
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Fakultät für Biologie
Zentrum für Infektionsforschung

**Untersuchungen zur Rolle von PavA und der Fibronektin-
vermittelten Interaktion von *Streptococcus pneumoniae*
mit humanen Wirtszellen**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von

Dipl. Biotechnol.

Daniela Somplatzki (geb. Pracht)

aus Salzgitter

2007

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Sven Hammerschmidt

Gutachter: Prof. Dr. Michael Kuhn

Tag des Promotionskolloquiums:

Vorsitzender:

1. Prüfer: Prof. Dr. Sven Hammerschmidt

2. Prüfer: Prof. Dr. Michael Kuhn

3. Prüfer: Prof. Dr. Jürgen Kreft

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

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

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, 5.4.2007

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Summary	3
3. Einleitung	5
3.1. Charakteristik und Klassifizierung der Streptokokken.....	5
3.2. Die Art <i>Streptococcus pneumoniae</i>	6
3.3. Krankheitsbild und Pathogenese	8
3.4. Immunabwehr	9
3.5. Antibiotikaresistenz.....	10
3.6. Impfstoffe.....	11
3.7. Virulenzfaktoren von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	13
3.7.1. PavA - Ein Virulenzfaktor von <i>S. pneumoniae</i>	20
3.8. Fibronektin und bakterielle Fibronektin-Bindungsproteine.....	21
3.9. Zielsetzung	27
4. Ergebnisse	28
4.1. Untersuchungen zur Rolle von PavA als Virulenzfaktor	28
4.1.1. Untersuchungen zur Rolle von PavA im experimentellen Maus-Meningitis- Modell	28
4.1.2. Morphologischer Vergleich von <i>S. pneumoniae</i> und der isogenen <i>pavA</i> - Mutante durch Transmissions-Elektronenmikroskopie.....	31
4.1.3. Einfluss von PavA auf die Adhärenz und Invasion von <i>S. pneumoniae</i> an bzw. in humane Wirtszellen.....	31
4.1.4. Untersuchungen zur Rolle von PavA auf die Bindung von Pneumokokken an immobilisiertes Fibronektin	40
4.1.5. Inhibition der Adhärenz an und der Invasion von <i>S. pneumoniae</i> in Wirtszellen.....	42
4.1.6. Untersuchungen zum Einfluss von PavA auf die Expression der Virulenzfaktoren PspC und PspA	44
4.1.7. Einfluss von PavA auf die Bindung von sekretorischem IgA an Pneumokokken	45
4.1.8. Rolle von PavA in der Adhärenz und Invasion von Pneumokokken an bzw. in plgR exprimierende Zellen.....	47
4.2. Untersuchungen zum Einfluss von Fibronektin auf die Interaktion zwischen <i>S. pneumoniae</i> und humanen Wirtszellen.....	50
4.2.1. Rekrutierung des Fibronektins von <i>S. pneumoniae</i> aus Plasma	50
4.2.2. Bindung von Fibronektin an Pneumokokken.....	52

4.2.3. Untersuchungen zum Einfluss von Fibronectin auf die Adhärenz von <i>S. pneumoniae</i> an humane Wirtszellen	54
4.2.4. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Fibronectin-vermittelten Adhärenz von <i>S. pneumoniae</i> an Wirtszellen	62
4.2.5. Analyse der endogenen Fibronectin-Expression von humanen Epithel- und Endothelzellen.....	63
4.2.6. Inhibition der Fibronectin-vermittelten Adhärenz durch Heparin.....	65
4.2.7. Untersuchungen zum Einfluss von PavA auf die Fibronectin-vermittelte Adhärenz.....	67
4.2.7.1. Inhibition der Fibronectin-vermittelten Adhärenz durch anti-PavA- Antiserum	68
4.2.7.2. Expression des Fusionsproteins MBP-PavA	69
4.2.7.3. Bindung des Fusionsproteins MBP-PavA an Fibronectin	71
4.2.7.4. Inhibition der Fibronectin-vermittelten Adhärenz durch MBP-PavA	72
4.2.7.5. Fibronectin-vermittelte Adhärenz von <i>pavA</i> -defizienten Pneumokokken	74
4.2.8. Bedeutung des zellgebundenen Fibronectins für die Invasion von Pneumokokken in Wirtszellen	75
4.2.9. Funktionelle Bedeutung des Zytoskeletts für die Fibronectin-vermittelte Invasion von <i>S. pneumoniae</i> in humane Wirtszellen.....	76
4.2.10. Untersuchungen der Rolle spezifischer Kinasen in der Fibronectin- vermittelten Invasion von <i>S. pneumoniae</i>	78
5. Diskussion.....	82
5.1. Die Bedeutung von PavA bei der Kolonisierung.....	83
5.2. Die Rolle von PavA als Virulenzfaktor <i>in vitro</i>	84
5.3. Der Einfluss von Fibronectin auf die Interaktion von <i>S. pneumoniae</i> und humanen Wirtszellen	90
6. Material	103
6.1. Bakterien	103
6.1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> Stämme	103
6.1.2. <i>Escherichia coli</i> Stämme	104
6.1.3. Nährmedien.....	105
6.2. Zellkultur.....	106
6.2.1. Zelllinien.....	106
6.2.2. Zellkulturmedien.....	107
6.3. Antibiotika.....	108
6.4. Antikörper, Proteine und Inhibitoren.....	108

6.4.1. Antikörper.....	108
6.4.2. Proteine.....	109
6.4.3. Inhibitoren	110
6.5. Enzyme	110
6.6. Plasmide.....	111
6.7. Oligonukleotide.....	111
6.8. DNA-Größenstandard.....	112
6.9. Größenstandard für SDS-PAGE	113
6.10. Puffer und Lösungen.....	113
6.10.1. Puffer und Lösungen für die Zellkultur	113
6.10.2. Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie.....	114
6.10.3. Puffer und Lösungen für Proteinaufreinigung, SDS-PAGE und Western- Blot.....	115
6.11. Kits	116
6.12. Laborgeräte	116
6.13. Verbrauchsmittel.....	118
6.14. Chemikalien.....	118
7. Methoden.....	122
7.1. Methoden für das Arbeiten mit Bakterien	122
7.1.1. Kultivierung von <i>S. pneumoniae</i>	122
7.1.2. Kultivierung von <i>E. coli</i>	122
7.1.3. Konservierung von Bakterien	122
7.1.4. Herstellung elektrokompetenter Bakterien.....	122
7.1.5. Transformation von <i>S. pneumoniae</i>	122
7.2. Methoden für das Arbeiten mit Zelllinien	123
7.2.1. Kultivierung von Zelllinien.....	123
7.2.2. Konservierung von Zelllinien	123
7.2.3. Auftauen von Zellen	124
7.2.4. Zellzahlbestimmung	124
7.2.5. Nachweis von Fibronectin auf eukaryotischen Zellen	124
7.3. Methoden für das Arbeiten mit DNA.....	125
7.3.1. Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Streptococcus pneumoniae</i>	125
7.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	125
7.3.3. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	125
7.3.4. Agarose-Gelelektrophorese.....	126
7.3.5. DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	126
7.3.6. Enzymatische Restriktion von Nukleinsäuren	126

7.3.7. Klenow-Reaktion	126
7.3.8. Polymerasekettenreaktion (PCR, Saiki <i>et al.</i> , 1988)	127
7.3.9. Digoxigenin (DIG)-Markierung mittels PCR	128
7.3.10. Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem QIAquick-Purification Kit (Qiagen)	128
7.3.11. PCR-Sequenzierung von DNA	128
7.3.12. Ligation von Nukleinsäuren	129
7.3.13. Klonierung von PCR-Produkten mit dem pGEM-T-Easy Cloning Kit.....	129
7.3.14. Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation (Calvin und Hanawalt, 1988).....	130
7.3.15. Southern-Blot (Southern, 1975).....	130
7.3.16. DNA-DNA-Hybridisierung	131
7.4. Methoden für das Arbeiten mit RNA.....	131
7.4.1. Isolierung der RNA aus Pneumokokken	131
7.4.2. Northern-Blot.....	131
7.4.3. Spezifischer Nachweis von RNA durch DIG-markierte Sonden	132
7.5. Methoden für das Arbeiten mit Proteinen	132
7.5.1. Induktion der Proteinexpression in <i>E. coli</i> (pQE-System, Qiagen)	132
7.5.2. Induktion der Proteinexpression in <i>E. coli</i> (pMAL-System, NEB)	133
7.5.3. Proteinisolierung nach Lyse von <i>E. coli</i> in der French Press	133
7.5.4. Aufreinigung von His ₆ -tag Fusionsproteinen über die Affinitätschromatographie.....	133
7.5.4.1. Aufreinigung mit Ni-NTA -Agarose (Qiagen)	133
7.5.4.2. Aufreinigung über Ni-TED Silica (Macherey-Nagel)	134
7.5.5. Aufreinigung von MBP-Fusionsproteinen	134
7.5.6. Aufreinigung von Inclusion Bodies (nach Nagai und Thogersen, 1987).....	135
7.5.7. Immunisierung von Kaninchen	135
7.5.8. Aufreinigung von IgG aus Kaninchenserum.....	135
7.5.9. Markierung von Proteinen mit FITC.....	136
7.5.10. Dialyse	136
7.5.11. Herstellung von Bakterienlysaten	136
7.5.12. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli <i>et al.</i> , 1970)	136
7.5.13. Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue.....	137
7.5.14. Western Blot (Towbin <i>et al.</i> , 1979)	138
7.5.15. Immunblot	138
7.5.16. ELISA.....	138

7.6. Methoden zur Untersuchung der Infektion von Wirtszellen durch <i>S. pneumoniae</i> in der Zellkultur.....	139
7.6.1. Infektion von Zellen für die Analyse durch Immunfluoreszenzmikroskopie	139
7.6.2. Antibiotika-Schutz-Versuche	139
7.6.3. Präinkubation der Wirtszellen.....	140
7.6.4. Präinkubation der Bakterien	140
7.7. Mikroskopie	140
7.7.1. Fixierung von Präparaten für die Immunfluoreszenzmikroskopie.....	140
7.7.2. Doppelimmunfluoreszenzfärbung	140
7.7.3. Fixierung von Präparaten für die Raster-Elektronenmikroskopie	143
7.7.4. Fixierung von Bakterien für die Transmissions-Elektronenmikroskopie	143
7.8. Methoden zur Untersuchung der Fibronektin-Bindung von <i>S. pneumoniae</i>	144
7.8.1. Bindung von <i>Streptococcus pneumoniae</i> an immobilisiertes Fibronektin.....	144
7.8.2. Bindung von löslichem Fibronektin an <i>Streptococcus pneumoniae</i>	144
7.8.2.1. Nachweis von gebundenem Fibronektin an Pneumokokken im Immunblot.....	145
7.8.2.2. Nachweis von gebundenem Fibronektin an <i>S. pneumoniae</i> unter Verwendung der Durchflusszytometrie.....	145
7.9. Maus-Meningitis-Infektionsmodell.....	145
7.9.1. Infektion von Mäusen mit <i>S. pneumoniae</i> zur Bestimmung der Mortalität.....	146
7.9.2. Infektion von Mäusen mit Pneumokokken zur Untersuchung des Krankheitsbildes (Gerber, Nau 2001)	146
7.10. Statistische Auswertung.....	147
8. Literaturverzeichnis	148
9. Anhang.....	176
9.1. Wertetabellen	176
9.2. Abkürzungen	187

1. Zusammenfassung

Der human pathogene Erreger *Streptococcus pneumoniae* kann symptomlos den Nasenrachenraum des Menschen besiedeln, aber auch Infektionen wie Otitis Media und invasive Erkrankungen wie Pneumonie und Meningitis auslösen. Die Pneumokokken kolonisieren den oberen Respirationstrakt, können von dort allerdings in die Lunge gelangen und schwere invasive Erkrankungen hervorrufen. Einen essentiellen Schritt für den Infektionsprozess stellt die Anheftung von *S. pneumoniae* an die Epithel- und Endothelzellen des Wirtes dar. Im Verlauf der Infektion ist aber auch das nachfolgende Eindringen der pathogenen Mikroorganismen in das humane Gewebe von wichtiger Bedeutung. An dieser Interaktion zwischen Erreger und Wirtszellen sind sowohl bakterielle Virulenzfaktoren als auch Komponenten des Wirtes beteiligt.

Der pneumococcal adherence and virulence factor A (PavA) von *S. pneumoniae* ist ein Fibronectin-bindendes Oberflächenprotein und ist essentiell für die Virulenz in einem Sepsis- und einem Pneumonie-Mausinfektionsmodell (Holmes *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte PavA zusätzlich in einem experimentellen Maus-Meningitis-Modell als Virulenzfaktor identifiziert werden. In *in vitro* Infektionsstudien zeigten *pavA*-defiziente Pneumokokkenmutanten eine signifikant verringerte Adhärenz an und Invasion in alveoläre Epithelzellen A549 von Typ II Pneumozyten, in Larynxkarzinomzellen HEp-2, in humane Hirnendothelzellen HBMEC und in humane Nabelschnurendothelzellen HUVEC. Diese Zelllinien repräsentieren modellhaft typische Gewebezellen, mit denen *S. pneumoniae* während des Infektionsprozesses in Kontakt treten kann. Die signifikante Reduktion der Adhärenz der *pavA*-Mutante ist auf die Mutagenese des *pavA*-Gens zurückzuführen, da die Komplementierung mit einem aktiven *pavA*-Gen die Adhärenz an die humanen Zellen wiederherstellte. In Inhibitionsstudien blockierte anti-PavA-Antiserum die bakterielle Bindung an immobilisiertes Fibronectin, die über den C-terminalen Bereich des PavA-Proteins vermittelt wird. Im Gegensatz dazu wurde die Adhärenz von *S. pneumoniae* an die humanen Wirtszellen in Inhibitionsstudien mit anti-PavA-Antiserum oder rekombinantem PavA-Protein nicht blockiert. Zusammenfassend ist PavA ein wichtiger Virulenzfaktor für die Infektion und das Überleben der Erreger *in vivo* und spielt gleichzeitig auch eine Rolle während der Adhärenz von Pneumokokken an die humanen Wirtszellen *in vitro*. Allerdings beeinflusst PavA den Anheftungsprozess nicht direkt als Adhäsion, sondern scheint die Funktion anderer, wichtiger, bisher unbekannter Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* zu regulieren.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde die Interaktion von *S. pneumoniae* mit dem Glykoprotein Fibronectin und deren Bedeutung für die Kolonisierung und den Infektionsmechanismus *in vitro* untersucht. *S. pneumoniae* bindet direkt an immobilisiertes Fibronectin (van der Flier *et al.*, 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Pneumokokken Fibronectin sowohl wirtsunabhängig aus dem Plasma rekrutieren als

auch reines lösliches Fibronectin binden können. Dabei binden Pneumokokken sowohl die multimere, zelluläre Form des Fibronectins als auch das lösliche, dimere Plasma-Fibronectin. Die Zugabe von Fibronectin verstärkt die Adhärenz von *S. pneumoniae* an die humanen Nasopharynxepithelzellen Detroit 562, die Larynxzellen HEp-2, die Bronchialepithelzellen A549 und die Hirndothelzellen HBMEC. Die Fibronectin-vermittelte Anheftung von Pneumokokken an die Nasopharynxzellen Detroit 562 und die Hirndothelzellen HBMEC erfolgt wahrscheinlich über die Heparin-Bindungsdomäne, da die bakterielle Adhärenz durch die Zugabe von Heparin inhibiert wird. Weitere Inhibitionsstudien zeigten, dass weder die Präinkubation der Erreger mit anti-PavA-Antiserum noch die Zugabe von rekombinantem PavA-Protein die Fibronectin-vermittelte Adhärenz an die Wirtszellen blockierte. Die Interaktion von *S. pneumoniae* über das Brückenmolekül Fibronectin mit den humanen Wirtszellen findet damit nicht über das Fibronectin-bindende Oberflächenprotein PavA statt. Fibronectin vermittelt nicht nur die Adhärenz von *S. pneumoniae* an die Wirtszellen, sondern auch deren Internalisierung. In Inhibitionsstudien mit spezifischen Inhibitoren des Aktin-Zytoskeletts und der Mikrotubuli konnte gezeigt werden, dass die Dynamik des Zytoskeletts eine essentielle Rolle für die Fibronectin-vermittelte Internalisierung der Pneumokokken in die Wirtszellen spielt. Außerdem wurde durch die Zugabe von pharmakologischen Inhibitoren der Protein Tyrosin Kinasen, der Familie der Src-Kinasen und der Phosphatidylinositol (PI-3)-Kinase die Fibronectin-vermittelte bakterielle Invasion in humane Zellen signifikant blockiert. Die Invasion von *S. pneumoniae* in Mausfibroblasten, die defizient für die fokale Adhäsionskinase (FAK) waren, war im Vergleich zu der bakteriellen Invasion in die Wildtyp-Fibroblasten reduziert. Diese Ergebnisse zeigen die Beteiligung der Src-Kinasen, der PI-3-Kinase und der FAK an der Signaltransduktion, die für die Fibronectin-vermittelte Invasion von *S. pneumoniae* in eukaryotische Zellen notwendig ist.

2. Summary

The human pathogen *Streptococcus pneumoniae* causes infections such as otitis media, pneumonia and meningitis. Pneumococci colonize asymptotically the human nasopharynx. But they can migrate also to the lungs and after breaching the lung barrier spread throughout the human body and induce severe invasive diseases. Adhesion of *S. pneumoniae* to epithelial and endothelial host cells is an essential first step for the establishment of colonization and invasive infections. Moreover subsequent bacterial invasion into the human tissue is important for developing disease as well. Both, bacterial virulence factors and host components participate in the interaction of pneumococci and human cells.

The pneumococcal adherence and virulence factor A (PavA) of *S. pneumoniae* is a fibronectin binding surface protein and a crucial virulence determinant in a sepsis and in a pneumonia mouse model of infection (Holmes *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001). Within this study, PavA was identified as an important factor causing disease and promoting survival in an experimental mouse meningitis model. PavA-deficient mutants of *S. pneumoniae* showed significantly reduced adherence and invasion into the alveolar epithelial cell type A549 of type II pneumocytes, larynx carcinoma epithelial cells HEp-2, human brain derived endothelial cells HBMEC and human umbilical vein derived endothelial cells HUVEC. These cell lines represent typical cells of the human tissue that are involved in the progression of pneumococcal infections. The adhesion level of a *pavA*-knockout mutant was restored by re-introducing the entire *pavA* gene, indicating that the observed effect was due to *pavA*-deficiency. In inhibition studies the addition of anti-PavA antisera inhibited pneumococcal attachment to immobilized fibronectin. Binding of fibronectin was mediated by the C-terminal part of the PavA protein. In contrast, bacterial adherence and invasion into host cells was not influenced by addition of anti-PavA antisera or recombinant PavA protein.

In conclusion, PavA plays a pivotal role in pneumococcal adherence to host cells *in vitro* and is an important virulence factor for the progression of pneumococcal disease and survival *in vivo*. PavA is not directly involved in the pneumococcal adhesion process by acting as an adhesin. The results indicated that PavA affects colonization and pneumococcal survival by modulating the function of important but yet unknown virulence determinants of *S. pneumoniae*.

In the second part of this study the interaction of *S. pneumoniae* with the host glycoprotein fibronectin and its role in colonization *in vitro* was investigated. *S. pneumoniae* binds directly to immobilized fibronectin (van der Flier *et al.*, 1995). In this study is shown that pneumococci recruit fibronectin from plasma in a species-unspecific manner and bind pure soluble fibronectin. *S. pneumoniae* interacts with the multimeric cellular form of fibronectin as well as with the soluble dimeric plasma fibronectin. Host-cell bound fibronectin significantly

enhances pneumococcal adherence to the human nasopharyngeal epithelial cell line Detroit 562, to larynx cells HEp-2, to alveolar cells A549 and to brain endothelial cells HBMEC. Fibronectin-mediated pneumococcal adherence to the nasopharyngeal cells Detroit 562 and to the brain endothelial cells HBMEC is probably mediated by the heparin binding site due to the fact that bacterial adherence is inhibited by the addition of heparin. Further inhibition studies demonstrated that neither pneumococcal preincubation with anti-PavA antisera nor addition of recombinant PavA protein inhibited fibronectin-mediated adherence. These results indicate that fibronectin-mediated adherence was not due to binding of PavA to fibronectin.

Fibronectin plays a key role in pneumococcal adherence to host cells and, in addition, promotes pneumococcal internalization. Inhibition studies with specific inhibitors of the actin cytoskeleton and the microtubulis showed an essential impact of the cytoskeleton dynamic on the fibronectin-mediated pneumococcal invasion into host cells. In addition, presence of pharmacological inhibitors of protein tyrosine kinases, Src-kinases and Phosphatidylinositol (PI-3)-kinase significantly blocked fibronectin-mediated bacterial invasion in human cells. Pneumococcal invasion into fibroblasts deficient for the focal adhesion kinase (FAK) was reduced compared to wildtype fibroblasts. These results indicate the involvement of Src-kinases, PI-3-kinase and FAK in signal transduction leading to fibronectin-mediated internalization of *S. pneumoniae* in eukaryotic cells.

3. Einleitung

Infektionen des Respirationstraktes sind weltweit nach wie vor eine der Hauptursachen von akuten Erkrankungen (World Health Organisation (WHO), 2005). Jährlich sterben mehr als vier Millionen Menschen an Atemwegserkrankungen. 70 % der 1,9 Millionen Kinder, die im Jahr 2000 in Folge von Infektionen des Respirationstraktes starben, lebten in Afrika und Südostasien (WHO, 2005). Die Haupterreger von Atemwegserkrankungen bei Kindern sind *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* Typ B, das respiratorische synzytial Virus und Parainfluenza Virus Typ 3. Nach Schätzungen der WHO sterben weltweit allein nach Infektionen mit *S. pneumoniae* jährlich nahezu eine Million Kinder unter fünf Jahren (Jaffar *et al.*, 1999). Die meisten dieser Todesfälle treten in Entwicklungsländern auf, in denen Pneumokokken zu den bedeutendsten Erregern von Infektionskrankheiten bei Kindern zählen. Nahezu jedes Kind sowohl in den Entwicklungsländern als auch in den Industrieländern trägt *S. pneumoniae* innerhalb des ersten Lebensjahres im Nasenrachenraum. Bei vielen Kindern kommt es dadurch zu Mittelohrentzündungen, bei einer geringeren Zahl führt die Infektion mit *S. pneumoniae* zu invasiven Erkrankungen wie Lungen- bzw. Hirnhautentzündung und Sepsis. Neben Kindern haben aber auch ältere Personen und Menschen mit geschwächtem Immunsystem oder chronischen Erkrankungen ein erhöhtes Risiko, eine durch Pneumokokken hervorgerufene Infektion zu entwickeln. In Europa und den USA werden mindestens 30 % der ambulant erworbenen Pneumonien von *S. pneumoniae* verursacht, die eine Sterblichkeitsrate von 10 bis 30 % aufweisen (WHO, 2005). Ein großes Problem bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten, die durch bakterielle Erreger hervorgerufen werden, ergibt sich aus den vermehrt auftretenden Antibiotikaresistenzen. So müssen neben der Suche nach wirksamen Antibiotika auch neue Strategien in der Krankheitsvorsorge entwickelt werden. Ein Ansatz zur Vorsorge ist die weitere Entwicklung wirksamer und verträglicher Impfstoffe. Dafür ist es notwendig, neben dem Verständnis der Immunabwehr die am Infektionsprozess beteiligten bakteriellen Komponenten zu identifizieren und deren Interaktion mit den wirtseigenen Faktoren aufzuklären.

3.1. Charakteristik und Klassifizierung der Streptokokken

Die Gattung *Streptococcus* umfasst unbewegliche, Gram-positive, runde bis ovale Kokken, die sich in gewundenen Ketten (streptos = gewunden, verdrillt) oder als Pärchen anordnen. Diese Bakterien sind katalasenegativ, bilden keine Sporen und wachsen unter fakultativ anaeroben Bedingungen (Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, 1986).

Streptokokken zählen zu der Gruppe der Milchsäurebakterien, da sie durch Fermentation von Glukose, Maltose und Sucrose unter Säurebildung Energie gewinnen. Viele leben in der

Normalflora der menschlichen Schleimhäute. Andere hingegen sind Erreger zum Teil schwerer Infektionen (Kayser *et al.*, 1997).

Im Jahr 1874 wurden durch den Chirurgen Billroth erstmalig in Wundeiterpräparaten die kettenförmigen Kokken entdeckt und in der Literatur als Streptokokken verzeichnet. Schottmüller teilte 1903 die Gattung *Streptococcus* nach ihrem Hämolyseverhalten auf Blutagar ein. Dabei wurden hämolysierende, vergrünende und nicht-hämolysierende Arten unterschieden. Diese Einteilung wurde 1919 von Brown konkretisiert, indem er die Begriffe der α -, β - und γ -Hämolyse einführte. Bei der α -Hämolyse kommt es zu einer grünen Zone um die Kolonien von *Streptococcus* auf Blutagar, die durch die Freisetzung von H_2O_2 hervorgerufen wird. Hämoglobin wird zu Methämoglobin reduziert, wobei die Erythrozytenmembranen weitgehend intakt bleiben. Die α -Hämolyse ist charakteristisch für *Streptococcus pneumoniae*. Findet eine vollständige Hämolyse statt, bei der die Erythrozyten zerstört und das Hämoglobin abgebaut werden, so spricht man von β -Hämolyse. Beispiele für die β -Hämolyse sind *Streptococcus pyogenes* und *Streptococcus agalactiae*. Die γ -Hämolyse kennzeichnet die Abwesenheit makroskopisch sichtbarer Hämolysezonen und wird damit für nicht-hämolysierende Streptokokken verwendet, wie beispielsweise *Streptococcus bovis* oder *Streptococcus salivarius*.

Eine weitere taxonomische Einteilung der Gattung *Streptococcus* basiert auf Zellwand- bzw. Zelloberflächenantigenen, bei denen es sich um polymere Kohlenhydrate oder Lipoteichonsäuren handelt. Rebecca C. Lancefield führte entsprechend der unterschiedlichen Antigene eine serologische Einteilung der Bakterien in die Lancefield-Gruppen A bis V ein (Lancefield, 1933).

3.2. Die Art *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae wurde erstmals 1881 von Sternberg als Erreger der Pneumonie und als Spezies innerhalb der Gattung *Streptococcus* beschrieben (Sternberg, 1881) und nahezu zeitgleich zusätzlich von Pasteur (1881) und Fränkel (1884) identifiziert. Es handelt sich bei diesen auch als Pneumokokken bezeichneten Bakterien um ovale bis lanzettförmige Kokken, die meist als Pärchen (Diplokokken) oder in kurzen Ketten vorkommen. Während der Kultivierung auf Blutagar bilden sie α -hämolytische Kolonien mit grünem Hämolysehof aus (Kayser *et al.*, 1997).

Die Virulenz von *S. pneumoniae* hängt von dessen Ausprägung der Kapsel ab. Bekapselte Stämme sind um das 10^5 -fache virulenter als die unbekapselten Varianten (Watson und Musher, 1990).

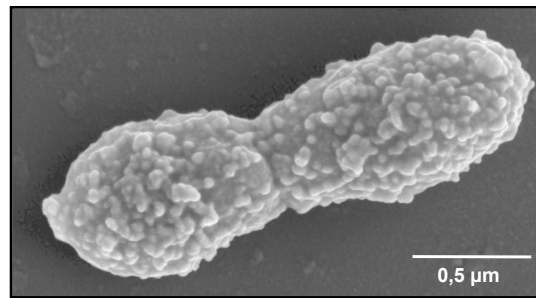


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Streptococcus pneumoniae* mit ausgeprägter Kapselstruktur (Bild: Manfred Rohde aus Hammerschmidt *et al.*, 2005)

Bei der Kultivierung von bekapselten Stämmen auf Blutagar zeigen sich morphologisch schleimig aussehende Kolonien, die als s (smooth)-Form bezeichnet werden. Hingegen weisen die unbekapselten Stämme eine raue Oberfläche bzw. eine r (rough)-Form der Kolonien bei ihrem Wachstum auf Blutagar auf. Untersuchungen von Griffith im Jahr 1928 zur Veränderung des Kapselphänotyps von *Streptococcus pneumoniae* führten zur Entdeckung der natürlichen Transformierbarkeit von Bakterien. Ein weiterer Meilenstein für die molekularbiologische Forschung wurde 1942 von Avery gesetzt, als ihm der experimentelle Nachweis gelang, die DNA als die Komponente zu identifizieren, die bei der Transformation von Bakterien aufgenommen wird. Die Fähigkeit von *Streptococcus pneumoniae*, exogene DNA aufzunehmen, hängt von der Wachstumsphase der Bakterien in Kultur und dem verwendeten Kulturmedium ab (Tomasz, 1965; 1966; Tomasz und Mosser, 1966). Im Gegensatz zu dem Wachstum in Komplexmedium kann durch die Kultivierung von Pneumokokken in so genanntem CpH8-Medium eine natürliche Kompetenz induziert werden. Weiterhin kann durch die Zugabe des „Competence Stimulating Peptides“ (CSP), ein Peptid mit 17 Aminosäuren, die Transformierbarkeit unterstützt werden. Dabei wirkt CSP konzentrationsabhängig als Pheromon (Håvarstein *et al.*, 1995).

Die Einteilung der Pneumokokken erfolgt in der amerikanischen Nomenklatur nach den chronologischen Entdeckungsdaten der Isolate. Die dänische Nomenklatur, die der amerikanischen Taxonomie vorgezogen wird, basiert bei der Gruppierung verschiedener *S. pneumoniae*-Stämme auf deren Unterschiede in der chemischen Feinstruktur der Kapselpolysaccharide. Bislang können damit über 90 Serovare aufgrund der unterschiedlichen Struktur und chemischen Zusammensetzung ihrer Kapsel differenziert werden (Henrichsen, 1995; Paton und Morona, 1997). Die serologische Typisierung kann mit spezifisch gegen die Kapsel gerichteten Antikörpern in der so genannten Kapselquellungsreaktion bestimmt werden (Neufeld, 1902). Die Genomsequenz des TIGR4-Stammes von *Streptococcus pneumoniae* mit 2.160.837 Basenpaaren und des Pneumokokkenstammes R6 wurden 2001 entschlüsselt (Tettelin *et al.*, 2001; Hoskins *et al.*, 2001). Des Weiteren ist seit kurzem die Genomsequenz des virulenten Serotyp 2 Stammes D39 bekannt (Lanie *et al.*, 2007).

Das natürliche Habitat der Pneumokokken ist der menschliche Nasopharynx. Die meisten Kleinkinder und 40 bis 70 % der gesunden Erwachsenen sind zumindest vorübergehend symptomlose Keimträger, ohne ein Krankheitsbild zu entwickeln. Die Rate der asymptomatischen Träger hängt von deren Alter und Lebensumfeld ab. Erwachsene ohne direkten Kontakt zu kleinen Kindern sind z. B. nur zu 5 bis 10 % Keimträger. Diese Rate erhöht sich für Schüler und Bewohner von Altenheimen auf 27 bis 58 %. Die Besiedelung des Menschen durch den Erreger kann sich sowohl mehrmals im Laufe des Lebens wiederholen als auch mit verschiedenen Serotypen zeitgleich erfolgen (Gray *et al.*, 1979; Kayser *et al.*, 1997).

3.3. Krankheitsbild und Pathogenese

Streptococcus pneumoniae ist ein Kommensale der menschlichen Schleimhaut des oberen Respirationstraktes. Die Erreger werden meist durch Tröpfcheninfektionen weitergegeben (Andersson, 1988). Die Besiedelung durch Pneumokokken muss nicht zwangsläufig zu einer Erkrankung führen, da dies meist durch das angeborene und adaptive Immunsystem verhindert wird. *S. pneumoniae* kann aber auch als obligat humanpathogener Erreger ernster, invasiver Infekte auftreten. Die Mechanismen, wie sich der harmlose Kommensale des Nasopharynx in einen Erreger schwerer invasiver Erkrankungen umwandeln kann, sind erst wenig aufgeklärt. Die invasiven Infekte gehen meist von der eigenen Flora des Nasopharynx aus und werden von bestimmten Risikofaktoren begünstigt. So ist die Infektionsgefahr für Kleinkinder unter 2 Jahren, für ältere Menschen ab 60 Jahre und für immunsupprimierte Menschen am größten (Gray *et al.*, 1979; Garcia-Leoni *et al.*, 1992). Weiter erhöht sich das Risiko einer durch Pneumokokken hervorgerufenen Erkrankung durch eine vorausgegangene Infektion mit z. B. *Haemophilus influenzae* oder Viren, durch chronische Leiden des Herz-Kreislaufsystems oder der Lunge, durch angeborene oder erworbene Defekte des Immunsystems, durch eine Krebserkrankung, eine HIV-Infektion, durch chronische Leber- oder Nierenerkrankungen oder Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus (Salyers und Whitt, 1994; Centers for Disease Control and Prevention, 1997, Kayser *et al.*, 1997).

Infektionen durch *S. pneumoniae* beginnen mit der Adhärenz an die Epithelzellen und der Kolonisierung des Nasenrachenraumes. Die Kolonisierung der mukosalen Oberflächen des Nasopharynx erfolgt meist mit Pneumokokken mit transparentem Phänotyp, da dieser Phänotyp weniger Kapselpolysaccharid exprimiert und damit adhäsive Oberflächenmoleküle der Bakterien für die Anheftung an Epithelzellen zugänglich sind (Hammerschmidt *et al.*, 2005). Nach der Besiedelung der Nasenhöhle und der Nasennebenhöhlen kann *S. pneumoniae* über die Eustachische Röhre in das Mittelohr gelangen und typische lokale Infektionen wie Nasennebenhöhlenentzündungen (Sinusitis) und Mittelohrentzündungen

(Otitis Media) auslösen. Kommt es zu einer Störung der Homöostase zwischen Wirt und Erreger, können die Pneumokokken aus dem Nasopharynx nach Versagen der spezifischen und unspezifischen Abwehr der Schleimhäute in die Lunge des Wirts gelangen (Boulnois, 1992). Dort schützt die Polysaccharidkapsel die Bakterien vor der Phagozytose und Zerstörung durch alveoläre Makrophagen, so dass sich die Erreger dort ausbreiten können. Bei bis zu 25 % aller Pneumokokken-Pneumonien erfolgt ein Übertritt der Bakterien in die Blutbahn mit Entwicklung einer Bakteriämie, die in einer Sepsis resultieren kann (Lee *et al.*, 1991). Durchbrechen die Erreger im bakteriämischen Stadium die Blut-Hirn-Schranke, können die Pneumokokken in die Meningen eindringen und eine Meningitis auslösen (Tuomanen *et al.*, 1995). Die Meningen können alternativ auch direkt vom Nasenrachenraum aus infiziert werden (Boulnois, 1992).

S. pneumoniae ist weltweit der häufigste Auslöser ambulant erworbener Pneumonien (CAP (community acquired pneumonia)-Netz), sowie nach *Neisseria meningitidis* der zweithäufigste Erreger der bakteriellen Meningitis (Dagan, 1994; Burman *et al.*, 1985). Etwa die Hälfte aller Mittelohrentzündungen werden durch Pneumokokken verursacht (Tuomanen *et al.*, 1995). Trotz antibiotischer Therapien enden 5 % der Pneumonien, 25 bis 29 % der Bakteriämien und bis zu 30 % der Meningitiden, die durch *S. pneumoniae* hervorgerufen wurden, bei Erwachsenen tödlich (Mufson, 1990). Die Schwere der Erkrankung ist nicht allein abhängig von der Virulenz des Erregers, sondern steht ebenso in Beziehung zu dem Immunstatus und der physiologischen Verfassung des betroffenen Menschen.

3.4. Immunabwehr

Die erste Abwehrlinie gegen Mikroorganismen stellt das angeborene Immunsystem dar. Dabei wirken die Haut und Schleimhäute als mechanische Barrieren. Das Oberflächensekret der Atemwege verhindert die Adhäsion und Invasion von Krankheitserregern, indem durch den Flimmerschlag des zilienträgenden Bronchial- und Trachealepithels der kontinuierliche Transport von Sekreten und Fremdmaterial wie z. B. Bakterien aus den Lungen in die oberen Atemwege gewährleistet ist. Dieses Abwehrsystem wird als mukoziliäre Klärung bezeichnet. Des Weiteren zählen das Komplementsystem und die Phagozytose durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen zu den Abwehrmechanismen gegen *Streptococcus pneumoniae*. Das Komplementsystem besteht aus mehr als 30 Proteinen, die im Blutplasma gelöst oder zellgebunden vorkommen. Die Bindung von Komponenten des Komplementsystems an die Bakterienoberfläche und deren Aktivierung führt zu einer verstärkten Oponisierung der Erreger und löst eine Reihe von Entzündungsreaktionen aus. Das Komplementsystem ist sowohl Teil des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems und verbindet beide Formen miteinander. Es werden drei Wege unterschieden, durch die das Komplementsystem aktiviert werden kann. Die klassische Aktivierung des Komplements

erfolgt durch die Antikörperbindung an Antigene, kann aber auch direkt durch die Bindung der Komplementkomponente C1q ausgelöst werden (Brown *et al.*, 2002). Bei der Abwehr von Pneumokokken ist die klassische Aktivierung des Komplements der dominanteste Weg in Mäusen (Brown *et al.*, 2002). Daneben findet aber auch die Aktivierung des Komplements auf alternativem Weg statt. Dieser wird durch die Bindung von spontan entstehendem C3b an die mikrobielle Oberfläche aktiviert. Die dritte Möglichkeit der Komplementaktivierung ist der Lektin-vermittelte Weg. Dabei bindet Serumlektin an mannosehaltige Proteine oder Kohlenhydrate der Erreger. Unabhängig von der Art des Aktivierungsweges werden nach einer Reihe von Spaltreaktionen C3-Konvertasen gebildet, die mit hoher Aktivität C3 in C3b und C3a spalten. Das größere Fragment C3b bindet kovalent an die Zelloberfläche von Bakterien und wirkt als Opsin, so dass die Erreger von Phagozyten aufgenommen werden können. Weiterhin führt die Bindung von C3b zu einer positiven Rückkopplung, da erneut der alternative Weg der Komplementaktivierung eingeleitet wird. Weitere Spaltfragmente der Komplementkaskade wirken als Anaphylatoxin lokal inflammatorisch, da sie eine akute systemische Entzündung auslösen. Dabei werden Makrophagen und neutrophile Granulozyten angelockt, die auf ihrer Oberfläche Toll-like Rezeptoren (TLR) exprimieren. Diese gehören zu der Gruppe der so genannten „pattern recognition receptors“ (PRR), die bestimmte Strukturen von Mikroorganismen, so genannte „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) erkennen. Dabei ist die Unterscheidung zwischen wirtseigenen und fremden Strukturen für eine gezielte Abwehr des Immunsystems wichtig. So reagiert die Gruppe der PRR vor allem auf Lipopolysaccharide, Peptidoglykan, Lipoteichonsäure, Mannan, Glukan, bakterielle DNA und Doppelstrang-RNA. Spezifische TLR erkennen Lipoteichonsäure, Peptidoglykan oder Pneumolysin von *Streptococcus pneumoniae* und lösen eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die zur Stimulation der angeborenen Immunabwehr führt (Review: Paterson und Mitchell, 2006). Des Weiteren kann auch die Aktivierung der adaptiven Immunantwort durch TLRs moduliert werden (Schnare *et al.*, 2001).

3.5. Antibiotikaresistenz

Das Antibiotikum der Wahl bei Erkrankungen durch *Streptococcus pneumoniae* ist auch heute noch das Penicillin als (Musher, 1992). Doch die Therapie der Pneumokokkeninfektionen wird durch die zunehmende Resistenzbildung der Erreger gegenüber Beta-Laktam-Antibiotika erschwert. Die Penicillin-Resistenz beruht auf modifizierten Penicillin-Bindeproteinen, die eine geringere Affinität zu den Penicillinen aufweisen und damit ihre Funktion innerhalb der Zellwandbiosynthese aufrecht erhalten (Tomasz und Munoz, 1995). Erste klinische Isolate, die eine intermediär empfindliche Penicillinresistenz zeigten, wurden in den 60er Jahren in Australien und den USA entdeckt (Hansman und Bullen, 1967). Ende

der 70er Jahre wurden erstmals hochgradig-resistente Isolate in Südafrika beobachtet, die eine Multiresistenz gegen drei oder mehr Antibiotikaklassen zeigten (Appelbaum *et al.*, 1977). Diese Multiresistenzen führen zu erheblichen Problemen bei der Behandlung von Pneumokokkeninfektionen. Seit fast 20 Jahren werden hochgradig-resistente Isolate weltweit identifiziert und ihre Zahl steigt. In den USA sind 20 bis 30 % der isolierten Pneumokokkenstämme resistent gegen Penicillin G (Doern *et al.*, 2001). Weit höhere Resistenzraten mit bis zu 45 % werden in europäischen Ländern wie Ungarn, Rumänien und Spanien beobachtet (Marton, 1992; Fenoll *et al.*, 1998). In Frankreich weisen 40 % der Pneumokokkenisolate eine Penicillinresistenz auf (Geslin *et al.*, 1998). In Nord- und Mitteleuropa liegt die Rate Penicillin-resistenter Stämme hingegen unter 10 % (NRZ, 2001). In Dänemark und Finnland ist der Anteil dieser Stämme 1 % bzw. 2 % (Nielsen *et al.*, 1996). Neben der Resistenz von *S. pneumoniae* gegen Penicillin spielt in Deutschland vor allem die Zunahme von Makrolidresistenzen eine große Rolle. Makrolid-Antibiotika binden an die 50S-Ribosomenuntereinheit der Bakterien, verhindern so die Anlagerung von mRNA und damit die Translation der mRNA. Eine Veränderung der Ribosomenstruktur oder die Methylierung des Ribosoms kann zu einer Resistenzbildung gegen Makrolide führen. Ein weiterer in Europa sehr verbreiteter Resistenzmechanismus ist der Efflux-Mechanismus. Damit sind Pneumokokken in der Lage, Makrolide aus der Zelle auszuschleusen. Im Jahr 2000 zeigten mehr als 20 % der Pneumokokkenisolate in Deutschland, die invasive Infektionen bei Kindern hervorriefen, eine Resistenz gegen Erythromycin (Reinert *et al.*, 2002). Antibiotikaresistenzen treten gehäuft bei bestimmten Serogruppen von *S. pneumoniae* auf. Eine Resistenz gegen Penicillin wird vermehrt für die Serotypen 6B und 23F (Davies *et al.*, 1999; McDougal *et al.*, 1992) beobachtet. Die Ursachen der Ausbreitung und Zunahme von Antibiotikaresistenzen sind vielfältig. Zum einen führt die unkontrollierte und wiederholte Einnahme von Antibiotika mit breitem Wirkungsspektrum zu einer Selektion von multiresistenten Stämmen, die sich dann durch die hohe Mobilität überregional ausbreiten können. Des Weiteren erfolgt aufgrund der natürlichen Transformierbarkeit von Pneumokokken ein horizontaler Gentransfer, der in einem Austausch und in einer eventuellen Neukombination von Resistenzgenen resultieren kann und so zu einer schnellen Anpassungsfähigkeit der Bakterien führt. Damit stellt die Entwicklung und der Einsatz neuer Antibiotika nur eine zeitlich begrenzte Waffe gegen Infektionen mit *S. pneumoniae* dar.

3.6. Impfstoffe

Da die Behandlung von *S. pneumoniae*-Infektionen mit Antibiotika durch die zunehmenden Resistenzen erschwert wird, steht die Vorsorge durch eine aktive Immunisierung im Vordergrund. Es besteht die Möglichkeit der Impfung mit dem Pneumokokken-Vakzin PneumovaxTM (Merck Research Laboratories, USA), das je 25 mg der gereinigten

Kapselpolysaccharide von 23 der am häufigsten bei systemischen Infektionen vorkommenden Serotypen enthält. 85 % bis 90 % aller isolierten Pneumokokken in Europa und den USA weisen die in dem Impfstoff vorhandenen Kapselantigene der Serotypen 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F und 33F auf (Kayser *et al.*, 1997). Dieser Polysaccharid-Impfstoff hat eine Wirksamkeit von 61 % bis 75 % bei Kindern älter als 2 Jahre und bei Erwachsenen (Butler *et al.*, 1997; Fedson, 1998). Allerdings ist dieser Impfstoff bei Kindern vor Vollendung des zweiten Lebensjahres, bei denen 80 % der invasiven Pneumokokken-Erkrankungen im Kindesalter auftreten, nicht wirksam. Das Kapselpolysaccharid-Vakzin induziert keine T-Zell-abhängige Immunantwort, und damit werden keine Gedächtniszellen gebildet. Der Impfschutz ist von begrenzter Dauer (Poland, 1999). Einen weiteren Ansatz der Immunisierung stellt der Einsatz von Konjugatimpfstoffen dar, bei denen eine geringe Anzahl an relevanter Kapselpolysaccharide an ein Trägerprotein gekoppelt werden. Hierbei wird zusätzlich zu der T-Zell-unabhängigen auch die proteinspezifische T-Zell-abhängige Immunantwort induziert. Damit wird das immunologische Gedächtnis durch die Differenzierung von Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten stimuliert. Dies könnte eine längerfristige Wirkung des Vakzins bewirken und zu einer besseren Immunantwort bei Kindern jünger als 2 Jahre führen. Der 7-valente Konjugatimpfstoff PrevnarTM (Wyeth, USA) enthält die verbreiteten Kapselpolysaccharide der Serotypen 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F und 23F und deckt damit die Serogruppen von 85 % der Pneumokokkenisolate in den USA, 60 % bis 70 % der Isolate in Europa und 55 % in Asien ab (Pelton *et al.*, 2003). Die Impfung mit PrevnarTM schützt vor 97,4 % der invasiven Erkrankungen, die durch die im Impfstoff enthaltenen Serotypen hervorgerufen werden. Des Weiteren besteht ebenso ein signifikanter Schutz gegen eine Pneumonie und Otitis Media (Eskola *et al.*, 2001). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Besiedelung des Nasopharynx durch Pneumokokken unterdrückt wird. Damit vermindert sich das Risiko der horizontalen Übertragung von Mensch zu Mensch. Allerdings können evtl. Serotypen der Erreger aufkommen, deren Kapselpolysaccharid nicht in dem Impfstoff enthalten ist. In Deutschland ist die Immunisierung von Säuglingen ab dem 2. Lebensmonat mit PrevnarTM in den Impfkalendar der ständigen Impfkommission aufgenommen worden (STIKO, 2006). Allgemein können Kapselpolysaccharid-Vakzine nur gegen die im Impfstoff enthaltenen Serotypen eine Immunreaktion bewirken. Deshalb richtet sich in der Forschung das Interesse auf die Untersuchung der immunogenen Wirkung von Proteinen, um einen Serotyp-unabhängigen, T-Zell-abhängigen und längerfristigen Immunschutz zu erreichen. Im Fokus werden dabei besonders die Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* hinsichtlich ihrer immunogenen Wirkung und ihrer Eignung als Vakzinbestandteil betrachtet.

3.7. Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae*

Die Kolonisierung durch *Streptococcus pneumoniae* und das Auslösen der bakteriellen Infektion sind eng mit der Expression von Virulenzfaktoren verbunden (Salyers und Whitt, 1994). Zu den Virulenzfaktoren von Pneumokokken gehören Proteine, Enzyme, Toxine und Kohlenhydratstrukturen, die in die Umgebung freigesetzt oder auf der Bakterienoberfläche verankert werden. Diese Pathogenitätsfaktoren ermöglichen dem Erreger, sich vor dem humanen Immunsystem zu schützen oder die Adhärenz an bzw. Invasion in spezifische Wirtszellen zu vermitteln.

Ein Hauptvirulenzfaktor von *S. pneumoniae* ist das **Kapselpolysaccharid**, das notwendig für die Virulenz ist (Austrian, 1981). Es sind nur 20 der über 90 verschiedenen Serotypen für die Entwicklung schwerer Pneumokokkenerkrankungen verantwortlich (Mulholland, 1999; Musher, 1992). Die Kapselpolysaccharide schützen den Erreger vor einer Komplement-vermittelten Opsonophagozytose (Fine, 1975; Giebink *et al.*, 1977; Silvennoinen-Kassinen und Koskela, 1986). Dabei ist die Schutzwirkung stärker von der biochemischen Struktur als von der Dicke der Kapsel abhängig. Bei *S. pneumoniae* findet eine spontane Phasenvariation mit einer Frequenz von 10^{-3} bis 10^{-6} statt, die zu einer opaquen oder transparenten Form der Kolonien führt (Weiser *et al.*, 1994). Pneumokokken mit transparentem Phänotyp, die weniger Kapselpolysaccharide produzieren, besiedeln die mukosalen Oberflächen des Nasopharynx. Hingegen zeigten Bakterien mit opakem Phänotyp ein höheres Virulenzpotenzial in systemischen Infektionen (Kim und Weiser, 1998; Weiser *et al.*, 1996; Weiser *et al.*, 2001). Kapselpolysaccharide sind meist lineare Zuckerketten, die über Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft sind und enthalten je nach Serotyp auch unterschiedliche Mono-, Di- und Trisaccharide, sowie Aminozucker, Phosphorylcholine, Acetyl- und Phosphatgruppen (Van Dam, 1990). Die Polysaccharidkapsel umgibt die Zellwand von *S. pneumoniae*. Die Zellwand der Pneumokokken besteht wie bei anderen Gram-positiven Bakterien aus dem Peptidoglykan Murein, das sich aus einer β -1,4-glykosidisch verbundenen alternierenden Folge aus N-Acetylglucosaminen und N-Acetylmuraminsäuren zusammensetzt. Die heteropolymeren Ketten sind untereinander peptidisch quervernetzt (Schlegel, 1992). Die Zellwand von *S. pneumoniae* ist eine dynamische Struktur, die Teichonsäuren, Lipoteichonsäuren, Glykolipide, Proteine und Phosphorylcholin enthält (Tomasz, 1967; Garcia-Bustos *et al.*, 1990; Tomasz, 1981). Die Teichonsäuren sind an N-Acetylmuraminsäure der Peptidoglykanschicht verankert, während die Lipoteichonsäuren, auch als Forssman- bzw. F-Antigen bezeichnet, an Glykolipide der Plasmamembran gekoppelt sind (Sorensen und Henrichsen, 1987). Eine wichtige Komponente der Pneumokokkenzellwand ist das **Phosphorylcholin**, über das die Gruppe der cholinbindenden Proteine auf der Bakterienoberfläche nicht kovalent verankert wird (Yother und White, 1994).

Phosphorylcholin ist aber gleichzeitig auch ein Adhäsion, das die Bindung an den Wirtsrezeptor des Thrombozyten aktivierten Faktors („platelet-activating factors“, PAF) vermittelt (Cundell *et al.*, 1995a). Des Weiteren wird Phosphorylcholin von dem C-reaktiven Protein des angeborenen Immunsystems erkannt. Dies führt zu einer Aktivierung des humanen Komplementsystems (Mold *et al.*, 2002; Szalai *et al.*, 1997). Es wurde gezeigt, dass sowohl Lipoteichonsäuren als auch Zellwand Peptidoglykan von TLR2 erkannt werden (Han *et al.*, 2003; Schroder *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2003; Yoshimura *et al.*, 1999). Allerdings wurden in einer jüngeren Studie gegensätzliche Ergebnisse publiziert. Dabei wurde von Travassos *et al.* (2004) nachgewiesen, dass hochgradig aufgereinigtes Peptidoglykan verschiedener Spezies nicht von TLR2, TLR2/1 oder TLR2/6 erkannt wird, sondern wahrscheinlich intrazellulär über Nod1/Nod2 detektiert wird. Die Stimulierung des Immunsystems erfolgt zusätzlich durch die Bindung von Komponenten der Pneumokokken-Zellwand an LBP (Lipopolysaccharid bindendes Protein) (Weber *et al.*, 2003). Die Komponenten der Zellwand sind damit für Entzündungsprozesse im Verlauf einer Pneumokokkeninfektion verantwortlich. So stimulieren gereinigte Zellwandkomponenten humane Monocyten zur Produktion von Interleukin-1 (Riesenfeld-Orn *et al.*, 1989). Die Signalkaskaden, die durch die Zellwand von *S. pneumoniae* ausgelöst werden, induzieren die Expression des Transkriptionsfaktors NF- κ B und die Produktion von TNF- α , Interleukin-1, -6 und -8 (Bergeron *et al.*, 1998; Heuman *et al.*, 1994; Saukkonen *et al.*, 1990; Spellerberg *et al.*, 1996). Außerdem spielt die Zellwand besonders bei unbekapselten Pneumokokken eine Rolle im Anheftungsprozess an die humanen Endothelzellen HUVEC (Geelen *et al.*, 1993). Bisher ist das Potenzial der Bakterienzellwand und deren Komponenten in Bezug auf die Virulenz von *S. pneumoniae* beschrieben worden. Pneumokokken verfügen weiterhin über verschiedenste Proteine, die als Virulenzfaktoren identifiziert worden sind.

Pneumolysin ist ein intrazelluläres Protein mit einem Molekulargewicht von 52,8 kDa, das im Gegensatz zu anderen Pathogenitätsfaktoren nicht auf der Bakterienoberfläche exponiert wird. Zunächst wurde angenommen, dass es durch die Autolysin vermittelte Lyse der Pneumokokken freigesetzt wird. Dies wurde allerdings widerlegt, so dass der Mechanismus der Sekretion von Pneumolysin unklar ist (Balachandran *et al.*, 2001). Pneumolysin kommt als thiol-aktiviertes Toxin in allen klinischen Isolaten von *S. pneumoniae* vor. Es hemmt den Zilienschlag von respiratorischen Epithelzellen (Steinfort *et al.*, 1989). Pneumolysin bindet an das Cholesterin der Plasmamembran von Wirtszellen und führt durch seine hämolytische Aktivität zur Zelllyse (Johnson *et al.*, 1980). Dabei induziert Pneumolysin die Bildung von Transmembranporen (Morgan *et al.*, 1994 und 1995). Durch die Schädigung von Wirtszellen kann es zu einem Eintritt von *S. pneumoniae* in das Blutssystem und damit zu einer Bakteriämie kommen (Rubins *et al.*, 1993 und 1995). Bei Kontakt von Pneumolysin mit Zellen der Blut-Hirn-Schranke wird diese geschädigt, so dass Pneumokokken in Teile des

Gehirns eindringen und eine Meningitis hervorrufen können (Zysk *et al.*, 2001). Weiterhin aktiviert Pneumolysin den klassischen Weg der Komplementkaskade (Paton *et al.*, 1984) und bindet unspezifisch an die Fc-Fragmente von Immunglobulin G (Mitchell *et al.*, 1991). In sehr geringen Dosen (< 1 ng/ml) verringert Pneumolysin die bakterizide Aktivität und die Migration von Neutrophilen (Paton und Ferrante, 1983). Darüber hinaus stimuliert Pneumolysin die Produktion von Zytokinen wie TNF- α und Interleukin-1 β in humanen Monozyten (Houldsworth *et al.*, 1994) und fördert damit die Entzündungsreaktion des Wirts. Außerdem erkennt der Toll-like Rezeptor 4 Pneumolysin. Dies führt zu einer Freisetzung von TNF- α und Interleukin-6 (Malley *et al.*, 2003).

Die Oberflächenproteine mit Virulenzeigenschaften von *S. pneumoniae* können in mehrere Gruppen unterschieden werden: Zum einen gibt es die Cholin-bindenden Proteine wie Autolysin, Pce, CbpD, CbpG, PspA und PspC, die über ihre Cholin-bindende Domäne an das Phosphorylcholin der Zellwand binden. Zum anderen wird die Gruppe der Proteine zusammengefasst, die über ein LPXTG-Verankerungsmotiv an das Peptidoglykan binden und auf der Zellwandoberfläche der Pneumokokken kovalent verankert werden. Dazu gehören die Hyaluronidase, NanA, die IgA1-Protease, ZmpC und HtrA. Die dritte Gruppe beinhaltet die Lipoproteine wie PsaA, PpmA und SlrA. Daneben gibt es allerdings auch Oberflächenproteine wie die Enolase, GAPDH und PavA, die sich nicht in die beschriebenen Gruppen klassifizieren lassen, aber dennoch zur Virulenz von *S. pneumoniae* beitragen.

Die Cholin-bindenden Proteine haben einen modularen Aufbau und bestehen aus einer Signalsequenz, einer biologisch aktiven N-terminalen Region und der konservierten Cholin-bindenden Domäne, über die das Protein nicht-kovalent an das Phosphorylcholin der Zellwand gebunden wird (Yother und White, 1994). Die Cholin-bindende Domäne besteht aus sich wiederholenden, Cholin-bindenden Sequenzen. Pneumokokken exprimieren stammabhängig 13 bis 16 verschiedene Cholin-bindende Proteine. Dazu gehören die Zellwand-assoziierten Hydrolasen Autolysin LytA, LytB, LytC und eine Phosphorylcholin-esterase Pce bzw. CbpE.

Das **Hauptautolysin** LytA ist eine N-Acetylmuraminsäure-L-Alanin-Amidase, die bei Erreichen der stationären Wachstumsphase oder der Einwirkung von Penicillin zur Lyse der Bakterien führt (Tomasz *et al.*, 1970). Daneben spielt LytA eine Rolle in der Zellseparation von Tochterzellen (Ronda *et al.*, 1987; Sanchez-Puelles *et al.*, 1986). Dabei ist LytB das Hauptenzym der Zellseparation (Garcia *et al.*, 1999; de las Rivas *et al.*, 2002). LytA verleiht einen Immunschutz im Tiermodell (Berry *et al.*, 1989).

Die **Phosphorylcholinesterase (Pce)**, die auch mit CbpE bezeichnet wird, entfernt enzymatisch endständiges Phosphorylcholin von den Teichon- und Lipoteichonsäuren der Zellwand und führt damit zu Veränderungen des Koloniephänotyps (de las Rivas *et al.*, 2001;

Vollmer und Tomasz, 2001). Pce gehört zu der Familie der Metallo- β -Lactamasen. Die Fähigkeit, die Menge an Phosphorylcholin auf der Zellwandoberfläche zu verändern, ist für die Adhärenz der Pneumokokken an humane Wirtszellen und die Kolonisierung des Nasopharynx relevant (Gosink *et al.*, 2000). Andererseits zeigten Pneumokokken mit inaktiver Pce eine höhere Virulenz bei einer Infektion des Peritoneums von Mäusen (Vollmer und Tomasz, 2001). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch die fehlende Pce-Aktivität eine größere Zahl von Cholinresten auf der Bakterienoberfläche vorhanden ist, die wiederum mit dem PAF-Rezeptor interagieren können. Auf der anderen Seite bindet Phosphorylcholin das wirtseigene C-reaktive Protein, so dass es zu einer verstärkten Phagozytose der Erreger kommen kann. Die Pce könnte demnach eine doppelte Funktion sowohl in der Kolonisierung als auch bei invasiven Infektionen durch die Modulation des Phosphorylcholingehalts der Zellwand ausüben.

Die Cholin-bindenden Proteine **CbpD** und **CbpG** spielen eine Rolle während der Kolonisierung. Dabei ist CbpG eine putative Serinprotease (Gosink *et al.*, 2000). CbpD ist ein durch das Kompetenz-stimulierende Peptid induzierbares Protein, das als Murein Hydrolase wirken könnte. CbpD unterstützt LytA bei der Kompetenz-induzierten Zelllyse (Kausmally *et al.*, 2005). Des Weiteren ist CbpD an der Wirkung von kompetenten Pneumokokken auf die Freisetzung von Virulenzfaktoren von nicht-kompetenten Bakterien beteiligt (Giral *et al.*, 2005).

Ein weiteres Cholin-bindendes Protein und Virulenzfaktor von *S. pneumoniae* ist das **Pneumococcal surface protein A (PspA)**. Es kommt in struktureller und antigener Variation in allen klinisch relevanten Serotypen vor (Crain *et al.*, 1990) und ist für die Virulenz der Erreger notwendig (Briles *et al.*, 1988). Das Molekulargewicht variiert unabhängig vom Kapselserotyp von 67 kDa bis 99 kDa in verschiedenen Stämmen. PspA wirkt stark immunogen und verleiht im Mausmodell einen hohen Immunschutz (McDaniel *et al.*, 1994). Die Inaktivierung von PspA führt zu einer verminderten Virulenz und einer erhöhten Komplement-vermittelten Phagozytose der Bakterien (Ren *et al.*, 2004). PspA inhibiert die Aktivierung und die Anlagerung von C3 über den klassischen Komplementweg (Ren *et al.*, 2003 und 2004) bzw. die Anheftung von C3b und damit die alternative Komplementkaskade (Ren *et al.*, 2004; Tu *et al.*, 1999). Darüber hinaus bindet PspA das humane Eisen-transporterprotein Lactoferrin (Hammerschmidt *et al.*, 1999); Pneumokokken können allerdings Lactoferrin nicht als Eisenquelle nutzen. Lactoferrin spielt eine bedeutende Rolle in der angeborenen Immunabwehr, und die Eisen-depletierte Form Apolactoferrin wirkt bakteriostatisch oder bakterizid. Die Expression von PspA schützt vor dem bakteriziden Effekt des Apolactoferrins, indem PspA durch die Bindung an Apolactoferrin wahrscheinlich dessen aktives Zentrum blockiert (Shaper *et al.*, 2004)

Das **Pneumococcal surface protein C (PspC)** ist ein multifunktionales Cholin-bindendes Protein von *Streptococcus pneumoniae*. Es ist auch als SpsA (*Streptococcus pneumoniae* sekretorisches IgA Bindungsprotein) und CbpA beschrieben. Zum einen vermittelt PspC die Aufnahme von Pneumokokken in Epithelzellen des Nasopharynx und zum anderen interagiert es mit Komponenten des angeborenen Immunsystems. PspC bindet als Adhäsionsspezifisch an die Ektodomäne des polymeren Immunglobulinrezeptors (plgR), die auch als sekretorische Komponente bezeichnet wird (Hammerschmidt *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Die Interaktion von PspC mit der sekretorischen Komponente führt zu einer Anheftung von *S. pneumoniae* an plgR-exprimierende Epithelzellen und zum anderen zu einer Transmigration der Bakterien durch mukosale Epithelzellen (Elm *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2000). Die Humanspezifität der Interaktion von PspC und der sekretorischen Komponente wird durch die Aminosäureunterschiede in den Ektodomänen D3 und D4 bedingt (Elm *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2003). Trotz der Humanspezifität führt die Inaktivierung von PspC zu einer reduzierten Kolonisierung in neugeborenen Ratten (Rosenow *et al.*, 1997) und in plgR-Knockout-Mäusen (Zhang *et al.*, 2000). Das Bindungsmotiv von PspC für die sekretorische Komponente ist ein Hexamer und ist im N-terminalen Bereich von PspC lokalisiert (Hammerschmidt *et al.*, 2000). Die Strukturanalyse von PspC zeigte, dass die Schleife zwischen Helix 1 und 2 eine Tyrosin-Gabelung bildet, in der das YPT-Epitop lokalisiert ist, welches das minimale Bindungsmotiv von PspC für die Interaktion mit der sekretorischen Komponente darstellt (Luo *et al.*, 2005). PspC bindet außerdem Komponenten des angeborenen Immunsystems, wie das Komplementprotein C3 und Faktor H (Smith und Hostetter, 2000; Dave *et al.*, 2001). Neben PspC bindet auch das PspC-ähnliche **Hic (Factor H-binding inhibitor of complement)**-Protein (PspC 11.4) Faktor H des Komplements (Janulczyk *et al.*, 2000). Hic wird hauptsächlich in Pneumokokken des Serotyp 3 exprimiert, die keine Bindung der sekretorischen Komponente zeigen. Hic enthält ein LPXTG-Motiv, über das das Protein an dem Peptidoglykangerüst der Zellwand verankert wird. Die Bindung von Faktor H an Hic schützt vor der Aktivierung von C3b und damit vor der Komplement-vermittelten Opsonophagozytose von *S. pneumoniae* (Jarva *et al.*, 2004). Des Weiteren erhöht sich die Überlebensrate der Erreger bei Expression von PspC oder Hic in einem systemischen Mausinfektionsmodell (Iannelli *et al.*, 2004).

Neben der Familie der Cholin-bindenden Proteine von *S. pneumoniae* gibt es weitere Oberflächenproteine, die über ein LPXTG-Motiv an dem Peptidoglykan der Zellwand kovalent verankert werden. Diesen Proteinen ist eine Signalsequenz für den Proteinexport über den allgemeinen Sekretionsweg und das C-terminale Verankerungsmotiv gemeinsam.

Dazu gehört die **Hyaluronidase**, die die Hyaluronsäure der extrazellulären Matrix hydrolysiert. Damit könnte die Hyaluronidase die Ausbreitung der Pneumokokken im Gewebeverband fördern und zum invasiven Potenzial beitragen (Berry *et al.*, 1994). Die

Inaktivierung der Hyaluronidase führte in einem intraperitonealen Mausinfektionsmodell zu einer verminderten Virulenz von *S. pneumoniae* (Chapuy-Regaud *et al.*, 2003).

Praktisch alle klinischen Pneumokokkenisolate produzieren mindestens eine **Neuraminidase**, die von *nanA* oder *nanB* kodiert wird. Diese Exoglykosidasen spalten die endständigen Sialinsäuren von Glykoproteinen, Glykolipiden und Oligosacchariden aus Zelloberflächen oder Körperflüssigkeiten des humanen Wirtes ab. NanA und NanB werden über den allgemeinen Sekretionsweg sekretiert, jedoch besitzt nur NanA das C-terminale LPXTG-Verankerungsmotiv (Berry *et al.*, 1994; Camara *et al.*, 1994). NanA spielt eine wichtige Rolle während der Kolonisierung von *S. pneumoniae*, da die Besiedelung des Nasopharynx und des Mittelohrs mit einer *nanA*-Mutante in einem Chinchillainfektionsmodell vermindert war (Tong *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu zeigte der *nanA*-defiziente Stamm keine Beeinträchtigung der Virulenz in einem intraperitonealen Infektionsmodell (Berry und Paton, 2000). NanA spaltet nicht nur Sialinsäure von Wirtskomponenten ab, sondern die Neuraminidase katalysiert auch die die Abspaltung von endständigen Sialinsäuren von Lipooligosacchariden der Erreger *Haemophilus influenzae* und *Neisseria meningitidis* (Shakhnovich *et al.*, 2002). Die endständigen Sialinsäuren schützen die Bakterien vor der Komplement-vermittelten Phagozytose. *S. pneumoniae* könnte einen Vorteil gegenüber den anderen Pathogenen während der Kolonisierung ziehen, die durch das Entfernen der Sialinsäuren nun von dem Immunsystem angegriffen werden können. Weiterhin spaltet NanA Sialinsäuren der sekretorischen Komponente, von Lactoferrin und IgA2 ab (King *et al.*, 2004). Damit kann das Überleben der Pneumokokken im humanen Atmungssystem erleichtert werden. Zusätzlich schützt die Diversität des *nanA*-Gens, die durch Rekombinationsereignisse hervorgerufen wird und sich auf den Teil des Gens beschränkt, der nicht für die enzymatische Aktivität kodiert, den Erreger vor der adaptiven Immunantwort des Wirts (King *et al.*, 2005).

S. pneumoniae exprimiert vier Zink-Metalloproteasen, zu denen die IgA1-Protease, ZmpB, ZmpC und ZmpD gehören, die ebenfalls über ein LPXTG-Motiv an der Zellwand verankert werden. Die **IgA1-Protease** kommt in nahezu allen klinischen Pneumokokkenisolaten vor und spielt eine Rolle bei Lungeninfektionen und Bakteriämie (Polissi *et al.*, 1998). Sie spaltet spezifisch humanes IgA1. Pneumokokken, die auf ihrer Oberfläche Serotyp-spezifisches IgA1 gebunden haben, zeigten in Gegenwart der IgA1-Protease eine erhöhte Adhärenz an humane Wirtszellen (Weiser *et al.*, 2003). Dabei wird angenommen, dass die gebundenen Fab-Fragmente die negative Ladung der Kapsel neutralisieren und damit den anti-adhäsiven Effekt der Kapsel aufheben, so dass es zu einer Interaktion zwischen dem Phosphorylcholin der Zellwand der Pneumokokken und dem PAF-Rezeptor kommen kann.

Die **Zink-Metalloprotease C (ZmpC)** von *S. pneumoniae* spaltet das Proenzym der humanen Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) in ihre aktive Form. MMP-9 ist an der

Degradation der Matrix und dem Öffnen der Blut-Hirn-Schranke beteiligt, so dass der Virulenzfaktor ZmpC zur Pathogenese beitragen kann. In einem Pneumonia-Mausinfektionsmodell zeigte die *zmpC*-defiziente Mutante eine beeinträchtigte Virulenz (Oggioni *et al.*, 2003).

Die **high-temperature requirement A (HtrA)** Protease der Pneumokokken wirkt temperaturabhängig als ein molekulares Chaperon oder eine Hitzeschock-induzierte Serinprotease. HtrA wird durch CiaRH-Zweikomponentensystem reguliert und ist an der Resistenz von *S. pneumoniae* gegenüber oxidativem Stress beteiligt. Des Weiteren spielt HtrA eine Rolle in der Kolonisierung des Nasopharynx von Ratten und bei der durch Pneumokokken hervorgerufenen Lungenentzündung. Gleichzeitig induziert die *htrA*-defiziente Mutante während einer Pneumonie geringere Mengen der proinflammatorischen Cytokine Interleukin 6 und TNF- α in den Lungen verglichen mit dem isogenen Wildtyp (Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003; Ibrahim *et al.*, 2004).

Die Lipoproteine von *S. pneumoniae*, die auch die Peptidpermeasen beinhalten, spielen eine wichtige Rolle innerhalb des Substrattransports und für die bakterielle Fitness.

Das Lipoprotein **Pneumococcal surface antigen A (PsaA)** bindet spezifisch Mangan- und Zinkionen und ist Teil des ABC-Transportsystems (Dintilhac *et al.*, 1997). Die Inaktivierung von *psaA* hat verschiedene Auswirkungen wie eine reduzierte Adhärenz der Pneumokokken an Wirtszellen, eine verminderte Virulenz in einem intranasalen bzw. intraperitonealen Mausinfektionsmodell und eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress (Marra *et al.*, 2002; Tseng *et al.*, 2002). Die Rolle von PsaA als Adhäsion ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Gegen PsaA gerichtete Antikörper inhibieren die Adhärenz von *S. pneumoniae* an Epithelzellen des Nasopharynx (Romero-Steiner *et al.*, 2003). Des Weiteren führte die mukosale Immunisierung von Mäusen mit PsaA zu einem hohen Schutz vor der Kolonisierung durch Pneumokokken (Johnson *et al.*, 2002). Microarray-Experimente zeigten außerdem eine stärkere Expression von *psaA* in Bakterien, die an die Epithelzellen des Nasopharynx adhärten (Orihuela *et al.*, 2004).

