman hingegen zeigte keinen Effekt. TM300 führte wiederum zu einer leichten Stabilisierung des Zellmonolayers. Sowohl Cowan I als auch 6850 und Newman exprimieren Gene, die sowohl für FnBPA als auch für FnBPB kodieren. Newman unterscheidet sich aber dahingehend, dass sowohl *fnbA* als auch *fnbB* im Bereich der C-Domäne ein Stopcodon besitzen. Dies führt zu einem frühzeitigen Abbruch der FnBP-Synthese, was einen Verlust integraler FnBP-

Funktionen wie zum Beispiel Adhärenz an Fibronectin oder Wirtszellinvasion zur Folge hat [193]. 6850 besitzt im Vergleich zu den anderen verwendeten Stämmen zusätzlich noch verschiedene Hämolyse, unter anderem  $\alpha$ -Toxin.  $\alpha$ -Toxin gilt als einer von mehreren wichtigen Faktoren in der *S. aureus*-vermittelten Induktion von Apoptose in Endothelzellen [194].



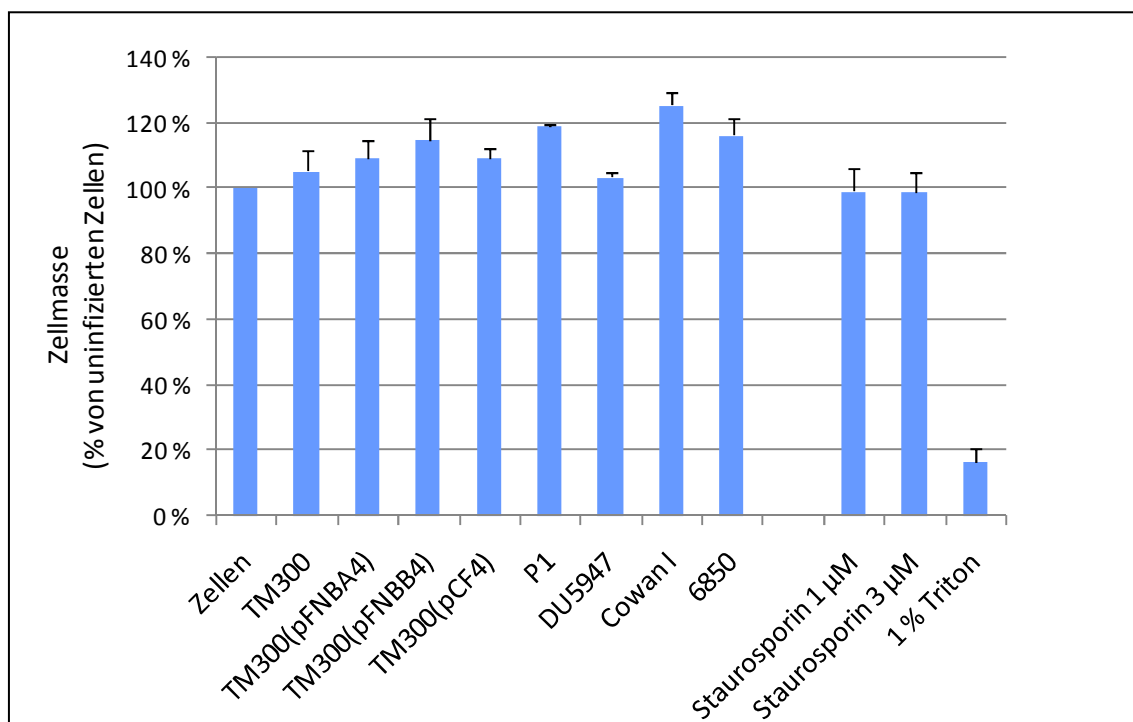
In der Zusammenschau belegen die Permeabilitätsmessungen, dass es durch die funktionelle Expression von FnBPs zu einem Anstieg der transendothelialen Permeabilität nach 4 und 24 Stunden kommt. *fnb*-defiziente Stämme oder solche mit Defekten in der FnBP-Synthese hingegen bewirkten keine Veränderungen der Durchlässigkeit bzw. führten zum Teil sogar zu einer zusätzlichen Stabilisierung der Endothelbarriere.

### 3.3 Apoptotische Effekte durch *Staphylococcus aureus* FnBPs spielen eine Rolle in der Permeabilitätserhöhung nach 24 Stunden, nicht aber nach 4 Stunden

Zur Erfassung relevanter zytotoxischer Effekte für die Beschädigung der endothelialen Integrität wurden mit den bereits im Permeabilitätsassay verwendeten Stämmen verschiedene Zelltod-Untersuchungen durchgeführt.

#### Kristallviolett-Assay

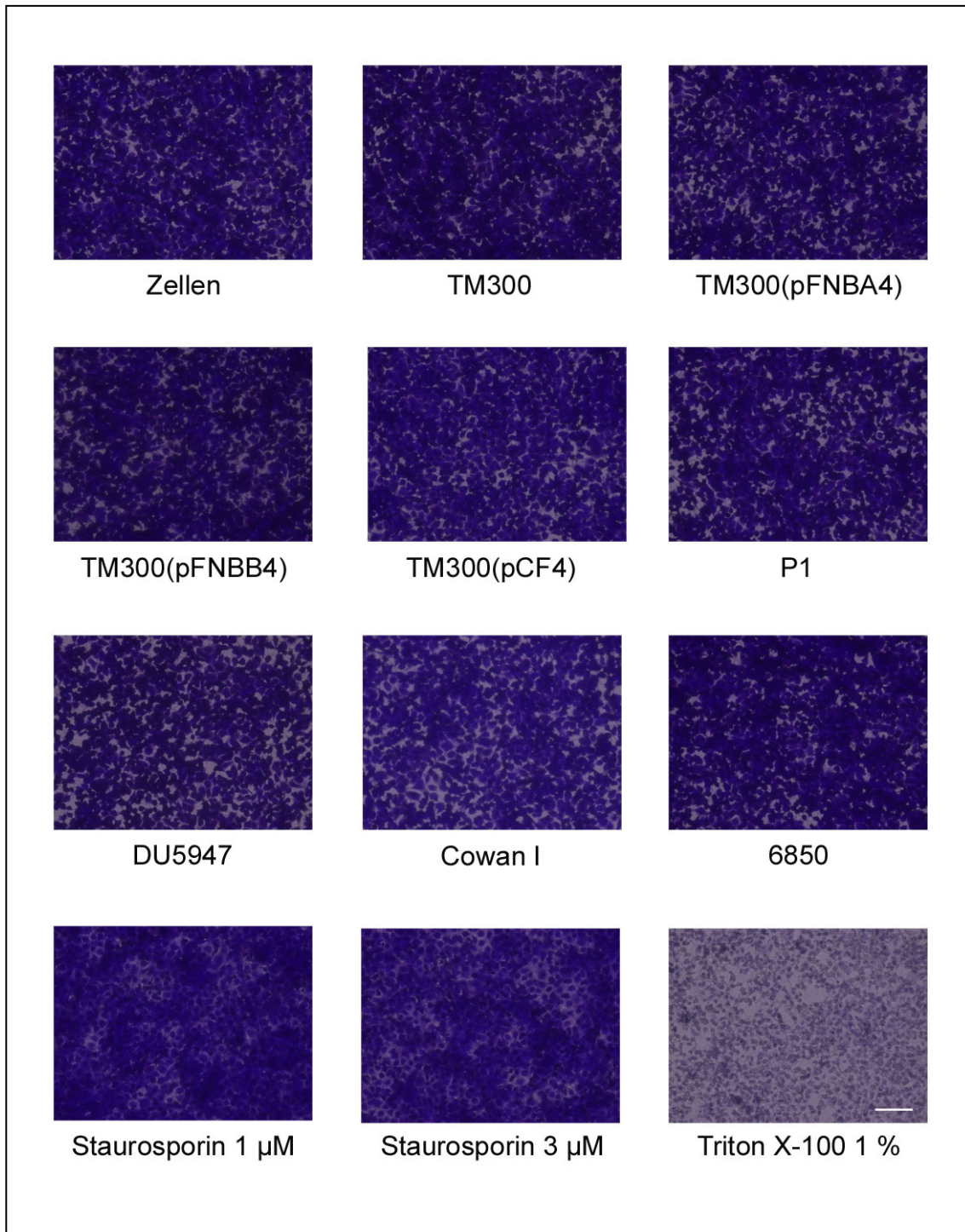
Im Kristallviolett-Assay diente die verbleibende Zellmasse nach Infektion als Marker für Zelltod. In der ersten Messung nach 4 Stunden führte die Kontrolle mit Triton X-100 durch Zelllyse zu einem starken Verlust von Zellmasse um 83 %. Die Staurosporin-behandelten Zellen hingegen waren noch intakt, da ein Zeitraum von 4 Stunden für die Aktivierung von Caspasen und somit für die Induktion von Apoptose nicht ausreichend ist [195]. Die gemessene Kristallviolettabsorption der infizierten Zellen unterschied sich nicht von der der Kontrollzellen, sodass die Kristallviolett-Färbung keinen Hinweis auf einen bereits eingetretenen Verlust von Zellen nach 4 Stunden lieferte (Abb. 13).



**Abb. 13: Mit FnBP-exprimierenden *S. aureus*- und *S. carnosus*-Stämmen infizierte EA.hy926-Zellen weisen keinen Verlust von Zellmasse 4 Stunden nach Infektion auf**

Auswirkung der Infektion auf die Zellmasse von konfluenten EA.hy926-Zellen im Kristallviolett-Assay. Photometrische Messung der Absorption des eluierten Farbstoffes nach 4 Stunden am Mikroplatten-Reader. Dargestellt ist die verbliebene Zellmasse im Verhältnis zur uninfizierten Kontrolle; gezeigt ist jeweils der MW aus drei Versuchen und die SD.

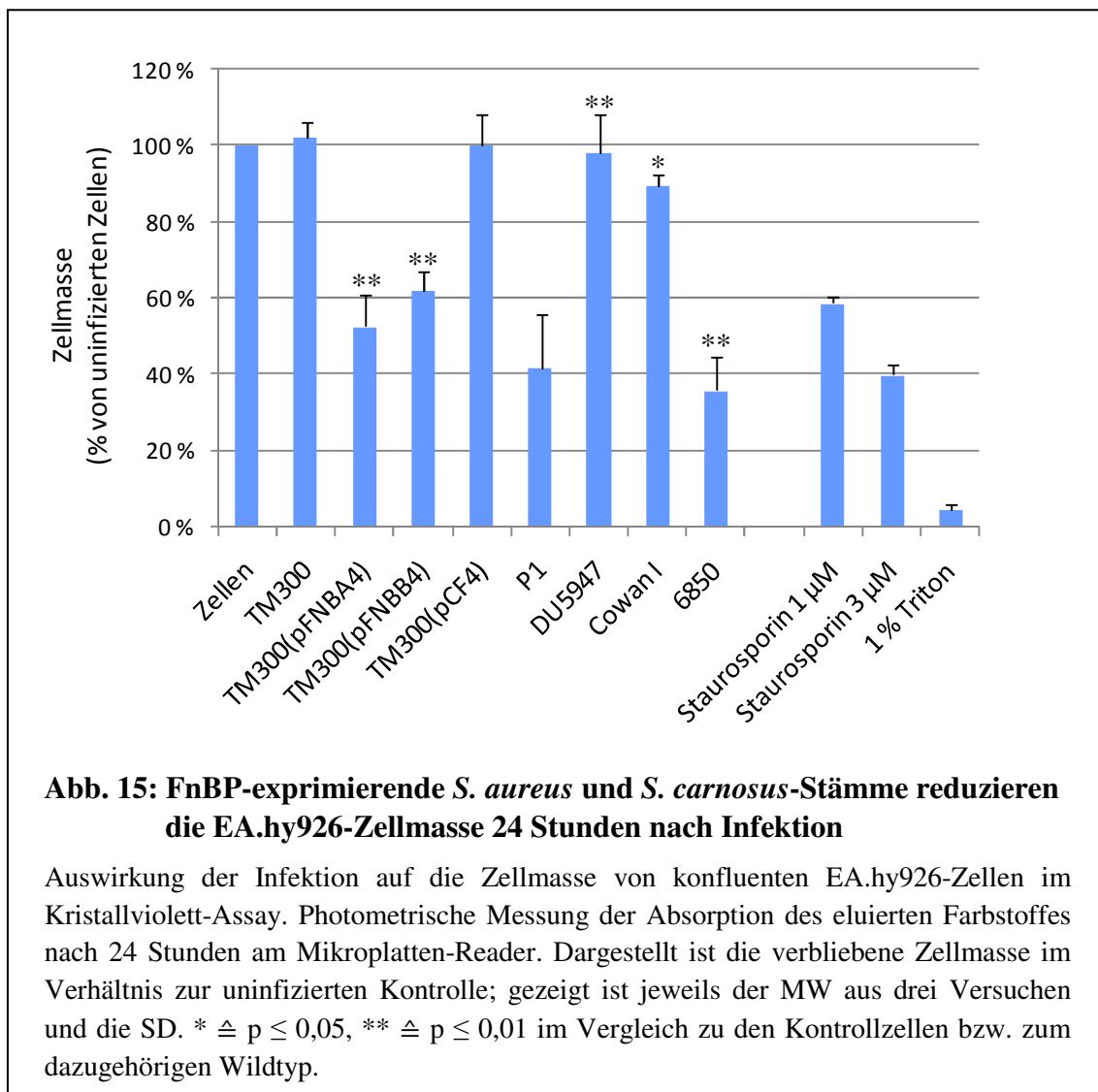
Zur Verifizierung der Messergebnisse erfolgte eine bildmorphologische Analyse der verbliebenen Zellmasse nach 4 Stunden mittels Lichtmikroskopie. Auch hier zeigte sich bei allen infizierten Zellen eine ähnlich hohe Zellzahl wie bei den Kontrollzellen (Abb. 14).



**Abb. 14: Mikroskopie von kristallviolettgefärbten EA.hy926-Zellen zeigt keine Unterschiede in der Zellzahl 4 Stunden nach Infektion mit *S. aureus* und *S. carnosus***

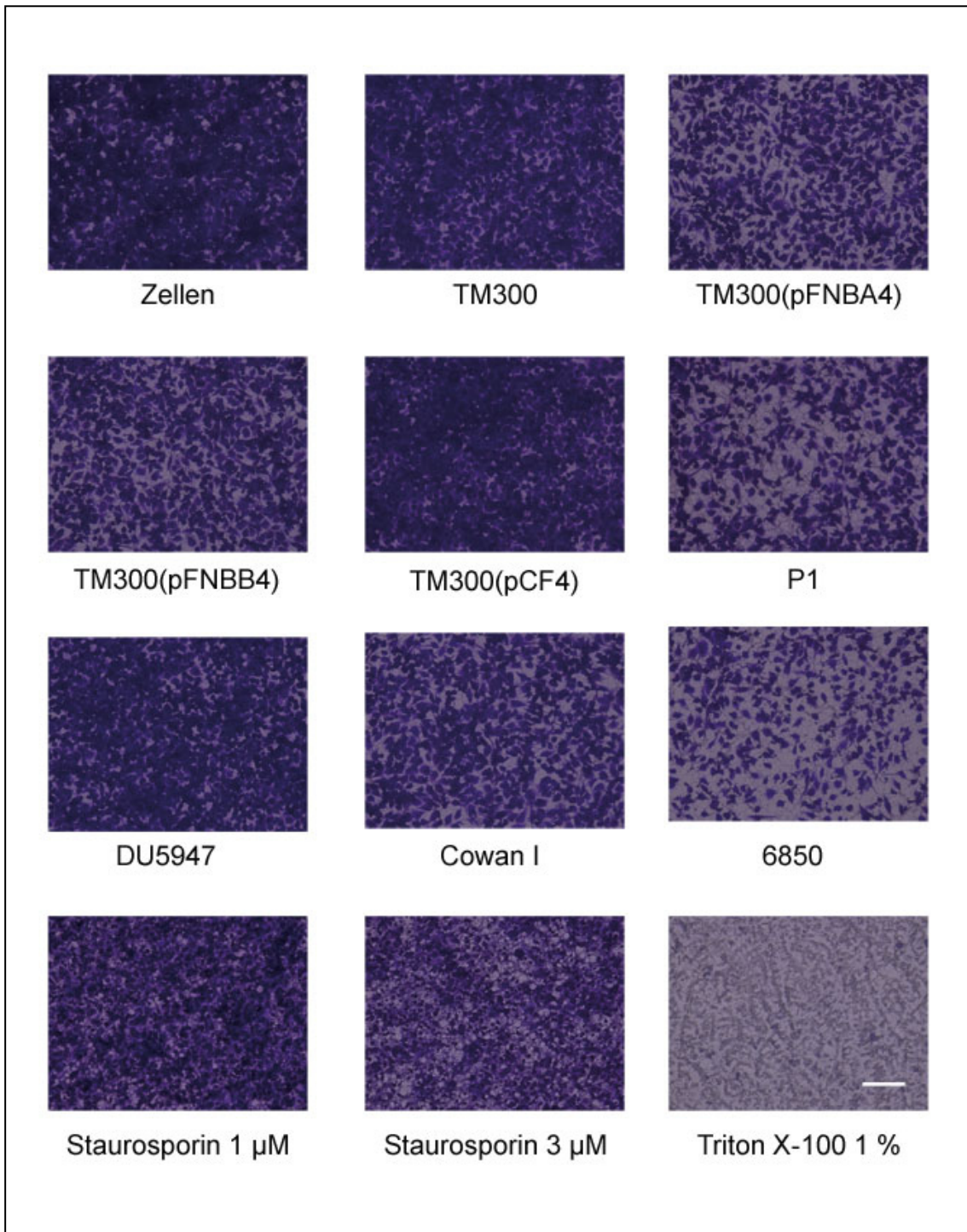
Auswirkung der Infektion auf die Zellmasse von konfluenten EA.hy926-Zellen nach Kristallviolett-färbung. Exemplarische mikroskopische Bilder der mittleren Zelldichte. Maßstab: 100  $\mu\text{m}$

Der Verlust von Zellmasse 24 Stunden *p. i.* wurde in einer zweiten Versuchsreihe analysiert (Abb. 15). Die Kontrollen mit Staurosporin und Triton X-100 führten erwartungsgemäß durch Apoptoseinduktion bzw. durch Zellyse zu einer Reduktion der Zellmasse um 41 bis 96 %. Die Infektion mit den *fnb*-exprimierenden Stämmen TM300(pFNBA4), TM300(pFNBB4), P1 und Cowan I sowie dem zusätzlich  $\alpha$ -Toxin produzierendem Stamm 6850 führten zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl nach 24 Stunden. Die *fnb*-defizienten Stämme TM300, TM300(pCFA) und DU5947 hingegen bewirkten keine Reduktion der Zellmasse im Vergleich zu den Kontrollzellen.



Auch lichtmikroskopisch zeigte sich 24 Stunden *p. i.* eine deutliche Abnahme der Zellmasse nach Infektion mit FnBP-produzierenden Stämmen (Abb. 16).

