

Charakterisierung der Thrombospondin-1 vermittelten Anheftung von *Streptococcus pneumoniae* an humane Wirtszellen

Dissertation

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

vorgelegt von

Claudia Rennemeier
aus Haltern am See

Würzburg, März 2007

ZENTRUM FÜR
INFEKTIONSFORSCHUNG

ZINF
IMIB

INSTITUT FÜR MOLEKULARE
INFEKTIONS BIOLOGIE

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter: Prof. Dr. Sven Hammerschmidt
2. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Kreft
3. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Morschhäuser

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat, und ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, März 2007

Claudia Rennemeier

Meinen Eltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Mai 2003 bis März 2007 in der Arbeitsgruppe und unter der Betreuung von Prof. Dr. Sven Hammerschmidt am Zentrum für Infektionsforschung (Vorstand: Prof. Dr. J. Hacker) der Universität Würzburg angefertigt.

Prof. Dr. Sven Hammerschmidt danke ich für die Betreuung der Arbeit, seine große fachliche Kompetenz, seine Diskussionsbereitschaft, die vielen guten Ideen und seinen herausragenden Einsatz für den Erfolg meiner Arbeit.

Ich danke Prof. Dr. Jörg Hacker für stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit, Prof. Dr. Jürgen Kreft für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens, und Prof. Dr. Joachim Morschhäuser für die Übernahme seiner Funktion als Gutachter im Promotionskomitee, aber auch für viele gute Ratschläge.

Besonderen Dank an meine lieben Kollegen: Simone Bergmann, Nadja Noske, Christa Albert, Daniela Somplatzki, Vaibhav Agarwal, Sabrina Jung, Doris Deininger, Michael Rothe, Anke Lang, Gudrun Friehs, Inga Jentsch, Christine Elm und Giacomo Miccoli...es hat großen Spaß gemacht mit Euch zu arbeiten!
Danke!

Ich danke all meinen Freunden für ihre Worte, für gemeinsame Erlebnisse und dass alles so viel schöner ist, wenn man einen Weg gemeinsam geht.

Ich danke meiner Familie. Vielen Dank meinen Eltern, meinen Großeltern, meiner Großtante und meinen beiden Brüdern...für Eure Unterstützung, die ich zu jeder Zeit fühlen kann. *Danke Peter...für alles! Du machst mich sehr glücklich!*

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2. EINLEITUNG.....	5
2.1. Allgemeine Einführung - Bedeutung der Infektionsbiologie.....	5
2.2. Bakterielle Infektionen der oberen und unteren Atemwege	5
2.3. Allgemeine Merkmale der Streptokokken	6
2.4. <i>Streptococcus pneumoniae</i> – allgemeine Merkmale, Epidemiologie und Pathogenese.....	7
2.5. Therapie und Prävention von Pneumokokkeninfektionen.....	9
2.6. Oberflächenkomponenten und Virulenzfaktoren von <i>S. pneumoniae</i>	10
2.6.1. Die Polysaccharidkapsel	11
2.6.2. Zellwand und Zellwandpolysaccharide.....	12
2.6.3. Adhäsine und andere Virulenzfaktoren von <i>S. pneumoniae</i>	15
2.7. Strategien pathogener Bakterien zur Interaktion mit verschiedenen eukaryontischen Strukturen.....	18
2.8. Thrombospondin-1	21
2.9. Zielsetzung der Arbeit.....	24
3. ERGEBNISSE.....	25
3.1. Interaktion von <i>S. pneumoniae</i> mit Thrombospondin-1.....	25
3.1.1. Thrombospondin-1 vermittelt eine Adhäsion von <i>S. pneumoniae</i> an Blutplättchen	25
3.1.2. Einfluss des bakteriellen Kapselpolysaccharids auf die Interaktion von <i>S. pneumoniae</i> mit löslichem Thrombospondin-1	30
3.1.3. Einfluss des bakteriellen Kapselpolysaccharids auf die Interaktion von <i>S. pneumoniae</i> mit immobilisiertem Thrombospondin-1.....	33
3.1.4. Herstellung einer kapsellosen Mutante von <i>S. pneumoniae</i> D39.....	35
3.1.5. Einfluss der Polysaccharidkapsel auf die Interaktion von <i>S. pneumoniae</i> mit Thrombospondin-1.....	37
3.2. Thrombospondin-1 vermittelt eine Adhärenz und Invasion an und in humane Wirtszellen.....	41
3.2.1. Die Thrombospondin-1 vermittelte Adhärenz ist abhängig von der Konformation des TSP1-Moleküls	41

3.2.2.	Untersuchungen zum Einfluss von Thrombospondin-1 auf die Adhärenz von <i>S. pneumoniae</i> an humane Wirtszellen	44
3.2.3.	Die Thrombospondin-1 vermittelte Adhärenz und Invasion von Pneumokokken ist ein zellunspezifischer Mechanismus	48
3.2.4.	Einfluss des bakteriellen Kapselpolysaccharids auf die Thrombospondin-1 vermittelte Adhärenz von <i>S. pneumoniae</i> an HEp-2 Zellen.....	52
3.3.	Charakterisierung des bakteriellen Adhäsins für Thrombospondin-1	54
3.3.1.	Die chemische Natur des bakteriellen Adhäsins	55
3.3.2.	Die Rolle des Pneumokokken-Phosphorylcholins für die Thrombospondin-1 vermittelte Assoziation an Wirtszellen	59
3.3.3.	Einfluss verschiedener Pneumokokken-Zellwandkomponenten auf die Thrombospondin-1 vermittelte Adhärenz von Pneumokokken an Wirtszellen	63
3.3.4.	Untersuchungen zur spezifischen Interaktion von Thrombospondin-1 mit Peptidoglykan.....	70
3.4.	Analyse der Interaktion verschiedener Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien mit Thrombospondin-1	72
3.4.1.	Gram-positive Bakterien interagieren mit löslichem und immobilisiertem Thrombospondin-1	72
3.4.2.	Thrombospondin-1 vermittelt die Adhärenz von Gram-positiven Bakterien an humane Wirtszellen	75
3.4.3.	Untersuchungen zur chemischen Natur des Adhäsins Gram-positiver Bakterien für Thrombospondin-1	79
3.4.4.	Identifizierung des Adhäsins Gram-positiver Bakterien für Thrombospondin-1	80
3.5.	Analyse der Interaktion zwischen Thrombospondin-1 und Wirtszellen.....	82
3.6.	<i>In bzw. ex vivo</i> Studien zur Rolle von Thrombospondin-1 in Infektionsmodellen	87
3.6.1.	Ratten Endokarditis/Sepsis-Modell.....	87
3.6.2.	Untersuchungen zur Rolle des humanen Thrombospondin-1 bei der Phagozytose von Gram-positiven Bakterien durch primäre Granulozyten.....	88
4.	DISKUSSION	92
4.1.	Bedeutung von Thrombospondin-1 für die Anheftung von <i>S. pneumoniae</i> an humane Wirtsstrukturen	92
4.2.	Die Charakterisierung des bakteriellen Adhäsins für Thrombospondin-1.....	98
4.3.	Peptidoglykan als Thrombospondin-1-Adhäsins Gram-positiver Bakterien	104

4.4.	Ein putatives LysM-Motiv im Thrombospondin-1 könnte an der Bindung von bakteriellem Peptidoglykan beteiligt sein	108
4.5.	<i>In bzw. ex vivo</i> Studien zur Aufklärung der Rolle von Thrombospondin-1 im Infektionsprozess	109
5.	MATERIAL	113
5.1.	Verwendete Bakterienstämme.....	113
5.1.1.	<i>S. pneumoniae</i> Wildtyp-Stämme.....	113
5.1.2.	<i>S. pneumoniae</i> Mutanten.....	113
5.1.3.	Andere Stämme.....	113
5.2.	Nährmedien und Kulturbedingungen	114
5.2.1.	Nährmedien und Kulturbedingungen für Streptokokken.....	114
5.2.2.	Nährmedien und Kulturbedingungen für <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> und <i>S. carnosus</i>	117
5.2.3.	Nährmedien und Kulturbedingungen für <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>	117
5.2.4.	Nährmedien und Kulturbedingungen für <i>L. pneumophila</i>	117
5.2.5.	Nährmedien und Kulturbedingungen für <i>H. influenzae</i>	118
5.2.6.	Nährmedien für <i>N. meningitidis</i>	118
5.3.	Verwendete Zelllinien	119
5.3.1.	Epithelzelllinien	119
5.3.2.	Endothelzelllinie	119
5.4.	Zellkulturmedien und Kulturbedingungen.....	119
5.4.1.	Kultivierung der humanen Epithelzelllinien HEp-2 und A549.....	119
5.4.2.	Kultivierung der humanen Epithelzelllinie Detroit 562.....	120
5.4.3.	Kultivierung der humanen Endothelzelllinie HBMEC	120
5.4.4.	Zusätze zu den Zellkulturmedien	120
5.5.	Antikörper.....	120
5.6.	Plasmide und Vektoren.....	121
5.7.	Reagenzien.....	121
5.7.1.	Antibiotika.....	121
5.7.2.	Restriktionsendonukleasen.....	122
5.7.3.	Oligonukleotide.....	122
5.7.4.	Molekularbiologische Kits	122
5.7.5.	DNA-Größenstandard	123

5.7.6. Protein-Größenstandard	123
5.7.7. Puffer und Lösungen	124
5.8. Zellwandkomponenten.....	127
6. METHODEN	128
6.1. Kultivierung von Bakterien	128
6.1.1. Kultivierung von Streptokokken	128
6.1.2. Kultivierung von Staphylokokken und Listerien	128
6.1.3. Kultivierung von <i>H. influenzae</i>	128
6.1.4. Kultivierung von <i>N. meningitidis</i>	128
6.1.5. Kultivierung von <i>L. pneumophila</i>	128
6.1.6. Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>	129
6.1.7. Konservierung der Bakterienstämme	129
6.2. Methoden für das Arbeiten mit eukaryontischen Zellen.....	129
6.2.1. Kultivierung der Zelllinien.....	129
6.2.2. Kryokonservierung der Zelllinien	130
6.2.3. Auftauen der Zelllinien	130
6.3. Methoden zur Untersuchung der Adhärenz und der Invasion von Bakterien an und in humane Wirtszellen	130
6.3.1. Infektionsversuche	131
6.3.2. Vorbereiten der Bakterien für Infektionsversuche	131
6.3.3. Vorbereiten der Wirtszellen für Infektionsversuche	132
6.3.4. Inhibitionsexperimente in der Zellkultur	132
6.3.5. Doppelimmunfluoreszenzfärbung.....	133
6.3.6. Bestimmung der wirtszellassoziierten und der intrazellulären Bakterien im Plattierungsversuch	134
6.3.7. Phagozytoseversuche	135
6.3.8. Ratten Endokarditis/Sepsis-Modell.....	137
6.4. Methoden zur Analyse der Bindung und der Expression von Proteinen auf humanen Wirtszellen oder auf Bakterien.....	137
6.4.1. Durchflusszytometrie mit Epithel- und Endothelzellen.....	137
6.4.2. Untersuchungen zur Interaktion der Thrombozyten mit <i>S. pneumoniae</i> in der Durchflusszytometrie	138
6.4.3. Durchflusszytometrie mit Bakterien	139
6.4.4. Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen	139
6.4.5. Bindung von Pneumokokken an immobilisierte Proteine.....	140

6.4.6.	Bindungsversuche mit ¹²⁵ Iod-Thrombospondin-1	141
6.4.7.	Thrombospondin-1-Peptidoglykan Bindungsversuch.....	142
6.5.	Graphische Darstellung und statistische Auswertung	142
6.6.	Methoden für das Arbeiten mit Proteinen	143
6.6.1.	Herstellung von Bakterienlysaten	143
6.6.2.	Ausschüttung von Thrombospondin-1 aus Blutplättchen durch Thrombin-Aktivierung	143
6.6.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970).....	143
6.6.4.	Protein-Färbungen.....	144
6.6.5.	Western-Blot: Semidry-Verfahren	144
6.6.6.	Dot-Spot-Analyse.....	145
6.6.7.	Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	145
6.6.8.	Aufreinigung von Proteinen mit der Affinitätschromatographie	146
6.6.9.	Immunglobulin G-Aufreinigung	146
6.6.10.	Dialyse.....	146
6.6.11.	Kolorimetrischer Funktionstest der Phosphorylcholinesterase (Vollmer and Tomasz, 2001)	147
6.7.	Methoden für das Arbeiten mit DNA	147
6.7.1.	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. pneumoniae</i>	147
6.7.2.	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	148
6.7.3.	Agarose-Gelelektrophorese.....	148
6.7.4.	DNA-Elution aus Agarosegelen.....	149
6.7.5.	Restriktionsverdau von Nukleinsäuren	149
6.7.6.	Herstellung elektrokompenter Bakterien	149
6.7.7.	Elektroporation von <i>E. coli</i>	150
6.7.8.	Transformation von <i>S. pneumoniae</i>	150
6.7.9.	Polymerase-Kettenreaktion	150
6.7.10.	Digoxygenin (DIG)-Markierung von Oligonukleotiden	151
6.7.11.	DNA-Sequenzierung	152
6.7.12.	Ligation und Klonierung von PCR-Fragmenten in Vektoren	153
6.7.13.	Southern-Blot	154
6.7.14.	DNA-DNA-Hybridisierung.....	155
6.7.15.	Herstellung einer kapsellosen Pneumokokken Mutante	155
7.	ANHANG	156
7.1.	Literaturverzeichnis	156

7.2.	Abkürzungsverzeichnis	169
7.3.	Verbrauchsmaterial	172
7.4.	Proteine und Chemikalien	173
7.5.	Geräte	176
7.6.	Thrombospondin-1-Modell.....	178
7.6.1.	Strukturmodell des Thrombospondin-1	178
7.6.2.	Nukleotid- und Aminosäuresequenz von Thrombospondin-1	179
7.7.	Vorveröffentlichungen der Dissertation.....	185
7.8.	Lebenslauf	186

1. Zusammenfassung

Thrombospondin-1 (TSP1) ist ein matrizelluläres, Calcium-bindendes Glykoprotein, das an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse beteiligt ist. TSP1 wird von unterschiedlichen Zelltypen gebildet und ist vor allem in den α -Granula der Thrombozyten zu finden, aus denen es nach deren Aktivierung sekretiert wird. *Streptococcus pneumoniae* (Pneumokokken) sind Gram-positive humanpathogene Bakterien. Sie besiedeln asymptomatisch den menschlichen Respirationstrakt und können schwerwiegende lokale Infektionen und lebensbedrohliche Erkrankungen, wie z.B. Sepsis, bakterielle Meningitis oder invasive Pneumonien auslösen. Die Anheftung von *S. pneumoniae* an Wirtsstrukturen ist ein initialer Schritt für die Kolonisierung mukosaler Epitheloberflächen. In dieser Arbeit wird die Bedeutung des humanen TSP1 für die Pathogen-Wirt Interaktion analysiert und der Effekt für die Pathogenese demonstriert. Verschiedene Bindungsstudien und durchflusszytometrische Analysen zeigten eine Assoziation von *S. pneumoniae* an aktivierte Thrombozyten und an lösliches und immobilisiertes TSP1. In *in vitro* Infektionsversuchen konnte nachgewiesen werden, dass wirtszellgebundenes TSP1 die Adhärenz an und Invasion in Epithel- bzw. Endothelzellen vermittelt. TSP1 übernimmt die Funktion als Brückenmolekül zwischen *S. pneumoniae* und eukaryontischen Wirtszellen. Zur Charakterisierung des bakteriellen Adhäsins für TSP1 wurden die Pneumokokken mit dem proteolytischen Enzym Pronase E bzw. mit der Zucker oxidierenden Substanz Natriumperiodat inkubiert. Eine Behandlung mit Natriumperiodat reduzierte die TSP1 vermittelte Adhärenz der Pneumokokken an humane Wirtszellen. Im Gegensatz dazu hatte die Behandlung mit Pronase E keinen Einfluss auf die TSP1 vermittelte Anheftung von *S. pneumoniae* an eukaryontische Zellen. Diese Ergebnisse deuten an, dass es sich bei dem bakteriellen Adhäsins für TSP1 um eine oberflächenlokalisierte Glykostruktur der Pneumokokken handelt. Die TSP1 vermittelte bakterielle Adhärenz der Pneumokokken an Wirtszellen konnte durch Pneumokokken-spezifisches Phosphorylcholin bzw. durch Lipoteichonsäuren nicht reduziert werden. Im Gegensatz dazu wurde die TSP1 vermittelte Adhärenz von *S. pneumoniae* an Wirtszellen durch Zugabe von löslichem Peptidoglykan signifikant inhibiert. In verschiedenen Bindungsstudien wurde das Peptidoglykan als Pneumokokken-Adhäsins für TSP1 identifiziert. Weiterhin wurde herausgestellt, dass nicht nur *S. pneumoniae*, sondern auch andere Gram-positive pathogene Bakterien, wie *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes* und verschiedene apathogene Bakterien mit TSP1 interagieren, im Gegensatz zu Gram-negativen Bakterien. Es konnte gezeigt werden, dass TSP1 das Peptidoglykan aller getesteten Gram-

positiven Bakterien erkennt. Diese Beobachtung weist auf einen allgemeingültigen Mechanismus der Bakterien-Wirt Interaktion hin, der wahrscheinlich von großer Bedeutung für die Pathogenese Gram-positiver Bakterien ist. Als Rezeptoren für TSP1 auf der Wirtszellseite wurden Proteoglykane auf der Oberfläche von eukaryontischen Zellen identifiziert. Weiterhin konnte herausgestellt werden, dass eine Interaktion der Gram-positiven Bakterien mit TSP1 nicht nur eine Adhärenz an Wirtszellen vermittelt, sondern die Bakterien vor einer Phagozytose durch primäre Granulozyten schützt. Zusammenfassend beweisen diese Ergebnisse eine spezifische Interaktion von Gram-positiven Bakterien mit TSP1, die zur bakteriellen Kolonisierung des Wirtsgewebes beiträgt. Das Peptidoglykan übernimmt die Funktion eines bakteriellen Adhäsins für TSP1, so dass TSP1 als molekulare Brücke die Interaktion von Gram-positiven Bakterien und Wirtszell-Proteoglykanen vermittelt. Diese Untersuchungen tragen in bedeutender Weise zu einem besseren Verständnis der Pathogenese von Infektionen durch *S. pneumoniae* und anderen Gram-positiven Bakterien bei.

Summary

Thrombospondin-1 (TSP1) is a matricellular glycoprotein that has key roles in interactions between human cells and components of the extracellular matrix. TSP1 is produced by different cell types and is mainly found in the α -granules of human thrombocytes and secreted upon their stimulation. *Streptococcus pneumoniae* are Gram-positive human bacteria which reside asymptotically in the human respiratory tract, but can also cause local infections and life-threatening diseases such as sepsis, bacterial meningitis and pneumonia. A prerequisite for pneumococcal colonization of mucosal epithelial cells is the bacterial interaction with host cell structures. This study reports a novel role for human TSP1 in pathogen-host interactions. Binding assays and flow cytometric analysis demonstrate that *S. pneumoniae* specifically interacts with human TSP1. It is shown that *S. pneumoniae* binds to activated thrombocytes and recruits TSP1 from human plasma. Host-cell bound TSP1 promotes adherence of *S. pneumoniae* to human epithelial and endothelial cells, thereby acting as a molecular bridge between pneumococci and eukaryotic cells. To identify the bacterial adhesin for TSP1, pneumococci were incubated with the proteolytic enzyme pronase E and with sodium periodate, which oxidizes surface-exposed sugars. Pretreatment of the bacteria with sodium periodate, but not pronase E substantially reduced TSP1 mediated adherence to host cells, suggesting a glycoconjugate as the pneumococcal receptor for TSP1. Pneumococcal phosphorylcholine and lipoteichoic acids did not affect TSP1 mediated adherence of *S. pneumoniae* to host cells. In contrast, attachment of pneumococci to host cells via TSP1 was blocked by soluble peptidoglycan, indicating the recognition of bacterial peptidoglycan by TSP1. Further studies demonstrate that in addition to *S. pneumoniae* other Gram-positive bacteria including *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes* and several apathogenic bacteria interact with TSP1. Gram-negative bacteria did not interact with TSP1. Further it is shown that TSP1 recognizes the peptidoglycan of all tested Gram-positive bacteria, suggesting a general mechanism of bacteria-host protein interaction which probably has a significant impact on the pathogenesis of Gram-positive bacteria. Host cell proteoglycans were identified as the cellular receptors for TSP1. It is demonstrated that the bacterial binding to TSP1 does not only support adhesion to host cells, but can also protect the bacteria from phagocytosis by granulocytes. In conclusion, the results demonstrate an exploitation of TSP1 by Gram-positive bacteria which supports bacterial colonization of host tissues. In this scenario peptidoglycan functions as adhesin and TSP1 acts as a molecular bridge, linking Gram-positive bacteria with proteoglycan receptors on the host cells. These

studies contribute to a better understanding of infections by *S. pneumoniae* and other Gram-positive bacteria.

2. Einleitung

2.1. Allgemeine Einführung - Bedeutung der Infektionsbiologie

Infektionskrankheiten wurden schon in der Antike als besondere Bedrohung der Menschheit erkannt, doch erst Robert Koch (1843–1919) konnte ihre Übertragbarkeit auf „pathogene Agenzien“ zurückführen. Mit seiner Entdeckung der Tuberkulose- und der Cholera-Erreger legte er einen wichtigen Grundstein für die Entwicklung der infektionsbiologischen Forschung. In den letzten Jahrzehnten sind große Fortschritte in der Untersuchung verschiedener Krankheitserreger erzielt worden und viele ihrer so genannten Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren wurden beschrieben und charakterisiert. Maßgebend für einen Infektionsverlauf ist neben den Eigenschaften der Mikroben auch der physische Zustand des Wirtes. Insbesondere abwehrgeschwächte Menschen können nicht nur von pathogenen, sondern auch von schwach pathogenen oder sogar apathogenen Mikroorganismen infiziert werden. Die Anzahl dieser Risikopatienten ist heute größer denn je, bedingt durch Veränderungen in der Lebensweise, Organtransplantationen, der weltweiten Vernetzung von Infrastrukturen und der fortschreitenden Vermischung unterschiedlicher Kulturen. Dass Infektionskrankheiten auch in Zukunft eine ernstzunehmende Bedrohung darstellen wird auch durch den Umstand verstärkt, dass sich Mikroorganismen ständig verändern. Mutationen führen nicht zuletzt zu einem Auftreten von gefürchteten Resistenzen gegen die derzeit zur Verfügung stehenden Medikamente und Antibiotika. Ein Verständnis der molekularen Mechanismen der Pathogenese von Krankheitserregern ist daher unbedingt erforderlich, sowohl um neue Zielstrukturen für ihre Bekämpfung mit neu zu entwickelnden Wirkstoffen zu entdecken, als auch um die Grundlagen unserer Immunabwehr besser verstehen zu können.

2.2. Bakterielle Infektionen der oberen und unteren Atemwege

Der menschliche Respirationstrakt umfasst den Nasen-Rachen-Raum (Nasopharynx), die Nasennebenhöhlen, den Kehlkopf (Larynx) sowie die Luftröhre (Trachea) mit dem Bronchialbaum und den Lungenbläschen (Alveolen). Diese Hohlräume ausgenommen der Lungenbläschen sind mit einem respiratorischen Epithel ausgekleidet. Der gesamte

Respirationstrakt nimmt durch die Atmung täglich ca. 10 000 Mikroorganismen auf, wobei größere Partikel mit einem Durchmesser von etwa 10 µm in der Nase abgefangen werden. Zum Abwehrsystem des Respirationstraktes gehören Makrophagen, sekretorische IgA Antikörper, Komplementfaktoren, Defensine und das Laktoferrin. Trotz des effektiven Abwehrsystems wurden 1995 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) 248 Millionen akute Infektionen der unteren Atemwege pro Jahr verzeichnet.

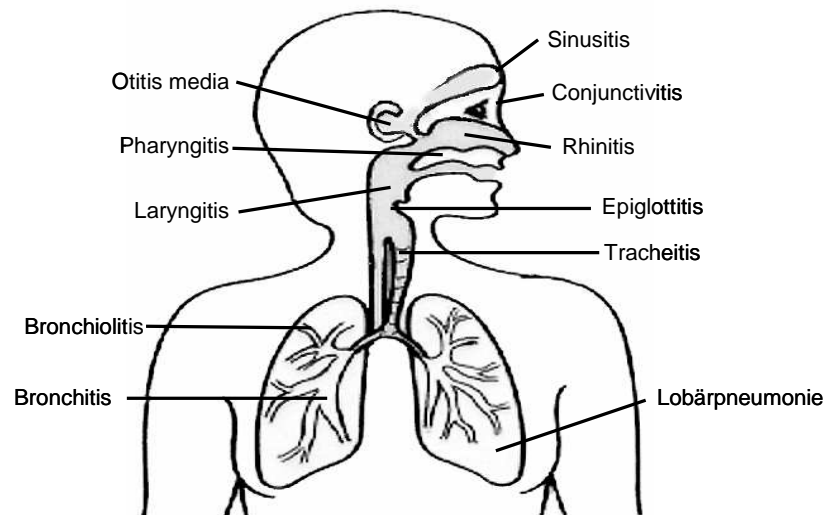


Abb. 1: Schematische Darstellung des oberen und unteren Respirationstraktes mit den zugeordneten Infektionskrankheiten (Hacker, 2000).

Ein Großteil dieser Infektionen wird durch Bakterien verursacht, wie z.B. den Erregern *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* und *Moraxella catarrhalis*, die in einer Häufigkeit von bis zu 60% im Respirationstrakt gesunder Menschen nachgewiesen werden können. Abbildung 1 zeigt eine Übersicht über den Respirationstrakt und die verschiedenen Infektionskrankheiten, die durch zahlreiche Erreger ausgelöst werden.

2.3. Allgemeine Merkmale der Streptokokken

Die Gattung der Streptokokken umfasst eine Gruppe von 34 oxidase- und katalase-negativen Spezies Gram-positiver Kokken, von denen vor allem *Streptococcus pyogenes* und *S. pneumoniae* (Pneumokokken) von medizinischer Bedeutung sind. *S. pyogenes*, auch Gruppe A Streptokokken (GAS) genannt, gehört zur Normalflora der Haut und der

Schleimhäute des Menschen, kann aber auch sowohl lokale Infektionen des Nasen-Rachen-Raumes wie auch Hautinfektionen und akutes rheumatisches Fieber auslösen. *S. pneumoniae* zählt zu den natürlichen Kommensalen des nasopharyngealen Epithelgewebes, stellt aber zurzeit einen der wichtigsten Erreger von Pneumonien dar. Pneumokokken sind ebenfalls die Erreger von Sepsis, bakterieller Meningitis und ambulant erworbener Infektionen des Hals-, Nasen-, und Ohrenbereichs. Weitere medizinisch relevante Streptokokkenarten sind *S. agalactiae*, bekannt auch als Gruppe B Streptokokken (GBS) und Erreger neonataler Meningitiden. *S. mutans* ist eine oral vorkommende Streptokokkenart, die als Kariesauslöser gilt. Streptokokken wurden erstmals 1884 durch Billroth in Wundeiterungen nachgewiesen, bevor sie 1903 durch Schottmüller nach ihrem Hämolyseverhalten eingeteilt wurden. Die Hämolyse bezeichnet die Fähigkeit, auf Blutagar einen Hämolysehof auszubilden: α -hämolisierende Streptokokken lysieren die Blutzellen nur teilweise, β -hämolisierende lysieren vollständig und γ -hämolisierende zeigen keine Hämolyse. 1933 führte Rebecca C. Lancefield eine Einteilung der Streptokokken in serologische Gruppen ein. Die serologischen Gruppen werden auch als Lancefield Gruppen (A bis V) bezeichnet und unterscheiden sich in der Zusammensetzung des Kapselpolysaccharids (Kayser, 1998; Lancefield, 1933).