Pneumokokken exprimieren weiterhin zwei konservierte Oberflächen-lokalisierte Lipoproteine, die zu einer Familie von Chaperonen, den Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPIasen), gehören. Die PPIasen sind an der Sekretion und Aktivierung von Oberflächenmolekülen beteiligt. Beide Proteine, **PpmA (putative proteinase maturation protein A)** und **SlrA (streptococcal lipoprotein rotamase A)**, sind immunogen (Adrian *et al.*, 2004). Die Inaktivierung von PpmA erhöhte die Überlebensrate von *S. pneumoniae* im Mäusen (Overweg *et al.*, 2000), während *slrA*-defiziente Pneumokokken eine geringere Kolonisierung des Nasenrachenraumes von Mäusen zeigten. Dies ist auf die verminderte Fähigkeit der Bakterien zurückzuführen, an nicht-professionelle Zellen zu binden (Hermans

et al., 2006). Zur Überprüfung des Potenzials von PpmA und SlrA als mögliche Impfstoffkandidaten müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Ein weiterer Virulenzfaktor, der sich nicht in die beschriebenen Gruppen einteilen lässt, ist die **α -Enolase**. Die Enolase von *S. pneumoniae* ist sowohl im Cytoplasma als auch an der Zelloberfläche lokalisiert, obwohl sie keine typischen Eigenschaften eines Oberflächen-assoziierten Proteins wie ein Sekretionssignal oder Verankerungsmotiv enthält. Pneumokokken können über verschiedene bakterielle Liganden humanes Plasmin(ogen) binden. Das wichtigste dieser plasmin(ogen)bindenden Proteine ist das Glykolyseenzym Enolase (Bergmann *et al.*, 2001). Außerdem bindet die **Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)** Plasmin(ogen) (Bergmann *et al.*, 2004). Plasminogen repräsentiert das monomere Proenzym der Serin-Protease Plasmin, das eine entscheidende Rolle in der Fibrinolyse (Collen und Verstraete, 1975), in der Homeostase (Saksela und Rifkin, 1990) und in der Degradation der extrazellulären Matrix (Vassalli *et al.*, 1991) spielt. Die Bindung von Plasmin(ogen) über die Enolase an Pneumokokken führt zu einer erhöhten Degradation der extrazellulären Matrix, zum Auflösen von Fibrin und zur Transmigration der Pneumokokken (Bergmann *et al.*, 2005). Die proteolytische Aktivität des Oberflächen-gebundenen Plasmin(ogen)s kann zu einer verstärkten Invasivität und damit zu einer höheren Virulenz von *S. pneumoniae* führen. *Enolase*-Mutanten mit inaktivierter Plasminogen-Bindungsstelle zeigten eine signifikant geringere Virulenz in einem intranasalen Mausinfektionsmodell im Vergleich zu dem isogenen Wildtyp (Bergmann *et al.*, 2003).

3.7.1. PavA - Ein Virulenzfaktor von *S. pneumoniae*

Neben der Enolase und GAPDH ist das **Pneumococcal adhesion and virulence protein A (PavA)** auf der Oberfläche von *S. pneumoniae* lokalisiert, obgleich es in seiner Aminosäuresequenz weder ein Signalpeptid für den allgemeinen Sekretionsweg, noch ein für Gram-positive Bakterien übliches C-terminales LPXTG-Motiv zur Verankerung an der Zellwand enthält (Fischetti *et al.*, 1990). Die Proteinsequenz von PavA enthält auch keine Cholin-bindenden Repeats im C-terminalen Bereich, über die es an das Phosphorylcholin der Zellwand binden könnte (Yother und White, 1994). Die Oberflächenlokalisierung von PavA wurde in der Immunelektronenmikroskopie gezeigt (Holmes *et al.*, 2001). Damit bildet PavA zusammen mit der Enolase und GAPDH von *S. pneumoniae* eine neue Klasse von Oberflächenproteinen (Chhatwal, 2002).

PavA besteht aus 551 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 63,3 kDa. Das *pavA*-Gen kommt in allen 64 getesteten klinischen Isolaten von *S. pneumoniae* vor, die 21 verschiedene Serotypen repräsentieren; PavA scheint damit ein hoch konserviertes Protein darzustellen (Holmes *et al.*, 2001). Die Aminosäuresequenz von PavA weist eine 67 %ige Homologie zu dem Fibronectin-bindenden Protein Fbp54 aus *Streptococcus pyogenes* und

eine 74 %ige Homologie zu dem Protein FbpA aus *Streptococcus gordonii* auf (Holmes *et al.*, 2001; Courtney *et al.*, 1994 und 1996). Rekombinantes PavA bindet an immobilisiertes humanes Fibronectin, eine Komponente der extrazellulären Matrix des Wirtsorganismus. Die Bindung von PavA an immobilisiertes Fibronectin kann durch die Zugabe von Heparin blockiert werden, da PavA die Heparin-Bindungsdomäne innerhalb des C-Terminus im humanen Fibronectin erkennen könnte. Weiter ist der C-terminale Bereich von PavA essentiell für die Bindung an Fibronectin, da ein C-terminal verkürztes PavA-Fragment mit einem Molekulargewicht von 42 kDa keine Bindung an Fibronectin zeigt. Die Zugabe von rekombinantem PavA-Protein blockiert die Bindung von Pneumokokken an immobilisiertes Fibronectin. Hingegen zeigt die Zugabe des C-terminal verkürzten PavA-Proteins keinen Einfluss auf diese Bindung. Des Weiteren weisen PavA-defiziente Pneumokokken eine um 50 % reduzierte Bindung an immobilisiertes Fibronectin auf. Dies deutet darauf hin, dass PavA nicht das einzige Fibronectin-bindende Protein von *S. pneumoniae* darstellt (Holmes *et al.*, 2001). Neben der Eigenschaft, an Fibronectin zu binden, spielt PavA eine wichtige Rolle bei der Pathogenität von *S. pneumoniae*. PavA-defiziente Pneumokokken zeigen eine um das 10⁴-fache verminderte Virulenz in einem systemischen Infektionsmodell der Maus. Die Inaktivierung des *pavA*-Gens in *S. pneumoniae* hat keine Auswirkung auf die Wachstumsrate, die Zellmorphologie, die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Bakterienoberfläche und die Produktion der Virulenzfaktoren Pneumolysin, Autolysin, PspA und PsaA (Holmes *et al.*, 2001). Des Weiteren wurde PavA unabhängig in einer „signature tagged Mutagenese“ (STM) als Virulenzfaktor in einem Pneumonie-Mausinfektionsmodell identifiziert (Lau *et al.*, 2001).

3.8. Fibronectin und bakterielle Fibronectin-Bindungsproteine

Pathogene Mikroorganismen haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um sich an die Wirtszellen anzuheften und damit den Wirt zu kolonisieren. Dabei binden viele Erreger wie Staphylokokken und Streptokokken in der frühen Infektionsphase das humane Wirtsprotein Fibronectin (Joh *et al.*, 1999). Fibronectin ist ein großes, multifunktionales Glykoprotein, dass in verschiedenen Varianten vorkommt (Kosmehl *et al.*, 1996). Fibronectin liegt im Blutplasma und den extrazellulären Flüssigkeiten als lösliches Dimer vor. Die Konzentration des Glykoproteins im Blutplasma beträgt dabei 200 bis 700 µg/ml. Die unlösliche multimere Form des Fibronectins findet sich in der extrazellulären Matrix und der Basalmembran von Epithelzellen (Ruoslahti, 1988). Die Bezeichnung „Fibronectin“ berücksichtigt sowohl die Struktur als auch die Bindungsstärke und –vielfalt des Proteins (lateinisch: fibra für „Faser“ und nexus für „Verknüpfung“). Fibronectin spielt in vielen physiologischen Abläufen wie der Migration und Adhäsion von eukaryotischen Zellen, dem Zellwachstum und der Differenzierung eine wichtige Rolle (Mosher, 1989; Carsons, 1989; Hynes, 1990; Yamada

und Clark, 1996). In der Blutgerinnung bildet Fibronectin ein fibrilläres Netzwerk, das als Gerüst zur Einlagerung von Matrixbestandteilen wie Kollagen, Heparansulfat, Proteoglykan, Chondroitinsulfat und ähnlichem dient (Mosher, 1980 und 1984; Grinnel, 1984).

Fibronectin existiert als lösliches Dimer aus zwei nahezu identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von jeweils etwa 230 bis 270 kDa. Die Untereinheiten sind an ihrem C-Terminus über ein Paar Disulfidbrücken miteinander kovalent verbunden. Jedes Monomer besteht aus einem modularen Aufbau aus drei Arten von sich wiederholenden, funktionell unterscheidbaren Domänen, die als Typ I-, Typ II- und Typ III-Modul bezeichnet werden (Peterson und Skorstengaard, 1985, Ruoslahti, 1988). Die Sekundärstruktur dieser Domänen setzt sich aus antiparallel angeordneten β -Faltblattstrukturen zusammen. Dabei enthalten die Typ I- und Typ II-Domänen jeweils zwei Disulfidbrücken, die in Typ III-Domänen nicht vorkommen. Jede Polypeptidkette des Fibronectins besteht aus 12 Typ I-Domänen, 2 Typ II-Domänen und 15 bis 17 Typ III-Domänen, die zusammen etwa 90 % der Sequenz umfassen. Die Typ I-Domänen, von denen drei den C-Terminus des Fibronectins bilden, beinhalten jeweils 45 Aminosäuren. Neun Typ I-Domänen am N-Terminus des Polypeptids werden von zwei je 60 Aminosäuren umfassenden Typ II-Domänen unterbrochen. Die mittlere Region des Peptids besteht aus den 15 bis 17 Typ III-Domänen, die aus jeweils 90 Aminosäuren gebildet werden (Abbildung 2). Zusätzlich können die Fibronectinmonomere eine variable (V-) Sequenz enthalten, die keine Homologie zu anderen Bereichen des Proteins aufweist. Damit besteht jede Polypeptidkette aus bis zu 2500 Aminosäuren (Skorstengaard *et al.*, 1986). Obwohl Fibronectinmoleküle das Produkt eines einzigen Gens sind, können sie sich aufgrund alternativer Splicevorgänge der Pre-mRNA unterscheiden. Für den Menschen sind 20 verschiedene Varianten des Fibronectins bekannt (Kosmehl *et al.*, 1996). Das lösliche Plasma-Fibronectin wird von Hepatozyten in der Leber produziert. Das multimere zelluläre Fibronectin hingegen wird lokal im Gewebe gebildet. Während die lösliche Form des Fibronectins weder die Extradomäne A (EDA) noch die Extradomäne B (EDB) des Typ III enthält, finden sich eine oder beide dieser Domänen im zellulären Fibronectin (Abbildung 2). Dabei ist die EDB zwischen den Typ III-Domänen 7 und 8 und die EDA zwischen den Typ III-Domänen 11 und 12 lokalisiert. Ein weiterer Unterschied der Arten des Fibronectins liegt in einer zusätzlichen Spliceregion, die als variable (V-) Region bezeichnet wird und sich zwischen den Typ III-Domänen 14 und 15 befindet. Die V-Region kommt im Plasma-Fibronectin in nur einer der Untereinheiten vor, hingegen enthalten nahezu alle Untereinheiten des zellulären Fibronectins diese Region (Schwarzbauer *et al.*, 1989). Die 120 Aminosäuren der V-Region können in den Polypeptidketten unterschiedlich gespleißt vorliegen (Tamkun *et al.*, 1984). Die hohe Variabilität der Fibronectinisoformen des zellulären Fibronectins wird durch die Vorgänge des alternativen Spleißens hervorgerufen. Diese verschiedenen zellulären Fibronectinproteine haben unterschiedliche Eigenschaften in

der Zelladhäsion, in der Bindung von Liganden und in der Löslichkeit. Damit kann die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix in verschiedenen Gewebearten variiert und so an die Umgebung angepasst werden (Pankov und Yamada, 2002).

Fibronectin bindet verschiedene Moleküle wie Heparin (Barkalow und Schwarzbauer, 1991), Kollagen (Hahn und Yamada, 1979) und Fibrin (Hynes, 1990) und ist ein Ligand für Integrine (Plow *et al.*, 2000). Die Bindungsstellen innerhalb des Fibronectinmoleküls konnten über proteolytische Fragmentierung und rekombinanter DNA-Analyse identifiziert werden (Mosher, 1989; Yamada und Clark, 1996). Innerhalb der Typ III-Domäne 10 ist eine funktionelle Sequenz der Aminosäuren Arginin (R), Glycin (G) und Asparaginsäure (D) lokalisiert. Über dieses RGD-Motiv erfolgt die direkte Bindung von Fibronectin an die Integrine der Zelle, besonders an den klassischen Fibronectin-Rezeptor $\alpha_5\beta_1$ -Integrin (Pierschbacher und Ruoslahti, 1984).

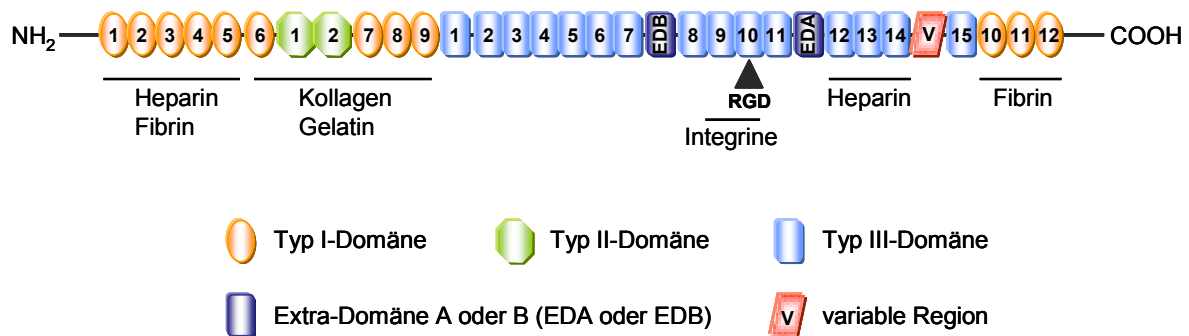


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Fibronectin-Monomers mit verschiedenen Bindungsregionen bzw. alternativen Splicevarianten (modifiziert nach Pankov und Yamada, 2002)

Integrine sind heterodimere Oberflächenrezeptoren, die die Plasmamembran durchspannen und die Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibronectin mit dem Zell-Zytoskelett verbinden. Dabei interagieren die zytoplasmatischen Domänen der Integrine mit Zytoskelett-assoziierten und an Signalwegen beteiligten Proteinen. Diese Interaktion spielt eine große Rolle bei der Bildung von Fibronectin-Fibrillen in der extrazellulären Matrix (Ali und Hynes, 1978; Wu *et al.*, 1995) und bei der Internalisierung verschiedener pathogener Mikroorganismen wie *Streptococcus pyogenes* und *Staphylococcus aureus*. Die schrittweise Fibrillogenese von Fibronectin, bei der unlösliche Fibronectin-Fibrillen gebildet und in der extrazellulären Matrix verankert werden, ist ein von den Zellen spezifisch vermittelt und regulierter Prozess. Lösliches Fibronectin kann unter physiologischen Bedingungen nicht von selbst polymerisieren. Zunächst bindet es über den N-terminalen Bereich in einem reversiblen Schritt an die Zelloberfläche (McKeown-Longo und Mosher, 1983). Danach bildet das zellgebundene Fibronectin, stabilisiert über Disulfidbrücken, Multimere mit anderen Fibronectinmolekülen (McKeown-Longo und Mosher, 1984; Chen und Mosher, 1996).

Anschließend wird die Bindungsstelle auf der Zelloberfläche regeneriert. An der Fibrillogenese von Fibronectin sind sowohl bestimmte Stellen der Zelloberfläche, die als LAMMs (molecules of large apparent molecular mass) bezeichnet werden, als auch Integrine beteiligt (Peters und Mosher, 1987). Die Fibrillen können dabei sowohl aus dimerem Plasma-Fibronectin als auch aus zellulärem Fibronectin zusammengesetzt sein (Allio und McKeown-Longo, 1988). Fibronectin kann von verschiedenen Bakterien gebunden werden. Dabei lagern sich Gram-positive Kokken innerhalb des N-terminalen Bereichs des Fibronectins an (Mosher und Proctor, 1980; Speziale *et al.*, 1984). Hingegen bindet *Streptococcus pneumoniae* an die Typ III-Module der Heparinbindungsdomäne im C-Terminus des Fibronectins. Bisher konnte nur die Bindung von Pneumokokken an immobilisiertes Fibronectin nachgewiesen werden (van der Flier *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu rekrutieren Gruppe B Streptokokken, *Streptococcus sanguis* und *Yersinia*-Arten lösliches Fibronectin (Lowrance *et al.*, 1988; Schultze-Koops *et al.*, 1993; Tamura und Rubens, 1995).

Die Anheftung an Wirtszellen stellt einen ersten und wichtigen Schritt der Kolonisierung durch Mikroorganismen dar. Dabei können die Erreger über ihre Fibronectin-Bindungsproteine an Fibronectin binden. Das Fibronectin tritt hierbei als Brückenmolekül auf und vermittelt die Adhärenz an die Epithelzellen (Joh *et al.*, 1994; Okada *et al.*, 1997). Weiterhin spielt die Bindung von Fibronectin eine wichtige Rolle bei der nachfolgenden Invasion in die Wirtszelle (Molinari *et al.*, 1997 und 2000; Talay *et al.*, 2000; Okada *et al.*, 1998) und der damit einhergehenden Aktivierung von Signalkaskaden (Ozeri *et al.*, 2001; Agerer *et al.*, 2003 und 2005). Verschiedene Fibronectin-Bindungsproteine konnten bereits bei Streptokokken identifiziert werden (Tabelle 1).

Bakterienstamm	Gruppenantigen	Fibronectin-Bindungsprotein	Molekulargewicht	Literatur
<i>S. pneumoniae</i>		PavA SSURE (<i>sp0082</i>)	63 kDa	Holmes <i>et al.</i> , 2001 Bumbaca <i>et al.</i> , 2004
<i>S. pyogenes</i>	A	Sfbl/Protein F SfblI / Serum Opacity factor (Sof 22) Fbp54 PFBP/F2 M1 Fba SfbX	113 kDa 54 kDa 127,4 kDa 37,8 kDa 650 aa	Talay <i>et al.</i> , 1992 Kreikemeyer <i>et al.</i> , 1995 Rakonjac <i>et al.</i> , 1995 Courtney <i>et al.</i> , 1994 Rocha und Fischetti, 1999 Cue <i>et al.</i> , 1998 Terao <i>et al.</i> , 2001 Jeng <i>et al.</i> , 2003
<i>S. gordonii</i>	A	CshA FbpA	259 kDa 62 kDa	McNab <i>et al.</i> , 1999 Christie <i>et al.</i> , 2002
<i>S. agalactiae</i>	B	ScpB		Beckmann <i>et al.</i> , 2002
<i>S. dysgalactiae</i>	C	FnBA FnBB	117 kDa 122 kDa	Lindgren <i>et al.</i> , 1992 Lindgren <i>et al.</i> , 1993
<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i>	C	SFS Fne FNEB	40 kDa 45,6 kDa	Lindmark <i>et al.</i> , 1999 Lindmark <i>et al.</i> , 2001 Lannergard <i>et al.</i> , 2005
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	C	FnZ FNZ2	61 kDa	Lindmark <i>et al.</i> , 1996 Hong 2005
<i>S. equisimilis</i>	G	FnB	120 kDa	Lindgren <i>et al.</i> , 1994
Gruppe G Streptokokken	G	GfbA	65 kDa	Kline <i>et al.</i> , 1996
<i>S. mutans</i>	E	FBP-130	130 kDa	Chia <i>et al.</i> , 2000

Tabelle 1: Zusammenstellung der Fibronectin-Bindungsproteine von Streptokokken

Die Proteinstruktur fast aller Fibronectin-Bindungsproteine gliedert sich in eine variable N-terminale und in eine konservierte C-terminale Region. Diese C-terminale Region enthält meist drei bis fünf sich wiederholende Motive, die aus 37 bis 45 Aminosäuren bestehen und die Bindung an Fibronectin vermitteln (Rocha und Fischetti, 1999). Diese klassische Proteinstruktur findet sich bei Sfbl und Protein F von *S. pyogenes* wieder, die sehr gut untersuchte identische Fibronectin-Bindungsproteine darstellen (Hanski *et al.*, 1992; Talay *et al.*, 1994). Die Proteine enthalten ein N-terminales Signalpeptid gefolgt von einer ca. 200 Aminosäuren umfassenden, variablen, aromatischen Region und konservierten Prolinreichen Repeats. An diese schließt sich der Fibronectin-bindende Spacer, gefolgt von den Fibronectin-bindenden Repeats an. Im C-Terminus liegt die Zellwand-Region mit einem LPXTG-Verankerungsmotiv (Talay *et al.*, 2000). Die Interaktion von Sfbl und Fibronectin

erfolgt nach einem Tandem- β -Zipper Mechanismus (Schwarz-Linek *et al.*, 2003). Die Fibronektin-bindenden Proteine der Streptokokken spielen als Virulenzfaktoren bei der Kolonisierung eine Rolle, vermitteln aber teilweise auch die Invasion der Erreger in die Wirtszellen. Das am besten charakterisierte Fibronektin-bindende Protein der Gruppe A Streptokokken ist das Sfbl bzw. Protein F. Sfbl vermittelt die Adhärenz und die Invasion in humane Epithelzellen (Talay *et al.*, 1992; Molinari *et al.*, 1997). Das Streptokokkenadhäsion Fbp54 vermittelt eine zellspezifische Anheftung von *S. pyogenes* an Wirtszellen (Courtney *et al.*, 1996) und das Fibronektin-bindende Oberflächenprotein M1 die Invasion der Bakterien in Lungenepithelzellen *in vitro* (Cue *et al.*, 1998). Fba-defiziente Mutanten von Gruppe A Streptokokken weisen eine verminderte Invasionsrate in Epithelzellen *in vitro* und eine geringere Virulenz in einem Hautinfektionsmodell der Maus auf (Terao *et al.*, 2001).

In *Streptococcus gordonii* sind bisher zwei Fibronektin-bindende Proteine beschrieben worden. Das Fibronektinadhäsion CshA ist in der Zellwand verankert (McNab *et al.*, 1999) und fungiert als Komponente der Fibrillen auf der Bakterienoberfläche. Die Genexpression von CshA wird von FbpA, dem zweiten bekannten Fibronektin-bindenden Protein von *S. gordonii*, moduliert und damit die Anheftung der Bakterien an Fibronektin beeinflusst (McNab *et al.*, 1996; Christie *et al.*, 2002). Die Lokalisation von FbpA auf der Oberfläche von *S. gordonii* konnte bislang nicht gezeigt werden. Jedoch weist FbpA eine 70 %ige Homologie zu den Fibronektin-bindenden Proteinen Fbp54 von *S. pyogenes* (Courtney *et al.*, 1994) und PavA von *S. pneumoniae* (Holmes *et al.*, 2001) auf. Diese Proteine zeigen nicht die klassische Proteinstruktur, die für das Fibronektin-bindende Sfbl-Protein von *S. pyogenes* beschrieben wurde. Die Proteine FbpA, Fbp54 und PavA tragen weder ein N-terminales Signalpeptid für die Sekretion über den allgemeinen Sekretionsweg noch ein LPXTG-Verankerungsmotiv im C-terminalen Bereich. Über die Sekretionsmechanismen dieser Proteine und ihre Verankerung in der Zellwand ist bisher noch wenig bekannt.

Für *S. mutans* ist das Fibronektin-bindende Protein FBP-130 beschrieben, das stärker an immobilisiertes als an lösliches Fibronektin bindet und direkt die Adhärenz von *S. mutans* an Endothelzellen vermittelt (Chia *et al.*, 2000).

In *Streptococcus pneumoniae* sind bisher zwei Proteine mit Fibronektin-bindenden Eigenschaften bekannt. Zum einen bindet der Pneumococcal adherence and virulence Faktor A (PavA) an die Heparin-Bindungsdomäne des immobilisierten Fibronektins. Die C-terminale Region von PavA ist dabei essentiell für die Fibronektinbindung (Holmes *et al.*, 2001). Zum anderen wurden in dem offenen Leserahmen *sp0082* des Pneumokokkenstammes TIGR4 sich wiederholende Domänen identifiziert, die möglicherweise Fibronektin binden. Diese Regionen wurden als streptococcal surface repeat (SSURE) Domänen bezeichnet. Das von *sp0082* kodierte Protein enthält eine LPXTG-Verankerungssequenz (Bumbaca *et al.*, 2004). Die Funktion der Fibronektin-bindenden Proteine von *S. pneumoniae*

für die Virulenz der Erreger und deren Interaktion mit Fibronectin bzw. mit humanen Wirtszellen ist noch ungeklärt.

3.9. Zielsetzung

In vorausgegangenen Studien wurde PavA von *Streptococcus pneumoniae* als Fibronectin-bindendes Protein und als Virulenzfaktor in einem Sepsisinfectionsmodell der Maus identifiziert. Das Protein ist auf der Oberfläche der Erreger lokalisiert, verfügt allerdings weder über ein Sekretionssignal noch über ein Verankerungsmotiv (Holmes *et al.*, 2001).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von PavA in der Virulenz von Pneumokokken in einem experimentellen Maus-Meningitis-Modell *in vivo* zu untersuchen und die potenzielle Funktion von PavA bei der Kolonisierung und der Interaktion mit humanen Wirtszellen *in vitro* zu überprüfen. Es sollte die Adhärenz an und die Invasion von *pavA*-defizienten Pneumokokken in Wirtszellen unterschiedlicher Gewebetypen in Infektionsstudien untersucht werden. Zusätzliche Inhibitionsstudien mit anti-PavA-Antikörpern sollten die Rolle von PavA als bakterieller Bindungspartner für Rezeptoren der Wirtszelle aufklären. Außerdem sollte der Einfluss von PavA auf andere bekannte Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* wie das PspA oder PspC untersucht werden.

Des Weiteren sollte die Bindung von Fibronectin und *S. pneumoniae* charakterisiert, sowie die Wirtsspezifität in Bezug auf das verwendete Fibronectin betrachtet werden. Dazu sollten Bindungsstudien mit humanem und bovinem Plasma und mit reinem löslichen Fibronectin unterschiedlicher Spezies durchgeführt werden. Dabei sollte auch der Einfluss der Konformation des Fibonektins analysiert werden, in dem für die Bindungsstudien sowohl dimeres Plasma-Fibronectin als auch multimeres zelluläres Fibronectin verwendet wurde. Ziel war es außerdem, den Einfluss von Fibronectin auf die Anheftung von *S. pneumoniae* an humane Wirtszellen zu untersuchen und dabei auch die Rolle von PavA als Fibronectin-bindendes Protein zu berücksichtigen. Die Adhärenz an und die Invasion der Erreger in humane Epithel- und Endothelzellen nach der Zugabe von exogenem Fibronectin sollte dazu analysiert werden. Des Weiteren sollten Inhibitionsstudien mit Heparin durchgeführt werden, um eine Fibronectin-vermittelte Adhärenz zu blockieren. Schließlich sollten erste Hinweise auf die Beteiligung von Wirtszellkomponenten bei der Fibronectin-vermittelten Internalisierung von *S. pneumoniae* erhalten werden, indem die Infektionsversuche mit humanen Zellen in Gegenwart verschiedener Inhibitoren des Zytoskeletts und Inhibitoren spezifischer Kinasen, wie der Kinasen der Src-Familie oder der PI-3-Kinase, durchgeführt werden sollten. Weiterhin sollte die Rolle der fokalen Adhäsionskinase (FAK) in Infektionsstudien mit FAK-defizienten Fibroblasten untersucht werden.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchungen zur Rolle von PavA als Virulenzfaktor

4.1.1. Untersuchungen zur Rolle von PavA im experimentellen Maus-Meningitis-Modell

Streptococcus pneumoniae besiedelt als Kommensale asymptomatisch den Nasenrachenraum des Menschen. Der humanpathogene Erreger kann aber auch sowohl lokale als auch invasive Erkrankungen hervorrufen. Es sind verschiedene Virulenzfaktoren von Pneumokokken bekannt, die mit unterschiedlichen Komponenten des Wirts, z. B. mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix (ECM), interagieren und so zu einem Anheften und Eindringen der Bakterien in humanes Gewebe führen konnten.

Ein Virulenzfaktor von *S. pneumoniae* ist das pneumococcal adherence and yirulence protein A (PavA). PavA ist auf der Oberfläche von Pneumokokken lokalisiert, obwohl das Protein keine Signalsequenz für die Sekretion und kein LPXTG-Verankerungsmotiv enthält. Es bindet an immobilisiertes Fibronectin, das eine Hauptkomponente der ECM darstellt. Mutanten mit einer Inaktivierung des *pavA*-Gens zeigten in einem Maus-Sepsis-Modell eine um das 10^4 -fache reduzierte Virulenz in Bezug auf den Wildtyp-Stamm (Holmes *et al.*, 2001). Die Rolle von PavA als Virulenzfaktor von *S. pneumoniae* wurde auch in einem Maus-Meningitis-Modell analysiert. Dabei wurden weibliche C57BL/6 Mäuse durch eine Injektion direkt in den rechten Frontallappen des Gehirns mit einer Dosis von 10^6 CFU des Pneumokokken-Wildtypstamms D39 und der isogenen *pavA*-Mutante infiziert. Je Gruppe wurden 9 Tiere untersucht und die Überlebensrate bestimmt, die in der Kaplan-Meier Darstellung gezeigt wird (Abbildung 3).

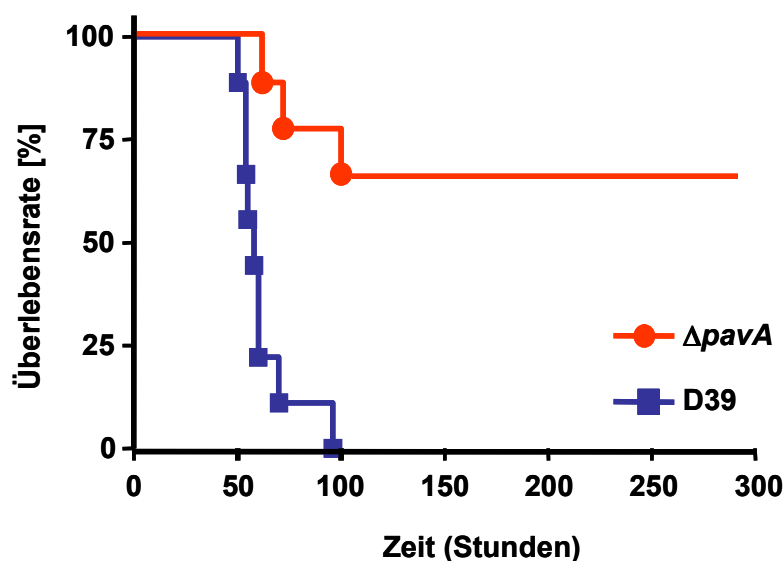


Abbildung 3: Untersuchung der Überlebensrate nach einer Infektion mit 10^6 CFU *S. pneumoniae* (blau) oder der isogenen *pavA*-Mutante (rot) in den rechten Frontallappen im experimentellen Maus-Meningitis-Modell.

Alle Mäuse, die mit dem Wildtypstamm D39 infiziert worden waren, starben innerhalb von 4 Tagen nach der Infektion. Hingegen lag die Überlebensrate der Mäuse, die mit der *pavA*-Mutante infiziert wurden, bei 67 %. Innerhalb dieser Gruppe starben an der Pneumokokken-Infektion 3 der 9 Tiere. Die überlebenden Mäuse erholten sich von der Infektion und zeigten keine körperliche Beeinträchtigung.

Zur Untersuchung des Einflusses von PavA auf die körperliche Beeinträchtigung und den Grad einer Hirnhautentzündung nach einer Infektion mit *S. pneumoniae* in dem experimentellen Maus-Meningitis-Modell wurden je Gruppe 6 Tiere mit einer Dosis von 10^4 CFU des Wildtypstamms D39 und der isogenen *pavA*-Mutante intrazerebral infiziert. Die Mäuse wurden nach 12, 24 und 36 Stunden einem sogenannten „Drahtseiltest“ unterzogen. Dabei wurde das Koordinationsvermögen der Tiere überprüft, indem sie über ein Seil ein Podest erreichen sollten. Die dafür benötigte Zeit wurde nach definierten Vorgaben in einer Punktzahl dargestellt. Je kleiner die Punktzahl, desto schneller erreichte die Maus das Podest und desto geringer war die durch eine Hirnhautentzündung hervorgerufene körperliche Beeinträchtigung. Es zeigte sich, dass Mäuse, die mit der *pavA*-Mutante infiziert waren, signifikant weniger Zeit zum Erreichen des Podests benötigten als die Kontrollgruppe, die den Wildtypstamm injiziert bekamen. Der Median lag hier bei 2 ($Q_{.25} = 1$ und $Q_{.75} = 3,5$). Die Werte von Mäusen, die mit dem Wildtypstamm D39 infiziert waren, stiegen im Median auf 12 ($Q_{.25} = 2,5$ und $Q_{.75} = 20$). Im Vergleich zeigten Mäuse mit einer Pneumokokken-Infektion, hervorgerufen von einem Stamm mit inaktiviertem *pavA*-Gen, geringere körperliche Beeinträchtigungen als die mit dem Wildtypstamm infizierte Kontrollgruppe.

Nach einer Infektionszeit von 36 Stunden wurden alle Tiere getötet, die Hirnrinde der Gehirnhälften präpariert und fixiert. Für die Untersuchung der bakteriellen Last wurde Blut, Milz und das Kleinhirn entnommen. Die Organe wurden homogenisiert und in Verdünnungsreihen auf Blutagarplatten ausgestrichen. In Mäusen, die mit *S. pneumoniae* D39 infiziert wurden, konnten im Blut und im Kleinhirn je $\lg 6,5 \pm 0,6$ CFU und in der Milz $\lg 6,4 \pm 1$ CFU festgestellt werden. Die isogene *pavA*-Mutante zeigte hingegen kein Wachstum in den Mäusen. In keinem der Tiere konnten Pneumokokken mit einer Nachweisgrenze von 100 CFU detektiert werden.

Zur Analyse des Ausmaßes der Hirnhautentzündung wurden Gewebeschnitte der Hirnrinde angefertigt und nach einer Hämatoxylin-Eosin Färbung untersucht. Es wurde mikroskopisch die Anzahl an Granulozyten, die bei einer Hirnhautentzündung in das Gewebe einwandern, durch Auszählen bestimmt. Die Anzahl der Granulozyten wurde anschließend per Definition in eine Punktzahl von 0 bis 3 umgewandelt. Die Punktzahl 1 wurde vergeben, wenn die Zahl an Granulozyten < 10 war und die Punktzahl 3 entsprach dabei mehr als 50 Granulozyten pro Gesichtsfeld. Waren es zwischen 10 und 50 Granulozyten je Gesichtsfeld bei einer 40-fachen Vergrößerung, so wurde die Punktzahl mit 2 definiert. Es wurden die Bereiche der

stirnseitigen Region zwischen den Hirnhemisphären, der Hippocampuspalte von beiden Seiten, von drei Oberflächenregionen im Bereich der Wölbung der Hirnhemisphären und des dritten Ventrikels untersucht. Die Punktzahlen der einzelnen Regionen wurden addiert.

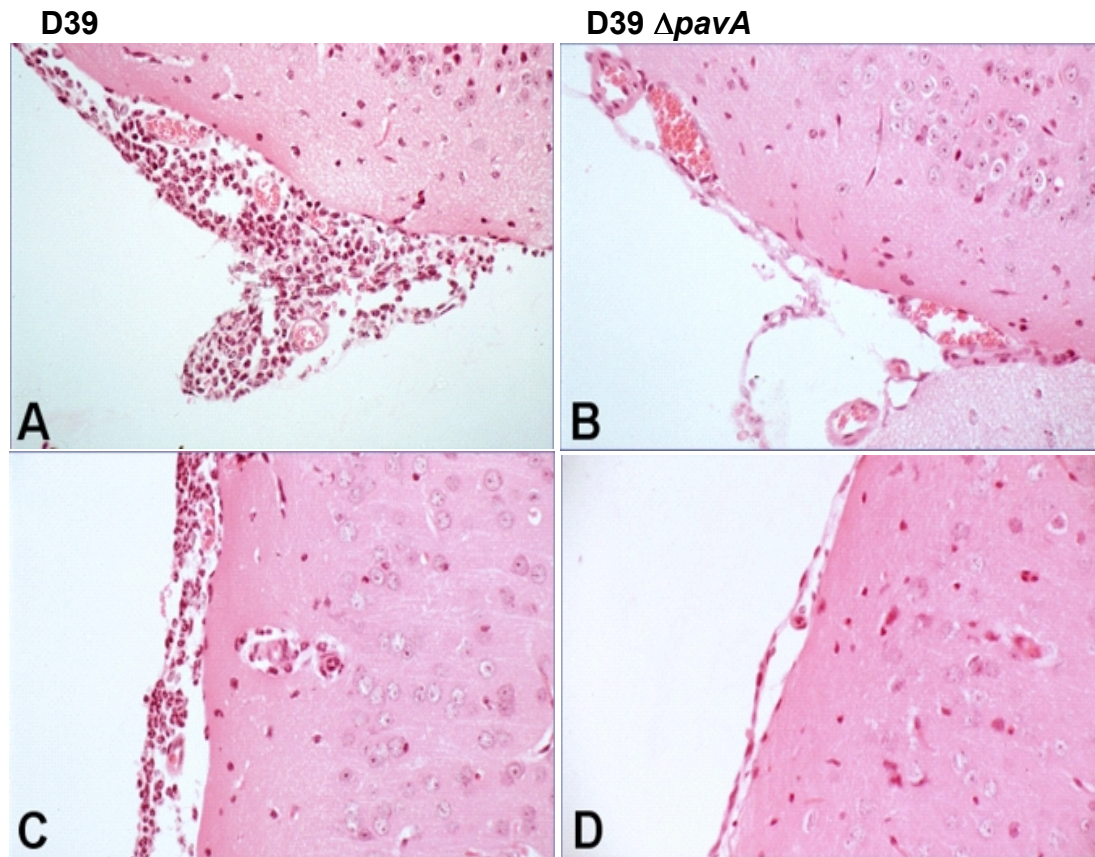


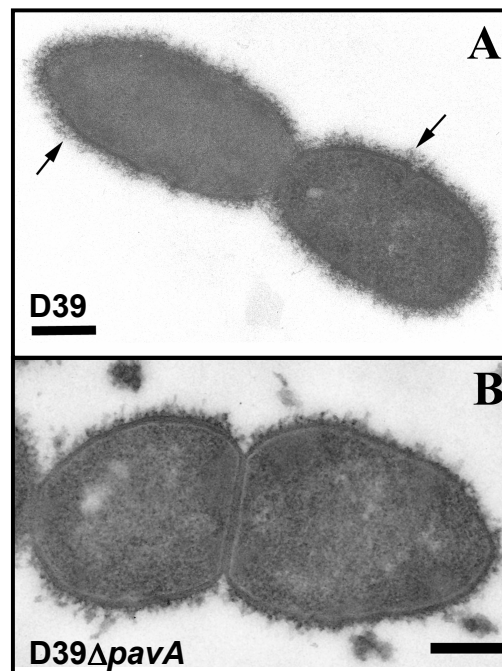
Abbildung 4: Gewebeschnitte der Hirnrinde von Mäusen nach der intrazerebralen Infektion mit *S. pneumoniae* D39 (A und C) oder der isogenen *pavA*-Mutante (B und D). Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung macht die Einwanderung der Granulozyten in die verschiedenen Regionen des Hirns sichtbar.
A und B: Interhämischäre Region
C und D: superficiale neocorticale Hirnhautregion

Die gefärbten Gewebeschnitte der Hirnrinde (Abbildung 4) zeigten, dass es nach der intrazerebralen Infektion mit Pneumokokken zu einem Eindringen von Granulozyten in verschiedene Regionen des Hirns kam. Die quantitative Auswertung der eingewanderten Granulozyten ergab einen Median von 11 ($Q_{.25} = 5,5$ und $Q_{.75} = 12$) nach der Infektion mit dem Wildtypstamm D39. Das Ausmaß der Hirnhautentzündung gemessen an der Infiltration von Granulozyten war für die Infektion mit der *pavA*-Mutante mit einem Median von 1,5 ($Q_{.25} = 1$ und $Q_{.75} = 2,5$) signifikant kleiner. Der Grad der Hirnhautentzündung hervorgerufen durch eine Infektion mit *S. pneumoniae* D39 ist also signifikant größer als durch eine intrazerebrale Infektion mit der isogenen *pavA*-Mutante.

Zusammenfassend zeigten Pneumokokken mit einem inaktivierten *pavA*-Gen eine signifikant geringere Virulenz in dem untersuchten Maus-Menigitis-Modell als der Wildtypstamm.

4.1.2. Morphologischer Vergleich von *S. pneumoniae* und der isogenen *pavA*-Mutante durch Transmissions-Elektronenmikroskopie

Zur Darstellung morphologischer Eigenschaften und zellulärer Strukturen von *S. pneumoniae* D39 und der entsprechenden *pavA*-Mutante wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Die Analyse der Ultradünnschnitte in der Transmissions-elektronenmikroskopie zeigte keine Veränderung der zellulären Morphologie, der subzellulären Strukturen oder der Kapselexpression der im Mausmodell attenuierten *pavA*-Mutante im Vergleich zu dem Wildtypstamm (Abbildung 5).



M. Rohde, HZI

Abbildung 5: Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung der Zellmorphologie von *S. pneumoniae* D39 (A) und der isogenen *pavA*-Mutante (B). Die Pfeile markieren die dehydrierten Bestandteile der Bakterien. Die Ultradünnschnitte zeigen keine signifikanten Unterschiede der Zellmorphologie und der Kapselexpression der *pavA*-Mutante verglichen mit dem Wildtypstamm. Der Balken entspricht 0,25 μm .

4.1.3. Einfluss von PavA auf die Adhärenz und Invasion von *S. pneumoniae* an bzw. in humane Wirtszellen

Das auf der Oberfläche lokalisierte Protein PavA von *S. pneumoniae* wurde als wichtiger Virulenzfaktor der Bakterien in einem Maus-Sepsis-Modell und dem experimentellen Maus-Meningitis-Modell identifiziert, da die Virulenz der *pavA*-Mutante im Vergleich zu der der Wildtyperreger stark reduziert war. In weiteren Studien sollte der Einfluss von PavA auf die ersten Schritte während des Infektionsprozesses untersucht werden. Dazu wurden Infektionsversuche mit zwei unterschiedlichen Pneumokokkenstämmen und den jeweiligen

isogenen *pavA*-Mutanten durchgeführt und die Adhärenz an und die Invasion in verschiedene humane Epithel- und Endothelzelllinien analysiert. Für die Infektionsexperimente wurden der bekapselte Stamm *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 35A (NCTC 10319) und der unbekapselte Stamm R800 sowie die entsprechenden *pavA*-negativen-Mutanten eingesetzt. In dem Serotyp 35A-Stamm und der isogenen *pavA*-Mutante wurde zusätzlich das für Pneumolysin kodierende Gen (*ply*) zerstört, um die durch Pneumolysin hervorgerufenen Zellschädigungen zu verhindern, die bei Infektionen von bis zu 4 Stunden Dauer auftreten können. Die Inaktivierung des *ply*-Gens hatte keine Auswirkung auf das Adhärenz- und Invasionsverhalten des Serotyp 35A-Stammes und der entsprechenden *pavA*-Mutante verglichen mit den jeweiligen Pneumolysin-positiven Stämmen. Der *S. pneumoniae* Stamm Typ 35A Δ *ply* wird im folgenden als Wildtyp in Bezug auf die Doppelmutante *S. p.* Typ 35A Δ *pavA* Δ *ply* bezeichnet.

Für die Studie des Einflusses von PavA auf die Adhärenz und Invasion von Pneumokokken wurden Zelllinien verwendet, die von unterschiedlichen humanen für den Infektionsprozess relevanten Geweben stammten. So wurde die alveoläre Lungenepithelzelllinie A549 aus Typ II Pneumozyten (ATCC CCL-185), die epitheliale Larynxkarzinom-Zelllinie HEp-2 (ATCC CCL-23), die primären Nabelschnurzellen HUVEC und die Hirnendothelzelllinie HBMEC, die als Modell für die Blut-Hirn-Schranke gilt, verwendet. Die Zellen wurden für 4 Stunden mit den Pneumokokkenstämmen infiziert. Zur Bestimmung der Anzahl adhärenter und invasiver Bakterien wurde anschließend eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Dabei wurden invasive Pneumokokken mit dem Fluorochrom Alexa 568 und adhärenente Bakterien zusätzlich mit dem Fluorochrom Alexa 488 markiert. Adhärenente Pneumokokken erschienen in der Fluoreszenzmikroskopie durch Überlagerung der beiden Farbstoffe mit einem entsprechenden Filter gelb, und invasive Bakterien leuchteten als rote Kokken. Die Anzahl adhärenter und invasiver Bakterien wurde mikroskopisch durch Auszählen von 50 Zellen bestimmt.

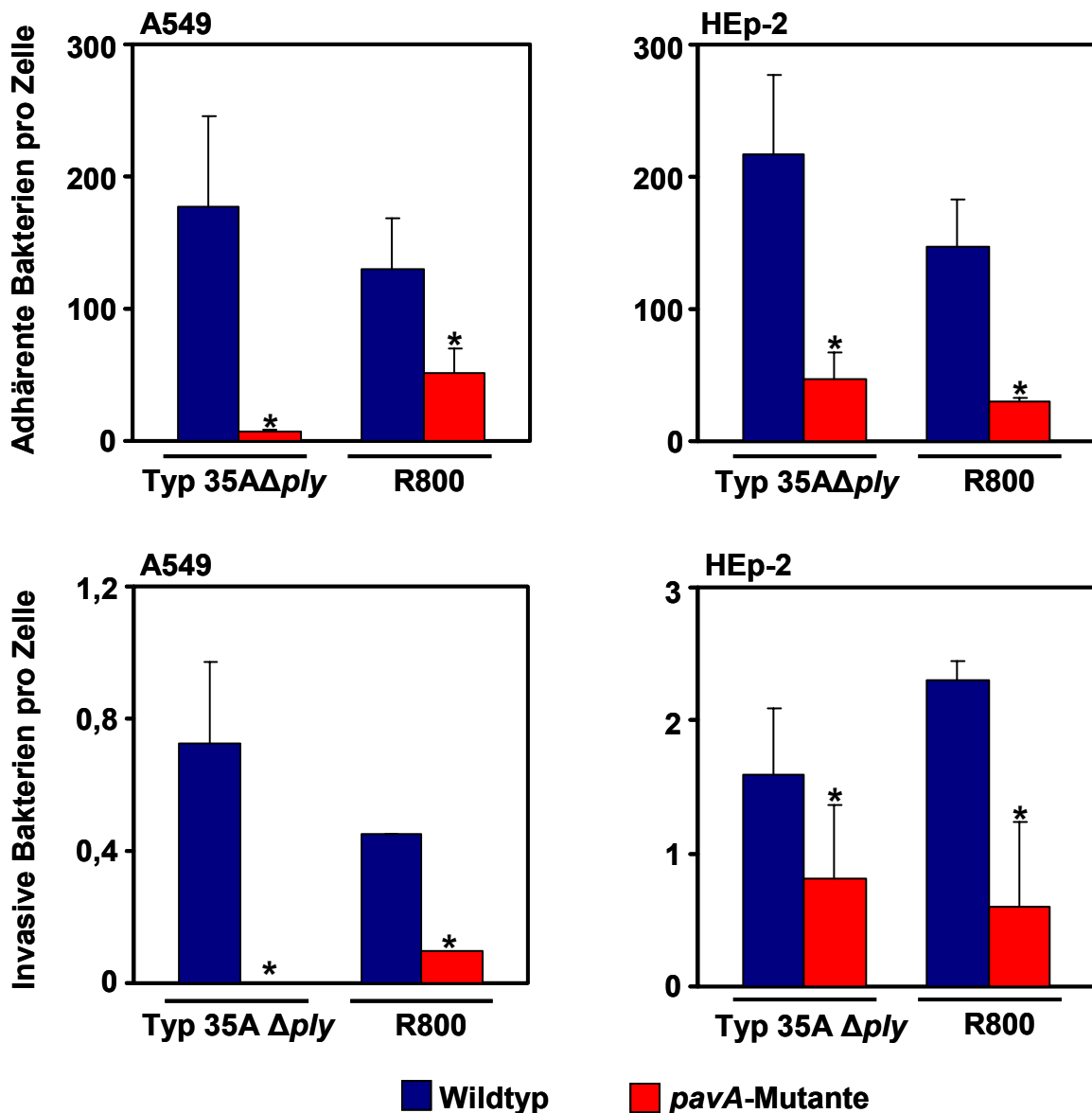


Abbildung 6: Einfluss von PavA auf die Infektion von humanen Epithelzellen. Gezeigt ist die Adhärenz an und die Invasion von *S. pneumoniae* Wildtyp Serotyp 35A Δ ply bzw. R800 (blau) und den isogenen *pavA*-Mutanten (rot) in humane alveoläre Lungeneithelzellen A549 und humane Larynxkarzinomzellen HEp-2 durch Auszählen nach einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung. * entspricht $P < 0,02$

Sowohl die Adhärenz an als auch die Invasion der *pavA*-defizienten Mutanten in die Epithelzelllinien A549 und HEp-2 zeigten eine signifikante Reduktion im Vergleich zu den Wildtypstämmen (Abbildung 6). Im Mittel konnte für *S. p.* Typ 35A Δ ply eine Adhärenz von $176,5 \pm 69,7$ Bakterien je Zelle der Linie A549 beobachtet werden. Im Vergleich adhärenzte die isogene *pavA*-Mutante mit $6,8 \pm 1,7$ Bakterien pro Zelle. Parallel wurden für den Stamm R800 im Durchschnitt $129,9 \pm 38,4$ und für die isogene Mutante $52,1 \pm 18,3$ Bakterien pro Zelle gezählt. Damit war bei A549-Zellen die Adhärenz der *pavA*-Mutante des Serotyp 35A Δ ply-Stammes um 96 % und die der *pavA*-defizienten Mutante von R800 um 60 % reduziert. Die Adhärenz der *pavA*-defizienten Mutanten des bekapselten als auch des

unbekapselten Pneumokokkenstammes war für HEp-2-Zellen um je ca. 80 % abgeschwächt. Die Adhärenz von *S. p.* Typ 35A Δ *ply* an HEp-2-Zellen lag bei $217,5 \pm 60,3$ Bakterien pro Zelle, die Anheftung des entsprechenden *pavA*-defizienten Stammes bei $46,5 \pm 20$ Bakterien je Zelle. Für *S. pneumoniae* R800 wurde eine Adhärenz je HEp-2-Zelle von $146,7 \pm 35,6$ Bakterien und für R800 Δ *pavA* $29,8 \pm 2,8$ Bakterien beobachtet.

Die *pavA*-Mutante des Serotyp 35A Δ *ply*-Stammes zeigte keine Invasion in A549-Zellen und im Vergleich zu dem Wildtyp ein um 50 % verringertes Eindringen in HEp-2-Zellen. In A549- bzw. HEp-2-Zellen wurden je Zelle durchschnittlich $0,73 \pm 0,25$ bzw. $1,6 \pm 0,5$ Bakterien des Stammes *S. p.* Typ 35A Δ *ply* aufgenommen. Die Internalisierungsrate der isogenen *pavA*-Mutante lag für HEp-2-Zellen bei $0,81 \pm 0,56$ Bakterien pro Zelle. Bakterien des unbekapselten Stammes R800 drangen mit 0,45 Kokken in A549- bzw. mit $2,3 \pm 0,14$ Bakterien in HEp-2-Zellen ein. Die Zahl internalisierter Bakterien der entsprechenden *pavA*-Mutante sank in A549-Zellen auf 0,1 und in HEp-2-Zellen auf $0,6 \pm 0,6$ Bakterien pro Zelle. Die Internalisierung von R800 Δ *pavA* in A549-Zellen war folglich um 78 % und in HEp-2-Zellen um 74 % vermindert.

Ähnliche Ergebnisse ergaben sich für die Infektion humaner Endothelzellen mit bekapselten und unbekapselten Pneumokokken und deren isogenen *pavA*-Mutanten (Abbildung 7).

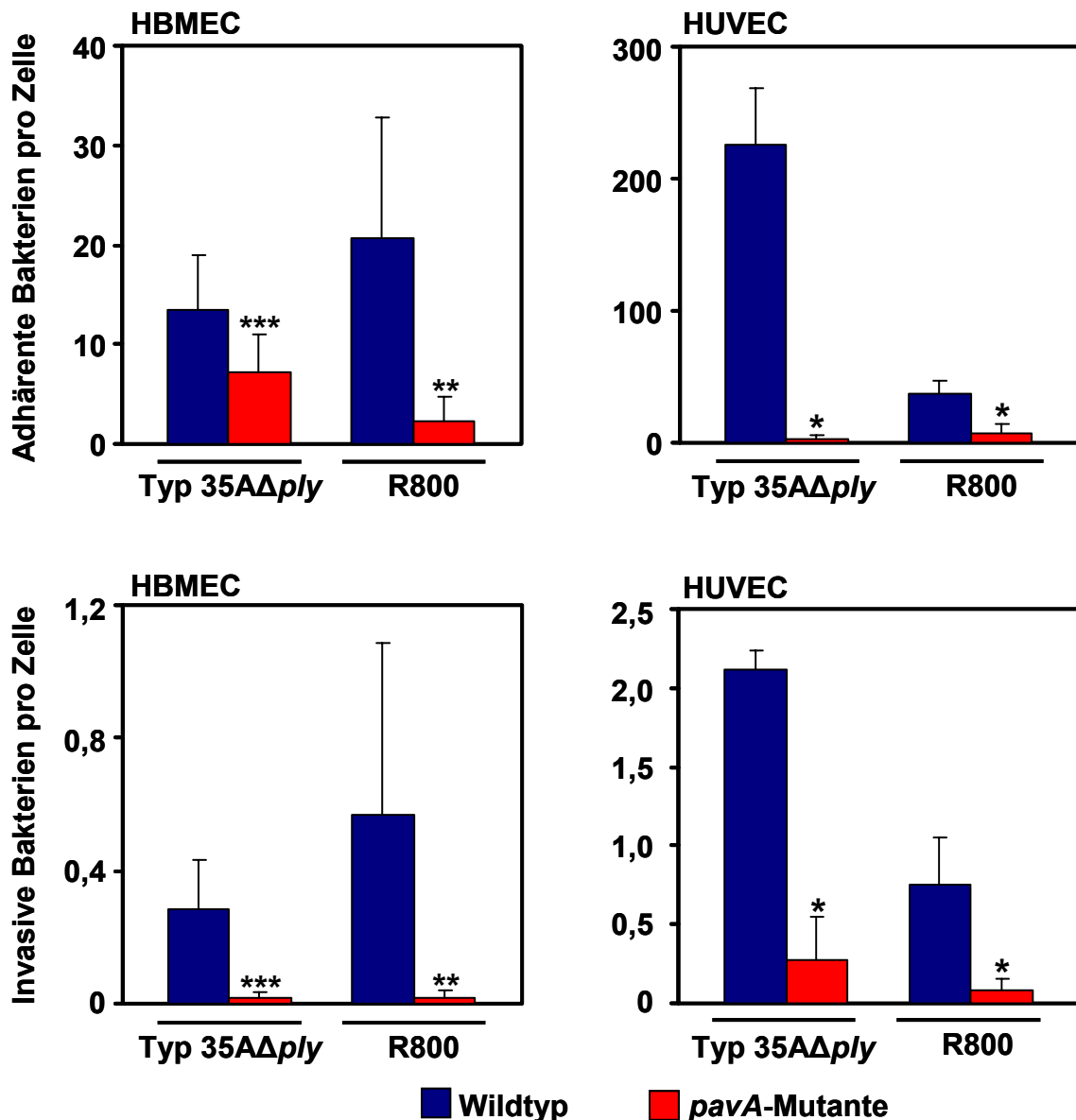


Abbildung 7: Rolle von PavA auf die Infektion von humanen Endothelzellen. Die Zahlen für die Adhärenz an und die Invasion von *S. pneumoniae* Wildtyp Serotyp 35AΔply bzw. R800 (blau) und den isogenen *pavA*-Mutanten (rot) in humane Hirnendothelzellen HBMEC und primäre humane Nabelschnurothelzellen HUVEC resultieren aus dem Auszählen der mit Fluorochromen gefärbten Bakterien im Mikroskop. * $P < 0,003$; ** $P < 0,03$; *** $P < 0,085$

Es zeigte sich, dass die Adhärenz von *S. pneumoniae* Typ 35AΔpavA an HBMEC um die Hälfte und an HUVEC um 98 % im Vergleich zu dem parentalen Stamm reduziert war. Es adhärten $13,6 \pm 5,4$ Bakterien des Serotyp 35AΔply-Stammes und $7,2 \pm 3,5$ Bakterien mit inaktivem PavA pro HBMEC-Zelle. Für die Adhärenz an HUVEC ergab sich für den Wildtyp eine Zahl von $225,2 \pm 43,7$ und für die *pavA*-Mutante von $3,3 \pm 2,5$ Bakterien je Zelle. Die Internalisierung dieser Mutante war mit 0,02 Bakterien pro HBMEC-Zelle um 93 % und mit 0,3 Bakterien je HUVEC-Zelle um 87 % in Relation zu dem Wildtyp verringert. Die Invasionsrate lag für *S. p.* Typ 35AΔply bei $0,3 \pm 0,15$ Bakterien pro HBMEC-Zelle und bei $2,1 \pm 0,1$ Kokken je HUVEC-Zelle.

S. pneumoniae R800 adhärte mit $20,6 \pm 12,2$ Bakterien pro Zelle an HBMEC und mit $37,2 \pm 10,3$ Bakterien je Zelle an HUVEC. Für die *pavA*-Mutante des unbekapselten Stammes R800 ergab sich mit $2,3 \pm 2,4$ bzw. $7,3 \pm 6,4$ Bakterien pro Zelle eine um 89 % bzw. 80 % reduzierte Adhärenz an HBMEC bzw. HUVEC im Vergleich mit dem Wildtyp. Die Invasionsrate sank für R800 Δ *pavA* auf 3,5 % in HBMEC- bzw. 10,5 % in HUVEC-Zellen in Relation zu der Invasion von R800 in die jeweiligen Zellen. Die absoluten Zahlen für die Invasion lagen für R800 bei $0,6 \pm 0,5$ Bakterien je HBMEC-Zelle bzw. $0,8 \pm 0,3$ Bakterien je HUVEC-Zelle und für die isogene *pavA*-Mutante bei $0,02 \pm 0,02$ Bakterien je HBMEC-Zelle und $0,1 \pm 0,07$ Kokken pro HUVEC-Zelle.

Insgesamt wurde für die untersuchten Epithelzelllinien des Respirationstraktes, die humanen Nabelschnurendothelzellen und die Hirndothelzelllinie als Modell der Blut-Hirn-Schranke eine signifikante Reduktion sowohl der Adhärenz als auch der Internalisierung von Pneumokokken mit inaktiviertem PavA gemessen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Infektion von A549-, HEP-2-, HUVEC- und HBMEC-Zellen mit *S. pneumoniae* Serotyp 35A Δ *ply* und der isogenen *pavA*-Mutante zeigen den Unterschied in der Adhärenz und der Invasion (Abbildung 8). Die Bakterien wurden nach der Infektion mit zwei unterschiedlichen Fluorochromen gefärbt, so dass adhärente Pneumokokken in gelb und invasive Bakterien in rot erscheinen. An den mit der *pavA*-Mutante infizierten Zellen adhärten keine bzw. kaum Bakterien. Wurden die Zellen mit dem Wildtyp infiziert, so zeigten die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen adhärrierende und internalisierte Pneumokokken.

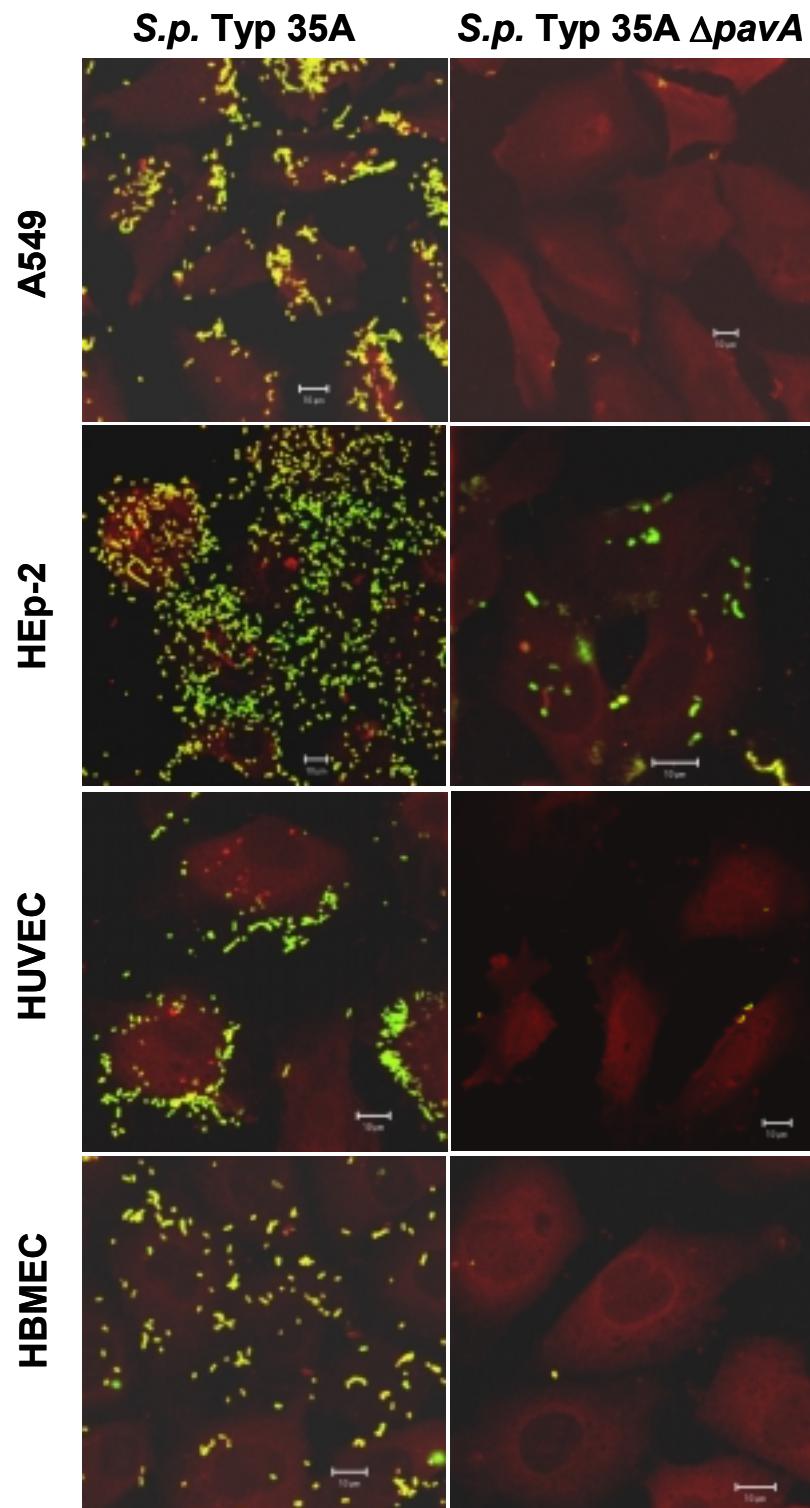


Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Infektion von humanen Epithel- und Endothelzellen.

Gezeigt ist die Adhärenz an und die Invasion von *S. pneumoniae* Typ 35A Δply (NCTC 10319) und der isogenen *pavA*-Mutante in die humanen Epithelzelllinien A549 und HEp-2 und die humanen Endothelzelllinien HUVEC und HBMEC. Adhärenzte Pneumokokken erscheinen gelb und invasive Bakterien leuchten rot. Die Bilder der Infektionen mit dem Wildtypstamm sind auf der linken Seite und die mit der isogenen *pavA*-Mutante auf der rechten Seite angeordnet.

Zur weiteren Untersuchung, ob die signifikante Reduktion der Adhärenz und Invasion von *pavA*-defizienten Pneumokokken tatsächlich auf die Inaktivierung des *pavA*-Gens zurückzuführen ist, wurde der Stamm *S. p.* Typ 35A Δ *pavA* mit dem Plasmid pJDC9::*pavA*⁺ komplementiert, welches das vollständige *pavA*-Gen enthielt. Dazu wurde das *pavA*-Gen mit Promotorbereich aus der chromosomalen DNA des Stammes *S. p.* Typ 35A mit dem Primerpaar PavApRMGE 1 und 2 amplifiziert, in den pGEM-T-easy-Vektor subkloniert und das Fragment nach der Sequenzüberprüfung mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* herausgeschnitten. Das *pavA*-Gen inklusive Promotorbereich wurde anschließend in den mit *EcoRI* und *HindIII* behandelten pJDC9-Vektor ligiert. Als Kontrolle wurde der Wildtyp *S. p.* Typ 35A ebenfalls mit diesem Konstrukt pJDC9::*pavA*⁺ transformiert. Die Epithelzelllinie HEp-2 wurde mit den unterschiedlichen Pneumokokkenstämmen des Serotyps 35A für 4 Stunden infiziert und die Zahl adhärenter Bakterien nach der Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt (Abbildung 9).

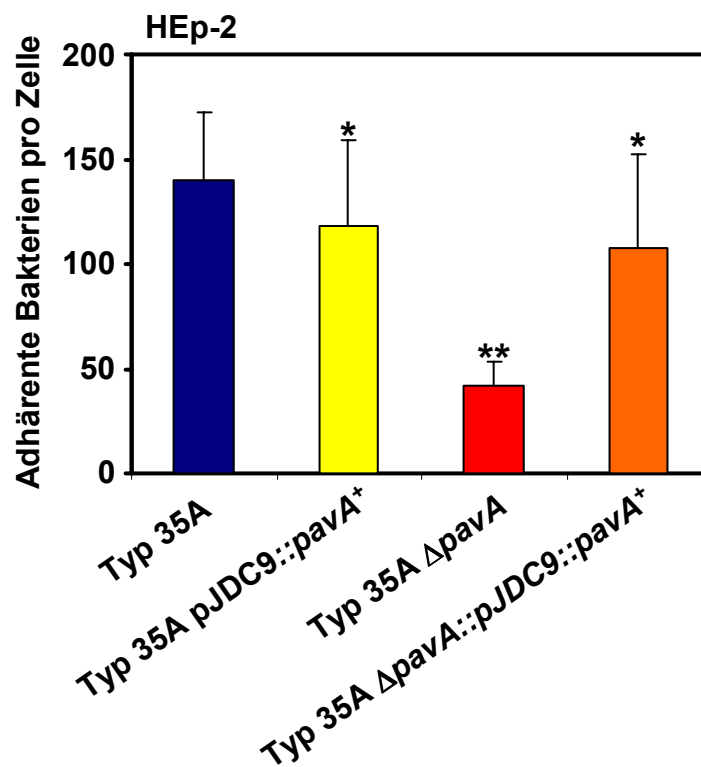


Abbildung 9: Adhärenz der komplementierten *pavA*-Mutante an die humane Epithelzelllinie HEp-2. Die Zellen wurden mit dem Stamm *S. p.* Typ 35A (NCTC 10319) (blau), *S. p.* Typ 35A pJDC9::*pavA*⁺ (gelb), *S. p.* Typ 35A Δ *pavA* (rot) und der komplementierten *pavA*-Mutante *S. p.* Typ 35A Δ *pavA*::pJDC9::*pavA*⁺ (orange) für 4 Stunden infiziert. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch nach der Immunfluoreszenzfärbung durch Auszählen von mindestens 30 Zellen.
* $P > 0,3$; ** $P < 0,05$

Die Adhärenz der *PavA* defizienten Mutante an HEp-2-Zellen lag in diesen Versuchen bei $41,7 \pm 11,3$ Bakterien pro Zelle und war damit um 70 % reduziert im Vergleich zu dem Wildtyp, der durchschnittlich mit $140,1 \pm 31,9$ Bakterien je Zelle adhärierte (Abbildung 9). Durch das Einbringen des kompletten *pavA*-Gens mittels Transformation des Plasmids

pJDC9::*pavA*⁺ in die *pavA*-Mutante des Serotyp 35A konnte diese signifikante Verminderung der Adhärenz aufgehoben werden. Die komplementierte *pavA*-Mutante zeigte mit $107,8 \pm 44,4$ adhärenenten Bakterien pro Zelle ebenso wie der mit dem Plasmid pJDC9::*pavA*⁺ transformierte Wildtyp mit $118,1 \pm 40,7$ Bakterien je Zelle kein signifikant verändertes Adhärenzverhalten in Relation zu *S. p.* Typ 35A. Damit beruht die verminderte Adhärenz der *pavA*-defizienten Pneumokokken auf der Inaktivierung des *pavA*-Gens, da die Einführung des kompletten *pavA*-Gens die Adhärenzrate auf nahezu die des Wildtyps wiederherstellte.

Für eine weitere Analyse der Invasionsrate von *pavA*-defizienten Pneumokokken wurden Antibiotika-Schutz-Experimente durchgeführt. Die Epithelzellen A549 und HEp-2 wurden ebenso wie die Endothelzellen HUVEC und HBMEC mit *S. pneumoniae* Typ 35A und der isogenen *pavA*-Mutante für 4 Stunden infiziert. Im Anschluss wurden extrazelluläre Bakterien durch die Zugabe von Gentamicin und Penicillin G abgetötet. Internalisierte Bakterien wurden durch Lyse der Zellen freigesetzt und auf Blutagarplatten in entsprechender Verdünnung ausplattiert. Die Zahl invasiver Wildtyp-Pneumokokken wurde als 100 % definiert und die Anzahl intrazellulärer Bakterien mit deletiertem *pavA*-Gen in Relation dazu gesetzt (Abbildung 10).

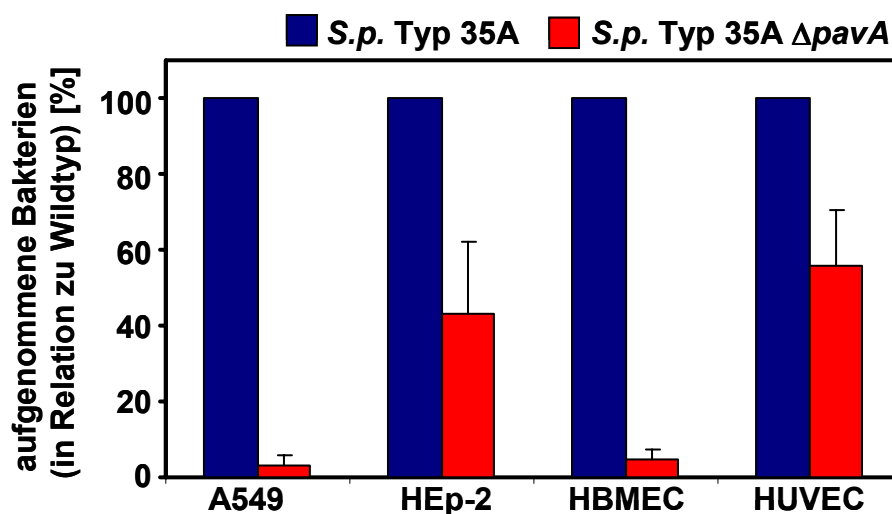


Abbildung 10: Invasion von *Streptococcus pneumoniae* in humane Epithel- und Endothelzellen. In einem Antibiotika-Schutz-Experiment wurden die Epithelzellen des Respirationstraktes A549 und HEp-2, die Hirnendothelzellen HBMEC und die Nabelschnurendothelzellen HUVEC mit *S. p.* Typ 35A (NCTC 10319) (blau) und der isogenen *pavA*-Mutante *S. p.* Typ 35A Δ *pavA* (rot) infiziert. Die Zahl internalisierter Pneumokokken wurde durch Ausplattieren bestimmt und für den Wildtyp als 100 % gesetzt. Die Invasion der *pavA*-Mutante wurde in Relation dazu angegeben.