Die Absorptionsmessungen und bildmorphologischen Untersuchungen des Kristallviolett-Assays ergeben zusammenfassend, dass es zwar 24 Stunden nach Infektion zu einem FnBP-abhängigen Verlust von Zellmaterial kommt, nicht aber nach 4 Stunden.



**Abb. 16: Mikroskopie von kristallviolettgefärbten EA.hy926-Zellen zeigt eine Abnahme der Zellzahl durch FnBP-produzierende *S. aureus*- und *S. carnosus*-Stämme 24 Stunden nach Infektion**

Auswirkung der Infektion auf die Zellmasse von konfluenten EA.hy926-Zellen nach Kristallviolett-färbung. Exemplarische mikroskopische Bilder der mittleren Zelldichte. Maßstab: 100 µm



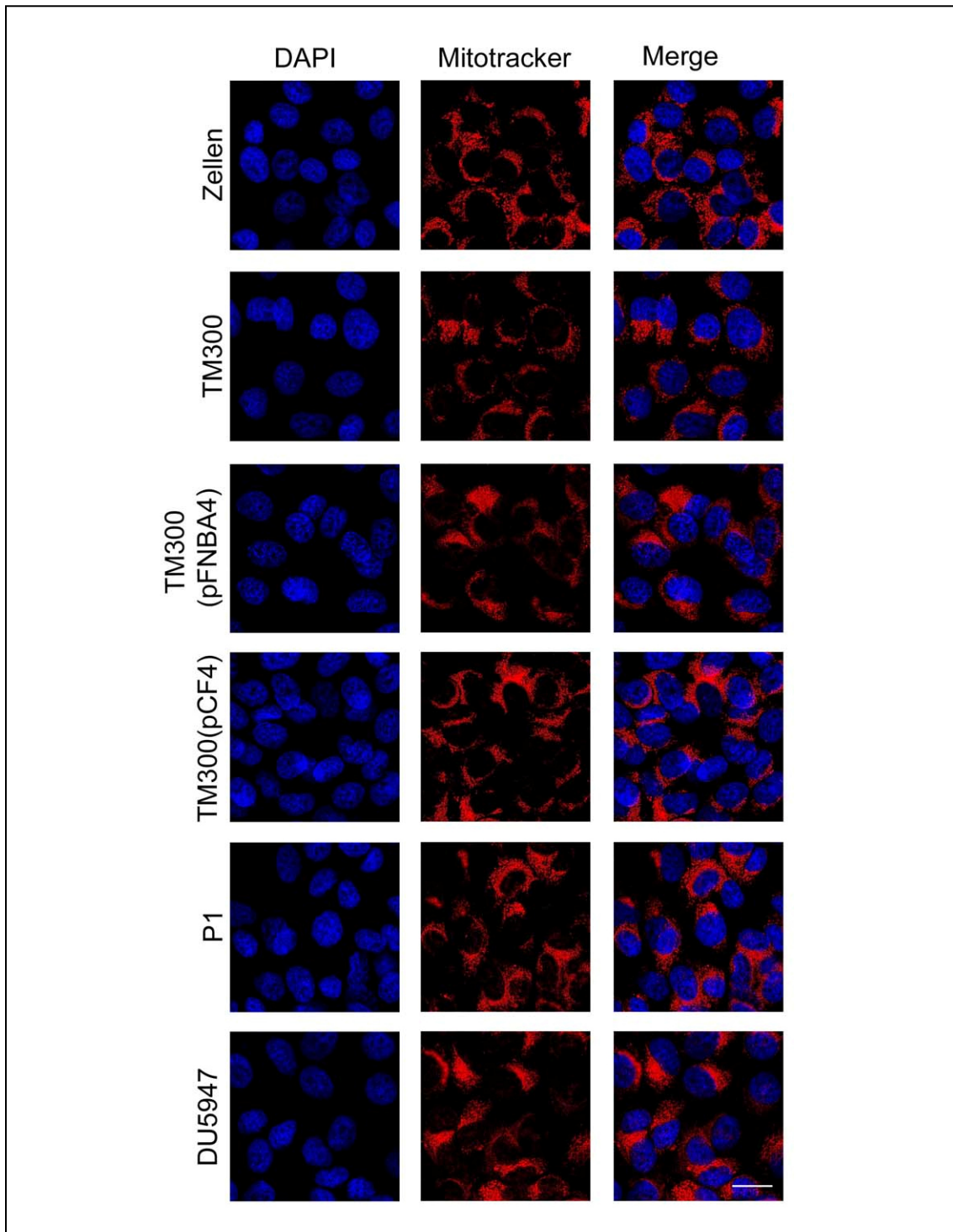
#### **Mitotracker-Färbung**

Zytotoxische Effekte von *S. aureus* wurden des Weiteren anhand von Veränderungen des mitochondrialen Membranpotenzials untersucht. Hierzu wurden die infizierten Zellen mit Mitotracker und DAPI gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. In frühen Stadien der Apoptose kommt es zu einer veränderten Permeabilität der Mitochondrienmembranen sowie zu einem Zusammenbruch des Transmembranpotenzials. Im weiteren Verlauf tritt typischerweise eine Chromatinkondensation und eine Fragmentierung der DNA auf [196]. Diese Veränderungen spiegeln sich in veränderten Mitotracker- bzw. DAPI-Signalen wider.

4 Stunden *p. i.* zeigte sich bei den Kontrollzellen sowie bei allen infizierten Zellen eine ähnliche Gesamtzellzahl sowie das typische Bild intakter Mitochondrien und Nuklei (Abb. 17). In allen Mitochondrien reicherte sich das Mitotracker-Signal gleichmäßig verteilt an einem Zellpol an. Eine beginnende Karyorrhexis war nicht zu erkennen.

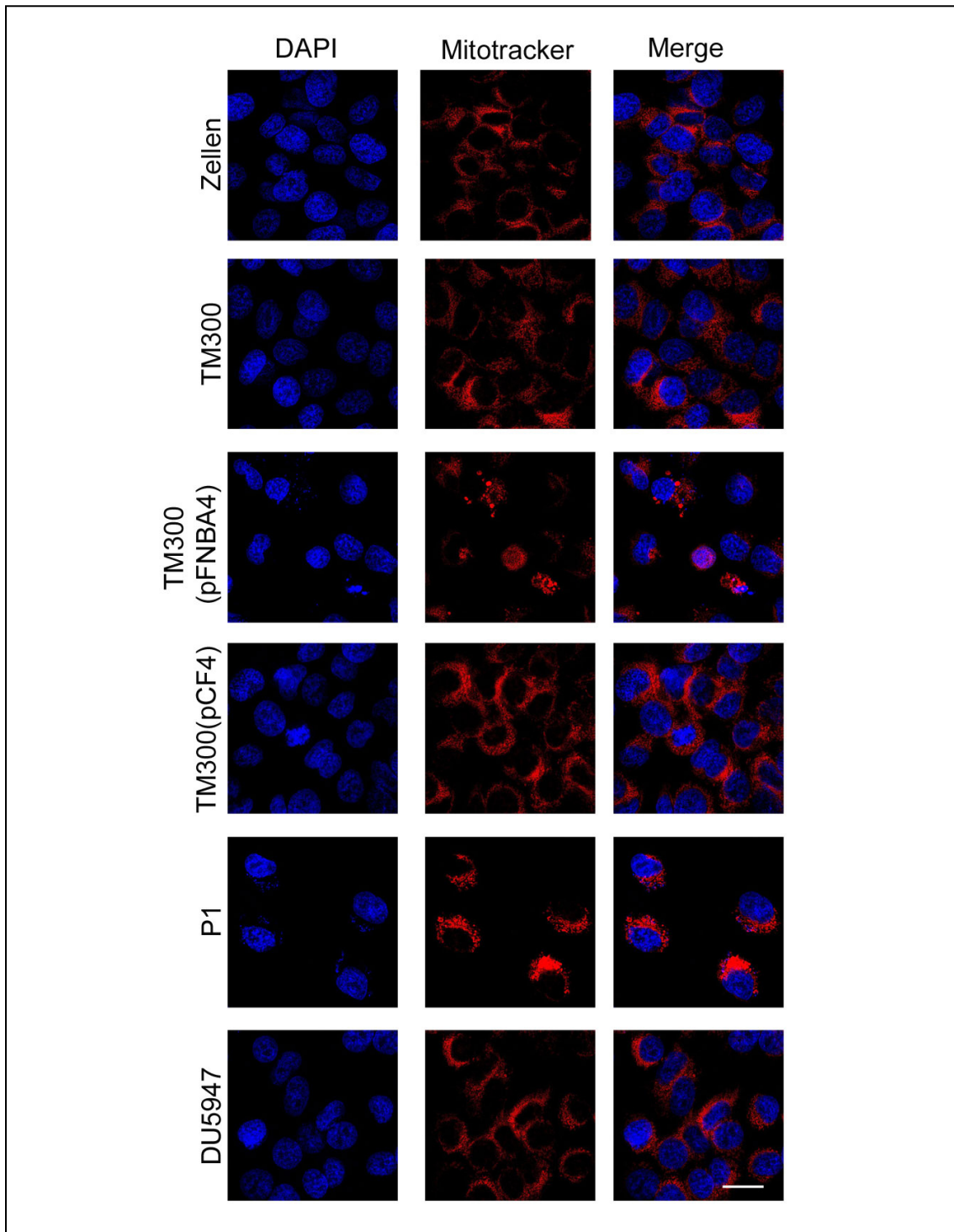
Nach 24 Stunden zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den mit verschiedenen Stämmen infizierten Zellen (Abb. 18). Während die Kontrollzellen sowie die mit TM300, TM300(pCF4) und DU5947 infizierten Zellen keine morphologischen Veränderungen aufwiesen, führten TM300(pFNBA4) und P1 zu einer deutlichen Beschädigung der zellulären Integrität. Es kam zu einer Reduktion der Gesamtzellzahl; in den noch adhären Zellen war das Mitotracker-Signal nicht mehr randständig lokalisiert, sondern diffus über die gesamte Zelle verteilt. Stellenweise bildeten sich Mitotracker-Konglomerate. Eine beginnende Fragmentierung des Zellkerns war bei beiden Stämmen deutlich zu erkennen.

Auch die Immunfluoreszenzfärbung mit Mitotracker und DAPI ergab somit, dass es nach 4 Stunden noch nicht zu einem zytotoxischen Effekt durch die Infektion gekommen war. 24 Stunden nach Infektion hingegen fanden sich deutlich Hinweise auf die Induktion von Apoptose durch FnBP-exprimierende Stämme.



**Abb. 17: EA.hy926-Zellen zeigen 4 Stunden nach Infektion keine Veränderungen des Mitochondrienpotenzials oder der Zellkerne in der Immunfluoreszenz**

Auswirkung der Infektion auf die Integrität der Zellkerne und Mitochondrien konfluenten EA.hy926-Zellen nach Infektion. Exemplarische mikroskopische Bilder. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$

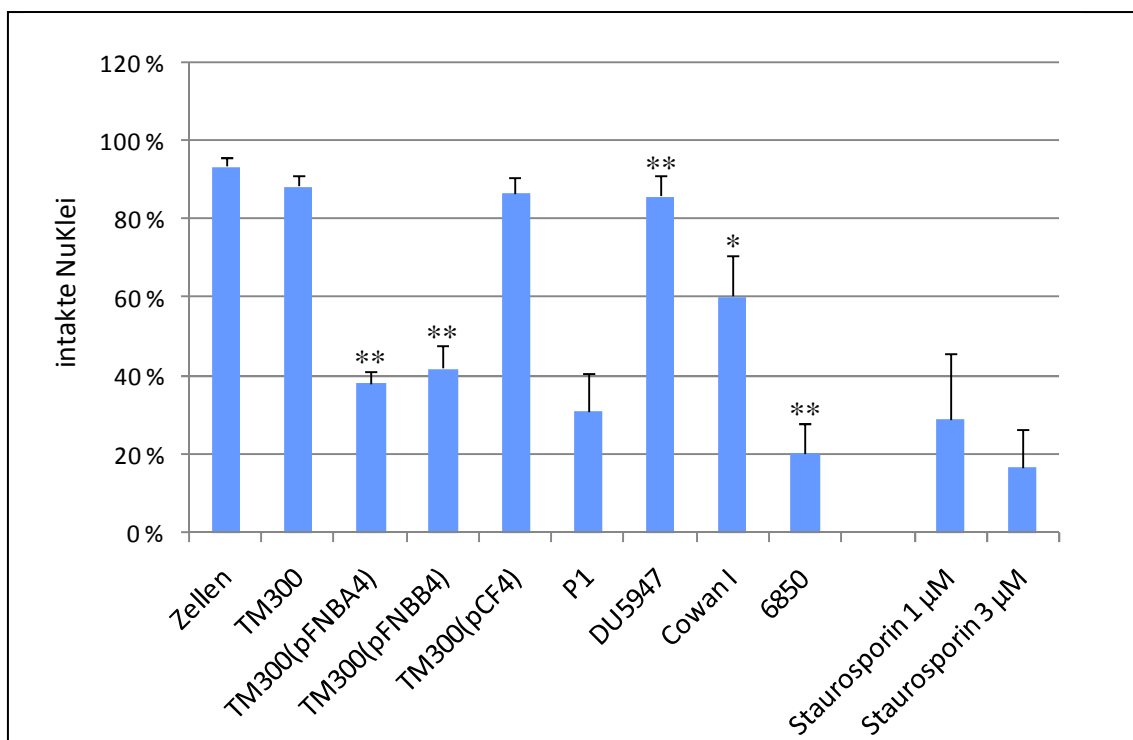


**Abb. 18: FnBP-produzierende *S. aureus*- und *S. carnosus*-Stämme bewirken eine Schädigung der mitochondrialen und nukleären Integrität in EA.hy926-Zellen 24 Stunden nach Infektion**

Auswirkung der Infektion auf die Integrität der Zellkerne und Mitochondrien konfluenten EA.hy926-Zellen nach Infektion. Exemplarische mikroskopische Bilder. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$

### Nicoletti-Assay

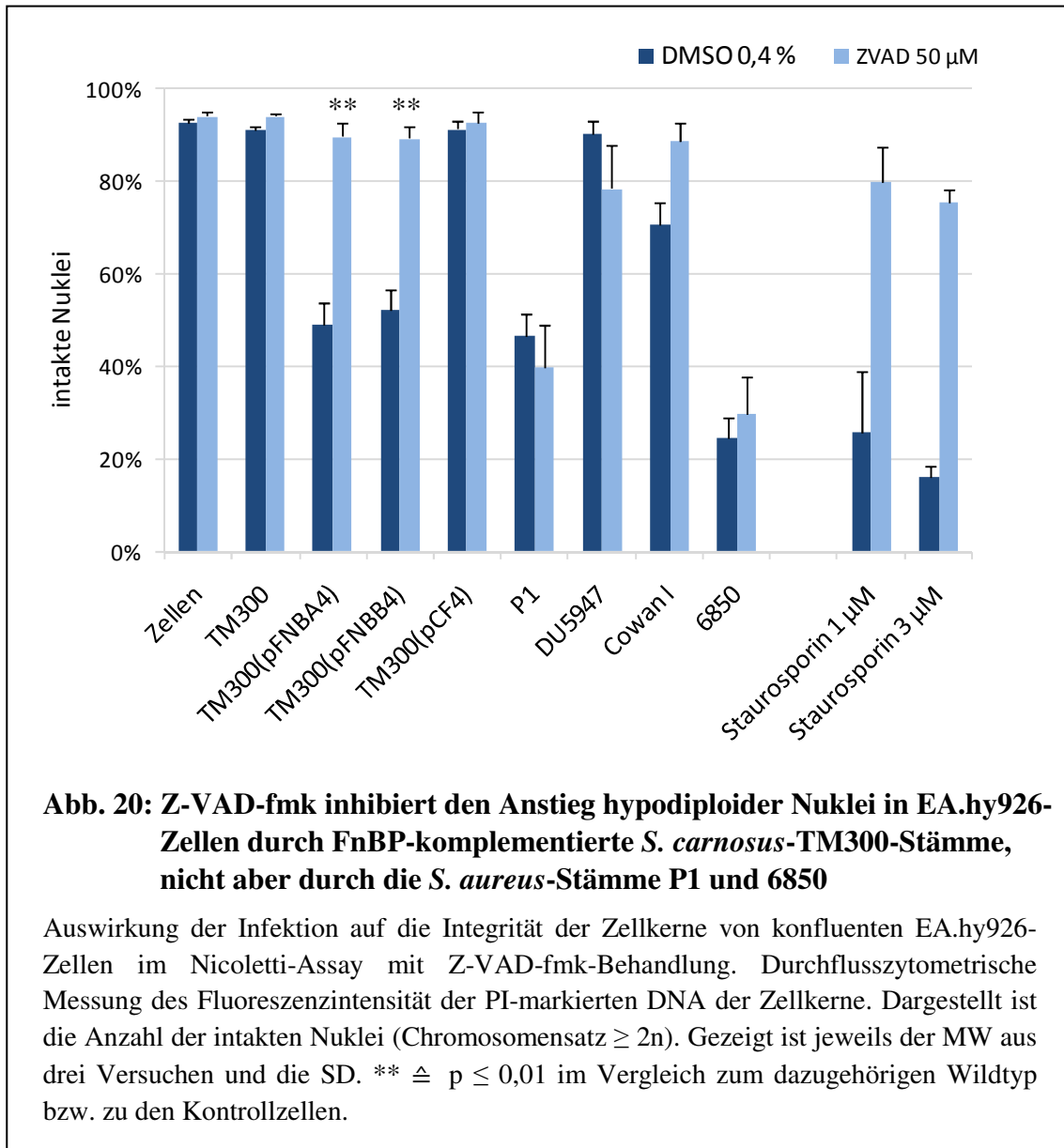
Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurde als dritter Viabilitätstest der Nicoletti-Assay 24 Stunden *p. i.* durchgeführt (Abb. 19). Im Nicoletti-Assay kann die DNA-Fragmentierung quantifiziert und somit Apoptose nachgewiesen werden. Da die Fragmentierung des Zellkerns als später Schritt der Apoptose ein gewisses Zeitfenster benötigt [197], war eine Durchführung nach 4 Stunden nicht sinnvoll. Die mit Staurosporin behandelten Zellen wiesen ein um bis zu 83 % reduziertes PI-Signal nach 24 Stunden auf. Von den Kontrollzellen zeigten circa 93 % noch eine intakte Integrität der Nuklei. Ähnliche Werte wurden in den mit TM300, TM300(pCFA) und DU5947 infizierten Zellen gemessen. Der Anteil hypodiploider Nuklei in allen anderen Stämmen zeigte einen (hoch-)signifikanten Unterschied zu den Kontrollzellen bzw. zum dazugehörigen Wildtyp. Somit bestätigte der Nicoletti-Assay die bereits im Kristallviolett-Assay und in der Mitotracker-Färbung erzielten Ergebnisse, dass FnBPs in der Lage sind Apoptose zu induzieren.