2.4. *Streptococcus pneumoniae* – allgemeine Merkmale, Epidemiologie und Pathogenese

Seit seiner Isolation aus gesunden Trägern durch George M. Sternberg im Jahr 1881 ist *S. pneumoniae* einer der am häufigsten untersuchten Mikroorganismen, der durch grundlegende biologisch-medizinische Entdeckungen bekannt wurde. Zu diesen Entdeckungen gehören beispielsweise der Nachweis der natürlichen Transformierbarkeit von Pneumokokken im Jahre 1928 durch Griffith (Griffith, 1928), Untersuchungen zur Bedeutung des Penicillins, die Rolle der bakteriellen Kapsel in der Resistenz gegenüber der Phagozytose, sowie die Eigenschaft bakterieller Polysaccharide eine Antikörperproduktion auszulösen (AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995). Aufgrund der morphologischen Anordnung der Zellen in Paaren oder kurzen Ketten wurde *S. pneumoniae* zunächst als *Diplococcus pneumoniae* bezeichnet (**Abb. 2**). Pneumokokken gehören zu den α -hämolisierenden Bakterien, die auf Blutagar in aerober Atmosphäre ein vergrünendes Wachstum aufweisen (Kayser, 1998). Auf Agarplatten bilden sie mehr oder weniger schleimige Kolonien, wofür ihre Polysaccharidkapsel verantwortlich ist. Die Kapselstruktur kann in der Gram-Färbung als hellrosafarbene Zone um die blau-violett gefärbten Kokken sichtbar gemacht werden. Die

unterschiedliche Zusammensetzung der Kapselpolysaccharide ermöglicht eine Einteilung in über 90 verschiedene Serotypen, von denen nur 23 häufig als Infektionserreger in den USA und in Europa in Erscheinung treten. Aufgrund der antiphagozytären Eigenschaft stellt das Kapselpolysaccharid einen wichtigen Virulenzfaktor der Pneumokokken dar. Bekapselte Stämme sind daher in der Regel pathogen für Mensch und Tier, während unbekapselte Stämme meist apathogen sind (Watson and Musher, 1990). Unbekapselte, nicht-typisierbare Pneumokokken haben einen Anteil von bis zu 2% an der asymptomatisch vorkommenden Pneumokokkenpopulation des Epithelgewebes im Nasen-Rachen-Raum (Tuomanen, 2004).

S. pneumoniae kommt asymptomatisch auf den Schleimhäuten des oberen respiratorischen Traktes bei 5-70% der gesunden Erwachsenen und bei mindestens 40% der gesunden Kleinkinder vor. Eine Übertragung erfolgt häufig durch Aerosole, oft auch in Kombination mit Viren des respiratorischen Traktes. Bei einer geschwächten Wirtsdisposition, bei Kleinkindern oder älteren Menschen, kolonisieren die Pneumokokken im Nasopharynx, von wo aus sie in die Nebenhöhlen und in die Bronchien wandern. Dort können sie eine Infektion auslösen oder über mehrere Wochen und Monate asymptomatisch im Wirt persistieren (Ekdahl *et al.*, 1997; Loda *et al.*, 1975). In vielen Fällen induziert eine Kolonisierung des oberen Respirationstraktes mit *S. pneumoniae* die Produktion von Antikörpern, die gegen das bakterielle Kapselpolysaccharid gerichtet sind und resultiert in der Immunisierung gegen den entsprechenden Stamm. Bei einer Abwehrschwäche können Pneumokokken schwerwiegende Infektionen auslösen, die in zwei Kategorien eingeteilt werden: Zum einen in invasive Infektionen, wie z.B. Sepsis oder Infektionen des zentralen Nervensystems, zum anderen in lokale Erkrankungen der Schleimhäute, wie z.B. Infektionen des oberen Respirationstraktes. Daneben ist *S. pneumoniae* auch Auslöser von bakteriellen Meningitiden, invasiven Pneumonien, lokalen Infektionen wie Mittelohrentzündung (Otitis Media) und Sinusitis (**Abb. 1**). Nach einer amerikanischen Studie haben 62% aller Kinder im Alter von 24 Monaten mindestens eine akute Mittelohrentzündung. In seltenen Fällen verursachen Pneumokokken auch Endokarditis und Perikarditis (Musher, 1992). Die häufigsten Infektionen werden bei Kleinkindern im Alter von 6 bis 11 Monaten beobachtet. Ihre Zahl sinkt im Erwachsenenalter ab, steigt aber im Alter von 50 bis 65 Jahren wieder steil an. Allein in den USA werden 7 Millionen Fälle von Otitis Media und mehr als 500 000 Lungenentzündungen pro Jahr registriert, darunter bis zu 7% mit tödlichem Verlauf. Weltweit sterben bei 20 Millionen Infektionen pro Jahr etwa 1 Million Menschen an den Folgen einer Pneumokokken-Pneumonie und etwa 750 000 an den Folgen einer Pneumokokken-

Meningitis. Das deutsche Statistische Bundesamt schätzt die Zahl der jährlichen Pneumoniefälle auf 350 000 bis 500 000.

Die meisten Infektionen durch Pneumokokken werden durch eine kleine Anzahl der bekannten Serotypen verursacht, von denen die Serotypen 1 und 2 als besonders infektiös beschrieben wurden und bisher nicht aus der Normalflora gesunder Erwachsener isoliert werden konnten (Tuomanen, 2004). Die Verbreitung der verschiedenen Serotypen ist abhängig von unterschiedlichen Faktoren des Wirtes, wie beispielsweise dem Immunstatus, dem Alter und dem geographischem Wohnort.

2.5. Therapie und Prävention von Pneumokokkeninfektionen

Penicillin galt über Jahrzehnte hinweg als das Antibiotikum der Wahl zur Behandlung der verschiedenen Pneumokokkeninfektionen, da es bereits in sehr geringer Dosis ($<0.06 \mu\text{g/ml}$) gegen die meisten Pneumokokkenstämme wirksam war. Seit den 1960er Jahren erschwert ein starker Anstieg der Zahl der Penicillin-resistenten Pneumokokkenstämme zunehmend die Therapie. Der Anteil Penicillin-resistenter *S. pneumoniae*-Stämme beträgt inzwischen je nach geographischer Lage bis zu 40% (Nasal, 1999). Die weltweite Ausbreitung der Antibiotika-Resistenz wird der Ausbreitung einiger hochresistenter Isolate der Serotypen 6B, 19F und 23F zugeschrieben (Davies *et al.*, 1999), die für einen Großteil der Pneumokokkeninfektionen vor allem bei Kleinkindern verantwortlich sind. Eine verminderte Penicillinempfindlichkeit tritt dabei häufig bei Patienten mit vorangegangener Hospitalisierung und Antibiotikatherapie auf. Die ersten Versuche zur Impfung gegen Pneumokokken wurden zu Beginn des 20. Jahrhunderts unternommen. Durch zuvor abgetötete Erreger wurde eine leichte Infektion ausgelöst, die einen lang andauernden Schutz vor einer erneuten Infektion bewirkte. Solche Impfungen führten nicht selten zu einer tödlich verlaufenden Pneumokokkenerkrankung. Eine sichere und wirkungsvolle Impfung wurde ab 1930 durch die Verwendung von aufgereinigten Kapselpolysacchariden ermöglicht. Es handelte sich um einen hexavalenten Polysaccharidimpfstoff, der aus Kapselpolysacchariden verschiedener Pneumokokkenserotypen zusammengesetzt ist. Dieser Impfstoff bewirkte bei Erwachsenen die Bildung von Antikörpern gegen die Kapselpolysaccharide, die wiederum das Komplementsystem aktivierten und so zu einem erheblichen Schutz gegen eine Pneumokokkeninfektion beitrugen. In den 1970er Jahren wurde ein 14-valenter Impfstoff zugelassen, der die Kapselpolysaccharide von 14 verschiedenen Pneumokokkenserotypen enthielt. Dieser wurde 1983 von einem 23-valenten Impfstoff (PneumovaxTM, PPV23)

abgelöst (Bruyn *et al.*, 1992). Die Immunisierung bewirkte einen effektiven Schutz gegen Pneumokokkeninfektionen bei gesunden Erwachsenen. Der Polysaccharidimpfstoff vermittelt keine schützende Immunisierung bei Kindern unter 2 Jahren, da Kapselpolysaccharide T-Zell-unabhängige Antigene darstellen, und bei Kleinkindern unter 2 Jahren die T-Zell-unabhängige Immunreaktion noch nicht entwickelt ist. Im Jahr 2000 wurde in den USA ein Protein-Konjugatimpfstoff gegen Pneumokokken mit der Bezeichnung Prevnar[®] (PNCRM7) zugelassen. Zu seiner Herstellung wurden aufgereinigte Kapselpolysaccharide von 7 *S. pneumoniae*-Serotypen (4, 6B, 9V, 14, 19F und 23F), sowie ein Oligosaccharid (aus Serotyp 18C) chemisch an ein Proteinträgermolekül, einer Variante des Diphtherietoxins CRM₁₉₇, gekoppelt. Diese Konjugate werden von B-Zell-Rezeptoren erkannt, in die Zellen internalisiert und von MHCII-Molekülen an die Oberfläche der B-Zellen transportiert, wo die Peptidfragmente den T-Zellen präsentiert werden. Dadurch wird die T-Zell-unabhängige in eine T-Zell-abhängige Reaktion gegen die Polysaccharide umgewandelt, die nun auch Kleinkinder langfristig gegen eine Pneumokokkeninfektion schützen kann. Eine Studie über die Schutzwirkung dieses 7-valenten Konjugatimpfstoffes ergab in den USA einen Rückgang der Otitis Media Erkrankungen um 67% und der Bakteriämien um 85% (Black, 2000). Es bleibt zu berücksichtigen, dass der Konjugatimpfstoff nur einen Immunschutz gegen die beinhalteten Serotypen vermittelt. In unterschiedlichen geographischen Regionen kommen auch andere Serotypen vor, so dass ein vermehrter Einsatz dieser Impfstoffe zu einer zunehmenden Ausbreitung solcher seltenen Serotypen führen könnte. Eine mögliche Lösung liegt in der Entwicklung von Impfstoffen, die auf Serotyp unabhängigen immunogenen Pneumokokken Proteinen, wie z.B. Pneumolysin basieren.

2.6. Oberflächenkomponenten und Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae*

Verschiedene Merkmale der Pneumokokken liefern einen bedeutenden Beitrag zu ihrer Virulenz. Neben dem im bakteriellen Zytosol gebildeten Toxin Pneumolysin spielen dabei vor allem Faktoren der Bakterienoberfläche eine besondere Rolle. Bakterielle Oberflächenkomponenten haben immunmodulatorische Eigenschaften und zeigen adhäsions- und invasionsfördernde Eigenschaften (AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995). Häufig fungieren Proteine, Polysaccharide oder Lipidstrukturen der Bakterienoberfläche als Adhäsine. Die Anheftung von *S. pneumoniae* an Wirtsstrukturen stellt einen wichtigen initialen Schritt bei einer Infektion dar. Adhärenente Bakterien können sich im weiteren Infektionsprozess

extrazellulär vermehren und in tiefere Gewebe vordringen. Nach dem Zellkontakt können sie die Aufnahme in Wirtszellen auslösen, um zelluläre Barrieren zu überwinden oder intrazellulär zu persistieren.

2.6.1. Die Polysaccharidkapsel

Bei den meisten *S. pneumoniae*-Stämmen wird die Zelloberfläche von einer Polysaccharidkapsel umgeben. Bei der Kapsel handelt es sich um eine stammspezifisch zusammengesetzte Zuckerstruktur, die als Hauptvirulenzfaktor der Pneumokokken identifiziert wurde (AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995; Hammerschmidt *et al.*, 2005; Jedrzejak, 2001). Bekapselte *S. pneumoniae*-Stämme verhalten sich im Tiermodell um ein Vielfaches virulenter als kapsellose (Watson and Musher, 1990). In Abhängigkeit ihrer immunogenen Eigenschaften sind mehr als neunzig Serotypen bekannt, von denen aber nur zwanzig als Infektionserreger beschrieben wurden (Musher, 1992). Aus erkrankten Erwachsenen konnten die Serotypen 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F und 23F isoliert werden. Bei Kindern lösen vor allem die Serotypen 1, 4, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19A, 19F und 23F Infektionen aus. Die für die Virulenz bedeutsame Rolle der Kapsel wird dadurch begründet, dass sie, unabhängig von der jeweiligen Struktur der Kapselpolysaccharide, den Pneumokokken einen sicheren Schutz vor dem Immunsystem verleiht. Die Kapsel schützt die Erreger gegen die Komplement-ausgelöste Opsonisierung, indem sie eine Bindung zwischen Bakterien und dem C3b Komplementrezeptor verhindert (Fine, 1975; Roberts, 1996). Darüber hinaus konnte bei einigen Serotypen (Serotypen 3, 8 und 37) von *S. pneumoniae* während einer Infektion eine spontane Phasenvariation in der Kapselexpression beobachtet werden. Der so genannte transparente Phänotyp bildet eine geringere Menge an Kapselpolysaccharid. Bakterielle Oberflächenproteine sind nicht mehr von Polysacchariden maskiert und können die Anheftung der Bakterien an mukosale Epitheloberflächen fördern und ermöglichen damit ein Persistieren im nasopharyngealen Epithelgewebe. Der opaque Phänotyp ist durch eine stärkere Bekapselung gekennzeichnet und weist eine deutlich erhöhte Virulenz in systemischen Infektionen auf (Overweg *et al.*, 2000; Weiser *et al.*, 2001). Es wurde vermutet, dass die Kapsel möglicherweise wichtige Virulenzfaktoren auf der Pneumokokkenoberfläche maskiert, die für eine Adhärenz an Wirtszellgewebe notwendig sind. Ein zu stark ausgeprägtes Kapselpolysaccharid könnte demnach die Adhärenz der Bakterien an Wirtsgewebe verhindern (Overweg *et al.*, 2000; Weiser *et al.*, 1994). In diesem Zusammenhang zeigten Hammerschmidt *et al.* (Hammerschmidt *et al.*, 2005), dass

Pneumokokken offensichtlich die Menge an Kapselpolysaccharid im Verlauf einer Infektion differentiell bzw. stadienspezifisch regulieren können. In elektronenmikroskopischen Studien konnte gezeigt werden, dass zunächst stark bekapselte Pneumokokken in direktem Kontakt mit Wirtszellen aus dem Lungengewebe der Maus deutlich weniger stark bekapselt erschienen.

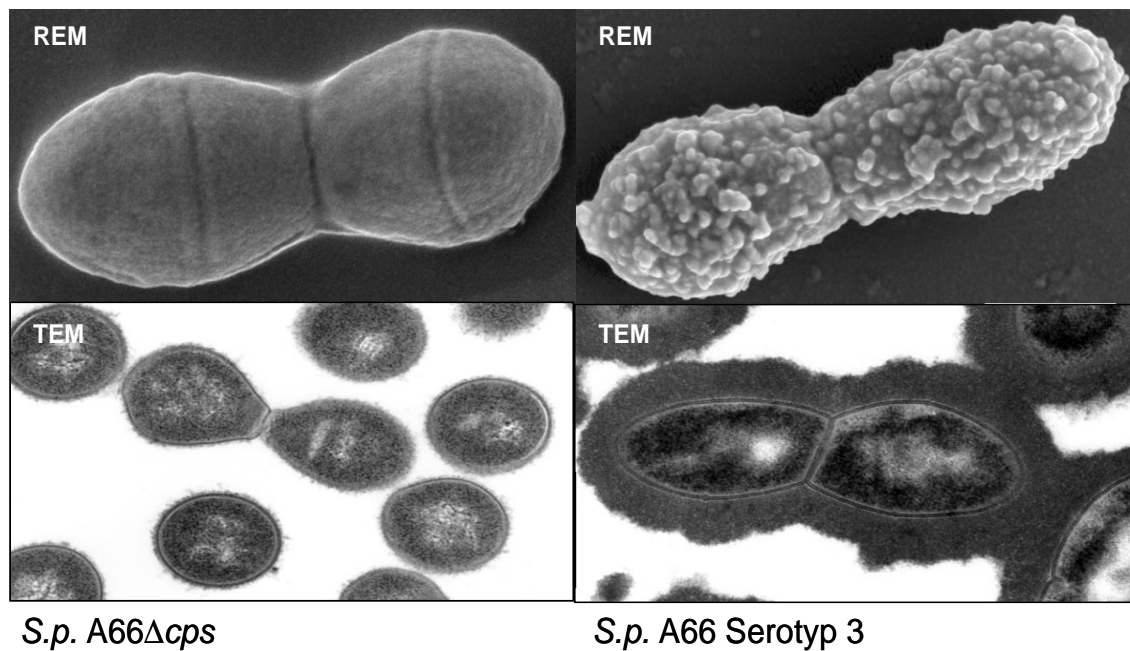


Abb. 2: Bekapselte und unbekapselte Pneumokokken. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ruthenium-Rot-fixierten Pneumokokken zeigen den Unterschied in der Expression des Kapselpolysaccharids zwischen einem bekapselten *S. pneumoniae* Stamm (*S.p.* A66 Serotyp 3) und seiner unbekapselten Mutante (*S.p.* A66 Δ *cps*) (Hammerschmidt *et al.*, 2005).

2.6.2. Zellwand und Zellwandpolysaccharide

Die Zellwand der Pneumokokken besteht aus einem Netzwerk verschiedener Moleküle, welche der Bakterienzelle Struktur und mechanische Stärke verleihen (Garcia-Bustos *et al.*, 1987). Ihre Hauptbestandteile sind wie bei anderen Gram-positiven Bakterien Peptidoglykan, Teichonsäuren und verschiedene Proteine (Mosser and Tomasz, 1970). Ein besonderes Merkmal der Zellwand von Pneumokokken ist das Phosphorylcholin (Vollmer and Tomasz, 2001), das auch bei *Neisseria* spp., *Haemophilus influenzae* und *Pseudomonas* als Zellwandbestandteil vorkommt (Kolberg *et al.*, 1997; Weiser *et al.*, 1998) und als Anker für verschiedene oberflächenlokalisierte Cholin-bindende Proteine (CBPs) fungiert (Yother *et al.*, 1998). Viele der Zellwandkomponenten üben eine wichtige Rolle als Pathogenitätsfaktoren

der Bakterien aus und wirken beispielsweise als Adhäsine oder Determinanten zum Schutz gegen Wirtsabwehrmechanismen (Talay, 2005).

Das auch als Murein bezeichnete Peptidoglykan stellt die Hauptkomponente Gram-positiver Zellwände dar. Es kommt auch in der Zellwand Gram-negativer Bakterien vor, bildet hier jedoch nur eine vergleichsweise dünne Schicht. Das Peptidoglykan ist ein Heteropolymer, bestehend aus Zuckerpolymeren, die durch verschiedene Oligopeptide kovalent quervernetzt sind. Der Kohlenhydratanteil besteht aus alternierenden Einheiten von *N*-Acetylglukosamin und *N*-Acetylmuraminsäure, die über eine β -1,4-glykosidische Bindung miteinander verknüpft sind. An die Muraminsäuren sind kovalent Peptide aus D- und L-Aminosäuren gekoppelt, die untereinander ebenfalls kovalent quervernetzt sind (**Abb. 3**). In *S. pneumoniae* bestehen die quervernetzten Peptide aus den Aminosäuren L-Alanin, D-Glutamin, L-Lysin und L-Serin (Fischer and Tomasz, 1985). Weitere Bestandteile der Gram-positiven Pneumokokkenzellwand sind Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren, die über *N*-Acetylmuraminsäure an das Mureingerüst gebunden sind. Zwischen 15% und 30% des *N*-Acetylmuramins tragen Teichonsäuren. Der Anteil an Teichonsäuren variiert im Zuge der Phasenvariation zwischen opakem und transparentem Bakterienzell-Phänotyp. Die Teichonsäuren sind über Phosphatester miteinander verbunden, die Aminosäure D-Alanin sowie jeweils zwei Phosphorylcholine sind daran geknüpft. Die Phosphorylcholinketten bestehen aus sechs Cholin-Einheiten und sind glykosidisch über *N*-Acetylgalaktosamin an die Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren gebunden (**Abb. 3**) (Fischer, 2000). Cholin stellt für Pneumokokken einen essentiellen Wachstumsfaktor dar, der von den Bakterien nicht selbst synthetisiert werden kann und daher im Nährsubstrat enthalten sein muss. Cholin kann durch Ethanolamin im Wachstumsmedium ersetzt werden, das entsprechend an dieselbe Position wie das Cholin in Teichon- und Lipoteichonsäuren eingebaut werden kann. Als Folge dieses Austausches wurde beobachtet, dass die Bakterien ungewöhnlich lange Ketten ausbilden (Vollmer and Tomasz, 2001). Da bekannt ist, dass die Cholin-bindenden Proteine (CBPs) das Phosphorylcholin benötigen, um mit der Pneumokokkenzellwand zu assoziieren kann das Ethanolamin das Cholin funktionell nicht ersetzen (Sanchez-Puelles *et al.*, 1990). Die Funktion dieser Cholin-bindenden Proteine wird später im Detail beschrieben. Verschiedene Oberflächenproteine enthalten eine Signalsequenz, durch die sie mit Hilfe des Sec-abhängigen Transportweges über die Zytoplasmamembran nach außen transportiert werden. Dort werden sie entweder in der äußeren Membran verankert oder in die extrazelluläre Umgebung entlassen. Allgemein werden zwei Gruppen von Oberflächenproteinen unterschieden. Die eine Gruppe umfasst die meisten Lipoproteine die ein Lipidankermotiv besitzen. Die andere

Gruppe umfasst diejenigen Proteine die über das LPxTG Motiv durch die Sortase kovalent in der Zellwand verankert werden (**Abb. 4**) (Bergmann and Hammerschmidt, 2006; Fischetti *et al.*, 1990).

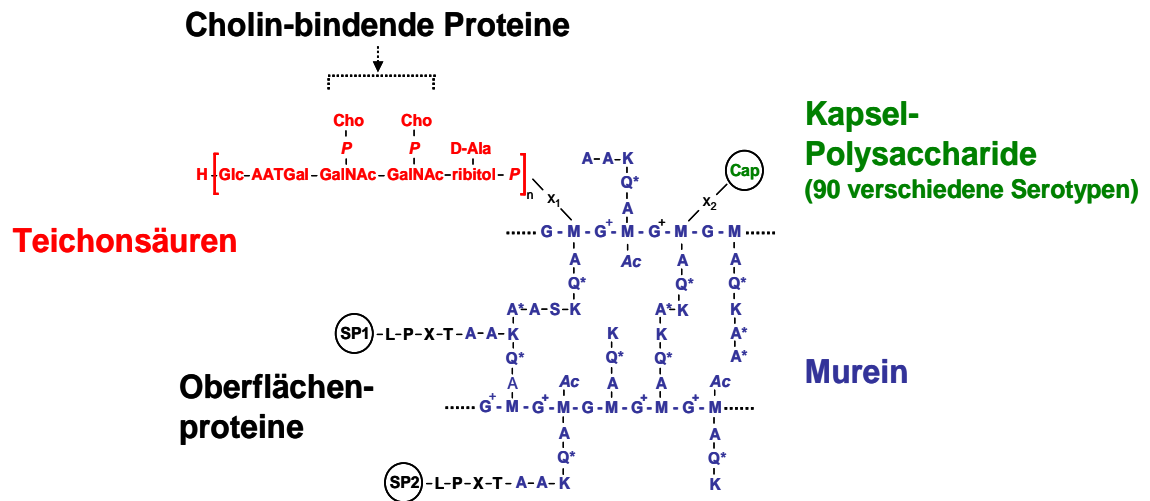


Abb. 3: Zellwandaufbau und Pneumokokken-spezifische Modifikationen (Vollmer, 2007).

Peptidoglykan wird als ein starkes biologisches Effektormolekül ähnlich dem Endotoxin LPS (Lipopolysaccharid) der Gram-negativen Bakterien beschrieben (Boneca, 2005; Myhre *et al.*, 2006; Rietschel *et al.*, 1998). Entsprechend seiner Eigenschaften als hochkonservierte bakterielle Komponente wird Peptidoglykan in die Familie der PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) eingruppiert. PAMPs können durch die angeborene Immunabwehr von PRRs (pathogen recognition receptors) erkannt und eliminiert werden. Das C-reaktive Protein, ein PRR und Modulator der frühen Immunantwort, kann an das Phosphorylcholin auf der Pneumokokkenoberfläche binden, die Komplementkaskade aktivieren und damit eine Phagozytose des Pathogens induzieren (Medzhitov and Janeway, 1997; Mold *et al.*, 2002). Andere PRRs die in Zusammenhang mit der Zellwand der Pneumokokken beschrieben wurden, sind die Toll-like Rezeptoren (TLRs), das LBP (LPS binding protein), NOD- (Nucleotide-binding oligomerization domain) Proteine und CD14, ein Rezeptor auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen (Paterson and Mitchell, 2006; Weber *et al.*, 2003; Weidemann *et al.*, 1997). Lange wurde angenommen, dass TLR2 das Peptidoglykan und die Lipoteichonsäuren der Zellwand von Gram-positiven Bakterien erkennt. Es konnte aber gezeigt werden, dass Proteine, die im Peptidoglykannetzwerk eingebettet sind und durch eine Aufreinigung des Peptidoglykans nicht entfernt werden konnten, die Auslöser einer

TLR2-abhängigen Immunantwort sind. Es wird angenommen, dass Lipopeptide die TLR2-abhängige Immunantwort auslösen. Das LBP wurde als Zellwand-bindendes Akutphasenprotein identifiziert. Dabei erkennt es sowohl aufgereinigte Pneumokokkenzellwandstrukturen, wie auch intakte Pneumokokken (Weber *et al.*, 2003). CD14 kann eine Monozyten und Makrophagenaktivierung durch eine Bindung von löslichem Peptidoglykan und Gram-negativen LPS-Strukturen induzieren (Weidemann *et al.*, 1997). Die Bindung von Muropeptiden des Peptidoglykans an den intrazellulären eukaryontischen Rezeptor NOD2 initiiert eine Signalkaskade, die in einer Expression verschiedener antimikrobieller Peptide aus Makrophagen und Monozyten resultiert (Opitz *et al.*, 2004).