Die Invasion von *S. p.* Typ 35A Δ *pavA* in die humanen Zelllinien ist deutlich reduziert im Vergleich zu dem Wildtyp (Abbildung 10). Die relative Zahl aufgenommener Bakterien des Stammes Typ 35A Δ *pavA* in A549- bzw. HEp-2-Zellen lag bei 3,4 % bzw. 43,3 %. In HUVEC-Zellen wurden 55,9 % der *pavA*-Mutante im Vergleich zu dem Wildtyp aufgenommen und in

HBMEC-Zellen 4,8 %. Die erhaltenen Zahlen aus den Antibiotika-Schutz-Experimenten entsprachen den Zahlen, die sich aus der Auswertung der Invasion nach einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung ergaben. Damit konnte eine signifikante Reduktion der Invasion von PavA defizienten Pneumokokken verglichen mit dem Wildtypstamm in die untersuchten Zelllinien gezeigt werden. Diese verminderte Internalisierung war mit Ausnahme der HBMEC-Zellen äquivalent zu der reduzierten Adhärenz der *pavA*-Mutante im Vergleich zu dem parentalen Stamm. Die relative Adhärenz von *S. p.* Typ 35A Δ *pavA* betrug für A549-Zellen 3,8 %, für HEp-2-Zellen 21,4 %, für HUVEC 1,5 % bzw. für HBMEC 53,4 %. Die Untersuchungen zeigten, dass PavA eine wichtige Rolle für die Adhärenz von *S. pneumoniae* an unterschiedliche humane Wirtszellen unabhängig des Wirtszellgewebes spielt. Dies gilt wahrscheinlich nicht für die Invasion, da die verminderte Aufnahme aus der reduzierten Anheftung der Bakterien an die eukaryotischen Zellen resultieren kann.

4.1.4. Untersuchungen zur Rolle von PavA auf die Bindung von Pneumokokken an immobilisiertes Fibronectin

PavA ist auf der Oberfläche von *S. pneumoniae* lokalisiert und bindet an Fibronectin, eine Hauptkomponente der ECM. Weiter wurde in der Studie von Holmes *et al.* gezeigt, dass ein rekombinantes C-terminal verkürztes PavA-Fragment, bezeichnet als PavA42, mit einer molekularen Masse von 42 kDa nicht mehr an Fibronectin bindet. Für die Untersuchung von PavA als potenzielles Adhäsion wurden Antiseren gegen rekombinant hergestellte PavA-Proteine mit einer Gesamtgröße von 63 kDa und das verkürzte Fragment mit einer Größe von 42 kDa produziert. Dazu wurden die für die Proteine kodierenden Gene in einen Expressionsvektor kloniert und mit einer Basensequenz fusioniert, die für einen His₆-tag kodiert. Die Proteine wurden in *E. coli* exprimiert und affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die Proteine wurden anschließend für die Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Die erhaltenen Seren wurden über eine Protein-A-Sepharose aufgereinigt, um spezifische IgG-Antikörper für die folgenden Experimente zu verwenden.

Zunächst wurde der Einfluss von anti-PavA-IgG und anti-PavA42-IgG auf die Bindung von Pneumokokken an immobilisiertes Fibronectin untersucht. Humanes Fibronectin wurde über Nacht mit 2 μ g je Vertiefung in einer MaxiSorp-Platte mit 96 Vertiefungen immobilisiert. *S. pneumoniae* Typ 35A wurde mit dem Fluorochrom FITC konjugiert und je Ansatz mit 0,05 mg, 0,1 mg und 0,2 mg anti-PavA-Antikörper bei 37°C behandelt. Nicht gebundene Antikörper wurden nach der Inkubationszeit von 20 Minuten entfernt. Als Kontrolle wurden jeweils 0,2 mg IgG, aufgereinigt aus Präimmenserum der Kaninchen, verwendet. Je Ansatz und Vertiefung wurden $2,5 \times 10^7$ Pneumokokken eingesetzt. Die Pneumokokken wurden für 1 Stunde mit dem immobilisierten und mit BSA abgesättigtem Fibronectin lichtgeschützt bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die erste Messung im Fluoroskan Ascent bei

485 nm/538 nm. Nicht gebundene Bakterien wurden durch mehrmaliges Waschen entfernt und die zweite Messung angeschlossen. Damit wurde der spezifische Bindungswert berechnet.

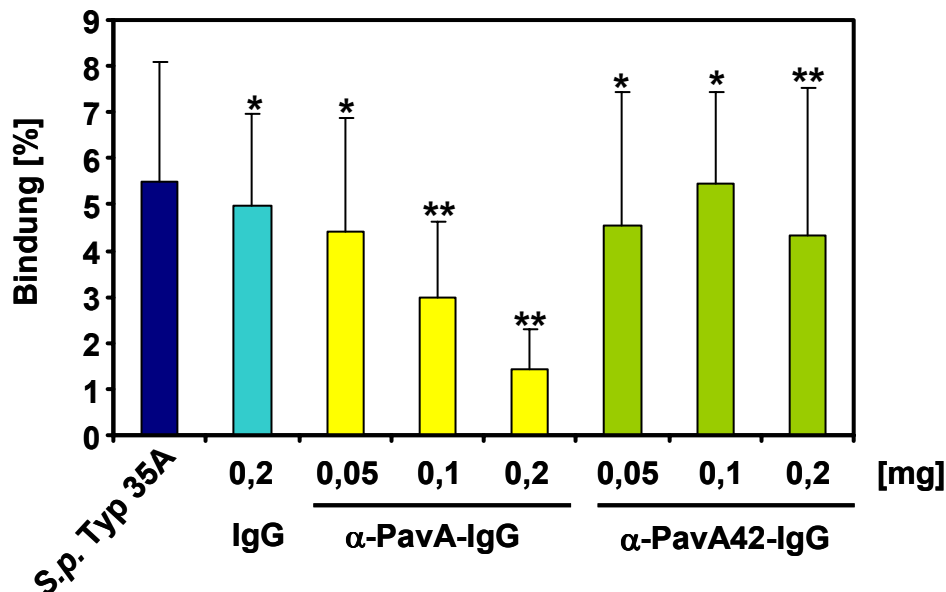


Abbildung 11: Bindung FITC-konjugierter Pneumokokken an immobilisiertes Fibronectin. Das Fluorochrom FITC wurde an *S. p.* Typ 35A gekoppelt. Die Bakterien wurden mit unterschiedlichen Mengen verschiedener anti-PavA-Antiseren inkubiert und auf ihre Bindung an immobilisiertes Fibronectin (2 µg je Vertiefung einer Platte mit 96 Vertiefungen) untersucht. Als Kontrolle wurde *S. p.* Typ 35A unbehandelt (dunkelblau) und mit 0,2 mg IgG aus Präimmenserum inkubiert (türkis) eingesetzt. Weiter wurde der Einfluss von anti-PavA-IgG (gelb) und anti-Pav42-IgG (grün) auf die bakterielle Bindung an immobilisiertes Fibronectin analysiert. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse aus drei Versuchen jeweils in dreifachen Ansätzen durchgeführt.
* $P > 0,17$; ** $P < 0,04$

Die Behandlung von *S. pneumoniae* Typ 35A mit unterschiedlichen Mengen an anti-PavA-Antikörpern führte zu einer signifikanten und konzentrationsabhängigen Abnahme der Bindung an immobilisiertes Fibronectin (Abbildung 11). Die Verwendung von 0,1 mg bzw. 0,2 mg der anti-PavA IgG reduzierte die Bindung der Pneumokokken an Fibronectin um 45 % bzw. 74 % auf $3,0 \pm 1,6$ % bzw. $1,5 \pm 0,9$ % im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle mit $5,5 \pm 2,6$ % Bindung. Hingegen zeigte die Präinkubation der Bakterien mit Antikörpern gerichtet gegen das C-terminal verkürzte PavA-Protein PavA42 keine signifikante Inhibition der Bindung an Fibronectin. Die Bindung ergab sich zu $4,5 \pm 2,9$ %, $5,4 \pm 2$ % bzw. $4,3 \pm 3,2$ % nach Behandlung der Pneumokokken mit 0,05 mg, 0,1 mg bzw. 0,2 mg anti-PavA42-IgG. Gleiches wurde für die Behandlung der Pneumokokken mit 0,2 mg IgG aus Präimmenserum beobachtet (Abbildung 11). Die Bindung lag hier bei 5 ± 2 %. Antikörper, gerichtet gegen das komplette PavA-Protein, blockierten im Gegensatz zu

Antikörpern gegen das PavA42-Fragment signifikant die Bindung von *S. pneumoniae* an immobilisiertes Fibronectin.

4.1.5. Inhibition der Adhärenz an und der Invasion von *S. pneumoniae* in Wirtszellen

Die Bindung von *S. pneumoniae* an immobilisiertes Fibronectin konnte durch die Behandlung der Bakterien mit anti-PavA-IgG reduziert werden. In *in vitro* Experimenten sollte nun der Einfluss von anti-PavA-Antikörpern auf das Adhärenz- an und Invasionsverhalten von Pneumokokken in humane Epithel- und Endothelzellen untersucht werden. *S. pneumoniae* Typ 35A wurde vor der Infektion für 20 min bei 37°C mit einer 1:5 Verdünnung von anti-PavA- bzw. anti-PavA42-IgG inkubiert. Dies entsprach einer Antikörperkonzentration von 0,4 mg/ml. Für jede Infektion der Wirtszellen wurden 1×10^7 Bakterien eingesetzt. Die verwendeten Antikörper sollten dabei an das PavA auf der Oberfläche von *S. pneumoniae* binden und damit die Interaktion von PavA und einem potenziellen Rezeptor auf der Wirtsseite blockieren. Die Bakterien wurden zusammen mit den überschüssigen Antikörpern für die Infektion der Zellen eingesetzt, da sich die Pneumokokken während der Infektionsdauer von 4 Stunden vermehrten und neu gebildetes PavA von den freien Antikörpern gebunden werden konnte. Die Auswertung der Infektionsversuche erfolgte nach der Doppelimmunfluoreszenzfärbung durch Auszählen adhärenter und invasiver Pneumokokken.

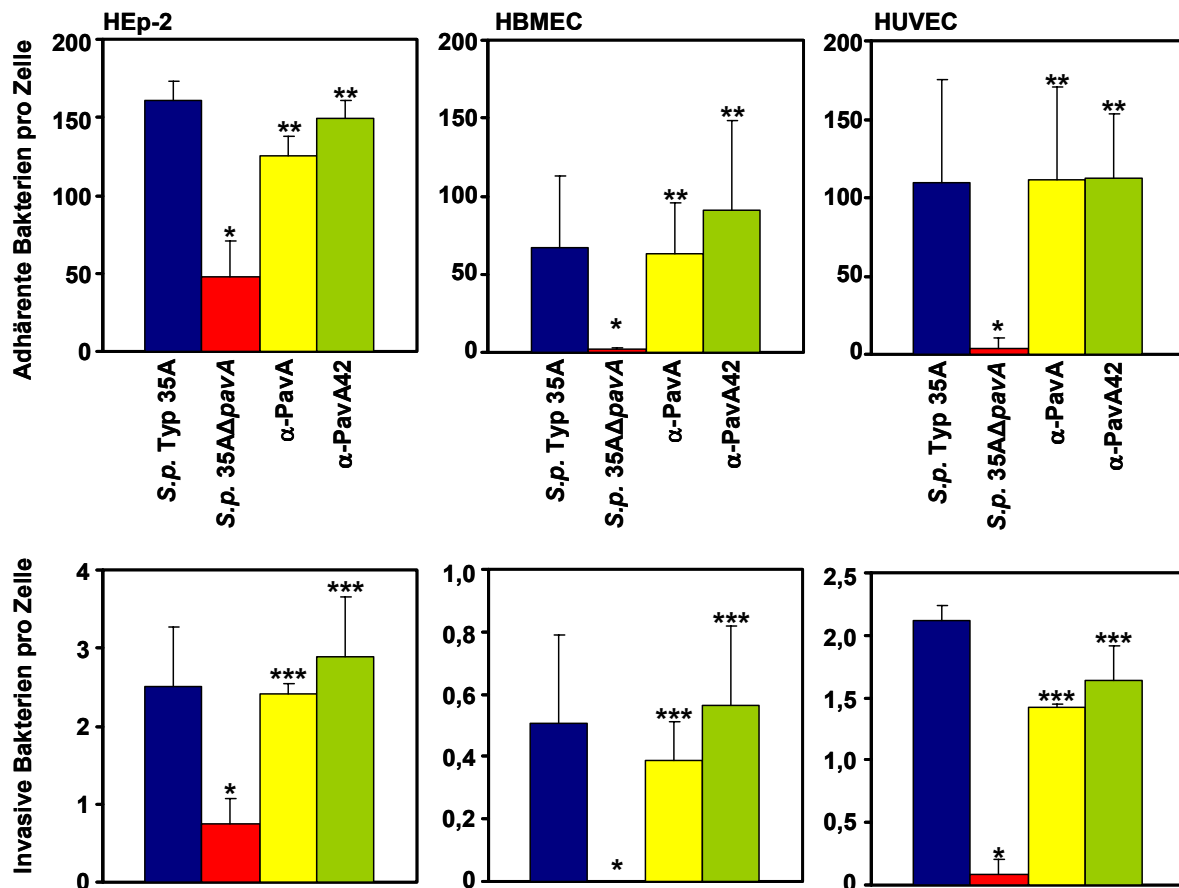


Abbildung 12: Adhärenz an und Invasion von *S. pneumoniae* in Wirtszellen nach Behandlung der Bakterien mit anti-PavA-Antikörpern.

S. p. Typ 35A wurde vor der Infektion mit 40 µg anti-PavA- (gelb) bzw. anti-PavA42-IgG (grün) je 10^7 eingesetzter Bakterien inkubiert. Als Kontrolle wurden die humanen Larynxkarzinomzellen HEp-2, die Hirnendothelzellen HBMEC und die Nabelschnurendothelzellen HUVEC mit *S. p.* Typ 35A (blau) und *S. p.* Typ 35AΔpavA (rot) infiziert. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch nach einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung. * $P < 0,05$; ** $P > 0,13$; *** $P > 0,25$

Die Adhärenz von *S.p.* Typ 35A an HEp-2-, HBMEC- und HUVEC-Zellen ergab Werte von $160,5 \pm 12,5$, $66,9 \pm 46$ bzw. $109,2 \pm 66,2$ Bakterien pro Zelle (Abbildung 12). Insgesamt führte die Inkubation des Wildtypstammes mit anti-PavA-Antikörpern gerichtet gegen das komplette PavA-Protein bzw. das C-terminal verkürzte PavA42-Fragment in den Infektionsversuchen zu keiner signifikanten Reduktion der Adhärenz an oder der Invasion in HEp-2-, HBMEC- oder HUVEC-Zellen (Abbildung 12). Nach der Behandlung der Pneumokokken mit anti-PavA-IgG zeigte sich eine Adhärenz von $125,6 \pm 12,1$, $63,5 \pm 31,2$ bzw. $111,8 \pm 58,5$ Bakterien pro HEp-2-, HBMEC- bzw. HUVEC-Zelle. Die Inkubation der Erreger mit anti-PavA42-IgG resultierte in der Adhärenz von $149,2 \pm 11,9$, $91 \pm 57,8$ bzw. $112,2 \pm 41$ Bakterien pro HEp-2-, HBMEC- bzw. HUVEC-Zelle. Als Kontrolle nahm die Adhärenz der isogenen *pavA*-Mutante mit $48,1 \pm 22,3$, $1,5 \pm 1,4$ bzw. $4,2 \pm 6,6$ Bakterien pro Zelle an die Zelllinien HEp-2, HBMEC bzw. HUVEC im Vergleich zu der Adhärenz des Wildtypstammes signifikant ab, so wie es bereits in den vorhergehenden Experimenten

gezeigt wurde. Die zugesetzten anti-PavA-Antikörper hatten demnach keinen signifikanten Einfluss auf die Adhärenz an und die Invasion der Pneumokokken in die humanen Wirtszellen.

4.1.6. Untersuchungen zum Einfluss von PavA auf die Expression der Virulenzfaktoren PspC und PspA

Die bisherigen Ergebnisse belegen, dass PavA von *S. pneumoniae* einen wichtigen Virulenzfaktor in einem Sepsis-Maus- und in einem Maus-Meningitis-Modell darstellt. Weiter zeigte die *pavA*-Mutante im Vergleich zu dem entsprechenden Wildtyp eine signifikante Reduktion der Adhärenz, die durch eine Komplementation mit einem intakten *pavA*-Gen wiederhergestellt werden konnte. Da in den vorhergegangenen Inhibitionsstudien mit anti-PavA-Antikörpern keine direkte Interaktion von PavA auf der Bakterienoberfläche mit einem Rezeptor auf der Wirtsseite nachgewiesen werden konnte, wurde nun überprüft, ob die Inaktivierung des *pavA*-Gens einen Einfluss auf die Expression anderer bakterieller Faktoren ausübte. Dazu wurde die Expression von *pspC*, *pspA* und *enolase* und auch die Proteinexpression untersucht.

PspC ist ein Adhäsion der Pneumokokken, das an die Ektodomänen des humanen polymeren Immunglobulinrezeptors binden kann und so die Adhärenz an mukosale Epithelzellen vermittelt (Elm *et al.*, 2004). Für die Überprüfung der Expression der mRNA von *pspC* und *pspA* wurde die Gesamt-RNA aus *S. pneumoniae* Typ 35A und der isogenen *pavA*-Mutante isoliert. Es wurden 2 µg der Gesamt-RNA in einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Die Hybridisierung erfolgte mit der jeweiligen DIG-markierten DNA-Sonde unter stringenten Bedingungen. Als Ladungskontrolle wurde die Expression der mRNA der *enolase* mit der entsprechenden DIG-markierten Sonde detektiert (Abbildung 13 A). Die Northern-Blot-Analyse zeigte keine Reduktion der mRNA-Expression *pspC* oder *pspA* in *pavA*-defizienten Pneumokokken. Die Expression von *pspC* und *pspA* scheint sogar in der *pavA*-Mutante höher zu sein als in dem Wildtypstamm. Der Nachweis der Expression der *enolase* ergab, dass vergleichbare Mengen an Gesamt-RNA von Wildtyp und *pavA*-Mutante für den Northern-Blot eingesetzt wurden. Die Transkription von *pspC* und *pspA* wurde demnach nicht durch die Inaktivierung des *pavA*-Gens vermindert. Im nächsten Schritt wurde die Proteinexpression von PspC und PspA in einem Immunblot überprüft. Es wurden Zelllysate von *S. pneumoniae* Typ 35A und der isogenen *pavA*-Mutante hergestellt und in einem 12 % SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und mit anti-PspC- oder anti-PspA-Antiserum auf die Produktion von PspC bzw. PspA untersucht. Als Ladungskontrolle wurde die Expression des Glykolyse-Enzyms Enolase mit einem anti-Enolase-Antiserum nachgewiesen.

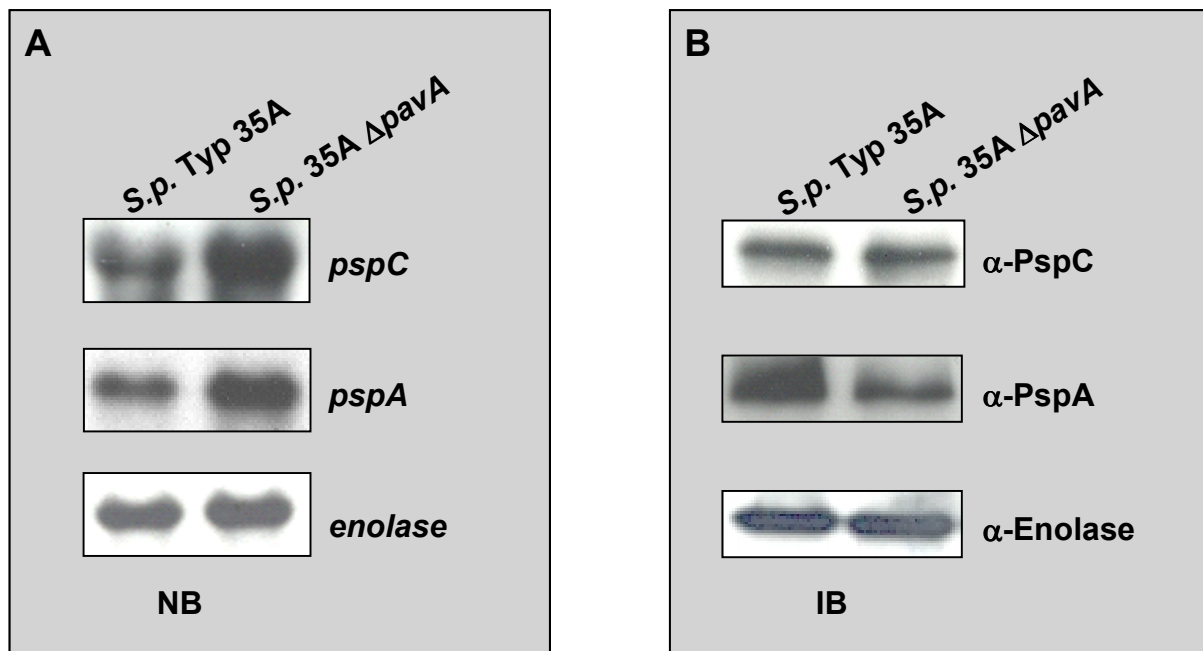


Abbildung 13: Detektion der Expression der Virulenzfaktoren PspC und PspA auf Transkriptions- (A) und Proteinebene (B) in *S. pneumoniae* Typ 35A und der isogenen *pavA*-Mutante.

A) Detektion der Expression der mRNA von *pspC* und *pspA* im Northern-Blot. Die Expression der mRNA von *eno* wurde als Ladungskontrolle durchgeführt. Es wurden 2 μ g der Gesamt-RNA eingesetzt und die Expression der mRNA mit spezifischen DIG-markierten PCR-DNA-Sonden der Gene *pspC*, *pspA* und *eno* nachgewiesen.

B) Überprüfung der Proteinexpression von PspC und PspA in Zelllysaten von *S. pneumoniae* Typ 35A und der isogenen *pavA*-Mutante unter Verwendung von anti-PspC- und anti-PspA-Antisera im Immunblot. Als Kontrolle wurde die Expression der Enolase mit einem anti-Enolase-Antiserum detektiert.

Die Analyse der Proteinexpression von PspC und PspA im Immunblot ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtypstamm und der *pavA*-Mutante (Abbildung 13 B). Der Nachweis der Enolase zeigte, dass vergleichbare Mengen an Gesamtprotein aus den Pneumokokkenstämmen für die Immunblots eingesetzt wurden. Damit konnte eine erhöhte Expression der mRNA von *pspC* und *pspA* nachgewiesen werden, die Produktion der Proteine PspC und PspA in der *pavA*-Mutante verglichen mit *S. p.* Typ 35A zeigte keine signifikanten Unterschiede.

4.1.7. Einfluss von PavA auf die Bindung von sekretorischem IgA an Pneumokokken

Das Adhäsins PspC von *S. pneumoniae* bindet nicht nur an die sekretorische Komponente des humanen polymeren Immunglobulinrezeptors, sondern vermittelt auch die Bindung an sekretorisches Immunglobulin A (SIgA) (Hammerschmidt *et al.*, 1997). In dem folgenden Experiment wurde die Fähigkeit der SIgA-Bindung des *pavA*-defizienten Stammes im Vergleich zu *S. p.* Typ 35A überprüft. Als Kontrolle wurde die isogene *pspC*-Mutante verwendet. SIgA wurde mit dem Fluorochrom FITC gekoppelt und in unterschiedlichen

Mengen mit den jeweiligen Pneumokokkenstämmen inkubiert. Pro Ansatz wurden 1×10^7 Bakterien für 20 min bei 37°C mit $1 \mu\text{g}$, $2,5 \mu\text{g}$ bzw. $5 \mu\text{g}$ FITC-konjugiertem SIgA inkubiert. Nicht gebundenes Protein wurde durch Waschen entfernt und die Bindung in der Durchflusszytometrie bestimmt.

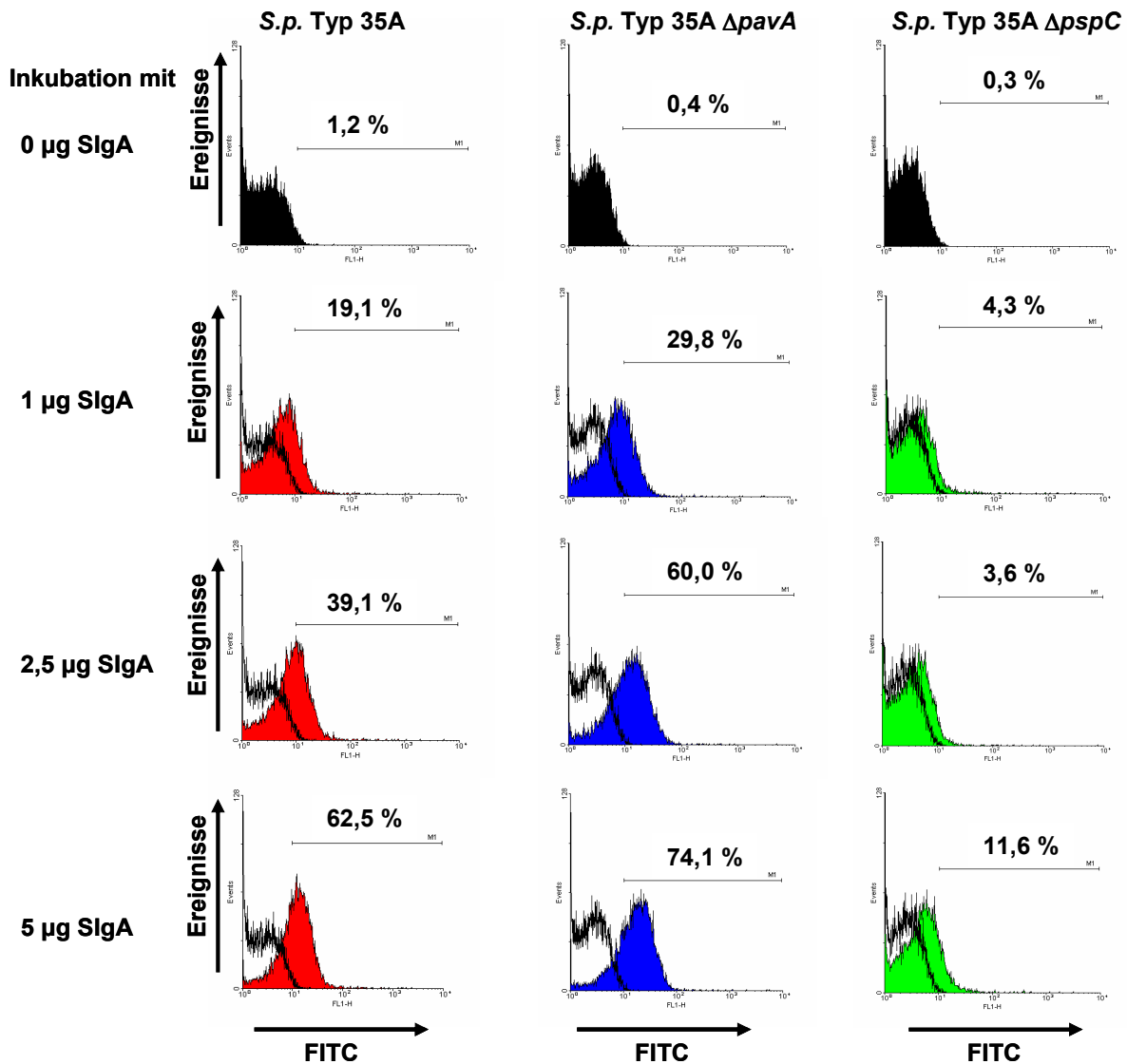


Abbildung 14: Bindung von sekretorischem IgA (SIgA) an Pneumokokken. FITC-konjugiertes SIgA wurde in verschiedenen Mengen mit dem Wildtyp Serotyp 35A (rot) und der isogenen *pavA*-Mutante (blau) inkubiert. Als Kontrolle wurde die entsprechende *pspC*-Mutante (grün) eingesetzt. Die Bindung von FITC-SIgA wurde in der Durchflusszytometrie analysiert.

Bei der Auswertung der im FACS Calibur erhaltenen Daten aus der Durchflusszytometrie wurde der Bereich betrachtet, der die untersuchten Pneumokokken enthielt. Daraus wurde die Anzahl der Ereignisse über der Fluoreszenzintensität (FITC) dargestellt (Abbildung 14). Die Balken innerhalb der Diagramme kennzeichnen den als positiv markierten Bereich der Fluoreszenzintensität. Die angegebenen Prozentzahlen spiegeln den als Fluoreszenz-positiv definierten Anteil der betrachteten Gesamt Ereignisse und damit den Anteil der FITC-IgA-

markierten Bakterien an der Gesamtpopulation der Pneumokokken wieder. Der Anteil markierter Pneumokokken steigerte sich von 19,1 % über 39,1 % auf 62,5 % nach der Inkubation des Wildtypstammes mit 1 µg, 2,5 µg bzw. 5 µg FITC-SIgA (Abbildung 14). Der Anteil Fluoreszenz-markierter Bakterien an der Gesamtpopulation nach entsprechender Behandlung mit FITC-SIgA der *pavA*-Mutante lag bei 29,8 %, 60 % bzw. 74,1 %. Damit war die Bindung von sekretorischem IgA an Pneumokokken mit inaktivem *pavA*-Gen im Vergleich zu dem parentalen Stamm gesteigert. Weiterhin zeigte sich die Bindung von sekretorischem IgA an Pneumokokken als dosis- bzw. konzentrationsabhängig. Als Kontrolle wies die isogene *pspC*-Mutante eine reduzierte Bindung von FITC-SIgA. Die Behandlung mit 1 µg, 2,5 µg bzw. 5 µg FITC-SIgA führte zu einem positiv-markierten Anteil der betrachteten Gesamtpopulation von 4,3 %, 3,6 % bzw. 11,6 %.

Insgesamt konnte durch die Northern- und Immunblotanalyse nachgewiesen werden, dass die Mutagenese des *pavA*-Gens in *S. pneumoniae* Typ 35A zu keiner Verminderung der Expression von *pspC* und *pspA* bzw. PspC und PspA führte. Die Expression der mRNA von *pspC* und *pspA* war in der *pavA*-Mutante im Vergleich zu dem Wildtyp sogar erhöht. Die Eigenschaft, sekretorisches IgA zu binden, zeigte sich für die *pavA*-Mutante ausgeprägter als für den Wildtypstamm.

4.1.8. Rolle von PavA in der Adhärenz und Invasion von Pneumokokken an bzw. in pIgR exprimierende Zellen

In *in vitro* Experimenten wurde im folgenden untersucht, ob das Ausschalten des *pavA*-Gens in Pneumokokken einen Einfluss auf die Adhärenz an und die Invasion von mukosalen Epithelzellen hat, die über die Interaktion des bakteriellen Adhäsins PspC und dem humanen polymeren Immunglobulinrezeptor (hplgR) vermittelt wird. Als Modellzelllinien wurden Calu-3- und MDCK-hplgR-Zellen eingesetzt. Bei Calu-3-Zellen handelt es sich um Lungenepithelzellen, die den hplgR exprimieren. MDCK-hplgR-Zellen sind Nierenepithelzellen eines Hundes und stabil mit der für den hplgR-kodierenden cDNA transfiziert. Die Epithelzellen wurden mit 1×10^7 Bakterien für 4 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ infiziert. Das Experiment wurde nach einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung mikroskopisch durch Auszählen von 50 Zellen ausgewertet.

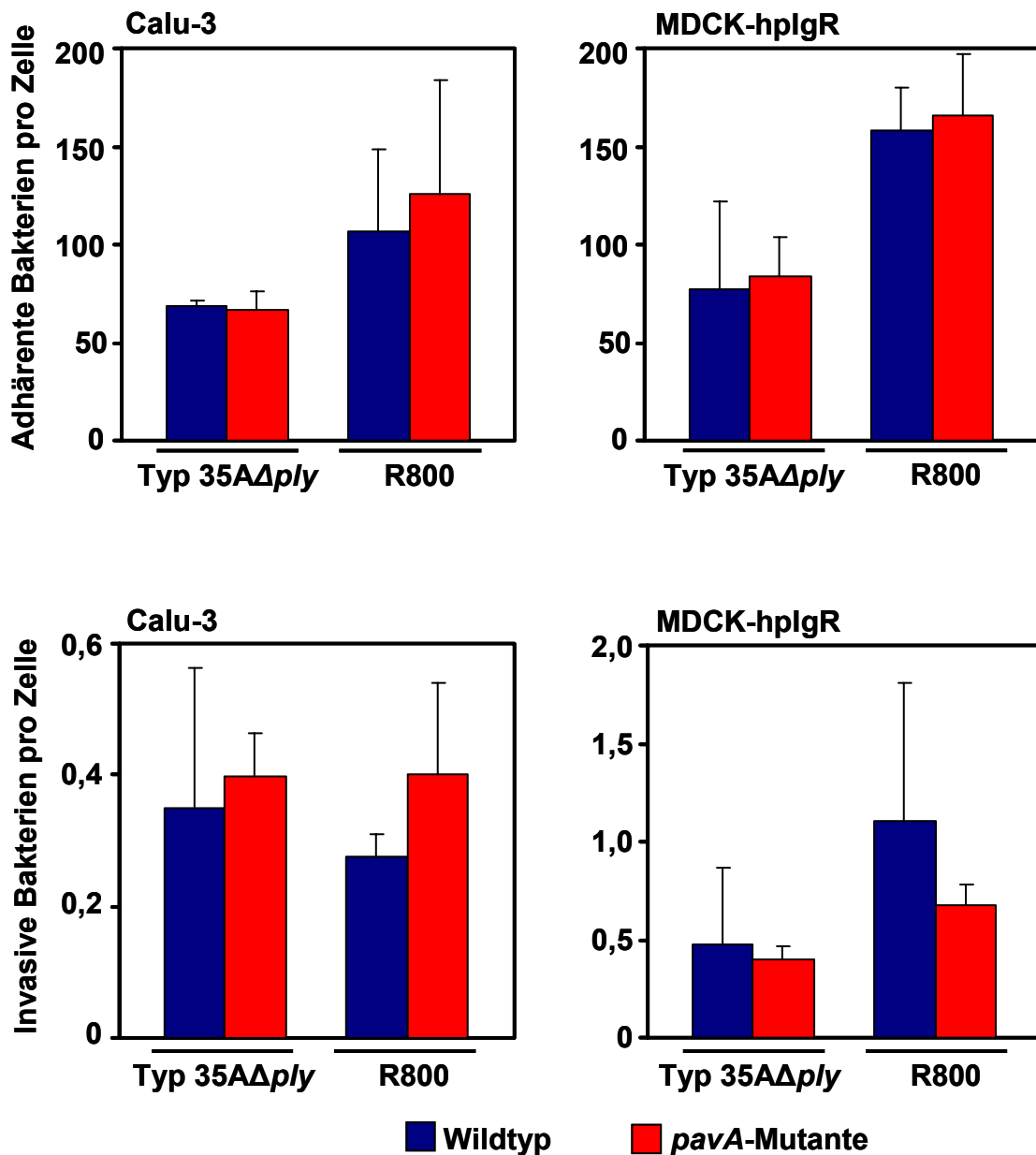


Abbildung 15: Adhärenz an und Invasion von *S. pneumoniae* Serotyp 35AΔply bzw. R800 (blau) und den isogenen *pavA*-Mutanten (rot) in humanen polymeren Immunglobulinrezeptor (hplgR) exprimierende Epithelzellen.

Es wurden die humane Lungenepithelzelllinie Calu-3 und die Nierenepithelzelllinie MDCK-hplgR, die stabil mit der für den hplgR-kodierenden cDNA transfiziert war, mit den Pneumokokken infiziert. Die Zahl adhärenter und invasiver Bakterien pro Zelle wurde nach einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung durch Auszählen am Mikroskop bestimmt.

Die Wildtypstämme *S. p.* Typ 35AΔply und R800 adhärten mit $68,2 \pm 3,6$ Bakterien bzw. $106,8 \pm 41,3$ Bakterien pro Calu-3-Zelle. Die isogenen *pavA*-Mutanten zeigten im Vergleich zu den parentalen Stämmen keine signifikante Änderung der Adhärenz. Es wurde eine Adhärenz von 67 ± 9 Bakterien für *S. p.* Typ 35AΔpavA bzw. von $125,7 \pm 58$ Bakterien für R800ΔpavA an Calu-3-Zellen nachgewiesen (Abbildung 15). An die MDCK-hplgR-Zellen adhärten der bekapselte bzw. der unbekapselte Pneumokokkenstamm mit $77,5 \pm 44,9$ Bakterien bzw. $157,7 \pm 22,2$ Bakterien pro Zelle. Die jeweiligen *pavA*-Mutanten zeigten eine

Adhärenz von $83,9 \pm 20,3$ Bakterien bzw. $165,3 \pm 31,5$ Bakterien pro Zelle und damit eine dem Wildtyp vergleichbare Anheftungsrate. Die Invasion in hplgR-exprimierende Epithelzellen wurde ebenso wie die Adhärenz nicht von der Inaktivierung des *pavA*-Gens beeinflusst. Die *pavA*-Mutanten drangen in ähnlicher Zahl in Calu-3- als auch in MDCK-hplgR-Zellen wie die entsprechenden Wildtypen *S. p.* Typ 35A Δ *ply* und R800 ein. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten ein vergleichbares Verhalten von *S. p.* Typ 35A Δ *ply* und der isogenen *pavA*-Mutante in der Infektion von Calu-3-Zellen (Abbildung 16).

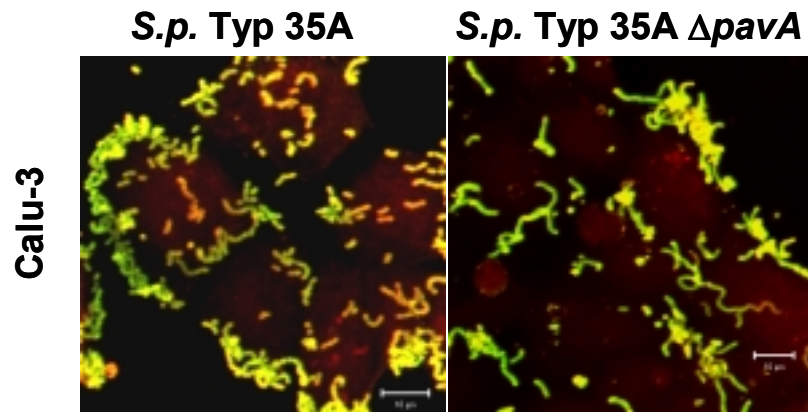


Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Infektion von humanen polymeren Immunglobulinrezeptor (hplgR) exprimierende Epithelzellen. Gezeigt ist die Adhärenz an und die Invasion von *S. pneumoniae* Typ 35A Δ *ply* und der isogenen *pavA*-Mutante in die humanen Lungenepithelzellen Calu-3. Adhärenz Pneumokokken erscheinen gelb und invasive Bakterien leuchten rot.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass das bakterielle Adhäsion PspC die Adhärenz an und die Invasion der PavA defizienten Pneumokokken in hplgR-exprimierende Epithelzellen vermittelt.

4.2. Untersuchungen zum Einfluss von Fibronectin auf die Interaktion zwischen *S. pneumoniae* und humanen Wirtszellen

4.2.1. Rekrutierung des Fibronektins von *S. pneumoniae* aus Plasma

Streptococcus pneumoniae interagiert mit verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM). So bindet der Erreger unter anderem an immobilisiertes Fibronectin (van der Flier *et al.*, 1995). Die Rekrutierung von löslichem Fibronectin aus dem Plasma konnte allerdings noch nicht eindeutig gezeigt werden. In Infektionsprozessen verschiedener gram-positiver pathogener Bakterien einschließlich der Gattungen *Streptococcus* und *Staphylococcus* wurde die Interaktion mit Fibronectin als Brückenmolekül als ein wichtiger Schritt für die Anheftung an Wirtsgewebe beschrieben.

Zunächst wurde untersucht, ob Pneumokokken lösliches Fibronectin aus Plasma rekrutieren konnten. *S. p.* Typ 35A wurde dazu mit verschiedenen Mengen an frischem humanen Plasma für 30 min bei 37°C inkubiert. Je Ansatz wurden 1×10^9 Bakterien verwendet, nach der Inkubation gewaschen und mit denaturierendem Proteinprobenpuffer versetzt. Davon wurden 5×10^7 Bakterien in einem 8 % SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis von Fibronectin erfolgte in einem Immunblot.

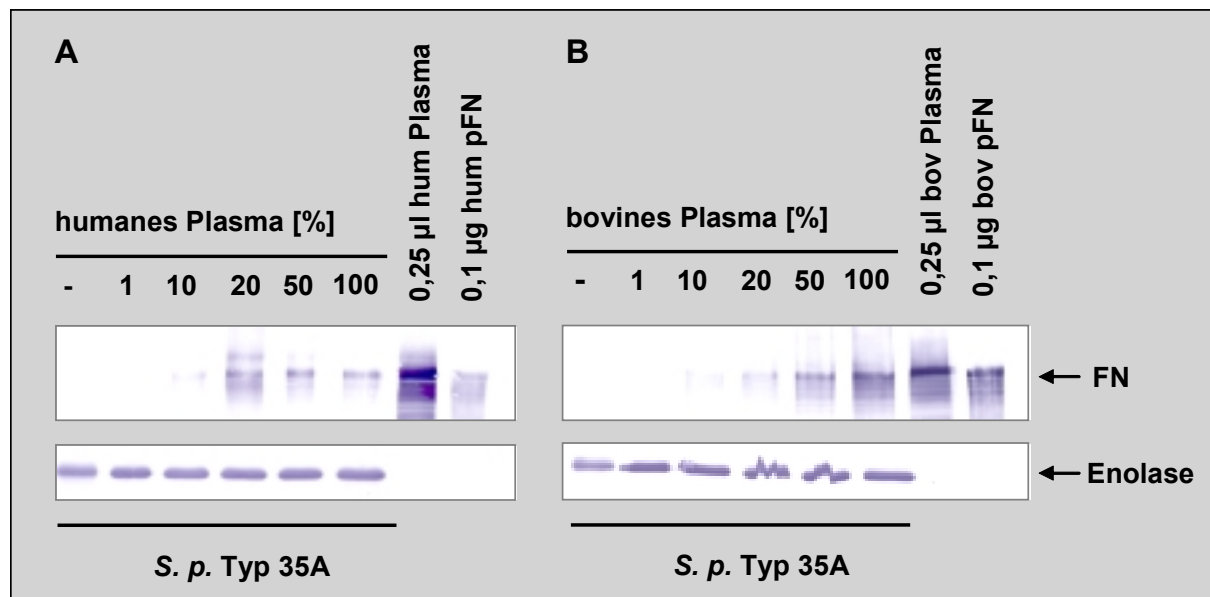


Abbildung 17: Nachweis von rekrutiertem Fibronectin aus frischem Plasma an *S. pneumoniae* Typ 35A im Immunblot.

Pneumokokken wurden mit unterschiedlichen Mengen an frischem Plasma humaner (A) oder boviner (B) Herkunft inkubiert. Die Ansätze wurden in einer 8 % SDS-PAGE aufgetrennt, und die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Kontrolle für den Immunblot dienten 0,25 µl des jeweiligen Plasmas und 0,1 µg reines Plasma-Fibronectin humanen oder bovines Ursprungs. Für den Nachweis von Fibronectin wurde der α -FN-Antikörper (Dako) in einer Verdünnung von 1:600 und als Ladungskontrolle α -Enolase-Antiserum 1:200 verdünnt eingesetzt. Nach der Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten α -Kaninchen-IgG (1:5000) erfolgte die Entwicklung mit Chloronaphthol.

Der Immunblot zeigte die mengenabhängige Rekrutierung von Fibronectin aus humanem Plasma an *S. pneumoniae* (Abbildung 17 A). Pneumokokken sind obligat humanpathogene Erreger. Für *Neisseria meningitidis* konnte nachgewiesen werden, dass diese human pathogenen Erreger nicht in der Lage sind, bovines Fibronectin zu rekrutieren und als Brückenmolekül für die Anheftung an Wirtszellen zu nutzen (Unkmeir *et al.*, 2002). In weiteren Experimenten wurde überprüft, ob Pneumokokken Fibronectin aus bovinem Plasma rekrutieren können. Diese Versuche wurden analog der Experimente mit humanem Plasma durchgeführt. Auch für den Einsatz von bovinem Plasma konnte eine Rekrutierung von Fibronectin durch *S. p.* Typ 35A in Immunblot-Analysen gezeigt werden (Abbildung 17 B). Die Detektion des Glykolyse-Enzyms Enolase ergab, dass gleiche Mengen an Bakterienmaterial für den Nachweis eingesetzt wurden.

Die Bindung von Fibronectin aus Plasma wurde nicht nur mit Hilfe des Immunblots untersucht, sondern auch durchflusszytometrisch überprüft. *S. p.* Typ 35A wurde mit verschiedenen Mengen frischem humanen und bovinen Plasma für 30 min bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurde untersucht, ob Pneumokokken Fibronectin aus fötalem bovinen Serum (FBS), das in der Zellkultur als FBS Gold (PAA) zugesetzt wird, binden können. Dazu wurden die Bakterien mit unterschiedlichen Mengen FBS behandelt. Je Ansatz wurden 1×10^8 Bakterien verwendet. Die Detektion des auf der Bakterienoberfläche assoziierten Fibronectins erfolgte durch eine Immunfluoreszenzfärbung. Nach der Inkubation mit Plasma oder FBS wurden die Pneumokokken mit einem anti-Fibronectin-Antikörper inkubiert, an den im Anschluss ein FITC-gekoppelter Zweitantikörper binden konnte. Um eine Hintergrundbindung auszuschließen, wurde überprüft, ob die verwendeten Antikörper unspezifisch mit Pneumokokken reagierten. Die Vermessung erfolgte in einem FACS Calibur (Becton Dickinson). Für die Auswertung der Daten wurde zunächst die Gesamtpopulation der Pneumokokken eingegrenzt. Als positiv-markierte Bakterien wurden die Ereignisse definiert, die in der Auftragung Granularität über Fluoreszenzintensität im rechten oberen Quadranten zu finden waren (Abbildung 18 B). Die Prozentzahl gibt den Anteil positiv-markierter Pneumokokken an der Gesamtpopulation wieder. Die mittlere Fluoreszenzintensität MFI stellt den Mittelwert der Fluoreszenzintensität der Ereignisse im rechten oberen Quadranten, also der als positiv-markierten Bakterien dar. Das Produkt aus mittlerer Fluoreszenzintensität und prozentualem Anteil der positiv-markierten Ereignisse an der Gesamtzahl wurde berechnet und ist für drei unabhängige Versuche in Abbildung 18 A dargestellt.

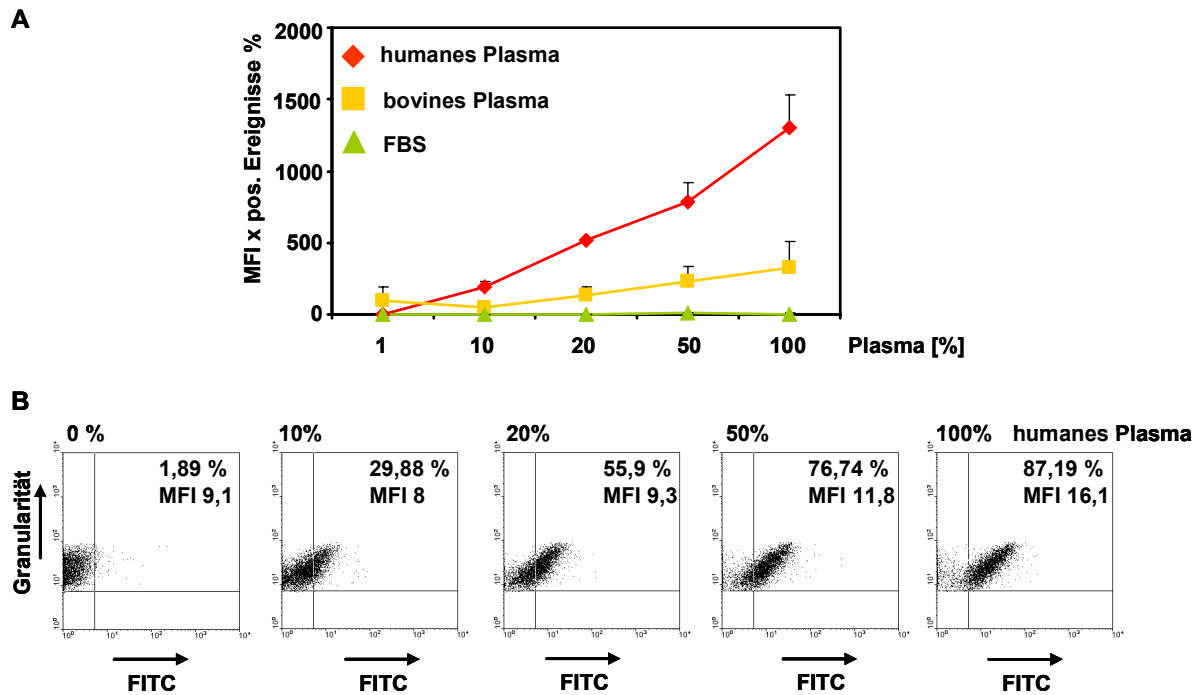


Abbildung 18: Bindung von Fibronectin aus Plasma bzw. FBS an *S. pneumoniae* Typ 35A. Pneumokokken wurden mit unterschiedlichen Mengen an frischem humanem oder bovinem Plasma bzw. FBS inkubiert (A). In (B) ist exemplarisch eine Datenreihe für die Rekrutierung von Fibronectin aus humanem Plasma an *S. p.* Typ 35A dargestellt. Auf der Bakterienoberfläche assoziiertes Fibronectin wurde durch einen α -FN-Antikörper (Dako) und einen FITC-konjugierten Zweitantikörper markiert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte in einem FACS Calibur.

Die durchflusszytometrische Messung erbrachte den Nachweis, dass *S. p.* Typ 35A Fibronectin aus sowohl humanem als auch bovinem Plasma rekrutieren konnte (Abbildung 18 A). Die Fähigkeit, Fibronectin aus bovinem Plasma zu binden, scheint schwächer ausgeprägt zu sein. Zu bemerken bleibt hier, dass der verwendete anti-Fibronectin-Antikörper bovines Fibronectin schwächer als die gleiche Menge humanes Fibronectin erkannte. Es konnte kein Fibronectin auf der Oberfläche von Pneumokokken nach der Inkubation mit FBS detektiert werden (Abbildung 18 A). Der Anteil an positiv-markierten Bakterien an der Gesamtpopulation und die Stärke der mittleren Fluoreszenzintensität vergrößerten sich deutlich mit zunehmender Menge an für die Inkubation eingesetztem humanem Plasma (Abbildung 18 B). Insgesamt wurde nachgewiesen, dass *S. pneumoniae* sowohl Fibronectin aus humanem als auch aus bovinem Plasma aber nicht aus FBS rekrutieren konnte.

4.2.2. Bindung von Fibronectin an Pneumokokken

Die Rekrutierung von Fibronectin aus Plasma auf der Oberfläche von Pneumokokken beweist nicht, dass die Erreger lösliches Fibronectin direkt binden könnten. Bei der Bindung von Proteinen aus einem komplexen Gemisch wie Plasma können andere, nicht identifizierte

Faktoren an der Interaktion beteiligt sein. Aus diesem Grund wurde die direkte Bindung von reinem löslichen Fibronectin unterschiedlicher Spezies an *S. p.* Typ 35A untersucht. Es wurden je Ansatz 1×10^9 Bakterien mit 1 μg , 5 μg und 10 μg reinem löslichen Fibronectin für 30 min bei 37°C inkubiert. Es wurde die Bindung von humanem und bovinem Plasma-Fibronectin getestet. Neben der dimeren Form des Plasma-Fibronectins existiert eine zweite Form, die als Multimer in der ECM vorkommt. Dieses humane zelluläre Fibronectin wurde ebenfalls auf die Bindung an Pneumokokken überprüft. Nach der Inkubation wurde nicht gebundenes Protein durch Waschen entfernt und die Ansätze mit denaturierendem Proteinprobenpuffer versetzt. Davon wurde ein Aliquot, das 5×10^7 Bakterien entsprach, in einem 8 % SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert, und der Nachweis von Fibronectin erfolgte in einem Immunblot.

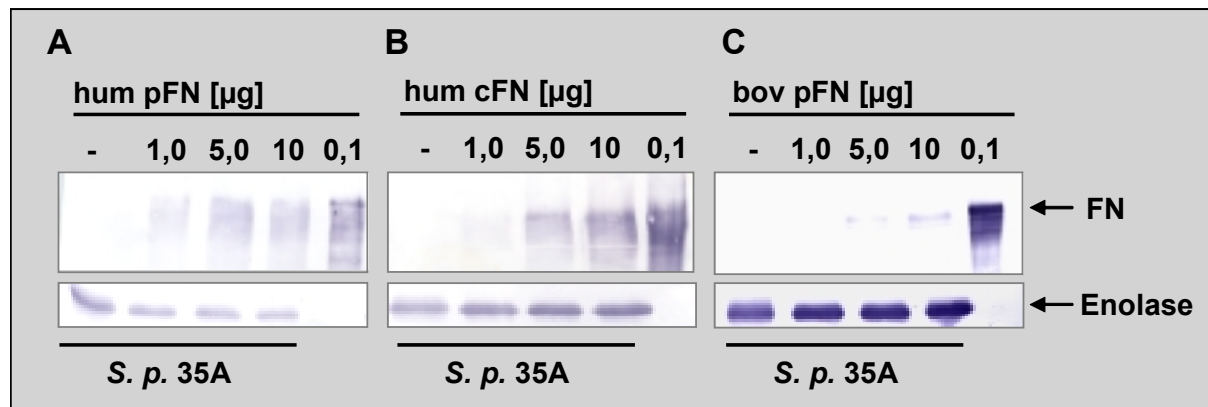


Abbildung 19: Bindung von reinem Fibronectin an *S. pneumoniae* Typ 35A. Pneumokokken wurden mit 1 μg , 5 μg und 10 μg löslichem Fibronectin inkubiert. Es wurde die Bindung von humanem Plasma-Fibronectin (A), humanem zellulären Fibronectin (B) und bovinem Plasma-Fibronectin (C) untersucht. Die Ansätze wurden in einer 8 % SDS-PAGE aufgetrennt, und die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Kontrolle für den Immunblot diente 0,1 μg des jeweiligen reinen Fibronectins. Für den Nachweis von Fibronectin wurde der α -FN-Antikörper (Dako) in einer Verdünnung von 1:600 und als Ladungskontrolle α -Enolase-Antiserum 1:200 verdünnt eingesetzt. Nach der Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten α -Kaninchen-IgG (1:5000) erfolgte die Entwicklung mit Chloronaphthol.

Der Immunblot zeigte eine dosisabhängige Bindung von humanem und bovinem Plasma-Fibronectin an *S. pneumoniae* (Abbildung 19 A und C). Eine quantitative Bewertung des Ergebnisses kann nicht vorgenommen werden, da die Spezifität, mit der der verwendete anti-Fibronectin-Antikörper (Dako) speziesabhängig Fibronectin erkennt, nicht eindeutig bekannt ist. Ebenso wie für das humane Plasma-Fibronectin konnte auch eine konzentrationsabhängige Bindung des humanen zellulären Fibronectins an Pneumokokken im Immunblot festgestellt werden (Abbildung 19 B).

Zusätzlich zu den Ergebnissen der Immunblots (Abbildung 19) wurde die Bindung von löslichem Fibronectin an *S. pneumoniae* durch durchflusszytometrische Experimente überprüft. Es wurden je Ansatz 1×10^8 Bakterien des Serotyp 35A-Stammes mit

verschiedenen Mengen des reinen humanen und bovinen Plasma-Fibronectins und des humanen zellulären Fibronectins behandelt. An den Erregern gebundenes Fibronectin wurde über die Immunfluoreszenzfärbung mit anti-Fibronectin-Antikörper und dem FITC-gekoppelten Zweitantikörper markiert. Die Daten, die die durchflusszytometrische Messung der gefärbten Bakterien ergab, wurden, wie zuvor bereits beschrieben, ausgewertet und die Ergebnisse aus drei Versuchen in einem Diagramm dargestellt (Abbildung 20).

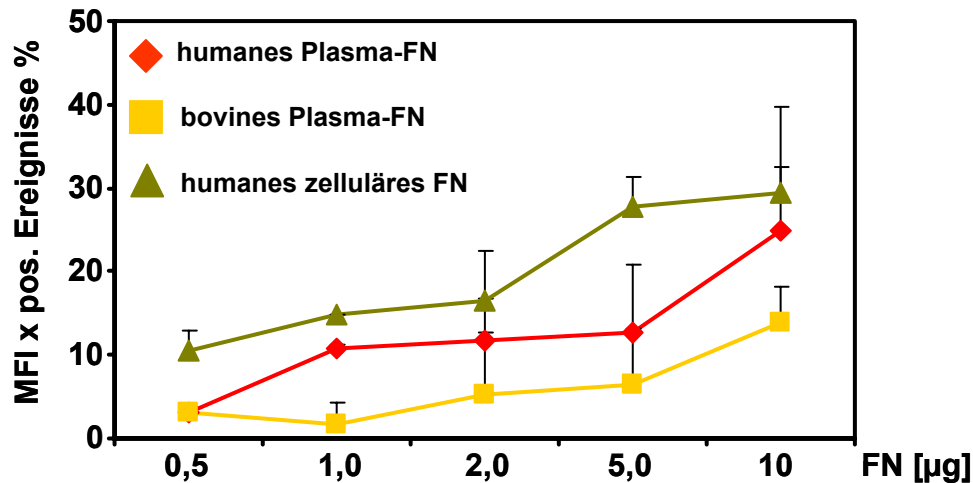


Abbildung 20: Bindung des löslichen Fibronectins an *S. pneumoniae* Typ 35A in der Durchflusszytometrie. Pneumokokken wurden mit unterschiedlichen Mengen an reinem löslichen Fibronectin inkubiert. Es wurde die Bindung von humanem Plasma-Fibronectin, humanem zellulären Fibronectin und bovinem Plasma-Fibronectin analysiert. Auf der Bakterienoberfläche assoziiertes Fibronectin wurde durch einen α -FN-Antikörper (Dako) mit einer Verdünnung von 1:600 und einen 1:300 verdünnten FITC-konjugierten Zweitantikörper markiert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte in einem FACS Calibur.

Die Ergebnisse aus der durchflusszytometrischen Analyse zeigten eine dosisabhängige Bindung von reinem löslichen Fibronectin an *S. pneumoniae* (Abbildung 20). Dabei wurde eine vergleichsweise höhere Bindung von humanem zellulären als von Plasma-Fibronectin an die Bakterien festgestellt. Es konnte sowohl im Immunblot als auch durch Durchflusszytometrie die direkte Bindung von humanem und bovinem löslichen Fibronectin an *S. pneumoniae* nachgewiesen werden.

4.2.3. Untersuchungen zum Einfluss von Fibronectin auf die Adhärenz von *S. pneumoniae* an humane Wirtszellen

Streptococcus pneumoniae bindet sowohl an immobilisiertes Fibronectin (van der Flier *et al.*, 1995) als auch lösliches Fibronectin auf seiner Oberfläche. Viele pathogene Mikroorganismen nutzen Fibronectin als Brückenmolekül, um sich an Wirtsgewebe anzuheften und in dieses einzudringen. Für Pneumokokken wurde in den folgenden Experimenten

untersucht, welche Rolle Fibronectin in der Adhärenz und Invasion der Bakterien an und in Wirtszellen spielt. Es wurden humane Nasopharynxepithelzellen Detroit 562 mit *S. p.* Typ 35A und einer multiplicity of infection (MOI) von 50 für 4 Stunden infiziert. Die MOI gibt dabei das Verhältnis von zugegebenen Bakterien je Wirtszelle an. In verschiedenen Versuchsansätzen wurde überprüft, ob und in welchem Ausmaß der Zusatz von humanem Plasma-Fibronectin die Adhärenz von Pneumokokken an die Wirtszellen beeinflusst. Dazu wurden die Nasopharynxepithelzellen Detroit 562 mit 5 µg Fibronectin bei 1×10^5 Zellen vor der Infektion mit Bakterien bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde ein Ansatz direkt mit Pneumokokken infiziert, und in einem weiteren Ansatz wurde vor der Zugabe der Bakterien durch einen Mediumwechsel nicht an die Zellen assoziiertes Fibronectin entfernt. In weiteren Ansätzen wurden die Bakterien vor der Infektion mit 5 µg Fibronectin je 5×10^6 Pneumokokken für 30 min bei 37°C behandelt. Auch hier wurde vor der Infektion aus einem Ansatz nicht Bakterien-gebundenes Fibronectin durch Waschen entfernt. Die Bakterien eines weiteren Ansatzes wurden zusammen mit ungebundenem Fibronectin für die Infektion von humanen Wirtszellen eingesetzt. Als Kontrolle wurden die Detroit 562-Zellen ohne Zusatz von Fibronectin mit *S. p.* Typ 35A infiziert. Die adhärennten Bakterien wurden nach der Infektion in einer Immunfluoreszenzfärbung markiert. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch durch Auszählen von mindestens 30 Zellen.

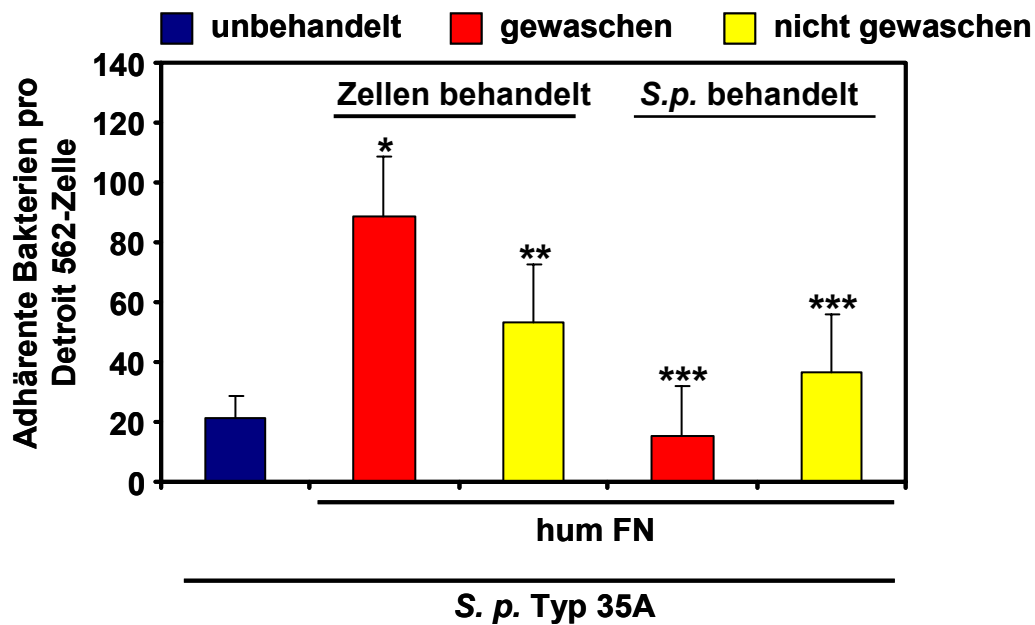


Abbildung 21: Einfluss von Fibronectin auf die Adhärenz von *S. pneumoniae* Serotyp 35A an humane Nasopharynxepithelzellen Detroit 562. Vor der Infektion wurden entweder die Epithelzellen oder die Bakterien mit 5 µg humanem Plasma-Fibronectin je Ansatz behandelt. Nach den Präinkubationen wurde zum einen ungebundenes Fibronectin durch Waschen entfernt (rot) oder die anschließende Infektion in Gegenwart von nicht gebundenem Fibronectin durchgeführt (gelb). Als Kontrolle wurden Detroit 562-Zellen ohne Zusatz von Fibronectin mit Pneumokokken infiziert (blau). Die Zahl adhärenter Bakterien pro Zelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung durch Auszählen am Mikroskop bestimmt. * $P < 0,002$; ** $P < 0,05$; *** $P > 0,17$

Die Präinkubation der Detroit 562-Zellen mit Fibronectin führte zu einer signifikanten Steigerung der Adhärenz von Pneumokokken im Vergleich zu den Infektionen in Abwesenheit von Fibronectin (Abbildung 21). Die Behandlung der Wirtszellen mit Fibronectin und Durchführung der Infektion in Gegenwart des ungebundenen Fibronectins erhöhte die Zahl angehefteter Bakterien je Zelle von $21,4 \pm 7,1$ bei Infektionen ohne Fibronectin auf $53 \pm 19,9$ Bakterien pro Zelle in Gegenwart von Fibronectin. Die größte Steigerung der Adhärenz auf durchschnittlich $88,9 \pm 19,8$ Bakterien pro Zelle wurde durch die Behandlung der Zellen mit Fibronectin und anschließendem Entfernen des ungebundenen Matrixproteins erzielt (Abbildung 21). Die Inkubation der Erreger mit Fibronectin zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Adhärenz. In Gegenwart ungebundenen Fibronectins lag hier die Zahl adhärenter Pneumokokken bei $36,4 \pm 19,4$ pro Zelle, nach Entfernen des nicht an die Bakterien assoziierten Proteins wurden $15,6 \pm 16,4$ Bakterien je Zelle gezählt. Da die Behandlung der Wirtszellen mit Fibronectin und das nachfolgende Entfernen des ungebundenen Wirtsproteins zu der höchsten signifikanten Steigerung der Adhärenz von *S. pneumoniae* führte, wurden alle folgenden Experimenten auf diese Weise durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von dimerem Plasma-Fibronectin mit der Rolle von multimerem zellulären Fibronectin im bakteriellen Anheftungsprozess verglichen. Parallel wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Fibronectin-vermittelten Adhärenz von Pneumokokken an humane Wirtszellen untersucht. Es wurden humane Nasopharynxepithelzellen Detroit 562 und Hirnendothelzellen HBMEC vor der Infektion mit 0,5 µg bis 5 µg humanem Plasma- oder zellulärem Fibronectin je Ansatz mit 10^5 Zellen und ml für 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ behandelt. Ungebundenes Protein wurde entfernt und die Zellen mit *S. p.* Typ35A mit einer MOI von 50 für 4 Stunden bei 37°C infiziert. Die Auswertung erfolgte nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch durch Auszählen von mindestens 30 Zellen.