**Abb. 19: Expression von FnBPs in *S. aureus* und *S. carnosus* erhöht die Anzahl hypodiploider Nuklei in EA.hy926-Zellen 24 Stunden nach Infektion**

Auswirkung der Infektion auf die Integrität der Zellkerne von konfluenten EA.hy926-Zellen im Nicoletti-Assay. Durchflusszytometrische Messung der Fluoreszenzintensität der PI-markierter DNA der Zellkerne. Dargestellt ist die Anzahl der intakten Nuklei (Chromosomensatz  $\geq 2n$ ). Gezeigt ist jeweils der MW aus drei Versuchen und die SD. \*  $\triangleq p \leq 0,05$ , \*\*  $\triangleq p \leq 0,01$  im Vergleich zu den Kontrollzellen bzw. zum dazugehörigen Wildtyp.

Da FnBPs in der Literatur typischerweise nicht als Apoptoseinduktoren beschrieben werden, wurde der Nicoletti-Assay nochmals in Anwesenheit des Pan-Caspase-Inhibitors Z-VAD-fmk durchgeführt (Abb. 20). Hierdurch sollten erste Hinweise über den Mechanismus der Zelltodinduktion gewonnen werden. Z-VAD-fmk inhibierte die Apoptoseinduktion durch die Stämme TM300(pFNBA4), TM300(pFNBB4) und Cowan I. Die Anzahl intakter Nuklei in den mit P1 und 6850 infizierten Zellen hingegen konnte durch die Z-VAD-fmk-Behandlung nicht gesteigert werden.



In der Zusammenschau zeigen die Ergebnisse der Zytotoxizitätsassays, dass die Endothelzellen 4 Stunden nach Infektion noch viabel sind, es nach 24 Stunden aber zum Eintritt von Apoptose durch FnBPs kommt. Somit ist ein apoptotischer Zellverlust keine Erklärung für die FnBP-vermittelte Permeabilitätserhöhung 4 Stunden nach Infektion.

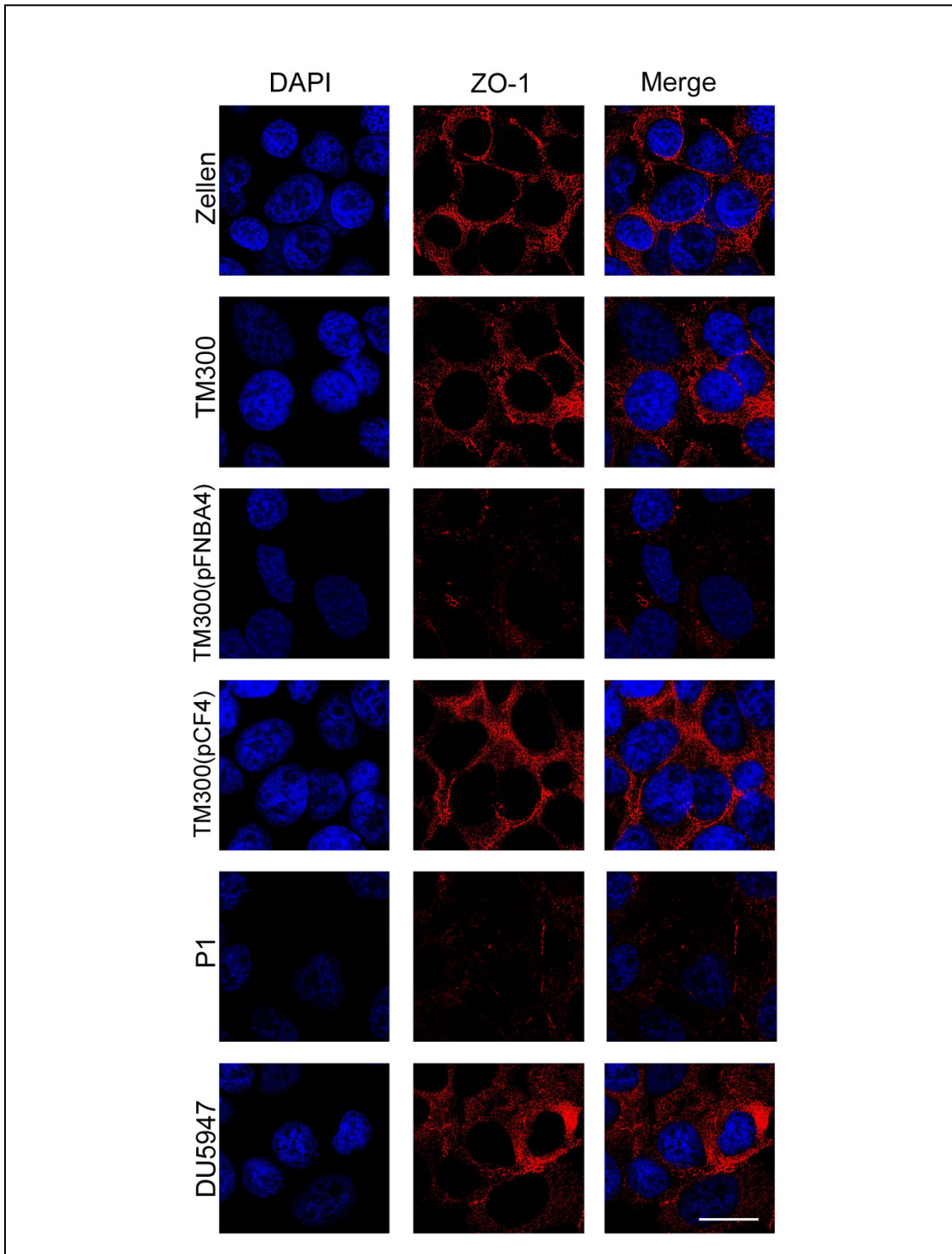
### **3.4 *Staphylococcus aureus* FnBPs bewirken eine Reduktion der Signalintensität von ZO-1 und VE-Cadherin in Endothelzellen 4 Stunden nach Infektion**

Da es 4 Stunden nach der Infektion mit FnBP-exprimierenden Stämmen zu einer erhöhten Endothelpermeabilität, nicht aber zu zytotoxischen Effekten kam, sollte der hierfür verantwortliche Mechanismus untersucht werden. In der Literatur ist beschrieben, dass sowohl Tight als auch Adherens Junctions wichtig für die Regulierung der vaskulären Permeabilität sind [198, 199]. Um zu überprüfen, ob Veränderungen von Zell-Zell-Verbindungen eine Rolle in der Erhöhung der endothelialen Durchlässigkeit spielen, wurden 4 Stunden *p. i.* exemplarisch die Proteine VE-Cadherin und ZO-1 mit indirekter Immunfluoreszenz dargestellt.

Nach Anfärbung konfluenter EA.hy926-Zellen gegen ZO-1, zeigte sich in uninfizierten Zellen ein deutliches ZO-1-Signal entlang der Zellgrenzen (Abb. 21). Ein ähnliches Bild zeigten alle Zellen, die mit den Stämmen TM300, TM300(pCF4) und DU5947 infiziert wurden. TM300(pFNBA4) und P1 hingegen bewirkten eine deutliche Abschwächung der ZO-1-Signalintensität. Eine Umverteilung ins Zytoplasma konnte nicht beobachtet werden.

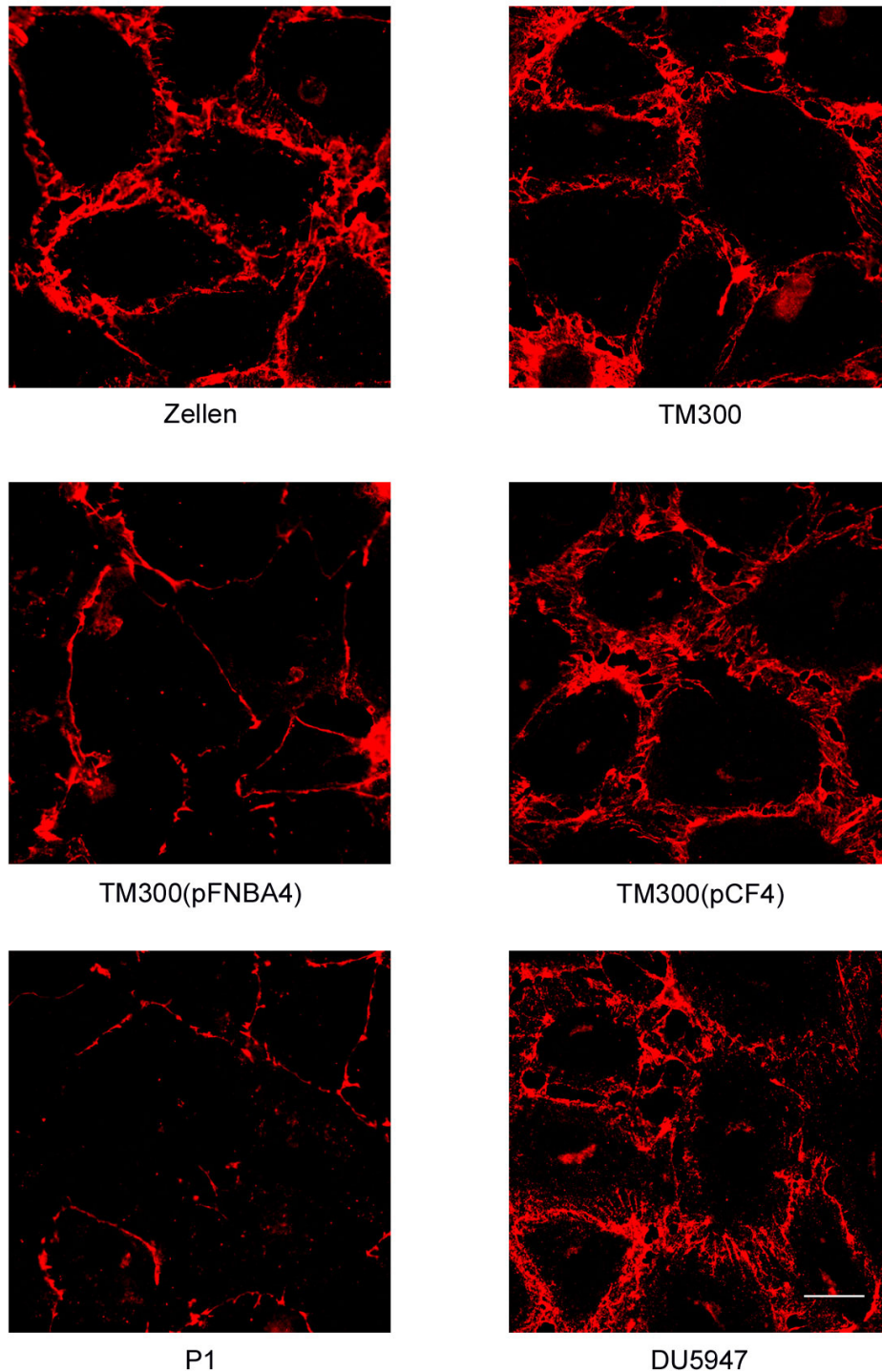
Da sich VE-Cadherin trotz Verwendung verschiedener Antikörper und Erprobung unterschiedlicher Versuchsbedingungen in EA.hy926-Zellen nicht reproduzierbar darstellen ließ, wurden hierfür zusätzlich primäre humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC) verwendet (Abb. 22). Auch in der VE-Cadherin-Färbung wiesen die Kontrollzellen ein deutliches Signal entlang der Zellgrenzen auf. *fnb*-defiziente Stämme verursachten keine Abschwächung der VE-Cadherin-Signalintensität. Nach Infektion mit den *fnb*-exprimierenden Stämmen P1 und TM300(pFNBA4) wiederum kam es zu einer Abnahme der Signalintensität, einer Verschmälerung des VE-Cadherin-Signals sowie zur Lückenbildung. Es kam nicht zu einer Umverteilung von VE-Cadherin in andere Zellkompartimente.

Insgesamt zeigte die immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zell-Zell-Verbindungsproteine, dass *S. aureus* FnBPs eine Reduktion der ZO-1- und VE-Cadherin-Signalintensität nach 4 Stunden bewirkten. *fnb*-defiziente Stämme hingegen riefen keine Veränderung im ZO-1- oder VE-Cadherin-Signal hervor.



**Abb. 21: FnBP-exprimierende *S. aureus*- und *S. carnosus*-Stämme führen 4 Stunden nach Infektion zu einer Abnahme der ZO-1-Signalintensität in EA.hy926-Zellen**

Auswirkung der Infektion auf die Signalintensität von ZO-1 in konfluenten EA.hy926-Zellen nach 4 Stunden. Exemplarische mikroskopische Bilder. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$



**Abb. 22: FnBP-exprimierende *S. aureus*- und *S. carnosus*-Stämme führen 4 Stunden nach Infektion zu einer Abnahme der VE-Cadherin-Signalintensität in HDMEC**

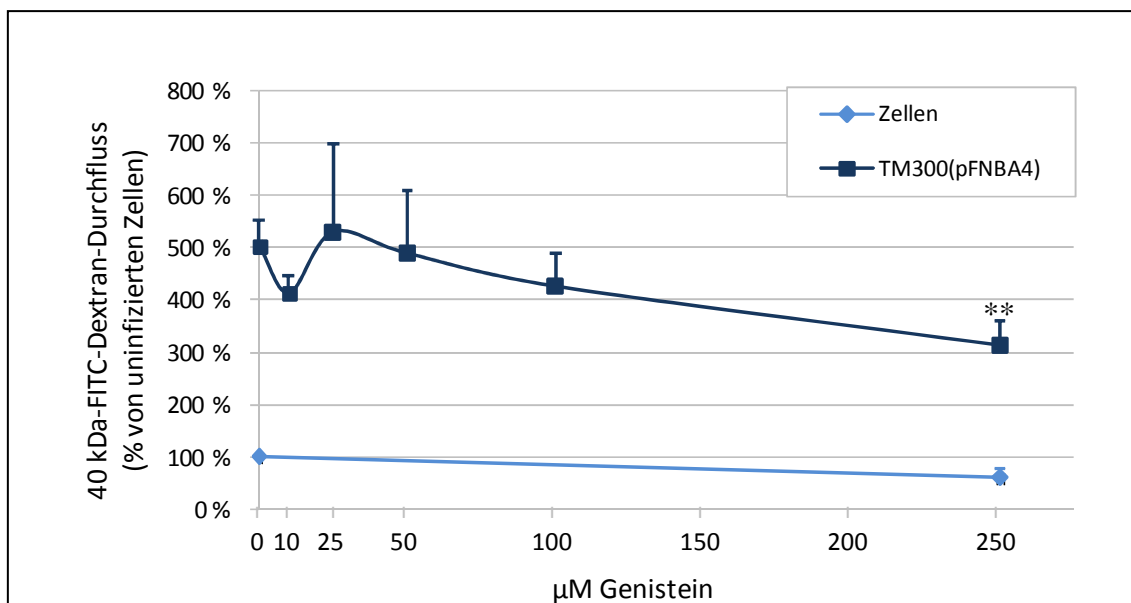
Auswirkung der Infektion auf die Signalintensität von VE-Cadherin in konfluenten HDMEC nach 4 Stunden. Exemplarische mikroskopische Bilder. Maßstab: 30  $\mu$ m



### 3.5 Protein-Tyrosin-Kinasen der Src-Familie sind an der Regulation der Endothelpermeabilität nach Infektion mit *Staphylococcus aureus* beteiligt

Unter 1.3.2 wurde beschrieben, dass Protein-Tyrosin-Kinasen der Src-Familie maßgeblich an der Regulation der parazellulären Permeabilität durch Zell-Zell-Verbindungen beteiligt sind. Ihre Rolle in der *S. aureus*-vermittelten vaskulären Permeabilitätserhöhung wurde mit Hilfe von Inhibitoren in Permeabilitätsassays analysiert.

Zunächst wurde der Effekte einer generellen Hemmung von Protein-Tyrosin-Kinasen auf den durch TM300(pFNBA4) induzierten Anstieg der Endotheldurchlässigkeit 4 Stunden *p. i.* untersucht. Hierzu wurden Permeabilitätsassays in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des Tyrosin-Kinase-Inhibitors Genistein durchgeführt (Abb. 23). Genistein führte dosisabhängig zu einer hochsignifikanten Abnahme der FnBP-vermittelten Permeabilitätserhöhung.

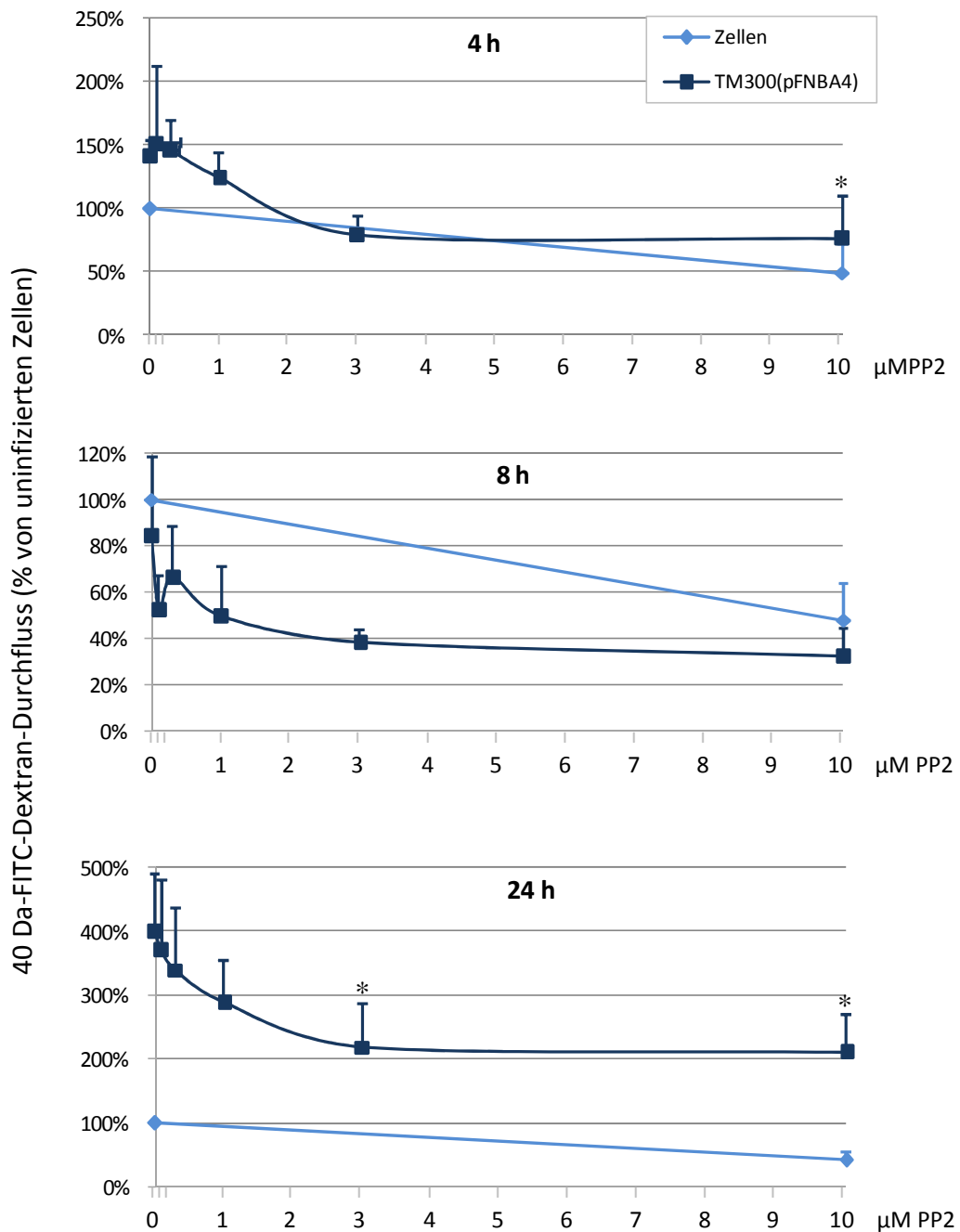


**Abb. 23: Genistein inhibiert die FnBP-vermittelte Erhöhung der Endothelpermeabilität in EA.hy926-Zellen 4 Stunden nach Infektion**

Auswirkung der Infektion auf die Permeabilität von konfluenten EA.hy926-Zellen im Transwell-Modell 4 Stunden *p. i.* unter Genisteinbehandlung. Die Kontrollzellen wurden nur mit der höchsten Genistein-Konzentration behandelt. Photometrische Messung des Durchflusses von 40 kDa-FITC-Dextran-Lösung über den Zellmonolayer. Dargestellt ist der Durchfluss im Verhältnis zur uninfizierten Kontrolle; gezeigt ist jeweils der MW aus drei Versuchen und die SD. \*\*  $\triangleq p \leq 0,01$  im Vergleich zu den unbehandelten, mit TM300(pFNBA4) infizierten Zellen.