2.6.3. Adhäsine und andere Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae*

Das oberflächenexponierte **Phosphorylcholin** der Pneumokokken spielt durch seine vielseitigen Wechselwirkungen in frühen Infektionsphasen eine entscheidende Rolle. Neben seiner Funktion als Anker-molekül für verschiedene Cholin-bindende Proteine kann es durch eine Interaktion mit PAF (platelet-activating factor) und dem PAF Rezeptor eine Internalisierung der Bakterienzelle in die aktivierte Endothelzelle unterstützen (Cundell *et al.*, 1995; Cundell *et al.*, 1995).

Die **Phosphorylcholin-Esterase** (CbpE oder Pce) besitzt eine N-terminale Signalsequenz und eine C-terminale Cholin-bindende Domäne. Durch die Esterase-Aktivität reguliert sie die Menge an Zellwand-assoziiertem Phosphorylcholin. Strukturanalysen der Pce zeigen, dass nur endständiges Phosphorylcholin der Teichonsäuren von der Esterase erreicht werden kann. Dadurch kann die Phosphorylcholin-Esterase nur etwa 30% der Phosphorylcholine von der Pneumokokkenzellwand abspalten (Holtje and Tomasz, 1974). Die im Maus-Modell beobachtete deutlich erhöhte Virulenz einer Pce-Mutante ist noch weitgehend unklar, allerdings wird vermutet, dass eine erhöhte Menge von Phosphorylcholin eine Interaktion mit dem PAF Rezeptor und damit eine Internalisierung der Erreger begünstigt (Vollmer and Tomasz, 2001).

Das Pneumokokken-Autolysin *N*-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidase **LytA** wurde als erstes Cholin-bindendes Protein beschrieben (Garcia *et al.*, 1988). Es benötigt das Phosphorylcholin für eine Konvertierung von der inaktiven E-Form in die aktive C-Form. LytA ist verantwortlich für eine Lyse der Pneumokokken, die durch Wachstum der Bakterien in der stationären Phase sowie durch den Einfluss von Antibiotika ausgelöst werden kann. Durch die Wirkung dieses Autolysins werden letztlich auch andere pathogenetisch wichtige

intrazelluläre Inhalte der Pneumokokken, wie z.B. das Toxin Pneumolysin freigesetzt (Tomasz, 1970). Die Zellwandhydrolase **LytB** spielt eine wichtige Rolle bei der Separation von Tochterzellen in der Zellteilung (Garcia *et al.*, 1999).

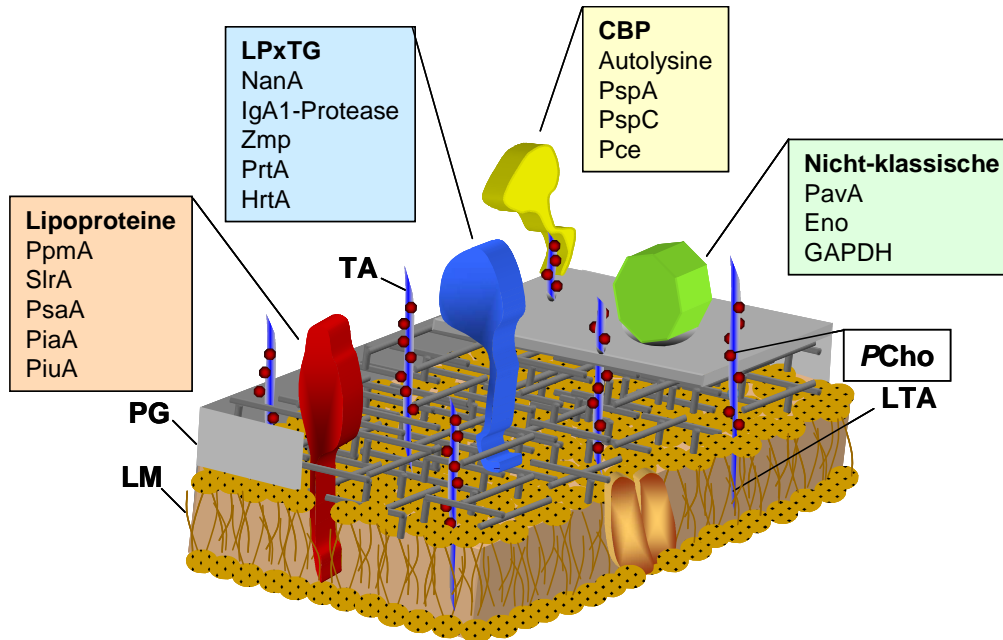


Abb. 4: Modell der Zellwand von *S. pneumoniae* mit oberflächenlokalisierten Adhäsinen und Virulenzfaktoren verschiedener Klassen. LM: Lipidmembran, PG: Peptidoglykan, PCho: Phosphorylcholin, LTA: Lipoteichonsäuren (Bergmann and Hammerschmidt, 2006).

Das Cholin-bindende Oberflächenprotein **PspA** (pneumococcal surface protein A) wurde als Bindungsprotein für das humane Eisentransportprotein Laktoferrin identifiziert. Laktoferrin ist in den Sekreten der Schleimhäute zu finden und dient hier den Pneumokokken möglicherweise als Eisenquelle (Hammerschmidt *et al.*, 1999). Darüber hinaus ist bekannt, dass PspA eine Aktivierung der Komplementkaskade verhindern kann, vermutlich indem es durch Interaktion mit dem Komplementfaktor B die Wirkung der C3-Konvertase und damit eine Spaltung in C3a und C3b verhindert. Dadurch wird eine Komplement-vermittelte Lyse der Pneumokokken unterbunden (Tu *et al.*, 1999).

Bei dem Oberflächenprotein **PspC** (pneumococcal surface protein C, auch CbpA oder SpsA genannt) handelt es sich ebenfalls um ein Cholin-bindendes Protein. PspC konnte als bakterielles Adhäsion für die sekretorische Komponente (SC) des sekretorischen Immunglobulins A (sIgA) und des polymeren Immunglobulinrezeptors (pIgR) identifiziert werden. Durch diese bisher ausschließlich für Pneumokokken beschriebene Interaktion wird

eine Adhärenz und eine anschließende Transmigration der Pneumokokken an bzw. durch humane Epithelzellen ermöglicht (Elm *et al.*, 2004; Hammerschmidt *et al.*, 1997). Weiterhin wird PspC als Bindungspartner der Komplementfaktoren C3 (Cheng *et al.*, 2000) und Faktor H (Dave *et al.*, 2001) beschrieben. Durch die Bindung der Faktoren des Komplementsystems könnten die Pneumokokken einer Opsonophagozytose entkommen.

Pneumolysin ist ein Zytolysin, das von allen klinischen Pneumokokkenisolaten gebildet wird. Es bindet an im Plasma der Wirtszelle vorliegendes Cholesterin und induziert durch seine hämolytische Aktivität eine ringförmige Lyse der Zelle (Johnson *et al.*, 1980). Pneumolysin ist ein 52,8 kDa großes, hoch konserviertes zytoplasmatisches Protein, bestehend aus 470 Aminosäuren (Johnson *et al.*, 1982). In Abhängigkeit der Konzentration des lytischen Pneumolysins konnten verschiedene biologische Aktivitäten dieses Toxins beschrieben werden. In hohen Konzentrationen aktiviert es die klassische Komplementkaskade, was zu einer Lyse der Wirtszellen führt. In niedrigeren, nicht-toxischen Konzentrationen resultiert eine Pneumolysinbehandlung von Serum in einer geringeren Opsonisierungsfähigkeit des Serums und damit auch in einer reduzierten Phagozytose von *S. pneumoniae* (Alcantara *et al.*, 2001). Zudem stimuliert Pneumolysin in sublytischer Konzentration die Produktion von inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α oder Interleukin-1 β . Weiterhin inhibiert es den Zilienschlag auf respiratorischem Epithelgewebe sowie die Migration von Neutrophilen und die Ausreifung von Lymphozyten, und damit eine Antikörperproduktion (Paton *et al.*, 1993). Eine Vielzahl von bakteriellen Adhäsinen ist in der Lage, verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) zu erkennen und dadurch eine spezifische Bindung von *S. pneumoniae* an den Wirt zu unterstützen. Durch Bindung an Plasminogen verfügen die Erreger über einen erfolgreichen Mechanismus, Strukturen der extrazellulären Matrix zu degradieren, um in Epithelzellen einzudringen. Plasminogen liegt in hoher Konzentration im menschlichen Plasma vor (180 $\mu\text{g/ml}$) und ist das Proenzym für Plasmin, einem Effektor der Fibrinolyse. Eine Plasminogen-Bindung von *S. pneumoniae* konnte bei bekapselten und unbekapselten Stämmen nachgewiesen werden. Als Plasminogen-Bindungsprotein von *S. pneumoniae* wurden die glykolytischen Enzyme **α -Enolase** und **GAPDH** (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) identifiziert (Bergmann *et al.*, 2001).

Ebenfalls von Bedeutung ist die Fähigkeit von Pneumokokken das extrazelluläre Matrix-Protein Fibronectin zu binden, und zwar sowohl in löslicher als auch in immobilisierter Form (van der Flier *et al.*, 1995). Das oberflächenlokalisierte **PavA** Protein (pneumococcal adherence and virulence factor A) konnte als Pneumokokken Adhäsine für Fibronectin identifiziert werden. Eine PavA-Deletionsmutante des virulenten Stammes D39 zeigte in

systemischen Maus-Infektionen sowie in einem Maus-Meningitis-Modell eine deutlich verminderte Virulenz (Holmes *et al.*, 2001; Pracht *et al.*, 2005).

Weitere Virulenzfaktoren und ihre verschiedenen Mechanismen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Protein	Virulenzmechanismus	Referenz
LPxTG-verankerte Proteine		
NanA	Persistenz im respiratorischen Trakt	(King <i>et al.</i> , 2004)
IgA ₁ -Protease	Verstärkung der Pneumokokken-Adhärenz	(Weiser <i>et al.</i> , 2003)
Hic	Faktor H-Bindung	(Janulczyk <i>et al.</i> , 2000)
	C3b Inaktivierung und Schutz vor Phagozytose	(Jarva <i>et al.</i> , 2002)
Hyaluronidase	Translokation von Pneumokokken zwischen verschiedenen Geweben	(Paton <i>et al.</i> , 1993)
Neuraminidase	Desialysierung des LPS von Pathogenen des Respirationstrakts	(Shakhnovich <i>et al.</i> , 2002)
HtrA	Resistenz gegenüber oxidativem Stress	(Sebert <i>et al.</i> , 2002)
Lipid-verankerte Proteine		
SlrA	Unterstützung der Kolonisierung	(Hermans <i>et al.</i> , 2006)
PpmA	Unterstützung der Kolonisierung	(Hermans <i>et al.</i> , 2006)
PiaA und PiuA	Eisenaufnahme und Kolonisierung	(Brown <i>et al.</i> , 2001)
PsaA	Unterstützung der Adhärenz	(Marra <i>et al.</i> , 2002)

Tab. 1: Virulenzmechanismen von LPxTG- und Lipid-verankerten Proteinen (Bergmann and Hammerschmidt, 2006; Hammerschmidt, 2007).

2.7. Strategien pathogener Bakterien zur Interaktion mit verschiedenen eukaryontischen Strukturen

Pathogene Mikroorganismen verfügen über eine Vielzahl von Strategien die es ihnen ermöglichen unterschiedliche Nischen innerhalb eines Wirtes zu besiedeln. Viele Gram-positive Bakterien besitzen eine Reihe von Adhäsinen, die an verschiedene Zielmoleküle binden können und so stadienspezifisch während einer Infektion die Adhärenz an Wirtsstrukturen vermitteln können. *Staphylococcus aureus* und andere Pathogene können durch differentiell exprimierte Adhäsine im Verlauf einer Infektion in verschiedene Epithel- und Endothelgewebe eindringen (Talay, 2005). Extrazelluläre Bakterien, wie z.B. viele Streptokokken und Staphylokokken binden spezifisch an Wirtsproteine der extrazellulären

Matrix. Dabei bilden viele verschiedene Proteine, wie z.B. Kollagene, Fibronectin, Laminin, Vitronectin, Fibrinogen und andere eine adhäsive Oberflächenstruktur. Glykosaminoglykane werden ebenfalls zur ECM gezählt. Proteine der extrazellulären Matrix sind im Körper weit verbreitet und werden vor allem bei Wunden und Verletzungen verstärkt gebildet, ein Umstand, der für Pathogene ideal zur Kolonisierung des Wirts genutzt werden kann (Talay, 2005). Am Beispiel von *S. pneumoniae* wurden bereits verschiedene Strategien beschrieben, wie Pneumokokken durch eine Vielzahl von Adhäsinen mit Proteinen der ECM interagieren und sogar durch eine Degradation von ECM Proteinen in tiefere Gewebsschichten eindringen können (siehe Kapitel 2.6.3). Bakterielle Oberflächenproteine, die eine Adhärenz an Wirtsmoleküle der ECM vermitteln, werden allgemein MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) genannt (Foster and Hook, 1998). MSCRAMMs repräsentieren eine Protein-Familie, deren Mitglieder meist kovalent in der Peptidoglykanschicht der Bakterienzellwand verankert sind. Beispiele für MSCRAMMs sind bei *S. aureus* die Fibronectin-Bindungs-Proteine FnBPA und FnBPB, ein Kollagen-bindendes Protein Cna und die Fibrinogen-bindenden Proteine ClfA und ClfB (clumping factor A und B) (Greene *et al.*, 1995). *S. aureus* Protein A (Spa), ein Oberflächenprotein mit einer für MSCRAMMs typischen LPxTG-Sequenz, konnte als Adhäsion des von Willebrand Faktors (vWF) identifiziert werden. Der vWF wird vor allem bei Verletzungen von Endothelstrukturen gebildet und kann deshalb als bevorzugter Rezeptor für Krankheitserreger in der initialen Phase einer intravaskulären Infektion dienen (Hartleib *et al.*, 2000).

Viele Pathogene haben neben der Interaktion mit Proteinen der ECM auch Strategien entwickelt, an Proteoglykan-Strukturen des mukosalen Epithelgewebes zu binden. Proteoglykane bestehen aus einem Protein und einer oder mehrerer kovalent gebundener Glykosaminoglykanketten. Zu den Glykosaminoglykanen, die aufgrund ihres reichlichen Vorkommens im menschlichen Körper ebenfalls eine Rolle während der Pathogenese spielen, gehören Heparin, Heparansulfat, Chondroitinsulfat und Dermatansulfat. Vor allem das weit verbreitete Heparansulfat konnte bereits als Zielmolekül verschiedener Mikroorganismen identifiziert werden. *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia pneumoniae*, *Neisseria* spp. und *S. pneumoniae* konnten über Heparansulfat an nasopharyngeale Epithelzellen binden (Tonnaer *et al.*, 2006).

Die Bindung von Bakterien an Wirtszellen und Komponenten der extrazellulären Matrix kann neben der physikalischen Anheftung auch zu einer Auslösung von Signalkaskaden in der Wirtszelle führen. Als Folge kann es zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und einer Integrin-vermittelten Aufnahme des Pathogens kommen. Solch eine Fähigkeit der Erreger

kann hilfreich sein, dem Immunsystem, aber auch einer Antibiotikabehandlung zu entkommen. Es konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* eine Aufnahme durch nicht-professionelle Phagozyten, wie z.B. Epithel- und Endothelzellen, Fibroblasten, Osteoblasten und Keratinozyten induzieren kann (Agerer *et al.*, 2003; Sinha *et al.*, 2000).

Neben Proteinen der extrazellulären Matrix können Bakterien auch an viele andere Wirtsstrukturen anheften und dadurch eine Besiedlung, eine Vermehrung und eine Ausbreitung unterstützen. Thrombozyten beispielsweise bieten Pathogenen eine adhäsive Oberfläche auf verletztem Gewebe und können den Erregern auch als Vehikel für einen Transfer in andere Wirtsbereiche dienen. Bei einer Vielzahl von Pathogenen, wie z.B. bei *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp. und *Bacillus* spp. konnten Interaktionen mit Thrombozyten nachgewiesen werden (Fitzgerald *et al.*, 2006). Dabei binden die Bakterien über bakterielle Oberflächenproteine entweder direkt oder über ein Brückenmolekül indirekt an die Oberflächenrezeptoren von Thrombozyten. Von Bedeutung erscheint darüber hinaus auch, dass Blutplättchen Granula enthalten, die mit verschiedenen Substanzen angefüllt sind, z.B. Adenosindiphosphat (ADP), Serotonin, Calcium und Proteinen wie Thrombospondin-1 (TSP1), Fibrinogen (Fg), Vitronektin (Vn) und dem von Willebrand Faktor (vWF) (Reed, 2002). Bei einer Aktivierung der Blutplättchen durch Verletzungen werden diese Inhalte sekretiert und eine Thrombusformation induziert. Bakterien können ebenfalls eine Aktivierung der Blutplättchen und damit eine Ausschüttung der Proteine der Granula bewirken. In diesem Zusammenhang wurde bei *S. aureus* beschrieben, dass ClfA/B (clumping factor A und B) und FnBPA/B eine wichtige Rolle bei der Bakterien-Thrombozyten-Assoziation spielen. *S. aureus* bindet über eine Fibrinogen- und Fibronektin-Brücke an die Blutplättchen (Fitzgerald *et al.*, 2006). Eine gesteigerte Assoziation von *S. aureus* an Blutplättchen konnte durch Fibrin und in Anwesenheit des Granula-Proteins Thrombospondin-1 (TSP1) beobachtet werden. TSP1 scheint nach Ausschüttung der Inhalte aus den Granula eine Aggregation verschiedener Proteine auf der Oberfläche der Blutplättchen zu bewirken, was letztlich zu einer gesteigerten Bindung von *S. aureus* an die Plättchen führt (Niemann *et al.*, 2004). In Kaninchen-Endokarditis-Modellen konnte eine bakterielle Adhärenz an Fibrin-Thrombozyten Matrizes beobachtet werden. Dabei wurde die Assoziation von Streptokokken und Staphylokokken in Anwesenheit von Thrombozyten an eine immobilisierte Fibrin-Matrix noch deutlich erhöht. Diese Beobachtung liefert einen weiteren Beleg für die Bedeutung von Thrombozyten und deren Rekrutierung durch

pathogene Bakterien in der initialen Phase einer bakteriellen Infektion (Chugh *et al.*, 1990). Eine Rolle von Thrombospondin-1, dem häufigsten Protein der Granula der Thrombozyten, in der Vermittlung einer Bindung von *S. aureus* an künstliche Oberflächen wurde zum ersten Mal von (Herrmann *et al.*, 1991) beschrieben.

2.8. Thrombospondin-1

Thrombospondin-1 (TSP1) ist ein matrizzelluläres, Calcium-bindendes Glykoprotein, das in verschiedene zelluläre Prozesse involviert ist und dessen Bildung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen abhängig ist. Bei der Wundheilung, Entzündungsreaktionen und der Angiogenese ist es an der Proliferation, Migration und Apoptose von Zellen beteiligt (Adams, 2001; Raugi *et al.*, 1987). TSP1 bindet an eine Reihe von Integrin- und nicht-Integrin Rezeptoren, CD47 oder CD36 und an extrazelluläre Moleküle wie Heparansulfat-Proteoglykane und ECM Proteine (Chen *et al.*, 2000). Die Bindungsstellen für diese verschiedenen Rezeptoren sind über das gesamte TSP1-Molekül verteilt, von denen viele Domänen multiple Rezeptoren binden (**Abb. 5**).

Strukturelle Organisation

Die Thrombospondin Familie kann in die Subfamilien A und B unterteilt werden. Zur Subfamilie A zählen die als Trimer organisierten Thrombospondine 1 und 2 (TSP1 und TSP2). Zur Subfamilie B gehören die Thrombospondine 3 und 4 sowie COMP (cartilage oligomeric matrix protein), welche als Pentamere organisiert sind und strukturelle Unterschiede zur Subfamilie A aufweisen. Am weitesten verbreitet ist das TSP1. Unter physiologischen Bedingungen ist die humane Plasmakonzentration von TSP1 100 µg/ml, die Serumkonzentration kann lokal über 200 µg/ml betragen. TSP1 besteht aus drei Polypeptiden, die über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden sind. Das Trimer hat ein Molekulargewicht von 420 kDa, das Monomer weist ein Molekulargewicht von ca. 180 kDa auf. Das TSP1 Monomer kann in vier strukturelle Abschnitte gegliedert werden: eine globuläre N-terminale Region, einen Oligomerisierungsabschnitt, einen verbindenden Abschnitt mit charakteristischen Typ 1, Typ 2 und Typ 3 Sequenzwiederholungen und eine globuläre C-terminale Region (Lawler and Hynes, 1986, 1987).

Zum N-Terminus (TSPN) zählen die globuläre N-terminale Region, die Oligomerisierungsdomäne und die Typ 1 Sequenz-Wiederholungen des anschließenden Abschnitts. Der globuläre Teil des N-Terminus ist verantwortlich für eine Heparansulfat-

Proteoglykan-, Fibrinogen- und Integrin-Bindung und wird auch Heparin-Bindungs-Domäne (HBD) bezeichnet. Innerhalb dieser Region konnten drei Sequenzabschnitte identifiziert werden die eine Heparin-Bindungsaktivität aufweisen (AS 22-29 ARKGSRR, AS 79-84 MKKTRG, AS 170-189 TRDKLASIARLRIAKGVNDNF) (Elzie and Murphy-Ullrich, 2004). Es wird vermutet, dass die drei Heparin-Bindungs-Sequenzen kooperativ an der Heparin-Bindung beteiligt sind. Die HBD besteht hauptsächlich aus basischen Aminosäuren und scheint damit verantwortlich für die ladungsabhängige Bindung von Sulfatiden zu sein. Heparansulfat-Proteoglykane sind verantwortlich für eine Bindung von TSP1 auf der apikalen Oberfläche von vaskulären Endothelzellen (Feitsma *et al.*, 2000). In einem Komplex mit Proteoglykanen konnten keine signifikanten Konformationsänderungen des gesamten TSP1-Moleküls beobachtet werden (Tan *et al.*, 2006). Im TSPN konnten verschiedene Bindungsstellen für die β_1 -Integrine $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_6\beta_1$ lokalisiert werden. Die AS 190-201 binden $\alpha_3\beta_1$ -Integrine auf Endothelzellen (Elzie and Murphy-Ullrich, 2004). An den globulären Bereich schließt sich die sogenannte Prokollagen-Domäne an, die für die Oligomerisierung der TSP1-Monomere zu einem durch Disulfidbrücken verbundenen TSP1-Trimer verantwortlich ist. Daran schließt sich die Properdin-ähnliche Domäne mit sechs Typ 1 Wiederholungen an. Diese Typ 1 Wiederholungen besitzen Bindungsstellen für CD36, Kollagen V, Fibronectin, Laminin und Heparansulfat-Proteoglykane.

Die anschließenden Typ 2 Wiederholungen, aufgrund ihrer Homologie zum epidermal growth factor auch EGF-ähnliche Domäne genannt, werden dem C-Terminus zugeordnet und haben Bindungsstellen für Plasminogen, Fibrinogen und β_1 -Integrine. Die sieben Typ 3 Wiederholungen binden vor allem Calcium-Ionen aber auch $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrine. Die Bindung von Calcium-Ionen ist besonders charakteristisch für das TSP1 Protein. Die Calcium-Bindung induziert starke Konformationsänderungen in den hoch konservierten Typ 3 Wiederholungen, welche die physikalischen Eigenschaften und die Zellanheftungsaktivität des ganzen Moleküls beeinflussen (Lawler and Hynes, 1986). Der siebte Abschnitt der Typ 3 Wiederholungen enthält eine konservierte RGD-Sequenz, ein Bindungsmotiv für Integrine, an das $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrine gebunden werden. In der globulären C-terminalen Domäne (GCT) konnten Bindungsstellen für CD47 (auch IAP, integrin-associated protein) identifiziert werden (Adams, 2004; Grimbert *et al.*, 2006; Isenberg *et al.*, 2006).

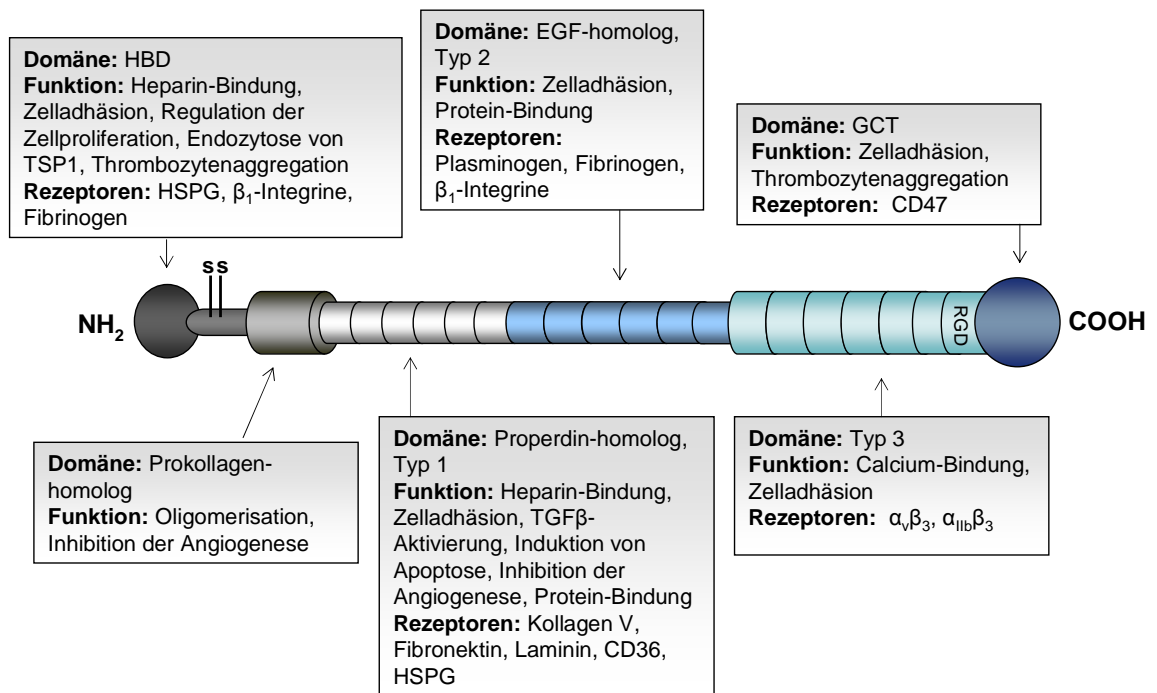


Abb. 5: Struktur, Funktion und Rezeptoren der Domänen von Thrombospondin-1. Grau gefärbt ist der N-terminale Bereich, der C-terminale Bereich ist blau gefärbt. HBD: Heparin-Bindungs-Domäne, HSPG: Heparansulfat-Proteoglykane, EGF: epidermal-growth-factor, GCT: Globuläre-C-terminale-Domäne.