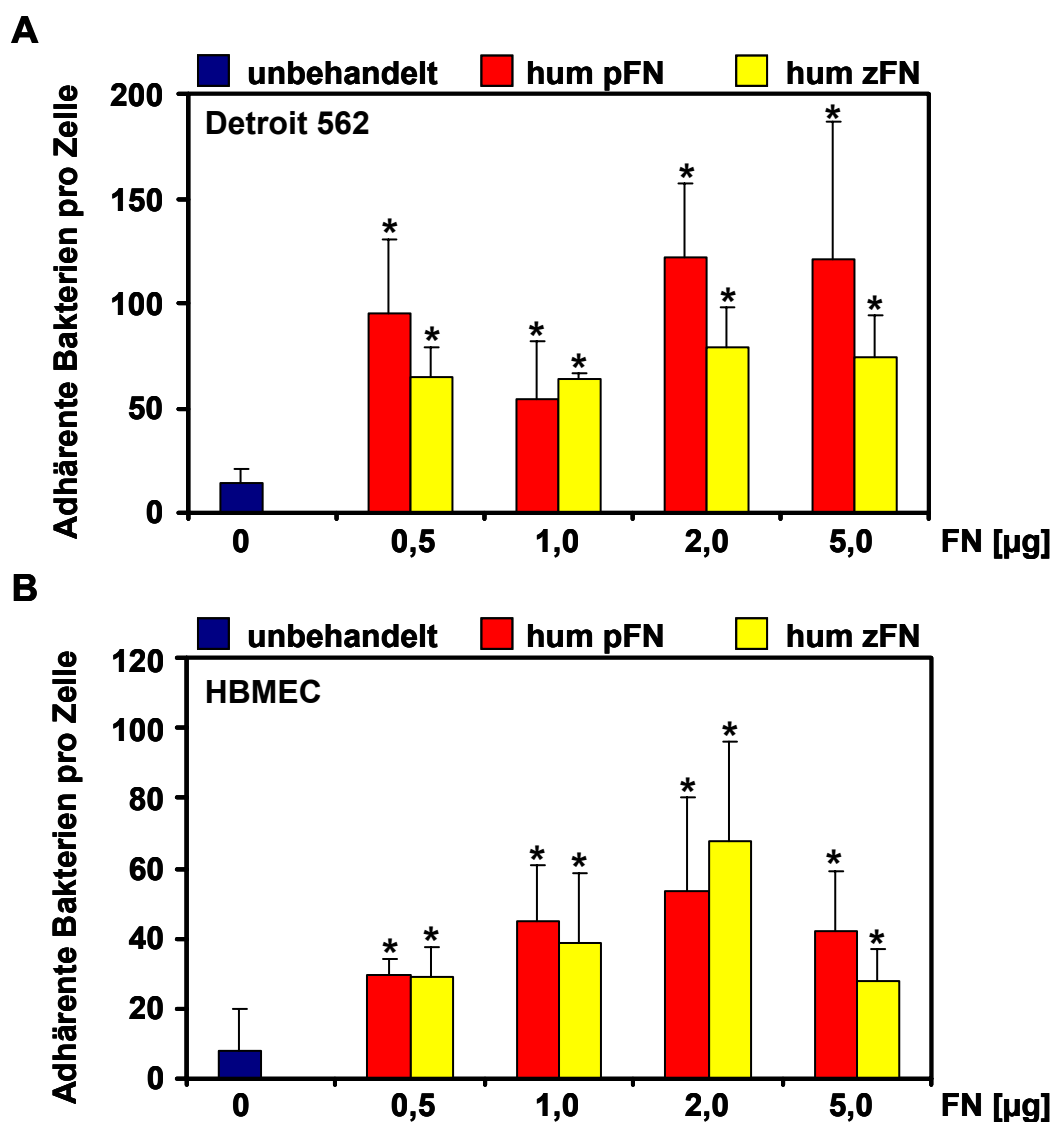


Abbildung 22: Einfluss von humanem plasmatischen bzw. zellulären Fibronectin auf die Adhärenz von *S. pneumoniae* Serotyp 35A an humane Wirtszellen. Die Nasopharynxepithelzellen Detroit 562 und die Hirnendothelzellen HBMEC wurden vor der Infektion mit Pneumokokken mit 0,5 µg bis 5 µg dimerem Plasma- (rot) oder multimerem zellulären Fibronectin (gelb) behandelt. Ungebundenes Protein wurde vor der Infektion entfernt. Als Kontrolle wurden die Wirtszellen ohne vorherige Fibronectin-Behandlung mit *S. pneumoniae* infiziert (blau). Die Zahl adhärenter Bakterien pro Zelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung durch mikroskopisches Auszählen bestimmt. * $P < 0,05$

Die Adhärenz von *S. pneumoniae* Typ 35A an die Epithelzellen des Nasenrachenraums Detroit 562 wurde bereits durch Vorbehandlung der Zellen mit 0,5 µg humanem Fibronectin signifikant erhöht (Abbildung 22). Ohne die Zugabe von Fibronectin wurden $13,9 \pm 7,1$ Bakterien je Zelle beobachtet. Die größte Zahl adhärenter Pneumokokken mit $122,2 \pm 35$ bzw. $78,9 \pm 18,8$ je Detroit 562-Zelle wurde durch die Präinkubation mit 2 µg plasmatischem bzw. zellulärem Fibronectin erreicht. Die Erhöhung der Zugabe von plasmatischem bzw. zellulärem Fibronectin auf 5 µg Protein je Ansatz führte mit $121,2 \pm 65,4$ bzw. $74,1 \pm 19,7$ Bakterien je Zelle zu keiner weiteren Steigerung der Adhärenz an die Epithelzellen. Auch die Adhärenz von Pneumokokken an die humanen Hirnendothelzellen HBMEC wurde bereits durch die Zugabe von 0,5 µg Fibronectin signifikant erhöht (Abbildung 22). Die Adhärenz ohne Behandlung der Zellen mit Fibronectin lag bei $7,9 \pm 11,7$ Bakterien pro Zelle und nach Inkubation mit 0,5 µg Plasma- bzw. zellulärem Fibronectin bei $29,6 \pm 4,8$ bzw. $28,8 \pm 8,6$ Bakterien pro HBMEC-Zelle. Die maximale Steigerung der Adhärenz ergab sich nach Behandlung der Zellen mit 2 µg Plasma- bzw. zellulärem Fibronectin zu $53,6 \pm 26,3$ bzw. $67,5 \pm 28,6$ Pneumokokken pro Zelle. Die Präinkubation mit 5 µg Fibronectin führte für die Plasma-Form zu $41,9 \pm 17,3$ adhärenenten Bakterien pro Zelle und für die zelluläre Form zu $28,1 \pm 9$ Bakterien je Zelle. Insgesamt zeigte sich eine Fibronectin-abhängige Adhärenz, die ein Maximum zwischen 2 und 5 µg zugegebenem Fibronectin erreichte. Es wurden ähnliche Ergebnisse bei der Verwendung von humanem Plasma- bzw. zellulären Fibronectin erzielt. Für alle folgenden Versuche wurden standardmäßig 5 µg Fibronectin je 10^5 Zellen und ml eingesetzt.

Der verstärkende Einfluss von humanem Fibronectin auf die Adhärenz von *S. pneumoniae* an die Epithelzelllinie Detroit 562 und an die Endothelzelllinie HBMEC konnte bereits festgestellt werden. Um die Rolle der Wirtsspezifität in der Interaktion zwischen Erreger und Fibronectin bei der Vermittlung der Adhärenz zu bestimmen, wurden im folgenden Infektionen verschiedener humaner Epithel- und Endothelzellen nach Behandlung mit Plasma-Fibronectin humanen oder bovinen Ursprungs durchgeführt. Es wurden zum einen die Epithelzelllinien Detroit 562, HEp-2 und A549 und zum anderen die Endothelzelllinien HBMEC und HUVEC eingesetzt. Die Wirtszellen wurden vor der Infektion mit jeweils 5 µg humanem oder bovinem Fibronectin je Ansatz bei 37°C für 30 min inkubiert und anschließend nicht gebundenes Protein entfernt. Die Infektion erfolgte mit *S. p.* Typ 35A bei 37°C für 4 Stunden. Nach der Infektion wurden die Bakterien durch eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung markiert und die Zahl adhärenter Bakterien durch mikroskopisches Auszählen bestimmt.

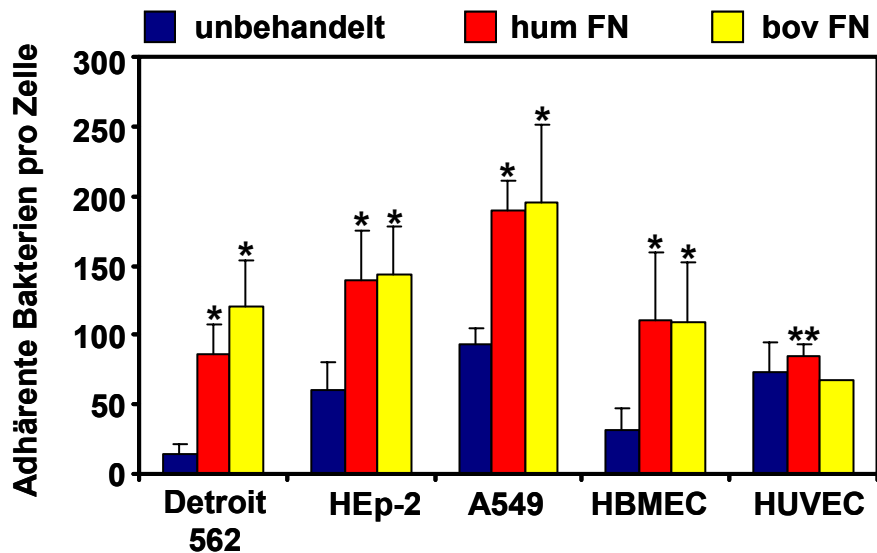


Abbildung 23: Fibronektin-vermittelte Adhärenz von *S. pneumoniae* Serotyp 35A an humane Epithel- und Endothelzellen.

Es wurden die Nasopharynxepithelzellen Detroit 562, die Larynxkarzinomzellen HEp-2, die alveolären Lungenepithelzellen A549, die Hirnendothelzellen HBMEC und die primären Nabelschnurendothelzellen HUVEC mit jeweils 5 µg humanem (rot) bzw. bovinem Plasma-Fibronektin (gelb) je Ansatz behandelt. Vor der Infektion mit Pneumokokken wurde ungebundenes Fibronektin entfernt. Zur Kontrolle wurden die Zellen jeweils ohne Zugabe von Fibronektin infiziert (blau). Nach der Infektion wurden die Bakterien durch eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung markiert und die Zahl adhärenter Bakterien pro Zelle durch mikroskopische Auswertung bestimmt.

* $P < 0,03$; ** $P > 0,5$

Die Adhärenz von *S. pneumoniae* Typ 35A steigerte sich signifikant mit Ausnahme der Infektion von HUVEC-Zellen für alle untersuchten Zelllinien durch Zugabe von humanem als auch von bovinem Plasma-Fibronektin (Abbildung 23). Nach Inkubation von Detroit 562-Zellen mit humanem bzw. bovinem Fibronektin ergab sich eine Adhärenz von $85,8 \pm 22,5$ bzw. $121 \pm 32,2$ Bakterien pro Zelle. Ohne Zugabe von Fibronektin lag die Adhärenz bei $14,4 \pm 7,2$ Pneumokokken je Detroit 562-Zelle. Nach der Infektion von HEp-2-Zellen wurden $60,8 \pm 19,4$ Pneumokokken je Wirtszelle beobachtet. Die Behandlung der HEp-2-Zellen mit humanem bzw. bovinem Fibronektin führte zu $139,4 \pm 35,5$ bzw. $143,8 \pm 33,5$ adhärenter Bakterien pro Wirtszelle. Die Fibronektin-vermittelte Adhärenz von *S. pneumoniae* an die alveolären Lungenepithelzellen A549 war doppelt so hoch wie die Anheftung in Abwesenheit von Fibronektin. Diese zeigte im Mittel $93,2 \pm 11,7$ Bakterien pro A549-Zelle. Nach Inkubation mit humanem oder bovinem Fibronektin steigerte sich die Adhärenz auf $188,9 \pm 22,6$ bzw. $195,3 \pm 56,4$ Bakterien pro A549-Zelle. Durch die Behandlung der HBMEC-Zellen mit humanem oder bovinem Plasma-Fibronektin wurde die Adhärenz um mehr als das dreifache von $31,5 \pm 16,4$ auf $110,7 \pm 49,2$ bzw. $109,6 \pm 42,6$ Pneumokokken je Hirnendothelzelle erhöht. Die Zugabe von Fibronektin unabhängig von der humanen oder bovinen Herkunft steigerte die Adhärenz der Erreger an Detroit 562-, HEp-2-, A549- und HBMEC-Zellen. Dies deutet auf eine Wirtsunspezifität bezogen auf das verwendete

Fibronectin hin, da Pneumokokken sowohl humanes als auch bovines Fibronectin für die Adhärenz an humane Wirtszellen nutzen.

Die exogene Zugabe von Fibronectin hatte jedoch keinen Einfluss auf die Zahl adhärenter Bakterien an die primäre Zelllinie HUVEC. Sie lag bei $73 \pm 21,3$ Bakterien je Wirtszelle ohne Präinkubation und bei $84,4 \pm 8,8$ bzw. $68,1$ Pneumokokken pro Zelle nach Behandlung der Wirtszellen mit humanem bzw. bovinem Fibronectin (Abbildung 23). Die Fluoreszenzbilder, aufgenommen mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop, illustrieren die Fibronectin-vermittelte Adhärenz an und Invasion von *S. pneumoniae* in die humane Wirtszellen (Abbildung 24). Die Zahl adhärenter Bakterien ist nach der exogenen Zugabe von Plasma-Fibronectin zu Detroit 562-, HEp-2-, A549- und HBMEC-Zellen erhöht im Vergleich zu den Infektionen in Abwesenheit von Fibronectin. Eine Ausnahme stellt die Infektion der primären Endothelzellen HUVEC dar. Die Zugabe von Fibronectin zu der primären Endothelzelllinie HUVEC zeigte keinen steigenden Einfluss auf die Adhärenz von Pneumokokken (Abbildungen 23 und 24).

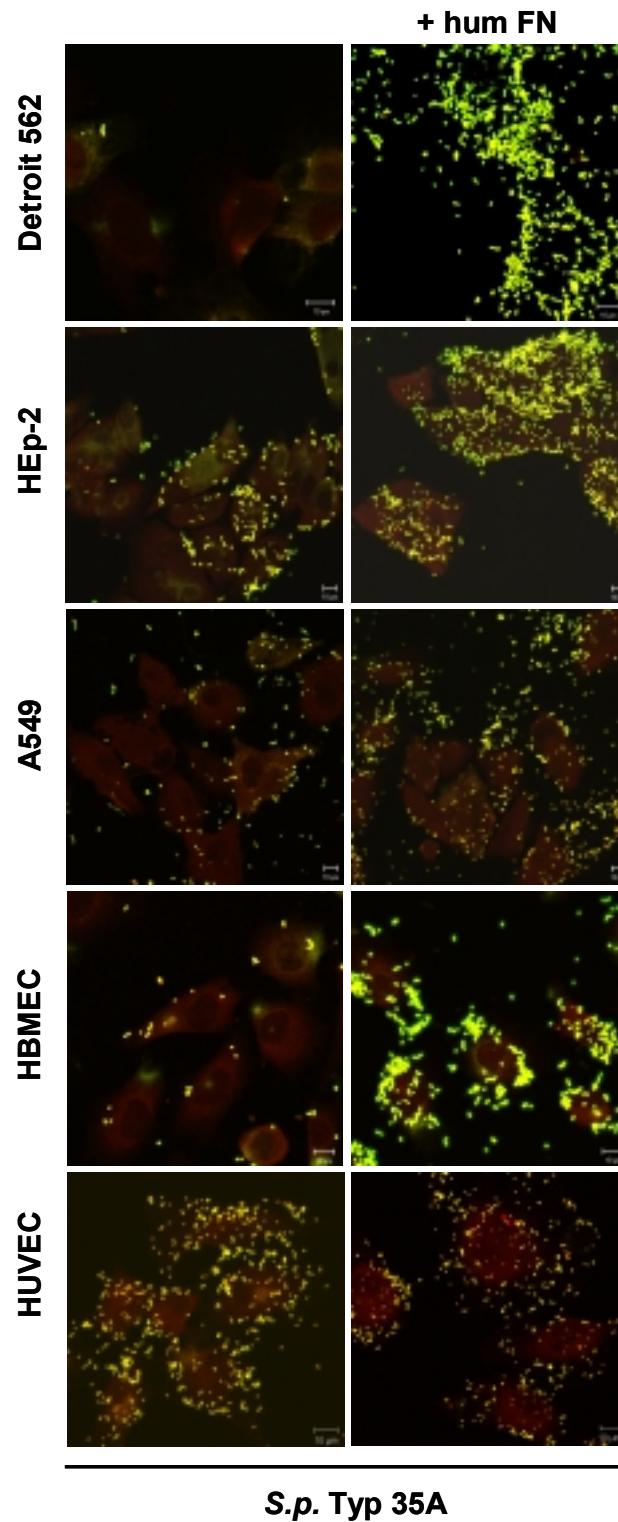


Abbildung 24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Fibronektin-vermittelten Adhärenz von *S. pneumoniae* an humane Epithel- und Endothelzellen. Die linke Spalte zeigt die Infektion der Zellen mit *S. p.* Typ 35A ohne vorherige Behandlung mit Fibronektin. Die Bilder der rechten Spalte illustrieren die Infektion nach der Zugabe von 5 μ g humanem Plasma-Fibronektin je Ansatz wieder. Es wurde die Infektion der Epithelzellen Detroit 562, HEp-2 und A549 und der Endothelzellen HBMEC und HUVEC untersucht. Adhärenz Pneumokokken wurden in der Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit den Fluorochromen Alexa 488 und Alexa 568 markiert und erscheinen gelb. Intrazelluläre Bakterien leuchten durch die Markierung mit Alexa 568 rot.

4.2.4. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Fibronektin-vermittelten Adhärenz von *S. pneumoniae* an Wirtszellen

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 24) zeigten eine Steigerung der Adhärenz von Pneumokokken an Detroit 562-Zellen und HBMEC nach exogener Zugabe von humanem Plasma-Fibronektin. Diese Ergebnisse wurden durch elektronenmikroskopische Bilder bestätigt. Die Nasopharynxzellen Detroit 562 und die Hirnendothelzellen HBMEC wurden vor der Infektion mit *S. p.* Typ 35A mit 5 µg humanem Fibronektin bei 37°C für 30 min inkubiert und ungebundenes Protein anschließend entfernt. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 50 für 4 Stunden bei 37°C. Als Kontrolle wurden die Zellen ohne exogene Zugabe von Fibronektin infiziert. Nach der Infektion wurden die Ansätze für die Rasterelektronenmikroskopie fixiert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten kaum angeheftete Bakterien an Detroit 562-Zellen oder HBMEC in Abwesenheit von Fibronektin. Die vorherige Zugabe von humanem Plasma-Fibronektin führte zu einer signifikanten Steigerung der Adhärenz von Pneumokokken (Abbildung 25).

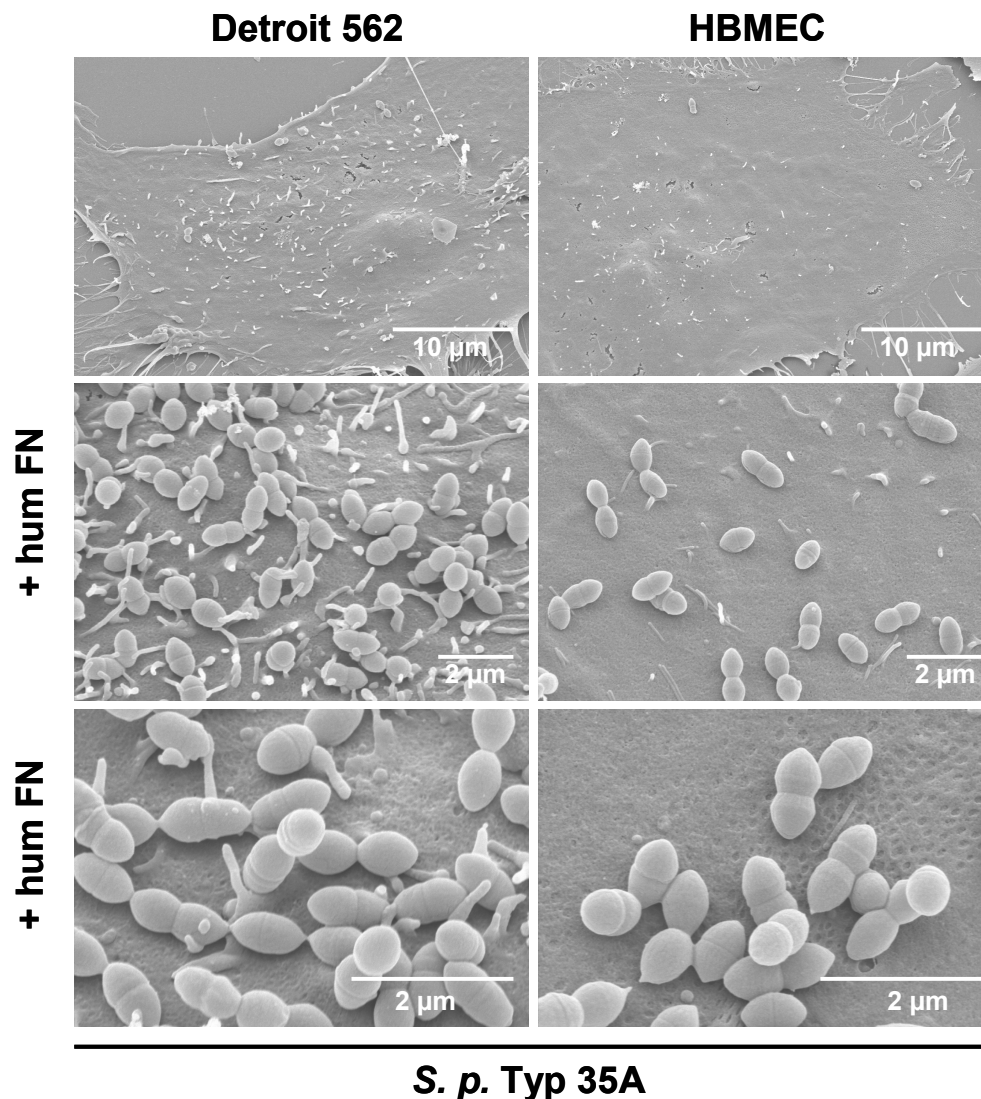


Abbildung 25: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Fibronektin-vermittelten Adhärenz von *S. pneumoniae* Typ 35A an humane Nasopharynxzellen Detroit 562 (links) und Hirnendothelzellen HBMEC (rechts).

4.2.5. Analyse der endogenen Fibronektin-Expression von humanen Epithel- und Endothelzellen

Die Infektionsversuche zeigten, dass die exogene Zugabe von Fibronektin die Adhärenz von *S. pneumoniae* an die etablierten Zelllinien Detroit 562-, HEp-2-, A549- und HBMEC signifikant steigerte, aber keinen Einfluss auf die bakterielle Anheftung an die primäre Zelllinie HUVEC ausübte. Die Erhöhung der bakteriellen Adhärenz durch Behandlung der Detroit 562- und HBMEC-Zellen mit Fibronektin erreichte bei 2 bis 5 μg die Sättigung. So wurde nun die endogene Expression von Fibronektin in den Wirtszellen überprüft, um mögliche Unterschiede in der auf der Wirtszelloberfläche assoziierten Menge an Fibronektin festzustellen. Die eukaryotischen Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80 % angezogen

und mit Accutase in Suspension gebracht. Der Nachweis von Fibronectin erfolgte durch eine Immunfluoreszenzfärbung der Zellen in Suspension. Fibronectin wurde mit einem anti-Fibronectin-Antikörper (Dako) detektiert, an den der FITC-konjugierte Sekundärantikörper binden konnte. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte in einem FACS Calibur. Für die Auswertung wurde der Anteil der positiv-markierten Zellen an der Gesamtpopulation mit der Stärke der mittleren Fluoreszenzintensität multipliziert. Der Wert der Hintergrundfärbung wurde subtrahiert (Abbildung 26).

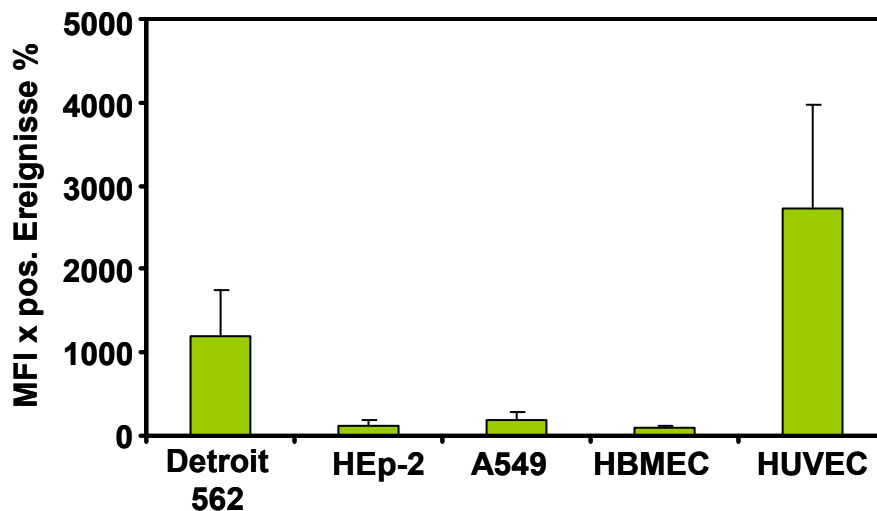


Abbildung 26: Endogene Fibronectin-Expression in den Wirtszellen. Die Zellen wurden schonend in Suspension gebracht und auf der Oberfläche assoziiertes Fibronectin durch einen anti-Fibronectin-Antkörper und einen FITC-konjugierten Sekundärantikörper markiert. Je Ansatz wurden 10^5 Zellen in der Durchflusszytometrie untersucht.

Auf den HUVEC-Zellen konnte die größte Menge an endogenem Fibronectin nachgewiesen werden. Hier war das Produkt aus dem Anteil an positiv markierten Zellen und der mittleren Fluoreszenzintensität am größten (Abbildung 26). Die Detroit 562-Zellen zeigten, verglichen mit HEp-2-, A549- und HBMEC-Zellen, die untereinander eine ähnlich geringe Fibronectin-Expression aufwiesen, deutlich mehr Fibronectin auf der Oberfläche. Das Produkt aus dem Anteil an positiv markierten Zellen und der mittleren Fluoreszenzintensität war für Detroit 562-Zellen in diesem Vergleich etwa zehnmal größer (Abbildung 26).

Mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde für die Detroit 562-Zellen überprüft, ob die Zugabe von exogenem Fibronectin zu einer stärkeren Assoziation von Fibronectin auf der Zelloberfläche führte. Die Zellen wurden analog den Vorbereitungen für die *in vitro* Infektionsstudien auf Glasplättchen kultiviert und mit der entsprechenden Menge von 5 μ g humanem Plasma-Fibronectin behandelt. Der Nachweis von assoziiertem Fibronectin erfolgte über einen anti-Fibronectin-Antikörper und einen Alexa 488-konjugierten Sekundärantikörper. Als Kontrolle dienten unbehandelte Detroit 562-Zellen.

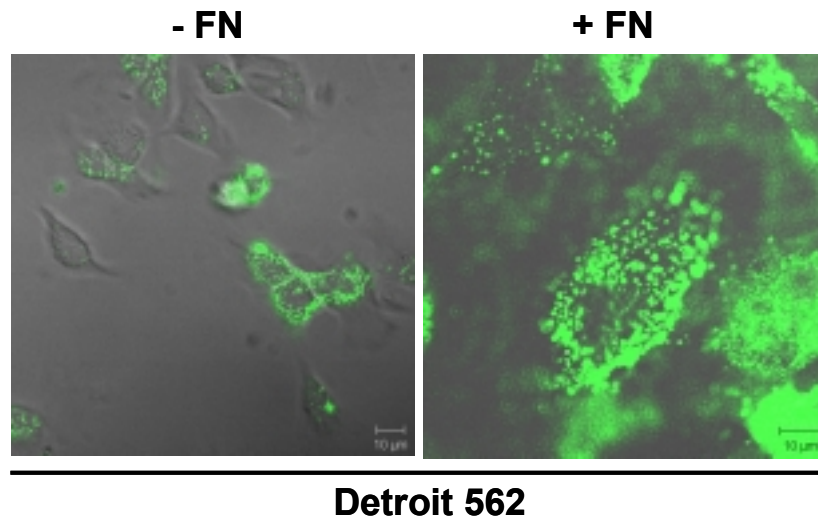


Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zum Nachweis von oberflächenassoziiertem Fibronektin auf humanen Nasopharynxzellen Detroit 562. Die Zellen wurden mit 5 µg/ml humanem Plasma-Fibronektin inkubiert (rechts). Oberflächenassoziiertes Fibronektin wurde durch einen anti-Fibronektin-Antikörper und einen Alexa 488-konjugierten Sekundärantikörper detektiert und leuchtete grün. Als Kontrolle dienten unbehandelte Detroit 562-Zellen (links).

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten die Expression von endogenem Fibronektin auf der Oberfläche von Detroit 562-Zellen (Abbildung 27). Es zeigte sich eine unregelmäßige Fibronektin-Expression auf den Detroit 562-Zellen. Einige Wirtszellen exprimierten kaum Fibronektin, und andere Detroit 562-Zellen hatten eine größere Menge an Fibronektin auf der Oberfläche gebunden. Durch die Zugabe von exogenem Fibronektin wurde die Assoziation von Fibronektin auf den Wirtszellen gesteigert, so dass es zu einer gleichmäßigeren, stärkeren Bindung von Fibronektin auf der Oberfläche der Epithelzellen kam (Abbildung 27).

4.2.6. Inhibition der Fibronektin-vermittelten Adhärenz durch Heparin

Die Bindung von *S. pneumoniae* an immobilisiertes Fibronektin wird durch die Zugabe von Heparin inhibiert (van der Flier *et al.*, 1995). Des Weiteren ist die Bindung von rekombinant aufgereinigtem PavA-Protein an immobilisiertes Fibronektin Heparin-sensitiv (Holmes *et al.*, 2001). Vor diesem Hintergrund wurde die Fibronektin-vermittelte Adhärenz an humane Wirtszellen in Gegenwart unterschiedlicher Mengen Heparin untersucht. Die Nasopharynx-epithelzellen Detroit 562 und die Hirnendothelzellen HBMEC wurden zunächst mit 5 µg/ml humanem Plasma-Fibronektin für 30 min bei 37°C inkubiert. Ungebundenes Protein wurde entfernt und die Zellen 20 min vor der Infektion mit *S. pneumoniae* Typ 35A mit 1 bis 100 U/ml Heparin behandelt. Die Infektion durch die Pneumokokken erfolgte in Gegenwart von Heparin mit einer MOI von 50 für 4 Stunden bei 37°C. Als Kontrolle wurden die Wirtszellen ohne Zugabe von Fibronektin oder Heparin mit den Bakterien inkubiert. Die

Auswertung der Infektionen erfolgte nach einer Immunfluoreszenzfärbung durch mikroskopisches Auszählen von mindestens 30 Zellen.

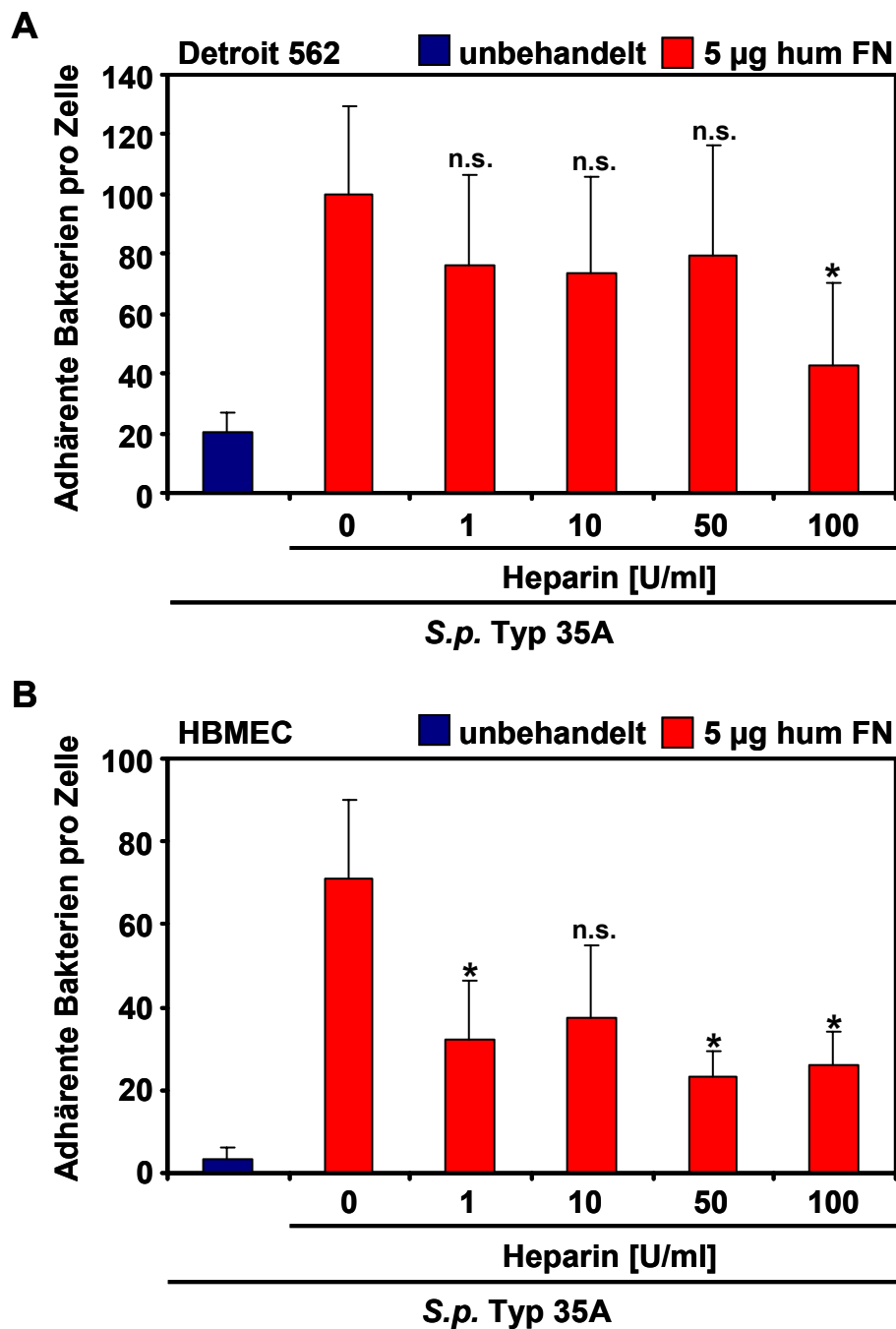


Abbildung 28: Inhibition der Fibronektin-vermittelten Adhärenz von *S. pneumoniae* an humane Wirtszellen durch Heparin.

Die Nasopharynxzellen Detroit 562 (A) und Hirnendothelzellen HBMEC (B) wurden zunächst mit 5 µg/ml humanem Plasma-Fibronectin bei 37°C für 30 min behandelt. Vor der Zugabe von 1 bis 100 U/ml Heparin wurde ungebundenes Fibronectin entfernt. Die Infektion erfolgte mit *S. p.* Typ 35A in Gegenwart von Heparin für 4 Stunden bei 37°C (rot). Zur Kontrolle wurden die Zellen ohne die Behandlung mit Fibronectin oder Heparin mit den Pneumokokken inkubiert (blau). Die Zahl adhärenter Bakterien pro Zelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung durch Auszählen am Mikroskop bestimmt. * $P < 0,05$; n.s. nicht signifikant

Zunächst konnte der Einfluss von Heparin auf die Fibronektin-vermittelte bakterielle Adhärenz an Detroit 562-Zellen beobachtet werden. Die Zahl angehefteter Pneumokokken stieg signifikant von $20,4 \pm 6,6$ auf $100 \pm 29,4$ je Wirtszelle nach Behandlung der Epithelzellen mit Fibronektin. In Gegenwart von 1 U/ml, 10 U/ml bzw. 50 U/ml Heparin wurde die Fibronektin-vermittelte Adhärenz auf $76,5 \pm 29,9$, $73,4 \pm 32,5$ bzw. $79,6 \pm 36,6$ Pneumokokken je Detroit 562-Zelle nicht signifikant reduziert. Erst die Zugabe von 100 U/ml Heparin senkte die Adhärenz signifikant um 57 % auf $42,7 \pm 27,6$ Bakterien je Wirtszelle (Abbildung 28 A). Geringere Mengen an Heparin führten zwar zu einer verminderten Zahl adhärenter Bakterien, die jedoch nicht signifikant war. Die Fibronektin-vermittelte Adhärenz von Pneumokokken an die Epithelzellen Detroit 562 wurde durch die Zugabe von 100 U/ml Heparin signifikant inhibiert (Abbildung 28 A).

Der Einfluss von Fibronektin auf die Anheftung der Erreger an die Endothelzelllinie HBMEC zeigte sich mit $71,1 \pm 18,9$ Bakterien pro Wirtszelle im Vergleich zu der Adhärenz in Abwesenheit von Fibronektin mit $3,1 \pm 2,8$ Bakterien pro Wirtszelle. Durch die Zugabe von 1 U/ml, 10 U/ml, 50 U/ml bzw. 100 U/ml Heparin wurde die Fibronektin-vermittelte Adhärenz auf $32 \pm 14,3$, $37,4 \pm 17,6$, $23,3 \pm 5,9$ bzw. $26 \pm 7,9$ Pneumokokken pro HBMEC-Zelle gesenkt (Abbildung 28B). Dies entsprach einer Reduktion der Zahl angehefteter Bakterien durch die Gegenwart von 10 U/ml Heparin um 47 %, die allerdings nicht signifikant war. Die Steigerung der Heparinmenge führte zu einer Inhibition der Fibronektin-vermittelten Adhärenz um über 60 %. Die Gegenwart von 1 U/ml, 50 U/ml und 100 U/ml Heparin übte einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die Fibronektin-vermittelte Adhärenz von *S. pneumoniae* an die Hirnendothelzellen HBMEC aus (Abbildung 28 B). Damit konnte gezeigt werden, dass Heparin sowohl einen inhibitorischen Effekt auf die Fibronektin-vermittelte Adhärenz von *S. pneumoniae* an die Epithelzelllinie Detroit 562 als auch an die Endothelzelllinie HBMEC ausübt.

4.2.7. Untersuchungen zum Einfluss von PavA auf die Fibronektin-vermittelte Adhärenz

PavA (pneumococcal adherence and virulence protein A) wurde 2001 als Fibronektin-bindendes Oberflächenprotein von *S. pneumoniae* identifiziert. Der PavA defiziente Stamm zeigte dabei eine um 50 % verminderte Bindung an immobilisiertes Fibronektin verglichen mit dem Wildtyp (Holmes *et al.*, 2001). Des Weiteren ergaben die bisherigen Untersuchungen, dass die Inaktivierung des *pavA*-Gens zu einer signifikanten Reduktion der Adhärenz von Pneumokokken an humane Wirtszellen führte. In den folgenden Experimenten wurde nun die Rolle von PavA in der Fibronektin-vermittelten Anheftung an eukaryotische Zellen analysiert.

4.2.7.1. Inhibition der Fibronektin-vermittelten Adhärenz durch anti-PavA-Antiserum

Zunächst wurde der Einfluss von anti-PavA-Antikörpern auf die Fibronektin-vermittelte Adhärenz überprüft. Es wurde untersucht, ob die Interaktion zwischen dem bakteriellen Oberflächenprotein und dem Fibronektin auf den Wirtszellen durch die Bindung von anti-PavA-Antikörpern an oberflächenassoziiertes PavA blockiert werden kann. Der Stamm *S. p.* Typ 35A wurde dazu mit 20 µg/ml anti-PavA-IgG vor der Infektion für 20 min bei 37°C inkubiert. Diese Antikörpermenge reichte in den Bindungsstudien mit immobilisiertem Fibronektin aus, um die Bindung der Pneumokokken an das immobilisierte Matrixprotein zu inhibieren. Die Bakterien wurden nach der Inkubation zusammen mit den überschüssigen Antikörpern für die Infektion von Nasopharynxzellen Detroit 562 und Hirnendothelzellen HBMEC, die jeweils mit 5 µg/ml Plasma-Fibronektin vorbehandelt waren, mit einer MOI von 50 eingesetzt. Die Pneumokokken vermehrten sich während der Infektionsdauer von 4 Stunden, und neu gebildetes PavA konnte so von den freien Antikörpern gebunden werden. Als Kontrolle erfolgte die Infektion der eukaryotischen Zellen zum einen ohne die vorherige Zugabe von exogenem Fibronektin und zum anderen ohne die Vorbehandlung der Erreger mit anti-PavA-IgG. Nach der Infektion wurden die Bakterien mit Fluorochromen markiert und die Zahl adhärenter Bakterien mikroskopisch ausgewertet.

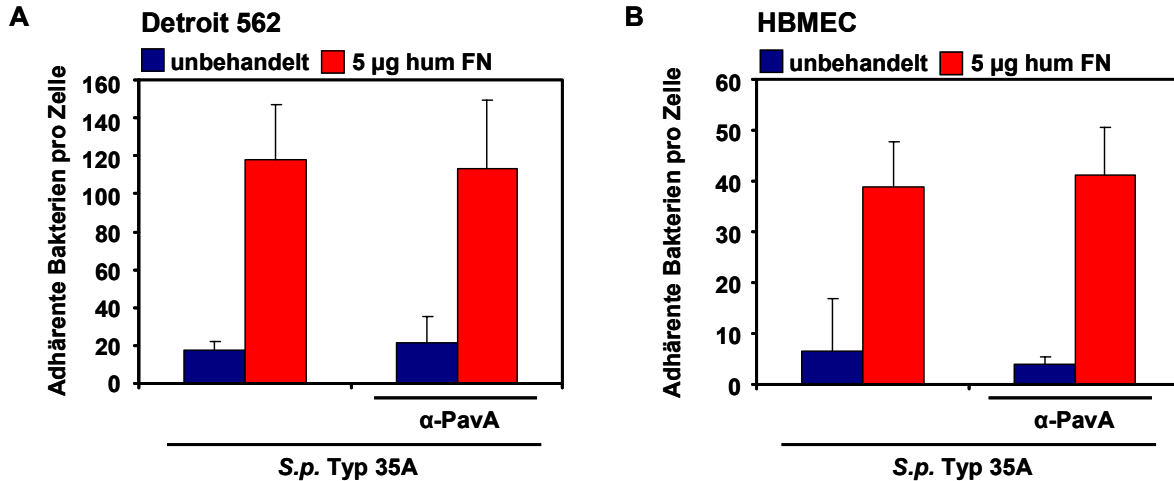


Abbildung 29: Inhibition der Fibronektin-vermittelten Adhärenz von *S. pneumoniae* Typ 35A an humane Wirtszellen mit anti-PavA-Antikörpern.

Die Pneumokokken wurden vor der Infektion mit 20 µg/ml anti-PavA-IgG für 20 min bei 37°C behandelt. Die Zugabe von 5 µg/ml exogenem humanen Plasma-Fibronektin zu den Nasopharynxzellen Detroit 562 (A) und den Hirnendothelzellen HBMEC (B) erfolgte für 30 min bei 37°C und ungebundenes Protein wurde vor der Infektion entfernt (rot). Als Kontrolle wurden die eukaryotischen Zellen ohne die Vorbehandlung mit Fibronektin infiziert (blau) bzw. die Bakterien ohne die Präinkubation mit anti-PavA-IgG für die Infektion eingesetzt. Die Zahl adhärenter Bakterien pro Zelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung durch Auszählen am Mikroskop bestimmt.

Die Vorbehandlung der Wirtszellen mit exogenem Fibronectin führte zu einer siebenfachen bzw. sechsfachen Steigerung der Adhärenz auf $117,9 \pm 29,5$ Bakterien je Detroit 562-Zelle bzw. $38,9 \pm 8,9$ Pneumokokken pro HBMEC-Zelle. Die Inkubation der Erreger mit anti-PavA-Antikörpern führte zu einer Adhärenz an mit Fibronectin-behandelte humane Zellen von $113,4 \pm 36,2$ Bakterien pro Detroit 562-Zelle und $41,1 \pm 9,6$ Erreger je HBMEC-Zelle (Abbildung 29). Es zeigte sich durch die Inkubation mit den anti-PavA-Antikörpern keine Reduktion der Fibronectin-vermittelten Adhärenz. Die Fibronectin-vermittelte Adhärenz der Pneumokokken an Detroit 562- und HBMEC-Zellen wurde durch die Zugabe von anti-PavA-Antikörpern nicht beeinflusst (Abbildung 29). Die Adhärenz von *S. pneumoniae* an die Epithelzelllinie Detroit 562 und die Endothelzelllinie HBMEC wurde in diesen Versuchen ebenfalls nicht durch die Zugabe von anti-PavA-Antikörpern inhibiert, wie bereits in Abbildung 12 gezeigt werden konnte.

4.2.7.2. Expression des Fusionsproteins MBP-PavA

Nachdem die Zugabe von anti-PavA-Antikörpern keinen inhibitorischen Einfluss auf die Fibronectin-vermittelte Anheftung von Pneumokokken an Wirtszellen ausübte, wurde nun rekombinant aufgereinigtes PavA-Protein zu Inhibitionsstudien eingesetzt. Bisher wurde das rekombinant exprimierte PavA-Protein verwendet, dass für die affinitätschromatographische Aufreinigung mit einem Histidin-Rest versehen war. Bei der Expression diesen Konstrukts in *E. coli* kam es zu der Bildung von Inclusion Bodies, die das PavA-Protein enthielten. Die Aufreinigung der Inclusion Bodies führte zwar zu einer hohen Proteinausbeute, das Protein lag allerdings in einer aggregierten und damit nicht löslichen Form vor. Aus diesem Grund wurde das *pavA*-Gen aus dem Expressionsplasmid pQE-30-*pavA* mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Pst*I herausgeschnitten, aufgereinigt und in den mit *Bam*HI und *Pst*I geschnittenen Expressionsvektor pMALc2x kloniert. Das Plasmid pMALc2x-*pavA* wurde durch eine Restriktion mit den Enzymen *Bam*HI und *Pst*I und eine Sequenzanalyse überprüft. Der pMALc2x-Vektor trägt die Sequenz für das Maltose-bindende-Protein (MBP). Die Expression in *E. coli* führte zu einem löslichen Fusionsprotein aus PavA und MBP im N-terminalen Bereich. Die affinitätschromatografische Aufreinigung des Fusionsproteins MBP-PavA wurde unter Verwendung einer Amylose-Säule durchgeführt. Die Expression und die Reaktivität des Proteins mit dem anti-PavA-Antikörper wurde in einem Immunblot überprüft. Dazu wurden Gesamtzelllysate des *E. coli*s, der das Plasmid pMALc2x-*pavA* trug, vor und nach der Induktion mit 0,3 mM IPTG und das aufgereinigte MBP-PavA-Fusionsprotein in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt. Als Kontrollen wurden das PavA-Protein, das aus Inclusion Bodies gewonnen wurde, mit einer Größe von 63 kDa und das aufgereinigte MBP-Protein mit einer Größe von 50,8 kDa aufgetragen. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und mit dem anti-PavA-Antikörper in einer Verdünnung

von 1:200 inkubiert. Zur Kontrolle wurde ein Immunblot mit anti-MBP-Serum (NEB) in einer Verdünnung von 1:10000 inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem 1:5000 verdünnten Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper und einer anschließenden Entwicklung mit Chloronaphthol.

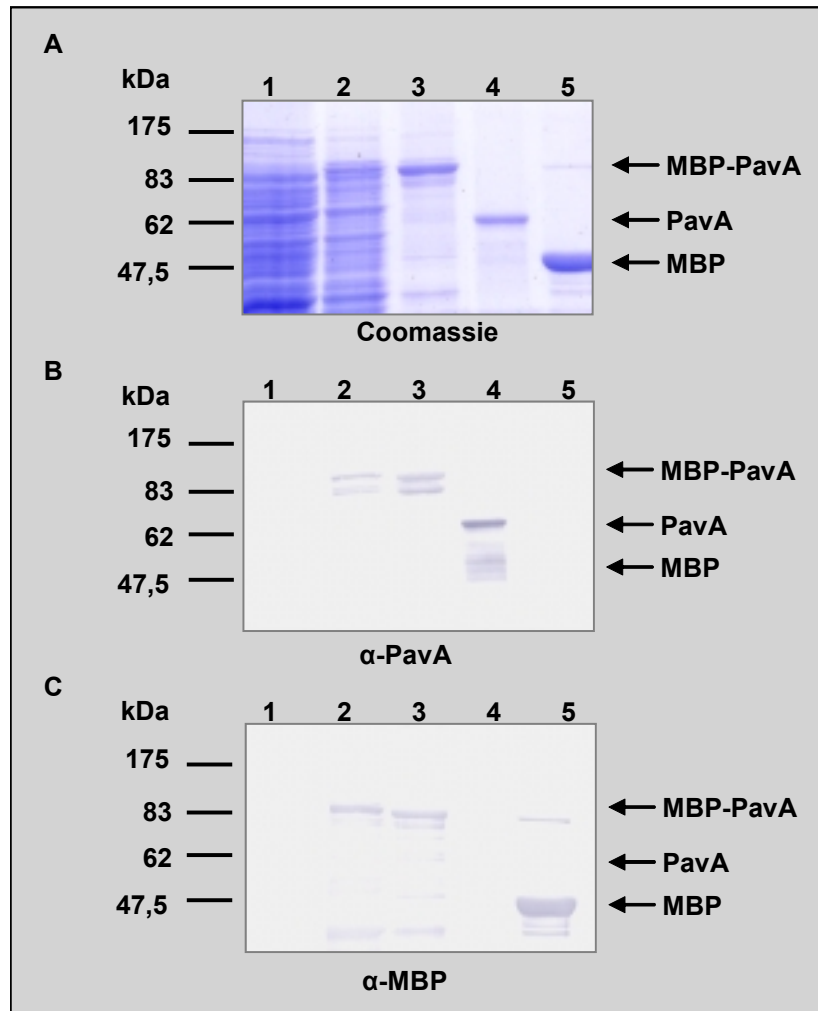


Abbildung 30: Reaktivität des MBP-PavA-Fusionsproteins mit anti-PavA- und anti-MBP-Antiserum. Die Proteine wurden in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt (A). Des Weiteren wurden die Proteine nach der Gelelektrophorese auf eine PVDF-Membran transferiert und mit anti-PavA IgG (B) bzw. anti-MBP-Serum (C) in einer Verdünnung von 1:200 bzw. 1:10000 inkubiert. Nach der Zugabe des 1:5000 verdünnten Peroxidase-konjugierten Zweitantikörpers erfolgte die Entwicklung mit Chloronaphthol.
(1) Bakterienlysate *E. coli*; (2) Bakterienlysate *E. coli* induziert mit 3 mM IPTG; (3) MBP-PavA (105,5 kDa); (4) PavA aus Inclusion Bodies mit His₆-tag (63 kDa); (5) MBP-βGal (50,8 kDa)

Die Coomassie-Färbung des aufgetrennten Bakterienlysats der induzierten Kultur zeigte die Expression des Fusionsproteins (Spur 2 in Abbildung 30 A). Das Molekulargewicht ergab sich aus dem MBP-Protein mit 42,5 kDa und PavA mit 63 kDa zu 105,5 kDa. Das MBP-Protein, das als Kontrolle diente, hatte eine Größe von 50,8 kDa, da es fusioniert mit β-Galaktosidase vorlag (Spur 5 in Abbildung 30). Das aus Inclusion Bodies aufgereinigte

PavA-Protein mit einem His₆-tag hatte eine Größe von 63 kDa (Spur 4 in Abbildung 30). Der anti-PavA-Antikörper reagierte mit dem MBP-PavA-Fusionsprotein im Immunblot (Abbildung 30 B). Das verwendete anti-MBP-Serum zeigte keine Kreuzreaktion mit dem reinen PavA-Protein (Spur 4 in Abbildung 30 C).

4.2.7.3. Bindung des Fusionsproteins MBP-PavA an Fibronectin

Es wurde bereits von Holmes *et al.* gezeigt, dass PavA, rekombinant über einen His₆-tag aufgereinigt, an immobilisiertes Fibronectin bindet. Diese Eigenschaft wurde nun für das MBP-PavA-Fusionsprotein untersucht. Es wurde jeweils 0,5 µg humanes Fibronectin in den Vertiefungen einer Platte mit 96 Vertiefungen immobilisiert und anschließend mit 5 % Magermilch abgesättigt. Es folgte die Inkubation verschiedener Mengen rekombinant aufgereinigtem MBP-PavA mit dem immobilisierten Fibronectin. Zur Kontrolle wurde parallel überprüft, ob MBP allein die Fähigkeit besitzt, an immobilisiertes Fibronectin zu binden. Gebundenes MBP-PavA bzw. MBP wurde durch die Zugabe von anti-PavA-IgG bzw. anti-MBP-Serum detektiert. Nach der Inkubation mit Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper erfolgte die Entwicklung mit ABTS und H₂O₂ für 30 min. Anschließend wurde die Absorption bei 405 nm gemessen. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Die erhaltenen Daten wurden mit den Werten für die Hintergrundbindung des 1. und 2. Antikörpers normalisiert.

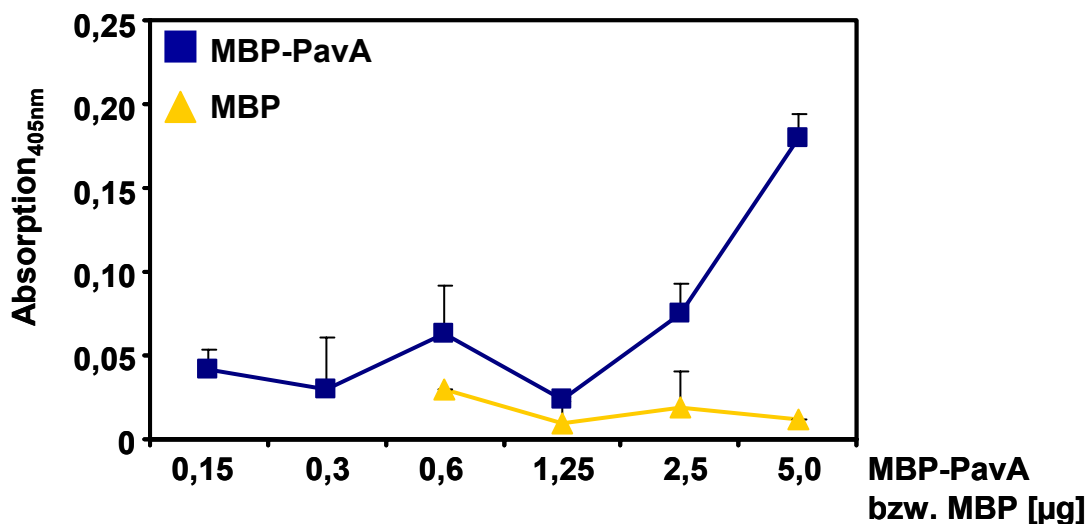


Abbildung 31: Bindung von MBP-PavA an immobilisiertes Fibronectin. Es wurden je 0,5 µg humanes Fibronectin je Vertiefung einer Platte mit 96 Vertiefungen immobilisiert. Nach der Absättigung mit 5 % Magermilch wurden die angegebenen Mengen der rekombinant aufgereinigten Proteine MBP-PavA und als Kontrolle MBP mit dem immobilisierten Fibronectin für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde gebundenes MBP-PavA (blau) bzw. MBP (gelb) über die Zugabe von anti-PavA-IgG (1:100) bzw. MBP-Serum (1:10000) und des Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpers (1:5000) detektiert. Die Entwicklung erfolgte mit ABTS und H₂O₂ für 30 min und die Absorption bei 405 nm wurde gemessen.

Die Auswertung der Bindungsstudien von MBP-PavA an immobilisiertes Fibronectin zeigte, dass MBP-PavA dosisabhängig an das immobilisierte Wirtsprotein Fibronectin bindet. Dabei kam es zu einer deutlichen Steigerung der Bindung von 5 µg im Vergleich zu 2,5 µg eingesetztem MBP-PavA an Fibronectin. Die Kontrolle mit aufgereinigtem MBP allein zeigte keine Bindung an Fibronectin. Damit konnte auch für das rekombinante Fusionsprotein MBP-PavA die Bindung an immobilisiertes Fibronectin und gleichzeitig die funktionelle Aktivität von MBP-PavA nachgewiesen werden.

4.2.7.4. Inhibition der Fibronectin-vermittelten Adhärenz durch MBP-PavA

In den folgenden Experimenten wurde das Fusionsprotein MBP-PavA eingesetzt. Um auszuschließen, dass mögliche Bindungen des Fusionsproteins an Wirtszell- oder Erregerkomponenten über dessen N-terminalen Bereich, das MBP-Protein, vermittelt werden, wurde in allen Ansätzen parallel die Kontrolle mit aufgereinigtem MBP-Protein durchgeführt.

Es wurde untersucht, ob die Zugabe des rekombinant aufgereinigten PavA-Proteins die Fibronectin-vermittelte Adhärenz von *S. pneumoniae* an humane Wirtszellen vermindert, in dem es mögliche Bindungspartner der Erreger blockiert. Die Nasopharynxepithelzellen Detroit 562 und die Hirnendothelzellen HBMEC wurden zunächst mit 5 µg/ml humanem Plasma-Fibronectin für 30 min bei 37°C behandelt und ungebundenes Protein im Anschluss entfernt. Es folgte eine 20 minütige Inkubation der Wirtszellen mit 50 µg/ml MBP-PavA bzw. MBP-Protein als Kontrolle bei 37°C. Die rekombinanten Proteine verblieben während der sich anschließenden Infektion mit *S. pneumoniae* Typ 35A für 4 Stunden bei 37°C in den Ansätzen. Zur Kontrolle wurden die Versuche ohne die Vorbehandlung der Wirtszellen mit Fibronectin oder PavA-Protein durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch mikroskopisches Auszählen adhärenter Bakterien nach einer Immunfluoreszenzfärbung.

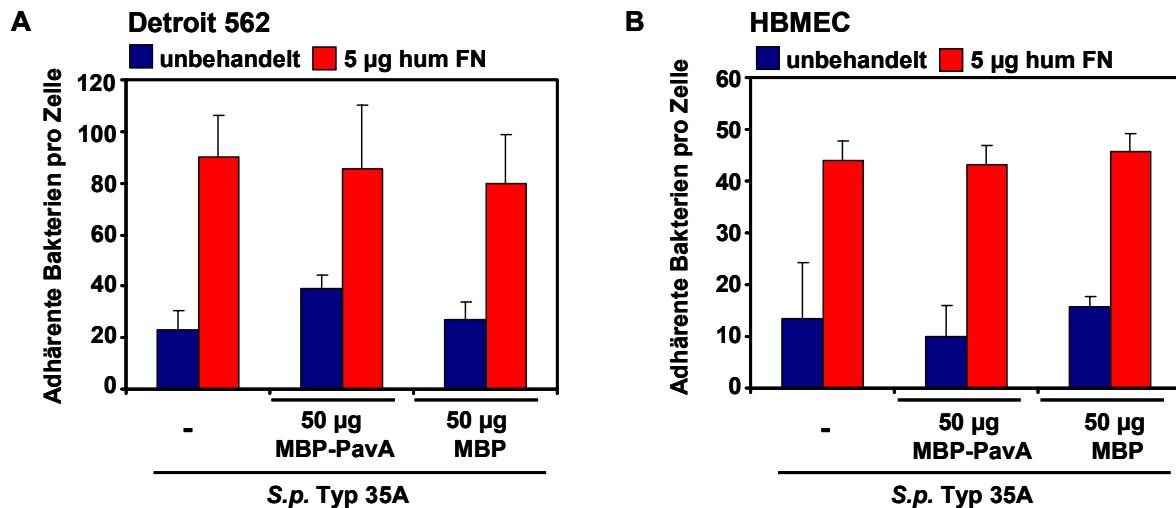


Abbildung 32: Inhibition der Fibronektin-vermittelten Adhärenz von *S. pneumoniae* an die Wirtszellen mit MBP-PavA. Die humanen Nasopharynxzellen Detroit 562 (A) und die Hirnendothelzellen HBMEC (B) wurden mit 5 µg/ml humanem Plasma-Fibronektin behandelt und ungebundenes Fibronektin nach der Inkubation entfernt (rot). Die Zugabe von 50 µg/ml MBP-PavA- bzw. MBP-Protein erfolgte 20 Minuten vor der Infektion mit *S. p.* Typ 35A und verblieben in den Ansätzen. Zur Kontrolle wurde die Infektion ohne die Vorbehandlung der eukaryotischen Zellen mit Fibronektin durchgeführt (blau). Die Wirtszellen wurden mit einer MOI von 50 für 4 Stunden bei 37°C infiziert. Die Zahl adhärenter Bakterien pro Zelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung durch Auszählen am Mikroskop bestimmt.

Die Zugabe von Fibronektin verstärkte signifikant die bakterielle Adhärenz um das 4- bzw. 3-fache an die Epithelzelllinie Detroit 562 bzw. die Endothelzelllinie HBMEC (Abbildung 32 A bzw. B). Die Zahl adhärenter Pneumokokken je Detroit 562-Zelle lag nach Behandlung mit Fibronektin bei $89,9 \pm 16$. In Gegenwart des MBP-PavA-Fusionsproteins wurde die Fibronektin-vermittelte Adhärenz mit $85,7 \pm 24,4$ Bakterien je Wirtszelle nicht beeinflusst. Weiter zeigte auch das MBP-Protein als Kontrollprotein keinen Effekt. Die Adhärenz lag hier bei $80 \pm 18,6$ Bakterien je Detroit 562-Zelle. Die Zugabe von MBP-PavA ohne eine Vorbehandlung der Wirtszellen mit Fibronektin führte zwar zu einer leichten, aber nicht signifikanten Steigerung der Adhärenz von $23,2 \pm 7,3$ auf $39,1 \pm 5$ Bakterien pro Detroit 562-Zelle (Abbildung 32 A). Für die Infektion der Hirnendothelzellen HBMEC ergab sich insgesamt ein ähnliches Bild. Die Fibronektin-vermittelte Adhärenz mit $44 \pm 3,7$ Bakterien je Wirtszelle wurde weder durch die Gegenwart von MBP-PavA noch durch das MBP-Protein beeinflusst. Die Adhärenz lag hier bei $43,3 \pm 3,6$ Bakterien pro HBMEC-Zelle bzw. $45,6 \pm 3,5$ Pneumokokken je Wirtszelle. Auch die Zugabe der rekombinanten Proteine zeigte keinerlei Einfluss auf die direkte Adhärenz von *S. pneumoniae* an HBMEC-Zellen ohne die vorherige Inkubation mit Fibronektin (Abbildung 32 B). Zusammenfassend wurde weder die Fibronektin-vermittelte Adhärenz von Pneumokokken an Detroit 562- und HBMEC-Zellen durch die Zugabe von anti-PavA-Antikörpern noch durch die Gegenwart von rekombinantem PavA-Protein beeinflusst.

4.2.7.5. Fibronectin-vermittelte Adhärenz von *pavA*-defizienten Pneumokokken

Zur weiteren Untersuchung der Rolle von PavA in der Fibronectin-vermittelten Anheftung wurden *pavA*-defiziente Pneumokokken des Serotyp 35A-Stammes für die Infektion von Detroit 562- und HBMEC-Zellen nach der Zugabe von Fibronectin eingesetzt. Es wurde bereits gezeigt, dass die Adhärenz von *pavA*-Mutanten an humane Epithel- und Endothelzellen im Vergleich zu dem isogenen Wildtyp signifikant reduziert ist (Abbildungen 6 und 7). Gleichzeitig ist PavA nicht das einzige Fibronectin-bindende Protein von *S. pneumoniae*, da Stämme mit inaktivem *pavA*-Gen noch eine 50 %ige Bindung an immobilisiertes Fibronectin im Vergleich zum Wildtyp erreichten (Holmes *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurde im folgenden überprüft, ob die Zugabe von Fibronectin die Adhärenz von *pavA*-defizienten Erregern an Detroit 562- und HBMEC-Zellen beeinflusst. Die humanen Wirtszellen wurden dazu mit 5 µg/ml humanem oder bovinem Plasma-Fibronectin für 30 min bei 37°C vor der Infektion inkubiert. Ungebundenes Protein wurde entfernt. Die Zellen wurden mit *S. p.* 35AΔ*pavA* und einer MOI von 50 für 4 Stunden infiziert. Die Bakterien wurden nach der Infektion mit Fluorochromen markiert und die Zahl adhärenter Bakterien mikroskopisch bestimmt.

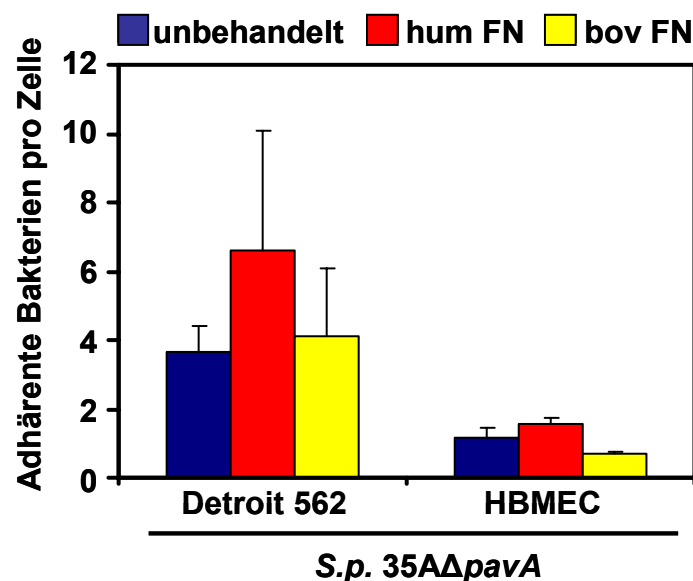


Abbildung 33: Fibronectin-vermittelte Adhärenz von *pavA*-defizienten Pneumokokken an humane Wirtszellen.

Die Nasopharynxzellen Detroit 562 und die Hirnendothelzellen HBMEC wurden vor der Infektion mit 5 µg/ml humanem (rot) oder bovinem Fibronectin (gelb) für 30 min bei 37°C inkubiert und ungebundenes Fibronectin anschließend entfernt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen (blau) mit *S. p.* Typ 35AΔ*pavA* für 4 Stunden infiziert. Die Zahl adhärenter Bakterien pro Zelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung durch Auszählen am Mikroskop bestimmt.

Die Präinkubation der Detroit 562- und HBMEC-Zellen mit Fibronectin führte im Gegensatz zu einer Infektion mit Wildtyp-Pneumokokken zu keiner signifikanten Steigerung der

Adhärenz von *pavA*-defizienten Bakterien. Die *pavA*-Mutante heftete sich mit $3,7 \pm 0,7$ Bakterien je Detroit 562- bzw. mit $1,2 \pm 0,3$ Erreger je HBMEC-Zelle an (Abbildung 33). Die Vorbehandlung der Nasopharynxepithelzellen mit humanem bzw. bovinem Fibronectin resultierte in $6,6 \pm 3,5$ bzw. $4,1 \pm 2$ adhärenzte Bakterien je Zelle. Für HBMEC-Zellen wurde nach der Zugabe von humanem bzw. bovinem Fibronectin $1,6 \pm 0,1$ bzw. $0,7 \pm 0,1$ angeheftete Bakterien je Zelle beobachtet (Abbildung 33). Damit zeigte die Präinkubation der Wirtszellen mit Plasma-Fibronectin keine Auswirkung auf das Adhärenzverhalten von *pavA*-defizienten Pneumokokken.

4.2.8. Bedeutung des zellgebundenen Fibronectins für die Invasion von Pneumokokken in Wirtszellen

In den vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass durch die Vorbehandlung von Wirtszellen mit Fibronectin die Adhärenz von *Streptococcus pneumoniae* signifikant gesteigert werden konnte. Um den entsprechenden Einfluss von Fibronectin auf die Internalisierung der Erreger in humane Zellen zu untersuchen, wurden Antibiotika-Schutz-Versuche durchgeführt. Nasopharynxepithelzellen Detroit 562 und Hirnendothelzellen HBMEC wurden mit 5 µg/ml humanem Plasma-Fibronectin für 30 min bei 37°C inkubiert. Das ungebundene Fibronectin wurde entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit *S. p.* Typ 35A mit einer MOI von 50 für 4 Stunden bei 37°C infiziert. Durch die Zugabe von Gentamicin und Penicillin G für 1 Stunde bei 37°C wurden die extrazellulären Bakterien abgetötet. Die Lyse der eukaryotischen Zellen erfolgte mit Saponin und die so freigesetzten intrazellulären Bakterien wurden in einer angemessenen Verdünnung auf Blutagar inkubiert.

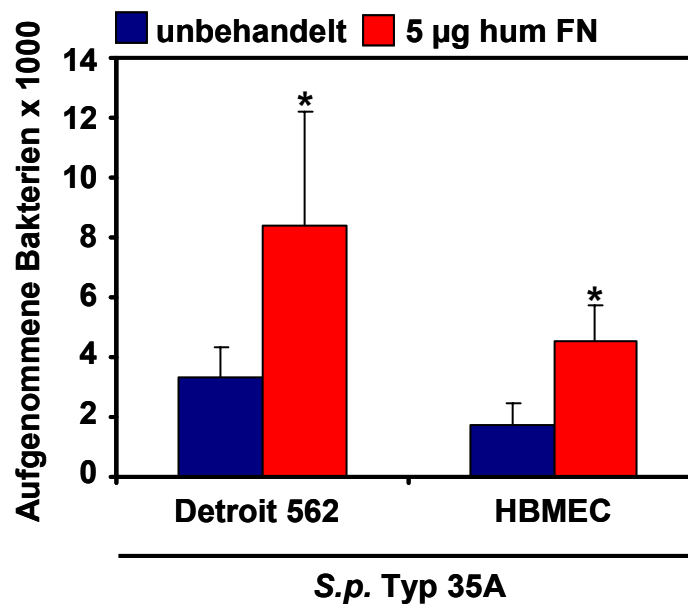


Abbildung 34: Fibronektin-vermittelte Invasion von *S. pneumoniae* in humane Nasopharynxzellen Detroit 562 und Hirnendothelzellen HBMEC. Die Epithel- und Endothelzellen wurden mit 5 µg/ml humanem Fibronektin vorbehandelt (rot) und anschließend mit *S. p. Typ 35A* für 4 Stunden infiziert. Als Kontrolle wurden die Zellen ohne die Zugabe von Fibronektin mit Pneumokokken inkubiert (blau). Die Zahl internalisierter Bakterien wurde durch einen Antibiotika-Schutz-Versuch und anschließendes Ausplattieren der freigesetzten Erreger bestimmt. * $P < 0,01$

Die Auswertung der Kolonie-bildenden Einheiten (CFU) zeigte, dass die Zahl internalisierter Pneumokokken je Vertiefung durch die Präinkubation der Zellen mit Fibronektin signifikant um das 2,5-fache erhöht wurde (Abbildung 34). Die Invasion in Detroit 562-Zellen stieg durch die Zugabe von Fibronektin von 3326 ± 1005 auf 8375 ± 3829 Bakterien je Zellschicht. Die Behandlung von HBMEC-Zellen mit Fibronektin bewirkte einen Anstieg von 1754 ± 720 auf 4514 ± 1201 internalisierter Erreger pro Zellschicht.

4.2.9. Funktionelle Bedeutung des Zytoskeletts für die Fibronektin-vermittelte Invasion von *S. pneumoniae* in humane Wirtszellen

Da sich die Zahl internalisierter Pneumokokken durch die Präinkubation der Wirtszellen mit Fibronektin erhöhte, wurde nun die Rolle des Zytoskeletts in diesem Prozess untersucht. Detroit 562-Zellen wurden mit pharmakologischen Inhibitoren des Aktin-Zytoskeletts wie Cytochalasin D, Latrunculin B und Jasplakinolid und der Mikrotubuli wie Nocodazol inkubiert. Dabei bindet Cytochalasin D an die wachsenden Enden der Aktin-Filamente und blockiert damit die Assoziation und Deassoziierung der Aktinmonomere. Latrunculin B bindet ebenfalls an die Aktinmonomere und verhindert die Polymerisation. Jasplakinolid inhibiert die Depolymerisation der Aktin-Filamente. Die Inhibition der Aktin-Polymerisation führt zu der Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts. Nocodazol bewirkt als Inhibitor die Depolymerisation der

Mikrotubuli. Die Epithelzellen wurden zunächst mit 5 µg/ml humanem Fibronectin für 30 min bei 37°C inkubiert und ungebundenes Protein entfernt. Anschließend wurden die humanen Wirtszellen mit 2 µM Cytochalasin D, 1 µM Latrunculin B, 1 µM Jasplakinolid bzw. 20 µM Nocodazol für 30 min bei 37°C behandelt. Die Infektion erfolgte mit *S. p.* Typ 35A und einer MOI von 50 für 4 Stunden bei 37°C in Gegenwart der Zytoskelett-Inhibitoren. Danach wurden extrazelluläre Bakterien durch die Zugabe von Gentamicin und Penicillin G abgetötet und die intrazellulären Erreger nach der Lyse mit Saponin auf Blutagar ausplattiert. Als Kontrolle wurden die mit Fibronectin-behandelten Wirtszellen in Gegenwart der entsprechenden Menge des für die Inhibitoren verwendeten Lösungsmittels DMSO mit den Pneumokokken infiziert.