Um zu überprüfen, ob im Speziellen auch hier Src-Kinasen entscheidend sind, wurde in einem weiteren Experiment der Src-Kinase-spezifische Tyrosin-Kinase-Inhibitor PP2 verwendet. Die Permeabilität unter PP2-Zusatz wurde 4, 8 und 24 Stunden nach Infektion untersucht (Abb. 24). PP2 bewirkte zu allen Zeitpunkten eine dosisabhängige Abnahme des FITC-Dextran-Durchflusses. Durch eine Dosiserhöhung von 3  $\mu\text{M}$  auf 10  $\mu\text{M}$  kam es nur noch zu einer sehr geringen Verstärkung des PP2-Effekts. Nach 4 Stunden führte die Behandlung mit PP2 zu einer hochsignifikanten Reduktion der FnBP-vermittelten Permeabilitätserhöhung um fast 50 %. Interessanterweise bewirkte die Infektion mit TM300(pFNBA4) 8 Stunden *p. i.* auch ohne PP2-Behandlung keine Zunahme der Permeabilität im Vergleich zu den Kontrollzellen. Nach 24 Stunden hingegen verursachte TM300(pFNBA4) wieder eine deutlich erhöhte endotheliale Durchlässigkeit. Durch die PP2-Inkubation kam es auch 24 Stunden *p. i.* zu einer signifikanten Abnahme der Permeabilitätserhöhung um knapp 50 %. Als Negativkontrolle wurde auch PP3, ein EGFR-Kinase-Inhibitor, getestet. Dieser hatte keinen Effekt auf die Endothelpermeabilität (Daten nicht gezeigt). Um auszuschließen, dass toxische Effekte von PP2 oder Genistein auf die Bakterien für die Reduktion der Permeabilitätserhöhung verantwortlich sind, wurde zusätzlich ein Viabilitätsassay durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Beide Substanzen hatten auch in den verwendeten Höchstkonzentrationen keine Auswirkungen auf die Viabilität der Bakterien.

Insgesamt konnte mit dieser Versuchsreihe demonstriert werden, dass eine allgemeine Inhibition von Protein-Tyrosin-Kinasen die endotheliale Permeabilitätserhöhung um bis zu 40 % senken kann, eine gezielte Inhibition von Src-Kinasen um bis zu 50 %. Hierbei handelt es sich nicht um toxische Effekte, da beide Inhibitoren keine bakterizide Wirkung zeigten. Zusätzlich stellte sich heraus, dass es nach einer initialen Permeabilitätserhöhung (4 Stunden) durch die Infektion mit TM300(pFNBA4) wieder zu einer beträchtlichen Abnahme der transendothelialen Durchlässigkeit kommt (8 Stunden). 8 Stunden *p. i.* unterschritt der gemessene FITC-Dextran-Durchfluss sogar den der uninfizierten Zellen. Man kann also zusammenfassen, dass die Infektion mit TM300(pFNBA4) die Endothelpermeabilität zunächst erhöht (4 Stunden), dann die Integrität der Endothelbarriere wieder hergestellt wird (8 Stunden) und es nach 24 Stunden wieder zu einem Permeabilitätsanstieg kommt.



**Abb. 24: PP2 inhibiert die FnBP-vermittelte Erhöhung der Endothelpermeabilität in EA.hy926-Zellen nach 4 und 24 Stunden**

Auswirkung der Infektion auf die Permeabilität von konfluenten EA.hy926-Zellen im Transwell-Modell nach 4, 8 und 24 Stunden unter PP2-Behandlung. Die Kontrollzellen wurden nur mit der höchsten PP2-Konzentration behandelt. Photometrische Messung des Durchflusses von 40 kDa-FITC-Dextran-Lösung über dem Zellmonolayer. Dargestellt ist der Durchfluss im Verhältnis zur uninfizierten Kontrolle. Gezeigt ist jeweils der MW aus drei Versuchen und die SD. \*  $\triangleq$   $p \leq 0,05$  im Vergleich zu den unbehandelten, mit TM300(pFNBA4) infizierten Zellen.

## 4 Diskussion

Für die Entstehung endovaskulärer *S. aureus*-Infektionen sind die Adhärenz des Erregers an das Endothel und die Überwindung der Endothelbarriere entscheidend. Interessanterweise ist insbesondere *S. aureus* in der Lage, auch bei nicht vorgeschädigtem Endothel schwere endovaskuläre Erkrankungen hervorzurufen [44, 47, 48]. In dieser Dissertation sollte daher untersucht werden, ob es *in vitro* durch die Infektion mit *S. aureus* zu Veränderungen einer intakten Endothelbarriere kommt und welche Mechanismen dabei eine Rolle spielen.

### 4.1 Veränderungen der transendothelialen Impedanz und Permeabilität durch *Staphylococcus aureus* FnBPs

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse belegen, dass *S. aureus* FnBP-abhängig die Integrität einer dichten Endothelbarriere zerstört. Dies zeigte sich zum einen in der Abnahme der transendothelialen Impedanz nach Infektion mit *fnb*-exprimierenden Stämmen. Die Tatsache, dass auch die *fnb*-defizienten Stämme TM300 und DU5947 zu späteren Zeitpunkten nach Infektion die transendotheliale Impedanz der Kontrollzellen unterschritten, lässt sich durch die fehlende Abtötung der extrazellulären Erreger durch Lysostaphin während der Impedanzmessungen erklären. Dies könnte zu einer unphysiologischen Überwucherung der Zellen mit Bakterien und somit zu einem FnBP-unabhängigen Verlust der endothelialen Dichtheit geführt haben. Zum anderen demonstrierten auch die Permeabilitätsmessungen einen FnBP-abhängigen Anstieg der parazellulären Durchlässigkeit, wobei sich die ausbleibende Permeabilitätserrhöhung nach Infektion mit dem Stamm Newman im Fehlen funktioneller FnBPs durch ein Stop-codon sowohl im *fnbA*- als auch im *fnbB*-Gen begründen lässt [193].

In einer Publikation von *Kramko et al. (2013)* wurden Veränderungen des transendothelialen elektrischen Widerstands (TER) drei Stunden nach Infektion mit *S. aureus* analysiert. In der Studie wurden unter anderem Unterschiede zwischen der Infektion mit dem *S. aureus*-Wildtypstamm 8325-4 und dessen *fnb*-defizienter Mutante untersucht. Während 8325-4 zu einer deutlichen Reduktion des Widerstands führte, wurde dieser Effekt durch Deletion des *fnb*-Gens stark vermindert. Interessanterweise verursachte jedoch die Infektion mit den *fnb*-komplementanten Stämmen TM300(pFNBA4) und TM300(pFNBB4) keine TER-Abnahme. Auch die Formaldehyd- und Hitzeinaktivierung der Stämme 8325-4 und 6850 bewirkte ein Ausbleiben des TER-Abfalls, sodass die Autoren zu der Schlussfolgerung kamen, dass FnBPs zwar notwendig, nicht aber alleine suffizient für Veränderungen der Endothelbarriere sind [200]. Dies steht im Widerspruch zu den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen, denn hier bewirkten die mit *fnb*-komplementierten *S. carnosus*-Stämme

TM300(pFNBA4) und TM300(pFNBB4) reproduzierbar sowohl eine Abnahme der transendothelialen elektrischen Impedanz als auch eine signifikante Zunahme der Endothelpermeabilität. Der Versuchsaufbau der beiden Arbeiten unterschied sich unter anderem dadurch, dass *Kramko et al.* HUVEC verwendeten, sodass ein divergierendes Ansprechen auf die Infektion durch den Gebrauch unterschiedlicher Zellen denkbar wäre. Da in der oben genannten Publikation eine wesentlich höhere MOI verwendet wurde als in dieser Arbeit (MOI 50 und MOI 100 vs. MOI 30), sind die abweichenden Resultate hierdurch nicht zu erklären. Um die Ergebnisse aus der vorliegenden Dissertation zu verifizieren, sollten weitere Impedanz- und Permeabilitätsmessungen mit inaktivierten Erregern oder FnBP-beschichteten Latexkugeln durchgeführt werden.

Ebenfalls untersucht werden sollte, ob die erhöhte endotheliale Durchlässigkeit bzw. die Impedanzabnahme auch zu einer Translokation von *S. aureus* führt. Auch dies wurde von *Kramko et al.* analysiert, indem in einem Transwell-System nach Infektion die Suspension aus der basalen Kammer ausplattiert wurde. Überraschenderweise zeigte sich eine negative lineare Korrelation zwischen TER-Abnahme und Translokation. Dies deutet daraufhin, dass die Translokation der Bakterien primär auf Transzytose beruht, denn Veränderungen der parazellulären Durchlässigkeit oder Apoptose würden sich in einer Verringerung des TER widerspiegeln. Die Abnahme des TER war mit einer vermehrten Expression des Leukozyten-Adhäsionsmoleküls ICAM-1 assoziiert, wohingegen translozierende Stämme die TNF- $\alpha$ -vermittelte ICAM-1-Expression inhibierten. Die Autoren schlussfolgerten, dass das Ausbleiben der ICAM-1-vermittelten Endothelaktivierung die Translokation begünstigt und dieser Mechanismus *in vivo* zur Verringerung der Leukodiapedese und zur erschwerten Eliminierung des Erregers durch Leukozyten beitragen könnte [200].

Andererseits wurde von *Kramko et al.* nur die Translokation 3 Stunden nach Infektion erfasst. Es ist möglich, dass Veränderungen der paraendothelialen Permeabilität der Parazytose des Erregers vorausgehen, sodass eine Untersuchung der Anzahl translozierter Bakterien zu späteren Zeitpunkten sinnvoll wäre. Weiterhin könnte man vermuten, dass *S. aureus* die initial erhöhte parazelluläre Durchlässigkeit vorrangig nutzt, um Zugang zur EZM zu erhalten. Hier findet sich eine große Menge von Fibronektin und  $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen, beides Komponenten die für die Invasion von *S. aureus* notwendig sind [99]. Man könnte die erhöhte parazelluläre Durchlässigkeit somit zunächst als Wegbereiter für die Invasion und nicht primär für die Translokation über die Endothelbarriere begreifen.

## 4.2 Apoptose in Endothelzellen nach Infektion mit *Staphylococcus aureus*

Da Apoptose oder die Ablösung von Zellen von ihrer Matrix mögliche Ursachen für die beobachtete Destabilisierung der Endothelbarriere sind, wurde untersucht, ob diese Mechanismen in den hier durchgeführten Versuchen relevant waren.

Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass keiner der verwendeten *S. aureus*-Stämme zu einem Verlust der Zellviabilität 4 Stunden nach Infektion führt. Auffallend war, dass auch der hämolytische Stamm 6850 4 Stunden *p. i.* keinen zytotoxischen Effekt auf die Endothelzellen zeigte. Allerdings werden im Kristallviolett-Assay und in der Mitotracker- und DAPI-Färbung keine frühen Reaktionen auf proapoptotische Stimuli erfasst. Es ist anzunehmen, dass man nach 4 Stunden frühe Apoptoseereignisse, wie die Translokation von membranärem Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran, hätte messen können [201]. Somit können die Ergebnisse dieser Versuchsreihe durchaus mit Befunden aus anderen Arbeiten in Einklang gebracht werden, die aufgrund von Messungen nach einer Annexin V-Färbung bereits einen früheren Eintritt von apoptotischen Veränderungen durch hämolytische Stämme postulieren [202].

Nach 24 Stunden hingegen bewirkten alle FnBP-exprimierenden *S. aureus*- und *S. carnosus*-Stämme einen Zellverlust. In der Literatur ist beschrieben, dass *S. aureus* in der Lage ist, in verschiedenen Zelltypen Apoptose zu induzieren [164]. Panton-Valentin Leukozidin (PVL) und  $\alpha$ -Toxin konnten als Auslöser hierfür bereits identifiziert werden [203–205]. Während für mononukleäre Zellen  $\alpha$ -Toxin alleine suffizient für die Induktion von Apoptose ist [203], konnte in einer Publikation von *Haslinger-Löffler et al. (2005)* gezeigt werden, dass in verschiedenen primären Endothelzellen (HUVEC und HBMEC, human brain microvascular endothelial cells) und in der Endothelzelllinie EA.hy926 sowohl invasive als auch hämolytische Eigenschaften für die Induktion von Apoptose notwendig sind [194]. In dieser Publikation führten weder gereinigtes  $\alpha$ -Toxin noch Kulturüberstände von *S. aureus* oder Formalin-fixierte Stämme zum Zelltod. Die Expression von  $\alpha$ -Toxin im nur schwach hämolytischen aber sehr invasiven Stamm Cowan I führte zu einem deutlichen Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen, während Cowan I alleine keinen relevanten zytotoxischen Effekt hatte. Obwohl sehr ähnliche Methoden verwendet wurden, stehen diese Ergebnisse von *Haslinger-Löffler et al.* in Diskrepanz zu den in dieser Dissertation erzielten Ergebnissen, die zeigen, dass FnBPs auch ohne zusätzliche hämolytische Virulenzfaktoren Apoptose induzieren können. Dies ist möglicherweise auf kleine Unterschiede im Infektionsprotokoll zurückzuführen. Zwar wurde in der beschriebenen Publikation eine etwas höhere MOI verwendet als in dieser Arbeit (MOI 50 vs. MOI 30), dafür war die Inkubationszeit in dieser Arbeit etwas

länger (4 vs. 3 Stunden). In beiden Fällen fand die Messung 20 Stunden nach Abtöten der extrazellulären Bakterien mit Lysostaphin statt und das Ausmaß apoptotischer Zellen wurde jeweils durch Messung hypodiploider Nuklei mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Während *Haslinger-Löffler et al.* nur Zellen der zweiten und dritten Passage einsetzten, wurden in dieser Arbeit auch Zellen höherer Passagen verwendet. Diese schienen zwar morphologisch intakt und zeigten auch im Permeabilitätsassay keine höhere Durchlässigkeit als die Kontrollzellen jüngerer Passagen; es ist dennoch denkbar, dass es zu einem veränderten Ansprechen auf proapoptotische Stimuli gekommen ist. Möglich ist auch, dass die Wachstumszeit nach Aussaat der Zellen in der Publikation von *Haslinger-Löffler et al.* kürzer war als in dieser Arbeit (4 Tage), was ebenfalls zu einer veränderten Reaktion der Zellen auf die Infektion beigetragen haben könnte.

Bislang sind für *S. carnosus* keine *S. aureus*-typischen Virulenzfaktoren nachgewiesen worden. Da in der vorliegenden Dissertation *fnb*-exprimierende *S. carnosus*-Stämme ebenfalls zu einem Zellverlust führten, ist davon auszugehen, dass in der verwendeten Versuchskonstellation FnBPs alleine suffizient für die Induktion von Zelltod sind und eine *de novo*-Synthese nicht obligat ist. Zur Klärung dieser Abweichung gegenüber oben genannter Publikation könnten weitere Zytotoxizitäts-Messungen mit inaktivierten Stämmen oder FnBP-beschichteten Latexkugeln beitragen.

Während für manche der verwendeten Stämme der klassische Weg der Caspase-Aktivierung eine notwendige Voraussetzung zur Zellestörung war (TM300(pFNBA4), TM300(pFNBB4), Cowan I), waren andere Stämme interessanterweise in der Lage auch auf andere Mechanismen zurückzugreifen (6850, P1). Es ist bekannt, dass Apoptose auch über zahlreiche Caspase-unabhängige Wege herbeigeführt werden kann [206]. So wurde beispielsweise beschrieben, dass sowohl Apoptosis-Inducing Faktor (AIF) als auch Cathepsin B hierzu imstande sind [207, 208]. In einer anderen Publikation wurde gezeigt, dass es nach Infektion von Endothelzellen mit dem Stamm 6850 zu einer Caspase 3-Aktivierung kommt [194]. Denkbar wäre, dass bestimmte *S. aureus*-Stämme in der Lage sind, über mehrere Wege Apoptose zu induzieren und bei einer Inhibition von Caspasen auf andere Wege zurückgreifen. Die Identifizierung der intrazellulären Signalwege, die nach *S. aureus*-Infektion auch Caspase-unabhängig zur Apoptoseinduktion führen, wird eine Herausforderung für weitere Untersuchungen sein.

### 4.3 Interaktion von *Staphylococcus aureus* mit Zell-Zell-Verbindungen

Da EA.hy926-Zellen 4 Stunden nach Infektion mit *S. aureus* noch vollkommen viabel waren, kann man schlussfolgern, dass der herabgesetzten Barrierefunktion des Endothels zu diesem Zeitpunkt ein Apoptose-unabhängiger Mechanismus zugrunde liegen muss. Es ist bekannt, dass die Beschädigung von Zell-Zell-Verbindungen wie Adherens und Tight Junctions entscheidend zu Störungen der Endothelbarriere beiträgt [66]. In dieser Dissertation konnte nun zum ersten Mal belegt werden, dass die Infektion mit *S. aureus* die Integrität von endothelialen Zell-Zell-Kontakten beschädigt: Es kommt zu einer FnBP-abhängigen Abschwächung der ZO-1- und VE-Cadherin-Signalintensität in der Immunfluoreszenz.