Funktionelle Aspekte der TSP1 Interaktion mit Matrixmolekülen

Das weit verbreitete Vorkommen von TSP1 und seine vielfachen Bindungseigenschaften sind bereits Hinweise auf seine komplexen funktionellen Eigenschaften. TSP1 wird im Körper von verschiedenen Zelltypen gebildet und in die extrazelluläre Matrix abgegeben. Neben Thrombozyten, den Hauptproduzenten, die es als Antwort auf eine Thrombin-Aktivierung sekretieren wird TSP1 aber auch von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen (DCs) und verschiedenen anderen nichthämatopoetischen Zellen gebildet (Jaffe *et al.*, 1982). Eine wichtige Funktion scheint TSP1 in der Angiogenese auszuüben, einem Prozess, der sowohl bei der normalen Proliferation von Geweben als auch bei pathologischen Ereignissen wie Krebs eine wichtige Rolle spielt. Eine Angiogenese wird durch Interaktionen von Endothelzellen mit Wachstumsfaktoren und ECM-Proteinen entweder stimuliert oder inhibiert. Dem TSP1-Molekül konnte hierbei durch die Interaktion mit CD36 und β_1 -Integrinen eine hauptsächlich anti-angiogenesische Wirkung zugeschrieben werden. Diese Wirkung konnte dadurch begründet werden, dass die Bindung der Typ 1-Sequenz-Wiederholungen im TSP1-Molekül an CD36 und β_1 -Integrine in einer Induktion einer

Signalkaskade resultiert, die eine Apoptose von Endothelzellen und damit letztlich eine Blutgefäßneubildung verhindert (Armstrong and Bornstein, 2003; Short *et al.*, 2005). In den meisten Fällen konnte der anti-angiogenetische Effekt des TSP1 in einem Karzinom-Modell durch eine Verringerung der Zahl und Größe der Blutgefäße nachgewiesen werden (Bleuel *et al.*, 1999). In Tumoren konnte aber umgekehrt auch eine pro-angiogenetische Eigenschaft des TSP1 beobachtet werden, hauptsächlich vermittelt durch den N-Terminus des Moleküls (Elzie and Murphy-Ullrich, 2004).

2.9. Zielsetzung der Arbeit

Ausgehend von der Tatsache, dass der humanpathogene Erreger *S. pneumoniae* während der Infektion verschiedene Wirtsoberflächen besiedeln und invadieren kann, sollte die Adhärenz und Invasion als bedeutende Form der Erreger-Wirts-Interaktion näher charakterisiert werden. Dabei sollte zunächst die Frage geklärt werden, ob das im menschlichen Körper weit verbreitete Protein TSP1 mit den Pneumokokken interagieren kann. Es sollte getestet werden, ob eine mögliche Interaktion der Pneumokokken mit TSP1 bei Adhärenz- und Invasionsprozessen eine Rolle spielt, d.h. ob TSP1 eine Adhärenz und Invasion von Pneumokokken an bzw. in humane Zellen beeinflusst. Das Studium dieser möglichen Interaktion soll durch Charakterisierung der beteiligten Strukturen zu einer Aufklärung des bakteriellen Adhäsins und zu einer Identifizierung des zellulären Rezeptors auf der Wirtszellseite führen. Weiterhin sollte die physiologische Rolle des TSP1 in Infektionsprozessen durch *ex vivo* Studien aufgeklärt werden. Letztlich sollen die Untersuchungen zu einem besseren Verständnis der Pathogenese von Infektionen durch *S. pneumoniae* beitragen.

3. Ergebnisse

3.1. Interaktion von *S. pneumoniae* mit Thrombospondin-1

Bei der Analyse der Interaktion von *S. pneumoniae* mit TSP1 wurde getestet, ob Pneumokokken an verschiedene physiologisch vorliegende Konformationen des Glykoproteins TSP1 binden können. Da Blutplättchen auf eine Aktivierung mit einer Ausschüttung verschiedener Proteine, darunter TSP1 als mengenmäßig häufigstes Protein, antworten, wurde zunächst eine mögliche Bindung von Pneumokokken an Blutplättchen untersucht.

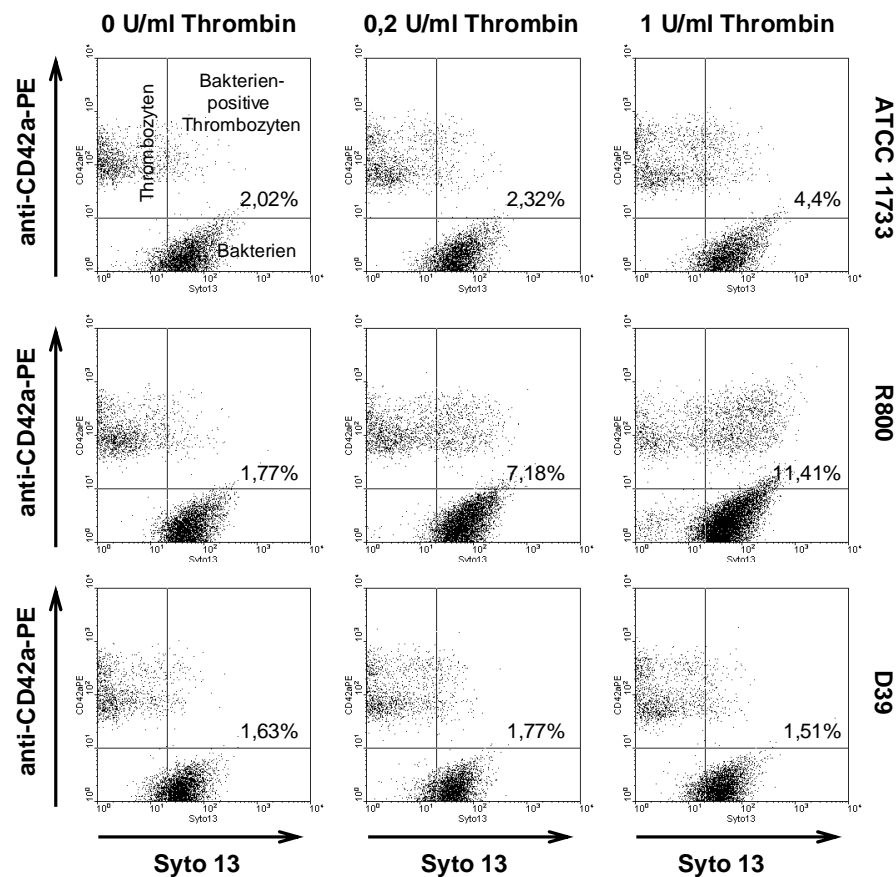
3.1.1. Thrombospondin-1 vermittelt eine Adhäsion von *S. pneumoniae* an Blutplättchen

Thrombozyten wurden mit aufsteigender Thrombin-Konzentration aktiviert um zu testen, ob *S. pneumoniae* an Blutplättchen adhären kann. Eine Thrombin-Aktivierung induziert die Sekretion verschiedener Proteine, die in den α -Granula der Thrombozyten gespeichert sind. Anschließend wurden die Thrombozyten mit verschiedenen *S. pneumoniae*-Stämmen inkubiert. Es wurde geprüft, ob *S. pneumoniae* an Blutplättchen adhären kann, die mit verschiedenen Konzentrationen Thrombin aktiviert wurden. Dazu wurden der schwach bekapselte *S. pneumoniae* Serotyp 2 Stamm ATCC 11733, der unbekapselte Stamm *S.p.* R800 und der bekapselte *S.p.* Serotyp 2 Stamm D39 auf eine Bindung an Blutplättchen (Assoziatformation) getestet. Der prozentuale Anteil der Bakterien-positiven Thrombozyten wurde mittels der Durchflusszytometrie bestimmt. In der Durchflusszytometrie konnte eine deutliche Assoziatformation zwischen *S. pneumoniae* (*S.p.*) und aktivierten Thrombozyten nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die beobachtete Assoziatformation abhängig von der eingesetzten Menge an Thrombin war. Zusätzlich konnte ein Einfluss des Kapselpolysaccharids auf die Interaktion von den Bakterien mit den Thrombozyten nachgewiesen werden (**Abb. 6**). Der unbekapselte *S.p.* R800 zeigte dabei die höchste Assoziatformation mit 11% Bakterien-positiver Thrombozyten. Bindungsversuche mit dem schwach bekapselten *S.p.* ATCC 11733 zeigten eine Adhärenz der Bakterien an die Thrombozyten von 5%. Der stark bekapselte *S.p.* D39 wies maximal 1,8% Bakterien-positiver Thrombozyten auf (**Abb. 6**). In früheren Studien konnte bereits derselbe Aktivierungs-

abhängige Prozess bei der Interaktion zwischen *S. aureus* und Thrombozyten beobachtet werden (Niemann *et al.*, 2004). Dabei wurde gezeigt, dass insbesondere lösliches Fibrin und verschiedene Proteine aus den α -Granula der Thrombozyten, an dieser Assoziatformation beteiligt sind. Vor allem das Glykoprotein TSP1 trug zu einer Verstärkung der Assoziatformation durch eine Komplexbildung mit Fibrin bei. Daher wurde in weiteren Versuchen untersucht, ob und wie TSP1 eine Adhäsion von *S. pneumoniae* an die Oberfläche von Thrombin-aktivierten Blutplättchen vermittelt.

Es wurde getestet, ob das bei einer Thrombin-Aktivierung der Blutplättchen ausgeschüttete TSP1 von *S. pneumoniae* gebunden werden kann. Mit Hilfe eines anti-TSP1 Antikörpers wurde eine Beteiligung des TSP1 an der Adhärenz von Pneumokokken an aktivierte Thrombozyten getestet. Frisch isolierte Blutplättchen wurden mit Thrombin aktiviert und der Proteinüberstand gewonnen. TSP1 konnte im Proteinüberstand in hoher Konzentration nachgewiesen werden (**Abb. 7**). Die folgenden Versuche wurden vor allem mit dem schwach bekapselten Laborstamm *S.p.* NCTC 10319, einem Serotyp 35A, durchgeführt. Aufsteigende Verdünnungen des sekretierten Proteinüberstandes wurden mit dem Stamm *S.p.* NCTC 10319 inkubiert. Das aus dem sekretierten Überstand an die Pneumokokken gebundene TSP1 wurde mit einem anti-TSP1 Antikörper und einem sekundären Fluorochrom-gekoppelten Antikörper markiert. Durchflusszytometrische Analysen zeigten eine konzentrationsabhängige Rekrutierung des TSP1 aus dem Proteinüberstand durch die Pneumokokken (**Abb. 7**).

A



B

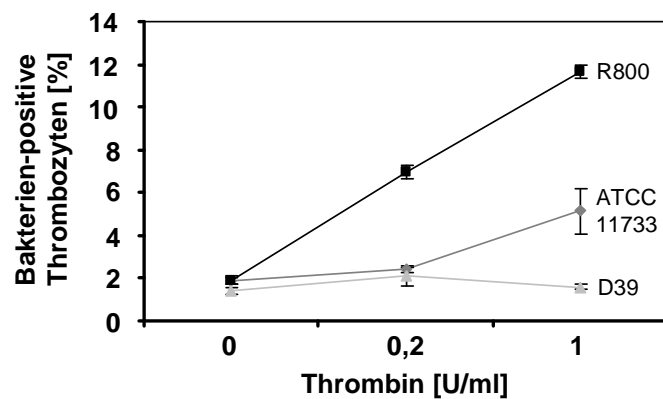
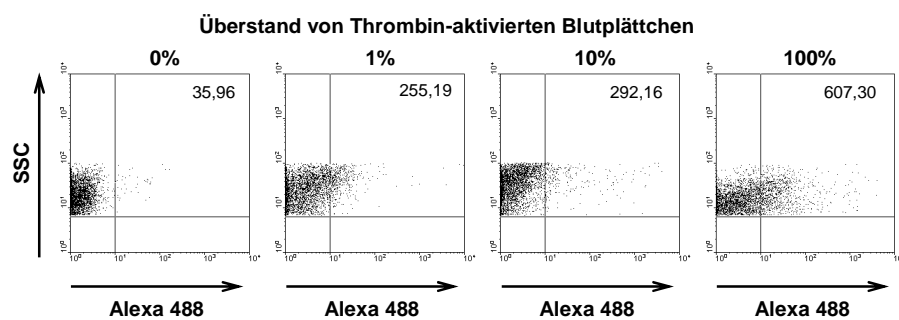


Abb. 6: Bindung von *S. pneumoniae* an Blutplättchen in Abhängigkeit der Thrombin-Aktivierung. **A**, Repräsentative Punktwolkendiagramme: Bindungsversuche wurden mit den Syto 13 markierten *S. pneumoniae*-Stämmen ATCC 11733, R800 und D39 an anti-CD42a-PE markierte Blutplättchen bei steigender Thrombin-Aktivierung der Blutplättchen durchgeführt. Die Assoziatformation (in %) wurde durch durchflusszytometrische Analysen quantifiziert. **B**, Eine Thrombin-Aktivierung erhöht konzentrationsabhängig die Bindung des schwach bekapselten ATCC 11733 und des unbekapselten R800, aber nicht die des stark bekapselten D39 an aktivierte Blutplättchen. Die Assoziatformation wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt.

<i>S. pneumoniae</i>	Thrombin [U/ml]		
	0	0,2	1
ATCC 11733	1,9 ± 0,17	2,4 ± 0,1	5,1 ± 1,0
R800	1,9 ± 0,2	7,0 ± 0,3	11,6 ± 0,3
D39	1,41 ± 0,19	2,1 ± 0,4	1,6 ± 0,1

Tab. 2: Bindung von *S. pneumoniae* an Blutplättchen in Abhängigkeit der Thrombin-Aktivierung. Assoziatformation (Bakterien-positive Thrombozyten in %) verschiedener *S. pneumoniae*-Stämme mit Thrombozyten.

A



B

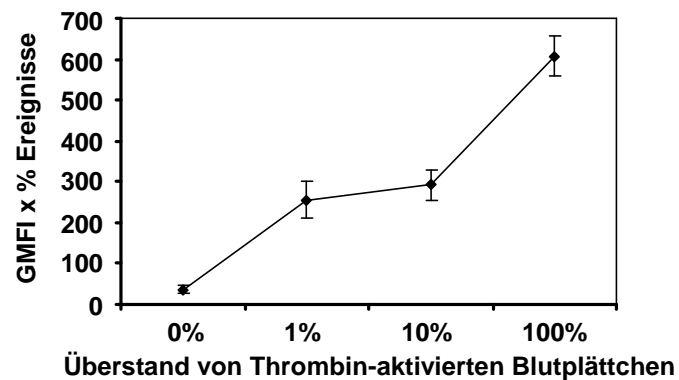


Abb. 7: Bindung von TSP1 aus Thrombin-aktivierten Blutplättchen an *S. pneumoniae*. *S. pneumoniae* NCTC 10319 wurde mit verschiedenen Mengen des Proteinüberstandes aus Thrombin-aktivierten Blutplättchen inkubiert. Die Proteinmenge, welche aus 1×10^5 Thrombin-aktivierten Blutplättchen ausgeschüttet wurde, wurde als 100% (in 200 μ l) definiert. **A**, Repräsentative Punktwolkendiagramme der Bindungsversuche von *S. pneumoniae* NCTC 10319 an Thrombin-aktivierte Blutplättchen. Eine Bindung wurde durch einen monoklonalen anti-TSP1 Antikörper und einen sekundären anti-Maus Alexa 488 Antikörper detektiert. **B**, Konzentrationsabhängige Rekrutierung von TSP1 aus dem Proteinüberstand von Thrombin-aktivierten Blutplättchen durch *S. pneumoniae* NCTC 10319.

sekretierter Überstand [%]	GMFI x % Ereignisse
0	35,97 ± 10,54
1	255,20 ± 44,48
10	292,16 ± 37,50
100	607,30 ± 48,15

Tab. 3: Bindung von TSP1 aus Thrombin-aktivierten Blutplättchen an *S. pneumoniae* NCTC 10319. Die Proteinmenge, welche aus 1×10^5 Thrombin-aktivierten Blutplättchen ausgeschüttet wurde, wurde als 100% (in 200 μ l) definiert.

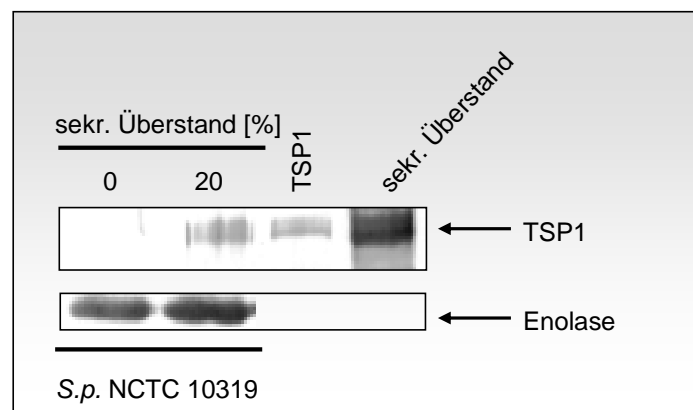


Abb. 8: Immunblot-Analyse der Bindung von TSP1 an *S. pneumoniae* NCTC 10319 aus dem Proteinüberstand von Thrombin-aktivierten Blutplättchen. *S. pneumoniae* wurde mit 0 bzw. 20% des sekretierten TSP1 enthaltenden Proteinüberstandes aktivierter Thrombozyten inkubiert. TSP1 wurde durch den monoklonalen anti-TSP1 Antikörper und einen sekundären Peroxidase-gekoppelten anti-Maus Antikörper detektiert. Die Enolase der Pneumokokken diente als Ladekontrolle und wurde durch einen polyklonalen anti-Enolase Antikörper und einen sekundären Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen Antikörper detektiert. TSP1: 2 μ g aufgereinigtes humanes TSP1; sekr. Überstand: 15 μ l sekretierter Überstand aus Thrombin-aktivierten Blutplättchen.

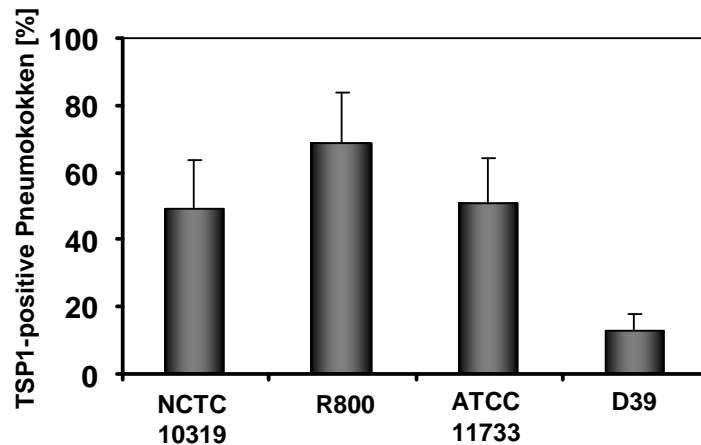
Die Bindung von *S. pneumoniae* an lösliches TSP1 wurde auch im Immunblot getestet (**Abb. 8**). Dafür wurde *S.p.* NCTC 10319 mit 40 μ l (entsprechen 20% des Gesamtvolumens) des sekretierten Proteinüberstandes aus Thrombin-aktivierten Thrombozyten inkubiert. Im Immunblot wurden Gesamtzelllysate der inkubierten Pneumokokken auf eine TSP1-Bindung aus dem Proteinüberstand untersucht. Als Negativkontrolle wurden Bakterienlysate von Pneumokokken verwendet, die nicht mit dem Proteinüberstand aus aktivierten Blutplättchen inkubiert wurden. Als Positivkontrollen wurden der Proteinüberstand aus Thrombin-aktivierten Thrombozyten sowie aufgereinigtes TSP1 Protein verwendet. Die Bakterienlysate

wurden in einem 8%igen SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran im Immunblot mit einem TSP1 spezifischen monoklonalen Antikörper nachgewiesen. Das Enolase-Protein der Pneumokokken diente als Ladekontrolle. Die Rekrutierung des TSP1 durch *S. pneumoniae* konnte durch eine TSP1-spezifische Proteinbande bei 180 kDa eindeutig nachgewiesen werden (**Abb. 8**).

3.1.2. Einfluss des bakteriellen Kapselpolysaccharids auf die Interaktion von *S. pneumoniae* mit löslichem Thrombospondin-1

Die Untersuchungen zur Assoziatformation verschiedener *S. pneumoniae*-Serotypen und Thrombozyten zeigten, dass die Bindungsaktivitäten der getesteten Pneumokokkenstämme unterschiedlich waren. Die Unterschiede in der Assoziatformation zwischen Blutplättchen und *S. pneumoniae* wurden insbesondere zwischen Stämmen mit unterschiedlichen Mengen an Kapselpolysaccharid festgestellt. Für den schwach bekapselten Stamm *S.p.* NCTC 10319 konnte eine Rekrutierung von löslichem TSP1 aus Thrombin-aktivierten Blutplättchen nachgewiesen werden. Da TSP1 nur eines von vielen Proteinen ist, welches als Antwort auf eine Aktivierung von den Thrombozyten sekretiert wird, konnte bisher eine eventuell indirekte Bindung der Pneumokokken an TSP1 nicht ausgeschlossen werden. Im Folgenden wurden die Pneumokokken daher auf eine direkte Interaktion mit löslichem TSP1 getestet. Zusätzlich sollte der Einfluss der Kapsel auf die Bindung von TSP1 untersucht werden. Dafür wurden verschiedene Pneumokokkenserotypen in der Durchflusszytometrie auf eine TSP1-Bindung analysiert. Im Vergleich mit dem schwach bekapselten Serotyp 35A (*S.p.* NCTC 10319) wurde der unbekapselte R800, der schwach bekapselte ATCC 11733 Serotyp 2 und der Stamm D39, ein stark bekapselter Serotyp 2, untersucht. Die Stämme wurden mit FITC-markiertem TSP1 inkubiert und anschließend durch durchflusszytometrische Analysen auf TSP1-positive Pneumokokken getestet. Die Ergebnisse zeigten eine TSP1-Bindung für alle getesteten Stämme. Dabei zeigte der unbekapselte R800 die höchsten und der stark bekapselte D39 die niedrigsten Bindungswerte für TSP1 (**Abb. 9A**). Die spezifische Bindung von TSP1 an Pneumokokken wurde auch mit radioaktiv markiertem TSP1 bestätigt (**Abb. 9B**). Das iodidierte TSP1 wurde mit *S. pneumoniae* inkubiert und anschließend der Anteil radioaktiv markierter Pneumokokken bestimmt. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte weiterhin eine Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von löslichem TSP1 an *S. pneumoniae* NCTC 10319 nachgewiesen werden (**Abb. 10**), was auf eine Spezifität dieser Interaktion hindeutete.

A



B

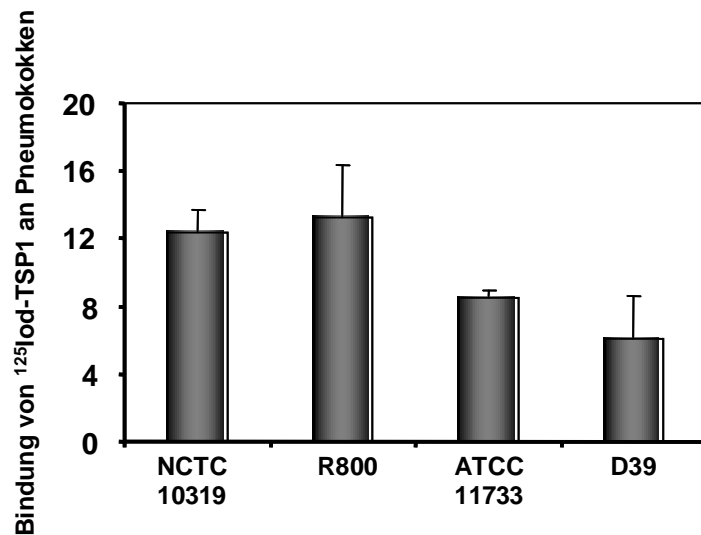


Abb. 9: Einfluss des Kapselpolysaccharids auf die Interaktion von *S. pneumoniae* mit löslichem TSP1. Bindungsversuche wurden mit dem schwach bekapselten *S.p.* NCTC 10319 (Serotyp 35A), dem unbekapselten R800, dem schwach bekapselten *S.p.* ATCC 11733 (Serotyp 2) und dem stark bekapselten D39 (Serotyp 2) durchgeführt. **A**, Bindung von 10 µg FITC-markiertem, löslichem TSP1 an *S. pneumoniae*. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. **B**, Bindung von ¹²⁵Iod-markiertem TSP1 an *S. pneumoniae*. Im Bindungsversuch wurden 100 000 cpm radioaktives TSP1 (100%) eingesetzt.

<i>S. pneumoniae</i>	TSP1-positive Pneumokokken [%]	Bindung von ¹²⁵ I-TSP1 an Pneumokokken [%]
NCTC 10319	49,11 ± 14,52	12,37 ± 1,33
R800	68,47 ± 15,43	13,28 ± 3,13
ATCC 11733	50,64 ± 13,47	8,45 ± 0,44
D39	12,70 ± 5,18	6,04 ± 2,60

Tab. 4: Einfluss des Kapselpolysaccharids auf die Interaktion von *S. pneumoniae* mit löslichem TSP1. Die Bindungsversuche wurden sowohl mit löslichem, FITC-markiertem TSP1 als auch mit ¹²⁵Iod-markiertem TSP1 durchgeführt.

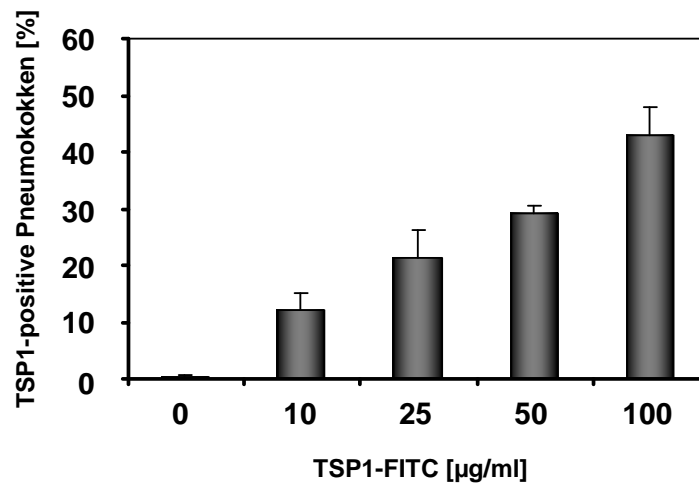


Abb. 10: Konzentrationsabhängige Bindung von löslichem TSP1 an *S. pneumoniae*. Der Bindungsversuch wurde mit *S.p.* NCTC 10319 und aufsteigenden TSP1-Konzentrationen durchgeführt. Die Bindungswerte wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt.