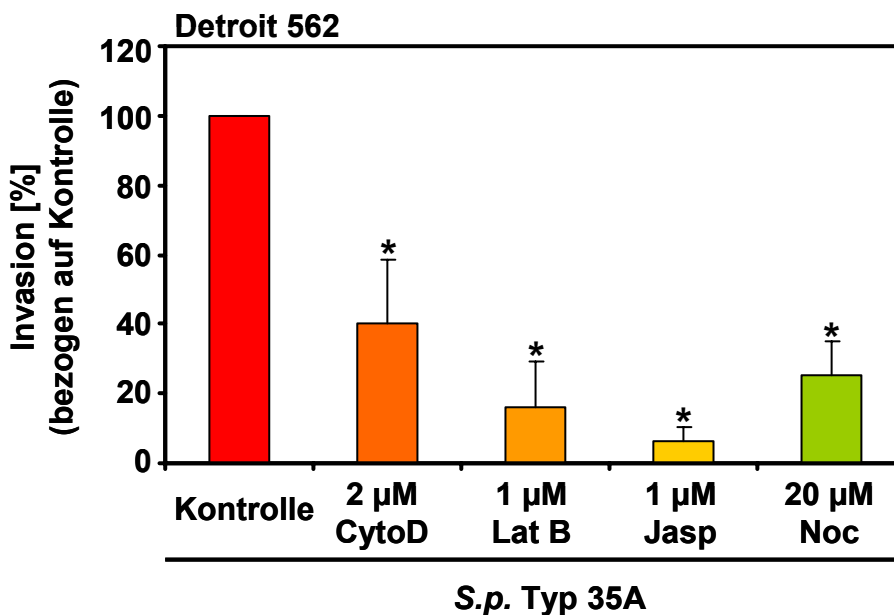


Abbildung 35: Einfluss des Zytoskeletts auf die Fibronectin-vermittelte Invasion von *S. pneumoniae* in humane Nasopharynxzellen Detroit 562.

Die Epithelzellen wurden zunächst mit 5 µg/ml Fibronectin behandelt. Nachdem ungebundenes Fibronectin entfernt worden war, wurden die Wirtszellen mit 2 µM Cytochalasin D, 1 µM Latrunculin B, 1 µM Jasplakinolid bzw. 20 µM Nocodazol oder der entsprechenden Menge DMSO für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Infektion mit *S. p.* Typ 35A erfolgte in Gegenwart der Inhibitoren für 4 Stunden bei 37°C. Die Zahl internalisierter Bakterien wurde durch einen Antibiotika-Schutz-Versuch ermittelt und für den Kontrollansatz als 100 % gesetzt. Die Invasion in Gegenwart der Inhibitoren wurde in Relation zur Kontrolle angegeben. * $P < 0,001$

In Gegenwart der Aktin-Zytoskelett-Inhibitoren Cytochalasin D, Latrunculin B bzw. Jasplakinolid lag die Internalisierung der Pneumokokken bei 40,4 % ± 18,2 %, 16,21 % ± 12,93 % bzw. 6,4 % ± 4,08 % im Vergleich zu den Kontrollinfektionen, die nicht mit den Inhibitoren behandelt wurden. Die Inkubation der Wirtszellen mit Nocodazol führte zu einer relativen Invasion von *S. pneumoniae* von 25 % ± 9,9 % (Abbildung 35). Die Zugabe der Inhibitoren der Aktinpolymerisation Cytochalasin D, Latrunculin B und Jasplakinolid und des Inhibitors der Microtubulibewegung Nocodazol reduzierte die Fibronectin-vermittelte

Aufnahme von *S. pneumoniae* in Detroit 562-Zellen signifikant (Abbildung 35). Diese Ergebnisse weisen auf die Beteiligung des Zytoskeletts von Wirtszellen an der Fibronektin-vermittelten Invasion von Pneumokokken hin.

4.2.10. Untersuchungen der Rolle spezifischer Kinasen in der Fibronektin-vermittelten Invasion von *S. pneumoniae*

In eukaryotischen Zellen werden sowohl Signale von außen in das Zellinnere als auch in umgekehrter Richtung weitergeleitet. Für diese Signalübermittlung werden spezifische Enzyme wie Phosphotyrosinkinasen innerhalb der Zelle benötigt. Wichtige Komponenten der Signalwege, die für die Reorganisation des Zytoskeletts eine zentrale Rolle spielen und damit an der Fibronektin-vermittelten Invasion von *S. pneumoniae* beteiligt sein können, wurden in weiteren Infektionsversuchen untersucht. Dabei wurde im besonderen die funktionelle Bedeutung der Phosphotyrosinkinasen, der Src-Kinasen und der Phosphatidylinositol (PI-3)-Kinase analysiert. Diese Kinasen sind Teil der Signalkaskaden, die an der Ausbildung von fokalen Adhäsionen beteiligt sind, die das Zytoskelett der Wirtszelle mit den Komponenten der extrazellulären Matrix verbinden. Die Assoziation und Deassoziation der fokalen Adhäsionen spielen eine große Rolle in der Zellmigration.

Die Nasopharynxepithelzellen Detroit 562 wurden zunächst mit 5 µg/ml humanem Fibronektin inkubiert, das im Anschluss aus dem Kulturüberstand entfernt wurde. Dann folgte die Behandlung der Zellen mit Inhibitoren verschiedener Kinasen für 30 min bei 37°C. Es wurde der Einfluss des allgemeinen Phosphotyrosinkinase (PTK)-Inhibitors Genistein und des spezifischen Inhibitors der Familie der Src-Kinasen PP2 auf die Fibronektin-vermittelte Internalisierung untersucht. Weiter wurde die Rolle der Phosphatidylinositol (PI-3)-Kinase durch die Zugabe des Inhibitors Wortmannin und der auf die PI-3-Kinase spezifisch wirkenden Substanz LY294002 überprüft. Die Infektion mit *S. p.* Typ 35A wurde mit einer MOI von 50 in Gegenwart der Inhibitoren für 4 Stunden durchgeführt. Da die inhibitorischen Substanzen in DMSO gelöst vorlagen, wurden die Fibronektin-behandelten Zellen zur Kontrolle anstelle von Inhibitoren mit der entsprechenden Menge an DMSO versetzt und mit den Erregern infiziert. Die Bestimmung der Zahl intrazellulärer Bakterien erfolgte über einen Antibiotika-Schutz-Versuch mit anschließendem Ausplattieren der Pneumokokken auf Blutagarplatten. Die Zahl internalisierter Bakterien aus dem Kontrollansatz wurde als 100 % definiert und die Invasion der Pneumokokken in Gegenwart der Inhibitoren in Relation dazu angegeben.

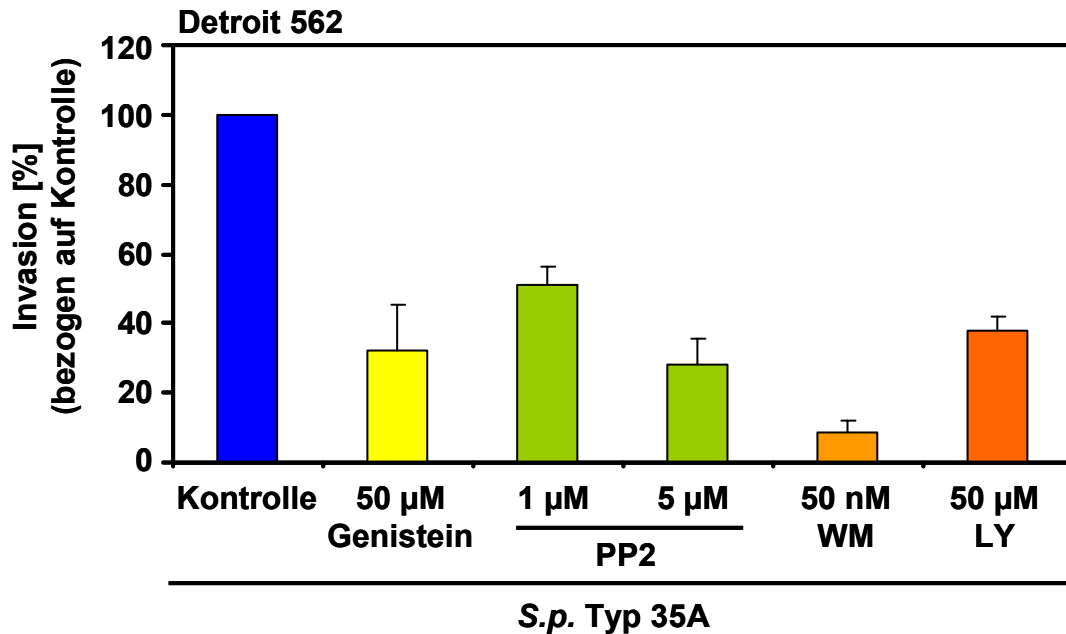


Abbildung 36: Inhibition der Fibronectin-vermittelten Invasion von *S. pneumoniae* in humane Wirtszellen in Gegenwart von Kinase-Inhibitoren. Die Nasopharynxzellen Detroit 562 wurden zunächst mit 5 µg/ml Fibronectin inkubiert und ungebundenes Protein anschließend entfernt. Vor der Infektion mit *S. p. Typ 35A* wurden die Epithelzellen für 30 min mit den Inhibitoren in den angegebenen Konzentration behandelt. Die Infektion erfolgte in Gegenwart der Inhibitoren für 4 Stunden. Dabei inhibierte Genistein allgemein die Phosphotyrosinkinase (PTK)-Aktivität (gelb), PP2 inhibierte spezifisch die Familie der Src Kinasen (grün). Wortmannin (WM) ist u.a. ein Inhibitor der PI-3-Kinase (orange) und LY294002 (LY) inhibierte spezifisch die PI-3-Kinase-Aktivität (rot). Als Kontrolle wurden die Detroit 562-Zellen ohne die Zugabe von Inhibitoren mit Pneumokokken infiziert (blau). Es wurde ein Antibiotika-Schutz-Experiment durchgeführt, um nach der Kultivierung auf Blutagar die Zahl internalisierter Bakterien zu bestimmen. Die Zahl internalisierter wurde für den Kontrollansatz als 100 % definiert. Die Invasion in Gegenwart der Inhibitoren wurde in Relation zur Kontrolle angegeben.

Die relative Invasionsrate war in Gegenwart von 50 µM des allgemeinen PTK-Inhibitors Genistein auf $32,2 \pm 13,4$ % verringert. Die Zugabe von 1 µM bzw. 5 µM des spezifischen Inhibitors der Familie der Src-Kinase führte zu einer Verringerung der Internalisierung von Pneumokokken in Detroit 562-Zellen auf $51,2 \pm 4,8$ % bzw. $27,9 \pm 7,8$ % im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 36). Die Behandlung der Wirtszellen mit 50 nM des PI-3-Kinase-Inhibitors Wortmannin resultierte in einer Absenkung der Invasionsrate auf $8,8 \pm 3,5$ % und der spezifisch auf die PI-3-Kinase wirkende Inhibitor LY294002 führte zu einer Invasionsrate von $38,2 \pm 3,9$ % (Abbildung 36). Damit sind sowohl Phosphotyrosinkinasen als auch PI-3-Kinasen an der Fibronectin-vermittelten Internalisierung von *S. pneumoniae* in Detroit 562-Zellen beteiligt. Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass das Zytoskelett, dessen Reorganisation und die Phosphotyrosinkinasen, Src-Kinasen und PI-3-Kinasen eine wichtige Funktion in der Fibronectin-vermittelten Invasion von Pneumokokken in Detroit 562-Zellen haben.

Eine weitere Kinase, die an der Umwandlung von Proteinkomplexen, die mit fokalen Kontakten assoziiert sind, und damit zu einer Beweglichkeit von Zellen führt, ist die fokale Adhäsionskinase (FAK). Die Aktivität der FAK spielt z. B. in der Integrin-vermittelten Internalisierung von *S. aureus* eine wichtige Rolle. Dabei bindet *S. aureus* über das Brückenmolekül Fibronectin an das β_1 -Integrin der Wirtszelle (Agerer *et al.*, 2003 und 2005). Im folgenden wurde überprüft, ob die FAK auch an der Invasion von *S. pneumoniae* in eukaryotische Zellen beteiligt ist. Dazu wurden Fibroblasten aus FAK-defizienten Mausembryos (FAK(-)-Zellen) und HA-FAK reexprimierende Fibroblasten (FAK(+)-Zellen) mit Pneumokokken infiziert und die Zahl internalisierter Bakterien über ein Antibiotika-Schutz-Experiment ermittelt. Die FAK(+)-Zellen wurden zunächst mit 5 μ g/ml Fibronectin präinkubiert und anschließend mit *S. p.* Typ 35A mit einer MOI von 50 in einer Kinetik für 1, 2 und 3 Stunden infiziert, um die geeignete Infektionsdauer zu ermitteln (Abbildung 37 A).

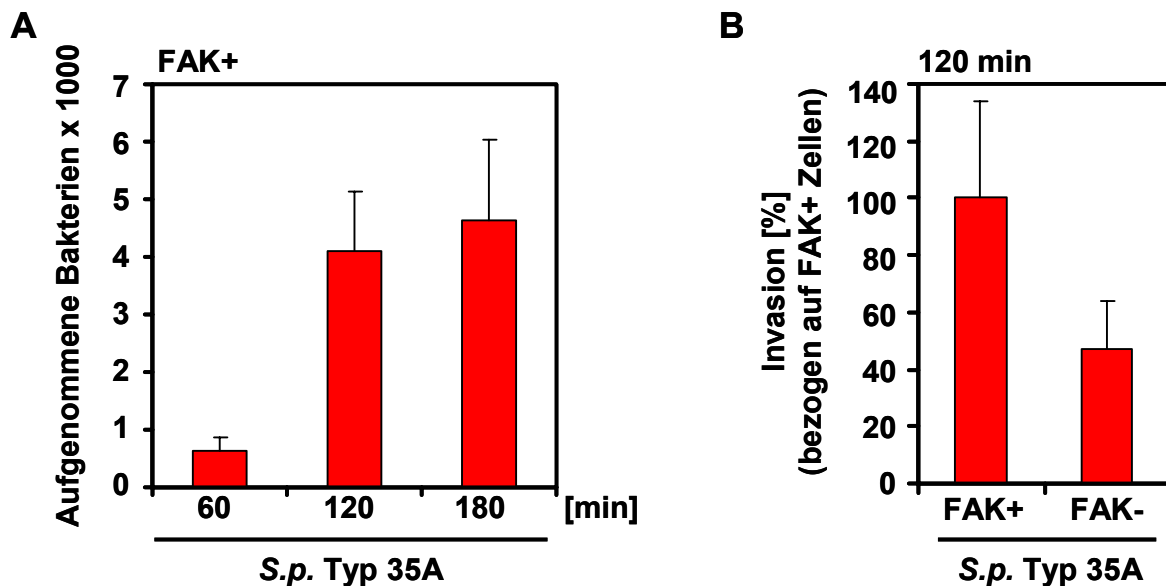


Abbildung 37: Rolle von FAK in der Fibronectin-vermittelten Invasion von *S. pneumoniae*. Die FAK defizienten (FAK-) und die FAK reexprimierenden (FAK+) Mausembryonalen Fibroblasten wurden zunächst mit 5 μ g/ml humanem Fibronectin vorbehandelt und anschließend mit *S. p.* Typ 35A mit einer MOI von 50 für die angegebene Dauer infiziert. Die Invasion der Erreger wurde durch Antibiotika-Schutz-Experimente und Plattieren der Kolonien ermittelt. In (A) ist die Zahl intrazellulärer Bakterien je Vertiefung der Infektionskinetik mit FAK(+)-Zellen dargestellt. (B) zeigt die relative Invasionsrate von Pneumokokken in FAK(-)-Zellen bezogen auf die Invasion in FAK reexprimierende Fibroblasten bei einer Infektionsdauer von 2 Stunden. Die Graphen zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 Versuchen, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden.

Die Zahl internalisierter Pneumokokken in FAK reexprimierende Mausembryonalen Fibroblasten stieg über die Zeit. Nach einer Stunde Infektion wurden $628,7 \pm 226,1$ intrazelluläre Bakterien je Vertiefung isoliert, nach 2 Stunden waren es $4090,8 \pm 1391,9$ und nach 3 Stunden $4635 \pm 1391,9$ Bakterien pro Vertiefung (Abbildung 37 A). Damit war die Aufnahme von *S. pneumoniae* in FAK reexprimierende Mausembryonalen Fibroblasten nach 2 bis 3 Stunden mit der

Invasion in Fibronectin-behandelte Detroit 562- oder HBMEC-Zellen vergleichbar (Abbildung 34). Für den Vergleich der Internalisierung in FAK(-)-Zellen mit FAK reexprimierenden Fibroblasten wurden die Zellen nach der Inkubation mit humanem Fibronectin für 2 Stunden mit *S. p.* Typ 35A infiziert. Die Zahl intrazellulärer Pneumokokken, ermittelt durch den Antibiotika-Schutz-Versuch, in FAK(+)-Zellen wurde als 100 % definiert und die Invasion in FAK(-)-Zellen in Relation dazu angegeben (Abbildung 37 B). Es konnte gezeigt werden, dass die Internalisierung von *S. pneumoniae* in FAK-defiziente Fibroblasten um über die Hälfte reduziert war. Die Invasionsrate lag bei $47 \pm 16,7$ %. Die Ergebnisse zeigten, dass auch die FAK an der Fibronectin-vermittelten Invasion von Pneumokokken beteiligt ist. Zusammenfassend konnte für verschiedene Kinasen, die mit den Signalwegen der fokalen Adhäsionen und der Reorganisation des Zytoskeletts assoziiert sind, eine wichtige Rolle für die Fibronectin-vermittelte Internalisierung von *S. pneumoniae* nachgewiesen werden.

5. Diskussion

Streptococcus pneumoniae ist ein Kommensale des humanen Respirationstraktes, tritt aber auch als Erreger schwerer, invasiver Erkrankungen wie einer Pneumonie, Sepsis und bakteriellen Meningitis auf. So gehen über eine Million Todesfälle weltweit auf eine Infektion mit Pneumokokken zurück. Der erste Schritt zur Kolonisierung des Menschen besteht in der Anheftung von *S. pneumoniae* an die eukaryotischen Wirtszellen des oberen Respirationstraktes. Von dort können die Erreger in die Lunge wandern, über die Alveolen in tieferes Gewebe eindringen und in die Blutbahn übertreten, wo sie mit dem die Blutgefäße auskleidenden Endothel in Kontakt treten können. Bei diesen Prozessen binden Pneumokokken an und dringen in humane Zellen des Nasopharynx, in bronchiale Lungenepithelzellen, in Typ II Pneumozyten A549 und in humane Endothelzellen ein (Talbot *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2000; Adamou *et al.*, 1998; Cundell *et al.*, 1995; Geelen *et al.*, 1993). Dabei interagieren Oberflächenstrukturen der Erreger mit spezifischen eukaryotischen Rezeptormolekülen. Die bakteriellen Adhäsine sind allerdings größtenteils noch unbekannt. Ausnahmen bilden das Cholin-bindende Protein PspC, das auch mit CbpA oder SpsA bezeichnet wird, und das Phosphorylcholin von *S. pneumoniae*. Das Oberflächenprotein PspC bindet spezifisch an die Ektodomäne des humanen polymeren Immunglobulin-Rezeptors und vermittelt so die Internalisierung von Pneumokokken in mukosale Epithelzellen (Elm *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2000). Des Weiteren interagiert das Phosphorylcholin als Komponente der Zellwand von *S. pneumoniae* mit dem Blutplättchen-aktivierenden Faktor („platelet-activating factor“ PAF)-Rezeptor von Endothelzellen. Diese Wechselwirkung führt zur Invasion der Bakterien in die Wirtszellen (Cundell *et al.*, 1995, Radin *et al.*, 2005; Fillon *et al.*, 2006). Neben der Bindung an eukaryotische Rezeptormoleküle rekrutieren Pneumokokken über weitere Adhäsine Wirtsproteine der extrazellulären Matrix und des Serums. Es konnte bereits eine Interaktion von *S. pneumoniae* über spezifische bakterielle Oberflächenproteine mit Faktor H, Lactoferrin, Plasmin(ogen) und immobilisiertem Fibronectin nachgewiesen werden (Janulczyk *et al.*, 2000; Dave *et al.*, 2001; Duthy *et al.*, 2002; Hammerschmidt *et al.*, 1999; Bergmann *et al.*, 2001; van der Flier *et al.*, 1995). Dabei wurde das PavA-Protein (pneumococcal adhesion and virulence factor A) als Fibronectin-bindendes Protein von *S. pneumoniae* identifiziert (Holmes *et al.*, 2001). Allerdings zeigten *pavA*-defiziente Mutanten eine 50 %ige Bindung an immobilisiertes Fibronectin im Vergleich zu dem isogenen Wildtyp (Holmes *et al.*, 2001), so dass an der Bindung an Fibronectin wahrscheinlich weitere Oberflächenmoleküle der Erreger beteiligt sein müssen. So wurden 2004 sich wiederholende Fibronectin-bindende Domänen beschrieben, die von dem offenen Leserahmen *sp0082* des Pneumokokkenstammes TIGR4 kodiert werden. Diese repetitiven Regionen wurden als streptococcal surface repet (SSURE) Domänen bezeichnet (Bumbaca *et al.*, 2004). Bisher wurde ausschließlich die

Bindung einer rekombinanten SSURE-Domäne an Fibronectin gezeigt. Die Untersuchungen der Funktion dieser Fibronectin-bindenden Domänen *in vitro* und *in vivo* stehen noch aus.

5.1. Die Bedeutung von PavA bei der Kolonisierung

Das PavA-Protein von *S. pneumoniae* weist eine hohe Homologie zu den Fibronectin-bindenden Proteinen FbpA von *Streptococcus gordonii*, Fbp54 der Gruppe A Streptokokken und FbpA von *Listeria monocytogenes* auf (Holmes *et al.*, 2001; Christie *et al.*, 2002; Courtney *et al.*, 1996; Dramsi *et al.*, 2004). Diese Proteine besitzen keine klassischen Fibronectin-bindenden Repeats, die die Bindung an Fibronectin vermitteln. Dies konnte ausführlich für das Fibronectin-bindende Protein SfbI von *S. pyogenes* beschrieben werden (Talay *et al.*, 2000). Immunelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten die Oberflächenlokalisation von PavA, obwohl die Proteinsequenz kein Signalpeptid für den klassischen Sekretionsweg und kein LPXTG-Verankerungsmotiv enthält (Holmes *et al.*, 2001). Neben der Eigenschaft, an immobilisiertes Fibronectin zu binden, spielt PavA auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Pneumokokken, da *pavA*-defiziente Mutanten eine stark verminderte Virulenz in einem Sepsis-Mausinfektionsmodell aufwiesen (Holmes *et al.*, 2001). Parallel und unabhängig dazu wurde PavA als Virulenzfaktor durch eine „signature-tagged-Mutagenese“ in einem Pneumonia-Mausinfektionsmodell identifiziert (Lau *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde die Rolle von PavA als Virulenzfaktor unter anderem in einem experimentellen Maus-Meningitis-Modell untersucht. Dabei führte die Inaktivierung von *pavA* zu einer verminderten Virulenz. Es starben innerhalb von vier Tagen alle mit dem Wildtypstamm infizierten Mäuse. Im Gegensatz dazu überlebten 67 % der Tiere die intrazerebrale Infektion mit der *pavA*-Mutante und erholten sich. Des Weiteren zeigten die Mäuse, die mit dem *pavA*-defizienten Pneumokokkenstamm infiziert wurden, geringere körperliche Beeinträchtigungen als die Tiere der Kontrollgruppe. Damit übereinstimmend löste die intrazerebrale Infektion mit der *pavA*-Mutante einen geringeren Grad der Hirnhautentzündung nach 36 Stunden Infektionszeit aus. Parallel dazu konnte kein Wachstum der Bakterien mit inaktiviertem *pavA*-Gen in der Milz, im Blut und im Kleinhirn festgestellt werden. Hingegen zeigten die Mäuse, die mit dem isogenen Wildtypstamm infiziert wurden, eine Bakterienlast in den Organen. Insgesamt löste die intrazerebrale Infektion mit einer *pavA*-defizienten Mutante keine schwere Erkrankung im Mausmodell aus. Zum ersten Mal konnte damit PavA als einzelner Virulenzfaktor in einem experimentellen Maus-Meningitis-Modell identifiziert werden, der in einem physiologisch immunsupprimierten Bereich des zentralen Nervensystems schwere Infektionen hervorrufen kann. Das experimentelle Maus-Meningitis-Modell wurde ebenfalls zur Untersuchung weiterer Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* eingesetzt. So überlebten Mäuse die intrazerebrale Infektion mit Pneumolysin-defizienten Pneumokokken länger als die Kontrollgruppe.

Hingegen hatte die Inaktivierung der Hyaluronidase bzw. Neuraminidase keine Auswirkung auf das Überleben der Tiere im Vergleich zu der Infektion mit dem entsprechenden Wildtypstamm. Des Weiteren zeigte das Fehlen dieser Virulenzfaktoren keinen Einfluss auf den Bakterientiter im Zerebellum und in der Milz (Wellmer *et al.*, 2002).

Die Virulenz der *pavA*-Mutante in einem Sepsis-Mausinfektionsmodell war im Vergleich zu der Infektion mit dem parentalen Wildtyp um das 10^4 -fache vermindert (Holmes *et al.*, 2001). Dies stellt eine überaus starke Attenuierung der Virulenz dar, denn in anderen Infektionsstudien resultierte die Inaktivierung der Gene von Pathogenitätsfaktoren, die als Adhäsine identifiziert wurden, in einer um das 10- bis 100-fache verminderten Virulenz. Die drastische Abschwächung der Virulenzeigenschaften um das 10^4 -fache durch die Inaktivierung von PavA scheint sogar ausgeprägter zu sein als der additive Effekt, der durch Infektionen mit Doppelmutanten in einem systemischen Mausinfektionsmodell hervorgerufen wird. Diese Doppelmutanten waren defizient für Pneumolysin und einen weiteren Virulenzfaktor wie Neuraminidase, Hyaluronidase, PspA, PspC oder Autolysin (LytA) (Berry und Paton, 2000). Damit hat PavA einen essentiellen Einfluss auf die Pathogenität von *S. pneumoniae*. Die Bilder der Ultradünnschnitte der Pneumokokken in der Transmissionselektronenmikroskopie zeigten, dass die attenuierte Virulenz der *pavA*-Mutante nicht auf sichtbare Veränderungen der Zellmorphologie, der Kapselexpression oder der subzellulären Strukturen zurückzuführen ist. Holmes *et al.* beschrieben bereits, dass weder die Wachstumsrate noch die Expression anderer Virulenzfaktoren wie Pneumolysin, Autolysin, PspA oder PsaA durch die Inaktivierung von PavA beeinträchtigt wurden (Holmes *et al.*, 2001).

5.2. Die Rolle von PavA als Virulenzfaktor *in vitro*

Neben der Rolle von PavA im Infektionsprozess *in vivo* wurde in der vorliegenden Arbeit der Schwerpunkt auf den Einfluss von PavA auf die Interaktion der Pneumokokken mit humanen Wirtszellen *in vitro* gelegt. Es wurde die Fähigkeit von *pavA*-defizienten Mutanten untersucht, an gewebespezifische Wirtszellen zu binden und in diese einzudringen, die bei der Kolonisierung und Etablierung einer invasiven Erkrankung durch *S. pneumoniae* eine Barriere darstellen. Aus diesem Grund wurden für die Infektionsversuche die alveoläre Lungenepithelzelllinie A549 aus Typ II Pneumozyten, die epitheliale Larynxkarzinom-Zelllinie HEp-2, die primären Nabelschnurzellen HUVEC und die Hirndothelzelllinie HBMEC, die als Modellzelllinie der Blut-Hirn-Schranke verwendet wird, eingesetzt. Da Pneumolysin zu der Familie der Thiol-aktivierten Zytolysine gehört und als Virulenzfaktor von Pneumokokken direkte zytotoxische Effekte auf Epithel- und Endothelzellen ausübt (Rubins *et al.*, 1993; Paton, 1998; Zysk *et al.*, 2001; Hirst *et al.*, 2000 und 2002), wurden *pneumolysin(ply)*-defiziente Mutanten des PavA exprimierenden Wildtypstammes *S. pneumoniae* Typ 35A und

der isogenen *pavA*- Mutante generiert und für die *in vitro* Infektionsstudien verwendet. Parallel wurden die Versuche mit dem kapsellosen Pneumokokkenstamm R800 und der entsprechenden *pavA*-Mutante durchgeführt. Die Inaktivierung von PavA führte sowohl in der Infektion von humanen Epithel- als auch von Endothelzellen zu einer signifikanten Verringerung der Zahl adhärenter und internalisierter Bakterien. Die drastische Reduzierung der Adhärenz von *pavA*-negativen Pneumokokken im Vergleich zum Wildtyp geht direkt auf die Zerstörung des *pavA*-Gens zurück, da die mit einem aktiven *pavA*-Gen komplementierte *pavA*-Mutante des Serotyp 35A-Stammes eine vergleichbare Adhärenz an die Epithelzelllinie HEp-2 wie der Wildtypstamm zeigte. Die verminderte Invasionsrate der *pavA*-Mutante ist wahrscheinlich keine direkte Folge der Inaktivierung von PavA, sondern ist vielmehr auf die reduzierte Adhärenz der PavA-defizienten Pneumokokken im Vergleich zum Wildtypstamm zurückzuführen. Zur Untersuchung von PavA als potenzielles Adhäsion von *S. pneumoniae* an humane Wirtszellen wurden Inhibitionsstudien mit anti-PavA-Antikörpern und Ko-Infektionen mit rekombinantem PavA-Protein durchgeführt. Da PavA auf der Oberfläche der Erreger lokalisiert ist, können anti-PavA-Antikörper an das Protein binden. Wäre PavA direkt an der Interaktion von Pneumokokken mit humanen Wirtszellen beteiligt, müsste die Bindung von funktionellen Domänen des Virulenzfaktors an zelluläre Rezeptormoleküle durch spezifische Antikörper blockiert werden können. Dies konnte für anti-PspC-Antikörper gezeigt werden, die eine durch PspC-vermittelte Adhärenz von *S. pneumoniae* an den polymeren Immunglobulinrezeptor von Epithelzellen inhibierten (Elm *et al.*, 2004). Es war bekannt, dass der C-terminale Bereich von PavA die Bindung an immobilisiertes Fibronectin vermittelt (Holmes *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurden für die Inhibitionsstudien Antikörper verwendet, die zum einen gegen das komplette PavA-Protein und zum anderen gegen ein C-terminal verkürztes Fragment mit einem Molekulargewicht von 42 kDa generiert wurden. Die Bindung von *S. pneumoniae* an immobilisiertes Fibronectin wurde durch die Zugabe des gegen das vollständige PavA-Protein gerichteten Antikörpers blockiert. Die Inkubation der Pneumokokken mit dem anti-Pav42-Antikörper inhibierte hingegen nicht die Bindung an immobilisiertes Fibronectin. In Infektionsstudien mit humanen Epithel- und Endothelzellen zeigte weder die Behandlung der Pneumokokken mit anti-PavA-Antikörpern noch die Gegenwart von anti-PavA42-Antikörpern einen inhibitorischen Effekt auf die bakterielle Adhärenz oder Invasion. Des Weiteren wurde die Adhärenz von *S. pneumoniae* in Ko-Infektionen von Epithelzellen mit rekombinantem PavA-Protein nicht signifikant reduziert. Diese Ergebnisse stehen im Einklang damit, dass mit PavA-Protein gekoppelte Latexkugeln nicht an Epithel- oder Endothelzellen binden (nicht gezeigte Daten). Auch nimmt die Adhärenz der *pavA*-defizienten Mutante an humane Epithel- und Endothelzellen nicht durch die Ko-Kultivierung mit rekombinantem PavA-Protein zu. Dies würde voraussetzen, dass rekombinantes PavA an die Oberfläche der Bakterien reassoziieren könnte. Aus diesen

Ergebnissen lässt sich eindeutig schlussfolgern, dass PavA von *S. pneumoniae* als Oberflächenprotein nicht als direktes Adhäsins an der Anheftung der Erreger an humane Wirtszellen beteiligt ist. Des Weiteren hat PavA keine Funktion als Brückenmolekül, das andere putative Oberflächen-lokalisierte Adhäsine der Erreger mit einem zellulären Rezeptor verbindet. Allerdings zeigen diese Daten, dass PavA an der Bindung von Pneumokokken an immobilisiertes Fibronectin beteiligt ist, und beweisen auch, dass diese Bindung über den C-terminalen Bereich des bakteriellen Proteins vermittelt wird.

Die Daten der *in vitro* Infektionsstudien ähneln den Ergebnissen, die für Peptidpermeasen-defiziente Mutanten von *S. pneumoniae* erzielt worden sind. Die Inaktivierung von Genen, die für Protein-abhängige Peptidpermeasen kodieren, führte zu einer reduzierten Anheftung der Pneumokokken an Typ II Pneumozyten und Endothelzellen (Cundell *et al.*, 1995, IAI). Des Weiteren resultierten Mutationen in *adc* und *psaA*, die für putative ABC Metallpermeasen kodieren, in einer verminderten Virulenz der Erreger (Berry und Paton, 1996; Dintilhac *et al.*, 1997; Marra *et al.*, 2002). PsaA wurde zuerst als Adhäsins beschrieben, da die Adhärenz der *psaA*-Mutante an die Epithelzelllinie A549 signifikant reduziert war (Berry und Paton, 1996). Dies wird durch das Ergebnis bestätigt, dass anti-PsaA-Antikörper die Adhärenz von Pneumokokken an Epithelzellen des Nasopharynx reduzierten (Romero-Steiner *et al.*, 2003). Andererseits könnte die verminderte Virulenz der *psaA*-Mutante auf einen pleiotropen Effekt zurückzuführen sein. PsaA ist Teil eines ABC-Mangan-Transportsystems (Dintilhac *et al.*, 1997). Der Mangan-Haushalt der *psaA*-Mutante ist damit gegenüber dem Wildtyp verändert. Da Pneumokokken Mangan für ihr Wachstum benötigen, könnte die Mutation in *psaA* den Grund für den pleiotropen Effekt darstellen.

PavA ist sowohl ein wichtiger Virulenzfaktor in einem Sepsis-Mausinfektionsmodell als auch in einem experimentellen Maus-Meningitis-Modell und moduliert die Adhärenz von Pneumokokken an humane Wirtszellen. Dieser Effekt von PavA beruht allerdings nicht auf der Funktion eines Adhäsins. Die genaue biologische Funktion und damit das Wirken von PavA als Virulenzfaktor im Infektionsprozess nicht geklärt. Für das PavA-ähnliche Protein von *Listeria monocytogenes*, das mit FbpA bezeichnet wird, konnte gezeigt werden, dass es sich wie ein Chaperon- oder wie ein Eskortprotein für Listeriolysin O und Internalin B verhält (Dramsı *et al.*, 2004). Um den Einfluss von PavA auf andere Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* zu untersuchen, wurden Expressionsstudien von PspA und PspC auf RNA- und Proteinebene durchgeführt. Die Transkription von *pspA* und *pspC* in der *pavA*-Mutante war dabei nicht vermindert sondern sogar höher als die Expression in dem entsprechenden Wildtyp. Die Proteinexpression von PspA und PspC wurde durch die Inaktivierung von *pavA* nicht beeinflusst. Die Bindung von sekretorischem IgA an *pavA*-defiziente Pneumokokken zur funktionellen Überprüfung der Expression von PspC zeigte, dass die *pavA*-Mutante sogar mehr sekretorisches IgA auf ihrer Oberflächen rekrutieren kann als der isogene

Wildtypstamm. Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen überein, die aus den Infektionen von *pavA*-negativen Mutanten mit Epithelzellen gewonnen wurden, die den humanen polymeren Immunglobulinrezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren. PspC bindet dabei an die sekretorische Komponente des polymeren Immunglobulinrezeptors (pIgR) und vermittelt als Adhäsins die Anheftung von *S. pneumoniae* an mukosale Epithelzellen (Elm *et al.*, 2004). Die Adhärenz der *pavA*-Mutante an die pIgR-exprimierenden Epithelzellen war vergleichbar mit der des isogenen Wildtyps. Die Inaktivierung von PavA hatte also keinen Einfluss auf die Interaktion des bakteriellen Adhäsins PspC und dem humanen polymeren Immunglobulinrezeptor. Damit ist die Genexpression und die funktionale Aktivität von bekannten Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* wie Pneumolysin und Cholin-bindenden Proteinen nicht beeinträchtigt (Holmes *et al.*, 2001; Pracht *et al.*, 2005).

Wahrscheinlich übt PavA Einfluss auf die biologische Aktivität anderer, bisher nicht identifizierter Pathogenitätsfaktoren von *S. pneumoniae* aus. Diese Hypothese ließe sich mit der Durchführung von Microarray- und/oder Proteomstudien überprüfen. Es müssten sich Unterschiede zwischen dem Expressionsprofil dieser potenziellen Faktoren der *pavA*-defizienten Mutante und des entsprechenden Wildtyps ergeben, wenn PavA modulatorisch auf die Genexpression anderer Virulenzfaktoren wirkte. Nähme PavA auf die Proteinexpression von Virulenzdeterminaten Einfluss, könnte dies durch den Einsatz der zweidimensionalen Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Erste Ansätze der vergleichenden Proteomanalyse einer *pavA*-negativen Mutante und dem isogenen Wildtyp zeigten zwei differentiell regulierte Proteine, von denen ein Protein als GlnQ identifiziert werden konnte. Dieses Protein wird von dem offenen Leserahmen *spr0408* des Pneumokokkenstammes R6 kodiert, das die ATP-bindende Domäne eines ABC-Glutamintransporters darstellt. Die Expression von GlnQ ist im Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteoms der *pavA*-Mutante reprimiert, bzw. GlnQ ist nicht in diesem Subproteom lokalisiert. Die Inaktivierung von PavA könnte damit zur Repression der Proteinexpression oder der Translokation von GlnQ führen (Dagmar Bracht, Dissertation 2005). In Gruppe B Streptokokken konnten Komponenten des ABC-Glutamintransporters als Virulenzfaktoren beschrieben werden (Tamura *et al.*, 2002). Auch für Pneumokokken ist das Lipoprotein PsaA, das Teil eines ABC-Mangantransporters ist, als Virulenzfaktor bekannt (Marra *et al.*, 2002). Die vollständige Charakterisierung von GlnQ als potenzieller Virulenzfaktor von *S. pneumoniae*, das in sechs offenen Leserahmen kodiert ist, steht allerdings noch aus. Die Expression des zweiten, nicht identifizierten, differentiell regulierten Proteins wurde in dem Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Subproteoms der *pavA*-defizienten Mutante induziert (Dagmar Bracht, Dissertation 2005). Damit zeigten erste experimentelle Daten, dass PavA von *S. pneumoniae* an der Regulation anderer Proteine

beteiligt ist. Diese Proteine sind allerdings noch in ihren Virulenzeigenschaften zu charakterisieren.

Für das Fibronectin-bindende Protein FbpA von *Listeria monocytogenes* konnte dieser Regulationsmechanismus bereits nachgewiesen werden (Dramsi *et al.*, 2004). FbpA wurde als Virulenzfaktor der Listerien mittels einer „signature tagged Mutagenese“ in einem Leberkolonisierungsmodell der Maus identifiziert. Das *fbpA*-Gen kodiert für 570 Aminosäuren, und dieses Fibronectin-bindende Protein zeigt eine hohe Homologie zu den bereits beschriebenen atypischen Fibronectin-bindenden Proteinen FbpA von *Streptococcus gordonii* (Christie *et al.*, 2002), Fbp54 von *Streptococcus pyogenes* (Courtney *et al.*, 1994) und PavA von *Streptococcus pneumoniae* (Holmes *et al.*, 2001). Das FbpA der Listerien enthält ebenso wie die genannten Proteine der Streptokokken kein Signalpeptid im N-terminalen Bereich für die Sekretion über den allgemeinen Sekretionsweg, keine Transmembrandomäne und kein LPXTG-Verankerungsmotiv. Diese Motive sind charakteristisch für kovalent verankerte Oberflächenproteine Gram-positiver Bakterien. Trotzdem konnte auch das FbpA über die Immunfluoreszenzmikroskopie auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* lokalisiert werden. Die Sekretion von FbpA ist unabhängig von der Sortase A und B. Vielmehr wird das FbpA über einen zweiten SecA-abhängigen Weg (Lenz *et al.*, 2003) aus der Bakterienzelle geschleust (Dramsi *et al.*, 2004). Die Sekretion des PavA-Proteins von *S. pneumoniae* ist noch nicht geklärt. Auch hier müsste durch die Generierung von Sortase- bzw. Sec-defizienten Mutanten überprüft werden, ob PavA auf der Oberfläche einer dieser Mutanten nachzuweisen wäre. Ist PavA in einem der Fälle nicht mehr auf der Pneumokokken-oberfläche lokalisiert, wäre dies ein Hinweis auf den potenziellen Sekretionsmechanismus. Das FbpA der Listerien ist ebenso wie PavA von *S. pneumoniae* in der Membranfraktion vorhanden, und rekombinantes FbpA bindet wie PavA bis zur Erreichung der Sättigung an immobilisiertes Fibronectin (Dramsi *et al.*, 2004; Holmes *et al.*, 2001). Des Weiteren wurde die Rolle von FbpA in *in vitro* Infektionsstudien von Listerien mit den Larynxepithelzellen HEp-2 überprüft. Die HEp-2-Zellen wurden anstelle der humanen Darmepithelzellen Caco-2 für das Infektionsmodell gewählt, da die HEp-2-Zellen im Vergleich zu den Caco-2-Zellen keine Expression von Fibronectin zeigten. Die Zugabe von exogenem Fibronectin erhöhte die Adhärenz des Wildtypstammes, hatte allerdings keinen Einfluss auf die Adhärenz der *fbpA*-defizienten Mutante. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass das Fibronectin-bindende Protein FbpA eine Rolle bei der Adhärenz von *L. monocytogenes* an die humanen Epithelzellen HEp-2 spielt (Dramsi *et al.*, 2004). Allerdings untersuchten Dramsi *et al.* den Einfluss von anti-FbpA-Antikörpern und rekombinantes FbpA-Protein auf den Anheftungsprozess nicht. Würde die Zugabe der Antikörper bzw. des rekombinanten Proteins die Adhärenz der Listerien an die humanen Zellen inhibieren, so könnte FbpA als direkter Bindungspartner von Wirtszellstrukturen

identifiziert werden. Es bleibt also die Frage offen, ob das FbpA der Listerien als Adhäsine die Interaktion mit Wirtszellkomponenten vermittelt, oder ob das FbpA wie im Fall des PavA-Proteins der Pneumokokken die bakterielle Adhärenz über modulatorische Eigenschaften beeinflusst. Für FbpA von *L. monocytogenes* konnte durch eine Immunpräzipitation der direkte Kontakt von FbpA mit den bekannten Virulenzfaktoren Listeriolysin O (LLO) und Internalin B (InlB) nachgewiesen werden. Es konnte hingegen keine Interaktion von FbpA mit dem Aktin-rekrutierenden Protein (ActA) und Internalin A (InlA) gezeigt werden. Dies deutet auf eine spezifische Interaktion von FbpA mit LLO und InlB hin. Die *fbpA*-Mutante zeigte im Vergleich zu dem entsprechenden Wildtyp reduzierte Mengen an exprimiertem LLO-Protein im Überstand und reduzierte Mengen des InlB-Proteins in der Zytosol- und Membranfraktion. Die Transkription der dafür kodierenden Gene in der *fbpA*-Mutante ist nicht beeinflusst. Damit ist die verminderte Menge an LLO- bzw. InlB-Protein nicht auf eine verringerte Transkription der dafür kodierenden Gene zurückzuführen, sondern wird wahrscheinlich auf der post-transkriptionalen Ebene durch FbpA reguliert. Es erscheint möglich, dass FbpA als Chaperon entweder die assoziierten Proteine wie LLO und InlB vor einer Degradation schützt und/oder zu einer verstärkten Sekretion bestimmter Virulenzfaktoren und damit zu deren spezifischen Lokalisation beiträgt (Dramsi *et al.*, 2004). Für PavA von *S. pneumoniae* konnten bisher keine direkten Bindungspartner innerhalb des Erregers identifiziert werden. Einen Ansatz für die Untersuchung von Interaktionspartnern von PavA stellt die Kopplung von rekombinantem PavA-Protein an eine Matrix und deren anschließende Inkubation mit Komponenten der Zytosol- und der Membranfraktion von Pneumokokken dar. Mögliche Bindungspartner aus diesen Fraktionen, die an das immobilisierte PavA binden, können anschließend durch eine SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und nachfolgend über eine N-terminale Sequenzierung identifiziert werden. Diese würde zu weiteren Fortschritten in der Aufklärung des Wirkmechanismus von PavA als Virulenzfaktor von *S. pneumoniae* führen.

Zusammengefasst haben sowohl die *in vitro* Infektionsstudien und die Infektionen in den verschiedenen Mausinfektionsmodellen gezeigt, dass PavA einen wichtigen Virulenzfaktor für den humanpathogenen Erreger *S. pneumoniae* darstellt. Die Expression von PavA ist essentiell für die Kolonisierung und das Überleben der Bakterien *in vivo*. Die Inaktivierung von PavA führte aber auch zu einer stark verminderten Adhärenz an humane Wirtszellen. In den Zellkulturinfektionen konnte allerdings keine direkte Rolle von PavA als Adhäsine für die Anheftung von Pneumokokken an eukaryotische Wirtszellen nachgewiesen werden. Damit ist die Virulenzeigenschaft von PavA bestätigt. Allerdings bleibt die Frage offen, welche direkte Funktion PavA während der Kolonisierung des Wirtsgewebes und dem Überleben *in vivo* ausübt.

5.3. Der Einfluss von Fibronektin auf die Interaktion von *S. pneumoniae* und humanen Wirtszellen

Fibronektin ist ein Glykoprotein, das in zwei Formen im Körper vorkommt. Zum einen kommt es als dimere, lösliche Form im Plasma und extrazellulären Flüssigkeiten sowie als multimerer, unlöslicher Form als Bestandteil der extrazellulären Matrix vor. Fibronektin ist an vielen eukaryotischen Zellprozessen wie Anheftung, Migration und Differenzierung beteiligt. Viele Bakterien nutzen Fibronektin zur Adhärenz an die Wirtszellen. Fibronektin vermittelt als Brückenmolekül die Anheftung von Bakterien an die Wirtszelloberfläche über die Bindung an verschiedene Integrine. Dabei ist das $\alpha_5\beta_1$ -Integrin der klassische Fibronektin-Rezeptor (Yamada, 1989; Ruoslahti, 1999; Plow *et al.*, 2000; Vogel *et al.*, 2001). Darüber hinaus vermittelt die Wechselwirkung zwischen pathogenen Mikroorganismen und Fibronektin die Internalisierung von Bakterien, wie es im Detail für *Streptococcus pyogenes* gezeigt werden konnte (Molinari *et al.*, 1997; Okada *et al.*, 1997; Jadoun *et al.*, 1998; Ozeri *et al.*, 1998; Molinari *et al.*, 2000; Talay *et al.*, 2000). An diesen spezifischen Internalisierungsprozessen von Bakterien sind über bestimmte Signalwege verschiedene Wirtszellkomponenten beteiligt. Für die Invasion von Gruppe A Streptokokken und *Staphylococcus aureus* in humane Wirtszellen sind bereits einige der benötigten Komponenten und deren Interaktion innerhalb der Signaltransduktionskaskaden bekannt (Cue *et al.*, 1998; Ozeri *et al.*, 2001; Purushothaman *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006a; Agerer *et al.*, 2003 und 2005).

Die Eigenschaft von *Streptococcus pneumoniae*, Fibronektin zu binden, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Van der Flier *et al.* zeigten (1995), dass sich Pneumokokken an immobilisiertes Fibronektin anheften, aber nicht lösliches Fibronektin binden können. Die Zugabe von löslichem Fibronektin inhibierte nicht die Bindung von *S. pneumoniae* an immobilisiertes Fibronektin. Weiterhin wurde gezeigt, dass durch Hitze abgetötete Bakterien in gleicher Weise wie lebende Erreger an immobilisiertes Fibronektin binden. Dies deutete zunächst auf eine Zellwandkomponente als mögliches Adhäsion hin. Allerdings konnte die Bindung von Pneumokokken an immobilisiertes Fibronektin nicht durch die Zugabe von gereinigten Zellwandkomponenten inhibiert werden. Des Weiteren zeigten mit Trypsin behandelte Bakterien keine Bindung an immobilisiertes Fibronektin. Diese Ergebnisse deuteten auf ein Oberflächenprotein von *S. pneumoniae* als Bindungspartner von Fibronektin hin (van der Flier *et al.*, 1995). Allerdings blieb weiterhin unklar, ob Pneumokokken neben der immobilisierten Form auch lösliches Fibronektin binden können. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *S. pneumoniae* lösliches Fibronektin aus dem Plasma auf seiner Oberfläche rekrutieren kann. Dabei handelt es sich um keinen wirtsspezifischen Mechanismus, da sowohl Fibronektin aus humanem als auch aus bovinem Plasma auf der Bakterienoberfläche der humanpathogenen Pneumokokken nachgewiesen werden konnte. Der ebenfalls obligat humanpathogene Erreger *Neisseria meningitidis* hingegen bindet

ausschließlich Fibronectin humanen Ursprungs (Unkmeir *et al.*, 2002). Die Rekrutierung von Fibronectin aus fötalem bovines Serum (FBS) an die Oberfläche von *S. pneumoniae* konnte nicht gezeigt werden. Das verwendete FBS Gold der Firma PAA enthält nur geringe Mengen an Fibronectin. Damit ist die Fibronectin-Konzentration sehr viel kleiner als die in dem humanem oder bovinem Plasma (Nachweis mittels Immunblot, nicht veröffentlichte Daten) und die Menge an rekrutiertem Fibronectin aus FBS könnte zu gering sein, um sie mit den eingesetzten Methoden zu detektieren. Allerdings zeigte die Inkubation der Pneumokokken mit dem Plasma lediglich die Rekrutierung von Fibronectin aus dem Plasma an die Oberfläche von *S. pneumoniae* und lieferte keinen Beweis für eine direkte Bindung des Fibronectins an die Bakterien. Bei der Wechselwirkung der Erreger mit einem komplexen Proteingemisch wie dem Plasma können weitere Komponenten aus dem Plasma an der bakteriellen Bindung des Fibronectins beteiligt sein. Aus diesem Grund wurden weitere Bindungsstudien von Pneumokokken mit löslichem gereinigtem Fibronectin durchgeführt. Dabei konnte eine direkte Bindung des gereinigten, löslichen Fibronectins an *S. pneumoniae* nachgewiesen und gleichzeitig die These widerlegt werden, dass Pneumokokken ausschließlich an immobilisiertes Fibronectin binden (van der Flier *et al.*, 1995). Auch die Bindung von löslichem und gereinigtem Plasma-Fibronectin erfolgte wirtsunspezifisch. Neben der plasmatischen Form wurde auch die zelluläre Form des humanen Fibronectins in den Bindungsstudien untersucht. Diese beiden Formen sind aus sich unterscheidenden Fibronectin-Monomeren zusammengesetzt, die aus verschiedenen alternativen Spleißvorgängen resultieren. Das lösliche, dimere Plasma-Fibronectin wird zentral in den Hepatozyten der Leber produziert, während das unlösliche, multimere zelluläre Fibronectin lokal im Gewebe gebildet wird (Pankov und Yamada, 2002). Das zelluläre Fibronectin ähnelt demnach der immobilisierten, fibrillenartigen Form des Fibronectins. In den Bindungsstudien konnte eine vergleichsweise höhere Bindung des zellulären als des Plasma-Fibronectins an die Erreger nachgewiesen werden. Damit binden Pneumokokken zwar lösliches Fibronectin, zeigten allerdings eine stärkere Interaktion mit der multimeren Form.

Fibronectin wird von vielen pathogenen Mikroorganismen als Brückenmolekül genutzt, um sich an die Zellen des Wirtsgewebes anzuheften. *Streptococcus pyogenes* und *Staphylococcus aureus* rekrutieren dazu in *in vitro* Infektionsstudien lösliches Fibronectin aus dem bovines Serum, das dem Kulturmedium zugesetzt wurde (Molinari *et al.*, 1997; Ozeri *et al.*, 1998; Talay *et al.*, 2000; Sinha *et al.*, 1999; Agerer *et al.*, 2003). *Neisseria meningitidis* nutzt ausschließlich humanes Fibronectin als Brückenmolekül für die Anheftung an Wirtszellen (Unkmeir *et al.*, 2002). Für Pneumokokken ist der Einfluss von Fibronectin auf die Infektion von humanen Wirtszellen bisher nicht untersucht worden. In dieser Arbeit zeigten Infektionsstudien mit den Nasopharynxepithelzellen Detroit 562, dass die Zugabe von exogenem reinen humanen Fibronectin zu den Wirtszellen die Adhärenz von *S. pneumoniae*

signifikant steigerte. Hingegen führte die Inkubation der Bakterien mit löslichem humanen Fibronectin nicht zu einer verstärkten Anheftung der Pneumokokken an die eukaryotischen Zellen. Die durch die Fibronectinzugabe vermittelte Adhärenz wurde zusätzlich gesteigert, wenn ungebundene Fibronectinmoleküle nach der Präinkubation der Zellen entfernt wurden. Dies führt zu der Hypothese, dass *S. pneumoniae* das Wirtszell-assoziierte Fibronectin als Brückenmolekül für seine Anheftung nutzen kann. An der Bakterienoberfläche gebundenes Fibronectin scheint hingegen nicht die Adhärenz der Erreger an die Wirtszellen zu vermitteln. Dies könnte auf unterschiedlichen Konformationen der Fibronectinmoleküle in Abhängigkeit ihrer Bindungspartner beruhen. Damit kann sich die Konformation des Fibronectins, das in der extrazellulären Matrix immobilisiert ist, von der des Fibronectins unterscheiden, das an die Pneumokokken gebunden ist. Diese verschiedenen Fibronectin-Konformationen können unterschiedliche Bindungseigenschaften aufweisen. Bei der Verankerung des Fibronectins innerhalb der extrazellulären Matrix von eukaryotischen Zellen kommt es zu einer schrittweisen Fibrillogenese von Fibronectin, die spezifisch von den Zellen vermittelt und reguliert wird. Nach der reversiblen Bindung von Fibronectin an die Zelloberfläche, bildet es, über Disulfidbrücken stabilisiert, unlösliche Multimere (McKeown-Longo und Mosher, 1983; McKeown-Longo und Mosher, 1984; Chen und Mosher, 1996). Die Bindungsstellen auf der Zelloberfläche werden anschließend regeneriert. Unter physiologischen Bedingungen kann lösliches Fibronectin nicht von selbst polymerisieren, sondern benötigt die Regulation durch die eukaryotische Zelle. Das an der Bakterienoberfläche assoziierte Fibronectin hingegen kann vermutlich keine Fibrillen ausbilden, da der zellspezifische Regulationsmechanismus der Fibrillogenese nicht gegeben ist. Damit unterscheidet sich die Konformation des an Bakterien gebundenen Fibronectins von der des an humanen Wirtszellen assoziierten Fibronectins. Dies könnte der Grund dafür sein, dass Pneumokokken zwar lösliches Fibronectin binden, dieses aber nicht als Brückenmolekül für die Anheftung an eukaryotische Zellen nutzen können. Verbleiben ungebundene Fibronectinmoleküle nach der Präinkubation der Wirtszellen in dem Infektionsmedium, so können diese zwar an die Pneumokokken binden, aber wahrscheinlich nicht die bakterielle Adhärenz vermitteln. Die freien Fibronectinmoleküle vermindern damit die mögliche Adhäsionsrate, die bei Entfernen von ungebundenem Fibronectin nach der Präinkubation der Wirtszellen erreicht werden kann. Zur weiteren Untersuchung des Einflusses der Fibronectinkonformation auf die Fibronectin-vermittelte Adhärenz könnten spezifische anti-Fibronectin-Antikörper zu Inhibitionsstudien eingesetzt werden, die in Abhängigkeit der Fibronectinkonformation binden.

Die Fibronectin-vermittelte Adhärenz an und Invasion von *Streptococcus pyogenes* in humane Larynxepithelzellen HEp-2 konnte durch die Zugabe von anti-Fibronectin-Antikörpern blockiert werden (Ozeri *et al.*, 1998; Nobbs *et al.*, 2006). Dies wurde auch in Inhibitionsstudien mit *S. pneumoniae* getestet. Allerdings zeigten die Bakterien eine

unspezifische Bindung an den verwendeten polyklonalen anti-Fibronectin Antikörper, so dass die Zugabe von anti-Fibronectin-Antikörpern zu den mit Fibronectin behandelten Wirtszellen die Adhärenz von *S. pneumoniae* nicht blockierte, sondern sogar verstärkte. Diese Experimente lieferten demnach keine verwertbaren Ergebnisse. Es bleibt zu überprüfen, ob Fab-Fragmente des anti-Fibronectin-Antikörpers ebenfalls unspezifisch an die Bakterien binden oder diese Fragmente für weitere Inhibitionsstudien eingesetzt werden können. Es ist zu bemerken, dass für die Bindungsstudien von löslichem Fibronectin an *S. pneumoniae* die Hintergrundbindung des anti-Fibronectin-Antikörpers in der Durchflusszytometrie berücksichtigt wurde.

Die Präinkubation der humanen Epithelzelllinie Detroit 562 und der Hirnendothelzellen HBMEC mit humanem Fibronectin führte zu einer signifikanten und konzentrations-abhängigen Steigerung der Adhärenz von *S. pneumoniae*. Dabei spielte die Form des zugegebenen Fibronectins keine Rolle. Die Präinkubation der Wirtszellen mit Plasma-Fibronectin zeigte wie die entsprechende Vorbehandlung mit zellulärem Fibronectin eine vergleichbare Steigerung der Adhärenz der Pneumokokken. Dies untermauert die These, dass die Erreger verstärkt an die fibrilläre Konformation des Fibronectins binden. Unter physiologischen Bedingungen können die Fibrillen sowohl aus dimerem Plasma-Fibronectin als auch aus zellulärem Fibronectin zusammengesetzt sein (Allio und McKeown-Longo, 1988). Nach der Verankerung des Fibronectins als Multimere in der extrazellulären Matrix unterscheiden sich die Eigenschaften der verschiedenen Fibronectinformen nicht mehr voneinander, so dass sich auch die Bindungseigenschaften der Bakterien nicht mehr unterscheiden. So adhäreren Pneumokokken in vergleichbarer Zahl an die mit humanem zellulären bzw. mit Plasma-Fibronectin präinkubierten Detroit 562-Zellen und HBMEC. Die Zugabe von Plasma-Fibronectin steigerte ebenfalls signifikant die Adhärenz von *S. pneumoniae* an humane Larynxepithelzellen HEp-2 und alveoläre Lungenepithelzellen A549. Dieser Einfluss von exogen zugegebenem Fibronectin war wirtsunspezifisch, da sowohl die Präinkubation der Wirtszellen mit humanem als auch mit bovinem Plasma-Fibronectin zu einem vergleichbaren Anstieg der bakteriellen Adhärenz führte. Diese Ergebnisse bestätigen die Daten aus den Bindungsstudien mit reinem Fibronectin. Diese Studien beweisen, dass die Interaktion des human pathogenen Mikroorganismus *S. pneumoniae* mit dem Glykoprotein Fibronectin wirtsunspezifisch ist.

Die Vorbehandlung der Wirtszellen mit Fibronectin steigerte signifikant die Adhärenz von *S. pneumoniae* an die humanen Zelllinien Detroit 562, HEp-2, A549 und HBMEC. Jedoch führte die Zugabe von exogenem Fibronectin nicht zu einer vermehrten Anheftung der Pneumokokken an die humanen Nabelschnurothelzellen HUVEC. Die Untersuchung der endogenen Fibronectin-Expression der in den Infektionsstudien verwendeten humanen Zellen ergab, dass HUVEC die im Vergleich zu den anderen Zelllinien größte Menge an

Fibronectin auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Die vergleichsweise hohe Expression an endogenem Fibronectin könnte damit für die Fibronectin-vermittelte Adhärenz von *S. pneumoniae* an HUVEC ausreichen, so dass die Zugabe von zusätzlichem exogenem Fibronectin zu keiner Steigerung der Adhärenz führt. Diese Hypothese steht im Einklang mit den Ergebnissen, die aus der Untersuchung zur Konzentrationsabhängigkeit der Fibronectin-vermittelten Adhärenz resultierten. Auch hier ergab sich eine Sättigungskonzentration des zugesetzten Fibronectins, mit der sich keine weitere Steigerung der bakteriellen Adhärenz an Detroit 562-Zellen bzw. HBMEC zeigte.

Pathogene Mikroorganismen binden Fibronectin über distinkte Domänen innerhalb des Glykoproteins. So wurde für Gram-positive Kokken wie *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes* die Bindungsstelle innerhalb des N-terminalen Heparin-bindenden Bereichs identifiziert (Mosher und Proctor, 1980; Speziale *et al.*, 1984). Dagegen binden Pneumokokken voraussichtlich bevorzugt an die Heparin-bindende Domäne im C-terminalen Bereich des immobilisierten Fibronectins (van der Flier *et al.*, 1995). Die Fibronectin-vermittelte Adhärenz von *S. pneumoniae* an die Epithelzellen Detroit 562 und die Endothelzellen HBMEC wurde durch die Zugabe von Heparin signifikant inhibiert. Die bakterielle Adhärenz an unbehandelte humane Zellen wurde in Gegenwart von Heparin nicht beeinflusst. Die Inhibitionsversuche demonstrierten, dass *S. pneumoniae* über die Heparinbindungsstelle an das Zell-assoziierte Fibronectin binden. Diese Studien beweisen allerdings nicht, dass es sich dabei um die C-terminal lokalisierte Heparin-bindende Domäne innerhalb des Fibronectinmoleküls handelt.

Die *in vitro* Infektionsexperimente zeigten, dass Fibronectin wirtsunspezifisch die Adhärenz von *S. pneumoniae* an humane Wirtszellen verschiedener Gewebetypen fördert. Dabei blieben die bakteriellen Bindungspartner für das Fibronectin unbeachtet. Bisher sind zwei Oberflächenproteine von Pneumokokken bekannt, die an immobilisiertes Fibronectin binden. Zum einen wurden 2004 sich wiederholende, potenzielle Fibronectin-bindende Domänen innerhalb des offenen Leserahmens *sp0082* des Stammes TIGR4 identifiziert, die als streptococcal surface repeat (SSURE) Domänen bezeichnet wurden (Bumbaca *et al.*, 2004). Die Bedeutung der SSURE-Domänen für die Bindung der Bakterien an Fibronectin ist jedoch nicht überprüft. Genauer untersucht ist das zweite Fibronectin-bindende Protein von *S. pneumoniae*, der pneumococcal adherence and virulence factor A (PavA). PavA bindet an immobilisiertes Fibronectin. Diese Bindung ist Heparin-sensitiv und wird über den C-terminalen Bereich des PavA-Proteins vermittelt (Holmes *et al.*, 2001). Inhibitionsstudien mit anti-PavA-Antikörpern zeigten, dass PavA zwar eine Rolle bei der Bindung von Pneumokokken an immobilisiertes Fibronectin spielt, jedoch keinen Einfluss auf die bakterielle Adhärenz an Wirtszellen nimmt. Des Weiteren konnte auch die Fibronectin-vermittelte Adhärenz von *S. pneumoniae* an humane Nasopharynxepithelzellen Detroit 562

und Hirndothelzellen HBMEC nicht durch die Zugabe von anti-PavA-Antikörpern reduziert werden. Auch die Gegenwart von rekombinantem MBP-PavA-Fusionsprotein blockierte die durch Fibronectin geförderte Adhärenz an humane Wirtszellen nicht. Weitere Studien zeigten, dass trotz der geringen bzw. fehlenden endogenen Fibronectin-Expression auf der Zelloberfläche der Zelllinien A549, HEp-2 und HBMEC die Deletion von *pavA* einen inhibitorischen Effekt auf die Adhärenz der Erreger an diese Wirtszellen hatte. Diese Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass PavA von *S. pneumoniae* nicht als Fibronectin-bindendes Oberflächenprotein über die Bindung an das Brückenmolekül Fibronectin die Interaktion mit einem zellulären Rezeptor vermittelt.

Das für die Inhibitionsstudien eingesetzte rekombinante MBP-PavA-Fusionsprotein ersetzte das zuvor verwendete rekombinante, über einen His₆-tag aufgereinigte PavA-Protein. Die Expression von PavA als Fusionsprotein mit einem Maltose-bindenden Protein (MBP) verhinderte die Bildung von aggregiertem Protein in *E. coli* und erleichterte somit die affinitätschromatografische Aufreinigung unter nativen Bedingungen. Das MBP-PavA-Fusionsprotein zeigte sich in Bindungsstudien mit immobilisiertem Fibronectin als funktionell aktiv, MBP allein vermittelte keine Bindung an Fibronectin. Weitere Bindungsstudien mit Pneumokokken demonstrierten, dass rekombinantes MBP-PavA sowohl auf der Bakterienoberfläche des Wildtyps als auch der *pavA*-defizienten Mutante assoziierte (nicht gezeigte Daten). Unklar ist, ob die Erreger über das rekombinante, auf ihrer Oberfläche gebundene MBP-PavA-Protein an humane Wirtszellen anheften können. Die Interaktion des Oberflächenproteins SfbI bzw. des Homologs Protein F1 von *S. pyogenes* mit Fibronectin und der damit verbundenen Fibronectin-vermittelten Adhärenz an Wirtszellen ist bereits detailliert untersucht. Protein F1 defiziente Streptokokken zeigen eine verminderte Adhärenz an respiratorische Wirtszellen (Hanski und Caparon, 1992), die jedoch durch die Zugabe von Protein F1 gesteigert werden kann (Hanski *et al.*, 1992). Des Weiteren blockiert SfbI die Bindung von Fibronectin an *S. pyogenes* und deren Adhärenz an Epithelzellen (Talay *et al.*, 1992). Damit ist Protein F1 bzw. das Homolog SfbI sowohl notwendig als auch ausreichend für die Bindung von Gruppe A Streptokokken an Fibronectin und die Adhärenz an Epithelzellen. Diese Eigenschaften des Fibronectin-bindenden bakteriellen Adhäsins scheinen für PavA von *S. pneumoniae* nicht zuzutreffen. PavA bindet an immobilisiertes Fibronectin, und die Interaktion von Pneumokokken mit immobilisiertem Fibronectin wurde durch anti-PavA-Antikörper blockiert. Weiterhin zeigten *pavA*-Mutanten zwar eine stark verminderte Adhärenz an Wirtszellen, die sich allerdings nicht durch die Zugabe von rekombinantem PavA erhöhte. Auch inhibierten anti-PavA-Antikörper und rekombinantes PavA-Protein weder eine potenzielle direkte noch eine Fibronectin-vermittelte Anheftung der Bakterien an humane Wirtszellen. Die Adhärenz der *pavA*-defizienten Mutante wurde nicht durch die Präinkubation der Wirtszellen mit Fibronectin beeinflusst. Damit wurde PavA als

oberflächenassoziiertes, Fibronectin-bindendes Protein von *S. pneumoniae* identifiziert, das allerdings keine direkte Rolle in der Fibronectin-vermittelten Adhärenz der Pneumokokken in Infektionsstudien *in vitro* spielt. Es müssen folglich andere bakterielle Faktoren an der Fibronectin-vermittelten Interaktion von Erreger und Wirt beteiligt sein, die bisher nicht identifiziert und charakterisiert sind. Das Ergebnis, dass die Zugabe von Fibronectin nicht die Adhärenz der *pavA*-Mutante an humane Wirtszellen steigerte, ließe sich allerdings dann nur mit der Hypothese erklären, dass durch die Inaktivierung von PavA andere, bisher nicht identifizierte Virulenzfaktoren beeinflusst werden, die im Zusammenhang mit der Bindung von Pneumokokken an Fibronectin stehen könnten. Zusammenfassend fördert PavA nicht direkt die Kolonisierung des humanen Wirts, sondern scheint die Expression und Funktion anderer wichtiger Pathogenitätsfaktoren von *S. pneumoniae* zu regulieren, die z.B. auch an der Fibronectin-vermittelten Adhärenz der Pneumokokken beteiligt sein können.

Fibronectin fördert nicht nur die Kolonisierung der Oberfläche von Wirtsgewebe durch pathogene Mikroorganismen, sondern auch die bakterielle Internalisierung in humane Zellen (Molinari *et al.*, 1997; Ozeri *et al.*, 1998; Talay *et al.*, 2000; Sinha *et al.*, 1999; Agerer *et al.*, 2003). Dabei bindet Fibronectin als Brückenmolekül an den klassischen Fibronectin-Rezeptor, das $\alpha_5\beta_1$ -Integrin. Die Invasion von *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* und *Neisseria meningitidis* in eukaryotische Zellen wurde durch anti- β_1 -Integrin-Antikörper blockiert (Cue *et al.*, 1998; Ozeri *et al.*, 1998; Sinha *et al.*, 1999; Agerer *et al.*, 2003; Unkmeir *et al.*, 2002). Des Weiteren inhibierte ein $\alpha_5\beta_1$ -Integrin-Antagonist die Internalisierung von *S. pyogenes* (Cue *et al.*, 2000). Integrine sind heterodimere, transmembrane Proteine, die als Adhäsionsmoleküle Komponenten der extrazellulären Matrix wie z. B. Fibronectin binden. Sie bestehen aus jeweils einer, nicht-kovalent verbundenen α - und β -Untereinheit, die beide eine extrazelluläre sowie eine zytoplasmatische Domäne besitzen (Hynes, 2002). Bei der Bindung von Liganden der extrazellulären Matrix können die Integrine ihre Konformation ändern. Daraufhin interagieren ihre zytoplasmatischen Domänen über bestimmte Moleküle mit dem Aktinzytoskelett sowie mit weiteren Signalproteinen. Für die Zelle hat die Integrinaktivierung Bedeutung für die Zelladhäsion, die Zellmigration und die Organisation der extrazellulären Matrix (Palecek *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1995). Auch pathogene Bakterien nutzen die Integrine als Rezeptoren, um sich direkt oder über Fibronectin als Brückenmolekül an die Wirtsoberfläche anzuheften und in die Zellen einzudringen (Molinari *et al.*, 1997; van Putten *et al.*, 1998; Ozeri *et al.*, 1998; Cue *et al.*, 1998; Sinha *et al.*, 1999; Talay *et al.*, 2000; Unkmeir *et al.*, 2002; Agerer *et al.*, 2003; Nobbs *et al.*, 2006).