Ähnliche Mechanismen wurden bereits für andere Pathogene beschrieben. So führt *Pseudomonas aeruginosa* durch Sekretion der Metalloproteinase LasB in Endothelzellen unter anderem zu einer Spaltung von VE-Cadherin und Occludin und somit zur Zerstörung der Endothelbarriere [210]. *Neisseria meningitidis* destabilisiert die Endothelbarriere durch die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinase-8 (MMP-8) und eine gezielte Spaltung von Occludin [166]. *Escherichia coli* vermittelt über eine Proteinkinase C- $\alpha$ -Aktivierung eine Permeabilitätserhöhung und Impedanzabnahme eines Endothelmonolayers durch eine Dissoziation von VE-Cadherin in Tight Junctions [211]. Andere Autoren beobachteten eine abnehmende Proteinkonzentration und eine Umverteilung von ZO-1 und Occludin durch Infektion mit *E. coli* [212]. Die Inkubation eines Endothelmonolayers mit den integralen bakteriellen Zellwandkomponenten Lipopolysaccharid und Lipoteichonsäure zeigte ebenfalls eine Verringerung der Expression sowie eine verminderte Signalintensität von ZO-1, Occludin und JAM in der Immunfluoreszenz [213]. Auch virale Erreger wie das West-Nil-Virus bewirken durch eine MMP-Aktivierung morphologische Veränderungen und einen Abfall in der Proteinkonzentration von ZO-1, VE-Cadherin,  $\beta$ -Catenin, Occludin, Claudin-1 und JAM-A sowie eine erhöhte endotheliale Durchlässigkeit [214, 215]. HI-Viren führen durch eine verminderte Expression von ZO-1 und ZO-2 und eine damit einhergehende Lückenbildung zu einer Zerstörung der dichten Endothelbarriere [216], Dengue-Viren vermitteln diesen Effekt über eine Abnahme der Expression und Umverteilung von ZO-1 und VE-Cadherin [217]. Ähnliche Mechanismen werden auch zur Überwindung der Epithelbarriere genutzt. So führt *Helicobacter pylori* über eine Interaktion mit ZO-1, Occludin und E-Cadherin zu einer Zerstörung von Tight und Adhärens-Kontakten in Epithelzellen [218].



Die Ergebnisse weiterer Arbeiten weisen darauf hin, dass auch *S. aureus* Veränderungen in epithelialen Zell-Zell-Verbindungen hervorruft. So konnte durch *Soong et al. (2011)* gezeigt werden, dass eine Infektion mit *S. aureus* zu einer Umverteilung von ZO-1, einer Fragmentierung von Occludin und E-Cadherin und einer Translokation der Erreger über die Epithelschicht führt. SpA wurde als hierfür notwendiger Virulenzfaktor identifiziert, war aber alleine nicht suffizient, um die oben genannten Effekte zu bewirken. Eine Aktivierung von TNF/EGFR/MAPK-Signalwegen und Rho-GTPasen war an der Spaltung der Zell-Zell-Verbindungen sowie der Permeabilitätserhöhung beteiligt [169]. Ob die beobachtete Translokation jedoch tatsächlich auf parazellulärem Weg über die veränderten Zellkontakte stattfand, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Durch *Kwak et al. (2012)* wurde demonstriert, dass *S. aureus*  $\alpha$ -Toxin zu einer Abnahme des transepithelialen Widerstandes führt. Auf molekularer Ebene beruht dies auf einer Verminderung der Proteinlevel sowie einer abnehmenden Signalintensität in der Immunfluoreszenz von ZO-1, ZO-3, E-Cadherin und Occludin [170]. In von *Ohnemus et al. (2008)* durchgeführten Versuchen mit Keratinozyten wurde eine Abnahme des transepithelialen Widerstands von einer Herabregulation von ZO-1, Claudin-1, Claudin-4, Occludin und in geringerem Maße auch von E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin auf Immunfluoreszenzebene begleitet. Auf Protein- und RNA-Ebene ließen sich jedoch nur geringe Unterschiede erkennen [167].

Da in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass *S. aureus* darüber hinaus auch in Endothelzellen zu FnBP-vermittelten Veränderungen von Zell-Zell-Verbindungen führt, ist eine Alternierung von wichtigen Strukturproteinen in Adherens und Tight Junctions eine mögliche Erklärung für die beobachtete endotheliale Permeabilitätserhöhung nach 4 Stunden. Somit scheint *S. aureus* ähnliche Mechanismen zur Destruktion der Endothelintegrität zu nutzen wie andere Erreger auch. Man kann vermuten, dass neben FnBPs auch weitere Virulenzfaktoren wie SpA oder  $\alpha$ -Toxin, deren Rolle bereits in der Interaktion mit epithelialen Zell-Zell-Verbindungen belegt wurde, in der Lage sind endotheliale Adherens und Tight Junctions zu beschädigen. In fortführenden Untersuchungen sollte analysiert werden, ob es auch auf Proteinebene zu Veränderungen von ZO-1 und VE-Cadherin kommt. Möglich ist, dass es ähnlich wie bei anderen Pathogenen zu deren Spaltung kommt. Auch eventuelle Veränderungen in der Genexpression von ZO-1 und VE-Cadherin durch die Infektion mit *S. aureus* sollten erfasst werden, da eine Herabregulation der entsprechenden Gene als Ursache für die abnehmende Signalintensität in der Immunfluoreszenz ebenfalls in Frage kommt. Neben ZO-1 und VE-Cadherin sollten darüber hinaus noch weitere wichtige Strukturproteine wie Occludin und Claudin Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

#### 4.4 Rolle von Src-Kinasen in der Regulation der Endothelpermeabilität nach *Staphylococcus aureus*-Infektion

Endotheliale Zell-Zell-Verbindungen können über verschiedene Signalwege reguliert werden. Man weiß, dass Protein-Tyrosin-Kinasen, insbesondere Src-Kinasen, hier eine entscheidende Rolle spielen [83]. Darüber hinaus konnten mehrere Autoren belegen, dass eine Infektion mit *S. aureus* zu einer Src-Aktivierung führt und dass diese notwendig für die Internalisierung des Erregers ist [157, 159, 160]. Auch die Ergebnisse dieser Dissertation demonstrieren eine Beteiligung von Src-Kinasen an frühen Schritten der Pathogenese endovaskulärer *S. aureus*-Infektionen. Die Inhibition von Src-Kinasen schwächte den Permeabilitätsanstieg nach 4 Stunden signifikant ab, gleichzeitig kam es nach 4 Stunden zu einer Signalreduktion von ZO-1 und VE-Cadherin in der Immunfluoreszenz. Es ist somit denkbar, dass Src-Kinasen an der Regulation von Zell-Zell-Verbindungen beteiligt sind.

Auch andere Erreger wie der Parasit *Plasmodium falciparum* bewirken über eine Src-abhängige Umverteilung von ZO-1, VE-Cadherin und Claudin 5 eine Beschädigung der Endothelbarriere [219]. Weitere Autoren beschreiben, dass Src-Kinasen über eine Phosphorylierung von VE-Cadherin zu einer erhöhten Endothelpermeabilität führen können [86, 87]. Eine  $\beta$ -Arrestin-abhängige Endozytose von VE-Cadherin [88] sowie eine Spaltung von VE-Cadherin / VEGFR2 /  $\beta$ -Catenin-Komplexen und eine daraus resultierende Abnahme der Endotheldichte werden über eine VEGF-Aktivierung reguliert [89]. Außerdem ist eine VEGF-vermittelte Src-Rekrutierung auch an der Destabilisierung von Tight und Adherens Junctions durch Interaktionen mit ZO-1 und Occludin beteiligt [90–92].

In weiterführenden Untersuchungen sollte geprüft werden, ob die *S. aureus*-vermittelte Src-Aktivierung zu Phosphorylierungen von VE-Cadherin oder ZO-1 führt. Man könnte auch spekulieren, dass eine Src-vermittelte Phosphorylierung anderer Adherens oder Tight Junction-Proteine mit einer Umverteilung von VE-Cadherin und ZO-1 assoziiert ist. So wurde in verschiedenen Veröffentlichungen belegt, dass die Src-Phosphorylierung von Occludin zu einer Abnahme der Kollokalisierung mit ZO-1 führen kann und es auf diesem Weg zu einer ZO-1-Umverteilung kommt [91, 92]. Darüber hinaus ist anzunehmen, dass neben Src-Kinasen noch andere Protein-Tyrosin-Kinasen wie Protein Kinase C (PKC) oder Focal Adhesion Kinase (FAK) oder Enzyme wie Matrix-Metalloproteinasen, deren Beteiligung an der Regulation der Endothelpermeabilität bereits beschrieben wurde, durch *S. aureus* aktiviert werden [166, 214, 220–222].

Die Tatsache, dass es auch 24 Stunden nach Infektion zu einer Abschwächung der Endotheldurchlässigkeit durch Src-Kinase-Inhibitoren kommt, lässt sich gut mit dem

Modell einer Apoptose-vermittelten Barrierestörung des Endothels vereinbaren. In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Invasion von *S. aureus* einen Hämolysin-unabhängigen Mechanismus zur Induktion von Apoptose in Keratinozyten darstellt [223]. Insbesondere für Endothelzellen ist berichtet worden, dass invasive Eigenschaften notwendig zur Stimulation von Apoptose sind. Da Src-Kinasen unabdingbar für die Invasion durch *S. aureus* sind [157, 159, 160], führt deren Inhibition auch zu einer reduzierten Internalisierung des Erregers und somit zu einer Verringerung proapoptotischer Stimuli durch die Invasion.

Unerwartet war, dass *S. aureus* FnBPs nach 8 Stunden bereits in der PP2-freien Kontrolle nicht mehr den nach 4 und 24 Stunden beobachteten Effekt einer Permeabilitätserhöhung hatten. Diese Beobachtung untermauert, dass der erhöhten Endotheldurchlässigkeit nach 4 bzw. 24 Stunden auf molekularer Ebene unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen, denn Apoptose ist ein irreversibles Ereignis. Da die Störung der Endothelbarrierefunktion nach 4 Stunden reversibel ist, kann man davon ausgehen, dass die erhöhte parazelluläre Durchlässigkeit des Endothels vor allem in frühen Schritten der Pathogenese endovaskulärer Infektionen ausschlaggebend ist.

#### **4.5 Erhöhte Endothelpermeabilität durch *Staphylococcus aureus* FnBPs – ein relevanter Mechanismus in endovaskulären Infektionen?**

Es wurde mehrfach belegt, dass *S. aureus* FnBPs eine maßgebliche Rolle in der Pathogenese endovaskulärer *S. aureus*-Infektionen spielen (siehe 1.4). So exprimieren nahezu alle klinischen Isolate mindestens ein *fnb*-Gen [96, 131, 132]. FnBPs vermitteln sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Adhärenz von *S. aureus* an eine intakte Endothelschicht [141, 142]. In verschiedenen Tiermodellen zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der FnBP-vermittelten Invasion von *S. aureus* in Endothelzellen und komplikationsreichen klinischen Verläufen [133, 139]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Invasion durch FnBPs in Endothelzellen häufig ein Wegbereiter für die nachfolgende Dissemination in andere Organe wie Niere oder Milz ist [133–135, 139].

Unklar ist bislang jedoch, ob es nach der Adhärenz von *S. aureus* an Endothelzellen zu initialen Umbauvorgängen des Endothels kommt. Da *S. aureus* im Vergleich zu anderen Erregern besonders häufig auch bei primär intakten Endothelverhältnissen zu schweren endovaskulären Komplikationen führt [41] und es oft zu metastatischen Absiedlungen in andere Organe kommt, liegt die Vermutung nahe, dass der Erreger die Integrität der Endothelbarriere beschädigen kann. Für viele andere bakterielle, virale und parasitäre

Erreger wurde bereits beschrieben, dass sie eine Erhöhung der Endothelpermeabilität bewirken [166, 210, 211, 214, 216, 217, 219].

Die Ergebnisse dieser Dissertation belegen nun, dass auch *S. aureus* zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion zu einer FnBP-abhängigen Störung der endothelialen Barrierefunktion führt. Noch nicht geklärt ist, ob die erhöhte Endothelpermeabilität tatsächlich auch zu einer Translokation von *S. aureus* über die Endothelbarriere führt. Dies sollte Ziel zukünftiger Untersuchungen sein. Da in dieser Arbeit Veränderungen wichtiger Strukturproteine von Adherens und Tight Junctions beobachtet werden konnten, könnte man spekulieren, dass der parazelluläre Transport ein möglicher Mechanismus zur Überwindung der Endothelbarriere ist. Auch andere Erreger wie *Haemophilus influenzae* oder *Streptococcus agalactiae* nutzen die parazelluläre Passage zur Überquerung eines epithelialen Monolayers [224, 225]. Um diese Hypothese zu erhärten, sollte in folgenden Arbeiten beleuchtet werden, ob es zu Veränderungen von Zellkontakten auf Gen- und Proteinebene kommt und ob Veränderungen weiterer wichtiger Proteinen wie Claudin oder Occludin auftreten. Zusätzliche morphologische sowie dynamische Analysen wie timelapse-Mikroskopie wären geeignet, um den parazellulären Transport von *S. aureus* und dabei stattfindende Veränderungen von Zellkontakten zu visualisieren.

Neben der Parazytose könnten die hier gemachten Beobachtungen auch die Transzytose von *S. aureus* über die Endothelbarriere begünstigen. Dies wird dadurch bestärkt, dass dem Austritt des Erregers aus dem Gefäßsystem häufig eine Invasion in Endothelzellen vorausgeht [133–135, 139]. Außerdem wurde in einer anderen Publikation beschrieben, dass eine Abnahme des TER nicht mit einer vermehrten Erregertranslokation assoziiert ist [200]. Der molekulare Mechanismus der Invasion ist durch eine Bindung von FnBPs an  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine über Fibronectin als Bindeglied charakterisiert [99, 153]. Fibronectin findet sich primär in der EZM, Integrine sind in polarisierten Endothelzellen vor allem basolateral lokalisiert. Durch die Beschädigung der Integrität von Adherens und Tight Junctions könnte *S. aureus* Zugang zu der basolateralen Seite des Endothels und somit zum größten Pool an Fibronectin und an  $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen erhalten. Dies könnte dann die Internalisierung des Erregers begünstigen. Während für andere Erreger wie *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis* oder *Streptococcus pneumoniae* Transzytose als Mechanismus zur Überwindung einer Endothelbarriere bereits identifiziert werden konnte [226], wurde dies für *S. aureus* bislang noch nicht beschrieben. Ein Grund hierfür ist, dass noch nicht abschließend geklärt ist, welche Ereignisse nach der Invasion stattfinden (intrazelluläre Persistenz und Vermehrung vs. rasche Induktion von Apoptose) [164, 165]. Die in dieser und anderen Arbeiten gemachte Beobachtung, dass

*S. aureus* in der Lage ist, Apoptose in Endothelzellen zu induzieren, könnte auch darauf hinweisen, dass es nach der Invasion zu einer Zerstörung der Wirtszelle und so zu einem Austritt aus dem Gefäßsystem kommt. Da in Tiermodellen ein Zusammenhang zwischen der Invasion in Endothelzellen und der Dissemination in andere Organe gezeigt wurde [133-135, 139], erscheint sowohl die Transzytose als auch die Invasion und darauffolgende Destruktion von Endothelzellen als attraktive Hypothese. Denkbar ist auch, dass bei endovaskulären *S. aureus*-Infektionen verschiedene Mechanismen (Parazytose, Transzytose, Apoptose von Endothelzellen) ineinandergreifen und somit die Überwindung der Endothelbarriere ermöglichen.

Eine Herausforderung für zukünftige Untersuchungen wäre die Durchführung weiterer Experimente unter Flussbedingungen. So könnte untersucht werden, ob es auch unter dynamischen Bedingungen zu einer Erhöhung der Endothelpermeabilität durch FnBPs kommt. Experimente von *Kerdudou et al. (2006)*, die unter Flussbedingungen durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass auch unter Einwirkung physiologischer Schergeschwindigkeiten FnBPs ausschlaggebend für die Adhärenz von *S. aureus* an Endothelzellen sind [141]. In einer anderen Arbeit war unter hohen Scherraten die Bindung von von-Willebrand-Faktor-Fasern durch Wandteichonsäuren ebenfalls maßgeblich [227]. Es ist denkbar, dass unter dynamischen Bedingungen auch andere Virulenzfaktoren die initiale Adhärenz an die Endothelschicht vermitteln und FnBPs dann nach erfolgter Adhärenz die Endothelpermeabilität erhöhen. Da es auch aus Tiermodellen zahlreiche Belege für die Relevanz von FnBPs in der Pathogenese endovaskulärer *S. aureus*-Infektionen gibt [133–135, 139], kann man vermuten, dass eine Destabilisierung der Endothelbarriere durch FnBPs ein entscheidender Schritt in der frühen Pathogenese von endovaskulären *S. aureus*-Infektionen ist.

#### **4.6 FnBPs als pharmakologische Zielstruktur – klinische Perspektiven**

Die Extravasation ist maßgeblich für den Progress einer *S. aureus*-Bakteriämie hin zur Entstehung sekundärer Infektionsmetastasen mit schweren Komplikationen wie Endokarditis, Osteomyelitis oder Abszessbildung in inneren Organen [57]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass FnBPs nicht nur für die Adhärenz und Invasion in Endothelzellen entscheidend sind, sondern durch eine Src-regulierte Alternierung von ZO-1 und VE-Cadherin auch zu einer erhöhten Endothelpermeabilität führen und so den Austritt aus dem Gefäßsystem begünstigen. Vor dem Hintergrund der sich zunehmend verschlechternden Resistenzlage bei sowohl gängigen als auch Reserveantibiotika wie Vancomycin, ist es eine vielversprechende Option, FnBPs als therapeutisches Ziel anzuvisieren.