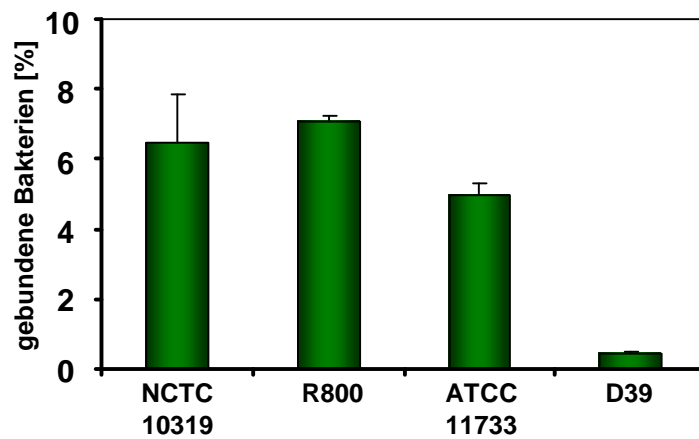
TSP1 [µg/ml]	TSP1-positive <i>S. pneumoniae</i> [%]
0	0,37 ± 0,44
10	12,00 ± 3,00
25	21,16 ± 5,15
50	29,27 ± 1,16
100	43,10 ± 4,88

Tab. 5: Konzentrationsabhängige Bindung von löslichem TSP1 an *S. pneumoniae*. Bindungswerte in % von FITC-markiertem, löslichem TSP1 an *S. pneumoniae* NCTC 10319.

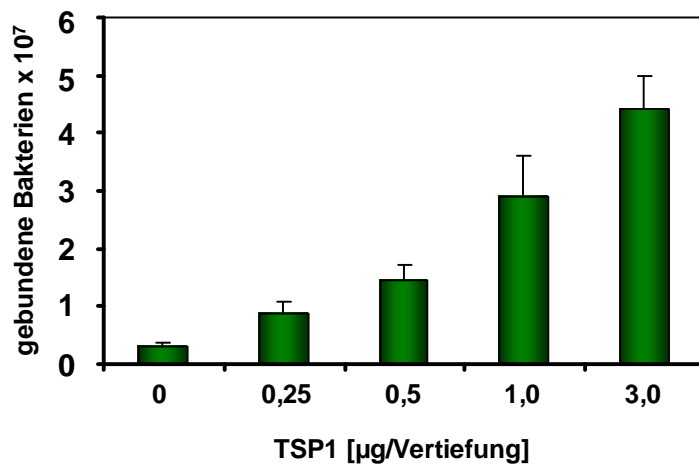
3.1.3. Einfluss des bakteriellen Kapselpolysaccharids auf die Interaktion von *S. pneumoniae* mit immobilisiertem Thrombospondin-1

Die Versuche mit löslichem TSP1 zeigten eine direkte Interaktion zwischen der löslichen Form des TSP1 und verschiedenen Pneumokokkenserotypen und Stämmen. Physiologisch kann das Glykoprotein TSP1 auch immobilisiert, z.B. auf der Oberfläche von Epithel-, Endothelzellen oder Thrombozyten vorliegen. Deshalb wurde im nächsten Schritt untersucht, ob Pneumokokken auch an die immobilisierte Form des TSP1 binden können. Dafür wurden 3 µg TSP1 auf einer Plastikoberfläche immobilisiert und mit den FITC-markierten Pneumokokkenstämmen, wie in den vorherigen Versuchen mit dem löslichem TSP1, inkubiert. Anschließend wurde die Bindung der FITC-markierten Pneumokokken an das immobilisierte TSP1 im Fluoroscan gemessen. Ebenso wie für das lösliche TSP1 konnte bis auf den Stamm D39 eine Bindung für die getesteten Stämme nachgewiesen werden. Dabei zeigte der unkapselte R800 eine leicht erhöhte Bindung gegenüber dem schwach bekapselten Serotyp 35A (NCTC 10319) und dem ebenfalls schwach bekapselten Serotyp 2 (ATCC 11733). Der stark bekapselte D39 (Serotyp 2) zeigte keine Bindung an immobilisiertes TSP1 (**Abb. 11A**). Diese Ergebnisse stimmen mit den Bindungsaktivitäten für lösliches TSP1 überein. Weitere Bindungsversuche und Fluoreszenzaufnahmen des FITC-markierten *S.p.* NCTC 10319 bestätigten zusätzlich eine konzentrationsabhängige Bindung an die immobilisierte Konformation des TSP1 (**Abb. 11B und C**).

A



B



C

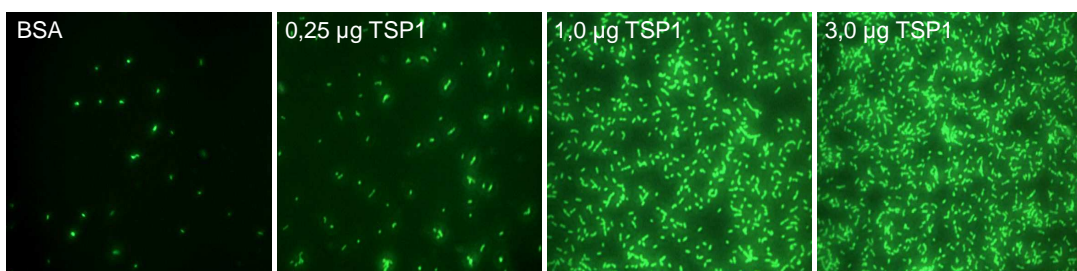


Abb. 11: Einfluss des Kapselpolysaccharids auf die Interaktion von *S. pneumoniae* mit immobilisiertem TSP1.

A, Untersucht wurde die Bindung des schwach bekapselten Stammes NCTC 10319, des unbekapselten R800, des schwach bekapselten *S.p.* ATCC 11733 (Serotyp 2) und des stark bekapselten D39 (Serotyp 2) an 3 µg immobilisiertes TSP1. Die Messung erfolgte im Fluoroscanner bei 485 nm/538 nm (Anregung/Emission). **B,** Die TSP1-Bindung von *S.p.* NCTC 10319 ist abhängig von der Konzentration des immobilisierten TSP1. **C,** Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der TSP1-Bindung von *S.p.* NCTC 10319 (Serotyp 35A) an immobilisiertes TSP1. Verschiedene Mengen TSP1 wurden in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte (96-well) immobilisiert.

<i>S. pneumoniae</i>	an TSP1 gebundene <i>S. pneumoniae</i> [%]
NCTC 10319	6,44 ± 1,41
R800	7,07 ± 0,15
ATCC 11733	4,98 ± 0,34
D39	0,47 ± 0,04

Tab. 6: Einfluss des Kapselpolysaccharids auf die Interaktion von *S. pneumoniae* mit immobilisiertem TSP1. Bindung von FITC-markierten *S. pneumoniae*-Stämmen an immobilisiertes TSP1 (3 µg).

TSP1 [µg/Vertiefung]	an TSP1 gebundene <i>S. pneumoniae</i> x 10 ⁷
0	0,31 ± 0,06
0,25	0,88 ± 0,20
0,5	1,46 ± 0,27
1,0	2,89 ± 0,73
3,0	4,43 ± 0,55

Tab. 7: Die Bindung von FITC-markierten *S. pneumoniae* an immobilisiertes TSP1 ist konzentrationsabhängig.

3.1.4. Herstellung einer kapsellosen Mutante von *S. pneumoniae* D39

Die Kapsel von *S. pneumoniae* repräsentiert einen der wichtigsten Virulenzfaktoren der Pneumokokken (AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995). In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Kapsel die Anheftung und damit die Adhärenz und die Invasion von Pneumokokken an Epithel- und Endothelzellen verhindert. Interessanterweise konnte jedoch beobachtet werden, dass die Pneumokokken im Verlauf einer Infektion die Menge von Kapselpolysaccharid modulieren und somit eine erfolgreiche Adhärenz an das Wirtszellgewebe garantieren können (Hammerschmidt *et al.*, 2005; Weiser *et al.*, 1994).

Dass die Kapsel auch bei der Interaktion von Pneumokokken mit TSP1 eine Rolle spielt, zeigten die Bindungsversuche mit löslichem und immobilisiertem TSP1. Die Ergebnisse zeigten jeweils eine erhöhte Bindungsaktivität für TSP1 an unkapselte Stämme und eine niedrige Bindungsaktivität für TSP1 der stark kapselnden Stämme (**Abb. 9 und 11**). Eine Kapselmutante D39Δ*cps* des stark kapselnden D39 wurde hergestellt, um den spezifischen Einfluss der Kapsel bei der Interaktion von Pneumokokken mit TSP1 zu beschreiben.

In der bereits vorhandenen kapsellosen Mutante Tigr4Δ*cps* (erhalten von F. Ianelli, Siena) wurde der Kapsellokus deletiert und enthielt ein Kanamycin-Resistenzgen. Dieses wurde über

eine PCR zusammen mit den flankierenden DNA-Sequenzen der benachbarten Gene *dexB* und *aliA* amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde anschließend zur Transformation des Stammes D39 verwendet und Kanamycin-resistente Transformanten auf Kanamycin-haltigen Blutagarplatten selektioniert. Eine spezifische Integration des linearen DNA-Fragments über homologe Rekombination wurde in der Southern-Analyse mit *HindIII* geschnittener chromosomaler DNA mittels einer *dexB*-spezifischen DNA-Sonde überprüft (**Abb. 12**). Die *dexB*-DNA Sonde wurde mit den Primern *dexBF2* und *dex19F* revers in der PCR amplifiziert. Als Kontrolle diente der isogene Wildtyp D39, sowie auch die Kapselmutante des Stammes TIGR4 Δ *cps*. Die erhaltenen Transformanten mit einer Deletion des Kapsellokus 1 (PN 111.1) und 2 (PN111.2) wurden zur Serotypisierung zum Nationalen Referenzzentrum für Streptokokken (Prof. Reinert, Aachen) geschickt (**Tab. 8**). Durch die fehlende Reaktion mit dem typspezifischen Antiserum konnte die vollständige Deletion der Kapsel von D39 für die Transformanten PN 111.1 und einer weiteren Mutante PN 111.2 bestätigt werden. Die kapsellose Mutante wurde als D39 Δ *cps* bezeichnet.

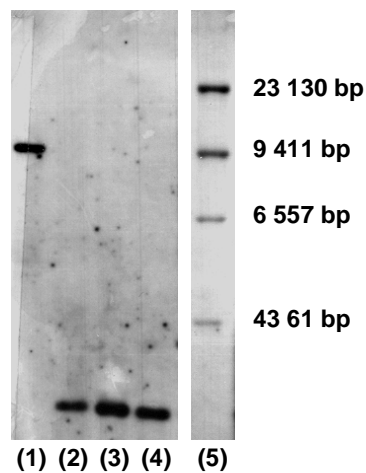


Abb. 12: Southern-Blot Analyse der Kapselgenlokus Deletion. Chromosomale DNA der Stämme D39 (Spur 1), TIGR4 Δ *cps* (Spur 2), sowie der Kanamycin-resistenten Transformanten (Spur 3 und 4) wurde mit dem Restriktionsenzym *HindIII* gespalten und nach Agarose-Gelelektrophorese und Southern-Blot mit einer *dexB*-spezifischen-Sonde hybridisiert.

Stamm	Optochin	Oxacillin	Galle-Löslichkeit	Serotyp
TIGR4 Δ cps (PN107)	sensibel	sensibel	positiv	nicht typisierbar
D39 (P 165)	resistent	sensibel	positiv	2
D39 Δ cps (PN 111.1)	resistent	sensibel	positiv	nicht typisierbar
D39 Δ cps (PN 111.2)	resistent	sensibel	positiv	nicht typisierbar

Tab. 8: Ergebnis der Serotypisierung der Transformanten PN 111.1 und PN 111.2 im Nationalen Referenzzentrum für Streptokokken (Prof. Reinert, Aachen). Die Transformanten zeigten in spezifischen Tests zur Charakterisierung von *S. pneumoniae* dieselben Eigenschaften wie der D39 Wildtypstamm. Nicht typisierbar bedeutet: keine positive Reaktion mit dem typspezifischen Antiserum, d.h. keine erkennbare Kapsel vorhanden.

3.1.5. Einfluss der Polysaccharidkapsel auf die Interaktion von *S. pneumoniae* mit Thrombospondin-1

Der Einfluss des Kapselpolysaccharids auf die Interaktion mit TSP1 wurde in Bindungsversuchen sowohl mit löslichem und auch mit immobilisiertem TSP1 getestet. Dazu wurden der Wildtyp D39 und die isogene kapsellose Mutante D39 Δ cps verwendet und in verschiedenen Bindungsstudien auf eine Interaktion mit löslichem und immobilisiertem TSP1 getestet. In der Durchflusszytometrie konnte eine konzentrationsabhängige Bindung des *S. pneumoniae* NCTC 10319 (Serotyp 35A), des D39 (Serotyp 2) und der unbekapselten Mutante D39 Δ cps an aufgereinigtes und FITC-markiertes lösliches TSP1 nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigten eine deutlich erhöhte TSP1-Bindung für die unbekapselte Mutante des D39 im Vergleich zum isogenen Wildtyp D39. Die Bindung von löslichem TSP1 an D39 Δ cps war sogar um ungefähr 100% höher als die an schwach bekapselte Pneumokokken NCTC 10319 (**Abb. 13**).

Bindungsstudien mit immobilisiertem TSP1 bestätigten die schwache Bindung des Stammes D39 und die im Gegensatz dazu stark erhöhte Bindung der isogenen Kapselmutante an TSP1. Zusätzlich zum *S.p.* NCTC 10319, D39 und der isogenen Kapselmutante D39 Δ cps wurde die Bindung des TIGR 4 (Serotyp 4) und seiner isogenen Kapselmutante TIGR4 Δ cps getestet. Die TSP1-Bindungsaktivität der Kapselmutanten war im Vergleich zu den bekapselten Wildtyp-Stämmen um mehr als das 50-fache erhöht (**Abb. 14**).

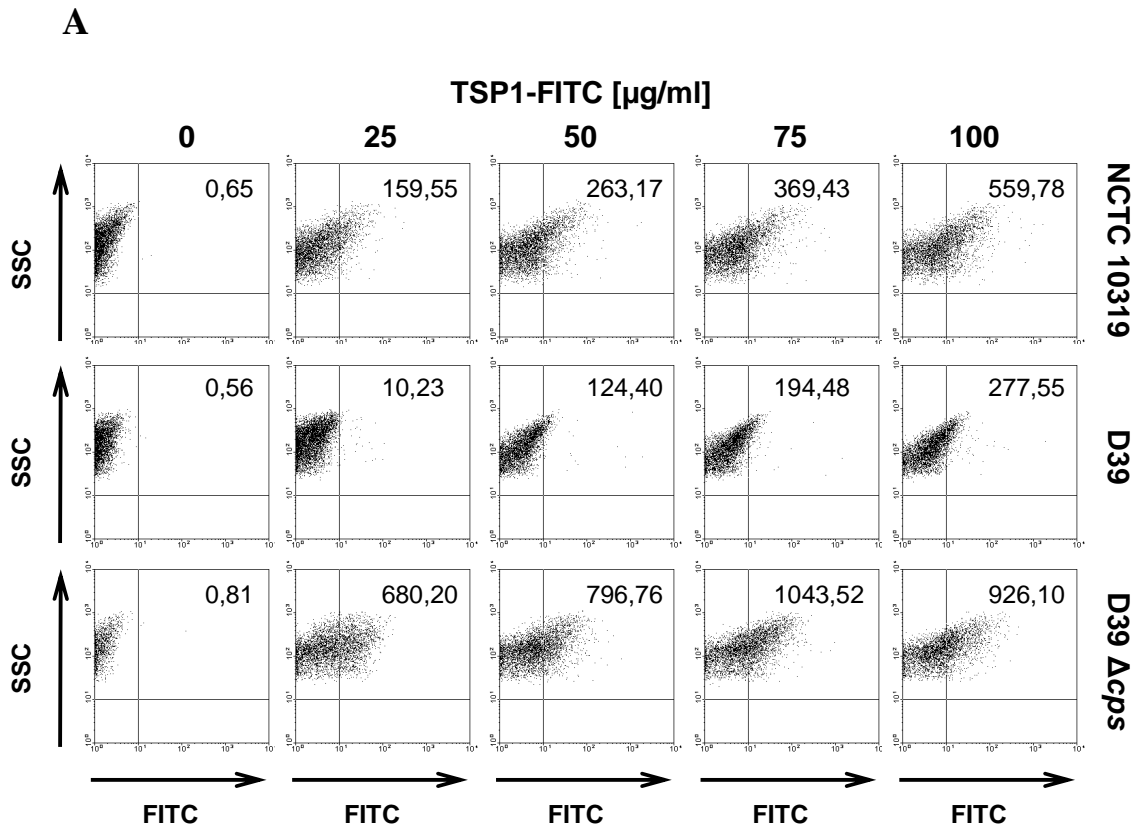
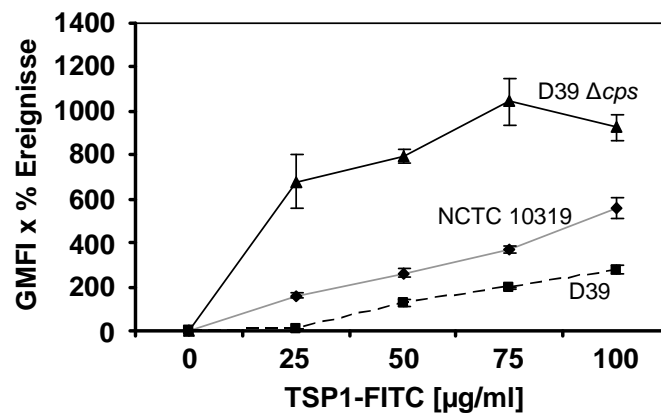
**B**

Abb. 13: Einfluss des Kapselpolysaccharids auf die Bindung von löslichem TSP1 an *S. pneumoniae*. **A**, Repräsentative Punktwolkendiagramme der durchflusszytometrischen Bindungsversuche von *S. pneumoniae* NCTC 10319 (Serotyp 35A), vom D39 (Serotyp 2) und von der Kapselmutante D39 Δcps mit FITC-markiertem löslichem TSP1. SSC (side scatter): Maß für die Granularität der analysierten Bakterienzellen **B**, Die Bindungsversuche mit *S. pneumoniae* und FITC-markiertem, löslichem TSP1 zeigten hohe konzentrationsabhängige Bindungswerte für die Kapseldeletionsmutante D39 Δcps , niedrigere Bindungswerte für den schwach bekapselten *S.p.* NCTC 10319 (Serotyp 35A) und eine sehr geringe Bindung für den stark bekapselten D39 (Serotyp 2).

TSP1-FITC [$\mu\text{g/ml}$]	<i>S. pneumoniae</i>		
	NCTC 10319	D39 GMFI x Ereignisse	D39 Δcps
0	0,65 \pm 0,20	0,56 \pm 0,28	0,81 \pm 0,45
25	159,55 \pm 12,51	10,23 \pm 1,29	680,20 \pm 121,41
50	263,17 \pm 19,40	124,40 \pm 14,60	796,76 \pm 30,61
75	369,43 \pm 17,03	194,48 \pm 5,75	1043,52 \pm 108,59
100	559,78 \pm 48,92	277,55 \pm 19,42	926,10 \pm 57,86

Tab. 9: Einfluss des Kapselpolysaccharids auf die Bindung von löslichem TSP1 an *S. pneumoniae*. Bindungswerte (GMFI x Ereignisse) von löslichem, FITC-markiertem TSP1 an *S. pneumoniae* NCTC 10319, D39 und D39 Δcps .

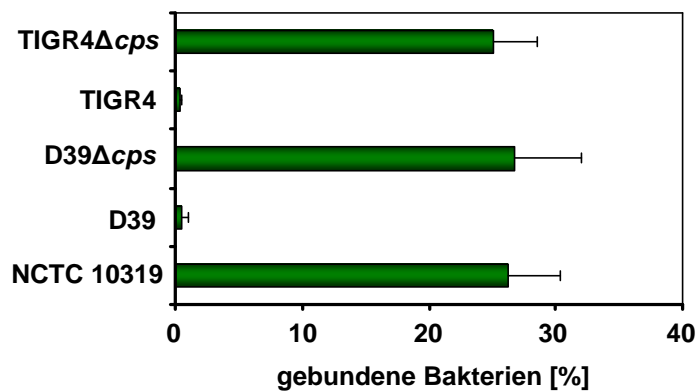


Abb. 14: Einfluss der Pneumokokken-Kapsel auf die Interaktion von *S. pneumoniae* mit immobilisiertem TSP1. Bindungsversuche mit *S. pneumoniae* an 3 μg immobilisiertes TSP1 zeigten eine Bindung für den schwach bekapselten *S.p.* NCTC 10319 (Serotyp 35A), und eine signifikant erhöhte Bindung für die Kapselmutanten D39 Δcps und TIGR4 Δcps im Vergleich zu den stark bekapselten Wildtypen D39 (Serotyp 2) und TIGR4 (Serotyp 4).

<i>S. pneumoniae</i>	gebundene <i>S. pneumoniae</i> [%]
NCTC 10319	26,29 \pm 4,01
D39	0,55 \pm 0,49
D39 Δcps	26,71 \pm 5,26
TIGR4	0,42 \pm 0,13
TIGR4 Δcps	25,05 \pm 3,54

Tab. 10: Einfluss der Pneumokokken-Kapsel auf die Interaktion von *S. pneumoniae* mit immobilisiertem TSP1. Bindungswerte von *S.p.* NCTC 10319, D39, der isogenen Mutante D39 Δcps , TIGR4 und TIGR4 Δcps an 3 μg immobilisiertes TSP1 pro Kavität einer 96-well Mikrotiterplatte.

Für die Stämme *S.p.* NCTC 10319, D39 und D39 Δ *cps* wurden zusätzlich TSP1-Bindungsstudien mit aufsteigenden TSP1-Konzentrationen durchgeführt. Eine Konzentrationsabhängigkeit konnte für *S.p.* NCTC 10319 und für D39 Δ *cps*, nicht jedoch für den bekapselten D39 nachgewiesen werden (**Abb. 15**).

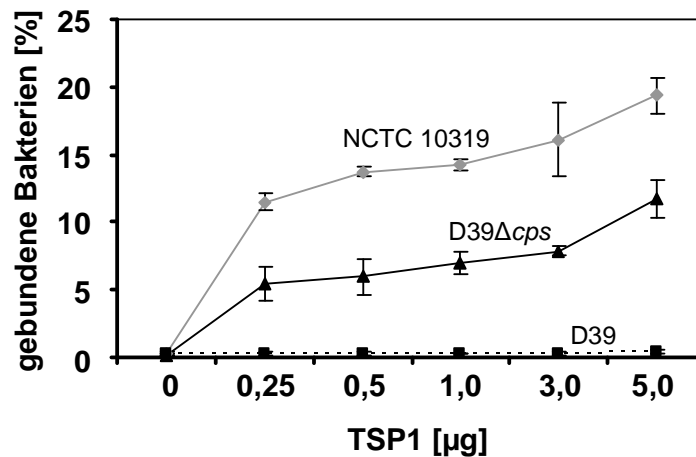


Abb. 15: Einfluss der bakteriellen Kapsel auf die Interaktion von *S. pneumoniae* mit immobilisiertem TSP1. Bindungsversuche von *S. pneumoniae* an immobilisiertes TSP1 zeigten hohe Bindungswerte für den schwach bekapselten *S.p.* NCTC 10319 (Serotyp 35A), niedrigere Bindungswerte für die Kapselmutante D39 Δ *cps* und keine Bindung für den stark bekapselten D39 (Serotyp 2).

immobilisiertes TSP1 [μg]	<i>S. pneumoniae</i>		
	NCTC 10319	D39	D39 Δ <i>cps</i>
	gebundene Bakterien [%]		
0	0,27 ± 0,1	0,22 ± 0,09	0,18 ± 0,11
0,25	11,49 ± 0,65	0,31 ± 0,13	5,42 ± 1,28
0,5	13,73 ± 0,32	0,30 ± 0,12	5,98 ± 1,33
1	14,23 ± 0,36	0,30 ± 0,05	6,95 ± 0,84
3	16,10 ± 2,7	0,30 ± 0,14	7,88 ± 0,37
5	19,36 ± 1,28	0,43 ± 0,17	11,75 ± 1,38

Tab. 11: Einfluss der bakteriellen Kapsel auf die Interaktion von *S. pneumoniae* mit immobilisiertem TSP1. Bindungswerte von *S.p.* NCTC 10319, vom D39 und von der Kapselmutante an aufsteigende Mengen immobilisiertes TSP1.

3.2. Thrombospondin-1 vermittelt eine Adhärenz und Invasion an und in humane Wirtszellen

Die Bindungsversuche mit TSP1 zeigten bereits, dass *S. pneumoniae* sowohl mit der löslichen wie auch mit der immobilisierten Form des TSP1 direkt interagieren kann. Es sollte untersucht werden, ob die Interaktion zwischen *S. pneumoniae* und TSP1 auch einen funktionellen Aspekt hat, TSP1 als Brückenmolekül zwischen humanen Wirtszellen und Pneumokokken fungieren und die bakterielle Adhärenz vermitteln kann. *In vitro* Infektionsversuche wurden durchgeführt, um den Einfluss von TSP1 auf eine Adhärenz und Invasion zu analysieren. Die Infektionen wurden vor allem mit der Pneumolysin-negativen Mutante *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* durchgeführt, um eine Pneumolysin-induzierte zytolytische und zytotoxische Schädigung der Wirtszellen zu vermeiden. Im Anschluss an die Infektion von verschiedenen Zelllinien wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung durchgeführt, um die Anzahl adhäsiver und invasiver Bakterien bestimmen zu können. Durch das Auszählen der zelladhärenten bzw. -invasiven Bakterien konnte das adhäsive und invasive Potential der Pneumokokken quantifiziert werden. Die Immunfluoreszenzfärbung ermöglicht eine Unterscheidung zwischen extrazellulär-adhärenenten (Überlagerung von grünem und rotem Farbstoff: gelbe Kokken) und intrazellulär-invasiven (Markierung mit rotem Farbstoff: rote Kokken) Mikroorganismen. Die Quantifizierung der adhärenenten und invasiven Pneumokokken erfolgte mikroskopisch durch Auszählen von 50 Wirtszellen.

3.2.1. Die Thrombospondin-1 vermittelte Adhärenz ist abhängig von der Konformation des TSP1-Moleküls

Zunächst mussten verschiedene Parameter etabliert werden, um den Einfluss von TSP1 auf eine bakterielle Adhärenz und Invasion untersuchen zu können. Für die Infektionen in der Zellkultur wurde zunächst untersucht, wie die Präinkubation mit TSP1 durchgeführt werden musste, welche TSP1-Konzentration optimal war und wie lange die Infektionsdauer sein musste.

Es wurde gezeigt, dass eine Präinkubation der Bakterien mit TSP1 und eine anschließende Infektion von HEP-2 Zellen mit den TSP1 präinkubierten Bakterien die Adhärenz nicht signifikant erhöhen konnte. Weiterhin war keine gesteigerte Adhärenz in Anwesenheit von TSP1 im Infektionsansatz bei einer Infektion mit dem Stamm *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* zu erkennen. Im Gegensatz dazu führte die 30-minütige Präinkubation der Wirtszellen mit TSP1 und das Entfernen des ungebundenen überschüssigen TSP1 bei einer Infektion mit

Pneumokokken zu einer 7-fach gesteigerten Adhärenz an die epithelialen Wirtszellen HEp-2 im Vergleich zu unbehandelten HEp-2 Wirtszellen (Abb. 16).