In dieser Arbeit konnte für *Streptococcus pneumoniae* eine Fibronectin-vermittelte Internalisierung in die humanen Nasopharynxepithelzellen Detroit 562 und in die

Hirndothelzellen HBMEC gezeigt werden. Inhibitionsstudien mit anti- β_1 -Integrin- und anti- $\alpha_5\beta_1$ -Integrin-Antikörpern sollten den Einfluss des $\alpha_5\beta_1$ -Integrins herausstellen. Es wurden verschiedene Klone der monoklonalen anti- β_1 -Integrin-Antikörper, für die bereits die Inhibition der Integrin-vermittelten Invasion von *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* und *Neisseria meningitidis* beschrieben waren, in Infektionsversuchen mit *S. pneumoniae* eingesetzt. Hier zeigte sich eine ähnliche Hintergrundbindung der Pneumokokken an die verwendeten anti-Integrin-Antikörper wie an den zur Inhibition eingesetzten anti-Fibronectin-Antikörper (nicht gezeigte Daten). Damit konnten mit den anti-Integrin-Antikörpern keine Inhibitionsstudien der Integrin-vermittelten Internalisierung der Erreger durchgeführt werden. Erste Versuche mit $\alpha_5\beta_1$ -Integrin- und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Analoga zeigten allerdings eine Blockierung der Fibronectin-geförderten Invasion in humane Epithelzellen (Inga Jensch, nicht veröffentlichte Daten). Das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin stellt den klassischen Integrin-Rezeptor für Vitronectin dar, das ebenfalls als Glykoprotein im Plasma und in der extrazellulären Matrix vorkommt. Fibronectin bindet bevorzugt an den $\alpha_5\beta_1$ -Integrin-Rezeptor als ersten Schritt in der Fibrillogenese von Fibronectin. Die Polymerisation von Fibronectin findet allerdings auch in β_1 -Integrin defizienten Zellen statt, da auch das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin als Bindungsstelle für Fibronectin genutzt werden kann (Wennerberg *et al.*, 1996; Yang und Hynes, 1996). Um herauszufinden, welcher dieser Integrin-Rezeptoren für die Fibronectin-vermittelte Adhärenz bzw. Invasion von *S. pneumoniae* verantwortlich ist, können Infektionsstudien mit einer Fibroblastenzelllinie durchgeführt werden, die anstelle des RGD-Motivs innerhalb des Fibronectinmoleküls eine RGE-Sequenz exprimiert. Das RGD- bzw. das RGE-Motiv sind dabei in der Typ III-Domäne 10 des Fibronectins lokalisiert. Fibronectin bindet über das RGD- jedoch nicht über das RGE-Motiv an das $\alpha_5\beta_1$ -Integrin. Die Bindungsstelle für das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin befindet sich in der Typ III-Domäne 9 des Fibronectinmoleküls (persönliche Information von R. Fässler, MPI München). Fibronectin kann die Adhärenz und Invasion von *S. pneumoniae* an die RGD-exprimierenden Fibroblasten sowohl über die Bindung an das $\alpha_5\beta_1$ - bzw. das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin vermitteln. Die Fibronectin-vermittelte bakterielle Anheftung an die RGE-exprimierenden Fibroblasten kann nur über das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin erfolgen. Beim Wachstum der Fibroblasten auf immobilisiertem Vitronectin adhären die Zellen über das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin an die Vitronectinmatrix, das als Folge blockiert ist und nicht für eine Bindung des Fibronectins zur Verfügung steht. Eine anschließende Infektion mit Pneumokokken würde Hinweise auf die Natur des Rezeptors für die Fibronectin-geförderte Adhärenz bzw. Invasion liefern. Wäre die Adhärenz der Bakterien an auf Vitronectin gewachsene RGD-exprimierende Fibroblasten nicht oder wenig beeinflusst und wäre die Anheftung der Pneumokokken an auf Vitronectin gewachsene RGE-exprimierende Fibroblasten inhibiert, deuteten diese Ergebnisse auf eine Rolle des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins in der Fibronectin-vermittelten Adhärenz hin. Ebenso ließe sich überprüfen, ob

das $\alpha_5\beta_1$ -Integrin hauptsächlich für die Fibronektin-geförderte Adhärenz von *S. pneumoniae* an eukaryotische Zellen verantwortlich wäre. In diesem Fall zeigte sich die Adhärenz der Erreger an RGD-exprimierende Fibroblasten nicht durch das Wachstum der Zellen auf Vitronektin und der damit einhergehenden Inhibition des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins beeinflusst. Einen weiteren Ansatz zur Untersuchung der Integrin-vermittelten Internalisierung von Pneumokokken kann die Transfektion von humanen Zellen mit siRNA darstellen, die eine Transkription des β_1 -Integrins blockiert. Die transfizierten Zellen würden weniger oder unter Umständen keine β_1 -Integrinuntereinheit produzieren, so dass es in diese Zellen bei einer Integrin-vermittelten Invasion zu einer verminderten Internalisierung der Bakterien käme. Neben den möglichen *in vitro* Infektionsstudien könnte weiterhin der Einfluss der Fibronektin-Bindung von *S. pneumoniae* auf die Virulenz *in vivo* untersucht werden. Infektionsexperimente mit *S. pyogenes* und transgenen Mäusen, die defizient für Plasma-Fibronektin waren, jedoch zelluläres Fibronektin produzierten, zeigten, dass Bakterien, die das Fibronektin-bindende Protein F1 exprimierten, bemerkenswerter Weise virulenter in den Infektionen der Fibronektin-negativen Mäuse waren. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass auf der Bakterienoberfläche gebundenes Plasma-Fibronektin die Virulenz durch eine eingeschränkte Ausbreitung von *S. pyogenes* im Wirt reduziert. Damit könnte die Bindung von Fibronektin einen Vorteil für die Persistenz der Erreger im Wirt darstellen (Nyberg *et al.*, 2004). *S. pyogenes* bindet u.a. über das Oberflächenprotein SfbI Fibronektin. SfbI enthält ebenso wie andere klassische Fibronektin-bindende Proteine wie FnBPA von *S. aureus*, FnBA und FnBB von *S. dysgalactiae* und FnZ von *S. equisimilis* Fibronektin-bindende Repeat-Domänen, die im C-terminalen Bereich der Proteine lokalisiert sind und jeweils 35 bis 40 Aminosäuren umfassen (Review: Schwarz-Linek *et al.*, 2006). SfbI enthält zusätzlich eine zweite, Fibronektin-bindende Region, die sich Amino-terminal der Fibronektin-bindenden Repeat-Domänen befindet (UFBD: upstream fibronectin binding domain). Diese Domänen binden in unterschiedlichen Bereichen des Fibronektin-Moleküls (Ozeri *et al.*, 1996; Talay *et al.*, 2000). Die Fibronektin-bindenden Repeat-Domänen treten mit dem N-terminalen Bereich des Fibronektin-Moleküls in Kontakt, der wiederum aus fünf Typ I-Modulen besteht. Dabei interagiert eine Fibronektin-bindende Domäne mit diesen fünf Typ I-Domänen des Fibronektins über einen Tandem β -Zipper Mechanismus (Schwarz-Linek *et al.*, 2003). Ein Fibronektin-bindendes Protein kann damit mehrere Fibronektin-Moleküle gleichzeitig binden, so dass es möglicherweise zu einer Clusterbildung von Integrinen der Wirtszelle kommen kann, die anschließend zu einer Aktivierung der Integrin-vermittelten Signalkaskade, einer Umstrukturierung des Zytoskelett und einer damit verbundenen Aufnahme der pathogenen Bakterien kommen kann (Schwarz-Linek *et al.*, 2004). Die zweite Fibronektin-bindende Domäne des SfbI-Proteins von *S. pyogenes* bindet innerhalb der Gelatin-bindenden Domäne des Fibronektins und verstärkt den durch SfbI-geförderten

Internalisierungsprozess der Bakterien durch einen kooperativen Mechanismus (Talay *et al.*, 2000). Die Natur der Interaktion von Fibronektin-bindenden Proteinen von *S. pneumoniae* mit dem Wirtspolypeptid Fibronektin ist bisher unbekannt. Zum einen weist das PavA-Protein keine Homologie zu den beschriebenen Fibronektin-bindenden Proteinen von Gram-positiven Kokken auf. Zum anderen ist die genaue Funktion der putativen Fibronektin-bindenden Repeat-Domänen, die von dem offenen Leserahmen *sp0082* des TIGR4-Pneumokokkenstammes kodiert werden, noch nicht identifiziert.

Für die Untersuchung der Fibronektin-vermittelten Invasionsmechanismen pathogener Mikroorganismen ist es nicht nur von Bedeutung, die Liganden und Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle, sondern auch die Signalwege im Inneren der Zelle zu erforschen. Binden Liganden an die Integrine, lagern sich die Integrine zu einem Cluster zusammen. Gleichzeitig werden Signalmoleküle und Aktinfilamente an die zyttoplasmatischen Enden der Integrine rekrutiert. Es bilden sich fokale Komplexe, die die Bindung der Zelle an ein Substrat und die gerichtete Lokalisation der Aktinfilamente und Signalmoleküle sicherstellen (Burrige und Chrzanowska-Wodnicka, 1996; Giancotti und Ruoslahti, 1999). Diese Integrin-vermittelten Prozesse sind wichtig für die Migration, die Polarität und das Überleben der Zellen. Es gibt vielfältige Proteine, die mit der zyttoplasmatischen Domäne der Integrine interagieren und verschiedenste Funktionen wahrnehmen. Zum einen verbinden Adaptor-Proteine die Integrine mit dem Zytoskelett und dienen außerdem als Interaktionspartner für weitere Signalmoleküle. Zu dieser Gruppe gehören z.B. Talin, α -Actinin und Filamin (Calderwood *et al.*, 1999; Sampath *et al.*, 1998; Pfaff *et al.*, 1998). Proteinkinasen wie die Integrin-linked Kinase ILK und die fokale Adhäsionskinase FAK zählen zu den Signalmolekülen (Dedhar, 1999; Parsons *et al.*, 2000). Calcium-bindende Proteine, Transkriptionsfaktoren und Proteine mit bisher unbekannter Funktion sind ebenfalls an der Integrin-vermittelten Signalkaskade beteiligt (van der Flier und Sonnenberg, 2001; de Hoog *et al.*, 2004). Für die Infektion von Wirtszellen mit *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* und *Neisseria meningitidis* konnten bereits zelluläre Faktoren und deren Interaktion bei der Integrin-vermittelten Internalisierung der Erreger identifiziert werden (Ozeri *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2006a und 2006b; Agerer *et al.*, 2003 und 2005; Sokolova *et al.*, 2004). *S. pyogenes* bindet Fibronektin über das bakterielle Protein SfbI bzw. Protein F1 an die Bakterienoberfläche. Das gebundene Fibronektin verbindet als Brückenmolekül die Gruppe A Streptokokken mit den Integrinen der Wirtszelle. Die Bindung von Fibronektin an die Integrine führt zu einer Clusterbildung der Integrine (Ozeri *et al.*, 2001). Die Integrin Clusters sind Bestandteile von fokalen Adhäsionen und fokalen Komplexen, die eine Signaltransduktion vermitteln (Giancotti und Ruoslahti, 1999). Diese adhäsiven Komplexe enthalten verschiedene Signal- und Strukturkomponenten, die als verbindende Proteine für die Komponenten des

Zytoskeletts dienen. Es wurde gezeigt, dass sich an der Eintrittsstelle für *S. pyogenes* in die Wirtszelle ein einzigartiger Adhäsionskomplex bildet, der kein α -Actinin enthält (Ozeri *et al.*, 2001). Vinculin wird an die Stelle des bakteriellen Eintritts rekrutiert, ist allerdings nicht für die Aufnahme der Gruppe A Streptokokken in die humanen Wirtszellen notwendig. Die in die Wirtszelle eindringenden Bakterien rekrutieren die fokale Adhäsionskinase FAK, die für die Invasion notwendig und Tyrosin phosphoryliert ist. Die Src-Kinasen Src, Yes und Fyn verstärken die Aufnahme von *S. pyogenes*, sind allerdings nicht absolut für die bakterielle Invasion notwendig (Ozeri *et al.*, 2001). Des Weiteren wird eine zweite Signalkaskade durch das Integrin Clustering, hervorgerufen durch die Bindung der Gruppe A Streptokokken über das Fibronectin an die Integrine, ausgelöst. Dabei wird Rac rekrutiert und aktiviert. Rac und Cdc42, nicht aber Rho sind für die Invasion von *S. pyogenes* notwendig. Diese Signalwege führen zu einer Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts, die in der bakteriellen Internalisierung resultiert (Ozeri *et al.*, 2001). Vor kurzem wurde zusätzlich die Integrin-linked Kinase ILK als notwendige Wirtskomponente für die Invasion von Gruppe A Streptokokken in die Wirtszellen identifiziert (Wang *et al.*, 2006). Diese ubiquitär exprimierte Serin-Threonin-Kinase interagiert mit der zytoplasmatischen Domäne der β_1 -Integrine, die über die Bindung der ILK mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft wird (Hannigen *et al.*, 1996). Die ILK bindet an fokale Adhäsionsproteine und wirkt in Abhängigkeit der PI-3-Kinase sowohl als katalytische als auch als strukturelle Komponente bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts mit (Persad und Dedhar, 2003). Die ILK besitzt eine Bindungsdomäne für Paxillin (Nikolopoulos und Turner, 2001). Damit können Signale von den Integrinen über die ILK an Paxillin übertragen werden. Die Phosphorylierung von Paxillin durch Tyrosin Kinasen wie Src und FAK führt zur Ausbildung zusätzlicher Bindungsstellen für die Organisation des Zytoskeletts und reguliert die Dynamik von fokalen Adhäsionen, die in Verbindung mit der morphologischen Veränderung der Zelle stehen (Vindis *et al.*, 2004). Zu diesen morphologischen Veränderungen der Zelle gehört auch der Zipper-ähnliche Invasionsmechanismus pathogener Bakterien (Joh *et al.*, 1999). Für die Internalisierung von *S. pyogenes* konnte die Phosphorylierung von Paxillin nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 2007). Auch der pathogene Mikroorganismus *Staphylococcus aureus* bindet über Fibronectin als Brückenmolekül an das $\alpha_5\beta_1$ -Integrin (Sinha *et al.*, 1999). Dies führt wiederum zum Clustering der Integrine und der Aktivierung spezifischer Signalwege in der Wirtszelle. Die Signalkaskade resultiert in der Re-Organisation des Aktin-Zytoskeletts und in der damit verbundenen Internalisierung von *S. aureus* in die Wirtszelle (Agerer *et al.*, 2005; Jett und Gilmore, 2002). Für die Integrin-vermittelte Invasion der Staphylokokken in die Wirtszelle sind Protein Tyrosin Kinasen notwendig (Dziewanowska *et al.*, 1999). Speziell konnten dabei die Protein Tyrosin Kinasen der Src-Familie und auch FAK identifiziert werden (Agerer *et al.*, 2003; Fowler *et al.*, 2003; Agerer *et al.*, 2005). An der Eintrittsstelle der Bakterien in die

Wirtszelle wird die Bildung von fibrillären Adhäsions-ähnlichen Proteinkomplexen induziert, die Tensin, FAK, Zyxin und Vinculin enthalten (Agerer *et al.*, 2005). Des Weiteren ist F-Aktin vorübergehend mit den in die Wirtszelle eindringenden Staphylokokken assoziiert (Agerer *et al.*, 2005). Cortactin wurde als ein Effektorprotein der aktivierten Src-Kinasen und FAK während der Integrin-vermittelten Internalisierung von *S. aureus* identifiziert (Agerer *et al.*, 2005). Cortactin ist ein Aktin-bindendes Protein, das auch mit dem Arp2/3 Komplex assoziieren kann, um eine Aktin-Polymerisation zu vermitteln. Des Weiteren bindet Cortactin an den Regulator der Membran Endozytose Dynamin-2 (McNiven *et al.*, 2000; Selbach und Backert, 2005). Damit induzieren mit Fibronectin gekoppelte Staphylokokken die Bildung von fibrillären Adhäsions-ähnlichen Kontaktstellen, die über das signaling der Protein Tyrosin Kinasen reguliert wird. Dieser Proteinkomplex wird an die Eintrittsstelle der Bakterien in die Wirtszelle rekrutiert und verbindet indirekt die für die bakterielle Anheftung genutzten Integrine mit dem Aktin-Zytoskelett. Dieses Zusammenspiel der Wirtskomponenten führt zu der Internalisierung der pathogenen Mikroorganismen.

In dieser Arbeit wurde erstmals die Rolle des Zytoskeletts und möglicher Signalmoleküle für die Fibronectin-vermittelte Internalisierung von *S. pneumoniae* in eukaryotische Zellen untersucht. Die Fibronectin-vermittelte Invasion in die humane Epithelzelllinie Detroit 562 hängt von der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts ab, da die Zugabe von Cytochalasin D, das die Aktinpolymerisation durch die direkte Bindung an die Enden des F-Aktins inhibiert, die Invasion der Bakterien signifikant reduzierte. Des Weiteren verminderten die Inhibitoren Latrunculin B und Jasplakinolid ebenfalls die Internalisierung der Pneumokokken. Dabei inhibiert Latrunculin B die Bildung von F-Aktin aus Aktinmonomeren, und Jasplakinolid hemmt die Depolymerisation des F-Aktins. Auch die Mikrotubuli wirken bei der Fibronectin-vermittelten Aufnahme der Erreger mit, da die Zugabe von Nocodazol, einem Inhibitor der Mikrotubulibewegung, die Invasion verminderte. Diese Ergebnisse stehen im Einklang zu den für die Fibronectin-vermittelte Invasion von *Staphylococcus aureus* publizierten Daten (Agerer *et al.*, 2003 und 2005). Neben dem Zytoskelett sind auch Proteinkinasen an der Fibronectin-vermittelten Invasion von *S. pneumoniae* beteiligt. Es konnte dabei sowohl eine Rolle für Protein Tyrosin Kinasen (PTK), speziell für die Familie der Src-PTK, und für die Phosphatidylinositol (PI-3)-Kinase nachgewiesen werden. Für diese Inhibitionsstudien mit humanen Epithelzellen Detroit 562 wurden spezifische pharmakologische Inhibitoren der Kinasen eingesetzt. Die Fibronectin-vermittelte Internalisierung der Pneumokokken wurde durch Genistein, einem allgemeinen Inhibitor für die PTK-Aktivität, und auch durch den spezifischen Inhibitor PP2 der Familie der Src-Kinasen gehemmt. Die Zugabe der Inhibitoren der PI-3-Kinase-Aktivität Wortmannin und LY294002 demonstrierte, dass auch die PI-3-Kinase-Aktivität an der Fibronectin-vermittelten Aufnahme beteiligt ist. Die Rolle der fokalen Adhäsionskinase FAK wurde in Invasionsstudien mit FAK-defizienten Fibroblasten der Maus

untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass FAK ebenfalls ein Teil der Signalkaskade ist, die zu der Reorganisation des Zytoskeletts und damit zu der Internalisierung der Bakterien führt. Diese Daten liefern erste Erkenntnisse über einige der Proteine, die Teil dieser Signalkaskade sind. Weitere Untersuchungen müssen durchgeführt werden, um das genaue Zusammenspiel der beschriebenen Einzelkomponenten und noch nicht identifizierter Proteine für die Fibronectin-vermittelte Invasion von *S. pneumoniae* aufzuklären.

Zusammengefasst binden Pneumokokken wirtsunspezifisch an Fibronectin. Diese Bindung ist wahrscheinlich innerhalb der Heparin-Bindungsdomäne des Fibronectins lokalisiert. Das Wirtszell-assoziierte Fibronectin fördert die Adhärenz und die Invasion von Pneumokokken an bzw. in humane Zellen. Die Fibronectin-Bindung scheint ein wichtiges Merkmal der Virulenz verschiedener pathogener Mikroorganismen zu sein, das den Erregern ermöglicht, invasive Erkrankungen hervorzurufen und möglicherweise in den Wirtszellen zu persistieren. Die Bakterien nutzen für ihre Internalisierung die Funktionen eukaryotischer Zellstrukturen aus, um in die Wirtszellen einzudringen. Die Aktivierung von Signalwegen und die damit verbundene Re-Organisation des Zytoskeletts ist für die bakterielle Invasion von entscheidender Bedeutung. Die zukünftige Aufklärung der an der Fibronectin-vermittelten Invasion beteiligten Mechanismen liefert neue Einblicke in die Virulenzstrategie von *Streptococcus pneumoniae*.

6. Material

6.1. Bakterien

6.1.1. *Streptococcus pneumoniae* Stämme

Stammbezeichnung	Quelle	Serotyp	Referenz
SP 37	NCTC 10319	35 A	Hammerschmidt <i>et al.</i> , 1997
SP 173 (R800)	H. Jenkinson	-	Holmes <i>et al.</i> , 2001
SP 257 (D39)	H. Jenkinson	2	Holmes <i>et al.</i> , 2001

Tabelle 2: Zusammenstellung der verwendeten *S. pneumoniae* Stämme

Stammbezeichnung	Wildtyp	Plasmid	Knock-out-Gen	Antibiotika-resistenz	Referenz
PN 8.1	NCTC10319	pMSH4.1	<i>pspC</i>	erm ^R	Hammerschmidt <i>et al.</i> , 2000
PN 41 (UB 1341)	D39		<i>pavA</i>	cm ^R	Holmes <i>et al.</i> , 2001
PN 48 (UB 1339)	R800		<i>pavA</i>	cm ^R	Holmes <i>et al.</i> , 2001
PN64	NCTC10319	pJDC9:: <i>pdB</i>	<i>pdB</i>	erm ^R	Elm <i>et al.</i> , 2004
PN65	NCTC10319	pMSH14:: <i>pavA</i>	<i>pavA</i>	spec ^R	Pracht <i>et al.</i> , 2005
PN65 Δ <i>ply</i>	NCTC10319	pJDC9:: <i>pdB</i> pMSH14:: <i>pavA</i>	<i>pdB</i> , <i>pavA</i>	erm ^R , spec ^R	Pracht <i>et al.</i> , 2005
PN65 <i>pavA</i> ⁺	NCTC10319	pJDC9:: <i>pavA</i> ⁺	-	erm ^R , spec ^R	Pracht <i>et al.</i> , 2005
SP37 <i>pavA</i> ⁺	NCTC10319	pJDC9:: <i>pavA</i> ⁺	-	erm ^R	Pracht <i>et al.</i> , 2005

Tabelle 3: Zusammenstellung der verwendeten *S. pneumoniae* Mutanten und Komplementanten

6.1.2. *Escherichia coli* Stämme

<i>E. coli</i>	genetische Eigenschaften	Resistenz	Quelle
DH5 α	$\Delta(lac)U169$, <i>endA1</i> , <i>gyrA46</i> , <i>hsdR17</i> , $\Phi80\Delta(lacZ)M15$, <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i>	-	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
XL1-Blue MRF'	$\Delta(mcrA)183$ $\Delta(mcrCB-hsdSMR-$ <i>mrr)173</i> <i>endA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> <i>lacI^qZ</i> Δ M15 Tn10(Tet ^r)] ^c	tet ^R	Stratagene
M15 [pREP4]	Nal ^S , Str ^S , rif ^S , lac ⁻ , ara ⁻ , gal ⁻ , mtl ⁻ , F ⁻ , <i>recA</i> ⁺ , <i>uvr</i> ⁺	kan ^R	QIAGEN
JM109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , $\Delta(lac-proAB)$, [F' <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>laqI^qZ</i> Δ M15]	-	Promega

Tabelle 4: Zusammenstellung der verwendeten *E. coli* Stämme

Klon Nr.	<i>E. coli</i>	Vektor	kloniertes Gen	Größe des Genprodukts	aus Pneumokokkenstamm	Quelle
178	M15[pREP4]	pQE 30	<i>pavA</i>	62 kDa	R800	H. Jenkinson
179	M15[pREP4]	pQE 30	<i>pavA</i>	42 kDa	R800	H. Jenkinson
393	JM109	pMAL-c2X	<i>pavA</i>	105,5 kDa	R800	diese Arbeit

Tabelle 5: Zusammenstellung der verwendeten *E. coli* Klone zur rekombinanten Proteinexpression

6.1.3. Nährmedien

THY-Medium	36,4 g/l Todd Hewitt Broth, 0,5 % Hefeextrakt
LB (Luria-Bertani)-Medium	1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, pH 7,5
LB-Platten	1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, 1,5 % Agar, pH 7,5
Blut-Platten (Oxoid)	23 g Peptone, 5 g NaCl, 14 g Agar, 65 ml Hammelblut, pH 7,4
Rich-Medium + Glucose	1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, 0,2 % Glucose
CpH8	800 ml Pre C 26 ml Supplement 20 ml Glutamin (0,1 %) 20 ml Adams III 10 ml Natriumpyruvat (2 %) 30 ml Phosphatpuffer, pH 8,0 18 ml Hefeextrakt (5 %)

Zusammensetzung der Einzelkomponenten für CpH8-Medium:

PreC:	1,208 g Natrium-Acetat, 5 g Caseinhydrolysat, 5 mg L-Tryptophan, 5 mg L-Cystein ad 1 l mit H ₂ O, pH 7,5 mit NaOH
3 in 1-Salze:	100 g MgCl ₂ × 6 H ₂ O, 500 mg CaCl ₂ , 3,3 mg MnSO ₄ × 4 H ₂ O ad 1 l mit H ₂ O
Supplement:	60 ml '3 in 1' Salze, 120 ml Glukose (20 %), 6 ml Saccharose (50 %), 120 ml Adenosin (2 mg/ml), 120 ml Uridin (2 mg/ml)
Phosphatpuffer:	947 ml K ₂ HPO ₄ (1M), 53 ml KH ₂ PO ₄ (1M)
Adams I:	0,15 mg Biotin, 150 mg Nikotinsäure, 175 mg Pyridoxin-HCl, 600 mg Ca-Pantothenat, 160 mg Thiamin-HCl, 70 mg Riboflavin ad 1 l mit H ₂ O
Adams II:	500 mg FeSO ₄ × 7 H ₂ O, 500 mg CuSO ₄ × 5 H ₂ O, 500 mg ZnSO ₄ × 7 H ₂ O, 200 mg MnCl ₂ × 4 H ₂ O, 10 ml HCl konz. ad 1 l mit H ₂ O
Adams III:	160 ml Adams I, 40 ml Adams II, 2 g L-Asparagin, 400 mg Cholin-HCl, 17 mg CaCl ₂

6.2. Zellkultur

6.2.1. Zelllinien

Zelllinie	Quelle	Herkunft	Referenz
Detroit 562	ATCC CCL-138	humane adhärenzte Epithelzellen aus Pharynx (Rachen)-Karzinom	Peterson WD Jr., 1968
HEp-2	ATCC CCL-23	adhärenzte Epithelzellen aus humanem Epidermiskarzinom des Larynx (Kehlkopfes)	Moore, A.E. <i>et al.</i> , 1952
A549	ATCC CCL-185	adhärenzte alveoläre Epithelzellen (Typ II Pneumocyten) aus humanem Lungenkarzinom	Giard, D. J. <i>et al.</i> , 1972
HBMEC		humane adhärenzte Hirnendothelzellen (human brain-derived microvascular endothelial cells)	Kwang Sik Kim, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA
HUVEC	Cambrex CC-2517	humane adhärenzte Nabelschnurendothelzellen (human umbilical vein-derived endothelial cells)	Clonetics (Cambrex)
Calu-3	ATCC HTB-55	humane adhärenzte Epithelzellen aus Adenokarzinom	Fogh <i>et al.</i> , 1975
MDCK	ATCC CCL-34	adhärenzte Nierenepithelzellen aus einem Cocker Spaniel	S.H.Madin und N.B. Darby, September 1958
MDCK-hpIgR	J. P. Vaerman	mit humanem pIgR (poly Immunglobulinrezeptor) stabil transfizierte MDCK-Zellen	Elm <i>et al.</i> , 2004
FAK(-)		adhärenzte embryonale Mausfibroblasten aus FAK-knock-out Mäusen	Sieg <i>et al.</i> , 1999
FAK(-) + HA-FAK		adhärenzte embryonale Mausfibroblasten aus FAK-knock-out Mäusen mit HA-FAK rekonstituiert	Sieg <i>et al.</i> , 1999

Tabelle 6: Zelllinien

6.2.2. Zellkulturmedien

Hep-2 und A549	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 1 g/l Glucose, 10 % FBS, 2 mM Glutamin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 Units/ml Penicillin
Detroit 562	RPMI 1640, 10 % FBS, 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 Units/ml Penicillin
HBMEC	RPMI 1640, 10 % FBS, 10 % Nu-Serum IV, 2 mM Glutamin, 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren, 1 % MEM Vitamine, 1 mM Natriumpyruvat, 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 Units/ml Penicillin
HUVEC	500 ml EBM-2-Medium, 2 % FCS, 0,5 ml hEGF (human recombinant epidermal growth factor), 2 ml hFGF-B (human fibroblast growth factor-B), 0,5 ml VEGF (vascular endothelial growth factor), 0,5 ml R ³ -IGF-1 (long recombinant Insulin-like growth factor), 0,5 ml Heparin, 0,2 ml Hydrocortison, 0,5 ml Ascorbinsäure (Vitamin C), 0,5 ml
Calu-3	Eagle's MEM (minimum essential medium), 10 % FBS, 2 mM Glutamin, 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 Units/ml Penicillin
MDCK	Eagle's MEM (minimum essential medium), 10 % FBS, 2 mM Glutamin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 Units/ml Penicillin
Fibroblasten	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 4,5 g/l Glucose, 10 % FBS, 2 mM Glutamin, 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren, 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 Units/ml Penicillin

6.3. Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration <i>E. coli</i>	Konzentration <i>S. pneumoniae</i>	Lösungsmittel
Ampicillin	100 µg/ml	-	dH ₂ O
Kanamycin	50 µg/ml	-	dH ₂ O
Erythromycin	250 µg/ml	5 µg/ml	70 % Ethanol
Tetracyclin	10 µg/ml	-	Methanol
Spectinomycin	100 µg/ml	50 µg/ml	dH ₂ O
Chloramphenicol	50 µg/ml	8 µg/ml	100 % Ethanol
Penicillin G	100 Units/ml für Antibiotika-Schutz-Experimente		
Gentamicin	100 µg/ml für Antibiotika-Schutz-Experimente		
Penicillin	10000 Units/ml für die Zellkultur (PAA)		
Streptomycin	10 mg/ml für die Zellkultur (PAA)		

Tabelle 7: Antibiotikakonzentrationen

6.4. Antikörper, Proteine und Inhibitoren

6.4.1. Antikörper

Enzym-konjugierte Antikörper

Ziege-anti-Kaninchen, Peroxidase gekoppelt	Dianova
Ziege-anti-Maus, Peroxidase gekoppelt	Sigma
Anti-Digoxigenin F(ab) ₂ -Fragmente, Peroxidase konjugiert	Roche

Fluorochrom markierte Antikörper

Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Kaninchen IgG	Invitrogen
Alexa Fluor 568 Ziege-anti-Kaninchen IgG	Invitrogen
Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Maus IgG	Invitrogen
Alexa Fluor 568 Ziege-anti-Maus IgG	Invitrogen
FITC Ziege-anti-Kaninchen IgG	Dianova

Nicht markierte Antikörper

Kaninchen-anti- <i>S. pneumoniae</i> (generiert gegen die Hitze-inaktivierten Stämme SP139 und SP51) IgG	Eurogentec
Kaninchen-anti-PavA IgG	Eurogentec
Kaninchen-anti-PavA IgG	Immunoglobine
Kaninchen-anti-PavA 42 kDa IgG	Eurogentec
Kaninchen-anti-Fibronektin IgG	Dako
Kaninchen-anti-Enolase	Eurogentec
Kaninchen-anti-PspC(SH2)	Eurogentec
Kaninchen-anti-PspA	Eurogentec
Kaninchen-anti-MBP	NEB

6.4.2. Proteine

humanes Plasma-Fibronektin	Invitrogen
humanes zelluläres Fibronektin	Biomol
bovines Plasma-Fibronektin	Sigma
sekretorisches IgA	Sigma
His ₆ -PavA	rekombinant aufgereinigt
verkürztes His ₆ -PavA (42 kDa)	rekombinant aufgereinigt
Maltose-Bindungsprotein MBP	rekombinant aufgereinigt
MBP-PavA Fusionsprotein	rekombinant aufgereinigt

6.4.3. Inhibitoren

Bezeichnung	Inhibition der	Arbeitskonzentration	Firma
Cytochalasin D	Aktinpolymerisation	2 μ M	MP Biomedical
Latrunculin B	Aktinpolymerisation	1 μ M	Calbiochem
Jasplakinolid	Depolymerisation des F-Aktins	1 μ M	Calbiochem
Nocodazol	Mikrotubulibewegung	20 μ M	Sigma
Genistein	PTK-Aktivität	50 μ M	Calbiochem
PP2	Familie der Src-Kinasen	1 – 5 μ M	Calbiochem
Wortmannin	PI-3-Kinase-Aktivität	50 nM	Calbiochem
LY294002	PI-3-Kinase-Aktivität	50 μ M	Calbiochem

Tabelle 8: Inhibitoren

6.5. Enzyme

Restriktionsendonuklease	Schnittstelle
<i>Bam</i> HI	G↓GATCC
<i>Eco</i> RI	G↓AATTC
<i>Hind</i> III	A↓AGCTT
<i>Pst</i> I	CTGCA↓G
<i>Sph</i> I	GCA↓TGC

Tabelle 9: Restriktionsendonukleasen von NEB

<i>Taq</i> DNA-Polymerase	NEB
T4-DNA-Ligase (5000 U/ml)	NEB
Alkalische Phosphatase	NEB
Klenow-Enzym (DNA-Polymerase I)	NEB
RNaseA	AppliChem

6.6. Plasmide

Plasmid	genetische Eigenschaft	Resistenz	Größe	Referenz
pGEM-T-Easy	<i>lacZ</i>	amp ^R	3 kb	Promega
pQE-30	ori Col E1, <i>lacO</i> , 6 x His ₆ -tag, MCS	amp ^R	3,4 kb	Qiagen
pMAL-c2X	ori pBR322, <i>lacI</i> , <i>malE</i> , MCS, <i>lacZα</i> , <i>rmB</i>	amp ^R	6,6 kb	NEB
pJDC9	T ₁ T ₂ , MCS, <i>lacZ</i>	erm ^R	6,95 kb	J.-D. Chen und D.A. Morrison, 1988

Tabelle 10: Vektoren

6.7. Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Amplifizierung von DNA-Sequenzen aus Vektoren oder Antibiotikakassetten:

Name	Sequenz (5' → 3')	T _m	Position
M13	GACGTTGTAAAACGACGGCCAG	73°C	Forward-Primer vom 5'-Ende der MCS des pGEM-Vektors
RM13	CACAGGAAACAGCTATGACCATG	72°C	Reverse-Primer vom 3'-Ende der MCS des pGEM-Vektors
QE1b	CATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAG	64°C	Forward-Primer vom 5'-Ende der MCS des pQE-Vektors
QE2	GTTCTGAGGTCATTACTGGATC	65°C	Reverse-Primer vom 3'-Ende der MCS des pQE-Vektors
erm1	CGAAATGATACACCAATCAGTGC	66°C	Reverse-Primer vom 5'-Ende der Erythromycinkassette
erm2	GACGGTTCGTGTTTCGTGCTG	64°C	Forward-Primer vom 3'-Ende der Erythromycinkassette

Tabelle 11: Vektorprimer und Oligonukleotide aus Antibiotikakassetten

Oligonukleotide zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus dem Chromosom von *S. pneumoniae*:

Name	Sequenz (5' → 3')	T _m	Schnittstelle	Position
PavA-pRMGE 1	(GC) ₃ <u>GAATTC</u> CATGTGCTTCTCGT TTCTCTTTAC	68°C	<i>EcoR</i> I	forward Primer für Klonierung von <i>pavA</i> mit Promotorbereich -98 bis -74
PavA-pRMGE 2	(GC) ₃ <u>AAGCTT</u> CAAGTAAAATCAG GATTTTTTCATG	66°C	<i>Hind</i> III	revers Primer für Klonierung von <i>pavA</i> (mit Stop) 1675-1649
SB 18	ATGTCAATTATTACTGATGTTTAC GC	68°C	-	forward Primer für <i>eno</i> -DIG-Sonde
SB 19	TTATTTTTTAAGGTTGTAGAATGA TTTC	68°C	-	revers Primer für <i>eno</i> -DIG-Sonde
PspC Struc 1F	<u>GGATCCT</u> TGAGGGAGATTCAACT AGATAG	67°C	<i>Bam</i> HI	forward Primer für <i>pspC</i> -DIG-Sonde
PspC Struc 1R	<u>AAGCTT</u> TTCTTTAACTTTATCTTC TTCTGCTG	66°C	<i>Hind</i> III	revers Primer für <i>pspC</i> -DIG-Sonde
SH 38	(GC) ₆ <u>GGATCC</u> GAAGAATCTCCCG TAGCCAGTC	68°C	<i>Bam</i> HI	forward Primer für <i>pspA</i> -DIG-Sonde
SH 30	GCTTTTGGCGGTTGCTGTTG	62°C	-	revers Primer für <i>pspA</i> -DIG-Sonde

Tabelle 12: Oligonukleotide, Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen

6.8. DNA-Größenstandard

DNA-Größenstandard	Bandengrößen in bp	Firma
1 kb DNA Ladder	10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500	NEB
1 KB-Ladder-Mix	10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250	MBI
<i>Hind</i> III- Marker DIG-markiert	23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564	Roche
RNA-Marker	6583, 4981, 3638, 2604, 1908, 1383, 955, 623, 281	Promega

Tabelle 13: DNA-Größenstandards

6.9. Größenstandard für SDS-PAGE

Protein	Molekulargewicht (kDa)
MBP- β -Galaktosidase	175
MBP-Paramyosin	83
MBP-CBD	62
Aldolase	47,5
Triosephosphat Isomerase	32,5
β -Lactoglobulin A	25
Lysozym	16,5
Aprotinin	6,5

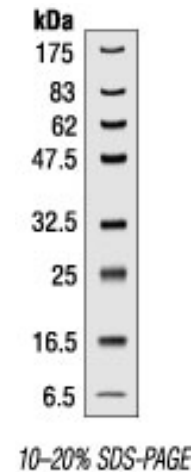


Tabelle 14: Prestained Protein Marker, broad range (NEB #7720S)

6.10. Puffer und Lösungen

6.10.1. Puffer und Lösungen für die Zellkultur

Gelatine-Lösung	0,1 % Gelatine in 1 x PBS
Moviol-Lösung	20 g Moviol 4-88 (Farbwerk Hoechst) in 80 ml 1 x PBS durch Rühren lösen, 40 ml Glycerin zugeben und über Nacht rühren, Lösung für eine Stunde bei 26000 x g zentrifugieren und den Überstand verwenden
Paraformaldehyd	37 % in PBS unter Rühren auf 70°C erhitzen, tropfenweise 0,1 M NaOH bis zur Lösung zugeben, filtrieren und aliquotiert bei -20°C lagern
PBS/EDTA	10 mM PBS, 2 mM EDTA pH 7,5
1 x PBS	37 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 80 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Poly-D-Lysin	10 µg/ml in 1 x PBS
Saponinlösung	1 % Saponin in Zellkulturmedium, sterilfiltriert

6.10.2. Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie

Agarosegel Loading Dye	0,25 % Bromphenolblau, 40 % Sucrose
EDTA-Lösung	0,2 M in dH ₂ O, pH 8,0
Ethidiumbromid Färbelösung	100 µl EtBr Flüssigstocklösung (AppliChem) in 200 ml dH ₂ O
High-SDS-Puffer	7 % SDS, 50 % Formamid, 5 x SSC, 50 mM NaPO ₃ (pH 7,0), 0,1 % N-Laurylsarcosin, 2 % Blockreagenz (Roche)
IPTG-Stock	1 M IPTG in H ₂ O
10 × KGB-Puffer	1 M Kaliumglutamat, 0,25 M Tris-Acetat (pH 7,6), 0,1 M Mg-Acetat, 0,5 mg/ml BSA, 5 mM β-Mercaptoethanol
Lösung A (Southern-Blot)	0,25 M HCl
Lösung B (Southern-Blot)	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
Lösung C (Southern-Blot)	0,5 M Tris-HCl (pH 7,5), 1,5 M NaCl
Lysepuffer (Pneumolysintest)	10 mM DTT, 0,1 % BSA in PBS, pH 7,4
Lysozym	5 mg/ml in TES
10 x MOPS-Puffer	200 mM MOPS, 50 mM NaOAc, 10 mM EDTA, pH 7,0
Mutanolysin	1 mg/ml in Tris, pH 7,5
Natrium-Acetat Lösung	3 M Natrium Acetat, pH 4,8 mit Eisessig einstellen
Plasmid-Miniprep. Lösung I	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA, 0,1 mg/ml RNase
Plasmid-Miniprep. Lösung II	0,2 N NaOH, 1 % SDS
Plasmid-Miniprep. Lösung III	3 M Natrium Acetat, pH 4,8
Pronase	5 mg/ml (30 min bei 37°C vorinkubieren)
RNase	5 mg/ml TES (15 min bei 100 °C inkubiert)
Sarkosyllösung	10 % Sarkosyl in 250 mM EDTA
20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0
50 x TAE-Puffer	2 M Tris, 0,6 M EDTA, 0,57 % Eisessig
TE (Tris/EDTA)	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
TES (Tris EDTA Saline)	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl
X-Gal	0,2 g 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid in 10 ml Dimethylformamid (DMF) oder in 10 ml DMSO

6.10.3. Puffer und Lösungen für Proteinaufreinigung, SDS-PAGE und Western-Blot

Transferpuffer (Western-Blot)	5,8 g Tris, 2,9 g Glycin, 0,37 g SDS (0,037 %), 200 ml Methanol ad 1000 ml dH ₂ O
Detergenzpuffer (IC Aufreinigung)	20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1 % Deoxycholsäure, 1 % Nonidet P-40
Chloronaphthol	1 Tablette (30 mg, Sigma) in 10 ml Methanol
Coomassie-Entfärber	40 % Ethanol, 10% Eisessig
Coomassie-Färbelösung	50 % Ethanol, 5,8 % Eisessig, 0,2 % Coomassie Brilliant Blue™ R250
IPTG-Stock	1 M IPTG in H ₂ O
8 x Laufpuffer (SDS-PAGE)	0,12 M Tris, 0,96 M Glycin, 0,5 % SDS
Lysepuffer (IC Aufreinigung)	50 mM Tris-HCl, pH 8, 0,25 % Sucrose, 1 mM EDTA
0,1 M Na-Carbonat-Puffer	900 ml 0,1 M NaHCO ₃ , 100 ml 0,1 M Na ₂ CO ₃ , pH 9,2
1 x PBS	37 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 80 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Protein-Probenpuffer	25 % 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 20 % Glycerin, 5 % SDS, 10 % 2-Mercapthoethanol, 5 % Bromphenolblau-Lösung (10 µg/ml dH ₂ O)
Lsg. 1 (Affinitätschromatographie)	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, pH 8,0
Lsg. 2 (Affinitätschromatographie)	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 1 mM PMSF frisch zusetzen, pH 8,0
Lsg. 3 (Affinitätschromatographie)	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0
Waschpuffer (IC Aufreinigung)	0,5 % Triton X-100, 1 mM EDTA

6.11. Kits

Abi Sequencing Prism™ Ready Reaction Kit	Applied Biosystems
Dig Oligonucleotide 3'-End Labeling and Detection Kit	Roche
pGEM®-T-Easy-Vektor System	Promega
QIAGEN Purification Kits	Qiagen
QIAGEN genomic DNA Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR-Purification Kit	Qiagen
RNeasy®Midi Kit	Qiagen
Peqlab Kits	Peqlab
E.Z.N.A® Cycle-Pure Kit	Peqlab
E.Z.N.A® Gel Extraction Kit	Peqlab
E.Z.N.A® Plasmid-Miniprep Kit II	Peqlab

6.12. Laborgeräte

Agarosegel-Elektrophoresekammer	Peqlab und Gibco
Autoklav	Varioklav
Brutschränke (37°C; 28°C)	Heraeus
CO ₂ -Inkubator (5 % CO ₂)	Heraeus
Eismaschine	Ziegra
Elektroporationsgerät	Equibio
FACS-Calibur	Becton Dickinson
Feinwaage	Chyo
Filmkassette	BLB
Fluoroskan Ascent	ThermoLabsystems
French Press	SLMAminco
Geldokumentation	Bio-Rad
Geltrockner Gel Air Drying System	Bio-Rad
Glaswaren	Schott, VWR Brand
Heizblock (Thermomixer 5436)	Eppendorf
Hybridisierungsöfen	Hybaid
Inkubationsschüttler	HT
Kühlschränke, 4°C und 12°C	Privileg
Magnetrührer heizbar, RCT basic	KIKA
Magnetrührer M20/1	Franco®

Mikroskope

Phasenkontrastmikroskop ID 02

Zeiss

Fluoreszenzmikroskop Axioskop

Zeiss

Konfokales Laserscanning Mikroskop (CLSM)

Zeiss

Mikrowelle

AEG

Multiskan Ascent

Thermo Labsystems

Neubauer Zählkammer

Brand

PCR-Thermocycler

Thermo Hybaid, Eppendorf

pH-Meter

WTW

Photometer

Eppendorf

Pipetten

Gilson

Power Supply 200/2.0 und Power Pac 300

Bio-Rad

Pumpe mit UV-Detektor für Affinitätschromatographie

Bio-Rad

Quarzküvetten

Hellma

Schwenktisch WT 12

Biometra

SDS-Gelelektrophoresekammer

Peqlab

Sequenzierer

Abi-Prism

Steril-Werkbank Hera Safe

Heraeus

Steril-Werkbank Lamin Air[®]HLB 2427

Heraeus

Thermomixer 5436

Eppendorf

Tiefkühlschrank (-20°C)

Privileg

Tiefkühlschrank (-80°C)

Heraeus

Transblot SD Semidry Transfer Cell

Bio-Rad

Ultraschallgerät (Sonifier 250 und Ultrasonic cleaner)

Branson, Unisonic

UV-Stratalinker 1800

Stratagene

Vortex Genie 2

Hobein AG

Waage

Kern

Wasserheizbad

GFL[®]

Zeitmesser

Junghans

Zentrifugen

Sorvall T6000B

DuPont

Sorvall RC 5B

DuPont

Biofuge fresco

Heraeus

CP Centrifuge

Beckmann

6.13. Verbrauchsmittel

Dialyseschlauch Servapor®	Serva
Einmalpipetten 5 ml, 10 ml und 25 ml (steril, Plastik)	Greiner
Elektroporationsküvetten	Peqlab
Falcon-Röhrchen, 15 ml und 50 ml	Greiner
Handschuhe	AsidBonz
Injektionskanülen	Rose GmbH
Mikrotiterplatten, Maxisorp F96	Nunc
Nylonmembran	Macherey-Nagel
Papiertücher Tork	Sca
Parafilm „M“®	ANC
Pasteur-Pipetten	Brand
Petrischalen für Bakterienkultur	Greiner
Petrischalen für Zellkultur	Greiner
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl und 1000 µl	Sarstedt
Plastikküvetten 1 ml	Greiner
PVDF-Membran	Millipore
Reaktionsgefäße 0,5 ml	ABgene
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf
Röntgenfilme	Amersham
Skalpellklingen	Braun
Steril-Filter (0,2 µm)	Schleicher & Schuell
Vinyl-Handschuhe	Sempermed
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell
Zellkulturflaschen, 25 cm ² und 75 cm ²	Greiner
Zellkulturplatte mit 4 Vertiefungen	Nunc
Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen	Greiner
Zentrifugenröhrchen 14 ml	Greiner

6.14. Chemikalien

Accutase	PAA
Acrylamid-N,N-Methylen-Bisacrylamid (30 % / 0,8 %)	Roth
Agar Agar	Difco
Agarose	Peqlab
Agarose	Seakem
Aktivkohle	Roth
Amoniumsulfat	Applichem

Ampicillin	Sigma
APS	Applichem
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Biotin	Sigma
Blutagar-Platten	Oxoid
BSA	Sigma
CaCl ₂ -Dihydrat z. A. (~99,5 %)	Merck
Chloramphenicol	Serva
Chloronaphthol	Sigma
Coomassie Brilliant Blue™ R250	Bio-Rad
L-Cystein	Sigma
Deoxycholsäure	Sigma
D-+-Glucose	Sigma
DMEM	PAA
DMSO	Applichem
EBM	Cambrex
EDTA	Riedel-de-Haën
Eisensulfat	Sigma
Eisessig	Roth
Erythromycin	Sigma
Ethanol z. A. (~99,8 %)	Roth
Ethanol (vergällt)	Roth
FBS Gold (Fetal bovine Serum)	PAA
Fleischextrakt	Merck
Formamid	Merck
Glutamin	PAA
Glycerin	Applichem
Glycin	Roth
Hefe-Extrakt	Difco
Imidazol	Sigma
Immersionsöl	Zeiss
IPTG	Applichem
Isopropanol	Roth
Kanamycin	Serva
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Sigma

K ₂ HPO ₄	Sigma
MgCl ₂ -Hexahydrat	Merck
MEM Vitamine	PAA
2-Mercaptoethanol	Applichem
Methanol	Roth
Moviol	Hoechst
Natriumacetat	Roth
Natriumcitrat	Roth
NaCl z.A.	Roth
Na ₂ HPO ₄ z.A. (wasserfrei)	Applichem
NaH ₂ PO ₄	Applichem
NaOH	Sigma
Na-Pyruvat	PAA
NH ₄ -Acetat	Riedel-de-Haën
Nicht-essentielle Aminosäuren	PAA
Nickel-NTA-Agarose	Qiagen
Nonidet P-40	MP Biomedical
NU-Serum	Becton Dickinson
Paraformaldehyd	Fluka
Pepton	Merck
Penicillin-Streptomycin-Lösung	PAA
pH-Meter Kalibrier-Lösungen (pH 4,0; 7,0; 10,0)	Applichem
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Applichem
Polyethylenglykol (8000)	Merck
Riboflavin	Sigma
RPMI 1640	PAA
Salzsäure	Roth
Saponin	Applichem
Schafblut	Oxoid
SDS	Roth
Spectinomycin	Sigma
Stickstoff	Linde
Sucrose	Applichem
TEMED	Bio-Rad
Todd Hewitt Broth	Roth
Triton X-100	Applichem
Trockenmilchpulver (0,3 % Fettanteil)	Applichem

TRIZMA-Base	Sigma
Trypsin-EDTA	PAA
Trypton	Merck
Tween® 20	Applichem
Wasserstoffperoxid	Merck
X-Gal	Applichem
Xylencyanol	Applichem
Zinksulfat	Sigma

7. Methoden

7.1. Methoden für das Arbeiten mit Bakterien

7.1.1. Kultivierung von *S. pneumoniae*

Die Kultivierung von *S. pneumoniae* Stämmen erfolgte bei 37°C über Nacht auf Blutagarplatten unter Zusatz entsprechender Antibiotika. Eine Flüssigkultur von *S. pneumoniae* in THY-Medium wurde mit einer $OD_{600} \leq 0,05 - 0,1$ beimpft und stehend bei 37°C bis zu einer OD von 0,3 bis 0,4 inkubiert.

7.1.2. Kultivierung von *E. coli*

E. coli wurde auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikazusatz bei 37°C im Brutschrank über Nacht angezogen. Die Flüssigkultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Flüssigmedium bei 37°C und 130 rpm im Schüttelinkubator.

7.1.3. Konservierung von Bakterien

Für die Stammkulturhaltung über längere Zeit wurden Kulturen der Bakterien in 20 % (v/v) Glycerol in Medium angelegt und bei -80°C aufbewahrt.

7.1.4. Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml einer entsprechenden Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 120 rpm schüttelnd bis zu einer OD_{600} von 0,6 angezogen. Die Flüssigkultur wurde für 15 min auf Eis gestellt und anschließend für 10 min bei 5000 x g zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde zweimal mit je 500 ml eiskaltem dH₂O gewaschen. Danach erfolgte ein Waschschrift mit 100 ml eiskaltem 10%igen Glycerin. Das Zellsediment wurde anschließend in 1 ml eiskaltem 10%igen Glycerin resuspendiert und zügig zu je 40 µl Aliquots in Reaktionsgefäße gefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und sofort bei -80°C eingelagert.

7.1.5. Transformation von *S. pneumoniae*

S. pneumoniae ist ein natürlich transformierbarer Organismus, der seine natürliche Kompetenz in CpH8-Medium entwickelt. Die Kultur wurde in CpH8-Medium mit einer OD_{600} von 0,03 bis 0,04 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,1 bis 0,15 in Abhängigkeit des verwendeten Stammes kultiviert. Es wurde 1 ml der Bakteriensuspension mit 1 µg CSP, einem kompetenzstimulierenden Peptid, versetzt und für weitere 20 min bei 37°C inkubiert. Nach genau 4 min auf Eis wurden je 250 µl der Kultur mit 0,5 bis 5 µg DNA vermischt und zunächst für 30 min bei 30°C und dann für 90 min bei 37°C inkubiert. Der gesamte

Transformationsansatz wurde auf eine Blutagarplatte gegeben, die das für die Selektion benötigte Antibiotikum in einer verringerten Konzentration enthielt, und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurden transformierte Pneumokokken-Klone auf Blutagarplatten mit höherer Antibiotikakonzentration angezogen.

7.2. Methoden für das Arbeiten mit Zelllinien

7.2.1. Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in dem für die Zellen benötigtem Medium in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5 % CO₂ Atmosphäre. Die HUVEC- und Fibroblasten-Zelllinien wurden in dem für sie notwendigem Medium in Plastik-Petrischalen bei 37°C und 5 % CO₂ Atmosphäre kultiviert.

Alle in der Zellkultur verwendeten Medien und Lösungen wurden vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt. PBS-EDTA und Trypsin-EDTA wurden bei Raumtemperatur eingesetzt.

Zellen, die zu 80 % konfluent gewachsen waren, wurden durch Zugabe von 3 ml Trypsin-EDTA bzw. PBS-EDTA in Suspension gebracht. Diese Zellsuspension wurde mit 5 ml Kulturmedium verdünnt und bei 700 rpm für 4 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert und zur weiteren Kultivierung in einer 1:6 bzw. 1:10 Verdünnung in Zellkulturflaschen oder -schalen ausgesät. Die Zellen wurden bis zur 12. Passage kultiviert, mit Ausnahme von HUVEC Zellen, die maximal viermal passagiert wurden.

7.2.2. Konservierung von Zelllinien

Zellen können durch Lagerung in flüssigem Stickstoff über Jahre hinweg konserviert werden. Die Zellen wurden als Suspension in dem jeweiligen Kulturmedium unter Zusatz von 10 % FBS und 10 % DMSO eingefroren. Dazu wurden sie bis zur Konfluenz angezogen und abgelöst. Nach der Zentrifugation bei 700 rpm für 4 min wurde das Zellsediment in 1,6 ml Medium und 0,2 ml FBS resuspendiert. Es wurden 0,9 ml der Zellsuspension zu 0,1 ml DMSO in einem Kryoröhrchen gegeben. Je Kulturgefäß mit einer Fläche von 75 cm² wurden demnach zwei Aliquots à 1 ml Zellsuspension eingefroren. Zunächst wurden die Röhrchen in einem mit Isopropanol gefüllten Behälter bei -80°C gelagert. Dieser Behälter ermöglichte ein kontrolliertes Einfrieren, da die Temperatur in ihm konstant um 1°C pro Minute sinkt und somit die Bildung von intrazellulären Eiskristallen vermieden wird. Nach einem Tag wurden die Röhrchen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

7.2.3. Auftauen von Zellen

Zur Kultivierung der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden diese in einem 37°C Wasserbad nahezu vollständig aufgetaut. Sofort wurde 1 ml vorgewärmtes Kultivierungsmedium zugegeben und vermischt, um die Konzentration des zum Einfrieren verwendeten DMSO zu verdünnen. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt, in dem bereits 5 ml Medium vorgelegt waren. Es folgte eine vierminütige Zentrifugation bei 700 rpm. Das Zellsediment wurde in 1 ml Medium resuspendiert und auf zwei Zellkulturflaschen mit jeweils 20 ml Medium zu ein fünftel bzw. vier fünftel der Suspension verteilt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ Atmosphäre.

7.2.4. Zellzahlbestimmung

Das Aussäen von Zellen für einen Infektionsversuch erforderte die genaue Bestimmung der Zellzahl in einer Suspension. Dazu wurde ein Tropfen einer Zellsuspension in eine Neubauer-Zellkammer gegeben und die Zellen je Großquadrat mit Hilfe eines Lichtmikroskops gezählt. Unter Berücksichtigung des Kammerfaktors wurde die absolute Zellzahl pro ml Suspension bestimmt:

Anzahl der Zellen pro Großquadrat $\times 10^4$ (Volumen des Großquadrates entspricht 10^{-4} ml) = Zellzahl/ml.

7.2.5. Nachweis von Fibronectin auf eukaryotischen Zellen

Die eukaryotischen Zellen Detroit 562, A549, HEp-2, HBMEC und HUVEC wurden bis zu einer Konfluenz von maximal 80 % kultiviert. Die Zellen wurden durch die Behandlung mit 1,5 ml Accutase (PAA) je Kulturschale in Suspension gebracht und bei 700 rpm für 3 min sedimentiert. Die Zellen wurden in 5 ml eiskaltem PBS mit 0,5 % FBS suspendiert und zu jeweils 10^5 Zellen in Reaktionsgefäße verteilt. Die Ansätze wurden zentrifugiert und die Zellen in 300 μ l einer 1:600 Verdünnung des Kaninchen-anti-Fibronectin Antikörpers (Dako) auf Eis für 45 min inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS mit 0,5 % FBS gewaschen und mit 300 μ l des 1:300 verdünnten FITC-konjugierten anti-Kaninchen Antikörpers (Dianova) versetzt. Die Inkubation erfolgte für 45 min lichtgeschützt auf Eis. Nach erneutem Waschen erfolgte die Messung in der Durchflusszytometrie mit dem FACS Calibur (Becton Dickinson).

7.3. Methoden für das Arbeiten mit DNA

7.3.1. Isolierung chromosomaler DNA aus *Streptococcus pneumoniae*

Zur Isolierung von chromosomaler DNA aus *Streptococcus pneumoniae* wurde das Genomic-tip 100/G-Kit von QIAGEN benutzt. Bei diesem Verfahren wurde die DNA nach der Lyse der Bakterien an die Oberfläche eines Anionenaustauschers gebunden. Die DNA wurde zur Entfernung von Kontaminationen gewaschen, eluiert und gefällt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Nach dem Lösen der DNA wurde die Konzentration photometrisch bestimmt und die DNA bei -20°C aufbewahrt.

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

Es wurden 2 ml einer über Nacht bei 37°C schüttelnd kultivierter Bakteriensuspension für die Isolierung von Plasmid-DNA verwendet. Die Kultur wurde für 3 min bei 6800 x g zentrifugiert, und das Bakteriensediment in 200 µl Lösung I (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA, 0,1 mg/ml RNase) zur Lyse der Zellwand resuspendiert. Nachdem 150 µl Lösung II (0,2 N NaOH, 1 % SDS) zugegeben und invertiert wurde, wurden Proteine und chromosomale DNA durch den Zusatz von 150 µl Lösung III (3 M Natrium-Acetat, pH 4,8) und einer Inkubation des Ansatzes für 10 min auf Eis gefällt. Die Plasmid-DNA verblieb in Lösung. Es folgte die Zentrifugation des Bakterienlysats bei 20800 x g für 10 min bei Raumtemperatur. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 0,7 Volumen (entspricht 350 µl) Isopropanol versetzt und für 15 min bei 20800 x g zentrifugiert. Die gefällte DNA wurde mit 150 µl Ethanol (70%) gewaschen. Die DNA wurde nochmals bei 20800 x g für 10 min zentrifugiert und nach Abnahme des Überstandes getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl dH₂O gelöst. Für die Isolierung größerer Mengen wurde die Plasmid-DNA aus 15 ml Kultur unter Verwendung des Peqlab Plasmid Mini Kit II nach den Angaben des Herstellers gewonnen.

7.3.3. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Mit Hilfe der photometrischen Bestimmung der Absorption ultravioletter Strahlung wurde die Konzentration und die Qualität von Nukleinsäuren bestimmt. Die photometrische Messung erfolgte bei 260 nm und 280 nm.

Eine optische Dichte bei 260 nm von 1 bei einer Schichtdicke der Quarzküvette von 1 cm entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml bzw. einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Zur Qualitätskontrolle wurde der Quotient der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm gebildet. Dieses Verhältnis gibt Aufschluss über den Gehalt an Proteinen und beträgt für eine reine DNA-Lösung 1,8 bis 1,95 bzw. für eine reine RNA-Lösung 1,9 bis 2,1.

7.3.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten in Abhängigkeit ihrer Größe in einem elektrischen Feld. Aufgrund der negativen Ladung des Zucker-Phosphat-Gerüsts der DNA wandern die DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld zum positiv geladenen Pol. Höhere Konzentrationen an Agarose verringern die Porengröße der Gelmatrix und werden zur schärferen Auftrennung von kleineren DNA-Fragmenten eingesetzt, während geringere Konzentrationen die Auftrennung größerer Fragmente begünstigen. Je nach Größe der zu untersuchenden DNA wurden 0,8 bis 2,0%ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde durch Erhitzen in 1 x TAE gelöst und in einen Gelträger mit Kamm gegossen. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag mit 1 x Ladebuffer versetzt. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 80 bis 120 V in 1 x TAE-Puffer. Zur Analyse der aufgetrennten DNA wurde das Agarosegel nach der Elektrophorese in einer Ethidiumbromid-Lösung mit einer Konzentration von 1 µg/ml für 10 min inkubiert. Ethidiumbromid interkaliert sequenz-unspezifisch zwischen benachbarte Basenpaare der DNA-Doppelhelix und wird nach Anregung durch UV-Strahlung durch eine rötliche Fluoreszenz (590 nm) sichtbar.

7.3.5. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Isolierung von definierten DNA-Fragmenten aus einem DNA-Gemisch wurde die DNA in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und anschließend die entsprechende DNA-Bande unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) oder des E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kits (Pierce) gemäß den Angaben der Hersteller.

7.3.6. Enzymatische Restriktion von Nukleinsäuren

Für die Restriktion von chromosomaler- oder Plasmid-DNA wurde 1 Unit Enzym für 1 µg DNA unter Zugabe von KGB-Puffer oder einem vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 2 Stunden. Zur Kontrolle wurde die geschnittene DNA in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

7.3.7. Klenow-Reaktion

Diese Methode wird zum Auffüllen überstehender 5'-Enden von DNA eingesetzt. Das dafür verwendete Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I katalysiert die DNA-Synthese in 5'-3'-Richtung. Sie besitzt eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, allerdings keine in 5'-3'-Richtung.

Die Nukleinsäure mit überstehendem 5'-Ende wurde mit KGB-Puffer in 1,5-facher Konzentration, mit 0,1 mM dNTPs und mit 1-3 U T4 DNA Polymerase je µg DNA für 20 min bei 12°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 75°C für 10 min.

7.3.8. Polymerasekettenreaktion (PCR, Saiki *et al.*, 1988)

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde eine spezifische DNA-Sequenz enzymatisch aus einem DNA-Gemisch *in vitro* amplifiziert. Dazu dienten zwei gegensätzlich orientierte Oligonukleotide als Primer für die Amplifizierung des dazwischenliegenden DNA-Abschnitts. Die Reaktion erfolgte in sich wiederholenden Zyklen, die mit der Denaturierung der Doppelstrang-DNA begannen, an die sich die Hybridisierung von Primern und DNA und die Synthese durch die Polymerase anschloss. In der Regel wurde die *Taq* DNA Polymerase von Invitrogen verwendet. Die PCR wurde, wenn nicht anders angegeben, nach folgendem Reaktionsansatz und PCR-Programm durchgeführt:

2 µl	10 x PCR-Puffer ohne Mg
0,4 µl	10 mM dNTP-Mix
0,6 µl	50 mM MgCl ₂
1 µl	Primer 1 (10 pmol/µl)
1 µl	Primer 2 (10 pmol/µl)
x µl	Template (100 ng)
0,2 µl	Taq DNA Polymerase (5 U/µl)
ad 20 µl	dH ₂ O

PCR-Programm:

Denaturierung	94°C	3 min	1 Zyklus
Denaturierung	94°C	45 sec	
Annealing	Annealingtemperatur	30 sec	35 Zyklen
Elongation	72°C	~ 1 kb/min	
Abschluss-Synthese	72°C	10 min	1 Zyklus

Tabelle 15: PCR-Programm unter Verwendung der *Taq*-DNA Polymerase

Die Annealingtemperatur wurde in Abhängigkeit der verwendeten Oligonukleotide etwa 5°C unter ihrer Schmelztemperatur gewählt. Die Schmelztemperatur T_M berechnete sich dabei nach folgender Formel:

$$T_M = [(Anzahl \text{ der Guanin- und Cytosin-Nukleotide}) \times 4] + [(Anzahl \text{ der Adenin- und Thymidin-Nukleotide}) \times 2] \text{ } ^\circ\text{C}.$$

Die Dauer für die Elongation richtete sich nach der Synthesegeschwindigkeit der *Taq* DNA Polymerase und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Die *Taq* DNA Polymerase synthetisiert 1 kb DNA pro Minute. Nach der PCR-Reaktion wurde jeweils ein zehntel des Ansatzes zur Kontrolle in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

7.3.9. Digoxigenin (DIG)-Markierung mittels PCR

Die Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin diente zur Herstellung von nicht-radioaktiven DNA-Sonden, die zur Identifizierung von homologen Sequenzen in der DNA-DNA- oder DNA-RNA-Hybridisierung genutzt wurden. Mittels PCR wurde die DNA durch den Einbau von Digoxigenin-dUTP markiert. Die Detektion der DIG-markierten DNA-Fragmentsonde erfolgte über einen an alkalische Phosphatase gekoppelten polyklonalen Schaf-anti-DIG-Antikörper, der mit dem Substrat CSPD reagierte. Durch enzymatische Dephosphorylierung wurde Licht emittiert, das auf einem Röntgenfilm als positives Signal sichtbar gemacht werden konnte. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers Roche.

7.3.10. Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem QIAquick-Purification Kit (Qiagen)

Zum Abtrennen freier Nukleotide und der Polymerase wurden die PCR-Produkte unter Verwendung des QIAquick-Purification Kits nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

7.3.11. PCR-Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung von PCR-Produkten oder DNA-Fragmenten in Vektoren wurde eine nicht-radioaktive Sequenziermethode nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger verwendet (Sanger *et al.*, 1977). Dabei wurde die zu sequenzierende DNA in einer PCR eingesetzt, in deren Ansatz fluoreszenzmarkiertes Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP) zugesetzt wurde. Beim Einbau von ddNTP während der DNA Synthese durch die DNA-Polymerase kam es zu einem Kettenabbruch. Dadurch entstanden unterschiedlich große DNA-Fragmente, die in hochauflösenden Sequenziergelen aufgetrennt wurden. Die fluoreszenzmarkierten ddNTPs wurden durch eine Laseroptik detektiert und nach der Digitalisierung der Daten wurde die Abfolge der Basen automatisch bestimmt.

Für die Sequenzierreaktion in der PCR wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

- 1 µl DNA (100 ng)
- 1 µl Oligo (10 pmol)
- 2 µl Premix
- 2 µl Sequenzierpuffer
- ad 10 µl dH₂O

Denaturierung	94 °C	3 min	1 Zyklus
Denaturierung	94 °C	30 sec	25 Zyklen
Annealing	50°C	15 sec	
Elongation	60 °C	4 min	

Tabelle 16: PCR-Programm für die DNA-Sequenzierung

Die entstandenen PCR-Produkte wurden mit dH₂O auf 100 µl aufgefüllt und mit 10 µl 3 M Natriumacetat versetzt. Die Fällung der DNA erfolgte mit 2,5 Volumen (entspricht 250 µl) reinem Ethanol bei Raumtemperatur. Anschließend wurde für 15 min bei 20800 x g zentrifugiert und die DNA einmal mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min wurde das PCR-Produkt getrocknet und in 25 µl Sequenzier-Puffer der Firma ABI aufgenommen. Die Sequenzierung erfolgte in einem ABI Sequenzer.

7.3.12. Ligation von Nukleinsäuren

Bei der Ligation kommt es zu einer enzymatischen, ATP-abhängigen Phosphodiester-Bindung zwischen der freien 3'Hydroxylgruppe und der freien 5'Phosphatgruppe zweier Doppelstrang-Nukleinsäuren. Unter Verwendung der T4-Ligase wurde für die Ligation von kohäsiven Enden das zu klonierende DNA-Fragment in dreifachem molaren Überschuss gegenüber der Vektor-DNA zugesetzt. Bei der Ligation von glatten Enden wurde das DNA-Fragment in fünffachem Überschuss verwendet. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 10 µl mit 10 U T4-Ligase in 1 x Ligationspuffer über Nacht bei 12°C.

7.3.13. Klonierung von PCR-Produkten mit dem pGEM-T-Easy Cloning Kit

Der pGEM-T-Easy Cloning Kit (Promega) wurde für die Klonierung von PCR-Produkten verwendet. Bei der Amplifikation durch die *Taq*-DNA-Polymerase werden PCR-Produkte mit einem 3'-Polyadenin-Überhang synthetisiert und können dadurch effizient in Vektoren mit entsprechendem 3'-Polythymidin-Überhang kloniert werden. Die Ligation wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und in elektrokompetente *E. coli* transformiert.

Transformierte Bakterien wurden durch die Zugabe von Ampicillin selektioniert. Weiter konnte über eine blau-weiß-Selektion überprüft werden, welche Bakterienkolonien das klonierte DNA-Fragment in dem Vektor enthielten. Dazu wurden die Selektionsplatten mit 40 µl 100 mM IPTG und 40 µl 40 mg/ml X-Gal vor der Kultivierung versetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

7.3.14. Transformation von *E. coli* durch Elektroporation (Calvin und Hanawalt, 1988)

Die Elektroporation ist eine effiziente Methode, um Fremd-DNA in pro- oder eukaryotische Zellen einzubringen. Dabei werden die Zellmembranen durch das Anlegen einer Spannung kurzzeitig permeabilisiert, und durch die geöffneten Poren können DNA-Moleküle in die Zelle gelangen. Für die Transformation wurden 40 µl der elektrokompenten Bakterien mit 50 ng DNA gemischt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wurde bei einer Kapazität von 25 µF, einem Widerstand von 200 Ω und einer Spannung von 2,5 kV durchgeführt. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 1 Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Zur Selektion auf Fremd-DNA enthaltende Bakterien wurden 50 µl bis 100 µl oder mehr des Transformationsansatz auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Zur Kontrolle der kompetenten Bakterien wurden 40 µl der elektrokompenten *E. coli* mit 3 µl ddH₂O elektroporiert und auf LB-Agarplatten mit Antibiotikazusatz ausplattiert.

7.3.15. Southern-Blot (Southern, 1975)

Der Southern-Blot ist eine Methode zur Übertragung und Fixierung von DNA auf eine positiv geladene Membran. Die genomische DNA wurde zunächst durch Restriktionendonukleasen fragmentiert, in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und fotografiert. Der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran erfolgte mittels Vakuumblotter. Das Agarosegel wurde auf eine mit 20 x SSC äquilibrierte Nylonmembran gelegt. Das Vakuum wurde angelegt und das Agarosegel mit 0,25 M HCl (Lösung A) zur Depurinierung für 15 min bedeckt. Anschließend wurde die DNA durch die Zugabe einer alkalischen Lösung B (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) für 15 min denaturiert. Durch die Inkubation mit Lösung C (0,5 M Tris-HCl (pH 7,5), 1,5 M NaCl) erfolgte eine Neutralisierung, die die Effizienz des sich anschließenden Transfers erhöhte. Für den Transfer der einzelsträngigen DNA auf die Membran wurde 20 x SSC für 90 min auf das Agarosegel gegeben. Die Membran wurde dann für 30 sec in 0,4 M NaOH geschwenkt und für weitere 30 sec in 0,2 M Tris-HCl (pH 7,5) neutralisiert. Danach wurde die DNA mit 120 mJoule im UV-Stratalinker (Stratagene) mit der Membran quervernetzt.