Eine präventive Maßnahme wäre die Induktion von FnBP-Antikörpern durch ein Vakzin. Bislang wurden FnBP-Impfungen nur in tierexperimentellen Modellen untersucht. In einem Ratten-Endokarditis-Modell führte die Immunisierung mit FnBPs zu einer deutlich geringeren Anzahl an Erregern innerhalb der Klappenvegetationen als in nicht-immunisierten Ratten [228]. Eine Impfung mit Fusionsproteinen aus der Fn-bindenden Domäne von FnBPA bewirkte in einem Maus-Mastitis-Modell eine deutlich geringere Erregerdichte in den Brustdrüsen und eine Reduktion des klinischen Schweregrads der Mastitis [229]. Die Untersuchung von Serumproben von Patienten mit einer *S. aureus*-Infektion belegte, dass die Infektion die Entwicklung von FnBP-Antikörpern stimuliert [230, 231]. Allerdings verhinderte die Immunisierung die Bindung von FnBPs an Fn nicht, da die entstandenen Antikörper primär an FnBP-Fn-Komplexe gebunden haben [230]. Als möglicher Grund für dieses überraschende Ergebnis wird die schwache Immunogenität von FnBPs angesehen: FnBPs nehmen im ungebundenen Zustand eine unspezifische Struktur an und erst durch die Bindung an Fn kommt es zu einer Konformationsänderung [96, 232]. Noch ist unklar, ob Antikörper gegen Fn-gebundene FnBPs für den Wirt auch einen Vorteil darstellen, zum Beispiel indem sie als Opsonin zur Phagozytose dienen oder ob sie eher zu einem Überlebensvorteil für *S. aureus* führen [233]. Durch die Verwendung von kurzen synthetischen Peptiden aus der D-Domäne von FnBPs ist es mittlerweile gelungen, die Synthese von Antikörpern, welche die Fn-Bindung inhibieren, zu stimulieren [234]. Ob diese Antikörper auch im Menschen zu einem Schutz gegen *S. aureus*-Infektionen beitragen können, ist bislang noch unklar. In der Zusammenschau zeigen die bisher durchgeführten klinischen Studien, in denen eine Immunisierung gegen verschiedene andere *S. aureus*-Virulenzfaktoren getestet wurde, dass die Induktion von Antikörpern alleine nicht ausreicht, um im Wirt den gewünschten protektiven Effekt zu erzielen. Man geht davon aus, dass insbesondere die Stimulation der zellulären Immunität Ziel zukünftiger Impfungen sein sollte [32, 235]. Dennoch lassen einige tierexperimentelle Modelle darauf hoffen, dass eine Impfung gegen FnBPs in einem sorgsam ausgewählten Risikokollektiv zu einer Reduktion schwerer Komplikationen wie Endokarditis beiträgt. *Menzies et al.* stellten ein rekombinantes Fragment der Fibronectin-bindenden Domäne von FnBP (rFnBF) her und testeten es in einem Meerschweinchen-Wundinfektions-Modell. Die Hypothese war, dass es durch einen kompetitiven Antagonismus zwischen rFnBFs und FnBPs zu einer Abnahme der Bindung von *S. aureus* FnBPs an Fibronectin kommt. rFnBFs bewirkten eine Abnahme der Invasion in Endothelzellen und eine verminderte Abszessentstehung. Durch die simultane Anwendung von rFnBF und Cefazolin kam es zu einer Potenzierung des prophylaktischen Effekts des Antibiotikums

in Bezug auf die Abszessentstehung [236]. Eine Option wäre es rFnBFs adjuvant zur antibiotischen Therapie bei Patienten mit einem ungünstigen Risikoprofil anzuwenden [96]. Mit Hilfe des in dieser Arbeit verwendeten Permeabilitätsassays könnte der Effekt von rekombinanten FnBP-Fragmenten sowie FnBP-Antikörpern getestet werden. Diese Untersuchungen ließen weitere Rückschlüsse zu, ob es hierdurch *in vitro* zu einem protektiven Effekt auf die Endothelbarriere kommt. Wäre dies der Fall könnte in darauffolgenden *in vivo*-Experimenten geprüft werden, ob rekombinante FnBP-Fragmente bzw. FnBP-Antikörper dazu beitragen, die Erhöhung der Endothelpermeabilität als frühen Schritt in der Pathogenese endovaskulärer Infektionen zu inhibieren.

Src-Kinasen sind eine weitere therapeutische Zielstruktur, die sich aus dieser Arbeit ergibt. Es wurde gezeigt, dass Src-Kinase-Inhibitoren die Erhöhung der Endothelpermeabilität *in vitro* reduzieren. Durch andere Autoren konnte bereits demonstriert werden, dass Src-Kinasen auch für die Invasion von *S. aureus* entscheidend sind [157, 159, 160]. In der Tumorthherapie hat sich die Verwendung von Tyrosin-Kinase-Hemmern bereits gut etabliert. Als nächster Schritt sollte daher auch in tierexperimentellen Bakteriämie-Modellen getestet werden, ob sich die Hemmung von Src-Kinasen protektiv auf die Entstehung endovaskulärer Komplikationen auswirkt.

Fortführende Untersuchungen unter Flussbedingungen sowie in tierexperimentellen Modellen könnten klären, inwieweit die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse relevant für die Entstehung endovaskulärer *S. aureus*-Infektionen *in vivo* sind und welche therapeutischen Zielstrukturen zur Stabilisierung der Endothelbarriere in Zukunft angegangen werden könnten.

## 5 Zusammenfassung

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ist einer der häufigsten Erreger schwerer endovaskulärer Infektionen, die häufig mit einer Dissemination des Erregers in andere Organe und lebensbedrohlichen Komplikationen wie Endokarditis, Osteomyelitis oder Abszessen assoziiert sind. Entscheidender Schritt in der Pathogenese endovaskulärer Infektionen ist die Schädigung und Überwindung der Endothelbarriere. Für deren Integrität ist die Intaktheit von Zell-Zell-Verbindungen elementar, diese werden unter anderem durch Src-Kinasen reguliert. Es ist bekannt, dass *S. aureus* Fibronectin-Bindeproteine (FnBPs) maßgeblich für die Adhärenz und Invasion des Erregers in Endothelzellen sind. Die Invasion erfolgt über eine indirekte Bindung an  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine, invasive Eigenschaften finden sich in nahezu allen klinischen Isolaten. In verschiedenen Tiermodellen konnte außerdem ein Zusammenhang zwischen der Expression von FnBPs und der Dissemination von *S. aureus* in andere Organe gezeigt werden. Bisher ist jedoch nicht untersucht, welche Auswirkung die *S. aureus*-Infektion auf die Endothelbarriere hat und welche Mechanismen für die Translokation des Erregers verantwortlich sind.

In dieser Arbeit wurde analysiert, ob die Infektion mit *S. aureus*- und *S. carnosus*-Stämmen *in vitro* zu einer Schädigung der endothelialen Integrität von EA.hy926-Zellen führt. Hierzu wurden Änderungen der transendothelialen Impedanz und der Endothelpermeabilität nach Infektion im xCELLigence- bzw. Transwell-System erfasst. Zytotoxische Effekte wurden durch Kristallviolett-Färbungen, immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Mitochondrien und Nuklei sowie die Erfassung der hypodiploiden Zellkerne mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Zur Entschlüsselung des molekularen Mechanismus wurden Veränderungen der Adhärenz- und Tight Junction-Proteine ZO-1 und VE-Cadherin in der Immunfluoreszenz untersucht. Die Rolle von Src-Kinasen wurde durch pharmakologische Inhibition analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass FnBP-exprimierende *S. aureus*-Stämme eine Abnahme der transendothelialen Impedanz verursachen und dass es 4 und 24 Stunden nach Infektion zu einer signifikanten Zunahme der Endothelpermeabilität kommt. Zytotoxische Effekte auf die Endothelzellen durch die Infektion traten nach 24 Stunden auf, jedoch nicht nach 4 Stunden. VE-Cadherin und ZO-1 zeigten 4 Stunden nach Infektion eine FnBP-abhängige Konformationsänderung und Reduktion der Signalintensität. Außerdem konnte demonstriert werden, dass die Inhibition von Src-Kinasen den Anstieg der Endothelpermeabilität signifikant reduziert.



In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal belegt, dass *S. aureus* FnBPs eine Erhöhung der Endothelpermeabilität bewirken. Während hierfür zu späten Zeitpunkten Apoptose verantwortlich ist, muss nach 4 Stunden ein anderer Mechanismus ursächlich sein. Da es zu einer Abschwächung der ZO-1- und VE-Cadherin-Signalintensität in der Immunfluoreszenz kam, ist anzunehmen, dass Adherens und Tight Junctions durch die Infektion geschädigt werden. Es ist bekannt, dass Src-Kinasen durch die Infektion mit *S. aureus* aktiviert werden. Außerdem sind sie elementar für die Regulation der Endothelpermeabilität und vermitteln diesen Effekt unter anderem über eine Phosphorylierung von Adherens und Tight Junction-Proteinen. Eine Src-vermittelte Phosphorylierung von Zell-Zell-Verbindungsproteinen wäre daher eine mögliche Erklärung für die beobachteten Veränderungen von ZO-1 und VE-Cadherin. Dieser Mechanismus könnte Wegbereiter für die parazelluläre Passage über die Endothelbarriere sein. Darüber hinaus könnte die erhöhte Endothelpermeabilität den Zugang zur Extrazellulärematrix und zum größten Pool an Fibronectin und Integrinen ermöglichen und so die Invasion und Transzytose begünstigen. Die hier gewonnenen Ergebnisse tragen dazu bei, die komplexe Interaktion zwischen *S. aureus* und dem Endothel und somit wichtige Schritte in der Pathogenese endovaskulärer Infektionen besser zu verstehen und neue Zielstrukturen für therapeutische Interventionen zu identifizieren.

## 6 Literaturverzeichnis

1. **Hof, H., Dörries, R.** *Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag.
2. **Ogston A.** 1882. Micrococcus Poisoning. *J. Anat. Physiol.* **16**: 526–67.
3. **Rosenbach FI.** 1884. *Mikroorganismen bei den Wund-Infektions- Krankheiten des Menschen*. J. F. Bergmann.
4. **Lowy FD.** 1998. Staphylococcus aureus infections. *N. Engl. J. Med.* **339**: 520–32.
5. **Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W,** et al. 2005. The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. *Lancet Infect. Dis.* **5**: 751–62.
6. **Gordon RJ, Lowy FD.** 2008. Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **46 Suppl 5**: S350–9.
7. **Von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H,** et al. 2001. Nasal carriage as a source of Staphylococcus aureus bacteremia. Study Group. *N. Engl. J. Med.* **344**: 11–6.
8. **Albrich WC, Harbarth S.** 2008. Health-care workers: source, vector, or victim of MRSA? *Lancet Infect. Dis.* **8**: 289–301.
9. **Laupland KB, Church DL, Mucenski M, Sutherland LR,** et al. 2003. Population-based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive Staphylococcus aureus infections. *J. Infect. Dis.* **187**: 1452–9.
10. **Tong SYC, Chen LF, Fowler VG.** 2012. Colonization, pathogenicity, host susceptibility, and therapeutics for Staphylococcus aureus: what is the clinical relevance? *Semin. Immunopathol.* **34**: 185–200.
11. **Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG,** et al. 2011. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* **2**: 445–59.
12. **Murray RJ.** 2005. Recognition and management of Staphylococcus aureus toxin-mediated disease. *Intern. Med. J.* **35 Suppl 2**: S106–19.
13. **Hennekinne J-A, De Buyser M-L, Dragacci S.** 2012. Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**: 815–36.
14. **Balaban N, Rasooly A.** 2000. Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* **61**: 1–10.
15. **Ladhani S.** 2003. Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of Staphylococcus aureus. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **39**: 181–9.
16. **Thwaites GE, Edgeworth JD, Gkrania-Klotsas E, Kirby A,** et al. 2011. Clinical management of Staphylococcus aureus bacteraemia. *Lancet Infect. Dis.* **11**: 208–22.

17. **Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM**, et al. 2009. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**: 376–93.
18. **Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T**, et al. 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**: 1225–40.
19. **Kirby WM**. 1944. EXTRACTION OF A HIGHLY POTENT PENICILLIN INACTIVATOR FROM PENICILLIN RESISTANT STAPHYLOCOCCI. *Science* **99**: 452–3.
20. **Chambers HF, Deleo FR**. 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 629–41.
21. **Chambers HF**. 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 178–82.
22. **Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K**. 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1549–55.
23. **Ubukata K, Nonoguchi R, Matsushashi M, Konno M**. 1989. Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the mecA gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. *J. Bacteriol.* **171**: 2882–5.
24. RKI - RKI-Ratgeber für Ärzte - Staphylokokken-Erkrankungen, insbesondere Infektionen durch MRSA.
25. **Chatterjee SS, Otto M**. 2013. Improved understanding of factors driving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic waves. *Clin. Epidemiol.* **5**: 205–17.
26. **European Center for Disease Control and Prevention**. 2013. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012.
27. **Gould IM, Reilly J, Bunyan D, Walker A**. 2010. Costs of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its control. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16**: 1721–8.
28. **Appelbaum PC**. 2007. Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int. J. Antimicrob. Agents* **30**: 398–408.
29. **Skiest DJ**. 2006. Treatment failure resulting from resistance of *Staphylococcus aureus* to daptomycin. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 655–6.
30. **Dabul ANG, Camargo ILBC**. 2014. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to tigecycline and daptomycin isolated in a hospital in Brazil. *Epidemiol. Infect.* **142**: 479–83.
31. **Morales G, Picazo JJ, Baos E, Candel FJ**, et al. 2010. Resistance to linezolid is mediated by the cfr gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **50**: 821–5.

- 
32. **Jansen KU, Girgenti DQ, Scully IL, Anderson AS.** 2013. Vaccine review: "Staphylococcus aureus vaccines: problems and prospects." *Vaccine* **31**: 2723–30.
  33. **Pier GB.** 2013. Will there ever be a universal Staphylococcus aureus vaccine? *Hum. Vaccines Immunother.* **9**: 1865–76.
  34. **Spellberg B, Daum R.** 2012. Development of a vaccine against Staphylococcus aureus. *Semin. Immunopathol.* **34**: 335–48.
  35. **Biedenbach DJ, Moet GJ, Jones RN.** 2004. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **50**: 59–69.
  36. **Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H,** et al. 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **39**: 309–17.
  37. **López-Cortés LE, Del Toro MD, Gálvez-Acebal J, Bereciartua-Bastarrica E,** et al. 2013. Impact of an evidence-based bundle intervention in the quality-of-care management and outcome of Staphylococcus aureus bacteremia. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **57**: 1225–33.
  38. **Van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, Espedido BA,** et al. 2012. Predictors of mortality in Staphylococcus aureus Bacteremia. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**: 362–86.
  39. **Matsuda N, Hattori Y.** 2007. Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. *J. Smooth Muscle Res. Nihon Heikatsukin Gakkai Kikanshi* **43**: 117–37.
  40. **Greten, H., Rinninger, F., Greten, T.** *Innere Medizin.* Georg Thieme Verlag.
  41. **Que Y-A, Moreillon P.** 2011. Infective endocarditis. *Nat. Rev. Cardiol.* **8**: 322–36.
  42. **Fowler VG, Miro JM, Hoen B, Cabell CH,** et al. 2005. Staphylococcus aureus endocarditis: a consequence of medical progress. *JAMA* **293**: 3012–21.
  43. **Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, Miró JM,** et al. 2009. Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis-Pro prospective Cohort Study. *Arch. Intern. Med.* **169**: 463–73.
  44. **Nadji G, Réyadi JP, Coviaux F, Mirode AA,** et al. 2005. Comparison of clinical and morphological characteristics of Staphylococcus aureus endocarditis with endocarditis caused by other pathogens. *Heart Br. Card. Soc.* **91**: 932–7.
  45. **Suttorp, N., Mielke, M., Kiehl, W., Stück, B.** 2003. *Infektionskrankheiten verstehen, erkennen, behandeln.* Georg Thieme Verlag.
-

46. **Fernández Guerrero ML, González López JJ, Goyenechea A, Fraile J, et al.** 2009. Endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*: A reappraisal of the epidemiologic, clinical, and pathologic manifestations with analysis of factors determining outcome. *Medicine (Baltimore)* **88**: 1–22.
  47. **Selton-Suty C, Hoen B, Delahaye F, Lacassin F, et al.** 1996. Comparison of infective endocarditis in patients with and without previously recognized heart disease. *Am. J. Cardiol.* **77**: 1134–7.
  48. **Moreillon P, Que YA, Bayer AS.** 2002. Pathogenesis of streptococcal and staphylococcal endocarditis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **16**: 297–318.
  49. **Marom D, Ashkenazi S, Samra Z, Birk E.** 2013. Infective endocarditis in previously healthy children with structurally normal hearts. *Pediatr. Cardiol.* **34**: 1415–21.
  50. **Castillo JC, Anguita MP, Torres F, Siles JR, et al.** 2002. [Risk factors associated with endocarditis without underlying heart disease]. *Rev. Esp. Cardiol.* **55**: 304–7.
  51. **Fernández-Hidalgo N, Tornos Mas P.** 2013. Epidemiology of infective endocarditis in Spain in the last 20 years. *Rev. Esp. Cardiol. Engl. Ed* **66**: 728–33.
  52. **McKinsey DS, Ratts TE, Bisno AL.** 1987. Underlying cardiac lesions in adults with infective endocarditis. The changing spectrum. *Am. J. Med.* **82**: 681–8.
  53. **Nissen H, Nielsen PF, Frederiksen M, Helleberg C, et al.** 1992. Native valve infective endocarditis in the general population: a 10-year survey of the clinical picture during the 1980s. *Eur. Heart J.* **13**: 872–7.
  54. **Mylonakis E, Calderwood SB.** 2001. Infective endocarditis in adults. *N. Engl. J. Med.* **345**: 1318–30.
  55. **McDonald JR.** 2009. Acute infective endocarditis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **23**: 643–64.
  56. **Cabell CH, Jollis JG, Peterson GE, Corey GR, et al.** 2002. Changing patient characteristics and the effect on mortality in endocarditis. *Arch. Intern. Med.* **162**: 90–4.
  57. **Edwards AM, Massey RC.** 2011. How does *Staphylococcus aureus* escape the bloodstream? *Trends Microbiol.* **19**: 184–90.
  58. **Foster TJ.** 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 948–58.
  59. **Lüllmann-Rauch, R.** 2006. *Taschenlehrbuch Histologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
  60. **Leask RL, Jain N, Butany J.** 2003. Endothelium and valvular diseases of the heart. *Microsc. Res. Tech.* **60**: 129–37.
  61. **Goldenberg NM, Steinberg BE, Slutsky AS, Lee WL.** 2011. Broken barriers: a new take on sepsis pathogenesis. *Sci. Transl. Med.* **3**: 88ps25.
-

62. **Aird WC.** 2003. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* **101**: 3765–77.
63. **Goddard LM, Iruela-Arispe ML.** 2013. Cellular and molecular regulation of vascular permeability. *Thromb. Haemost.* **109**: 407–15.
64. **Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH,** et al. 2010. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* **468**: 557–61.
65. **Nees S, Weiss DR, Juchem G.** 2013. Focus on cardiac pericytes. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* **465**: 779–87.
66. **Lum H, Malik AB.** 1994. Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am. J. Physiol.* **267**: L223–41.
67. **Luissint A-C, Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K,** et al. 2012. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS* **9**: 23.
68. **Géraud C, Evdokimov K, Straub BK, Peitsch WK,** et al. 2012. Unique cell type-specific junctional complexes in vascular endothelium of human and rat liver sinusoids. *PloS One* **7**: e34206.
69. **Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R,** et al. 1992. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J. Cell Biol.* **118**: 1511–22.
70. **Bazzoni G, Dejana E.** 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol. Rev.* **84**: 869–901.
71. **Pokutta S, Weis WI.** 2002. The cytoplasmic face of cell contact sites. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**: 255–62.
72. **Hatzfeld M.** 2005. The p120 family of cell adhesion molecules. *Eur. J. Cell Biol.* **84**: 205–14.
73. **Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S.** 1997. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J. Cell Biol.* **138**: 181–92.
74. **Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A,** et al. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* **123**: 1777–88.
75. **Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K,** et al. 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* **141**: 1539–50.
76. **Martín-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L,** et al. 1998. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell Biol.* **142**: 117–27.