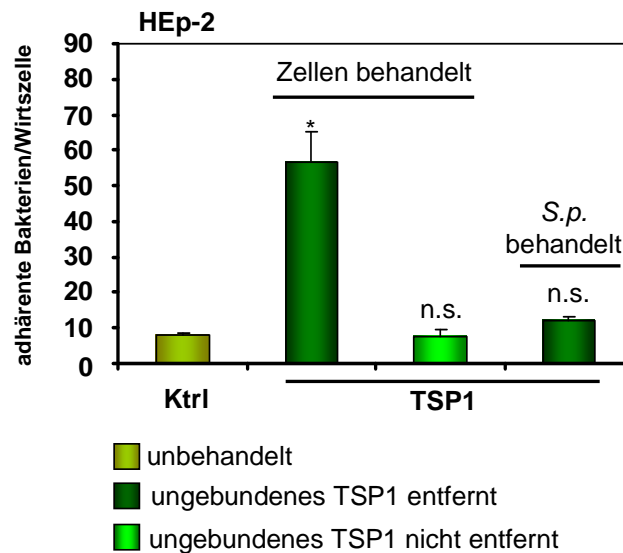


Abb. 16: Einfluss der TSP1 Konformation auf die Adhärenz von *S. pneumoniae* NCTC 10319 an humane HEp-2 Epithelzellen. Ungebundenes TSP1 entfernt: HEp-2 Zellen wurden mit 3 µg TSP1 für 30 min inkubiert und vor der Infektion entfernt, bzw. 1×10^9 Bakterien wurden mit 3 µg TSP1 inkubiert, anschließend gewaschen und die HEp-2 Epithelzellen mit den präinkubierten Bakterien infiziert; ungebundenes TSP1 nicht entfernt: HEp-2 Zellen wurden mit 3 µg TSP1 für 30 min inkubiert und vor der Infektion mit *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* (Serotyp 35A) nicht entfernt; unbehandelte Kontrolle (Ktrl), Infektion der unbehandelten Wirtszellen mit *S. pneumoniae* NCTC 10319 in Abwesenheit von TSP1. Die Zahl adhärenter Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt. Ein *p*-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant (*) angesehen (n.s.: nicht signifikant).

Die Bindungsversuche mit Thrombozyten zeigten, dass Pneumokokken sekretiertes TSP1 aus Thrombin-aktivierten Blutplättchen rekrutieren können (siehe Kapitel 3.1.1). Es wurde getestet, ob *S. pneumoniae* den sekretierten Proteinüberstand aus einer Thrombin-Aktivierung des Blutplättchenkonzentrats für eine Anheftung an HEp-2 Wirtszellen, ähnlich der Vermittlung durch aufgereinigtes TSP1, nutzen kann. *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* wurde mit 50 µl (entspricht Proteinüberstand aus $2,5 \times 10^4$ Thrombozyten) des Proteinüberstandes aus Thrombin-aktivierten Blutplättchen inkubiert und danach gewaschen. Anschließend wurden HEp-2 Wirtszellen mit den vorbehandelten Bakterien infiziert. Ähnlich der TSP1 vermittelten Infektion konnte im Vergleich zu unbehandelten Bakterien keine erhöhte Adhärenz an die

Wirtszellen für mit dem Proteinüberstand inkubierte Bakterien nachgewiesen werden. Ebenso wurde die Adhärenz von *S. pneumoniae* NCTC 10319 in Anwesenheit von 50 μ l Proteinüberstand aus Thrombin-aktivierten Thrombozyten in der Infektion nicht erhöht. Eine 30-minütige Präinkubation der Epithelzellen mit dem Proteinüberstand aus Thrombin-aktivierten Thrombozyten und einem anschließenden Entfernen der ungebundenen Proteine konnte in der Infektion mit *S. pneumoniae* eine um das 5-fache gesteigerte Adhärenz der Pneumokokken an die Wirtszellen bewirken (**Abb. 17**).

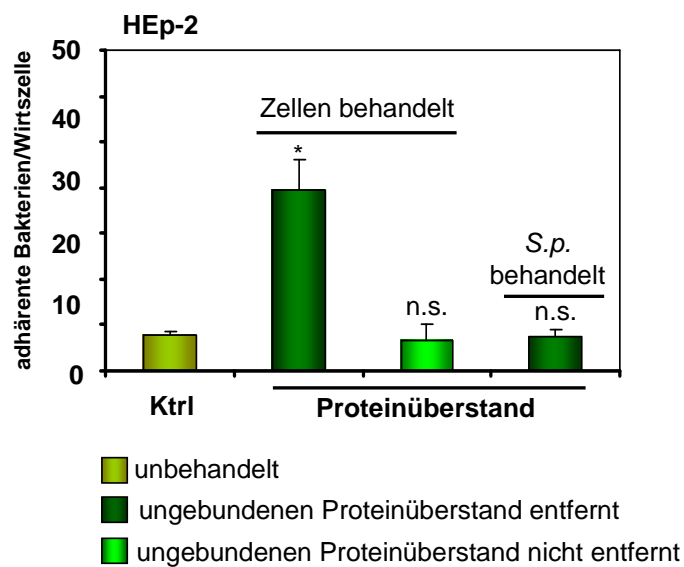


Abb. 17: Einfluss des sekretierten Proteinüberstandes aus Thrombin-aktivierten Thrombozyten auf die Adhärenz von *S. pneumoniae* NCTC 10319 an humane HEp-2 Epithelzellen. Ungebundenen Proteinüberstand entfernt: HEp-2 Zellen wurden mit 50 μ l (aus $2,5 \times 10^4$ Thrombozyten) Proteinüberstand für 30 min inkubiert und vor der Infektion entfernt, bzw. 1×10^9 Bakterien wurden mit 50 μ l Proteinüberstande aus Thrombin-aktivierten Blutplättchen inkubiert, anschließend gewaschen und die HEp-2 Epithelzellen mit den präinkubierten Bakterien infiziert; ungebundenen Proteinüberstand nicht entfernt: HEp-2 Zellen wurden mit 50 μ l Proteinüberstand für 30 min inkubiert und vor der Infektion nicht entfernt; unbehandelte Kontrolle (Ktrl): Infektion der Wirtszellen mit *S. pneumoniae* NCTC 10319 in Abwesenheit des Proteinüberstandes aus Thrombin-aktivierten Thrombozyten. Die Zahl adhärenter Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt. Ein p -Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant (*) angesehen (n.s.: nicht signifikant).

		Kontrolle	Protein entfernt	Protein nicht entfernt	Bakterien mit Protein inkubiert
adhärente Bakterien pro Wirtszelle	TSP1 [$\mu\text{g/ml}$]	6,68 \pm 0,91	56,55 \pm 8,91	7,73 \pm 2,02	12,1 \pm 0,88
adhärente Bakterien pro Wirtszelle	Thrombozyten-Protein-Sekretom [50 $\mu\text{l/ml}$]	7,85 \pm 0,78	39,52 \pm 6,61	6,72 \pm 3,56	7,3 \pm 1,70

Tab. 12: Einfluss der TSP1 Konformation auf die Adhärenz von *S. pneumoniae* NCTC 10319 an humane HEp-2 Epithelzellen. Anzahl der adhärenen Bakterien pro Wirtszelle nach einer 3-stündigen Infektion von HEp-2 Epithelzellen mit *S.p.* NCTC 10319 Δ ply. Die Infektion erfolgte in An- bzw. Abwesenheit von TSP1 oder sekretiertem Proteinüberstand aus Thrombozyten, jeweils auch mit bzw. ohne Entfernen der ungebundenen Proteine nach der Präinkubation. In einem weiteren Ansatz wurden die Bakterien vor der Infektion mit Wirtsproteinen präinkubiert. TSP1: 3 $\mu\text{g/ml}$ TSP1; Thrombozyten-Protein-Sekretom (Proteinüberstand): 50 $\mu\text{l/ml}$ sekretierter Proteinüberstand aus Thrombin-aktivierten Blutplättchen. Die Zahl adhärenen Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt.

In Infektionsversuchen wurde gezeigt, dass nur die Präinkubation der Wirtszellen mit TSP1 bzw. mit dem Thrombozyten-Protein-Sekretom und ein anschließender Waschschrift zu einer signifikant erhöhten Adhärenz der Pneumokokken an die Epithelzellen führte. Bei allen folgenden Infektionsversuchen wurde dementsprechend das TSP1 durch Präinkubation der Zellen auf den Wirtszellen immobilisiert und ungebundenes überschüssiges Protein vor der Infektion entfernt.

3.2.2. Untersuchungen zum Einfluss von Thrombospondin-1 auf die Adhärenz von *S. pneumoniae* an humane Wirtszellen

Für die Infektionsexperimente musste zunächst eine optimale TSP1 Dosis gefunden werden bei der die Adhärenz der Bakterien ausgewertet werden konnte. Außerdem musste darauf geachtet werden, dass die eingesetzte TSP1-Konzentration ungefähr der physiologischen Konzentration (200 ng/ml-200 $\mu\text{g/ml}$ TSP1 in humanem Serum) entsprach und diese nicht deutlich überstieg.

Zunächst wurden verschiedene Konzentrationen von TSP1 auf HEp-2 Epithelzellen immobilisiert. Durch durchflusszytometrische Versuche wurde die Bindung von löslichem TSP1 an humane Wirtszellen überprüft. Dafür wurden 2×10^5 Zellen Detroit 562, A549, HEp-2 und HBMEC mit 25 μg , 50 μg , 75 μg und 100 $\mu\text{g/ml}$ TSP1-FITC inkubiert und im

Durchflusszytometer bezüglich einer TSP1-Bindung analysiert. Die Ergebnisse aus der durchflusszytometrischen Analyse zeigten insgesamt eine dosisabhängige Bindung von löslichem TSP1 an die getesteten Wirtszellen (**Abb. 18**). Dabei wurde eine vergleichsweise höhere Bindung von löslichem TSP1 an die Epithelzelllinien HEp-2, Detroit 562 und A549 als an die Endothelzelllinie HBMEC festgestellt.

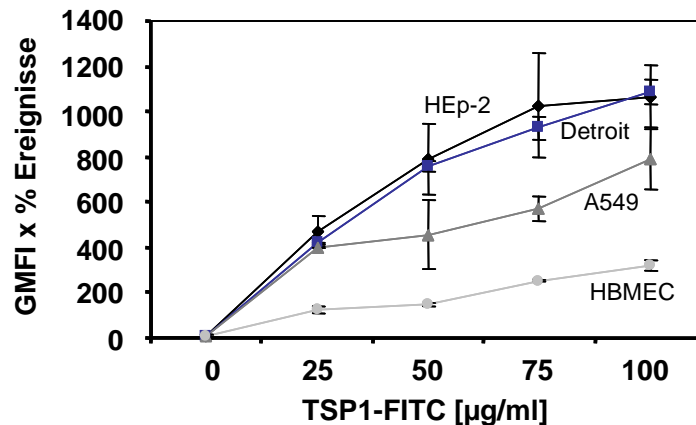


Abb. 18: Nachweis von zellgebundenem TSP1 auf verschiedenen Wirtszelllinien. Es wurde die Immobilisierung von löslichem, FITC-markiertem TSP1 an verschiedene Wirtszelllinien analysiert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte in einem FACSCalibur™ (Becton Dickinson).

TSP1-FITC [µg/ml]	HEp-2	Detroit 562	A549	HBMEC
	GMFI x % Ereignisse			
0	5,47 ± 1,16	6,00 ± 2,95	8,68 ± 8,33	8,93 ± 8,69
25	472,32 ± 69,59	419,46 ± 1,36	402,78 ± 5,33	25,03 ± 14,30
50	791,55 ± 157,79	758,19 ± 20,65	456,41 ± 151,80	48,90 ± 9,35
75	1027,29 ± 229,33	927,08 ± 48,48	570,92 ± 57,38	54,09 ± 4,55
100	1065,29 ± 140,45	1090,19 ± 54,51	792,94 ± 134,52	119,11 ± 23,24

Tab. 13: Nachweis von zellgebundenem TSP1 auf verschiedenen Wirtszelllinien. Die Bindungswerte sind das Produkt aus der geometrischen mittleren Fluoreszenzintensität und den eingegrenzten positiven Ereignissen (GMFI x Ereignisse).

In Zellkulturinfektionsexperimenten wurde die optimale TSP1 Dosis für eine Infektion ermittelt. Dafür wurden die Wirtszellen mit 0,25 µg, 0,5 µg, 1 µg, 3 µg, 5 µg und 10 µg/ml TSP1 inkubiert, überschüssiges TSP1 wurde nach 30 min entfernt und die HEp-2 Zellen wurden mit 5×10^6 Bakterien für 3 Stunden im Brutschrank bei 37°C mit *S. pneumoniae*

NCTC 10319 infiziert. Die Anzahl der adhärenen Pneumokokken wurde nach der Infektion und Doppelimmunfluoreszenzfärbung am Fluoreszenzmikroskop quantitativ bestimmt. Die Präinkubation von HEp-2 Zellen mit verschiedenen Mengen an TSP1 zeigte, dass Pneumokokken in Abhängigkeit von der TSP1-Konzentration an die Zellen adhärten. Dabei konnte mit 10 µg TSP pro 1 ml Infektionsmedium eine Sättigung der Anzahl adhärenen Pneumokokken noch nicht erreicht werden (**Abb. 19**). Die TSP1 vermittelte Adhärenz von *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* an HEp-2 Wirtszellen war bei 3 µg/ml TSP1 im Versuchsansatz um das 4-fache gegenüber nicht mit TSP1 präinkubierten HEp-2 Zellen erhöht. Die Wirtszellen wurden in den nachfolgenden Versuchen vor der Infektion mit jeweils 3 µg/ml TSP1 präinkubiert

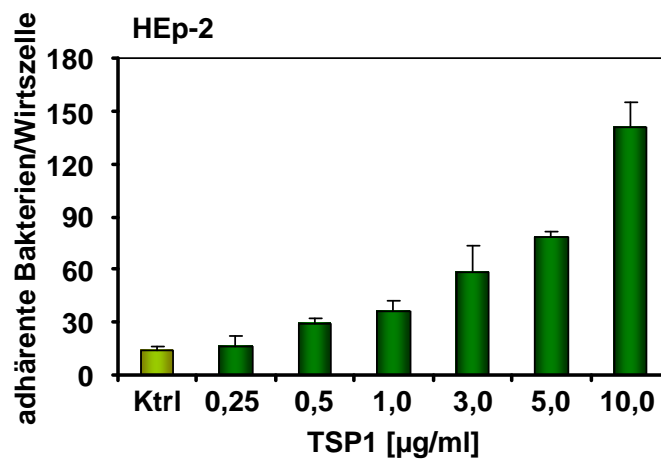


Abb. 19: Die Adhärenz von Pneumokokken ist abhängig von der TSP1-Konzentration. Die Anzahl adhärenen Bakterien pro Wirtszelle nach der Infektion von humanen Larynx-Karzinomzellen (HEp-2) mit *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* (Serotyp 35A) nahm mit aufsteigender Konzentration von zellgebundenem TSP1 zu. Die Zahl adhärenen Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt.

	TSP1 [µg/ml]						
	0	0,25	0,5	1,0	3,0	5,0	10,0
adhärente Bakterien pro Wirtszelle	14,3 ± 2,2	16,3 ± 5,6	29,4 ± 3,1	36,2 ± 6,4	58,0 ± 15,8	78,3 ± 3,3	140,9 ± 14,4

Tab. 14: Die Adhärenz von Pneumokokken ist abhängig von der TSP1 Konzentration. Anzahl adhärenen Bakterien pro Wirtszelle nach einer 3-stündigen Infektion von HEp-2 Epithelzellen mit *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply*. Die HEp-2 Zellen wurden vor der Infektion mit aufsteigenden Mengen TSP1 präinkubiert. Die Zahl adhärenen Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt.

Nachdem eine geeignete TSP1-Konzentration für die Infektionsversuche gefunden war, sollte die optimale Infektionsdauer bestimmt werden. Die Infektionszeit durfte nicht zu kurz sein, dass nur geringfügige Unterschiede zwischen der TSP1 unabhängigen und der TSP1 vermittelten Infektion erwartet werden könnten. Andererseits sollte die Infektionszeit nicht zu lange ausfallen, da eine massive Adhärenz das Auszählen unmöglich machen würde. Des Weiteren musste darauf geachtet werden, dass die Wirtszellen durch die langen Infektionszeiten nicht geschädigt werden. Um nun die Kinetik der TSP1 vermittelten Adhärenz zu untersuchen, wurden die Wirtszellen mit bzw. ohne 3 µg/ml TSP1 präinkubiert. Anschließend wurden die Epithelzellen für verschieden lange Zeiten mit *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* infiziert. Bereits nach 30 min konnte ein signifikanter Unterschied in der Anzahl adhärenter *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* pro HEp-2-Zelle in Anwesenheit von zellgebundenem TSP1 im Vergleich zu unbehandelten Wirtszellen beobachtet werden. Nach 3 Stunden war der relative Unterschied zwischen unbehandelten und TSP1 behandelten Zellen am höchsten (**Abb. 20**). Zu diesem Zeitpunkt konnte keine visuelle Schädigung der Wirtszellen beobachtet werden (**Abb. 21**). Daher wurden die Infektionsversuche zur Aufklärung der Mechanismen der TSP1 vermittelten Adhärenz von Pneumokokken an eukaryontische Zellen wenn nicht anders angegeben mit einer Infektionsdauer von 3 h durchgeführt.

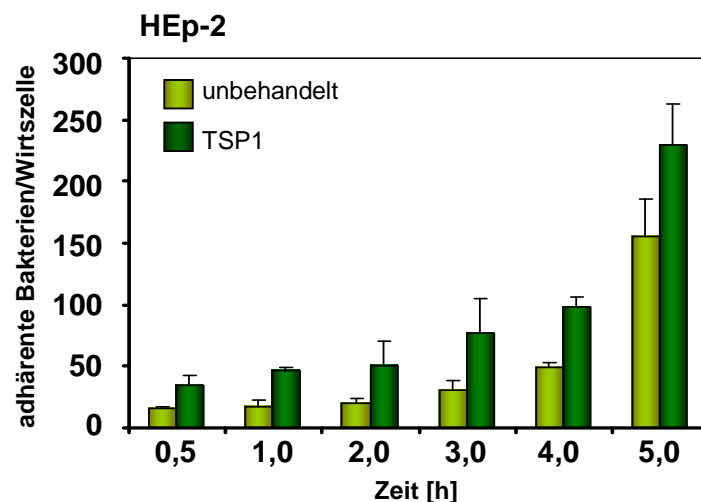


Abb. 20: Die Adhärenz der Pneumokokken an humane Wirtszellen ist abhängig von der Infektionsdauer. Die TSP1 unabhängige und abhängige Adhärenz von *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* (Serotyp 35A) an humane Larynx-Karzinomzellen (HEp-2) ist zeitabhängig und nimmt mit steigender Infektionsdauer zu. Die Zahl adhärenter Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt.

Infektionsdauer [h]	adhärente Bakterien pro HEp-2 Epithelzelle	
	unbehandelt	TSP1
0,5	15,87 ± 1,94	34,45 ± 7,42
1	17,8 ± 5,37	47,03 ± 1,52
2	20,57 ± 3,27	49,8 ± 20,15
3	30,59 ± 8,20	76,37 ± 28,72
4	49,0 ± 4,52	98,27 ± 7,76
5	155,43 ± 29,99	229,2 ± 34,07

Tab. 15: Die Adhärenz der Pneumokokken an humane Wirtszellen ist abhängig von der Infektionsdauer. Anzahl adhärenter Bakterien nach der Infektion von HEp-2 Zellen mit *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* bei ansteigender Infektionsdauer. Die Zahl adhärenter Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt.

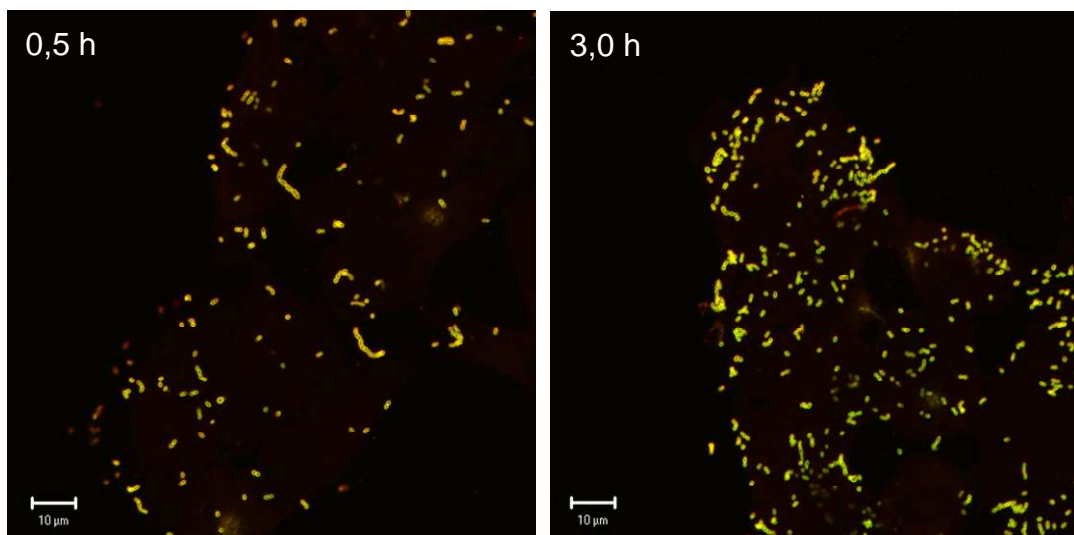
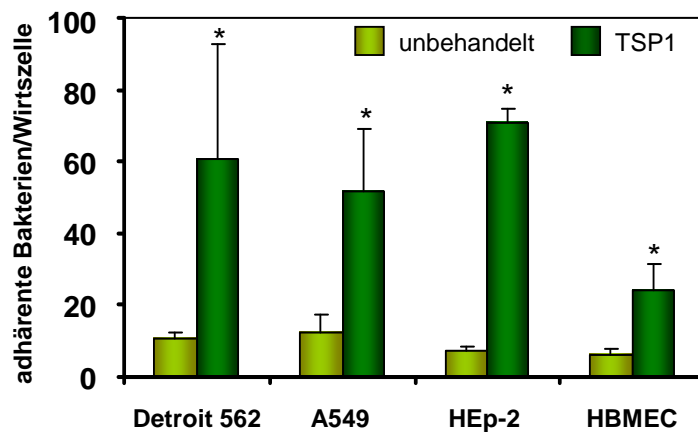


Abb. 21: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der TSP1 vermittelten Adhärenz von *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* (Serotyp 35A) an HEp-2 Epithelzellen. Die Infektionsdauer betrug 0,5 h bzw. 3 h.

3.2.3. Die Thrombospondin-1 vermittelte Adhärenz und Invasion von Pneumokokken ist ein zellunspezifischer Mechanismus

Die verschiedenen Parameter für die Infektionen von HEp-2 Zellen mit *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* waren etabliert, nun wurde die Rolle der Wirtsspezifität in der Interaktion zwischen *S. pneumoniae* und TSP1 bestimmt.

A



B

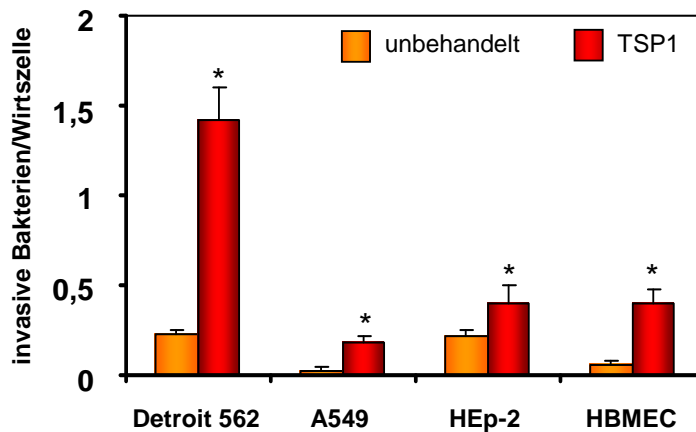


Abb. 22: Adhärenz und Invasion von *S. pneumoniae* NCTC 10319 an humane Epithelzellen und einer humanen Endothelzelllinie nach Behandlung mit TSP1. **A**, Adhärenz von *S.p.* NCTC 10319Δply (Serotyp 35A) an Detroit 562-Zellen, an humane alveoläre Lungeneithelzellen (A549), an humane Larynx-Karzinomzellen (HEp-2) und an Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (HBMEC). Die Infektionen wurden über 3 h in Abwesenheit von TSP1 (hellgrün) oder mit zellgebundenem TSP1 (3 µg/ml) (dunkelgrün) mit einer MOI von 20 durchgeführt. **B**, Invasion von *S.p.* NCTC 10319Δply (Serotyp 35A) in Detroit 562-Zellen, in humane alveoläre Lungeneithelzellen (A549), in humane Larynx-Karzinomzellen (HEp-2) und in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (HBMEC). Die Infektionen wurden über 3 h in Abwesenheit TSP1 (orange) oder mit zellgebundenem TSP1 (3 µg/ml) (rot) mit einer MOI von 20 durchgeführt. Die Zahl adhärenter und invasiver Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt. Ein *p*-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant (*) angesehen.

Die TSP1 abhängige Adhärenz und Invasion der Pneumokokken wurde dafür auf verschiedenen Zelllinien getestet. Zusätzlich zu den Infektionen mit den Larynxkarzinomzellen HEp-2 wurden nun Infektionen mit den epithelialen

Nasopharynxzellen Detroit 562, den alveolären Lungenepithelzellen A549 und den Endothelzellen aus der Blut-Hirn-Schranke, den HBMEC, durchgeführt. In der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass TSP1 nach einer Präinkubation mit diesen Zellen auf deren Oberfläche immobilisiert ist (**Abb. 18**). Es wurde geprüft, ob sich nicht nur die Adhärenz, sondern auch die Invasion der Bakterien in Anwesenheit von TSP1 erhöhte. Verschiedene Zelllinien wurden vor der Infektion mit 3 µg TSP1 je 1 ml Ansatz mit 2×10^5 Zellen für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ behandelt. Ungebundenes Protein wurde entfernt und die Wirtszellen mit *S. pneumoniae* NCTC 10319 mit einer MOI von 20 für 3 Stunden bei 37°C infiziert. Die Auswertung erfolgte nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch durch Auszählen von 50 Zellen. Die Adhärenz und Invasion von *S. pneumoniae* NCTC 10319 wurde signifikant für alle untersuchten Zelllinien durch Zugabe von 3 µg TSP1 pro Infektionsansatz gesteigert. Nach Inkubation mit TSP1 steigerte sich die Adhärenz im Vergleich zu unbehandelten Wirtszellen um mindestens 75%. Die Invasion steigerte sich dabei im Vergleich zu unbehandelten Wirtszellen um mindestens 50% (**Abb. 22**).