7.3.16. DNA-DNA-Hybridisierung

Die Hybridisierung mit einer spezifischen Digoxigenin-markierten DNA-Sonde ermöglichte die Detektion von homologen DNA-Sequenzen innerhalb eines Genoms.

Die Nylonmembran wurde für mindestens 2 Stunden bei 42°C mit High-SDS-Puffer äquilibriert. Die Hybridisierung mit 10 ng/ml einer denaturierten Digoxigenin-markierten DNA-Sonde erfolgte über Nacht bei 42°C in Gegenwart von Heringssperm-DNA, die zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran diente. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 min bei 30°C mit 2 x SSC und 0,1 % SDS und zweimal für 15 min bei 64°C mit 0,1 x SSC und 0,1 % SDS unter stringenten Bedingungen gewaschen.

Danach wurde die Membran für 5 min bei Raumtemperatur in Waschpuffer (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, 0,3 % Tween) (pH 7,5) geschwenkt. Für die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 30 min mit 1 % Blockierungsreagenz (Roche) in 0,1 M Maleinsäure inkubiert. Darauf folgte der Nachweis spezifisch gebundener DNA über einen mit alkalischer Phosphatase-konjugierten anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche). CSPD wurde als Substrat eingesetzt und die Entwicklung nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Detektion der Hybridisierungssignale wurde ein Röntgenfilm für 1 bis 24 Stunden exponiert und entwickelt.

7.4. Methoden für das Arbeiten mit RNA

7.4.1. Isolierung der RNA aus Pneumokokken

Die Isolierung der RNA erfolgte aus 15 ml Pneumokokkenkultur mit einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 (entspricht etwa 5×10^9 bis 1×10^{10} Bakterien) mit dem RNeasy Midi-Kit nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Zur Qualitätskontrolle wurde je 1 µg Gesamt-RNA in einem denaturierenden 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Intakte, nicht degradierte RNA zeigte nach dem Färben mit Ethidiumbromid drei klar abgegrenzte Banden, die der 5S, 16S und 23S rRNA entsprechen.

7.4.2. Northern-Blot

Zum Nachweis einer spezifischen mRNA durch eine DIG-markierte DNA-Sonde wurden Northern-Blots angefertigt. Die RNA wurde zunächst durch ein denaturierendes Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran übertragen. Zum Schutz der RNA vor RNasen wurden alle verwendeten Lösungen mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt bzw. direkt mit DEPC behandelt. Plastikmaterialien wurden vor Gebrauch mit RNase-Ex-Spray behandelt.

Für die Auftrennung der RNA nach ihrer Größe wurden Formaldehydagarosegele verwendet. Formaldehyd reagiert mit den Aminogruppen von Adenin, Cytosin und Guanin und verhindert

so die Basenpaarungen. Weiterhin wurde die RNA mit Formamid versetzt, um Wasserstoffbrückenbindungen aufzubrechen und so den Angriff des Formaldehyds an den Basen zu ermöglichen. Zur Herstellung eines 1 %igen Gels wurden 1 g Agarose in 87 ml DEPC-dH₂O durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf 60°C wurden 10 ml 10 × MOPS-Puffer und 3 ml Formaldehyd (37 %) dazugegeben, vorsichtig gemischt und das Gel gegossen. Für einen Northern-Blot wurden 2 µg der Gesamt-RNA mit 3 µl 3 × Probenpuffer versehen, auf 9 µl mit dH₂O aufgefüllt und für 10 min bei 60°C denaturiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 80 V für 1,5 Stunden. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 45 min in 10 × SSC äquilibriert. Der Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran erfolgte über Nacht mittels Kapillarblot mit 10 × SSC als Transferpuffer. Der Aufbau des Blots bestand aus drei Lagen in Transferpuffer getränktem Whatmanpapier, auf die das Gel und die äquilibrierte Membran gelegt wurden. Es folgten zwei weitere Lagen Whatmanpapier und eine etwa 10 cm hohe Schicht trockenes Filterpapier, das gleichmäßig mit einem Gewicht von 1 kg beschwert wurde. Nach dem Transfer wurde die Membran zweimal für 10 min in 2 × SSC gewaschen und zur Fixierung der RNA mit UV-Licht bestrahlt.

7.4.3. Spezifischer Nachweis von RNA durch DIG-markierte Sonden

Die Membran wurde zunächst in vorgewärmtem Hybridisierungspuffer für mindestens 2 Stunden bei 42 °C in einem Hybridisierungsofen prähybridisiert. Für die Hybridisierung wurden 100 ng der DIG-markierten DNA Sonden zusammen mit 100 µl Heringssperm-DNA durch 10-minütiges Aufkochen denaturiert und auf die Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C. Anschließend wurde die Membran für 2 × 5 min bei Raumtemperatur in 2 × SSC mit 0,1 % SDS und für 2 × 15 min bei 64 °C in 0,1 × SSC mit 0,1 % SDS gewaschen. Die Detektion der gebundenen Sonde wurde durch Bindung spezifischer Anti-Digoxigenin-Antikörper erreicht. Der Nachweis erfolgte durch eine Chemilumineszenzreaktion, bei der CSPD (Roche) als Substrat für die alkalische Phosphatase diente, die an den DIG-Antikörper gekoppelt war. Hierbei wurde nach Angaben des Herstellers (Roche) verfahren. Die Hybridisierungssignale wurden durch Auflegen eines Röntgenfilms für 1 bis 24 Stunden und anschließende Entwicklung detektiert.

7.5. Methoden für das Arbeiten mit Proteinen

7.5.1. Induktion der Proteinexpression in *E. coli* (pQE-System, Qiagen)

Das zu exprimierende Gen wurde in den pQE-30 Vektor kloniert, so dass an dessen 5'-Ende eine 6xHis-tag kodierende Sequenz angehängt wurde.

Zur Expression des Proteins wurden jeweils 250 ml LB-Medium mit Antibiotikazusatz mit 1 ml einer entsprechenden Vorkultur angeimpft und über Nacht schüttelnd bei 120 rpm und

30°C inkubiert. Hatte die optische Dichte bei 600 nm einen Wert von 1 erreicht, wurde neben 250 ml LB-Medium ohne Antibiotikazusatz 1 mM IPTG zur Induktion zugesetzt. Die Inkubation wurde unter o. g. Bedingungen für 5 bis 6 Stunden fortgesetzt.

Für das Kontrollgel wurde 1 ml Kultur abgenommen und ein Bakterienlysat hergestellt. Die übrige induzierte Bakterienkultur wurde bei 5858 x g für 10 Minuten zentrifugiert und die Zellen im Anschluss bei -20°C gelagert. Nach einer Überprüfung der Expression des gewünschten Proteins mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese wurden die Zellen zur Proteinisolierung in der French Press aufgeschlossen.

7.5.2. Induktion der Proteinexpression in *E. coli* (pMAL-System, NEB)

Für die Expression von PavA als MBP-Fusionsprotein wurde das *pavA*-Gen in den pMAL-c2X-Vektor kloniert. Die Expressionskultur von 500 ml LB-Rich Medium wurde mit 5 ml einer Übernachtskultur beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 schüttelnd bei 37°C inkubiert. Die Induktion erfolgte mit 0,3 mM IPTG für 4 Stunden bei 37°C. Anschließend wurde die induzierte Bakterienkultur bei 5858 x g für 10 Minuten zentrifugiert und die Zellen bei -20°C bis zum Zellaufschluss aufbewahrt.

7.5.3. Proteinisolierung nach Lyse von *E. coli* in der French Press

Die Bakterien wurden mit 1 x PBS gewaschen und anschließend in 3 ml PBS aufgenommen. Zusätzlich wurde 2 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) als Proteinase-Inhibitor zugesetzt. Die Suspension wurde in den gekühlten Zylinder der French Press gefüllt und dieser in die Hochdruckhydraulikpresse eingespannt. Am Boden des Zylinders befindet sich eine Bohrung mit geringem Durchmesser, die durch ein Reduzierstück in ihrem Querschnitt verengt wird. Bei verschlossener Bohrung wurde ein Kolben in den Zylinder hineingepresst, bis sich ein Druck von 40000 Psi einstellte. Dann wurde das Ventil so weit geöffnet, dass die Suspension tropfenweise austrat. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, um den Aufschlussgrad zu erhöhen. Das Aufschlussprinzip beruht auf der auftretenden Kavitation und Turbulenz im Ventil. Die Zellsuspension wurde im Anschluss zur Abtrennung der Zelltrümmer bei 4°C und 26890 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Aufreinigung von Fusionsproteinen eingesetzt.

7.5.4. Aufreinigung von His₆-tag Fusionsproteinen über die Affinitätschromatographie

7.5.4.1. Aufreinigung mit Ni-NTA -Agarose (Qiagen)

Zur Vorbereitung des Säulenbetts wurden 3 ml Ni-NTA(Nitrilotriessigsäure)-Agarose in eine Säule mit 1 cm Durchmesser gegeben und mit PBS überschichtet. Nachdem sich die Agarose abgesetzt hatte, wurde die Pumpe luftblasenfrei an die Säule angeschlossen und

diese mit gekühltem Puffer 1 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8,0) äquilibriert. Das Bakterien-Lysat wurde über die Pumpe auf das Säulenbett gegeben und mit Puffer 2 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 1 mM PMSF frisch zusetzen, pH 8,0) gewaschen. Der His₆-tag des rekombinanten Proteins bindet an immobilisierte Ni²⁺ Ionen der Ni-NTA-Matrix. Die Elution erfolgte mit Puffer 3 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0). Das Eluat wurde fraktionsweise aufgefangen. Der Imidazol-Ring ist ein Teil des Histidins und wechselwirkt mit der Ni-NTA-Matrix, so dass das Imidazol durch einen Konzentrationsüberschuss das His₆-tag Fusionsprotein verdrängt. Die Proben wurden bei 4°C aufbewahrt und die Qualität der Aufreinigung nach der SDS-PAGE mittels einer Coomassiefärbung überprüft.

7.5.4.2. Aufreinigung über Ni-TED Silica (Macherey-Nagel)

Neben der Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose wurde auch Ni-TED (tris-Carboxymethyl Ethylen Diamin)-Silica für die Aufreinigung von His₆-tag Fusionsproteinen verwendet. Der Unterschied zwischen den Säulenmaterialien für die Affinitätschromatographie besteht in der Anzahl der Bindungsstellen für den Histidinrest des Fusionsproteins. Ni-TED weist eine Bindungsstelle und Ni-NTA zwei Bindungsstellen auf. Das Prinzip der Aufreinigung unterscheidet sich nicht. Für die Proteinaufreinigung über Ni-TED wurden vorgepackte Protino[®] Ni-TED Säulen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

7.5.5. Aufreinigung von MBP-Fusionsproteinen

Für die Aufreinigung von MBP(Maltosebindungsprotein)-Fusionsproteinen wurde Amylose-Agarose als Säulenmaterial verwendet. 5 ml des Säulenmaterials wurden im Batch-Verfahren mit 8 Volumen des Säulenpuffers (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA) gewaschen. Dabei wurde das Säulenmaterial jeweils bei 3000 x g für 5 min sedimentiert. Die Bindung des Fusionsproteins an das Säulenmaterial erfolgte schwenkend bei 4°C über Nacht. Im Anschluss wurde das beladene Säulenmaterial in eine Säule gegeben, eine Pumpe an die Säule angeschlossen und mit Säulenpuffer kontinuierlich bis zum Erreichen einer Basislinie gewaschen. Die Elution erfolgte durch die Zugabe von 10 mM Maltose, und das Eluat wurde fraktionsweise aufgefangen. Die Fraktionen wurden anschließend durch SDS-PAGE und Coomassiefärbung auf ihre Proteinmenge und den Reinheitsgrad untersucht. Die Regeneration des Säulenmaterials wurde durch Waschen mit je 3 Säulenvolumen dH₂O, 0,1 % SDS, dH₂O und Säulenpuffer durchgeführt. Das regenerierte Säulenmaterial wurde bei 4°C gelagert und konnte bis zu fünf Mal wiederverwendet werden.

7.5.6. Aufreinigung von Inclusion Bodies (nach Nagai und Thogersen, 1987)

Einige Proteine, die in *E. coli* rekombinant exprimiert werden, bilden unlösliche Proteinaggregate, die als „Inclusion Bodies“ (Einschlusskörper) bezeichnet werden. Diese können nicht unter nativen Bedingungen aufgereinigt werden. Für die Aufreinigung von „Inclusion Bodies“ (IC) wurde das Bakteriensediment aus einer 750 ml Expressionskultur in 40 ml Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 0,25 % Sucrose, 1 mM EDTA) resuspendiert, mit 200 mg Lysozym versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch eine Ultraschallbehandlung für 10 min. Nach Zugabe von 100 ml Detergenzpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1 % Deoxycholsäure, 1 % Nonidet P-40) wurde die Suspension bei 5000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Sediment mit 125 ml Waschpuffer (0,5 % Triton X-100, 1 mM EDTA) versetzt und erneut zentrifugiert. Der entstandene milchige Überstand wurde vorsichtig entfernt, das Sediment wieder in Waschpuffer resuspendiert und anschließend zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis das Sediment eine feste Konsistenz aufwies. Die feste Konsistenz des Sediments wurde durchschnittlich nach vier bis fünf Durchgängen erzielt. Dann wurde das Sediment mit 125 ml 70 % Ethanol versetzt und ein weiterer Zentrifugationsschritt angeschlossen. Das erhaltene weiße Sediment wurde in 8 ml PBS aufgenommen und durch eine Ultraschallbehandlung dispergiert. Die Qualität der Aufreinigung wurde durch SDS-PAGE und eine Coomassiefärbung überprüft.

7.5.7. Immunisierung von Kaninchen

Zur Herstellung von Antikörpern gegen bestimmte Proteine von *S. pneumoniae* wurden die entsprechenden, rekombinant aufgereinigten Proteine aus *E. coli* für die Immunisierung von Kaninchen verwendet. Vor der Injektion des Antigens wurde dem Tier 5 ml Blut als so genanntes Präimmunserum entnommen. Die Immunisierung erfolgte mit 100 µg des Antigens. Nach weiteren zwei bzw. vier Wochen wurde die 2. bzw. 3. Immunisierung durchgeführt. Nach sechs Wochen wurden dem Tier 3 ml Blut als Testblutung entnommen, mit der die Reaktivität der gebildeten Antikörper überprüft werden konnte. Die erste Blutung wurde nach acht Wochen durchgeführt. Zwei Wochen später wurde das Kaninchen in der finalen Blutung ausgeblutet. Die Immunisierungen wurden von den Firmen Eurogentec bzw. Immunoglobe gemäß den geltenden Tierschutzbestimmungen durchgeführt.

7.5.8. Aufreinigung von IgG aus Kaninchenserum

Zur Isolierung von IgG aus Serum wurde die Probe über Protein A-Sepharose aufgereinigt. 0,5 g Protein A-Sepharose wurde in 20 ml dH₂O aufgenommen und zum Aufquellen 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Packen der Säule wurde sie mit PBS äquilibriert und 5 ml des Serums auf die Säule gegeben. Anschließend wurde mit PBS gewaschen. Die

Elution der IgG erfolgte mit 0,1 M Glycin/HCl (pH 3,0). Das Eluat wurde fraktionsweise aufgefangen und mit 1 M Tris/HCl (pH 8,0) neutralisiert. Das Säulenbett wurde zunächst mit 2 M Harnstoff und anschließend mit PBS gewaschen. Das Säulenmaterial konnte bei 4 °C gelagert und wiederverwendet werden. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die optische Dichte der Eluatfraktionen bei 280 nm bestimmt. Dabei entspricht eine OD_{280} von 1 einer Konzentration von 0,8 mg IgG pro ml.

7.5.9. Markierung von Proteinen mit FITC

Das zu markierende Protein wurde in 0,1 M Na-Carbonat-Puffer (pH 9,2) mit einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst bzw. gegen diesen Puffer dialysiert. 50 µl der FITC-Lösung (1 mg/ml in 0,1 M Na-Carbonat-Puffer) wurden tropfenweise unter Schütteln zu 1 ml der Proteinlösung gegeben und für eine Stunde schüttelnd, lichtgeschützt bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges FITC durch mehrmaliges Dialysieren gegen PBS entfernt. Die Kopplung von FITC an das Protein wurde durch eine SDS-PAGE, eine Coomassie-Färbung und einen Fluoreszenz-Scan überprüft.

7.5.10. Dialyse

Die Dialyse beruht auf Diffusionsvorgängen und ermöglicht es, niedermolekulare Substanzen aus einer wässrigen Lösung hochmolekularer Stoffe herauszutrennen.

Die Lösungen wurden für die Dialyse in einen entsprechend großen Dialyseschlauch überführt, dessen Membran die Proteine zurückhalten konnten. Salze und andere kleinere Moleküle hingegen passierten die Membranporen. Der Schlauch wurde in 4 bis 5 l des Puffers überführt, gegen den dialysiert werden sollte. Unter Rühren des Puffers wurde über Nacht bei 4°C dialysiert.

7.5.11. Herstellung von Bakterienlysaten

Es wurden 1 ml einer *E. coli*- bzw. 3 ml einer Pneumokokken-Bakterienkultur für 3 Minuten bei 2000 x g in der Tischzentrifuge sedimentiert und in 100 µl 1 x PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Proteinprobenpuffer wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 99°C im Heizblock erhitzt. Für die Auftrennung im Gel wurden 15 µl je Spur eingesetzt.

7.5.12. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli *et al.*, 1970)

Die Gelelektrophorese diente der Analyse von Proteinmischungen und des Reinheitsgrades rekombinanter Proteine. Proteine bilden mit dem Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat) negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis. Da sich die negativen Ladungen der gebundenen SDS-Moleküle gegenseitig abstoßen,

dissoziieren alle Proteine in ihre Untereinheiten, und die Polypeptidketten entfalten sich vollständig. Disulfid-Brücken werden dabei durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol reduziert. Zur weiteren Denaturierung werden die Proben erhitzt. Die Quatärstruktur der Proteine wird aufgelöst und die Trennung der Proteine erfolgt während der Elektrophorese nur nach ihrer Größe.

Für die SDS-PAGE nach Laemmli wird ein Gel aus Sammel- und Trenngel bestehend verwendet. Sie unterscheiden sich in Porosität, pH-Wert und Ionenstärke. Der pH-Wert des Sammelgels liegt bei 6,8, der des Trenngels bei 8,8. Die Porosität wird durch das Verhältnis von Polyacrylamid und Bisacrylamid als Vernetzer-Molekül festgelegt. Neben Bisacrylamid sind außerdem TEMED (Tetramethylen-diamin) als Katalysator und APS (Ammoniumperoxodisulfat) als freier Radikalbildner an der Polymerisation beteiligt. Die Proteinprobe wird in dem niederprozentigen Sammelgel konzentriert und in dem höherprozentigen Trenngel in einzelne Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Als Größenstandard diente ein vorgefärbter Molekulargewichtsstandard (NEB). Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V für 1 Stunde. Das Trenngel wurde im Anschluss direkt für eine Coomassiefärbung oder einen Immunblot eingesetzt.

	Trenngel			Sammelgel	
	8 %	10 %	12 %	4 %	
dH ₂ O	4,6 ml	4,0 ml	3,3 ml	dH ₂ O	2,5 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	0,5 M Tris (pH 6,8)	1,0 ml
10% SDS	100 μ l	100 μ l	100 μ l	10% SDS	40 μ l
Acryl/Bis (30%)	2,7 ml	3,3 ml	4,0 ml	Acryl/Bis (30%)	0,5 ml
APS (10%)	100 μ l	100 μ l	100 μ l	10 % APS	20 μ l
TEMED	6 μ l	4 μ l	4 μ l	TEMED	4 μ l

Tabelle 17: Zusammensetzung von SDS-Gelen

7.5.13. Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue

Das Sichtbarmachen von Proteinen in Polyacrylamidgelen erfolgte durch Färben der Acrylamidgele mit Coomassie Brilliant Blue, das an Proteine, nicht aber an die Gelmatrix bindet. Polyacrylamidgele wurden im Anschluss an die Elektrophorese 1 Stunde in Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung geschwenkt und dann zur Entfernung von überschüssigem Farbstoff in Entfärber gewaschen. Nach dem Entfärben wurden die Gele bis zur Trocknung im Geltrockner in Leitungswasser aufbewahrt.

7.5.14. Western Blot (Towbin *et al.*, 1979)

Mit Hilfe des Western Blots wurden Proteine aus einem Acrylamidgel durch Anlegen einer Spannung auf eine Membran transferiert. Die Proteine wurden dazu durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und durch Semi-Dry-Blotting auf eine mit Methanol aktivierte Nylonmembran (PVDF) übertragen. Das Gel und die Membran lagen in der Semi Dry Transfer Cell Trans-Blot® SD zwischen drei Lagen mit Transferpuffer getränktem Whatman Papier. Der Transfer erfolgte zwischen zwei Graphit-Platten-Elektroden, wobei die Membran auf der Anoden- und das Gel auf der Kathodenseite liegen musste. Der Transfer erfolgte für 30 min bei 15 V.

7.5.15. Immunblot

Der Immunblot ist ein Verfahren, um in einem Proteingemisch bestimmte Proteine mit Hilfe von Antikörpern zu detektieren. Dabei sind die Proteine auf einer Membran durch einen Western Blot immobilisiert. Die Membran wurde zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mindestens 2 Stunden in PBS mit 10 % (w/v) Magermilch bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurde die Membran mit dem spezifischen Primärantikörper in PBS für 2 Stunden inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper zugegeben und für eine Stunde mit der Membran inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Entwicklung durch Zugabe von 500 µl Chloronaphthol-Lösung und 12 µl H₂O₂ in 10 ml PBS. Durch die Aktivität der Peroxidase wurde das Chloronaphthol mit Hilfe des H₂O₂ als Substrat zu einem violetten Farbstoff umgesetzt. Nach erfolgter Farbstoffentwicklung wurde die Membran in Wasser gespült und getrocknet.

7.5.16. ELISA

Zur Überprüfung der Bindung des rekombinanten Proteins MBP-PavA an Fibronectin wurden 0,5 µg Fibronectin je 50 µl und Vertiefung über Nacht bei 4°C immobilisiert. Die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte am nächsten Tag mit 5 % Magermilch für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Für die Bindungsstudien wurde das MBP-PavA-Fusionsprotein in verschiedenen Verdünnungen mit dem immobilisierten Fibronectin für 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel wurde das MBP als Kontrolle in den Bindungsstudien eingesetzt. Nach der Inkubation wurden die Vertiefungen dreimal mit PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper anti-PavA- bzw. anti-MBP-Serum in einer Verdünnung von 1:100 bzw. 1:10000 in PBS bei 4°C über Nacht. Die Vertiefungen wurden dreimal mit PBS gewaschen und mit einer 1:5000 Verdünnung des Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen Antikörpers in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem

erneuten Waschen mit PBS erfolgte die Entwicklung mit 50 µl ABTS-Substrat incl. H₂O₂ je Vertiefung für 15 bzw. 30 Minuten. Die Farbreaktion wurde bei 405 nm vermessen.

7.6. Methoden zur Untersuchung der Infektion von Wirtszellen durch *S. pneumoniae* in der Zellkultur

7.6.1. Infektion von Zellen für die Analyse durch Immunfluoreszenzmikroskopie

Endothel- und Epithelzellen mit Ausnahme von Detroit 562 Zellen wurden mit 5×10^4 Zellen pro Vertiefung auf Glas-Deckgläser mit einem Durchmesser von 10 mm ausgesät und für 2 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ in dem entsprechenden Medium kultiviert. Für Detroit 562 Zellen wurden 7×10^4 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Am Tag der Infektion enthielt die Zellschicht etwa 2×10^5 Zellen. Diese Zellen wurden mit DMEM-HEPES (25 mM) mit 1 % FBS gewaschen, um das Antibiotikum des Kulturmediums zu entfernen. HUVEC-Zellen wurden abweichend in dem entsprechenden Kulturmedium ohne Antibiotikazusätze infiziert. Die Zellen wurden je nach Versuchsansatz vor der Infektion mit Inhibitoren, Antikörpern oder Proteinen inkubiert. Die Infektion der Zellen erfolgte mit $2,5 \times 10^6$ bis 1×10^7 Bakterien entsprechend einem 10- bis 50 fachen Überschuss an Bakterien bezogen auf eine Zelle. Die Pneumokokken wurden am Infektionstag in THY-Medium angezogen und auf eine optische Dichte bei 600 nm auf 0,1 in 1 ml DMEM-HEPES mit 1 % FBS eingestellt. Damit enthielt die Bakteriensuspension 10^8 Bakterien je ml. Dem Versuchsansatz entsprechend wurde die gewünschte Bakterienmenge entnommen und für die Infektion eingesetzt. Die Infektion erfolgte, wenn nicht anders angegeben, für 4 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂. Nach 3 Stunden wurden die nicht adhärenen Bakterien durch dreimaliges Waschen mit DMEM-HEPES mit 1 % FBS entfernt. Vor der Fixierung der Zellen wurden die Ansätze mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 3,7 % Paraformaldehyd über Nacht bei 4°C fixiert und im Anschluss für Immunfluoreszenzfärbungen verwendet.

7.6.2. Antibiotika-Schutz-Versuche

Antibiotika-Schutz-Versuche wurden zur Quantifizierung von intrazellulären lebensfähigen Bakterien durchgeführt. Die Endothel- und Epithelzellen wurden mit 5×10^4 Zellen pro Vertiefung ausgesät und für 2 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Detroit 562 Zellen wurden dabei mit einer Zellzahl von 7×10^4 Zellen je Vertiefung ausgesät. Die Fibroblasten wurden mit 4×10^4 Zellen in mit poly-D-Lysin beschichtete Vertiefungen über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

Am Infektionstag wurden die Zellen mit DMEM-HEPES (25 mM) mit 1 % FBS gewaschen und gegebenenfalls mit Fibronectin oder verschiedenen Inhibitoren inkubiert. Die Infektion erfolgte analog der Infektion von Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie. Nach der Infektion wurden die Zellen mit DMEM-HEPES mit 1 % FBS gewaschen und für eine Stunde

mit 100 µg/ml Gentamicin und 100 U/ml Penicillin G in Medium bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Dabei wurden die extrazellulären Bakterien abgetötet. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 300 µl 1 % Saponinlösung je Vertiefung für 10 min bei 37°C und 5 % CO₂ lysiert. Die freigesetzten Bakterien wurden in entsprechenden Verdünnungen auf Blutagarplatten bei 37°C über Nacht kultiviert und so am folgenden Tag die Zahl der überlebenden Kolonien bestimmt.

7.6.3. Präinkubation der Wirtszellen

Für einige Versuche wurden die gewaschenen Wirtszellen vor der Infektion mit verschiedenen Proteinen, Antikörpern oder Inhibitoren in der angegebenen Konzentration für mindestens 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Je nach Versuchsansatz wurden Proteine, Antikörper oder Inhibitoren durch mehrmaliges Waschen entfernt. Die Infektion der Wirtszellen mit *S. pneumoniae* erfolgte direkt im Anschluss.

7.6.4. Präinkubation der Bakterien

Für die Blockierung potenzieller Adhäsine wurden in Inhibitionsversuchen die eingestellten Bakterien mit spezifischen Antikörpern für 20 min bei 37°C präinkubiert. Die behandelte Pneumokokkensuspension wurde nach der Inkubation zusammen mit den Antikörpern für die Infektion der Wirtszellen eingesetzt.

7.7. Mikroskopie

7.7.1. Fixierung von Präparaten für die Immunfluoreszenzmikroskopie

Paraformaldehyd wurde als 37 %ige Lösung angesetzt und aliquotiert bei -20°C gelagert. Zum Gebrauch wurde die PFA-Lösung bei 70°C aufgetaut und mit PBS zu einer Arbeitslösung mit einer Konzentration von 1 % bis 3,7 % verdünnt. Nach der Infektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 300 µl der PFA-Lösung über Nacht bei 4°C fixiert.

7.7.2. Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Zum Nachweis und zur Unterscheidung von adhärenenten und invasiven Bakterien wurde nach der Infektion eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Das Prinzip der Färbung war eine zweifache Inkubation mit Kaninchen-anti-*S. pneumoniae* IgG-Antikörpern mit einer dazwischen liegenden Permeabilisierung der Zellen. Nach der ersten anti-Pneumokokken-Inkubation wurde mit einem Alexa 488 gekoppeltem Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper inkubiert. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembran mit Triton-X 100. Erst nach erneuter Inkubation mit Kaninchen-anti-*S. pneumoniae* IgG-Antikörper, durch die nun

auch die intrazellulären Bakterien detektiert wurden, konnte ein mit Alexa 568 gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper an die intrazellulären, aber auch an die extrazellulären Bakterien binden. Extrazelluläre Bakterien waren somit durch zwei unterschiedliche Fluorochrome markiert, intrazelluläre nur durch das Fluorochrom Alexa 568. Alexa 488 besitzt eine Anregungswellenlänge im blauen Spektralbereich und emittiert im grünen Bereich, Alexa 568 absorbiert im grünen Spektralbereich und fluoresziert rot. Damit erscheinen invasive Bakterien bei Betrachtung durch ein Fluoreszenzmikroskop rot und extrazelluläre Bakterien durch Überlagerung der beiden Fluorochrome gelb. Der detaillierte Ablauf der Doppelimmunfluoreszenzfärbung ist in Abbildung (Abbildung 38) schematisch dargestellt und wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln durchgeführt. Die Präparate wurden lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert.

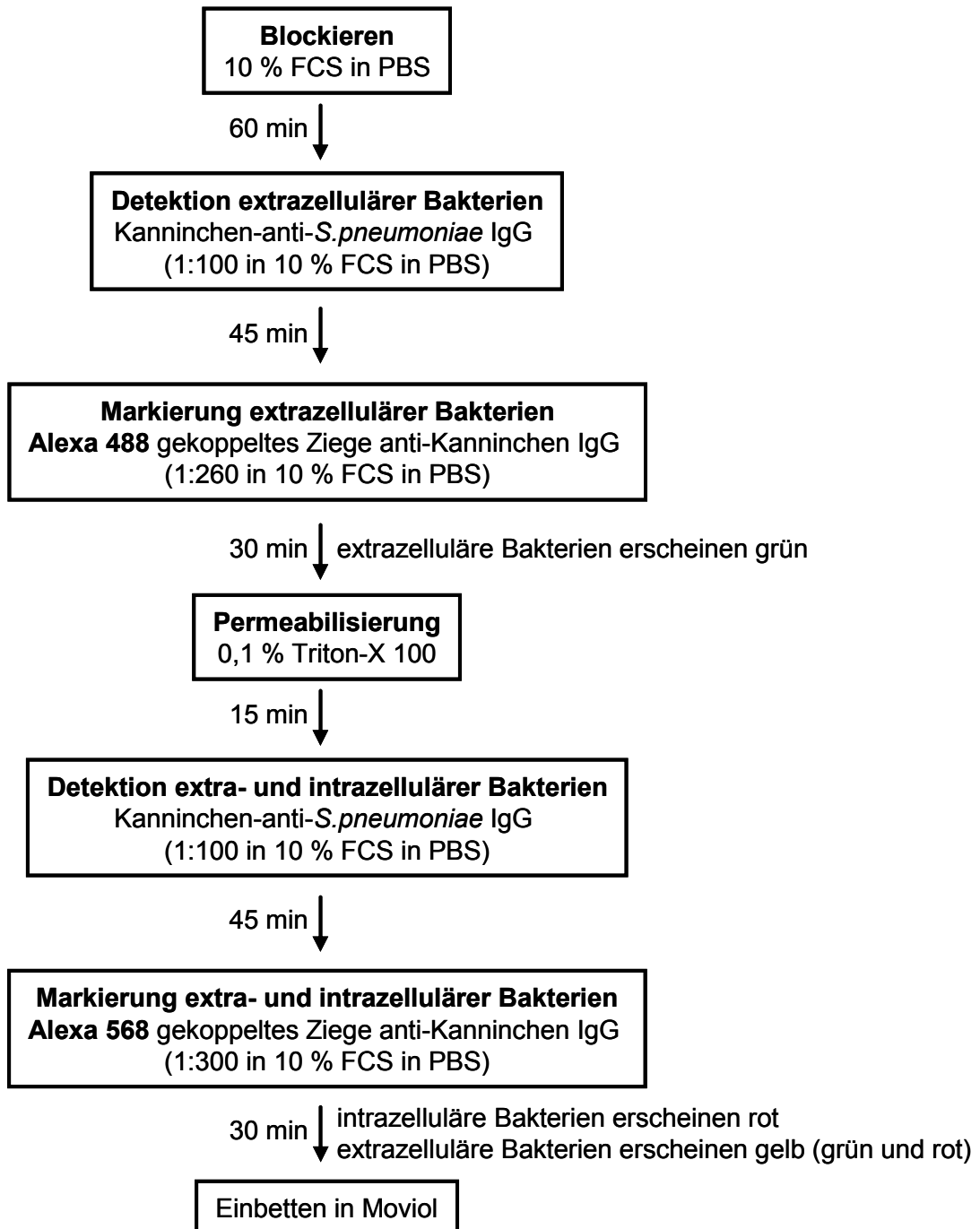


Abbildung 38: Schematische Darstellung des Ablaufs der Doppelimmunfluoreszenzfärbung zur Darstellung adhärenter und invasiver Pneumokokken

Die Präparate wurden durch Zählen von mindestens 30 Zellen bei 1000-facher Vergrößerung in einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die dargestellten Bilder wurden mit dem konfokalen Laserscanning Mikroskop der Firma Zeiss und der dazugehörigen Software angefertigt.

7.7.3. Fixierung von Präparaten für die Raster-Elektronenmikroskopie

Zur Vorbereitung für die Raster-Elektronenmikroskopie wurden die Zellen nach der Infektion mit PBS gewaschen und mit Cacodylat-Puffer (0,1 M Cacodylat (Dimethylarseninsäure Natriumsalz-Trihydrat), 0,09 M Sucrose, 0,01 M MgCl₂, 0,01 M CaCl₂) mit 3 % Formaldehyd und 2 % Glutaraldehyd über Nacht bei 4°C fixiert. Die weiteren Schritte wurden von Dr. Manfred Rohde (HZI, Braunschweig) durchgeführt. Die fixierten Präparate wurden mit TE-Puffer (20 mM Tris-HCl (pH 7,0), 1 mM EDTA) gewaschen und schrittweise mit einer Aceton-Verdünnungsreihe entwässert. Nach der kritischen Punkttrocknung mit flüssigem CO₂ wurden die Proben mit Gold bedampft und in einem Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop (DSM 982 Gemini, Zeiss) bei einer Spannung von 5 kV untersucht. Die Bilder wurden digital aufgenommen und gespeichert.

7.7.4. Fixierung von Bakterien für die Transmissions-Elektronenmikroskopie

Für die Untersuchung der Zellmorphologie und zellulärer Strukturen mit Hilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie wurden Pneumokokken in einer THY-Kultur angezogen und in Cacodylat-Puffer mit 2 % Formaldehyd, 2,5 % Glutaraldehyd, 0,075 % Rutheniumrot und 0,075 M Lysinacetat für 20 min auf Eis fixiert. Anschließend wurden die Proben mit Cacodylat-Puffer mit 0,075 % Rutheniumrot gewaschen und ein zweites Mal mit 2 % Formaldehyd und 2,5 % Glutaraldehyd in Cacodylat-Puffer mit 0,075 % Rutheniumrot für 3 Stunden fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Proben in Cacodylat-Puffer mit 0,075 % Rutheniumrot und 1 % Osmium für 1 Stunde bei Raumtemperatur fixiert. Die Proben wurden mit Cacodylat-Puffer und 0,075 % Rutheniumrot gewaschen und schrittweise über eine Acetonverdünnungsreihe entwässert. Dann erfolgte schrittweise die Einbettung der Präparate in das Acrylat-Harz LR White Harz (London Resin Company). Zunächst wurde je ein Teil 100 % Ethanol und LR White Harz für 2 Stunden auf Eis zugegeben. Danach wurde über Nacht auf Eis 1 Teil Ethanol und 2 Teile LR White Harz zugesetzt. Am folgenden Tag wurden die Proben mit reinem LR White Harz für 8 Stunden auf Eis behandelt und weiter über Nacht nach Austausch des Harzes inkubiert. Abschließend wurden die Proben in eine Gelatine kapsel gesetzt und mit LR White Harz bei Raumtemperatur ausgefüllt. Die Polymerisation erfolgte bei 60°C für 48 Stunden. Anschließend wurden Ultradünnschnitte angefertigt und diese mit 4 % wässrigem Uranylacetat nachkontrastiert. Die luftgetrockneten Proben wurden dann in einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM, EM 910, Zeiss) bei einer Spannung von 80 kV analysiert und die Bilder digital gespeichert. Die Transmissions-elektronenmikroskopie wurde von Dr. Manfred Rohde durchgeführt.

7.8. Methoden zur Untersuchung der Fibronectin-Bindung von *S. pneumoniae*

7.8.1. Bindung von *Streptococcus pneumoniae* an immobilisiertes Fibronectin

Für die Untersuchung der Bindung von *S. pneumoniae* an immobilisiertes Fibronectin wurden die Vertiefungen einer 96-well MaxiSorp-Platte mit je 2 µg humanem bzw. bovinem Plasma-Fibronectin in einem Volumen von 50 µl PBS über Nacht bei 4°C beschichtet. Die Vertiefungen wurden anschließend einmal mit PBS gewaschen und für 3 Stunden mit 1 % BSA in PBS bei Raumtemperatur abgesättigt.

Die Bakterien wurden in einer THY-Kultur bei 37°C angezogen, sedimentiert und einmal mit 0,1 M Na-Carbonatpuffer pH 9,2 gewaschen. Die Pneumokokken-Suspension wurde auf eine optische Dichte bei 600 nm von 1 eingestellt. Dies entspricht einer Bakterienzahl von 10⁹ Bakterien/ml. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation sedimentiert und in 200 µl FITC-Lösung (1 mg/ml in 0,1 M Na-Carbonatpuffer pH 9,2) für 30 min bei 37°C lichtgeschützt inkubiert. Die mit FITC markierten Pneumokokken wurden anschließend sorgfältig mit PBS gewaschen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen, und in PBS aufgenommen. Zur Untersuchung der Bindung von Pneumokokken an immobilisiertes Fibronectin wurden 2,5 x 10⁷ Bakterien in einem Volumen von 50 µl je Vertiefung eingesetzt. Für Inhibitionsstudien mit anti-PavA-Antikörpern wurde die entsprechende Menge FITC-markierter Bakterien mit der angegebenen Menge an Antikörper für 20 min bei 37°C lichtgeschützt inkubiert und nicht gebundener Antikörper durch anschließendes Waschen mit PBS entfernt. Die Inkubation der FITC-markierten Pneumokokken mit dem immobilisierten Fibronectin erfolgte für 1 Stunde lichtgeschützt bei 37°C. Anschließend wurde die Fluoreszenz bei 485 nm/538 nm (Anregung/Emission) im Fluoroskan Ascent (Thermo-Labsystems) gemessen. Dieser 1. Messwert wurde gleich 100 % gesetzt. Die Platte wurde bis zu dreimal mit PBS gewaschen und jeweils erneut im Fluoroskan Ascent vermessen (2. Messwert). Die tatsächliche Bindung wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Bindungswert [\%]} = \frac{2. \text{Messwert}}{1. \text{Messwert}} \times 100$$

7.8.2. Bindung von löslichem Fibronectin an *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae wurde in einer THY-Kultur bei 37°C angezogen. Die Bakterien wurden nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 durch Zentrifugieren bei 3000 x g sedimentiert und einmal mit PBS gewaschen. Die Pneumokokkenzahl wurde auf 10⁹ Bakterien/ml eingestellt. Dies entspricht einer OD₆₀₀ von 1. Für den Nachweis von gebundenem Fibronectin mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden je Ansatz 10⁸ Bakterien verwendet und mit der angegebenen Menge an reinem Fibronectin oder frischem Plasma für 30 min bei 37°C inkubiert. Für die Detektion im Immunblot wurden jeweils 10⁹ Bakterien für die Inkubation mit löslichem Fibronectin oder frischem Plasma eingesetzt.

7.8.2.1. Nachweis von gebundenem Fibronectin an Pneumokokken im Immunblot

Nach der Inkubation der Bakterien mit reinem Fibronectin oder frischem Plasma wurden die Ansätze zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pneumokokken-Sediment mit 20 µl 2 M NaCl versetzt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Der Überstand wurde abgenommen und mit 180 µl Proteinprobenpuffer versetzt. Das Sediment wurde in 100 µl PBS resuspendiert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 100 µl Proteinprobenpuffer hinzugegeben. Die Proben wurden für 5 min bei 99°C denaturiert. Es wurden jeweils 10 µl in einer SDS-PAGE aufgetrennt und für einen Immunblot eingesetzt. Für die Detektion von Fibronectin wurde ein Kaninchen-anti-Fibronectin-Antikörper (Dako) in einer Verdünnung von 1:600 verwendet. Als Ladungskontrolle wurde die Enolase von Pneumokokken mit einer 1:200 Verdünnung eines Kaninchen-anti-Pneumokokken-Enolase-Serums (Eurogentec) nachgewiesen (Bergmann *et al.*, 2003). Der Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper wurde 1:5000 verdünnt eingesetzt, und die Entwicklung erfolgte mit Hilfe von Chloronaphthol und H₂O₂.

7.8.2.2. Nachweis von gebundenem Fibronectin an *S. pneumoniae* unter Verwendung der Durchflusszytometrie

Die Pneumokokken wurden nach der Inkubation mit Fibronectin oder Plasma einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 100 µl einer 1:600 Verdünnung des Kaninchen-anti-Fibronectin-Antikörpers (Dako) für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Bakterien in 100 µl des 1:300 verdünnten FITC-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörpers (Dianova) resuspendiert und erneut inkubiert. Für die Fixierung wurden die Pneumokokken mit PBS gewaschen, in 1% Paraformaldehyd aufgenommen und für mindestens 1 Stunde lichtgeschützt in den Kühlschrank gestellt. Die Messung erfolgte nach einer Ultraschallbehandlung unter Verwendung des FACS Calibur (Becton Dickinson). Die Auswertung der erhaltenen Daten wurde mit der frei erhältlichen Software WinMDI durchgeführt.

7.9. Maus-Meningitis-Infektionsmodell

Die Tierversuche wurden von Prof. Dr. Roland Nau und Dr. Joachim Gerber mit weiblichen C57BL/6 Mäusen mit einem Gewicht von 26 g bis 37 g und einem Alter von 5 bis 7 Monaten durchgeführt. Die Tiere stammten aus dem zentralen Tierstall der Georg-August-Universität Göttingen. Alle Versuche wurden nach den geltenden niedersächsischen Tierschutzrichtlinien durchgeführt und von der Bezirksregierung Braunschweig genehmigt.

7.9.1. Infektion von Mäusen mit *S. pneumoniae* zur Bestimmung der Mortalität

Es wurden je Gruppe 9 Mäuse durch eine Injektion mit 10^6 Pneumokokken in einem Volumen von 10 μ l 0,9 % NaCl in den rechten Frontallappen infiziert und über einen Zeitraum von 12 Tagen beobachtet.

7.9.2. Infektion von Mäusen mit Pneumokokken zur Untersuchung des Krankheitsbildes (Gerber, Nau 2001)

Zur Untersuchung der Ausmaßes der körperlichen Erkrankung und des Grades einer Hirnhautentzündung nach einer Infektion mit Pneumokokken wurden je Gruppe 6 Tiere mit eine Dosis von 10^4 Pneumokokken durch eine Injektion in den rechten Frontallappen infiziert. Vor der Infektion und nach der Infektion in einem Abstand von je 12 Stunden wurde der Gesundheitszustand kontrolliert und ein „Drahtseiltest“ mit den Tieren durchgeführt, um Rückschlüsse auf das Ausmaß der Hirnhautentzündung ziehen zu können. Der Gesundheitszustand wurde durch Gewichtsbestimmung und Beobachtung des Verhaltens überprüft. Dabei wurde folgender Maßstab für die Bewertung des Verhaltens angelegt:

klinische Punktzahl	Verhalten	Bemerkung
0	normales Verhalten	
1	leichte Lethargie	sichtbare Abnahme von spontaner Aktivität
2	schwere Lethargie	seltene spontane Bewegung, aber Laufen nach Stimulation durch den Untersuchenden
3	nicht lauffähig	
4	tot	

Tabelle 18: Bewertungsmaßstab für das Verhalten von Mäusen nach Infektion mit *S. pneumoniae*

Bei dem „Drahtseiltest“ sollte die Maus über ein Seil ein Podest erreichen. Lag die dafür benötigte Zeit unter 6 sec, wurde die Punktzahl 0 vergeben. Für jedes weitere benötigte Zeitintervall von 6 sec wurde ein Punkt addiert. Mäuse, die für 60 sec an dem Seil hingen, ohne das Podest zu erreichen, bekamen die Punktzahl 10. Mäuse, die von dem Seil herunterfielen bevor 60 sec erreicht waren, erhielten für jedes Zeitintervall von 6 sec, das sie von der 60 sec-Marke entfernt waren, einen zusätzlichen Punkt. Damit betrug die maximal zu vergebene Punktzahl 20 für eine Maus, die sich nicht auf dem Seil halten konnte. Mäuse, die nicht laufen konnten, wurden gemäß den Richtlinien der Bezirksregierung getötet und dieser Zeitpunkt als Todeszeitpunkt bestimmt.

36 Stunden nach der Infektion wurde alle Mäuse getötet. Die Hirnrinde der Gehirnhälften wurde in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Anschließende Gewebeschnitte wurden nach einer Hämatoxylin-Eosin Färbung untersucht. Hämatoxylin färbt Zellkerne blau und das Zytoplasma wird mit Eosin gegengefärbt und erscheint rot. Das Ausmaß der Hirnhautentzündung wurde durch Auszählen der Granulozyten, die bei einer Meningitis in das Gewebe einwandern, in einem Gesichtsfeld bei einer 40-fachen Vergrößerung bestimmt. Dabei wurde folgender Maßstab angelegt:

Punktzahl	Granulozytenanzahl je Gesichtsfeld
0	0
1	< 10
2	10 – 50
3	> 50

Tabelle 19: Maßstab für die Beurteilung des Ausmaßes einer Hirnhautentzündung im experimentellen Maus-Meningitis-Modell

Es wurden die Bereiche der stirnseitigen Region zwischen den Hirnhemisphären, der Hippocampuspalte von beiden Seiten, von drei Oberflächenregionen im Bereich der Wölbung der Hirnhemisphären und des dritten Ventrikels untersucht. Die Punktzahlen der einzelnen Regionen wurden addiert. Weiterhin wurde die Bakterienlast nach der Infektion im Blut, im Kleinhirn und in der Milz durch Homogenisieren der Organe und Ausplattieren von Verdünnungsreihen auf Blutagarplatten bestimmt.

7.10. Statistische Auswertung

Die gezeigten Werte von Adhärenz und Invasion geben den Mittelwert und die Standardabweichung berechnet aus mindestens drei Infektionen wieder, die unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt wurden. Zusätzlich wurde die statistische Signifikanz der Ergebnisse durch einen zweiseitigen ungepaarten Student *t*-Test ermittelt.

Die Ergebnisse aus den Mausexperimenten wurden mit dem parameterfreien statistischen Mann-Whitney U-Test zweiseitig verglichen. Ein *P*-Wert von < 0,05 wurde jeweils als signifikant definiert.

8. Literaturverzeichnis

- Adamou, J. E., T. M. Wizemann, P. Barren and S. Langermann (1998). Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Infect Immun* 66(2): 820-2.
- Adrian, P. V., D. Bogaert, M. Oprins, S. Rapola, M. Lahdenkari, T. Kilpi, R. de Groot, H. Kayhty and P. W. Hermans (2004). Development of antibodies against pneumococcal proteins alpha-enolase, immunoglobulin A1 protease, streptococcal lipoprotein rotamase A, and putative proteinase maturation protein A in relation to pneumococcal carriage and Otitis Media. *Vaccine* 22(21-22): 2737-42.
- Agerer, F., A. Michel, K. Ohlsen and C. R. Hauck (2003). Integrin-mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src family protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 278(43): 42524-31.
- Agerer, F., S. Lux, A. Michel, M. Rohde, K. Ohlsen and C. R. Hauck (2005). Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalisation. *J Cell Sci* 118(Pt 10): 2189-200.
- Ali, I. U. and R. O. Hynes (1978). Role of disulfide bonds in the attachment and function of large, external, transformation-sensitive glycoprotein at the cell surface. *Biochim Biophys Acta* 510(1): 140-50.
- Allio, A. E. and P. J. McKeown-Longo (1988). Extracellular matrix assembly of cell-derived and plasma-derived fibronectins by substrate-attached fibroblasts. *J Cell Physiol* 135(3): 459-66.
- Appelbaum, P. C., A. Bhamjee, J. N. Scragg, A. F. Hallett, A. J. Bowen and R. C. Cooper (1977). *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. *Lancet* 2(8046): 995-7.
- Austrian, R. (1981). Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention. *Rev Infect Dis* 3 Suppl: S1-17.
- Avery, O. T., C. M. MacLeod and M. McCarty (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.* 79: 137-158.
- Balachandran, P., S. K. Hollingshead, J. C. Paton and D. E. Briles (2001). The autolytic enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* is not responsible for releasing pneumolysin. *J Bacteriol* 183(10): 3108-16.
- Barkalow, F. J. and J. E. Schwarzbauer (1991). Localization of the major heparin-binding site in fibronectin. *J Biol Chem* 266(12): 7812-8.

- Beckmann, C., J. D. Waggoner, T. O. Harris, G. S. Tamura and C. E. Rubens (2002). Identification of novel adhesins from Group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. *Infect Immun* 70(6): 2869-76.
- Bergeron, Y., N. Ouellet, A. M. Deslauriers, M. Simard, M. Olivier and M. G. Bergeron (1998). Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infect Immun* 66(3): 912-22.
- Bergey (1986). *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*.
- Bergmann, S., M. Rohde, G. S. Chhatwal and S. Hammerschmidt (2001). alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* 40(6): 1273-87.
- Bergmann, S., D. Wild, O. Diekmann, R. Frank, D. Bracht, G. S. Chhatwal and S. Hammerschmidt (2003). Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed alpha-enolase of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 49(2): 411-23.
- Bergmann, S., M. Rohde and S. Hammerschmidt (2004). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen-binding protein. *Infect Immun* 72(4): 2416-9.
- Bergmann, S., M. Rohde, K. T. Preissner and S. Hammerschmidt (2005). The nine residue plasminogen-binding motif of the pneumococcal enolase is the major cofactor of plasmin-mediated degradation of extracellular matrix, dissolution of fibrin and transmigration. *Thromb Haemost* 94(2): 304-11.
- Bergmann, S. and S. Hammerschmidt (2006). Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology* 152(Pt 2): 295-303.
- Berry, A. M., R. A. Lock, D. Hansman and J. C. Paton (1989). Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 57(8): 2324-30.
- Berry, A. M., R. A. Lock, S. M. Thomas, D. P. Rajan, D. Hansman and J. C. Paton (1994). Cloning and nucleotide sequence of the *Streptococcus pneumoniae* hyaluronidase gene and purification of the enzyme from recombinant *Escherichia coli*. *Infect Immun* 62(3): 1101-8.
- Berry, A. M. and J. C. Paton (1996). Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 64(12): 5255-62.

- Berry, A. M. and J. C. Paton (2000). Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect Immun* 68(1): 133-40.
- Boulnois, G. J. (1992). Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol* 138(2): 249-59.
- Bracht, D. (2005). Proteomanalyse von *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation.
- Briles, D. E., J. Yother and L. S. McDaniel (1988). Role of pneumococcal surface protein A in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Infect Dis* 10 Suppl 2: S372-4.
- Brown, J. H. (1919). The use of blood agar for the study of streptococci. *The Rockefeller Institut for Medical Research* 9: 122.
- Brown, J. S., T. Hussell, S. M. Gilliland, D. W. Holden, J. C. Paton, M. R. Ehrenstein, M. J. Walport and M. Botto (2002). The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26): 16969-74.
- Bumbaca, D., J. E. Littlejohn, H. Nayakanti, D. J. Rigden, M. Y. Galperin and M. J. Jedrzejak (2004). Sequence analysis and characterization of a novel fibronectin-binding repeat domain from the surface of *Streptococcus pneumoniae*. *Omic* 8(4): 341-56.
- Burman, L. A., R. Norrby and B. Trollfors (1985). Invasive pneumococcal infections: incidence, predisposing factors, and prognosis. *Rev Infect Dis* 7(2): 133-42.
- Burridge, K. and M. Chrzanowska-Wodnicka (1996). Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 463-518.
- Butler, J. C. (1997). Epidemiology of pneumococcal serotypes and conjugate vaccine formulations. *Microb Drug Resist* 3(2): 125-9.
- Calderwood, D. A., R. Zent, R. Grant, D. J. Rees, R. O. Hynes and M. H. Ginsberg (1999). The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem* 274(40): 28071-4.
- Calvin, N. M. and P. C. Hanawalt (1988). High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* 170(6): 2796-801.
- Camara, M., G. J. Boulnois, P. W. Andrew and T. J. Mitchell (1994). A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein. *Infect Immun* 62(9): 3688-95.
- Carsons, S. E. (1989). *Fibronectin in Health and Disease*. Florida: CRC Press, Inc.

- Chapuy-Regaud, S., A. D. Ogunniyi, N. Diallo, Y. Huet, J. F. Desnottes, J. C. Paton, S. Escaich and M. C. Trombe (2003). RegR, a global LacI/GalR family regulator, modulates virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 71(5): 2615-25.
- Chen, J. D. and D. A. Morrison (1988). Construction and properties of a new insertion vector, pJDC9, that is protected by transcriptional terminators and useful for cloning of DNA from *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* 64(1): 155-64.
- Chen, H. and D. F. Mosher (1996). Formation of sodium dodecyl sulfate-stable fibronectin multimers. Failure to detect products of thiol-disulfide exchange in cyanogen bromide or limited acid digests of stabilized matrix fibronectin. *J Biol Chem* 271(15): 9084-9.
- Chhatwal, G. S. (2002). Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors. *Trends Microbiol* 10(5): 205-8.
- Chia, J. S., C. Y. Yeh and J. Y. Chen (2000). Identification of a fibronectin binding protein from *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 68(4): 1864-70.
- Christie, J., R. McNab and H. F. Jenkinson (2002). Expression of fibronectin-binding protein FbpA modulates adhesion in *Streptococcus gordonii*. *Microbiology* 148(Pt 6): 1615-25.
- Centers for Disease Control and Prevention. (1997).
- Collen, D. and M. Verstraete (1975). Molecular biology of human plasminogen. II. Metabolism in physiological and some pathological conditions in man. *Thromb Diath Haemorrh* 34(2): 403-8.
- Courtney, H. S., Y. Li, J. B. Dale and D. L. Hasty (1994). Cloning, sequencing, and expression of a fibronectin/fibrinogen-binding protein from group A streptococci. *Infect Immun* 62(9): 3937-46.
- Courtney, H. S., J. B. Dale and D. I. Hasty (1996). Differential effects of the streptococcal fibronectin-binding protein, FBP54, on adhesion of group A streptococci to human buccal cells and HEP-2 tissue culture cells. *Infect Immun* 64(7): 2415-9.
- Crain, M. J., W. D. Waltman, 2nd, J. S. Turner, J. Yother, D. F. Talkington, L. S. McDaniel, B. M. Gray and D. E. Briles (1990). Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 58(10): 3293-9.

- Cue, D., P. E. Dombek, H. Lam and P. P. Cleary (1998). *Streptococcus pyogenes* serotype M1 encodes multiple pathways for entry into human epithelial cells. *Infect Immun* 66(10): 4593-601.
- Cue, D., S. O. Southern, P. J. Southern, J. Prabhakar, W. Lorelli, J. M. Smallheer, S. A. Mousa and P. P. Cleary (2000). A nonpeptide integrin antagonist can inhibit epithelial cell ingestion of *Streptococcus pyogenes* by blocking formation of integrin alpha 5beta 1-fibronectin-M1 protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(6): 2858-63.
- Cundell, D. R., N. P. Gerard, C. Gerard, I. Idanpaan-Heikkila and E. I. Tuomanen (1995). *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 377(6548): 435-8.
- Cundell, D. R., B. J. Pearce, J. Sandros, A. M. Naughton and H. R. Masure (1995). Peptide permeases from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eucaryotic cells. *Infect Immun* 63(7): 2493-8.
- Dagan, R., M. Isaachson, R. Lang, J. Karpuch, C. Block and J. Amir (1994). Epidemiology of pediatric meningitis caused by *Haemophilus influenzae* type b, *Streptococcus pneumoniae*, and *Neisseria meningitidis* in Israel: a 3-year nationwide prospective study. *Israeli Pediatric Bacteremia and Meningitis Group. J Infect Dis* 169(4): 912-6.
- Dave, S., A. Brooks-Walter, M. K. Pangburn and L. S. McDaniel (2001). PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. *Infect Immun* 69(5): 3435-7.
- Davies, T., R. V. Goering, M. Lovgren, J. A. Talbot, M. R. Jacobs and P. C. Appelbaum (1999). Molecular epidemiological survey of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from Asia, Europe, and North America. *Diagn Microbiol Infect Dis* 34(1): 7-12.
- de Hoog, C. L., L. J. Foster and M. Mann (2004). RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers. *Cell* 117(5): 649-62.
- de las Rivas, B., J. L. Garcia, R. Lopez and P. Garcia (2001). Molecular characterization of the pneumococcal teichoic acid phosphorylcholine esterase. *Microb Drug Resist* 7(3): 213-22.
- de Las Rivas, B., J. L. Garcia, R. Lopez and P. Garcia (2002). Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo-beta-N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J Bacteriol* 184(18): 4988-5000.
- Dedhar, S. (1999). Integrins and signal transduction. *Curr Opin Hematol* 6(1): 37-43.

- Dintilhac, A., G. Alloing, C. Granadel and J. P. Claverys (1997). Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol Microbiol* 25(4): 727-39.
- Doern, G. V., K. P. Heilmann, H. K. Huynh, P. R. Rhomberg, S. L. Coffman and A. B. Brueggemann (2001). Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States during 1999–2000, including a comparison of resistance rates since 1994–1995. *Antimicrob Agents Chemother* 45(6): 1721-9.
- Dramsi, S., F. Bourdichon, D. Cabanes, M. Lecuit, H. Fsihi and P. Cossart (2004). FbpA, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor. *Mol Microbiol* 53(2): 639-49.
- Duthy, T. G., R. J. Ormsby, E. Giannakis, A. D. Ogunniyi, U. H. Stroehner, J. C. Paton and D. L. Gordon (2002). The human complement regulator factor H binds pneumococcal surface protein PspC via short consensus repeats 13 to 15. *Infect Immun* 70(10): 5604-11.
- Dziewanowska, K., J. M. Patti, C. F. Deobald, K. W. Bayles, W. R. Trumble and G. A. Bohach (1999). Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect Immun* 67(9): 4673-8.
- Elm, C., R. Braathen, S. Bergmann, R. Frank, J. P. Vaerman, C. S. Kaetzel, G. S. Chhatwal, F. E. Johansen and S. Hammerschmidt (2004). Ectodomains 3 and 4 of human polymeric Immunoglobulin receptor (hplgR) mediate invasion of *Streptococcus pneumoniae* into the epithelium. *J Biol Chem* 279(8): 6296-304.
- Eskola, J., T. Kilpi, A. Palmu, J. Jokinen, J. Haapakoski, E. Herva, A. Takala, H. Kayhty, P. Karma, R. Kohberger, G. Siber and P. H. Makela (2001). Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med* 344(6): 403-9.
- Fedson, D. S. (1998). Pneumococcal vaccination in the United States and 20 other developed countries, 1981-1996. *Clin Infect Dis* 26(5): 1117-23.
- Fenoll, A., I. Jado, D. Vicioso, A. Perez and J. Casal (1998). Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain: update (1990 to 1996). *J Clin Microbiol* 36(12): 3447-54.

- Fillon, S., K. Soulis, S. Rajasekaran, H. Benedict-Hamilton, J. N. Radin, C. J. Orihuela, K. C. El Kasmi, G. Murti, D. Kaushal, M. W. Gaber, J. R. Weber, P. J. Murray and E. I. Tuomanen (2006). Platelet-activating factor receptor and innate immunity: uptake of gram-positive bacterial cell wall into host cells and cell-specific pathophysiology. *J Immunol* 177(9): 6182-91.
- Fine, D. P. (1975). Pneumococcal type-associated variability in alternate complement pathway activation. *Infect Immun* 12(4): 772-8.
- Fischetti, V. A., V. Pancholi and O. Schneewind (1990). Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci. *Mol Microbiol* 4(9): 1603-5.
- Fogh, J. (1975). Human tumor cells in vitro. New York: Plenum Press: 115-159.
- Fowler, T., S. Johansson, K. K. Wary and M. Hook (2003). Src kinase has a central role in in vitro cellular internalization of *Staphylococcus aureus*. *Cell Microbiol* 5(6): 417-26.
- Garcia, P., M. P. Gonzalez, E. Garcia, R. Lopez and J. L. Garcia (1999). LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol Microbiol* 31(4): 1275-81.
- Garcia-Bustos, J. and A. Tomasz (1990). A biological price of antibiotic resistance: major changes in the peptidoglycan structure of penicillin-resistant pneumococci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(14): 5415-9.
- Garcia-Leoni, M. E., S. Moreno, P. Rodeno, E. Cercenado, T. Vicente and E. Bouza (1992). Pneumococcal pneumonia in adult hospitalized patients infected with the human immunodeficiency virus. *Arch Intern Med* 152(9): 1808-12.
- Geelen, S., C. Bhattacharyya and E. Tuomanen (1993). The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells. *Infect Immun* 61(4): 1538-43.
- Gerber, J., G. Raivich, A. Wellmer, C. Noeske, T. Kunst, A. Werner, W. Bruck and R. Nau (2001). A mouse model of *Streptococcus pneumoniae* meningitis mimicking several features of human disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 101(5): 499-508.
- Geslin, P., A. Fremaux, G. Sissia and C. Spicq (1998). *Streptococcus pneumoniae*: serotypes, invasive and antibiotic resistant strains. Current situation in France. *Presse Med* 27 Suppl 1: 21-7.
- Giancotti, F. G. and E. Ruoslahti (1999). Integrin signaling. *Science* 285(5430): 1028-32.

- Giard, D. J., S. A. Aaronson, G. J. Todaro, P. Arnstein, J. H. Kersey, H. Dosik and W. P. Parks (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51(5): 1417-23.
- Giebink, G. S., J. Verhoef, P. K. Peterson and P. G. Quie (1977). Opsonic requirements for phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* types VI, XVIII, XXIII, and XXV. *Infect Immun* 18(2): 291-7.
- Gosink, K. K., E. R. Mann, C. Guglielmo, E. I. Tuomanen and H. R. Masure (2000). Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 68(10): 5690-5.
- Gray, B. M., G. M. Converse, 3rd and H. C. Dillon, Jr. (1979). Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing disease. *J Infect Dis* 140(6): 979-83.
- Grinnell, F. (1984). Fibronectin and wound healing. *J Cell Biochem* 26(2): 107-16.
- Guiral, S., T. J. Mitchell, B. Martin and J. P. Claverys (2005). Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(24): 8710-5.
- Hahn, L. H. and K. M. Yamada (1979). Identification and isolation of a collagen-binding fragment of the adhesive glycoprotein fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(3): 1160-3.
- Hammerschmidt, S., S. R. Talay, P. Brandtzaeg and G. S. Chhatwal (1997). SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol Microbiol* 25(6): 1113-24.
- Hammerschmidt, S., G. Bethe, P. H. Remane and G. S. Chhatwal (1999). Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 67(4): 1683-7.
- Hammerschmidt, S., M. P. Tillig, S. Wolff, J. P. Vaerman and G. S. Chhatwal (2000). Species-specific binding of human secretory component to SpsA protein of *Streptococcus pneumoniae* via a hexapeptide motif. *Mol Microbiol* 36(3): 726-36.
- Hammerschmidt, S., S. Wolff, A. Hocke, S. Rosseau, E. Muller and M. Rohde (2005). Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 73(8): 4653-67.
- Hammerschmidt, S. (2006). Adherence molecules of pathogenic pneumococci. *Curr Opin Microbiol* 9(1): 12-20.

- Han, S. H., J. H. Kim, M. Martin, S. M. Michalek and M. H. Nahm (2003). Pneumococcal lipoteichoic acid (LTA) is not as potent as staphylococcal LTA in stimulating Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 71(10): 5541-8.
- Hannigan, G. E., C. Leung-Hagesteijn, L. Fitz-Gibbon, M. G. Coppelino, G. Radeva, J. Filmus, J. C. Bell and S. Dedhar (1996). Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 379(6560): 91-6.
- Hanski, E. and M. Caparon (1992). Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesin of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(13): 6172-6.
- Hanski, E., P. A. Horwitz and M. G. Caparon (1992). Expression of protein F, the fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* JRS4, in heterologous streptococcal and enterococcal strains promotes their adherence to respiratory epithelial cells. *Infect Immun* 60(12): 5119-25.
- Hanski, E., J. Jaffe and V. Ozeri (1996). Proteins F1 and F2 of *Streptococcus pyogenes*. Properties of fibronectin binding. *Adv Exp Med Biol* 408: 141-50.
- Hansman, D. and M. M. Bullen (1967). A resistant pneumococcus. *Lancet* 2: 264-265.
- Havarstein, L. S., G. Coomaraswamy and D. A. Morrison (1995). An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(24): 11140-4.
- Henrichsen, J. (1995). Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 33(10): 2759-62.
- Hermans, P. W., P. V. Adrian, C. Albert, S. Estevao, T. Hoogenboezem, I. H. Luijendijk, T. Kamphausen and S. Hammerschmidt (2006). The streptococcal lipoprotein rotamase A (SlrA) is a functional peptidyl-prolyl isomerase involved in pneumococcal colonization. *J Biol Chem* 281(2): 968-76.
- Heumann, D., C. Barras, A. Severin, M. P. Glauser and A. Tomasz (1994). Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect Immun* 62(7): 2715-21.
- Hirst, R. A., K. S. Sikand, A. Rutman, T. J. Mitchell, P. W. Andrew and C. O'Callaghan (2000). Relative roles of pneumolysin and hydrogen peroxide from *Streptococcus pneumoniae* in inhibition of ependymal ciliary beat frequency. *Infect Immun* 68(3): 1557-62.

- Hirst, R. A., H. Yesilkaya, E. Clitheroe, A. Rutman, N. Duffy, T. J. Mitchell, C. O'Callaghan and P. W. Andrew (2002). Sensitivities of human monocytes and epithelial cells to pneumolysin are different. *Infect Immun* 70(2): 1017-22.
- Holmes, A. R., R. McNab, K. W. Millsap, M. Rohde, S. Hammerschmidt, J. L. Mawdsley and H. F. Jenkinson (2001). The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol Microbiol* 41(6): 1395-408.
- Hong, K. (2005). Identification and characterization of a novel fibronectin-binding protein gene from *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* strain VTU211. *FEMS Immunol Med Microbiol* 45(2): 231-7.
- Hook, M., M. J. McGavin, L. M. Switalski, R. Raja, G. Raucchi, P. E. Lindgren, M. Lindberg and C. Signas (1990). Interactions of bacteria with extracellular matrix proteins. *Cell Differ Dev* 32(3): 433-8.
- Hoskins, J., W. E. Alborn, Jr., J. Arnold, L. C. Blaszcak, S. Burgett, B. S. DeHoff, S. T. Estrem, L. Fritz, D. J. Fu, W. Fuller, C. Geringer, R. Gilmour, J. S. Glass, H. Khoja, A. R. Kraft, R. E. Lagace, D. J. LeBlanc, L. N. Lee, E. J. Lefkowitz, J. Lu, P. Matsushima, S. M. McAhren, M. McHenney, K. McLeaster, C. W. Mundy, T. I. Nicas, F. H. Norris, M. O'Gara, R. B. Peery, G. T. Robertson, P. Rockey, P. M. Sun, M. E. Winkler, Y. Yang, M. Young-Bellido, G. Zhao, C. A. Zook, R. H. Baltz, S. R. Jaskunas, P. R. Rosteck, Jr., P. L. Skatrud and J. I. Glass (2001). Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol* 183(19): 5709-17.
- Houldsworth, S., P. W. Andrew and T. J. Mitchell (1994). Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 62(4): 1501-3.
- Hynes, R. O. (1990). *Fibronectins*. New York: Springer-Verlag.
- Hynes, R. O., E. L. George, E. N. Georges, J. L. Guan, H. Rayburn and J. T. Yang (1992). Toward a genetic analysis of cell-matrix adhesion. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 57: 249-58.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110(6): 673-87.
- Iannelli, F., D. Chiavolini, S. Ricci, M. R. Oggioni and G. Pozzi (2004). Pneumococcal surface protein C contributes to sepsis caused by *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Infect Immun* 72(5): 3077-80.

- Ibrahim, Y. M., A. R. Kerr, J. McCluskey and T. J. Mitchell (2004). Control of virulence by the two-component system CiaR/H is mediated via HtrA, a major virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 186(16): 5258-66.
- Ibrahim, Y. M., A. R. Kerr, J. McCluskey and T. J. Mitchell (2004). Role of HtrA in the virulence and competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 72(6): 3584-91.
- Isberg, R. R., Z. Hamburger and P. Dersch (2000). Signaling and invasin-promoted uptake via integrin receptors. *Microbes Infect* 2(7): 793-801.
- Jaffe, J., S. Natanson-Yaron, M. G. Caparon and E. Hanski (1996). Protein F2, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, possesses two binding domains. *Mol Microbiol* 21(2): 373-84.
- Janulczyk, R., F. Iannelli, A. G. Sjöholm, G. Pozzi and L. Björck (2000). Hic, a novel surface protein of *Streptococcus pneumoniae* that interferes with complement function. *J Biol Chem* 275(47): 37257-63.
- Jarva, H., J. Hellwage, T. S. Jokiranta, M. J. Lehtinen, P. F. Zipfel and S. Meri (2004). The group B streptococcal beta and pneumococcal Hic proteins are structurally related immune evasion molecules that bind the complement inhibitor factor H in an analogous fashion. *J Immunol* 172(5): 3111-8.
- Jeng, A., V. Sakota, Z. Li, V. Datta, B. Beall and V. Nizet (2003). Molecular genetic analysis of a group A *Streptococcus* operon encoding serum opacity factor and a novel fibronectin-binding protein, SfbX. *J Bacteriol* 185(4): 1208-17.
- Jett, B. D. and M. S. Gilmore (2002). Internalization of *Staphylococcus aureus* by human corneal epithelial cells: role of bacterial fibronectin-binding protein and host cell factors. *Infect Immun* 70(8): 4697-700.
- Joh, D., E. R. Wann, B. Kreikemeyer, P. Speziale and M. Hook (1999). Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. *Matrix Biol* 18(3): 211-23.
- Joh, H. J., K. House-Pompeo, J. M. Patti, S. Gurusiddappa and M. Hook (1994). Fibronectin receptors from gram-positive bacteria: comparison of active sites. *Biochemistry* 33(20): 6086-92.
- Johnson, M. K., C. Geoffroy and J. E. Alouf (1980). Binding of cholesterol by sulfhydryl-activated cytolysins. *Infect Immun* 27(1): 97-101.