77. **Bazzoni G, Dejana E.** 2001. Pores in the sieve and channels in the wall: control of paracellular permeability by junctional proteins in endothelial cells. *Microcirc. N. Y. N* 1994 **8**: 143–52.
  78. **Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA.** 1986. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J. Cell Biol.* **103**: 755–66.
  79. **Jockusch BM, Bubeck P, Giehl K, Kroemker M,** et al. 1995. The molecular architecture of focal adhesions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**: 379–416.
  80. **Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL.** 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.* **50**: 197–263.
  81. **Hynes RO.** 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**: 11–25.
  82. **Wu MH, Ustinova E, Granger HJ.** 2001. Integrin binding to fibronectin and vitronectin maintains the barrier function of isolated porcine coronary venules. *J. Physiol.* **532**: 785–91.
  83. **Hu G, Place AT, Minshall RD.** 2008. Regulation of endothelial permeability by Src kinase signaling: vascular leakage versus transcellular transport of drugs and macromolecules. *Chem. Biol. Interact.* **171**: 177–89.
  84. **Thomas SM, Brugge JS.** 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**: 513–609.
  85. **Parsons SJ, Parsons JT.** 2004. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* **23**: 7906–9.
  86. **Potter MD, Barbero S, Cheresh DA.** 2005. Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J. Biol. Chem.* **280**: 31906–12.
  87. **Orsenigo F, Giampietro C, Ferrari A, Corada M,** et al. 2012. Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. *Nat. Commun.* **3**: 1208.
  88. **Gavard J, Gutkind JS.** 2006. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat. Cell Biol.* **8**: 1223–34.
  89. **Weis S, Shintani S, Weber A, Kirchmair R,** et al. 2004. Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *J. Clin. Invest.* **113**: 885–94.
  90. **Pedram A, Razandi M, Levin ER.** 2002. Deciphering vascular endothelial cell growth factor/vascular permeability factor signaling to vascular permeability. Inhibition by atrial natriuretic peptide. *J. Biol. Chem.* **277**: 44385–98.
-

91. **Elias BC, Suzuki T, Seth A, Giorgianni F**, et al. 2009. Phosphorylation of Tyr-398 and Tyr-402 in occludin prevents its interaction with ZO-1 and destabilizes its assembly at the tight junctions. *J. Biol. Chem.* **284**: 1559–69.
92. **Kale G, Naren AP, Sheth P, Rao RK**. 2003. Tyrosine phosphorylation of occludin attenuates its interactions with ZO-1, ZO-2, and ZO-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**: 324–9.
93. **Eliceiri BP, Puente XS, Hood JD, Stupack DG**, et al. 2002. Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin alpha(v)beta5 in vascular endothelial growth factor signaling. *J. Cell Biol.* **157**: 149–60.
94. **Okutani D, Lodyga M, Han B, Liu M**. 2006. Src protein tyrosine kinase family and acute inflammatory responses. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **291**: L129–41.
95. **Kevil CG, Okayama N, Alexander JS**. 2001. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated permeability II: importance of tyrosine phosphatase and kinase activity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281**: C1940–7.
96. **Sinha B, Herrmann M**. 2005. Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by *Staphylococcus aureus*. *Thromb. Haemost.* **94**: 266–77.
97. **Wann ER, Gurusiddappa S, Hook M**. 2000. The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *J. Biol. Chem.* **275**: 13863–71.
98. **Roche FM, Downer R, Keane F, Speziale P**, et al. 2004. The N-terminal A domain of fibronectin-binding proteins A and B promotes adhesion of *Staphylococcus aureus* to elastin. *J. Biol. Chem.* **279**: 38433–40.
99. **Sinha B, Francois P, Que YA, Hussain M**, et al. 2000. Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect. Immun.* **68**: 6871–8.
100. **Fitzgerald JR, Loughman A, Keane F, Brennan M**, et al. 2006. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* mediate activation of human platelets via fibrinogen and fibronectin bridges to integrin GPIIb/IIIa and IgG binding to the Fcγ<sub>3</sub> receptor. *Mol. Microbiol.* **59**: 212–30.
101. **Miyamoto YJ, Wann ER, Fowler T, Duffield E**, et al. 2001. Fibronectin binding protein A of *Staphylococcus aureus* can mediate human T lymphocyte adhesion and coactivation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166**: 5129–38.
102. **O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Humphreys H**, et al. 2008. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *J. Bacteriol.* **190**: 3835–50.
103. **Greene C, McDevitt D, Francois P, Vaudaux PE**, et al. 1995. Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of fnb genes. *Mol. Microbiol.* **17**: 1143–52.



104. **Heilmann C, Niemann S, Sinha B, Herrmann M**, et al. 2004. Staphylococcus aureus fibronectin-binding protein (FnBP)-mediated adherence to platelets, and aggregation of platelets induced by FnBPA but not by FnBPB. *J. Infect. Dis.* **190**: 321–9.
  105. **McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ**. 1994. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of Staphylococcus aureus. *Mol. Microbiol.* **11**: 237–48.
  106. **Niemann S, Spehr N, Van Aken H, Morgenstern E**, et al. 2004. Soluble fibrin is the main mediator of Staphylococcus aureus adhesion to platelets. *Circulation* **110**: 193–200.
  107. **O'Brien LM, Walsh EJ, Massey RC, Peacock SJ**, et al. 2002. Staphylococcus aureus clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. *Cell. Microbiol.* **4**: 759–70.
  108. **Moks T, Abrahmsén L, Nilsson B, Hellman U**, et al. 1986. Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur. J. Biochem. FEBS* **156**: 637–43.
  109. **Hartleib J, Köhler N, Dickinson RB, Chhatwal GS**, et al. 2000. Protein A is the von Willebrand factor binding protein on Staphylococcus aureus. *Blood* **96**: 2149–56.
  110. **Gómez MI, Lee A, Reddy B, Muir A**, et al. 2004. Staphylococcus aureus protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat. Med.* **10**: 842–8.
  111. **Clarke SR, Wiltshire MD, Foster SJ**. 2004. IsdA of Staphylococcus aureus is a broad spectrum, iron-regulated adhesin. *Mol. Microbiol.* **51**: 1509–19.
  112. **Taylor JM, Heinrichs DE**. 2002. Transferrin binding in Staphylococcus aureus: involvement of a cell wall-anchored protein. *Mol. Microbiol.* **43**: 1603–14.
  113. **Mazmanian SK, Skaar EP, Gaspar AH, Humayun M**, et al. 2003. Passage of heme-iron across the envelope of Staphylococcus aureus. *Science* **299**: 906–9.
  114. **Hildén P, Savolainen K, Tyynelä J, Vuento M**, et al. 1996. Purification and characterisation of a plasmin-sensitive surface protein of Staphylococcus aureus. *Eur. J. Biochem. FEBS* **236**: 904–10.
  115. **Hussain M, Schäfer D, Juuti KM, Peters G**, et al. 2009. Expression of Pls (plasmin sensitive) in Staphylococcus aureus negative for pls reduces adherence and cellular invasion and acts by steric hindrance. *J. Infect. Dis.* **200**: 107–17.
  116. **Juuti KM, Sinha B, Werbick C, Peters G**, et al. 2004. Reduced adherence and host cell invasion by methicillin-resistant Staphylococcus aureus expressing the surface protein Pls. *J. Infect. Dis.* **189**: 1574–84.
  117. **Huesca M, Peralta R, Sauder DN, Simor AE**, et al. 2002. Adhesion and virulence properties of epidemic Canadian methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain 1: identification of novel adhesion functions associated with plasmin-sensitive surface protein. *J. Infect. Dis.* **185**: 1285–96.
-

118. **Roche FM, Meehan M, Foster TJ.** 2003. The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. *Microbiol. Read. Engl.* **149**: 2759–67.
119. **Chavakis T, Hussain M, Kanse SM, Peters G,** et al. 2002. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat. Med.* **8**: 687–93.
120. **Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, Herrmann M.** 2005. *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial “secretable expanded repertoire adhesive molecules” (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb. Haemost.* **94**: 278–85.
121. **Harraghy N, Hussain M, Haggar A, Chavakis T,** et al. 2003. The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiol. Read. Engl.* **149**: 2701–7.
122. **Hussain M, Haggar A, Peters G, Chhatwal GS,** et al. 2008. More than one tandem repeat domain of the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus* is required for aggregation, adherence, and host cell invasion but not for leukocyte activation. *Infect. Immun.* **76**: 5615–23.
123. **Hussain M, Becker K, von Eiff C, Schrenzel J,** et al. 2001. Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. *J. Bacteriol.* **183**: 6778–86.
124. **Pai AB, Patel H, Prokopienko AJ, Alsaffar H,** et al. 2012. Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* induces lung endothelial cell barrier dysfunction: role of reactive oxygen and nitrogen species. *PLoS One* **7**: e49209.
125. **Weidenmaier C, Peschel A, Xiong Y-Q, Kristian SA,** et al. 2005. Lack of wall teichoic acids in *Staphylococcus aureus* leads to reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of endocarditis. *J. Infect. Dis.* **191**: 1771–7.
126. **Mosher DF, Proctor RA.** 1980. Binding and factor XIIIa-mediated cross-linking of a 27-kilodalton fragment of fibronectin to *Staphylococcus aureus*. *Science* **209**: 927–9.
127. **Mazmanian SK, Liu G, Ton-That H, Schneewind O.** 1999. *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* **285**: 760–3.
128. **Bingham RJ, Rudiño-Piñera E, Meenan NAG, Schwarz-Linek U,** et al. 2008. Crystal structures of fibronectin-binding sites from *Staphylococcus aureus* FnBPA in complex with fibronectin domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 12254–8.
129. **Jönsson K, Signäs C, Müller HP, Lindberg M.** 1991. Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *Eur. J. Biochem. FEBS* **202**: 1041–8.

130. **Heying R, van de Gevel J, Que Y-A, Moreillon P, et al.** 2007. Fibronectin-binding proteins and clumping factor A in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis: FnBPA is sufficient to activate human endothelial cells. *Thromb. Haemost.* **97**: 617–26.
  131. **Proctor RA.** 1987. The staphylococcal fibronectin receptor: evidence for its importance in invasive infections. *Rev. Infect. Dis.* **9 Suppl 4**: S335–40.
  132. **Proctor RA, Christman G, Mosher DF.** 1984. Fibronectin-induced agglutination of *Staphylococcus aureus* correlates with invasiveness. *J. Lab. Clin. Med.* **104**: 455–69.
  133. **Palmqvist N, Foster T, Fitzgerald JR, Josefsson E, et al.** 2005. Fibronectin-binding proteins and fibrinogen-binding clumping factors play distinct roles in staphylococcal arthritis and systemic inflammation. *J. Infect. Dis.* **191**: 791–8.
  134. **Edwards AM, Potts JR, Josefsson E, Massey RC.** 2010. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and virulence in sepsis is facilitated by the multiple repeats within FnBPA. *PLoS Pathog.* **6**: e1000964.
  135. **Piroth L, Que Y-A, Widmer E, Panchaud A, et al.** 2008. The fibrinogen- and fibronectin-binding domains of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A synergistically promote endothelial invasion and experimental endocarditis. *Infect. Immun.* **76**: 3824–31.
  136. **Loughman A, Fitzgerald JR, Brennan MP, Higgins J, et al.** 2005. Roles for fibrinogen, immunoglobulin and complement in platelet activation promoted by *Staphylococcus aureus* clumping factor A. *Mol. Microbiol.* **57**: 804–18.
  137. **O'Brien L, Kerrigan SW, Kaw G, Hogan M, et al.** 2002. Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. *Mol. Microbiol.* **44**: 1033–44.
  138. **Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, et al.** 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **70**: 4987–96.
  139. **Que Y-A, Haefliger J-A, Piroth L, François P, et al.** 2005. Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. *J. Exp. Med.* **201**: 1627–35.
  140. **Josefsson E, Higgins J, Foster TJ, Tarkowski A.** 2008. Fibrinogen binding sites P336 and Y338 of clumping factor A are crucial for *Staphylococcus aureus* virulence. *PLoS One* **3**: e2206.
  141. **Kerdudou S, Laschke MW, Sinha B, Preissner KT, et al.** 2006. Fibronectin binding proteins contribute to the adherence of *Staphylococcus aureus* to intact endothelium in vivo. *Thromb. Haemost.* **96**: 183–9.
  142. **Cooper MD, Jeffery C, Gall DL, Anderson AS.** 1985. Scanning electron microscopy studies of staphylococcal adherence to heart valve endothelial cells in organ culture: an in vitro model of acute endocarditis. *Scan. Electron Microsc.* : 1231–7.
-

143. **Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D.** 2006. The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 445–57.
144. **Sullam PM, Bayer AS, Foss WM, Cheung AL.** 1996. Diminished platelet binding in vitro by *Staphylococcus aureus* is associated with reduced virulence in a rabbit model of infective endocarditis. *Infect. Immun.* **64**: 4915–21.
145. **Miajlovic H, Loughman A, Brennan M, Cox D,** et al. 2007. Both complement- and fibrinogen-dependent mechanisms contribute to platelet aggregation mediated by *Staphylococcus aureus* clumping factor B. *Infect. Immun.* **75**: 3335–43.
146. **Kroh HK, Panizzi P, Bock PE.** 2009. Von Willebrand factor-binding protein is a hysteretic conformational activator of prothrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 7786–91.
147. **Friedrich R, Panizzi P, Fuentes-Prior P, Richter K,** et al. 2003. Staphylocoagulase is a prototype for the mechanism of cofactor-induced zymogen activation. *Nature* **425**: 535–9.
148. **Chorianopoulos E, Bea F, Katus HA, Frey N.** 2009. The role of endothelial cell biology in endocarditis. *Cell Tissue Res.* **335**: 153–63.
149. **McAdow M, Missiakas DM, Schneewind O.** 2012. *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. *J. Innate Immun.* **4**: 141–8.
150. **McAdow M, Kim HK, Dedent AC, Hendrickx APA,** et al. 2011. Preventing *Staphylococcus aureus* sepsis through the inhibition of its agglutination in blood. *PLoS Pathog.* **7**: e1002307.
151. **Cheng AG, McAdow M, Kim HK, Bae T,** et al. 2010. Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. *PLoS Pathog.* **6**: e1001036.
152. **Lowy FD.** 2000. Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? *Trends Microbiol.* **8**: 341–3.
153. **Sinha B, François PP, Nüsse O, Foti M,** et al. 1999. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cell. Microbiol.* **1**: 101–17.
154. **Schäfer D, Lâm T-T, Geiger T, Mainiero M,** et al. 2009. A point mutation in the sensor histidine kinase SaeS of *Staphylococcus aureus* strain Newman alters the response to biocide exposure. *J. Bacteriol.* **191**: 7306–14.
155. **Bur S, Preissner KT, Herrmann M, Bischoff M.** 2013. The *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein promotes bacterial internalization by keratinocytes independent of fibronectin-binding proteins. *J. Invest. Dermatol.* **133**: 2004–12.
156. **Sheen TR, Ebrahimi CM, Hiemstra IH, Barlow SB,** et al. 2010. Penetration of the blood-brain barrier by *Staphylococcus aureus*: contribution of membrane-anchored lipoteichoic acid. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **88**: 633–9.

157. **Agerer F, Michel A, Ohlsen K, Hauck CR.** 2003. Integrin-mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src family protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* **278**: 42524–31.
  158. **Agerer F, Lux S, Michel A, Rohde M,** et al. 2005. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalisation. *J. Cell Sci.* **118**: 2189–200.
  159. **Fowler T, Johansson S, Wary KK, Höök M.** 2003. Src kinase has a central role in in vitro cellular internalization of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Microbiol.* **5**: 417–26.
  160. **Dziewanowska K, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW,** et al. 1999. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect. Immun.* **67**: 4673–8.
  161. **Garzoni C, Kelley WL.** 2009. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol.* **17**: 59–65.
  162. **Sinha B, Herrmann M, Krause KH.** 2000. Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? *Trends Microbiol.* **8**: 343–4.
  163. **Ring A, Weiser JN, Tuomanen EI.** 1998. Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J. Clin. Invest.* **102**: 347–60.
  164. **Fraunholz M, Sinha B.** 2012. Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**: 43.
  165. **Sinha B, Fraunholz M.** 2010. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **300**: 170–5.
  166. **Schubert-Unkmeir A, Konrad C, Slanina H, Czapek F,** et al. 2010. *Neisseria meningitidis* induces brain microvascular endothelial cell detachment from the matrix and cleavage of occludin: a role for MMP-8. *PLoS Pathog.* **6**: e1000874.
  167. **Ohnemus U, Kohrmeyer K, Houdek P, Rohde H,** et al. 2008. Regulation of epidermal tight-junctions (TJ) during infection with exfoliative toxin-negative *Staphylococcus* strains. *J. Invest. Dermatol.* **128**: 906–16.
  168. **Boyer L, Doye A, Rolando M, Flatau G,** et al. 2006. Induction of transient macroapertures in endothelial cells through RhoA inhibition by *Staphylococcus aureus* factors. *J. Cell Biol.* **173**: 809–19.
  169. **Soong G, Martin FJ, Chun J, Cohen TS,** et al. 2011. *Staphylococcus aureus* protein A mediates invasion across airway epithelial cells through activation of RhoA GTPase signaling and proteolytic activity. *J. Biol. Chem.* **286**: 35891–8.
  170. **Kwak Y-K, Vikström E, Magnusson K-E, Vécsey-Semjén B,** et al. 2012. The *Staphylococcus aureus* alpha-toxin perturbs the barrier function in Caco-2 epithelial cell monolayers by altering junctional integrity. *Infect. Immun.* **80**: 1670–80.
-

171. **Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB.** 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**: 3734–7.
172. **Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W,** et al. 1976. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **17**: 62–70.
173. **Balwit JM, van Langevelde P, Vann JM, Proctor RA.** 1994. Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. *J. Infect. Dis.* **170**: 1033–7.
174. **Sherertz RJ, Carruth WA, Hampton AA, Byron MP,** et al. 1993. Efficacy of antibiotic-coated catheters in preventing subcutaneous *Staphylococcus aureus* infection in rabbits. *J. Infect. Dis.* **167**: 98–106.
175. **Duthie ES, Lorenz LL.** 1952. Staphylococcal coagulase; mode of action and antigenicity. *J. Gen. Microbiol.* **6**: 95–107.
176. **Schleifer, K. H., Fischer, U.** 1982. Description of a New Species of the Genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **32(2)**: 153–6.
177. **Slanina H, König A, Claus H, Frosch M,** et al. 2011. Real-time impedance analysis of host cell response to meningococcal infection. *J. Microbiol. Methods* **84**: 101–8.
178. **Kumar JK.** 2008. Lysostaphin: an antistaphylococcal agent. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80**: 555–61.
179. **Wu JA, Kusuma C, Mond JJ, Kokai-Kun JF.** 2003. Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 3407–14.
180. **Akiyama T, Ogawara H.** 1991. Use and specificity of genistein as inhibitor of protein-tyrosine kinases. *Methods Enzymol.* **201**: 362–70.
181. **Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS,** et al. 1996. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J. Biol. Chem.* **271**: 695–701.
182. **Kocher M, Clemetson KJ.** 1991. Staurosporine both activates and inhibits serine/threonine kinases in human platelets. *Biochem. J.* **275 ( Pt 2)**: 301–6.
183. **Secrist JP, Sehgal I, Powis G, Abraham RT.** 1990. Preferential inhibition of the platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase by staurosporine. *J. Biol. Chem.* **265**: 20394–400.
184. **Meyer T, Regenass U, Fabbro D, Alteri E,** et al. 1989. A derivative of staurosporine (CGP 41 251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and in vitro anti-proliferative as well as in vivo anti-tumor activity. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **43**: 851–6.