Zelllinie	adhärente <i>S. pneumoniae</i> pro Wirtszelle			invasive <i>S. pneumoniae</i> pro Wirtszelle		
	ohne	TSP1	<i>p</i>	ohne	TSP1	<i>p</i>
Detroit 562	10,8 ± 1,41	60,63 ± 31,85	0,019	0,23 ± 0,03	1,43 ± 0,18	0,00029
A549	12,39 ± 4,92	51,7 ± 17,36	0,019	0,03 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,00158
HEp-2	7,3 ± 1,21	70,57 ± 4,34	$1,72 \times 10^{-5}$	0,22 ± 0,03	0,4 ± 0,1	0,03799
HBMEC	6,31 ± 1,6	24,02 ± 7,36	0,0152	0,06 ± 0,03	0,40 ± 0,07	0,00133

Tab. 16: Adhärenz und Invasion von *S. pneumoniae* NCTC 10319 an und in humane Epithelzellen und einer humanen Endothelzelllinie nach Behandlung mit TSP1. Anzahl adhärenter und invasiver Bakterien pro Zelle nach Infektion von Detroit 562, A549, HEp-2 und HBMEC Zellen. Die Zellen wurden für 3 h mit *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* infiziert. Die Zahl adhärenter und invasiver Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt. Ein *p*-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

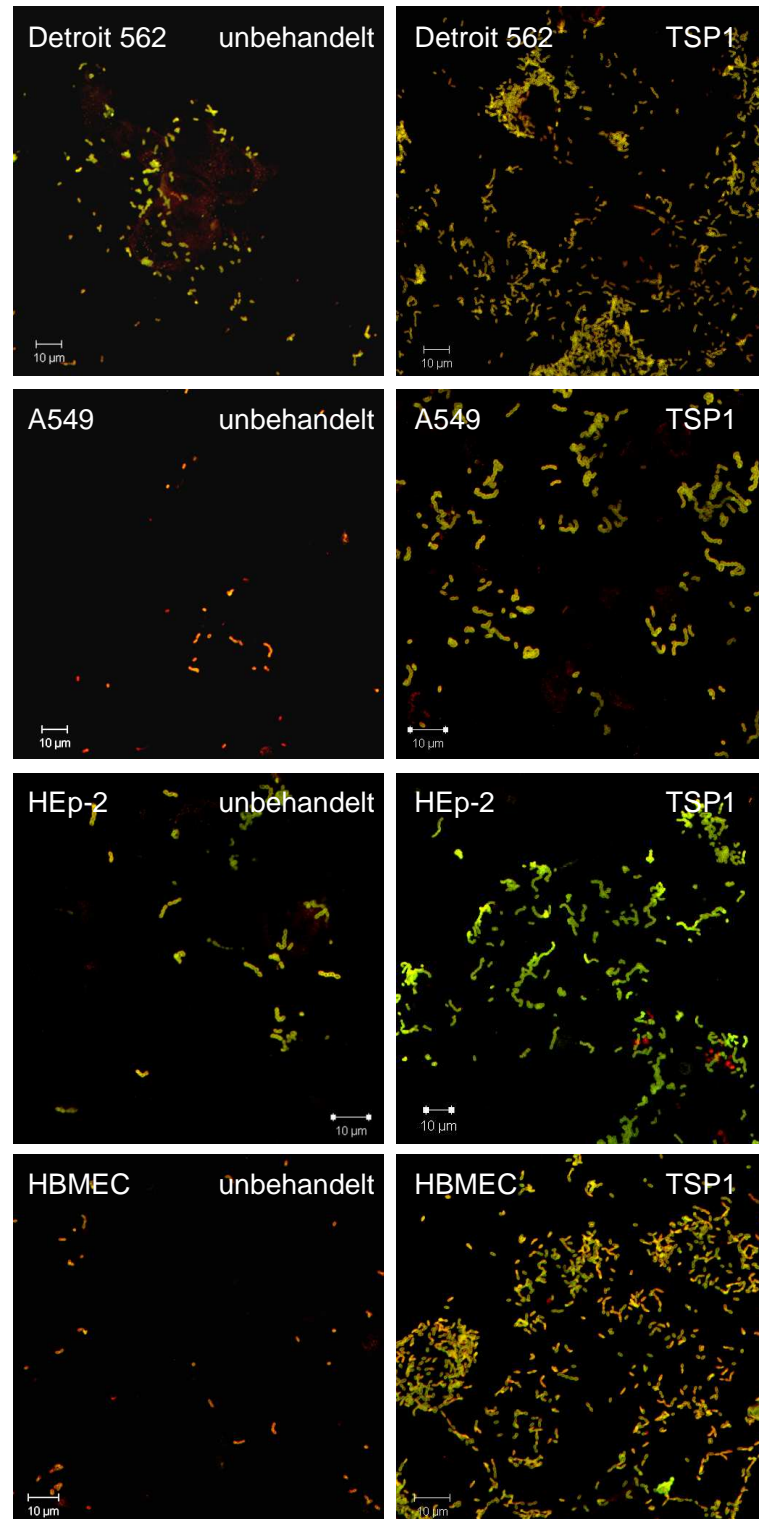


Abb. 23: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der TSP1 vermittelten bakteriellen Adhärenz an und Invasion in Epithelzelllinien (Detroit 562, A549, HEp-2) und eine Endothelzelllinie (HBMEC). Die TSP1 unabhängige Adhärenz und Invasion ist in der linken Spalte gezeigt, die der TSP1 abhängigen in der rechten Spalte. Die Wirtszellen wurden mit einer MOI von 20 mit *S.p.* NCTC 10319 für 3 h infiziert. Adhärenz Bakterien leuchten grün-gelb, invasive Bakterien leuchten rot.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, aufgenommen mit dem konfokalen Laserscanning Mikroskop, geben einen visuellen Eindruck der TSP1 vermittelten Adhärenz an und Invasion von *S. pneumoniae* in humane Wirtszellen (**Abb. 23**). Die Zahl adhärenter und invasiver Bakterien ist nach der exogenen Zugabe von TSP1 zu Detroit 562-, A549, HEp-2 und HBMEC Zellen im Vergleich zu den Infektionen ohne vorherige Behandlung mit TSP1 jeweils deutlich erhöht.

3.2.4. Einfluss des bakteriellen Kapselpolysaccharids auf die Thrombospondin-1 vermittelte Adhärenz von *S. pneumoniae* an HEp-2 Zellen

Die bisherigen Infektionsversuche wurden mit den schwach bekapselten Pneumokokken *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* durchgeführt. In Gegenwart von zellgebundenem TSP1 zeigte dieser Stamm eine deutlich gesteigerte Adhärenz an die eukaryontischen Zellen. In den Bindungsstudien mit löslichem und immobilisiertem TSP1 konnte gezeigt werden, dass sich die Bindungseigenschaften verschiedener Pneumokokkenserotypen jeweils abhängig von der Expression des Kapselpolysaccharids unterscheiden. So konnte eine verringerte Bindung an lösliches wie auch an immobilisiertes TSP1 für stark bekapselte Pneumokokken wie D39 und TIGR4 beobachtet werden. Schwach bekapselte Stämme oder Kapselmutanten zeigten eine deutlich gesteigerte Bindung an das Glykoprotein TSP1. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte angenommen werden, dass sich die unterschiedlichen Serotypen aufgrund ihrer unterschiedlichen Kapselexpression auch bei der TSP1 vermittelten Assoziation an Wirtszellen unterschiedlich verhalten würden.

Daher wurden in Infektionsexperimenten die Adhärenz von verschiedenen unbekapselten Stämmen wie R800, D39 Δ *cps*, TIGR4 Δ *cps*, eines schwach bekapselten Stammes (ATCC 11733) mit der Adhärenz der isogenen Wildtypen (D39 und TIGR4) verglichen, um die Bedeutung des Kapselpolysaccharids für eine TSP1 vermittelte Adhärenz an humane Wirtszellen zu beschreiben. Die jeweiligen unbekapselten Stämme (R800, D39 Δ *cps*, TIGR4 Δ *cps*) zeigten eine deutlich gesteigerte Adhärenz in Gegenwart von zellgebundenem TSP1 im Vergleich zum schwach bekapselten ATCC 11733 oder zu den stark bekapselten Stämmen (D39 und TIGR4) (**Abb. 24**). Die negative Auswirkung der Kapsel auf eine TSP1 vermittelte Adhärenz konnte sehr deutlich gezeigt werden (**Abb. 24**). Die bekapselten Stämme zeigten eine signifikant gesteigerte Adhärenz an HEp-2 Zellen in Gegenwart von immobilisiertem TSP1 im Vergleich zu unbehandelten Wirtszellen, allerdings war die Anzahl der adhärenter Bakterien pro ausgezählter Zelle im Vergleich zu den unbekapselten isogenen

Kapselmutanten (*D39Δcps*, *TIGR4Δcps*) und dem unbekapselten Stamm R800 sehr gering. Die unbekapselten Stämme zeigten eine deutliche Steigerung der Adhärenz um etwa 95% in Gegenwart von TSP1 (**Abb. 24**). Besonders erwähnenswert, in der logarithmischen Darstellung der Ergebnisse allerdings nur schwer zu erkennen, ist die höhere Adhärenz an wirtszellimmobilisiertes TSP1 der unbekapselten Stämme (R800 und Kapselmutanten) auch im Vergleich zum schwach bekapselten *S.p.* ATCC 11733 Serotyp 2 Stamm (**Abb. 24**).

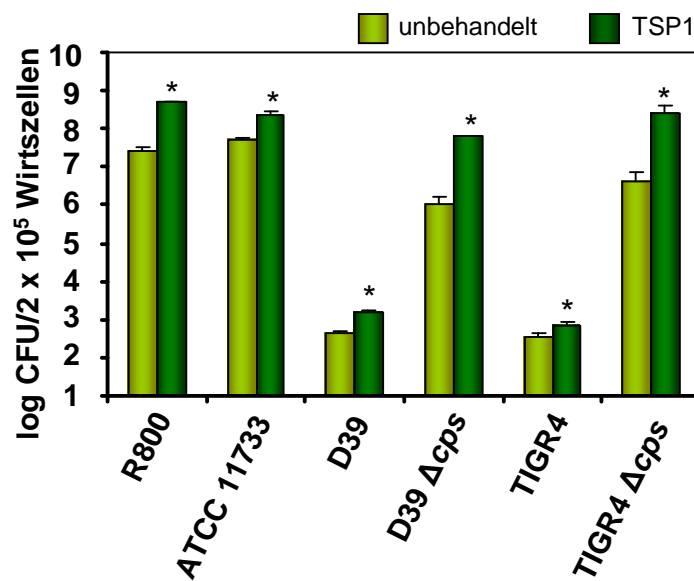


Abb. 24: Einfluss der bakteriellen Kapsel auf die TSP1 vermittelte Assoziation verschiedener Stämme an HEp-2 Wirtszellen. Infektionsversuche wurden mit dem unbekapselten R800, dem schwach bekapselten *S.p.* ATCC 11733 (Typ 2), dem stark bekapselten D39 (Typ 2), seiner isogenen Kapselmutante *D39Δcps*, dem stark bekapselten TIGR4 (Typ 4) und seiner isogenen Kapselmutante *TIGR4Δcps* durchgeführt. Die Infektionen wurden über 3 h in Abwesenheit von zellgebundenem TSP1 (hellgrün) oder mit 3 µg/ml zellgebundenem TSP1 (dunkelgrün) durchgeführt. Die Bindungswerte zeigen den Logarithmus der Anzahl Kolonie-formenden-Einheiten (CFU) pro Kavität einer 24-well Zellkulturschale (1×10^5 HEp-2 Zellen pro Kavität). Die Zahl adhärenter Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt. Ein p -Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant (*) angesehen.

<i>S. pneumoniae</i>	adhärente Bakterien pro Zelle (log CFU/2 x 10 ⁵ Wirtszellen)		
	unbehandelt	TSP1	p
R800	2653750 ± 584592,54	50462500 ± 3072127,72	1,2 x 10 ⁻⁵
ATCC 11733	5081250 ± 822639,62	22547500 ± 6153191,75	0,00820
D39	42,33 ± 7,23	147 ± 28,58	0,00354
D39Δcps	101666,67 ± 59651,77	6145000 ± 161786,89	4,4 x 10 ⁻⁷
TIGR4	34,33 ± 8,50	68 ± 14,11	0,024012
TIGR4Δcps	406666,67 ± 345048,31	25933333,3 ± 14342012,9	0,036863

Tab. 17: Einfluss des Kapselpolysaccharids auf die TSP1 vermittelte Assoziation verschiedener Stämme an HEp-2 Wirtszellen. Anzahl adhärenter Bakterien pro Zelle (als Logarithmus der Kolonie-formenden-Einheiten, CFU) nach 3-stündiger Infektion von HEp-2 Epithelzellen mit verschiedenen *S. pneumoniae*-Serotypen, die sich in der Expression des Kapselpolysaccharids unterscheiden. Die Zahl adhärenter Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt. Ein *p*-Wert von ≤ 0,05 wurde als signifikant angesehen.

Zusammenfassend zeigten die Bindungsstudien und Infektionen in der Zellkultur, dass TSP1 als Brückenmolekül die Adhärenz und die Invasion von verschiedenen *S. pneumoniae*-Serotypen an eukaryontische Wirtszellen vermittelt. Die Expression des Kapselpolysaccharids beeinflusst dabei die Interaktion zwischen *S. pneumoniae* und dem zellgebundenem Glykoprotein TSP1.

3.3. Charakterisierung des bakteriellen Adhäsins für Thrombospondin-1

Gram-positive Bakterien haben verschiedene Strategien entwickelt um an Bestandteile der extrazellulären Matrix zu binden und dadurch eine Adhärenz an oder eine Invasion in humane Wirtszellen zu erleichtern (Talay, 2005). Bei *S. pneumoniae* konnten vor allem Proteine der Zellwand als bakterielles Adhäsins für matrixoberflächenlokalisierte Proteine wie z.B. für Fibronektin und Faktor H identifiziert werden (Dave *et al.*, 2001; Pracht *et al.*, 2005). Die Interaktion zwischen *S. aureus* und TSP1 wurde als nicht-sensitiv gegenüber einer Trypsin-Behandlung beschrieben. Das bakterielle Adhäsins wurde bisher nicht weiter charakterisiert (Herrmann *et al.*, 1991). TSP1 ist ein Lektin und bindet an verschiedene Zell-Oberflächenrezeptoren wie Proteine und auch Zuckerstrukturen (Jaffe *et al.*, 1982).

In diesem Kapitel sollte das bakterielle Adhäsins für TSP1 identifiziert werden, welches durch eine Interaktion mit TSP1 eine gesteigerte Assoziation mit Wirtszellen ermöglicht. Als

Pneumokokken-Adhäsine für TSP1 kamen sowohl Proteine als auch Kohlenhydratstrukturen der Bakterienoberfläche in Frage.

3.3.1. Die chemische Natur des bakteriellen Adhäsins

Um zu ermitteln, ob es sich bei dem Pneumokokken-Adhäsine für TSP1 um ein Protein oder um eine Zuckerstruktur handelt, wurden die Bakterien vor der Infektion von Wirtszellen für 15 min mit dem proteolytischen Enzym Pronase E (ProE) bzw. mit der Zucker oxidierenden Verbindung Natriumperiodat (NaIO_4) behandelt. Anschließend wurden TSP1 behandelte Detroit 562, A549, HEp-2 und HBMEC Wirtszellen mit dem unbehandelten und dem entsprechend behandelten *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* für 3 h infiziert. Die Infektionen wurden nach der Doppelimmunfluoreszenzfärbung mikroskopisch durch das Auszählen von 50 Zellen ausgewertet.

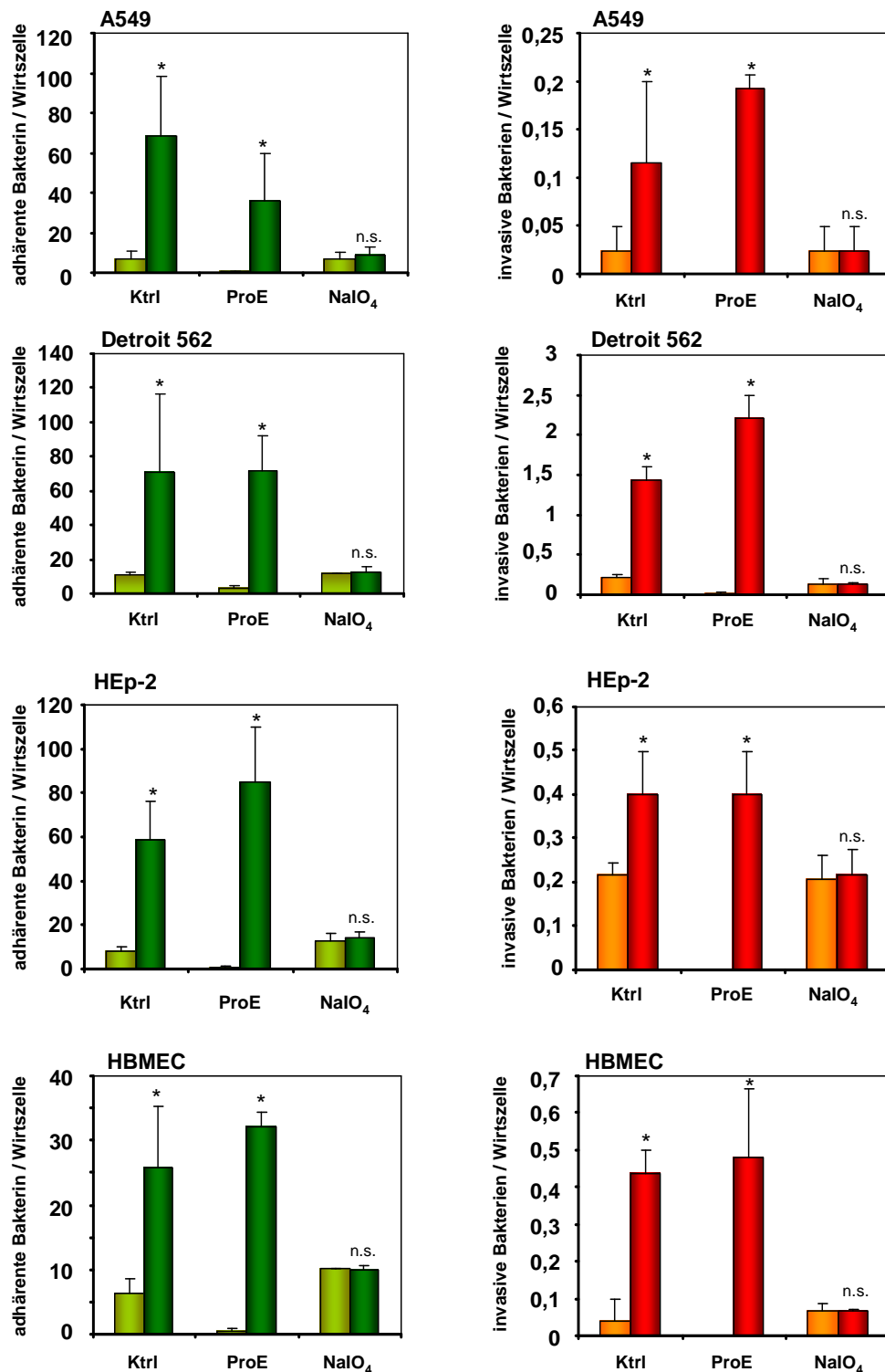


Abb. 25: Charakterisierung der chemischen Natur des Pneumokokken-Adhäsins für TSP1. Einfluss der Pronase E (ProE)- und Natriumperiodat (NaIO₄)-Behandlung von *S. pneumoniae* auf die TSP1 vermittelte Adhärenz an und Invasion in A549, Detroit 562, HEp-2 und HBMEC Wirtszellen. Infektionen wurden in Abwesenheit von TSP1 (hellgrün für Adhärenz und orange für Invasion) bzw. mit 3 µg/ml zellgebundenem TSP1 (dunkelgrün für Adhärenz und rot für Invasion) über 3 h durchgeführt. Ktrl: Kontrolle, ohne Behandlung der Pneumokokken. Die Zahl adhärenter und invasiver Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt. Ein *p*-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant (*) angesehen (n.s.: nicht signifikant).

Eine Quantifizierung der adhärennten und invasiven Bakterien pro Wirtszelle ergab, dass eine proteolytische Behandlung der Bakterien eine durch TSP1 vermittelte Adhärenz auf allen getesteten Zelllinien nicht reduzieren konnte. Ein Protein als wichtigstes bakterielles Adhäsion für TSP1 erschien somit unwahrscheinlich (**Abb. 25**).

Die Fluoreszenzaufnahmen geben einen Eindruck über die Adhärenz an und Invasion von *S.p.* NCTC 10319 in HEp-2 Epithelzellen nach der Pronase E- und der Natriumperiodat-Behandlung der Pneumokokken (**Abb. 26**).

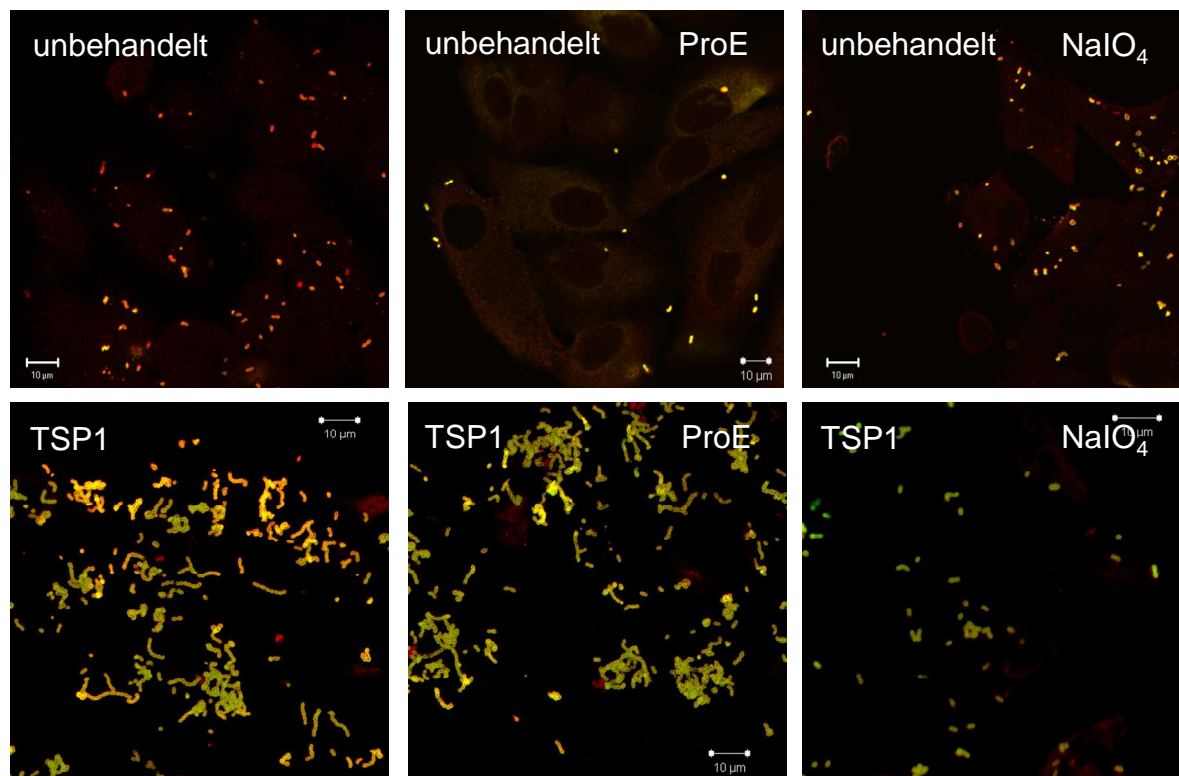


Abb. 26: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der TSP1 unabhängigen (oben) und der TSP1 abhängigen (unten) Adhärenz und Invasion von ProE- und NaIO₄- behandelten *S.p.* NCTC 10319Δply an bzw. in HEp-2 Epithelzellen. Adhärennte Bakterien leuchten grün-gelb, invasive Bakterien leuchten rot.

	adhärente Bakterien pro Wirtszelle			invasive Bakterien pro Wirtszelle		
	unbehandelt	TSP1	<i>p</i>	unbehandelt	TSP1	<i>p</i>
A549						
Kontrolle	6,69 ± 4,41	68,23 ± 30,09	0,02478	0,02 ± 0,03	0,12 ± 0,08	0,14194
ProE	0,63 ± 0,23	35,77 ± 24,12	0,06514	0 ± 0	0,19 ± 0,01	1,8 × 10 ⁻⁵
NaIO₄	7,11 ± 2,87	8,8 ± 4,01	0,58396	0,02 ± 0,023	0,02 ± 0,03	1
Detroit 562						
Kontrolle	10,8 ± 1,41	70,63 ± 45,99	0,03339	0,23 ± 0,03	1,43 ± 0,18	0,00029
ProE	3,22 ± 1,81	71,65 ± 20,65	0,00127	0,02 ± 0,02	2,21 ± 0,29	0,00019
NaIO₄	11,6 ± 0,28	12,75 ± 2,76	0,36702	0,13 ± 0,07	0,13 ± 0,02	0,98222
HBMEC						
Kontrolle	6,26 ± 2,27	25,74 ± 9,53	0,00821	0,04 ± 0,06	0,44 ± 0,06	0,00034
ProE	0,5 ± 0,42	32,16 ± 2,18	4,051E-06	0 ± 0	0,48 ± 0,18	0,00307
NaIO₄	10,1 ± 0,14	9,91 ± 0,70	0,55382	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,01	1
HEp-2						
Kontrolle	8 ± 2	58,56 ± 17,79	0,00808	0,22 ± 0,03	0,4 ± 0,1	0,03799
ProE	0,81 ± 0,25	84,76 ± 25,22	0,00448	0 ± 0	0,4 ± 0,1	0,00227
NaIO₄	12,9 ± 3,48	14,43 ± 2,44	0,56633	0,21 ± 0,05	0,22 ± 0,06	0,85165

Tab. 18: Charakterisierung der chemischen Natur des Pneumokokken-Adhäsins für TSP1. Anzahl adhärenter und invasiver proteolytisch bzw. oxidativ behandelter Bakterien pro Wirtszelle in Abwesenheit von TSP1 und in Anwesenheit von TSP1 (3 µg/ml) nach einer Infektion von A549, Detroit 562, HBMEC und HEp-2 Zellen mit *S.p.* NCTC 10319Δ*ply*. Die Zahl adhärenter und invasiver Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt. Ein *p*-Wert von ≤ 0,05 wurde als signifikant angesehen.