- Johnson, S. E., J. K. Dykes, D. L. Jue, J. S. Sampson, G. M. Carlone and E. W. Ades (2002). Inhibition of pneumococcal carriage in mice by subcutaneous immunization with peptides from the common surface protein pneumococcal surface adhesin a. *J Infect Dis* 185(4): 489-96.
- Kausmally, L., O. Johnsborg, M. Lunde, E. Knutsen and L. S. Havarstein (2005). Choline-binding protein D (CbpD) in *Streptococcus pneumoniae* is essential for competence-induced cell lysis. *J Bacteriol* 187(13): 4338-45.
- Kawabata, S., E. Kunitomo, Y. Terao, I. Nakagawa, K. Kikuchi, K. Totsuka and S. Hamada (2001). Systemic and mucosal immunizations with fibronectin-binding protein FBP54 induce protective immune responses against *Streptococcus pyogenes* challenge in mice. *Infect Immun* 69(2): 924-30.
- Kayser, B., Eckert, Zinkernagel (1997). *Medizinische Mikrobiologie*. Thieme-Verlag 9. Auflage.
- Kim, J. O. and J. N. Weiser (1998). Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 177(2): 368-77.
- King, S. J., K. R. Hippe, J. M. Gould, D. Bae, S. Peterson, R. T. Cline, C. Fasching, E. N. Janoff and J. N. Weiser (2004). Phase variable desialylation of host proteins that bind to *Streptococcus pneumoniae* in vivo and protect the airway. *Mol Microbiol* 54(1): 159-71.
- King, S. J., A. M. Whatmore and C. G. Dowson (2005). NanA, a neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae*, shows high levels of sequence diversity, at least in part through recombination with *Streptococcus oralis*. *J Bacteriol* 187(15): 5376-86.
- Kline, J. B., S. Xu, A. L. Bisno and C. M. Collins (1996). Identification of a fibronectin-binding protein (GfbA) in pathogenic group G streptococci. *Infect Immun* 64(6): 2122-9.
- Kosmehl, H., A. Berndt and D. Katenkamp (1996). Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. *Virchows Arch* 429(6): 311-22.
- Kreikemeyer, B., S. R. Talay and G. S. Chhatwal (1995). Characterization of a novel fibronectin-binding surface protein in group A streptococci. *Mol Microbiol* 17(1): 137-45.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5.

- Lancefield, R. C. (1933). A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 57: 571-595.
- Lanie, J. A., W. L. Ng, K. M. Kazmierczak, T. M. Andrzejewski, T. M. Davidsen, K. J. Wayne, H. Tettelin, J. I. Glass and M. E. Winkler (2007). Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J Bacteriol* 189(1): 38-51.
- Lannergard, J., M. Flock, S. Johansson, J. I. Flock and B. Guss (2005). Studies of fibronectin-binding proteins of *Streptococcus equi*. *Infect Immun* 73(11): 7243-51.
- Lau, G. W., S. Haataja, M. Lonetto, S. E. Kensit, A. Marra, A. P. Bryant, D. McDevitt, D. A. Morrison and D. W. Holden (2001). A functional genomic analysis of type 3 *Streptococcus pneumoniae* virulence. *Mol Microbiol* 40(3): 555-71.
- Lee, C. J., S. D. Banks and J. P. Li (1991). Virulence, immunity, and vaccine related to *Streptococcus pneumoniae*. *Crit Rev Microbiol* 18(2): 89-114.
- Lenz, L. L., S. Mohammadi, A. Geissler and D. A. Portnoy (2003). SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(21): 12432-7.
- Lindgren, P. E., P. Speziale, M. McGavin, H. J. Monstein, M. Hook, L. Visai, T. Kostianen, S. Bozzini and M. Lindberg (1992). Cloning and expression of two different genes from *Streptococcus dysgalactiae* encoding fibronectin receptors. *J Biol Chem* 267(3): 1924-31.
- Lindgren, P. E., M. J. McGavin, C. Signas, B. Guss, S. Gurusiddappa, M. Hook and M. Lindberg (1993). Two different genes coding for fibronectin-binding proteins from *Streptococcus dysgalactiae*. The complete nucleotide sequences and characterization of the binding domains. *Eur J Biochem* 214(3): 819-27.
- Lindgren, P. E., C. Signas, L. Rantamaki and M. Lindberg (1994). A fibronectin-binding protein from *Streptococcus equisimilis*: characterization of the gene and identification of the binding domain. *Vet Microbiol* 41(3): 235-47.
- Lindmark, H., K. Jacobsson, L. Frykberg and B. Guss (1996). Fibronectin-binding protein of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Infect Immun* 64(10): 3993-9.
- Lindmark, H. and B. Guss (1999). SFS, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus equi*, inhibits the binding between fibronectin and collagen. *Infect Immun* 67(5): 2383-8.

- Lindmark, H., M. Nilsson and B. Guss (2001). Comparison of the fibronectin-binding protein FNE from *Streptococcus equi* subspecies *equi* with FNZ from *S. equi* subspecies *zooepidemicus* reveals a major and conserved difference. *Infect Immun* 69(5): 3159-63.
- Lowrance, J. H., D. L. Hasty and W. A. Simpson (1988). Adherence of *Streptococcus sanguis* to conformationally specific determinants in fibronectin. *Infect Immun* 56(9): 2279-85.
- Lu, L., M. E. Lamm, H. Li, B. Corthesy and J. R. Zhang (2003). The human polymeric immunoglobulin receptor binds to *Streptococcus pneumoniae* via domains 3 and 4. *J Biol Chem* 278(48): 48178-87.
- Luo, R., B. Mann, W. S. Lewis, A. Rowe, R. Heath, M. L. Stewart, A. E. Hamburger, S. Sivakolundu, E. R. Lacy, P. J. Bjorkman, E. Tuomanen and R. W. Kriwacki (2005). Solution structure of choline binding protein A, the major adhesin of *Streptococcus pneumoniae*. *Embo J* 24(1): 34-43.
- Malley, R., P. Henneke, S. C. Morse, M. J. Cieslewicz, M. Lipsitch, C. M. Thompson, E. Kurt-Jones, J. C. Paton, M. R. Wessels and D. T. Golenbock (2003). Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(4): 1966-71.
- Marra, A., S. Lawson, J. S. Asundi, D. Brigham and A. E. Hromockyj (2002). In vivo characterization of the *psa* genes from *Streptococcus pneumoniae* in multiple models of infection. *Microbiology* 148(Pt 5): 1483-91.
- Marton, A. (1992). Pneumococcal antimicrobial resistance: the problem in Hungary. *Clin Infect Dis* 15(1): 106-11.
- Mascher, T., D. Zahner, M. Merai, N. Balmelle, A. B. de Saizieu and R. Hakenbeck (2003). The *Streptococcus pneumoniae* *cia* regulon: *CiaR* target sites and transcription profile analysis. *J Bacteriol* 185(1): 60-70.
- McDaniel, L. S., B. A. Ralph, D. O. McDaniel and D. E. Briles (1994). Localization of protection-eliciting epitopes on PspA of *Streptococcus pneumoniae* between amino acid residues 192 and 260. *Microb Pathog* 17(5): 323-37.
- McDougal, L. K., R. Facklam, M. Reeves, S. Hunter, J. M. Swenson, B. C. Hill and F. C. Tenover (1992). Analysis of multiply antimicrobial-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 36(10): 2176-84.
- McKeown-Longo, P. J. and D. F. Mosher (1983). Binding of plasma fibronectin to cell layers of human skin fibroblasts. *J Cell Biol* 97(2): 466-72.

- McKeown-Longo, P. J. and D. F. Mosher (1984). Mechanism of formation of disulfide-bonded multimers of plasma fibronectin in cell layers of cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 259(19): 12210-5.
- McNab, R., H. Forbes, P. S. Handley, D. M. Loach, G. W. Tannock and H. F. Jenkinson (1999). Cell wall-anchored CshA polypeptide (259 kilodaltons) in *Streptococcus gordonii* forms surface fibrils that confer hydrophobic and adhesive properties. *J Bacteriol* 181(10): 3087-95.
- McNiven, M. A., L. Kim, E. W. Krueger, J. D. Orth, H. Cao and T. W. Wong (2000). Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *J Cell Biol* 151(1): 187-98.
- Mitchell, T. J., P. W. Andrew, F. K. Saunders, A. N. Smith and G. J. Boulnois (1991). Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region of the toxin homologous to a human acute-phase protein. *Mol Microbiol* 5(8): 1883-8.
- Mold, C., B. Rodic-Polic and T. W. Du Clos (2002). Protection from *Streptococcus pneumoniae* infection by C-reactive protein and natural antibody requires complement but not Fc gamma receptors. *J Immunol* 168(12): 6375-81.
- Molinari, G., S. R. Talay, P. Valentin-Weigand, M. Rohde and G. S. Chhatwal (1997). The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect Immun* 65(4): 1357-63.
- Molinari, G., M. Rohde, C. A. Guzman and G. S. Chhatwal (2000). Two distinct pathways for the invasion of *Streptococcus pyogenes* in non-phagocytic cells. *Cell Microbiol* 2(2): 145-54.
- Moore, A. E., L. Sabachewsky and H. W. Toolan (1955). Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res* 15(9): 598-602.
- Morgan, P. J., S. C. Hyman, O. Byron, P. W. Andrew, T. J. Mitchell and A. J. Rowe (1994). Modeling the bacterial protein toxin, pneumolysin, in its monomeric and oligomeric form. *J Biol Chem* 269(41): 25315-20.
- Morgan, P. J., S. C. Hyman, A. J. Rowe, T. J. Mitchell, P. W. Andrew and H. R. Saibil (1995). Subunit organisation and symmetry of pore-forming, oligomeric pneumolysin. *FEBS Lett* 371(1): 77-80.
- Mosher, D. F. (1980). Fibronectin. *Prog Hemost Thromb* 5: 111-51.

- Mosher, D. F. (1984). Cross-linking of fibronectin to collagenous proteins. *Mol Cell Biochem* 58(1-2): 63-8.
- Mosher, D. F. (1989). *Fibronectin*. San Diego: Academic Press, Inc.
- Mosher, D. F. and R. A. Proctor (1980). Binding and factor XIIIa-mediated cross-linking of a 27-kilodalton fragment of fibronectin to *Staphylococcus aureus*. *Science* 209(4459): 927-9.
- Mufson, M. A. (1990). *Streptococcus pneumoniae* in: Mandell G. L., Douglas R.G., Bennet J.E. Principles and practice of infectious diseases: 1539.
- Mulholland, K. (1999). Strategies for the control of pneumococcal diseases. *Vaccine* 17 Suppl 1: S79-84.
- Musher, D. M. (1992). Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin Infect Dis* 14(4): 801-7.
- Nagai, K. and H. C. Thogersen (1987). Synthesis and sequence-specific proteolysis of hybrid proteins produced in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 153: 461-81.
- Navarre, W. W. and O. Schneewind (1994). Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 14(1): 115-21.
- Navarre, W. W. and O. Schneewind (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* 63(1): 174-229.
- Neufeld, F. (1902). Über die Agglutination der Pneumokokken und über die Theorien der Agglutination. *Z. Hyg. Infektionskr.* 40: 4-72.
- Nielsen, S. V. and J. Henrichsen (1996). Incidence of invasive pneumococcal disease and distribution of capsular types of pneumococci in Denmark, 1989-94. *Epidemiol Infect* 117(3): 411-6.
- Nikolopoulos, S. N. and C. E. Turner (2001). Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions. *J Biol Chem* 276(26): 23499-505.
- Nobbs, A. H., B. H. Shearer, M. Drobni, M. A. Jepson and H. F. Jenkinson (2006). Adherence and internalization of *Streptococcus gordonii* by epithelial cells involves beta1 integrin recognition by SspA and SspB (antigen I/II family) polypeptides. *Cell Microbiol*.

- Nyberg, P., T. Sakai, K. H. Cho, M. G. Caparon, R. Fassler and L. Bjorck (2004). Interactions with fibronectin attenuate the virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Embo J* 23(10): 2166-74.
- Oggioni, M. R., G. Memmi, T. Maggi, D. Chiavolini, F. Iannelli and G. Pozzi (2003). Pneumococcal zinc metalloproteinase ZmpC cleaves human matrix metalloproteinase 9 and is a virulence factor in experimental pneumonia. *Mol Microbiol* 49(3): 795-805.
- Okada, N., M. Watarai, V. Ozeri, E. Hanski, M. Caparon and C. Sasakawa (1997). A matrix form of fibronectin mediates enhanced binding of *Streptococcus pyogenes* to host tissue. *J Biol Chem* 272(43): 26978-84.
- Okada, N., I. Tatsuno, E. Hanski, M. Caparon and C. Sasakawa (1998). *Streptococcus pyogenes* protein F promotes invasion of HeLa cells. *Microbiology* 144 (Pt 11): 3079-86.
- Orihuela, C. J., J. N. Radin, J. E. Sublett, G. Gao, D. Kaushal and E. I. Tuomanen (2004). Microarray analysis of pneumococcal gene expression during invasive disease. *Infect Immun* 72(10): 5582-96.
- Overweg, K., D. Bogaert, M. Sluijter, J. Yother, J. Dankert, R. de Groot and P. W. Hermans (2000). Genetic relatedness within serotypes of penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol* 38(12): 4548-53.
- Ozeri, V., A. Tovi, I. Burstein, S. Natanson-Yaron, M. G. Caparon, K. M. Yamada, S. K. Akiyama, I. Vlodaysky and E. Hanski (1996). A two-domain mechanism for group A streptococcal adherence through protein F to the extracellular matrix. *Embo J* 15(5): 989-98.
- Ozeri, V., I. Rosenshine, D. F. Mosher, R. Fassler and E. Hanski (1998). Roles of integrins and fibronectin in the entry of *Streptococcus pyogenes* into cells via protein F1. *Mol Microbiol* 30(3): 625-37.
- Ozeri, V., I. Rosenshine, A. Ben-Ze'Ev, G. M. Bokoch, T. S. Jou and E. Hanski (2001). De novo formation of focal complex-like structures in host cells by invading Streptococci. *Mol Microbiol* 41(3): 561-73.
- Ozinsky, A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder and A. Aderem (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25): 13766-71.

- Palecek, S. P., J. C. Loftus, M. H. Ginsberg, D. A. Lauffenburger and A. F. Horwitz (1997). Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* 385(6616): 537-40.
- Pankov, R. and K. M. Yamada (2002). Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 115(Pt 20): 3861-3.
- Parsons, J. T., K. H. Martin, J. K. Slack, J. M. Taylor and S. A. Weed (2000). Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* 19(49): 5606-13.
- Paterson, G. K. and T. J. Mitchell (2006). Innate immunity and the pneumococcus. *Microbiology* 152(Pt 2): 285-93.
- Paton, J. C. and A. Ferrante (1983). Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by pneumolysin. *Infect Immun* 41(3): 1212-6.
- Paton, J. C., B. Rowan-Kelly and A. Ferrante (1984). Activation of human complement by the pneumococcal toxin pneumolysin. *Infect Immun* 43(3): 1085-7.
- Paton, J. C., J. K. Morona and R. Morona (1997). Characterization of the capsular polysaccharide biosynthesis locus of *Streptococcus pneumoniae* type 19F. *Microb Drug Resist* 3(1): 89-99.
- Paton, J. C. (1998). Novel pneumococcal surface proteins: role in virulence and vaccine potential. *Trends Microbiol* 6(3): 85-7; discussion 87-8.
- Pelton, S. I., R. Dagan, B. M. Gaines, K. P. Klugman, D. Laufer, K. O'Brien and H. J. Schmitt (2003). Pneumococcal conjugate vaccines: proceedings from an interactive symposium at the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *Vaccine* 21(15): 1562-71.
- Persad, S. and S. Dedhar (2003). The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 22(4): 375-84.
- Peters, D. M. and D. F. Mosher (1987). Localization of cell surface sites involved in fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol* 104(1): 121-30.
- Peterson, T. E. and K. Skorstengaard (1985). In *Hematology*. ed J. McDonagh; New York: Dekker 5: 7-30.
- Peterson, W. D., Jr., C. S. Stulberg, N. K. Swanborg and A. R. Robinson (1968). Glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzymes in human cell cultures determined by sucrose-agar gel and cellulose acetate zymograms. *Proc Soc Exp Biol Med* 128(3): 772-6.

- Pfaff, M., S. Liu, D. J. Erle and M. H. Ginsberg (1998). Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins. *J Biol Chem* 273(11): 6104-9.
- Pierschbacher, M. D. and E. Ruoslahti (1984). Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(19): 5985-8.
- Pierschbacher, M. D. and E. Ruoslahti (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309(5963): 30-3.
- Plow, E. F., T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus and J. W. Smith (2000). Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 275(29): 21785-8.
- Poland, G. A. (1999). The burden of pneumococcal disease: the role of conjugate vaccines. *Vaccine* 17(13-14): 1674-1679.
- Polissi, A., A. Pontiggia, G. Feger, M. Altieri, H. Mottl, L. Ferrari and D. Simon (1998). Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 66(12): 5620-9.
- Pracht, D., C. Elm, J. Gerber, S. Bergmann, M. Rohde, M. Seiler, K. S. Kim, H. F. Jenkinson, R. Nau and S. Hammerschmidt (2005). PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation. *Infect Immun* 73(5): 2680-9.
- Purushothaman, S. S., B. Wang and P. P. Cleary (2003). M1 protein triggers a phosphoinositide cascade for group A Streptococcus invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 71(10): 5823-30.
- Radin, J. N., C. J. Orihuela, G. Murti, C. Guglielmo, P. J. Murray and E. I. Tuomanen (2005). beta-Arrestin 1 participates in platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 73(12): 7827-35.
- Rakonjac, J. V., J. C. Robbins and V. A. Fischetti (1995). DNA sequence of the serum opacity factor of group A streptococci: identification of a fibronectin-binding repeat domain. *Infect Immun* 63(2): 622-31.
- Reinert, R. R., A. Al-Lahham, M. Lemperle, C. Tenholte, C. Briefs, S. Haupts, H. H. Gerards and R. Luttkicken (2002). Emergence of macrolide and penicillin resistance among invasive pneumococcal isolates in Germany. *J Antimicrob Chemother* 49(1): 61-8.

- Ren, B., A. J. Szalai, O. Thomas, S. K. Hollingshead and D. E. Briles (2003). Both family 1 and family 2 PspA proteins can inhibit complement deposition and confer virulence to a capsular serotype 3 strain of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 71(1): 75-85.
- Ren, B., M. A. McCrory, C. Pass, D. C. Bullard, C. M. Ballantyne, Y. Xu, D. E. Briles and A. J. Szalai (2004). The virulence function of *Streptococcus pneumoniae* surface protein A involves inhibition of complement activation and impairment of complement receptor-mediated protection. *J Immunol* 173(12): 7506-12.
- Ren, B., A. J. Szalai, S. K. Hollingshead and D. E. Briles (2004). Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. *Infect Immun* 72(1): 114-22.
- Rezcallah, M. S., K. Hodges, D. B. Gill, J. P. Atkinson, B. Wang and P. P. Cleary (2005). Engagement of CD46 and alpha5beta1 integrin by group A streptococci is required for efficient invasion of epithelial cells. *Cell Microbiol* 7(5): 645-53.
- Riesenfeld-Orn, I., S. Wolpe, J. F. Garcia-Bustos, M. K. Hoffmann and E. Tuomanen (1989). Production of interleukin-1 but not tumor necrosis factor by human monocytes stimulated with pneumococcal cell surface components. *Infect Immun* 57(7): 1890-3.
- Rocha, C. L. and V. A. Fischetti (1999). Identification and characterization of a novel fibronectin-binding protein on the surface of group A streptococci. *Infect Immun* 67(6): 2720-8.
- Romero-Steiner, S., T. Pilishvili, J. S. Sampson, S. E. Johnson, A. Stinson, G. M. Carlone and E. W. Ades (2003). Inhibition of pneumococcal adherence to human nasopharyngeal epithelial cells by anti-PsaA antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 10(2): 246-51.
- Ronda, C., J. L. Garcia, E. Garcia, J. M. Sanchez-Puelles and R. Lopez (1987). Biological role of the pneumococcal amidase. Cloning of the *lytA* gene in *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Biochem* 164(3): 621-4.
- Rubins, J. B., P. G. Duane, D. Clawson, D. Charboneau, J. Young and D. E. Niewoehner (1993). Toxicity of pneumolysin to pulmonary alveolar epithelial cells. *Infect Immun* 61(4): 1352-8.
- Rubins, J. B., D. Charboneau, J. C. Paton, T. J. Mitchell, P. W. Andrew and E. N. Janoff (1995). Dual function of pneumolysin in the early pathogenesis of murine pneumococcal pneumonia. *J Clin Invest* 95(1): 142-50.

- Ruoslahti, E. (1988). Fibronectin and its receptors. *Annu Rev Biochem* 57: 375-413.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839): 487-91.
- Saksela, O. and D. B. Rifkin (1990). Release of basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity. *J Cell Biol* 110(3): 767-75.
- Salyers, A. A. and D. D. Whitt (1994). *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*. ASM Press.
- Sambrook, F., Maniatis (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sampath, R., P. J. Gallagher and F. M. Pavalko (1998). Cytoskeletal interactions with the leukocyte integrin beta2 cytoplasmic tail. Activation-dependent regulation of associations with talin and alpha-actinin. *J Biol Chem* 273(50): 33588-94.
- Sanchez-Puelles, J. M., C. Ronda, J. L. Garcia, P. Garcia, R. Lopez and E. Garcia (1986). Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. *Eur J Biochem* 158(2): 289-93.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-7.
- Saukkonen, K., S. Sande, C. Cioffe, S. Wolpe, B. Sherry, A. Cerami and E. Tuomanen (1990). The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. *J Exp Med* 171(2): 439-48.
- Schlegel, H. G. (1992). *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme-Verlag 7. überarbeitete Auflage.
- Schnare, M., G. M. Barton, A. C. Holt, K. Takeda, S. Akira and R. Medzhitov (2001). Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2(10): 947-50.
- Schroder, N. W., S. Morath, C. Alexander, L. Hamann, T. Hartung, U. Zahringer, U. B. Gobel, J. R. Weber and R. R. Schumann (2003). Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* 278(18): 15587-94.

- Schulze-Koops, H., H. Burkhardt, J. Heesemann, T. Kirsch, B. Swoboda, C. Bull, S. Goodman and F. Emmrich (1993). Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infect Immun* 61(6): 2513-9.
- Schwarzbauer, J. E., C. S. Spencer and C. L. Wilson (1989). Selective secretion of alternatively spliced fibronectin variants. *J Cell Biol* 109(6 Pt 2): 3445-53.
- Schwarz-Linek, U., J. M. Werner, A. R. Pickford, S. Gurusiddappa, J. H. Kim, E. S. Pilka, J. A. Briggs, T. S. Gough, M. Hook, I. D. Campbell and J. R. Potts (2003). Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem beta-zipper. *Nature* 423(6936): 177-81.
- Schwarz-Linek, U., M. Hook and J. R. Potts (2004). The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. *Mol Microbiol* 52(3): 631-41.
- Schwarz-Linek, U., M. Hook and J. R. Potts (2006). Fibronectin-binding proteins of Gram-positive cocci. *Microbes Infect*.
- Sebert, M. E., L. M. Palmer, M. Rosenberg and J. N. Weiser (2002). Microarray-based identification of *htrA*, a *Streptococcus pneumoniae* gene that is regulated by the CiaRH two-component system and contributes to nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* 70(8): 4059-67.
- Selbach, M. and S. Backert (2005). Cortactin: an Achilles' heel of the actin cytoskeleton targeted by pathogens. *Trends Microbiol* 13(4): 181-9.
- Shakhnovich, E. A., S. J. King and J. N. Weiser (2002). Neuraminidase expressed by *Streptococcus pneumoniae* desialylates the lipopolysaccharide of *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*: a paradigm for interbacterial competition among pathogens of the human respiratory tract. *Infect Immun* 70(12): 7161-4.
- Shaper, M., S. K. Hollingshead, W. H. Benjamin, Jr. and D. E. Briles (2004). PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected]. *Infect Immun* 72(9): 5031-40.
- Sieg, D. J., C. R. Hauck and D. D. Schlaepfer (1999). Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J Cell Sci* 112 (Pt 16): 2677-91.

- Silvennoinen-Kassinen, S. and M. Koskela (1986). Optimal conditions for the opsonophagocytosis test with *Streptococcus pneumoniae* serotypes 3, 6A, 7F and 19F and human granulocytes. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [C]* 94(3): 105-11.
- Sinha, B., P. P. Francois, O. Nusse, M. Foti, O. M. Hartford, P. Vaudaux, T. J. Foster, D. P. Lew, M. Herrmann and K. H. Krause (1999). Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cell Microbiol* 1(2): 101-17.
- Skorstengaard, K., M. S. Jensen, P. Sahl, T. E. Petersen and S. Magnusson (1986). Complete primary structure of bovine plasma fibronectin. *Eur J Biochem* 161(2): 441-53.
- Smith, B. L. and M. K. Hostetter (2000). C3 as substrate for adhesion of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 182(2): 497-508.
- Sokolova, O., N. Heppel, R. Jagerhuber, K. S. Kim, M. Frosch, M. Eigenthaler and A. Schubert-Unkmeir (2004). Interaction of *Neisseria meningitidis* with human brain microvascular endothelial cells: role of MAP- and tyrosine kinases in invasion and inflammatory cytokine release. *Cell Microbiol* 6(12): 1153-66.
- Sorensen, U. B. and J. Henrichsen (1987). Cross-reactions between pneumococci and other streptococci due to C polysaccharide and F antigen. *J Clin Microbiol* 25(10): 1854-9.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-17.
- Spellerberg, B., C. Rosenow, W. Sha and E. I. Tuomanen (1996). Pneumococcal cell wall activates NF-kappa B in human monocytes: aspects distinct from endotoxin. *Microb Pathog* 20(5): 309-17.
- Speziale, P., M. Hook, L. M. Switalski and T. Wadstrom (1984). Fibronectin binding to a *Streptococcus pyogenes* strain. *J Bacteriol* 157(2): 420-7.
- Steinfort, C., R. Wilson, T. Mitchell, C. Feldman, A. Rutman, H. Todd, D. Sykes, J. Walker, K. Saunders, P. W. Andrew and et al. (1989). Effect of *Streptococcus pneumoniae* on human respiratory epithelium in vitro. *Infect Immun* 57(7): 2006-13.
- Sternberg, G. M. (1881). A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human saliva. An experimental research. *Board of Health Bulletin* 2: 781-783.

- Stins, M. F., F. Gilles and K. S. Kim (1997). Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. *J Neuroimmunol* 76(1-2): 81-90.
- Szalai, A. J., A. Agrawal, T. J. Greenhough and J. E. Volanakis (1997). C-reactive protein: structural biology, gene expression, and host defense function. *Immunol Res* 16(2): 127-36.
- Talay, S. R., P. Valentin-Weigand, P. G. Jerlstrom, K. N. Timmis and G. S. Chhatwal (1992). Fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*: sequence of the binding domain involved in adherence of streptococci to epithelial cells. *Infect Immun* 60(9): 3837-44.
- Talay, S. R., P. Valentin-Weigand, K. N. Timmis and G. S. Chhatwal (1994). Domain structure and conserved epitopes of Sfb protein, the fibronectin-binding adhesin of *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 13(3): 531-9.
- Talay, S. R., A. Zock, M. Rohde, G. Molinari, M. Oggioni, G. Pozzi, C. A. Guzman and G. S. Chhatwal (2000). Co-operative binding of human fibronectin to SfbI protein triggers streptococcal invasion into respiratory epithelial cells. *Cell Microbiol* 2(6): 521-35.
- Talay, S. R. (2005). Gram-positive adhesins. *Contrib Microbiol* 12: 90-113.
- Talbot, U. M., A. W. Paton and J. C. Paton (1996). Uptake of *Streptococcus pneumoniae* by respiratory epithelial cells. *Infect Immun* 64(9): 3772-7.
- Tamkun, J. W., J. E. Schwarzbauer and R. O. Hynes (1984). A single rat fibronectin gene generates three different mRNAs by alternative splicing of a complex exon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(16): 5140-4.
- Tamura, G. S. and C. E. Rubens (1995). Group B streptococci adhere to a variant of fibronectin attached to a solid phase. *Mol Microbiol* 15(3): 581-9.
- Tamura, G. S., A. Nittayajarn and D. L. Schoentag (2002). A glutamine transport gene, *glnQ*, is required for fibronectin adherence and virulence of group B streptococci. *Infect Immun* 70(6): 2877-85.
- Terao, Y., S. Kawabata, E. Kunitomo, J. Murakami, I. Nakagawa and S. Hamada (2001). Fba, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, promotes bacterial entry into epithelial cells, and the *fba* gene is positively transcribed under the Mga regulator. *Mol Microbiol* 42(1): 75-86.
- Tettelin, H., K. E. Nelson, I. T. Paulsen, J. A. Eisen, T. D. Read, S. Peterson, J. Heidelberg, R. T. DeBoy, D. H. Haft, R. J. Dodson, A. S. Durkin, M. Gwinn, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, J. D. Peterson, L. A. Umayam, O. White, S. L. Salzberg, M. R. Lewis, D.

- Radune, E. Holtzapple, H. Khouri, A. M. Wolf, T. R. Utterback, C. L. Hansen, L. A. McDonald, T. V. Feldblyum, S. Angiuoli, T. Dickinson, E. K. Hickey, I. E. Holt, B. J. Loftus, F. Yang, H. O. Smith, J. C. Venter, B. A. Dougherty, D. A. Morrison, S. K. Hollingshead and C. M. Fraser (2001). Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 293(5529): 498-506.
- Tomasz, A. (1965). Control of the competent state in Pneumococcus by a hormone-like cell product: an example for a new type of regulatory mechanism in bacteria. *Nature* 208(5006): 155-9.
- Tomasz, A. (1966). Model for the mechanism controlling the expression of competent state in Pneumococcus cultures. *J Bacteriol* 91(3): 1050-61.
- Tomasz, A. and J. L. Mosser (1966). On the nature of the pneumococcal activator substance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 55(1): 58-66.
- Tomasz, A. (1967). Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in Pneumococcus. *Science* 157(789): 694-7.
- Tomasz, A., A. Albino and E. Zanati (1970). Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. *Nature* 227(5254): 138-40.
- Tomasz, A. (1981). Surface components of *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Infect Dis* 3(2): 190-211.
- Tomasz, A. and R. Munoz (1995). Beta-Lactam antibiotic resistance in gram-positive bacterial pathogens of the upper respiratory tract: a brief overview of mechanisms. *Microb Drug Resist* 1(2): 103-9.
- Tong, H. H., X. Liu, Y. Chen, M. James and T. Demaria (2002). Effect of neuraminidase on receptor-mediated adherence of *Streptococcus pneumoniae* to chinchilla tracheal epithelium. *Acta Otolaryngol* 122(4): 413-9.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4.
- Travassos, L. H., S. E. Girardin, D. J. Philpott, D. Blanot, M. A. Nahori, C. Werts and I. G. Boneca (2004). Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep* 5(10): 1000-6.
- Tseng, H. J., A. G. McEwan, J. C. Paton and M. P. Jennings (2002). Virulence of *Streptococcus pneumoniae*: PsaA mutants are hypersensitive to oxidative stress. *Infect Immun* 70(3): 1635-9.

- Tu, A. H., R. L. Fulgham, M. A. McCrory, D. E. Briles and A. J. Szalai (1999). Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 67(9): 4720-4.
- Tuomanen, E. I., R. Austrian and H. R. Masure (1995). Pathogenesis of pneumococcal infection. *N Engl J Med* 332(19): 1280-4.
- Unkmeir, A., K. Latsch, G. Dietrich, E. Wintermeyer, B. Schinke, S. Schwender, K. S. Kim, M. Eigenthaler and M. Frosch (2002). Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *Mol Microbiol* 46(4): 933-46.
- van Dam, J. E., A. Fleer and H. Snippe (1990). Immunogenicity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides. *Antonie Van Leeuwenhoek* 58(1): 1-47.
- van der Flier, M., N. Chhun, T. M. Wizemann, J. Min, J. B. McCarthy and E. I. Tuomanen (1995). Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to immobilized fibronectin. *Infect Immun* 63(11): 4317-22.
- van der Flier, A. and A. Sonnenberg (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305(3): 285-98.
- van Putten, J. P., T. D. Duensing and R. L. Cole (1998). Entry of OpaA+ gonococci into HEp-2 cells requires concerted action of glycosaminoglycans, fibronectin and integrin receptors. *Mol Microbiol* 29(1): 369-79.
- Vassalli, J. D., A. P. Sappino and D. Belin (1991). The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest* 88(4): 1067-72.
- Vindis, C., T. Teli, D. P. Cerretti, C. E. Turner and U. Huynh-Do (2004). EphB1-mediated cell migration requires the phosphorylation of paxillin at Tyr-31/Tyr-118. *J Biol Chem* 279(27): 27965-70.
- Vollmer, W. and A. Tomasz (2001). Identification of the teichoic acid phosphorylcholine esterase in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 39(6): 1610-22.
- Wang, B., S. Li, P. J. Southern and P. P. Cleary (2006). Streptococcal modulation of cellular invasion via TGF-beta1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(7): 2380-5.
- Wang, B., R. S. Yurecko, S. Dedhar and P. P. Cleary (2006). Integrin-linked kinase is an essential link between integrins and uptake of bacterial pathogens by epithelial cells. *Cell Microbiol* 8(2): 257-66.

- Wang, B., S. Li, S. Dedhar and P. P. Cleary (2007). Paxillin phosphorylation: bifurcation point downstream of integrin-linked kinase (ILK) in streptococcal invasion. *Cell Microbiol.*
- Watson, D. A. and D. M. Musher (1990). Interruption of capsule production in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 by insertion of transposon Tn916. *Infect Immun* 58(9): 3135-8.
- Weber, J. R., D. Freyer, C. Alexander, N. W. Schroder, A. Reiss, C. Kuster, D. Pfeil, E. I. Tuomanen and R. R. Schumann (2003). Recognition of pneumococcal peptidoglycan: an expanded, pivotal role for LPS binding protein. *Immunity* 19(2): 269-79.
- Weiser, J. N., R. Austrian, P. K. Sreenivasan and H. R. Masure (1994). Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* 62(6): 2582-9.
- Weiser, J. N., Z. Markiewicz, E. I. Tuomanen and J. H. Wani (1996). Relationship between phase variation in colony morphology, intrastain variation in cell wall physiology, and nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 64(6): 2240-5.
- Weiser, J. N., D. Bae, H. Epino, S. B. Gordon, M. Kapoor, L. A. Zenewicz and M. Shchepetov (2001). Changes in availability of oxygen accentuate differences in capsular polysaccharide expression by phenotypic variants and clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 69(9): 5430-9.
- Weiser, J. N., D. Bae, C. Fasching, R. W. Scamurra, A. J. Ratner and E. N. Janoff (2003). Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7): 4215-20.
- Wellmer, A., G. Zysk, J. Gerber, T. Kunst, M. Von Mering, S. Bunkowski, H. Eiffert and R. Nau (2002). Decreased virulence of a pneumolysin-deficient strain of *Streptococcus pneumoniae* in murine meningitis. *Infect Immun* 70(11): 6504-8.
- Wennerberg, K., L. Lohikangas, D. Gullberg, M. Pfaff, S. Johansson and R. Fassler (1996). Beta 1 integrin-dependent and -independent polymerization of fibronectin. *J Cell Biol* 132(1-2): 227-38.
- WHO, W. H. O. (2005). State of the art of vaccine research and development. Initiative for Vaccine Research.
- Wu, C., V. M. Keivens, T. E. O'Toole, J. A. McDonald and M. H. Ginsberg (1995). Integrin activation and cytoskeletal interaction are essential for the assembly of a fibronectin matrix. *Cell* 83(5): 715-24.

- Yamada, K. M. and R. A. F. Clark (1996). Provisional matrix. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. New York: Plenum Press: 51-93.
- Yamada, K. M., R. Pankov and E. Cukierman (2003). Dimensions and dynamics in integrin function. *Braz J Med Biol Res* 36(8): 959-66.
- Yang, J. T. and R. O. Hynes (1996). Fibronectin receptor functions in embryonic cells deficient in alpha 5 beta 1 integrin can be replaced by alpha V integrins. *Mol Biol Cell* 7(11): 1737-48.
- Yoshimura, A., E. Lien, R. R. Ingalls, E. Tuomanen, R. Dziarski and D. Golenbock (1999). Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 163(1): 1-5.
- Yother, J. and J. M. White (1994). Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein PspA. *J Bacteriol* 176(10): 2976-85.
- Zhang, J. R., K. E. Mostov, M. E. Lamm, M. Nanno, S. Shimida, M. Ohwaki and E. Tuomanen (2000). The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell* 102(6): 827-37.
- Zysk, G., B. K. Schneider-Wald, J. H. Hwang, L. Bejo, K. S. Kim, T. J. Mitchell, R. Hakenbeck and H. P. Heinz (2001). Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 69(2): 845-52.

9. Anhang

9.1. Wertetabellen

Pneumokokkenstämme	Adhärente Bakterien pro Zelle		Invasive Bakterien pro Zelle	
	A549	HEp-2	A549	HEp-2
<i>S.p.</i> Typ 35A	176,53 ± 69,69	217,45 ± 60,25	0,73 ± 0,25	1,60 ± 0,49
<i>S.p.</i> Typ 35A Δ <i>pavA</i>	6,75 ± 1,70	46,53 ± 20,05	0 ± 0	0,81 ± 0,56
R800	129,85 ± 38,40	146,73 ± 35,6	0,45 ± 0	2,3 ± 0,14
R800 Δ <i>pavA</i>	52,1 ± 18,31	29,8 ± 2,76	0,1 ± 0	0,6 ± 0,64

Tabelle 20: Anzahl adhärenter und invasiver Bakterien an bzw. in den Epithelzellen A549 und HEp-2 nach der Infektion mit *S. pneumoniae* Serotyp 35A und R800 und den jeweiligen isogenen *pavA*-Mutanten für 4 Stunden. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch nach einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung. (Abbildung 6)

Pneumokokkenstämme	Adhärente Bakterien pro Zelle		Invasive Bakterien pro Zelle	
	HBMEC	HUVEC	HBMEC	HUVEC
<i>S.p.</i> Typ 35A	13,55 ± 5,40	225,22 ± 43,67	0,28 ± 0,15	2,12 ± 0,11
<i>S.p.</i> Typ 35A Δ <i>pavA</i>	7,23 ± 3,75	3,31 ± 2,51	0,02 ± 0,02	0,28 ± 0,29
R800	20,58 ± 12,19	37,17 ± 10,32	0,57 ± 0,52	0,76 ± 0,29
R800 Δ <i>pavA</i>	2,31 ± 2,40	7,27 ± 6,48	0,02 ± 0,02	0,08 ± 0,07

Tabelle 21: Anzahl adhärenter und invasiver Bakterien an bzw. in den humanen Hirnendothelzellen HBMEC und primären Nabelschnurendothelzellen HUVEC nach der Infektion mit *S. pneumoniae* Serotyp 35A und R800 und den jeweiligen isogenen *pavA*-Mutanten für 4 Stunden. Die Auswertung erfolgte nach einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung und anschließendem Auszählen am Mikroskop. (Abbildung 7)

Pneumokokkenstämme	Adhärente Bakterien pro HEp-2-Zelle
<i>S.p.</i> Typ 35A	140,08 ± 31,87
Typ 35A <i>pJDC9::pavA</i> ⁺	118,13 ± 40,68
<i>S.p.</i> Typ 35A Δ <i>pavA</i>	41,68 ± 11,25
Typ 35A Δ <i>pavA::pJDC9::pavA</i> ⁺	107,82 ± 44,4

Tabelle 22: Anzahl adhärenter Pneumokokken an humanen Larynxkarzinomzellen HEp-2 nach der Infektion mit dem Stamm *S.p.* Typ 35A (NCTC 10319), *S.p.* Typ 35A *pJDC9::pavA*⁺, *S.p.* Typ 35A Δ *pavA* und der komplementierten *pavA*-Mutante *S.p.* Typ 35A Δ *pavA::pJDC9::pavA*⁺ für 4 Stunden. Die mikroskopische Auswertung erfolgte nach einer Immunfluoreszenzfärbung. (Abbildung 9)

Zelllinie	Relative aufgenommene Bakterienzahl von <i>S.p.</i> Typ 35A Δ pavA bezogen auf den Wildtyp [%]
A549	3,38 \pm 2,42
HEp-2	43,35 \pm 18,52
HBMEC	4,79 \pm 2,81
HUVEC	55,95 \pm 14,52

Tabelle 23: Relative Invasion von *S. p.* Typ 35A Δ pavA in humane Epithel- und Endothelzellen bezogen auf den Wildtyp *S. p.* Typ 35A (NCTC 10319) ermittelt aus Antibiotika-Schutz-Experimenten. Die Wirtszellen wurden für 4 Stunden mit den Erregern infiziert. Die Zahl internalisierter Pneumokokken wurde durch Ausplattieren bestimmt und für den Wildtyp als 100 % gesetzt. Die Invasion der pavA-Mutante wurde in Relation dazu angegeben. (Abbildung 10)

Behandlung von <i>S.p.</i> Typ 35A (2,5 x 10 ⁷ Bakterien je Ansatz)	Bindungswerte von <i>S.p.</i> Typ 35A [%]
Kontrolle	5,49 \pm 2,62
0,2 mg IgG aus Präimmenserum	4,98 \pm 1,99
0,05 mg α -PavA-IgG	4,43 \pm 2,43
0,1 mg α -PavA-IgG	3,0 \pm 1,64
0,2 mg α -PavA-IgG	1,45 \pm 0,85
0,05 mg α -PavA42-IgG	4,54 \pm 2,91
0,1 mg α -PavA42-IgG	5,43 \pm 1,99
0,2 mg α -PavA42-IgG	4,31 \pm 3,24

Tabelle 24: Bindungswerte von *S. pneumoniae* Typ 35A an immobilisiertes Fibronectin. Die Bakterien wurden mit dem Fluorochrom FITC markiert und anschließend mit unterschiedlichen anti-PavA-Antisera inkubiert. Es wurde der Einfluss der verschiedenen Antikörper auf die Bindung von Pneumokokken an immobilisiertes Fibronectin (2 μ g/Vertiefung einer 96-well-Platte) untersucht. Die Werte geben den Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen dreifach angesetzten Versuchen wieder. (Abbildung 11)

Bakterien	Adhärente Bakterien pro Zelle		
	HEp-2	HBMEC	HUVEC
<i>S.p.</i> 35A	160,52 ± 12,52	66,91 ± 45,99	109,22 ± 66,2
<i>S.p.</i> 35A Δ <i>pavA</i>	48,11 ± 22,29	1,49 ± 1,46	4,16 ± 6,57
<i>S.p.</i> 35A + α -PavA	125,55 ± 12,13	63,53 ± 31,99	111,77 ± 58,48
<i>S.p.</i> 35A + α -PavA42	149,21 ± 11,93	90,97 ± 57,76	112,2 ± 41,02

Tabelle 25: Anzahl adhärenter Pneumokokken an HEp-2-, HBMEC- und HUVEC-Zellen nach Behandlung der Bakterien mit anti-PavA-Antikörpern. *S. p.* Typ 35A wurde vor der Infektion mit 40 μ g anti-PavA- bzw. anti-PavA42-IgG je 10^7 eingesetzter Bakterien inkubiert. Als Kontrolle wurden die Wirtszellen mit *S. p.* Typ 35A und *S. p.* Typ 35A Δ *pavA* für 4 Stunden infiziert. Die Mittelwerte ergaben sich nach mikroskopischem Auszählen von jeweils 50 Zellen aus 3 unabhängigen Versuchen. (Abbildung 12)

Bakterien	Invasive Bakterien pro Zelle		
	HEp-2	HBMEC	HUVEC
<i>S.p.</i> 35A	2,51 ± 0,76	0,51 ± 0,28	2,12 ± 0,11
<i>S.p.</i> 35A Δ <i>pavA</i>	0,74 ± 0,34	0 ± 0	0,08 ± 0,1
<i>S.p.</i> 35A + α -PavA	2,41 ± 0,13	0,39 ± 0,12	1,42 ± 0,03
<i>S.p.</i> 35A + α -PavA42	2,9 ± 0,76	0,56 ± 0,25	1,64 ± 0,28

Tabelle 26: Anzahl internalisierter Pneumokokken in die humanen Larynxkarzinomzellen HEp-2, die Hirnendothelzellen HBMEC und die Nabelschnurendothelzellen HUVEC. Die Mittelwerte und Standardabweichung stammen aus der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der gleichen Ansätze, aus denen oben die Anzahl adhärenter Erreger ermittelt wurde. (Abbildung 12)

Pneumokokkenstämme	Adhärente Bakterien pro Zelle		Invasive Bakterien pro Zelle	
	Calu-3	MDCK-hplgR	Calu-3	MDCK-hplgR
<i>S.p.</i> Typ 35A	68,17 ± 3,64	77,45 ± 44,87	0,35 ± 0,21	0,48 ± 0,39
<i>S.p.</i> Typ 35A Δ <i>pavA</i>	67,0 ± 8,98	83,87 ± 20,26	0,40 ± 0,07	0,4 ± 0,07
R800	106,83 ± 41,33	157,68 ± 22,17	0,28 ± 0,04	1,1 ± 0,71
R800 Δ <i>pavA</i>	125,68 ± 57,95	165,3 ± 31,47	0,4 ± 0,14	0,68 ± 0,11

Tabelle 27: Anzahl adhärenter und invasiver Bakterien an bzw. in den humanen polymeren Immunglobulinrezeptor (hplgR) exprimierende Epithelzellen Calu-3 und MDCK-hplgR nach der Infektion mit *S. pneumoniae* Serotyp 35A und R800 und den jeweiligen isogenen *pavA*-Mutanten für 4 Stunden. Die Auswertung erfolgte nach einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung und anschließendem Auszählen am Mikroskop. (Abbildung 15)

Plasmakonzentration	MFI x pos. Ereignisse %		
	hum Plasma	bov Plasma	FBS
1%	2,37 ± 1,68	97,61 ± 93,14	0,1 ± 0,1
10%	195,55 ± 34,1	43,99 ± 17,88	0 ± 0
20%	513,11 ± 14,03	135,23 ± 52,64	1,5 ± 1,4
50%	780,18 ± 141,57	227,85 ± 107,36	8,88 ± 3,5
100%	1297,77 ± 231,77	325,97 ± 183,95	2,34 ± 3,3

Tabelle 28: Quantifizierung der Rekrutierung von Fibronektin an *S. pneumoniae* Typ 35A aus humanem und bovinem Plasma und aus FCS mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Angegeben ist das Produkt aus der mittleren Fluoreszenzintensität der als positiv-definierten Bakterien und deren prozentualer Anteil an der Gesamtpopulation. (Abbildung 18)

FN-Konzentration [µg]	MFI x pos. Ereignisse %		
	hum pFN	bov pFN	hum zFN
0,5	3,07 ± 0,39	3,21 ± 0,54	10,55 ± 2,4
1	10,68 ± 0,67	1,77 ± 2,5	14,87 ± 0,07
2	11,83 ± 4,88	5,23 ± 7,39	16,57 ± 6
5	12,77 ± 8,14	6,35 ± 6,85	27,8 ± 3,48
10	24,93 ± 14,85	13,93 ± 4,17	29,49 ± 3,06

Tabelle 29: Quantifizierung der Bindung von löslichem Fibronektin an *S. pneumoniae* Typ 35A mittels Durchflusszytometrie. Es wurde die Bindung von humanem Plasma-Fibronektin, humanem zellulären Fibronektin und bovinem Plasma-Fibronektin untersucht. Angegeben ist das Produkt aus der mittleren Fluoreszenzintensität der als positiv-definierten Bakterien und deren prozentualer Anteil an der Gesamtpopulation. (Abbildung 20)

Präinkubation mit hum Plasma-FN	Adhärente Pneumokokken pro Detroit 562-Zelle
ohne	21,36 ± 7,14
Detroit 562 + FN, ungebundenes FN entfernt	88,87 ± 19,78
Detroit 562 + FN, Infektion in Gegenwart von ungebundenem FN	53,01 ± 19,85
<i>S. p.</i> Typ 35A + FN, ungebundenes FN entfernt	15,61 ± 16,42
<i>S. p.</i> Typ 35A + FN Infektion in Gegenwart von ungebundenem FN	36,38 ± 19,4

Tabelle 30: Anzahl adhärenter Bakterien pro Zelle nach Zugabe von humanem Plasma-Fibronektin bestimmt durch Auszählen am Mikroskop nach einer Immunfluoreszenzfärbung. Vor der Infektion wurden entweder die Epithelzelllinie Detroit 562 oder *S. pneumoniae* Serotyp 35A mit 5 µg humanem Plasma-Fibronektin je Ansatz behandelt. Nach den Präinkubationen wurde zum einen ungebundenes Fibronektin durch Waschen entfernt oder die sich anschließende Infektion in Gegenwart von nicht gebundenem Fibronektin durchgeführt. Als Kontrolle wurden Detroit 562-Zellen ohne Zusatz von Fibronektin mit Pneumokokken infiziert. (Abbildung 21)

Präinkubation der Zellen mit humanem FN [µg/ml]		Adhärente Bakterien pro Zelle	
		Detroit 562	HBMEC
ohne	-	13,95 ± 7,08	7,91 ± 11,71
plasmatisches Fibronektin	0,5	95,08 ± 35,46	29,57 ± 4,83
	1	54 ± 28	45,01 ± 15,76
	2	122,19 ± 34,99	53,62 ± 26,29
	5	121,22 ± 65,4	41,94 ± 17,26
zelluläres Fibronektin	0,5	64,57 ± 14,24	28,81 ± 8,61
	1	63,64 ± 2,99	38,51 ± 20,29
	2	78,85 ± 18,84	67,51 ± 28,6
	5	74,1 ± 19,74	28,05 ± 8,98

Tabelle 31: Anzahl angehefteter Bakterien je Wirtszelle nach Inkubation mit der angegebenen Menge an humanem plasmatischem oder zellulärem Fibronektin. Vor der Infektion mit *S. p.* Serotyp 35A wurde ungebundenes Fibronektin entfernt. Die Zahl adhärenter Bakterien pro Detroit 562- bzw. HBMEC-Zelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung durch mikroskopisches Auszählen bestimmt. (Abbildung 22)

Präinkubation der Zellen	Adhärente Bakterien <i>S. p. Typ 35A</i> pro Zelle				
	Detroit 562	HEp-2	A549	HBMEC	HUVEC
-	14,37 ± 7,22	60,77 ± 19,35	93,16 ± 11,68	31,46 ± 16,36	73,03 ± 21,31
5 µg/ml hum FN	85,82 ± 22,52	139,36 ± 35,53	188,93 ± 22,62	110,65 ± 49,21	84,43 ± 8,82
5 µg/ml bov FN	121,04 ± 32,24	143,81 ± 33,49	195,33 ± 56,37	109,56 ± 42,6	68,14

Tabelle 32: Anzahl adhärenter Pneumokokken an humanen Epithel- und Endothelzellen nach Behandlung der Wirtszellen mit humanem bzw. bovinem Fibronectin. Nach der Inkubation mit je 5 µg/ml Fibronectin wurde ungebundenes Protein entfernt und die Zellen für 4 Stunden mit *S. p. Typ 35A* infiziert. Die Bestimmung der Zahl angehefteter Bakterien erfolgte nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch. (Abbildung 23)

Zelllinie	MFI x pos. Ereignisse %
Detroit	1189,06 ± 554,17
HEp-2	117,68 ± 69,65
A549	184,26 ± 104,06
HBMEC	83,73 ± 37,31
HUVEC	2737,61 ± 1235,81

Tabelle 33: Quantifizierung der Expression von endogenem Fibronectin auf der Oberfläche von humanen Epithel- und Endothelzellen unter Verwendung der Durchflusszytometrie. Angegeben ist das Produkt aus der mittleren Fluoreszenzintensität der als positiv-definierten Zellen und deren prozentualer Anteil an der Gesamtpopulation. (Abbildung 26)

Behandlung der Zellen mit 5 µg/ml hum FN	Inhibition mit Heparin [U/ml]	Adhärente Bakterien <i>S. p. Typ 35A</i> pro Zelle	
		Detroit 562	HBMEC
-	-	20,39 ± 6,63	3,13 ± 2,85
+	-	100 ± 29,38	71,13 ± 18,87
+	1	76,45 ± 29,92	32 ± 14,25
+	10	73,38 ± 32,46	37,4 ± 17,55
+	50	79,59 ± 36,6	23,32 ± 5,93
+	100	42,72 ± 27,55	26,04 ± 7,96

Tabelle 34: Anzahl angehefteter Pneumokokken an Detroit 562- und HBMEC-Zellen nach Zugabe der angegebenen Mengen Heparin. Die Wirtszellen wurden zunächst mit 5 µg/ml humanem Plasma-Fibronektin inkubiert. Ungebundenes Protein wurde entfernt und zur Inhibition der Fibronektin-vermittelten Anheftung verschiedene Mengen Heparin zugesetzt. Als Kontrolle diente die Infektion ohne Fibronektin- bzw. ohne Heparin-Inkubation. Die eukaryotischen Zellen wurden für 4 Stunden mit *S. p. Typ 35A* und einer MOI von 50 infiziert. Die Zahl adhärenter Pneumokokken wurde nach deren Markierung mit Fluorochromen und mikroskopischen Auszählen bestimmt. (Abbildung 28)

Pneumokokkenstamm	Adhärente Bakterien pro Zelle			
	Detroit 562		HBMEC	
	unbehandelt	5 µg/ml hum FN	unbehandelt	5 µg/ml hum FN
<i>S.p. 35A</i>	17,62 ± 4,43	117,87 ± 29,45	6,65 ± 10,29	38,86 ± 8,95
<i>S.p. 35A + αPavA</i>	21,56 ± 13,37	113,42 ± 36,23	4,13 ± 1,34	41,11 ± 9,57

Tabelle 35: Anzahl angehefteter Bakterien an Detroit 562- und HBMEC-Zellen in Gegenwart von anti-PavA-Antikörpern. Die Epithel- und Endothelzelllinie wurde zunächst mit 5 µg/ml Fibronektin behandelt und ungebundenes Protein im Anschluss entfernt. Die Pneumokokken wurden vor der Infektion mit 20 µg/ml anti-PavA-IgG behandelt und zusammen mit nicht gebundenem IgG für die Infektion der Wirtszellen eingesetzt. Als Kontrolle wurde die Infektion ohne die Zugabe von anti-PavA-Antikörpern für 4 Stunden durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch nach einer Immunfluoreszenzfärbung. (Abbildung 29)

gebundenes Protein	Absorption _{405 nm}
0,15 µg MBP-PavA	0,04 ± 0,01
0,3 µg MBP-PavA	0,03 ± 0,03
0,6 µg MBP-PavA	0,06 ± 0,03
1,25 µg MBP-PavA	0,02 ± 0,001
2,5 µg MBP-PavA	0,08 ± 0,02
5 µg MBP-PavA	0,18 ± 0,01
0,6 µg MBP	0,03
1,25 µg MBP	0,01 ± 0,01
2,5 µg MBP	0,02 ± 0,02
5 µg MBP	0,01

Tabelle 36: Absorptionswerte bei 405 nm nach einem ELISA zur Bestimmung der Bindung von MBP-PavA an immobilisiertes Fibronectin. Es wurden je 0,5 µg humanes Fibronectin je Vertiefung gekoppelt. Nach der Absättigung wurden die angegebenen Mengen der rekombinant aufgereinigten Proteine MBP-PavA und als Kontrolle MBP mit dem immobilisierten Fibronectin inkubiert. Gebundenes Protein wurde über den entsprechenden Antikörper anti-PavA-IgG (1:100) bzw. anti-MBP-Serum (1:10000) und den Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper detektiert. Die Entwicklung erfolgte mit ABTS und H₂O₂, und die Absorption wurde bei 405 nm vermessen. (Abbildung 31)

Zugabe von 50 µg/ml rekombinantem Protein zu den Wirtszellen	Adhärente Bakterien <i>S.p.</i> Typ 35A pro Zelle			
	Detroit 562		HBMEC	
	unbehandelt	5 µg/ml hum FN	unbehandelt	5 µg/ml hum FN
-	23,21 ± 7,25	89,96 ± 16,02	13,31 ± 11,04	44,02 ± 3,72
MBP-PavA	39,06 ± 4,99	85,69 ± 24,36	10,07 ± 5,86	43,27 ± 3,58
MBP	26,78 ± 7,37	80,01 ± 18,57	15,58 ± 2,04	45,64 ± 3,5

Tabelle 37: Anzahl adhärenter Pneumokokken an die Nasopharynxepithelzellen Detroit 562 und die Hirnendothelzellen HBMEC in Gegenwart von rekombinant aufgereinigtem PavA-Protein. Die humanen Zellen wurden zuerst mit 5 µg/ml humanem Fibronectin inkubiert und ungebundenes Protein entfernt. Dann wurden die Zellen mit 50 µg/ml PavA als Fusionsprotein mit MBP (MBP-PavA) bzw. mit 50 µg/ml MBP allein versetzt. Die Infektion mit *S. p.* Typ 35A wurde in Gegenwart der rekombinanten Proteine für 4 Stunden durchgeführt. Das Auszählen der adhärenter Bakterien erfolgte am Mikroskop nach einer Immunfluoreszenzfärbung von mindestens 30 Zellen. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. (Abbildung 32)

Präinkubation der Zellen	Adhärente Bakterien <i>S. p.</i> Typ 35AΔpavA pro Zelle	
	Detroit 562	HBMEC
-	3,67 ± 0,71	1,15 ± 0,32
5 µg/ml hum FN	6,59 ± 3,52	1,59 ± 0,14
5 µg/ml bov FN	4,11 ± 1,97	0,71 ± 0,06

Tabelle 38: Anzahl adhärenter *pavA*-defizienter Pneumokokken an Detroit 562- und HBMEC-Zellen nach Zugabe von Fibronectin. Die humanen Wirtszellen wurden vor der Infektion mit 5 µg/ml humanem bzw. bovinem Fibronectin inkubiert. Ungebundenes Protein wurde entfernt. Die Zellen wurden mit *S. p.* Typ 35AΔpavA mit einer MOI von 50 für 4 Stunden infiziert. Die Bestimmung der Zahl angehefteter Bakterien wurde mikroskopisch nach einer Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. (Abbildung 33)

Präinkubation der Zellen	Internalisierte Bakterien <i>S. p.</i> Typ 35A je Vertiefung	
	Detroit 562	HBMEC
-	3325,83 ± 1004,78	1754 ± 719,75
5 µg/ml hum FN	8375 ± 3828,91	4514 ± 1201,16

Tabelle 39: Anzahl internalisierter Pneumokokken nach der Infektion von Fibronectin-behandelten Wirtszellen. Die Nasopharynxepithelzellen Detroit 562 und die Hirnendothelzellen HBMEC wurden mit 5 µg/ml humanem Fibronectin inkubiert und ungebundenes Protein im Anschluss entfernt. Die Infektion mit *S. pneumoniae* Typ 35A erfolgte mit einer MOI von 50 für 4 Stunden. Die Zahl internalisierter Bakterien wurde durch einen Antibiotika-Schutz-Versuch und anschließendes Ausplattieren der freigesetzten Erreger je Vertiefung bestimmt. (Abbildung 34)

Inhibitor	Invasion von <i>S. p.</i> Typ 35A in Detroit 562-Zellen bezogen auf die Kontrolle [%]
-	100
2 μ M Cytochalasin D	40,41 \pm 18,21
1 μ M Latrunculin B	16,21 \pm 12,93
1 μ M Jasplakinolid	6,4 \pm 4,08
20 μ M Nocodazol	25,03 \pm 9,89

Tabelle 40: Relative Invasion von *S. pneumoniae* Typ 35A in Detroit 562-Zellen in Gegenwart von Inhibitoren des Zytoskeletts. Die Epithelzellen wurden mit 5 μ g/ml humanem Fibronectin vorbehandelt. Nachdem ungebundenes Protein entfernt worden war, wurden die Zellen mit 2 μ M Cytochalasin D, 1 μ M Latrunculin B, 1 μ M Jasplakinolid bzw. 20 μ M Nocodazol versetzt. Die Infektion mit den Pneumokokken wurde in Gegenwart der Inhibitoren durchgeführt. Die Zahl internalisierter Bakterien wurde durch einen Antibiotika-Schutz-Versuch ermittelt und für den Kontrollansatz als 100 % gesetzt. Die Invasion in Gegenwart der Inhibitoren wurde in Relation zur Kontrolle angegeben. (Abbildung 35)

Inhibitor	Invasion von <i>S. p.</i> Typ 35A in Detroit 562 bezogen auf die Kontrolle [%]
-	100
50 μ M Genistein	32,21 \pm 13,35
1 μ M PP2	51,19 \pm 4,81
5 μ M PP2	27,95 \pm 7,78
50 nM Wortmannin	8,79 \pm 3,49
50 μ M LY294002	38,16 \pm 3,95

Tabelle 41: Invasion von Pneumokokken in Detroit 562-Zellen in Gegenwart verschiedener Signalmolekül-Inhibitoren. Die Nasopharynxepithelzellen wurden zunächst mit 5 μ g/ml humanem Fibronectin inkubiert. Ungebundenes Fibronectin wurde entfernt. Die Zellen wurden mit den angegebenen Mengen an Inhibitoren für 30 min behandelt und die Infektion mit *S. p.* Typ 35A in Gegenwart der Inhibitoren für 4 Stunden durchgeführt. Als Kontrolle wurden die mit Fibronectin-vorbehandelten Detroit 562-Zellen ohne die Zugabe eines Inhibitors mit Pneumokokken infiziert. Die Zahl internalisierter Bakterien wurde durch einen Antibiotika-Schutz-Versuch ermittelt und für den Kontrollansatz als 100 % gesetzt. Die Invasion in Gegenwart der Inhibitoren wurde in Relation zur Kontrolle angegeben.
Genistein ist ein allgemeiner Inhibitor der Phosphotyrosinkinase (PTK)-Aktivität, PP2 inhibiert spezifisch die Familie der Src Kinasen. Wortmannin ist u.a. ein Inhibitor der PI-3-Kinase und LY294002 inhibiert spezifisch die PI-3-Kinase-Aktivität. (Abbildung 36)

Bakterienstamm	Aufgenommene Bakterien in FAK(+)-Zellen je Vertiefung (Zellen präinkubiert mit 5 µg/ml hum FN)		
	60 min	120 min	180 min
<i>S.p.</i> Typ 35A	628,67 ± 226,07	4090,83 ± 1040,87	4635 ± 1391,93

Tabelle 42: Zahl internalisierter Pneumokokken in FAK reexprimierende Mausfibroblasten. Die Zellen wurden mit 5 µg/ml Fibronectin behandelt und ungebundenes Protein vor der Infektion entfernt. Die Zellen wurden mit *S. pneumoniae* Typ 35A mit einer MOI von 50 für 60 min, 120 min bzw. 180 min infiziert. Die Bestimmung der Zahl invasiver Bakterien je Ansatz wurde nach einem Antibiotika-Schutz-Experiment und Ausplattieren auf Blutagar durchgeführt. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet aus drei unabhängig voneinander in Duplikaten durchgeführten Experimenten. (Abbildung 37A)

Bakterienstamm	Invasion in % bezogen auf FAK(+)-Zellen, präinkubiert mit 5 µg/ml hum FN	
	FAK+	FAK-
<i>S.p.</i> Typ 35A	100 ± 34,12	46,98 ± 16,69

Tabelle 43: Invasion von *S. pneumoniae* in FAK-defiziente Mausfibroblasten. Nach der Inkubation mit 5 µg/ml humanem Fibronectin wurden die Zellen mit dem Serotyp 35A-Stamm für 2 Stunden infiziert. Die Invasion der Erreger wurde durch Antibiotika-Schutz-Experimente und Plattieren der Kolonien ermittelt. Die Zahl internalisierter Bakterien in FAK reexprimierende Mausfibroblasten wurde als 100 % definiert und die Invasion in FAK-defiziente Zellen relativ dazu angegeben. (Abbildung 37B)

9.2. Abkürzungen

α	anti
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bov	bovin
BSA	Rinderserumalbumin
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
CFU	colony forming units
CLSM	confocal laser scanning microscopy
CSP	Competence stimulating peptide
Da	Dalton
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
d.h.	das heißt
DIF	Doppelimmunfluoreszenzfärbung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
Erm	Erythromycin
FBS	fötales bovines Serum
FN	Fibronectin
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hum	human
IC	Inclusion Bodies
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropylthio- β -galactosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
LB	Luria Bertani
Lsg.	Lösung
M	molar (mol/l)
m	milli (10^{-3})
MBP	Maltose bindendes Protein
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MOI	multiplicity of infection
MW	Molekulargewicht
n.s.	nicht signifikant
μ	mikro (10^{-6})
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
n	nano (10^{-9})
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NaAc	Natriumacetat
nm	Nanometer

OD	Optische Dichte
Ω	Ohm (Einheit des elektrischen Widerstandes)
o. g.	oben genannt
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTK	Phosphotyrosinkinase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
<i>S. p.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Spec	Spectinomycin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THY	Todd Hewitt Broth mit 0,5 % Hefeextrakt
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
TRIS-HCl	Tris- (hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
u. a.	unter anderem
ü/N	über Nacht
(v/v)	Volumenprozent
V	Volt (Einheit der Spannung)
Vol	Volumen
(w/v)	Gewichtsanteil
(w/w)	Gewichtsprozent
z	zellulär
z. B.	zum Beispiel
ZK	Zellkultur

Publikation

Pracht, D., Elm, C., Gerber, J., Bergmann, S., Rohde, M., Seiler, M., Kim, K.S., Jenkinson, H.F., Nau, R., and Hammerschmidt, S. (2005) PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation. *Infect Immun* **73**: 2680-2689.

Vorträge

Pracht, D., Elm, C., Gerber, J., Jenkinson, H.F., Nau, R., and Hammerschmidt, S. (2004)
PavA of *Streptococcus pneumoniae*: A modulator of virulence?
Fachgruppentagung "Mikrobielle Pathogenität", Bad Urach

Pracht, D., Elm, C., Gerber, J., Jenkinson, H.F., Nau, R., and Hammerschmidt, S. (2004)
PavA of *Streptococcus pneumoniae*: A modulator of invasion and meningeal inflammation. Jahrestagung der DGHM, Münster

Posterpräsentationen

Pracht, D., Elm, C., Seiler, M., Jenkinson, H.F., and Hammerschmidt, S. (2003)
Role of pneumococcal virulence factor PavA on adherence and invasion.
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM),
Dresden

Pracht, D., Elm, C., Seiler, M., Jenkinson, H.F., and Hammerschmidt, S. (2004)
Pneumococcal adherence and invasion is affected by disruption of *pavA*.
Jahrestagung der Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie (VAAM),
Braunschweig

Pracht, D., Elm, C., Gerber, J., Jenkinson, H.F., Nau, R., and Hammerschmidt, S. (2005)
PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion and meningeal inflammation. Europneumo, Braunschweig

Somplatzki, D., Jenkinson H.F., and Hammerschmidt, S. (2006)
Role of fibronectin in pneumococcal adherence and invasion.
Jahrestagung der VAAM, Jena

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. Sven Hammerschmidt durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Sven Hammerschmidt für die interessante Themenstellung in dem Forschungsgebiet der mikrobiellen Pathogenität und die gute wissenschaftliche Betreuung der Arbeit. Ich möchte mich für die vielen Anregungen und Hilfestellungen während dieser Zeit und für die rasche Durchsicht des Manuskripts bedanken.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Kuhn für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Kreft danke ich für die Übernahme der Aufgaben des dritten Prüfers.

Vielen Dank an Dr. Manfred Rohde für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen, die am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig hergestellt wurden.

Ich möchte mich ebenso bei Dr. Joachim Gerber und Prof. Dr. Roland Nau von der Universität Göttingen bedanken, die das experimentelle Maus-Meningitis-Modell etabliert und die entsprechenden Infektionsstudien mit *S. pneumoniae* durchgeführt haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Howard Jenkinson von der Universität Bristol für das Überlassen von *pavA*-Mutanten und Plasmiden und für seine konstruktive Diskussionsbereitschaft.

Besonderer Dank gilt der Arbeitsgruppe in Würzburg mit Simone Bergmann und Christine Elm, mit Claudia Rennemeier, Christa Albert, Nadja Noske, Vaibhav Agarwal, Giacomo Miccoli, Doris Deininger, Sabrina Jung, Ursula Plawenn, Tanja Tanbouze, den Diplomanden Anke Lang, Gudrun Friehs und Michael Rothe, den Praktikanten Elli und Kathrin und allen, die versucht haben, mir die Zeit in Würzburg zu verschönern. Danke für die praktischen Tipps und Tricks im Laboralltag und die vielen aufmunternden Worte und Gesten.

Mein tiefer, persönlicher Dank geht an meine Familie, deren Unterstützung und Vertrauen mich bestärkt haben, diesen Weg zu gehen. Ich möchte mich bei meinem Mann André für seine besondere Geduld und sein Verständnis während der Promotionszeit bedanken. Beides hat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Daniela Somplatzki geb. Pracht
geboren am: 13. Januar 1978 in Salzgitter
Familienstand: verheiratet

Schulausbildung

1984 - 1988 Grundschule in Broistedt
1988 - 1990 Orientierungsstufe in Lengede
1990 - 1997 Gymnasiums Gr. Ilsede
Abschluss mit Abitur

Studium

1997 - 2003 Studium an der Technischen Universität Braunschweig im Studiengang Biotechnologie

Studienarbeit: Konstruktion eines GFP-Vektors für Transkriptionsanalysen in gram-positiven humanpathogenen Mikroorganismen

Diplomarbeit: Funktionelle Analyse zur Beteiligung der Adhäsine von *Streptococcus pneumoniae* am Anheftungs- und Invasionsprozess an bzw. in humane Endothel- und Epithelzellen
Abschluss mit Diplom im April 2003

Berufspraxis

05/2003 - 12/2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin) in der Nachwuchsgruppe *Streptococcus pneumoniae* am Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg
Mitglied des Doktorandenkollegs "Infektionsforschung"

01/2007 - 03/2007 Anfertigung der Dissertation

seit 04/2007 Business Manager bei Operon Biotechnologies GmbH