185. **Yanagihara N, Tachikawa E, Izumi F, Yasugawa S**, et al. 1991. Staurosporine: an effective inhibitor for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Neurochem.* **56**: 294–8.
186. **Zhang XD, Gillespie SK, Hersey P**. 2004. Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Mol. Cancer Ther.* **3**: 187–97.
187. **Yu J, Fischman DA, Steck TL**. 1973. Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *J. Supramol. Struct.* **1**: 233–48.
188. **Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR**. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**: 251–306.
189. **Nagata S**. 2000. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* **256**: 12–8.
190. **Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F**, et al. 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **139**: 271–9.
191. **Pendergrass W, Wolf N, Poot M**. 2004. Efficacy of MitoTracker Green and CMXrosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **61**: 162–9.
192. **Rosenstein R, Nerz C, Biswas L, Resch A**, et al. 2009. Genome analysis of the meat starter culture bacterium *Staphylococcus carnosus* TM300. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 811–22.
193. **Grundmeier M, Hussain M, Becker P, Heilmann C**, et al. 2004. Truncation of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* strain Newman leads to deficient adherence and host cell invasion due to loss of the cell wall anchor function. *Infect. Immun.* **72**: 7155–63.
194. **Haslinger-Löffler B, Kahl BC, Grundmeier M, Strangfeld K**, et al. 2005. Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells. *Cell. Microbiol.* **7**: 1087–97.
195. **Wyllie AH**. 2010. “Where, O death, is thy sting?” A brief review of apoptosis biology. *Mol. Neurobiol.* **42**: 4–9.
196. **Petit PX, Susin SA, Zamzami N, Mignotte B**, et al. 1996. Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett.* **396**: 7–13.
197. **Böhm I, Schild H**. 2003. Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* **5**: 2–14.
198. **González-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D**. 2008. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**: 729–56.
199. **Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K**, et al. 1999. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 9815–20.

200. **Kramko N, Sinitski D, Seebach J, Löffler B**, et al. 2013. Early Staphylococcus aureus-induced changes in endothelial barrier function are strain-specific and unrelated to bacterial translocation. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **303**: 635–44.
201. **Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C**. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* **184**: 39–51.
202. **Esen M, Schreiner B, Jendrossek V, Lang F**, et al. 2001. Mechanisms of Staphylococcus aureus induced apoptosis of human endothelial cells. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **6**: 431–9.
203. **Haslinger B, Strangfeld K, Peters G, Schulze-Osthoff K**, et al. 2003. Staphylococcus aureus alpha-toxin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cells: role of endogenous tumour necrosis factor-alpha and the mitochondrial death pathway. *Cell. Microbiol.* **5**: 729–41.
204. **Essmann F, Bantel H, Totzke G, Engels IH**, et al. 2003. Staphylococcus aureus alpha-toxin-induced cell death: predominant necrosis despite apoptotic caspase activation. *Cell Death Differ.* **10**: 1260–72.
205. **Genestier A-L, Michallet M-C, Prévost G, Bellot G**, et al. 2005. Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **115**: 3117–27.
206. **Leist M, Jäätelä M**. 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 589–98.
207. **Sevrioukova IF**. 2011. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. *Antioxid. Redox Signal.* **14**: 2545–79.
208. **Racoma IO, Meisen WH, Wang Q-E, Kaur B**, et al. 2013. Thymoquinone inhibits autophagy and induces cathepsin-mediated, caspase-independent cell death in glioblastoma cells. *PloS One* **8**: e72882.
209. **Frisch SM, Francis H**. 1994. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* **124**: 619–26.
210. **Beaufort N, Corvazier E, Mlanaoindrou S, de Bentzmann S**, et al. 2013. Disruption of the endothelial barrier by proteases from the bacterial pathogen Pseudomonas aeruginosa: implication of matrilysis and receptor cleavage. *PloS One* **8**: e75708.
211. **Sukumaran SK, Prasadarao NV**. 2003. Escherichia coli K1 invasion increases human brain microvascular endothelial cell monolayer permeability by disassembling vascular-endothelial cadherins at tight junctions. *J. Infect. Dis.* **188**: 1295–309.
212. **Chi F, Wang L, Zheng X, Wu C-H**, et al. 2011. Meningitic Escherichia coli K1 penetration and neutrophil transmigration across the blood-brain barrier are modulated by alpha7 nicotinic receptor. *PloS One* **6**: e25016.



213. **Singh AK, Jiang Y, Gupta S.** 2007. Effects of bacterial toxins on endothelial tight junction in vitro: a mechanism-based investigation. *Toxicol. Mech. Methods* **17**: 331–47.
  214. **Roe K, Kumar M, Lum S, Orillo B,** et al. 2012. West Nile virus-induced disruption of the blood-brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases. *J. Gen. Virol.* **93**: 1193–203.
  215. **Verma S, Kumar M, Gurjav U, Lum S,** et al. 2010. Reversal of West Nile virus-induced blood-brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor. *Virology* **397**: 130–8.
  216. **Nakamuta S, Endo H, Higashi Y, Kousaka A,** et al. 2008. Human immunodeficiency virus type 1 gp120-mediated disruption of tight junction proteins by induction of proteasome-mediated degradation of zonula occludens-1 and -2 in human brain microvascular endothelial cells. *J. Neurovirol.* **14**: 186–95.
  217. **Kanlaya R, Pattanakitsakul S, Sinchaikul S, Chen S-T,** et al. 2009. Alterations in actin cytoskeletal assembly and junctional protein complexes in human endothelial cells induced by dengue virus infection and mimicry of leukocyte transendothelial migration. *J. Proteome Res.* **8**: 2551–62.
  218. **Wessler S, Backert S.** 2008. Molecular mechanisms of epithelial-barrier disruption by *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol.* **16**: 397–405.
  219. **Gillrie MR, Krishnegowda G, Lee K, Buret AG,** et al. 2007. Src-family kinase dependent disruption of endothelial barrier function by *Plasmodium falciparum* merozoite proteins. *Blood* **110**: 3426–35.
  220. **Mehta D.** 2012. Focal adhesion kinase regulation of endothelial barrier function, apoptosis, and neovascularization. *Microvasc. Res.* **83**: 1–2.
  221. **Chen XL, Nam J-O, Jean C, Lawson C,** et al. 2012. VEGF-induced vascular permeability is mediated by FAK. *Dev. Cell* **22**: 146–57.
  222. **Konstantoulaki M, Kouklis P, Malik AB.** 2003. Protein kinase C modifications of VE-cadherin, p120, and beta-catenin contribute to endothelial barrier dysregulation induced by thrombin. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **285**: L434–42.
  223. **Mempel M, Schnopp C, Hojka M, Fesq H,** et al. 2002. Invasion of human keratinocytes by *Staphylococcus aureus* and intracellular bacterial persistence represent haemolysin-independent virulence mechanisms that are followed by features of necrotic and apoptotic keratinocyte cell death. *Br. J. Dermatol.* **146**: 943–51.
  224. **Pezzicoli A, Santi I, Lauer P, Rosini R,** et al. 2008. Pilus backbone contributes to group B *Streptococcus* paracellular translocation through epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **198**: 890–8.
  225. **Van Schilfgaarde M, van Alphen L, Eijk P, Everts V,** et al. 1995. Paracytosis of *Haemophilus influenzae* through cell layers of NCI-H292 lung epithelial cells. *Infect. Immun.* **63**: 4729–37.
-

226. **Doran KS, Banerjee A, Disson O, Lecuit M.** 2013. Concepts and mechanisms: crossing host barriers. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**
227. **Pappelbaum KI, Gorzelanny C, Grässle S, Suckau J,** et al. 2013. Ultralarge von Willebrand factor fibers mediate luminal Staphylococcus aureus adhesion to an intact endothelial cell layer under shear stress. *Circulation* **128**: 50–9.
228. **Schennings T, Heimdahl A, Coster K, Flock JI.** 1993. Immunization with fibronectin binding protein from Staphylococcus aureus protects against experimental endocarditis in rats. *Microb. Pathog.* **15**: 227–36.
229. **Mamo W, Jonsson P, Flock JI, Lindberg M,** et al. 1994. Vaccination against Staphylococcus aureus mastitis: immunological response of mice vaccinated with fibronectin-binding protein (FnBP-A) to challenge with S. aureus. *Vaccine* **12**: 988–92.
230. **Casolini F, Visai L, Joh D, Conaldi PG,** et al. 1998. Antibody response to fibronectin-binding adhesin FnbpA in patients with Staphylococcus aureus infections. *Infect. Immun.* **66**: 5433–42.
231. **Rindi S, Cicalini S, Pietrocola G, Venditti M,** et al. 2006. Antibody response in patients with endocarditis caused by Staphylococcus aureus. *Eur. J. Clin. Invest.* **36**: 536–43.
232. **House-Pompeo K, Xu Y, Joh D, Speziale P,** et al. 1996. Conformational changes in the fibronectin binding MSCRAMMs are induced by ligand binding. *J. Biol. Chem.* **271**: 1379–84.
233. **Menzies BE.** 2003. The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of Staphylococcus aureus infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **16**: 225–9.
234. **Huesca M, Sun Q, Peralta R, Shivji GM,** et al. 2000. Synthetic peptide immunogens elicit polyclonal and monoclonal antibodies specific for linear epitopes in the D motifs of Staphylococcus aureus fibronectin-binding protein, which are composed of amino acids that are essential for fibronectin binding. *Infect. Immun.* **68**: 1156–63.
235. **Proctor RA.** 2012. Challenges for a universal Staphylococcus aureus vaccine. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **54**: 1179–86.
236. **Menzies BE, Kourteva Y, Kaiser AB, Kernodle DS.** 2002. Inhibition of staphylococcal wound infection and potentiation of antibiotic prophylaxis by a recombinant fragment of the fibronectin-binding protein of Staphylococcus aureus. *J. Infect. Dis.* **185**: 937–43.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Struktureller Aufbau von <i>Staphylococcus aureus</i> FnBPA .....	12
Abb. 2:	Invasionsmechanismus von <i>Staphylococcus aureus</i> .....	15
Abb. 3:	Schematische Darstellung xCELLigence-System .....	27
Abb. 4:	Schematische Darstellung Transwell-System .....	29
Abb. 5:	Hypodiploide Nuklei zeigen eine geringere Fluoreszenz im FL2-Kanal .....	37
Abb. 6:	Die Expression von FnBPs im <i>S. carnosus</i> -Stamm TM300 führt zu einer Abnahme der transendothelialen Impedanz in EA.hy926-Zellen .....	41
Abb. 7:	Die Deletion von FnBPA/B im <i>S. aureus</i> -Stamm P1 inhibiert den Impedanzverlust in EA.hy926-Zellen .....	42
Abb. 8:	FnBP-exprimierende <i>S. carnosus</i> -Stämme erhöhen die Endothelpermeabilität in EA.hy926-Zellen 4 Stunden nach Infektion .....	43
Abb. 9:	FnBP-exprimierende <i>S. carnosus</i> -Stämme erhöhen die Endothelpermeabilität in EA.hy926-Zellen 24 Stunden nach Infektion .....	44
Abb. 10:	Der FnBP-exprimierende <i>S. aureus</i> -Stamm P1 erhöht die Endothelpermeabilität in EA.hy926-Zellen 4 Stunden nach Infektion .....	45
Abb. 11:	Der FnBP-exprimierende <i>S. aureus</i> -Stamm P1 erhöht die Endothelpermeabilität in EA.hy926-Zellen 24 Stunden nach Infektion .....	46
Abb. 12:	<i>S. aureus</i> -Stämme Cowan I und 6850 führen zu einer erhöhten Endothelpermeabilität in EA.hy926-Zellen 24 Stunden nach Infektion .....	47
Abb. 13:	Mit FnBP-exprimierenden <i>S. aureus</i> - und <i>S. carnosus</i> -Stämmen infizierte EA.hy926-Zellen weisen keinen Verlust von Zellmasse 4 Stunden nach Infektion auf.....	48
Abb. 14:	Mikroskopie von kristallviolettgefärbten EA.hy926-Zellen zeigt keine Unterschiede in der Zellzahl 4 Stunden nach Infektion mit <i>S. aureus</i> und <i>S. carnosus</i> .....	50
Abb. 15:	FnBP-exprimierende <i>S. aureus</i> und <i>S. carnosus</i> -Stämme reduzieren die EA.hy926-Zellmasse 24 Stunden nach Infektion.....	51

Abb. 16: Mikroskopie von kristallviolettgefärbten EA.hy926-Zellen zeigt eine Abnahme der Zellzahl durch FnBP-produzierende <i>S. aureus</i> - und <i>S. carnosus</i> -Stämme 24 Stunden nach Infektion .....	52
Abb. 17: EA.hy926-Zellen zeigen 4 Stunden nach Infektion keine Veränderungen des Mitochondrienpotenzials oder der Zellkerne in der Immunfluoreszenz .....	54
Abb. 18: FnBP-produzierende <i>S. aureus</i> - und <i>S. carnosus</i> -Stämme bewirken eine Schädigung der mitochondrialen und nukleären Integrität in EA.hy926-Zellen 24 Stunden nach Infektion.....	55
Abb. 19: Expression von FnBPs in <i>S. aureus</i> und <i>S. carnosus</i> erhöht die Anzahl hypodiploider Nuklei in EA.hy926-Zellen 24 Stunden nach Infektion.....	56
Abb. 20: Z-VAD-fmk inhibiert den Anstieg hypodiploider Nuklei in EA.hy926-Zellen durch FnBP-komplementierte <i>S. carnosus</i> -TM300-Stämmen, nicht aber durch die <i>S. aureus</i> -Stämmen P1 und 6850.....	57
Abb. 21: FnBP-exprimierende <i>S. aureus</i> - und <i>S. carnosus</i> -Stämme führen 4 Stunden nach Infektion zu einer Abnahme der ZO-1-Signalintensität in EA.hy926-Zellen .....	59
Abb. 22: FnBP-exprimierende <i>S. aureus</i> - und <i>S. carnosus</i> -Stämme führen 4 Stunden nach Infektion zu einer Abnahme der VE-Cadherin-Signalintensität in HDMEC.....	60
Abb. 23: Genistein inhibiert die FnBP-vermittelte Erhöhung der Endothelpermeabilität in EA.hy926-Zellen 4 Stunden nach Infektion .....	61
Abb. 24: PP2 inhibiert die FnBP-vermittelte Erhöhung der Endothelpermeabilität in EA.hy926-Zellen nach 4 und 24 Stunden .....	63

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: <i>S. aureus</i> -Adhäsine mit Relevanz für die Adhärenz an Endothelzellen .....	11
Tab. 2: Geräte .....	19
Tab. 3: Material .....	20
Tab. 4: Antikörper .....	21
Tab. 5: Bakterienstämme .....	24
Tab. 6: Tyrosin-Kinase-Inhibitoren.....	32
Tab. 7: Primär- und Sekundärantikörper .....	38

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIF	Apoptosis-Inducing Faktor
CA-MRSA	Ambulant erworbener Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
CI	Zellindex
CifA / B	Clumpingfaktor A / B
cm	Chloramphenicol
cm <sup>2</sup>	Einheit: Quadratzentimeter
Coa	Staphylokoagulase
Cy3	Indocarbocyanin
dag	Esel anti-Ziege
Δ	Deletion
DAPI	Diamidinphenylindol
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eaglemedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Eap	Extracellular adherence protein
EDIN	Epidermal cell differentiation inhibitors
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Emp	Extracellular matrix protein-binding protein
erm	Erythromycin
ET	Exfoliativtoxin
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAK	Fokale Adhäsionskinase
F-Aktin	Filamentäres Aktin
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fn	Fibronectin
FnBP (A / B)	Fibronectin-Bindeprotein (A / B)

---

GPIIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
GTPase	Guanosintriphosphat-Hydrolase
HA-MRSA	Nosokomial erworbener Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
HBMEC	Humane mikrovaskuläre Gehirn-Endothelzellen
HDMEC	Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen
HSA	Humanes Serumalbumin
HUVEC	Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen
i. v.	Intravenös
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
Isd	Iron-regulated surface determinant
JAM	Junction adhesion molecule
kDa	Einheit: Kilodalton
LTA	Lipoteichonsäuren
MHB	Müller-Hinton-Bouillon
ml	Einheit: Milliliter
mM	Einheit: Millimolar
mm	Einheit: Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOI	Multiplicity of infection
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
MW	Mittelwert
µg	Einheit: Mikrogramm
µm	Einheit: Mikrometer
µM	Einheit: Mikromolar
NCI	Normalisierter Zellindex
NDS	Normales Eselserum
nm	Einheit: Nanometer
OD	Optische Dichte
<i>p. i.</i>	<i>post infectionem</i>

---

PBP2a	Penicillin-bindendes Protein 2a
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PI	Propidiumiodid, plasmin sensitive protein
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Einheit: rounds per minute
RTCA	Real-Time Cell Analyzer
SCV	small colony variants
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SE	Staphylokokken-Enterotoxin
SERAM	Secretable expanded repertoire adhesive molecules
SP	Single plate
SpA	Protein A
S-Phase	Synthesephase
SSC	Staphylococcal cassette chromosome
SSSS	Staphylococcal scaled skin syndrome
Tab.	Tabelle
TER	Transendothelialer elektrischer Widerstand
tet	Tetracyclin
TSST-1	Toxic shock syndrom toxin-1
VCAM-1	Vascular adhesion molecule 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
vWbp	von-Willebrand-Faktor-Bindeprotein
vWF	von-Willebrand-Faktor
WTA	Wandteichonsäure

## Danksagung

Ich möchte mich bei den vielen Menschen bedanken, ohne die das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Matthias Frosch für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Hygiene und Mikrobiologie durchführen zu können sowie bei der Medizinischen Fakultät für den Erhalt eines Promotionsstipendiums.

Frau Prof. Dr. Alexandra Schubert-Unkmeir danke ich ganz herzlich für die Betreuung der Arbeit, vor allem für die vielen konstruktiven Anregungen beim Schreiben.

Herrn Prof. Dr. Dr. Bhanu Sinha gebührt Dank für die Überlassung des Themas und die Betreuung während der Durchführung der experimentellen Arbeiten.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Heiko Slanina für seine stetige Hilfsbereitschaft, insbesondere bei zahlreichen Fragen zur Immunfluoreszenz und den Impedanzanalysen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Nicolas Schlegel und Frau Alexia Witchen danke ich ebenfalls für die Unterstützung bei den Immunfluoreszenzversuchen sowie für die Bereitstellung von HDMEC.

Ein ganz großer Dank gebührt meiner großartigen Arbeitsgruppe. Heidi Linß und Babsi Conrad danke ich für ihre Geduld und Gelassenheit beim Einlernen und ihre kontinuierliche Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten. Bei Magda Grosz möchte ich mich für ihre zahlreichen konstruktiven Bemerkungen während der Versuchsdurchführungen sowie für ihre hilfreichen Anregungen beim Schreiben der Dissertation bedanken. Weiterhin danke ich Will Oosthuysen und Eddy Makgotlho für ihre Unterstützung bei inhaltlichen Fragestellungen sowie Lisa Pollak, die immer für gute Laune im Labor sorgte.

Ein ganz großer Dank gebührt außerdem meiner Mutter für ihre unermüdliche Hilfe beim Formatieren der Arbeit und ihre zahlreichen wertvollen Korrekturhinweise. Meinem Vater danke ich für seine kontinuierliche Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Zu guter Letzt danke ich meinem Mann Maik für sein Verständnis während vieler laborbedingter Abwesenheiten und seine stetige Unterstützung und aufbauenden Worte während mühevoller Phasen.

---



## Lebenslauf