Eine weiterer Beleg für die These, dass an der TSP1 vermittelten Adhärenz keine Proteine als bakterielle Adhäsine beteiligt waren, konnte mit dem Einsatz eines anti-Pneumokokken Antikörpers gezeigt werden. Der anti-Pneumokokken Antikörper wurde gegen hitzebehandelte Pneumokokken generiert und erkennt auch oberflächenlokalisierte Pneumokokkenproteine. Eine Inkubation von *S.p.* NCTC 10319Δ*ply* mit diesem Antikörper und eine anschließende Infektion in An- bzw. Abwesenheit von immobilisiertem TSP1 führte zu ähnlichen Ergebnissen wie nach Infektionen mit proteolytisch vorbehandelten Pneumokokken. Die TSP1 vermittelte Adhärenz an und die Invasion in HEp-2 Zellen konnte durch eine Maskierung der Pneumokokkenoberflächenproteine mit diesem Antikörper nicht verringert werden. Wurden die Bakterien im Gegensatz dazu vor der Infektion jedoch mit Natriumperiodat behandelt, wurde die TSP1 vermittelte Adhärenz und Invasion inhibiert

(**Abb. 25 und 26**). Daher wurde vermutet, dass es sich bei dem bakteriellen Adhäsın für TSP1 um eine Zuckerstruktur handeln könnte, die durch die Natriumperiodat-Behandlung oxidativ zerstört und in ihrer biologischen Aktivität nachhaltig verändert wurde.

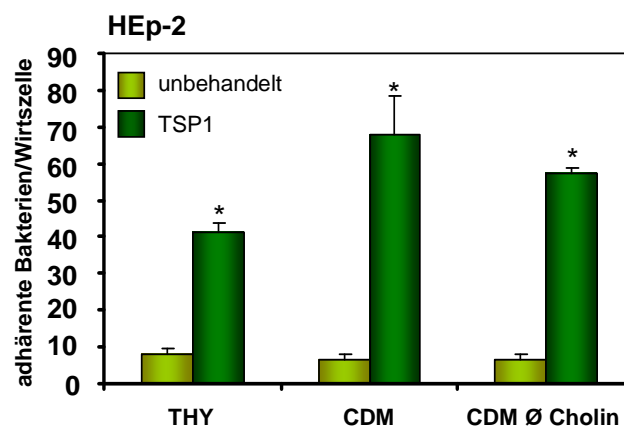
Ein Überlebenstest der Pneumokokken nach der Pronase E- und nach der Natriumperiodat-Behandlung zeigte keine Einschränkung im Wachstum der Pneumokokken. Interessanterweise verhinderte eine Pronase E-Behandlung der Pneumokokken bei anschließender Infektion die Adhärenz der Pneumokokken an alle unbehandelten Zelllinien. Diese Ergebnisse zeigten daher, dass die in Abwesenheit von TSP1 gemessene Adhärenz der Pneumokokken an Wirtszellen von Proteinen vermittelt wird. Die Natriumperiodat-Behandlung verringerte die TSP1 unabhängige Adhärenz im Vergleich zu unbehandelten Bakterien nicht (**Abb. 25 und 26**). Die Fluoreszenzaufnahmen der Infektion von HEP-2 Zellen mit *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* bestätigten, dass es sich bei dem Pneumokokken-Adhäsın für TSP1 um eine Zuckerstruktur handeln kann (**Abb. 26**).

3.3.2. Die Rolle des Pneumokokken-Phosphorylcholins für die Thrombospondin-1 vermittelte Assoziation an Wirtszellen

Das bakterielle Adhäsın für TSP1 ist vermutlich eine Oberflächenzuckerstruktur der Pneumokokken. Als potenzielle Kandidaten kamen verschiedene Strukturen in Frage. Phosphorylcholin (*PCho*) ist eine Pneumokokken-spezifische Zuckerstruktur, die in der Zellwand über glykosidische Bindungen an Lipoteichonsäuren und Teichonsäuren gebunden ist (Fischer, 2000). In verschiedenen Studien wurde das *PCho* als Adhäsın für den PAF-Rezeptor identifiziert (Cundell *et al.*, 1995; Cundell *et al.*, 1995). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob das *PCho* auch als Pneumokokken-Adhäsın für TSP1 fungiert. Daher wurde zunächst das Cholin im chemisch definierten Medium (CDM) durch den Aminoalkohol Ethanolamin ersetzt. Pneumokokken können das Ethanolamin anstelle des Cholins in die Zellwand einbauen. Ein Indiz für den Einbau des Ethanolamins in die Pneumokokkenzellwand ist eine ausgeprägte Kettenbildung der Bakterien (Vollmer and Tomasz, 2001). Die Pneumokokken wurden in CD-Medium ohne Ethanolamin angezogen und die Infektion mit TSP1 behandelten und TSP1 unbehandelten HEP-2 Wirtszellen durchgeführt. *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* zeigte im Vergleich zur Kultivierung in THY oder in cholin-haltigem CD-Medium keine veränderte Wachstumsgeschwindigkeit. Mikroskopisch wurde eine deutlich erhöhte Kettenbildung der Bakterien beobachtet, ein Indiz dafür, dass die Bakterien das Ethanolamin anstelle des Cholins in die Zellwand eingebaut hatten. Nach der

Infektion wurden die Bakterien durch eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung markiert und die Zahl adhärenter und invasiver Bakterien am Mikroskop ausgezählt. In der Infektion mit HEp-2 Epithelzellen konnte keine Reduktion der TSP1 vermittelten Adhärenz nachgewiesen werden. Die Bakterien, die zuvor in CDM ohne Cholin kultiviert wurden, zeigten sogar eine leicht erhöhte TSP1 vermittelte Adhärenz im Vergleich zu solchen, die im THY-Medium angezogen wurden. Die TSP1 unabhängige Adhärenz und Invasion der Pneumokokken blieb dabei jeweils unverändert (**Abb. 27A und B**).

A



B

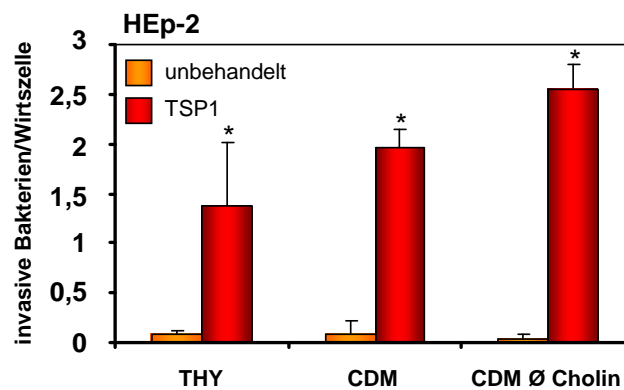


Abb. 27: Rolle des Cholins in der Adhärenz und Invasion von Pneumokokken an bzw. in HEp-2 Wirtszellen. **A**, Adhärenz von *S.p.* NCTC 10319Δply (Serotyp 35A) an HEp-2 Epithelzellen. **B**, Invasion von *S.p.* NCTC 10319Δply in HEp-2 Epithelzellen. Die Infektionen wurden über 3 h in Anwesenheit von TSP1 (hellgrün und orange) bzw. mit 3 µg/ml zellgebundenem TSP1 (dunkelgrün und rot) durchgeführt. Die Bakterien wurden zur Analyse der Beteiligung des PCho in verschiedenen Medien angezogen. THY: Todd-Hewitt-Broth, normales Pneumokokken-Nährmedium; CDM: chemisch-definiertes Medium, enthält Cholin; CDM Ø Cholin: chemisch-definiertes Medium ohne Cholin. Das Cholin wurde durch Ethanolamin ersetzt. Die Zahl adhärenter und invasiver Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt. Ein p -Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant (*) angesehen.

	adhärente <i>S. pneumoniae</i> pro Wirtszelle			invasive <i>S. pneumoniae</i> pro Wirtszelle		
	unbehandelt	TSP1	<i>p</i>	unbehandelt	TSP1	<i>p</i>
THY	8,27 ± 1,26	41 ± 2,98	6,2 × 10 ⁻⁵	0,08 ± 0,04	1,37 ± 0,65	0,02701
CDM	6,69 ± 1,34	67,98 ± 10,50	0,00055	0,08 ± 0,14	1,96 ± 0,19	0,00015
CDM Ø Cholin	6,65 ± 1,31	57,43 ± 1,50	1,6 × 10 ⁻⁶	0,04 ± 0,04	2,55 ± 0,25	6,7 × 10 ⁻⁵

Tab. 19: Rolle des Cholins in der Adhärenz und Invasion von Pneumokokken an bzw. in HEp-2 Wirtszellen. Anzahl adhärenter und invasiver Bakterien nach einer Infektion von HEp-2 Epithelzellen mit *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply*. Die Bakterien wurden in THY-, CD- oder in CD-Medium ohne Cholin (CDM Ø Cholin) kultiviert. Die Zahl adhärenter und invasiver Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt. Ein *p*-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

Im nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob eine enzymatische Behandlung des *PCho* eine Auswirkung auf die bakterielle TSP1 vermittelte Assoziation an die Wirtszellen hat. Dafür wurden die Bakterien mit einer Phosphorylcholin-Esterase (*Pce*) behandelt, die bis zu 30% des Zellwandphosphorylcholins von den Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren abspalten kann (Vollmer and Tomasz, 2001).

Zur Produktion der *Pce* von *S. pneumoniae*, wurde das *Pce* kodierende Gen (*pce*) aus dem D39 Stamm in den Expressionsvektor pQE30 kloniert und heterolog in *E. coli* exprimiert. Das Protein wurde anschließend affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die Aktivität der erhaltenen *Pce* wurde in einem kolorimetrischen Test mit dem Substrat *p-N*-Phosphorylcholin (*pNP-PC*, Sigma) mittels einer Farbreaktion getestet (Vollmer and Tomasz, 2001). Anschließend wurden die Pneumokokken NCTC 10319 Δ *ply* mit der aktiven *Pce* inkubiert. Der *Pce*-behandelte Stamm wurde in einer Infektion mit TSP1 behandelten bzw. unbehandelten Zellen auf eine Adhärenz an HEp-2 Epithelzellen getestet. Nach der Infektion wurden adhärenter und invasive Bakterien mittels der Doppelimmunfluoreszenzfärbung markiert und am Mikroskop ausgewertet. Dabei war die TSP1 vermittelte Adhärenz der enzymatisch behandelten Pneumokokken pro Wirtszelle nicht vermindert, sondern sogar im Vergleich mit dem unbehandelten Pneumokokkenstamm um ca. 40% erhöht. Die TSP1 unabhängige Adhärenz wurde durch die *Pce*-Behandlung nicht reduziert. Des Weiteren wurden in anderen Infektionsversuchen *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* mit einem anti-Phosphorylcholin Antikörper (TEPC 15, Sigma) präinkubiert und das *PCho* dadurch maskiert. Dabei konnte keine Reduktion der TSP1 vermittelten Adhärenz an HEp-2 Zellen im

Vergleich zur Infektion mit unbehandelten Pneumokokken festgestellt werden. Gleichzeitig blieb die TSP1 unabhängige Adhärenz unverändert (**Abb. 28**). Durch diese verschiedenen unabhängigen Versuchsansätze konnte das *PCho* daher als Pneumokokken-Adhäsion für TSP1 ausgeschlossen werden.

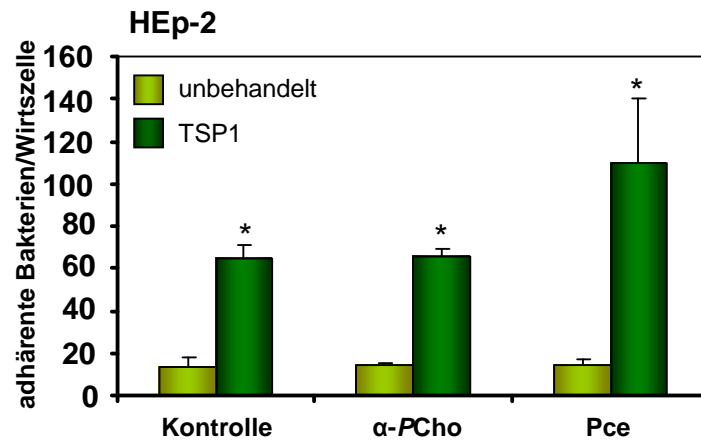


Abb. 28: Einfluss des Phosphorylcholins auf die Adhärenz von *S.p.* NCTC 10319Δply (Serotyp 35A) an HEp-2 Wirtszellen. Anti-Phosphorylcholin (α -Pch): *S.p.* NCTC 10319Δply (Serotyp 35A) wurde vor der Infektion mit einem anti-Phosphorylcholin Antikörper (TEPC 15, Sigma) inkubiert; Pce: *S.p.* NCTC 10319Δply (Serotyp 35A) wurde vor der Infektion mit aktiver rekombinanter Phosphorylcholin-Esterase inkubiert. Die Infektionen wurden über 3 h in Abwesenheit von TSP1 (hellgrün) bzw. mit 3 μ g/ml zellgebundenem TSP1 (dunkelgrün) durchgeführt. Die Zahl adhärenter Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt. Ein p -Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant (*) angesehen.

	adhärente <i>S. pneumoniae</i> pro Wirtszelle		
	unbehandelt	TSP1	p
Kontrolle	13,53 \pm 4,59	65,05 \pm 6,11	0,00030
α-PCho	14,25 \pm 1,43	65,23 \pm 4,21	3,8 $\times 10^{-5}$
Pce	14,77 \pm 2,59	109,62 \pm 30,35	0,00571

Tab. 20: Einfluss des Phosphorylcholins auf die Adhärenz von Pneumokokken an HEp-2 Epithelzellen. Die Bakterien wurden vor der TSP1 unabhängigen bzw. abhängigen Infektion mit anti-Phosphorylcholin (α -PCho) bzw. mit der rekombinanten Phosphorylcholinesterase (Pce) vorbehandelt. Die Zahl adhärenter Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt. Ein p -Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

3.3.3. Einfluss verschiedener Pneumokokken-Zellwandkomponenten auf die Thrombospondin-1 vermittelte Adhärenz von Pneumokokken an Wirtszellen

Das Phosphorylcholin konnte als Pneumokokken-Adhäsion für TSP1 ausgeschlossen werden. Im nächsten Schritt wurden isolierte Polysaccharidzellwandstrukturen als Inhibitoren eingesetzt, um zu testen, ob die TSP1 vermittelte bakterielle Adhärenz über andere Oberflächenglykostrukturen als das Phosphorylcholin vermittelt wird. In den Inhibitionsexperimenten wurden Lipoteichonsäuren, Peptidoglykan, verschiedene Fraktionen aus der Aufreinigung von Peptidoglykan und Zuckerbestandteile des Peptidoglykans eingesetzt. Die Auswertung der Infektionen erfolgte nach der Doppelimmunfluoreszenzfärbung durch Auszählen der adhärenenten Pneumokokken.

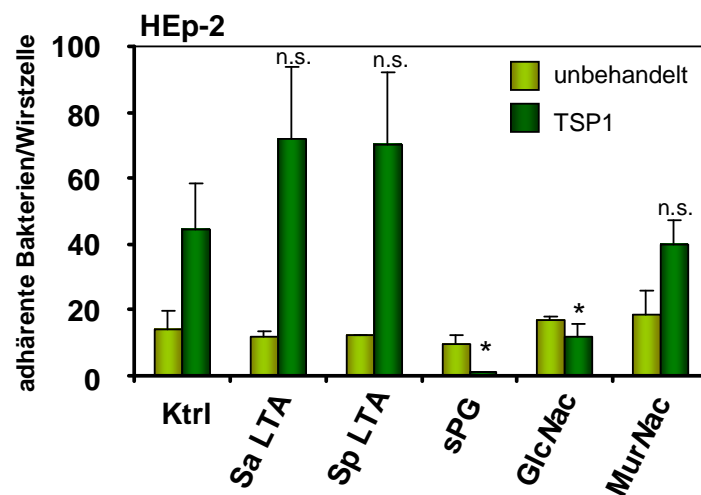


Abb. 29: Inhibition der TSP1 vermittelten Adhärenz mit Peptidoglykan. Die Adhärenz in Abwesenheit und Anwesenheit von TSP1 (3 µg/ml) wurde mit verschiedenen Zellwand-Komponenten inhibiert. Ktrl: Kontrolle ohne Inhibitor Sa LTA: Lipoteichonsäuren von *S. aureus* (100 µg/ml); Sp LTA: Lipoteichonsäuren von *S. pneumoniae* (100 µg/ml); sPG: lösliches Peptidoglykan von *S. aureus* (100 µg/ml); Glc/Nac: *N*-Acetylglukosamin (100 mM); Mur/Nac: *N*-Acetylmuraminsäure (100 mM). Die Infektionen wurden über 3 h ohne TSP1 (hellgrün) bzw. mit 3 µg/ml immobilisiertem TSP1 (dunkelgrün) durchgeführt. Die Zahl adhärenenten Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt. Ein *p*-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant (*) angesehen (n.s.: nicht signifikant).

	adhärente <i>S. pneumoniae</i> pro Wirtszelle		
	unbehandelt	TSP1	<i>p</i>
ohne	13,9 ± 5,73	44,43 ± 14,23	0,02610
100 µg/ml Staph LTA	11,99 ± 1,29	71,85 ± 22,13	0,08812
100 µg/ml Pneu LTA	12,30 ± 0,29	70,35 ± 21,71	0,09856
100 µg/ml sPG	9,48 ± 3,08	1,155 ± 0,01	0,00621
100 mM GlcNac	16,62 ± 1,33	11,68 ± 4,24	0,01876
100 mM MurNac	18,51 ± 7,48	40 ± 7,07	0,06374

Tab. 21: Inhibition der TSP1 vermittelten Adhärenz mit Peptidoglykan. Anzahl adhärenter Bakterien pro Wirtszelle nach Inhibitionsstudien mit Zellwandpolysacchariden. Die Zahl adhärenter Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt. Ein *p*-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

Durch Verwendung von isolierten und aufgereinigten Lipoteichonsäuren von *Staphylococcus aureus* und mit Lipoteichonsäuren von *S. pneumoniae* konnte keine Reduktion der TSP1 vermittelten Pneumokokken-Adhärenz bei der Infektion mit *S.p.* 35A Δ *ply* an HEp-2 Epithelzellen aufgezeigt werden. Dagegen bewirkten 20 µg lösliches Peptidoglykan von *S. aureus* eine signifikante Reduktion der TSP1 vermittelten Adhärenz der Pneumokokken an Epithelzellen. Auf die Adhärenz der Pneumokokken an unbehandelte Wirtszellen hatte das lösliche Peptidoglykan keinen Einfluss (**Abb. 29**). Weiterhin wurden Inhibitionen mit den beiden Zuckereinheiten des Peptidoglykans dem *N*-Acetylglukosamin und der *N*-Acetylmuraminsäure durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Inhibition der TSP1 vermittelten bakteriellen Adhärenz an HEp-2 Zellen mit 100 mM *N*-Acetylglukosamin, nicht jedoch mit 100 mM *N*-Acetylmuraminsäure. Da für eine Inhibition der TSP1 vermittelten Adhärenz an HEp-2 mit *N*-Acetylglukosamin (100 mM) unphysiologische Mengen des Zuckers eingesetzt werden mussten, ist es wahrscheinlich, dass dieser Zucker nicht das minimale Motiv des bakteriellen Adhäsins für TSP1 darstellt. Keine der in den Inhibitionsexperimenten eingesetzten Verbindungen hatte einen Effekt auf die TSP1 unabhängige Adhärenz (**Abb. 29**).

Zur weiteren Analyse der Spezifität des inhibitorischen Effekts von Peptidoglykan, wurden Versuche zur TSP1 vermittelten Adhärenz und Invasion mit einer Peptidoglykan-Konzentrationsreihe durchgeführt. Die adhärenenten und invasiven Bakterien wurden nach der Infektion in einer Immunfluoreszenzfärbung markiert. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch durch Auszählen von mindestens 30 Zellen. Der inhibitorische Effekt sowohl auf die Adhärenz wie auch auf die Invasion war abhängig von der Menge an eingesetztem

Peptidoglykan (**Abb. 30A und B**). Diese Tatsache deutete auf eine spezifische Interaktion zwischen Pneumokokken-Peptidoglykan und TSP1 hin. Die TSP1 vermittelte Adhärenz der Pneumokokken wurde in Gegenwart von 10 μg Peptidoglykan pro 500 μl Infektionsansatz um 50% im Vergleich zur Negativkontrolle ohne Peptidoglykan reduziert (**Abb. 30A**). Die Fluoreszenzaufnahmen verdeutlichen den inhibitorischen Effekt des Peptidoglykans auf die TSP1 vermittelte Adhärenz von Pneumokokken an humane Wirtszellen (**Abb. 30C**).

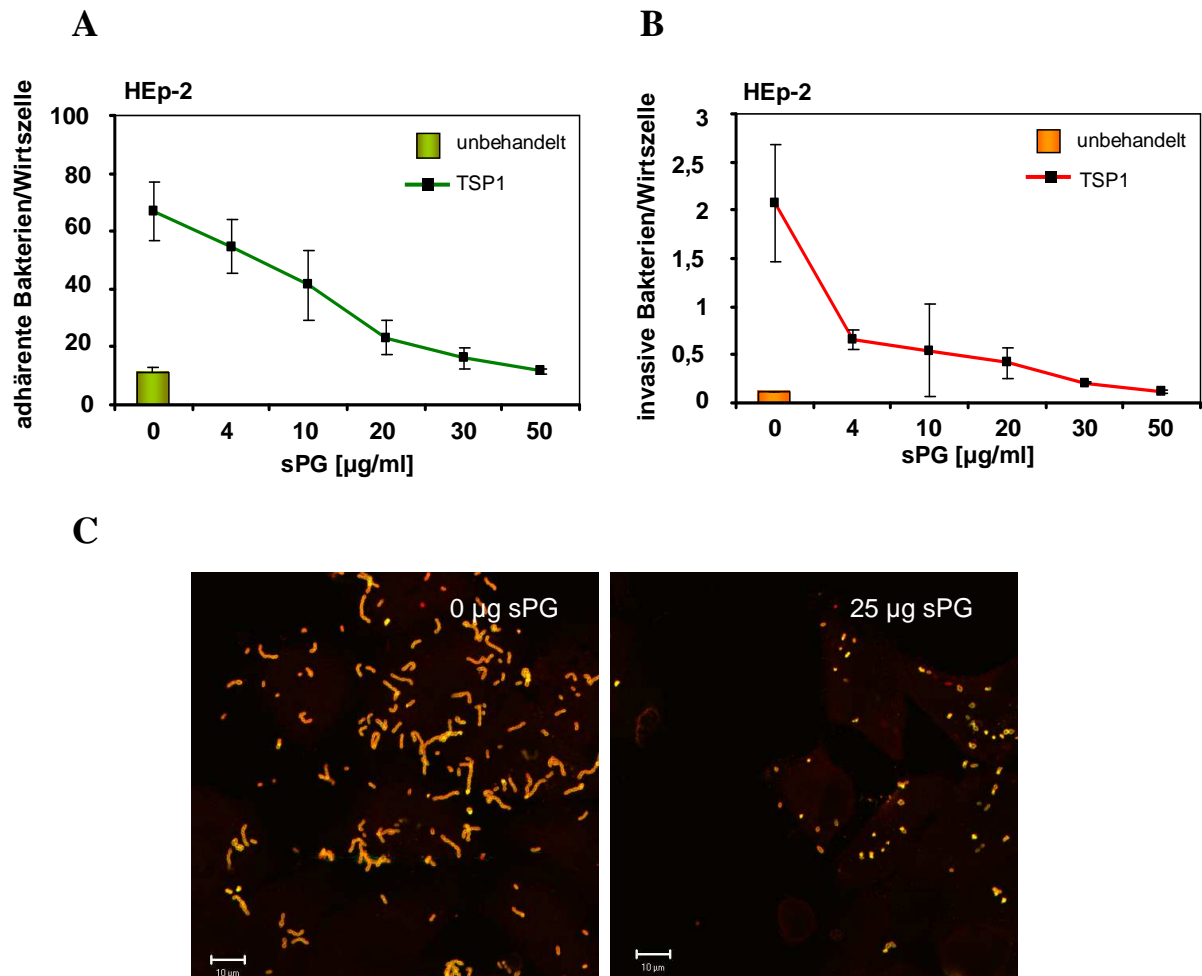


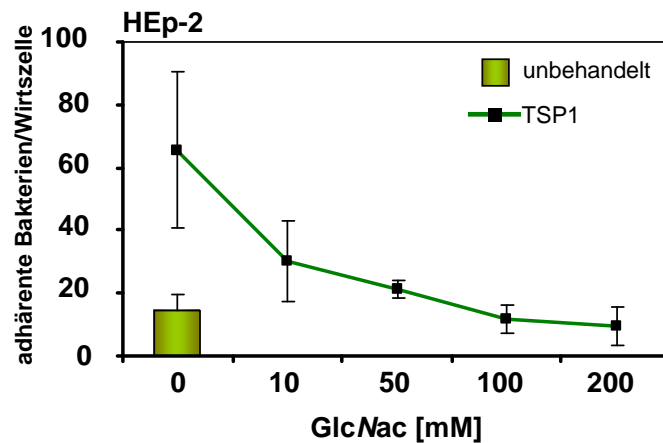
Abb. 30: Einfluss von Peptidoglykan auf die TSP1 vermittelte Adhärenz und Invasion. Konzentrationsabhängiger Einfluss des Peptidoglykans (sPG) auf eine TSP1 abhängige Adhärenz (**A**) an bzw. Invasion (**B**) in HEp-2 Epithelzellen. **C**, Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der Peptidoglykaninhibition der TSP1 abhängigen Adhärenz und Invasion von *S.p.* NCTC 10319 Δply (Serotyp 35A) an und in HEp-2 Epithelzellen.

sPG [$\mu\text{g/ml}$]	adhärente <i>S. pneumoniae</i> pro Wirtszelle		invasive <i>S. pneumoniae</i> pro Wirtszelle	
	unbehandelt	TSP1	unbehandelt	TSP1
0	11,05 \pm 2,11	66,74 \pm 10,18	0,115 \pm 0,01	2,07 \pm 0,61
4		54,67 \pm 9,14		0,66 \pm 0,11
10		41,34 \pm 11,86		0,54 \pm 0,48
20		23,25 \pm 5,85		0,42 \pm 0,16
30		16,19 \pm 3,70		0,21 \pm 0,01
50		11,61 \pm 0,96		0,12 \pm 0,01

Tab. 22: Einfluss von Peptidoglykan auf die TSP1 vermittelte Adhärenz und Invasion. Anzahl adhärenter und invasiver Bakterien pro Wirtszelle nach der Infektion von HEp-2 Zellen mit *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply*. Die Adhärenz und Invasion wurde mit aufsteigender Menge Peptidoglykan (sPG) inhibiert. Die Zahl adhärenter und invasiver Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt.

Zur Analyse des inhibitorischen Effekts von *N*-Acetylglukosamin wurden weitere Infektionsversuche durchgeführt und anschließend mikroskopisch ausgewertet. Dabei wurde ebenfalls die Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition mit *GlcNac* getestet. Der inhibierende Effekt von *N*-Acetylglukosamin auf eine TSP1 vermittelte Adhärenz war konzentrationsabhängig. In Gegenwart von 10 mM *N*-Acetylglukosamin pro 500 μl Infektionsansatz konnte eine 50%ige Reduktion der TSP1 vermittelten Inhibition im Vergleich zur Infektion in Abwesenheit von *N*-Acetylglukosamin nachgewiesen werden (**Abb. 31A**). Diese inhibitorische Wirkung des *N*-Acetylglukosamins wird auch in den entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen deutlich (**Abb. 31B**).

A



B

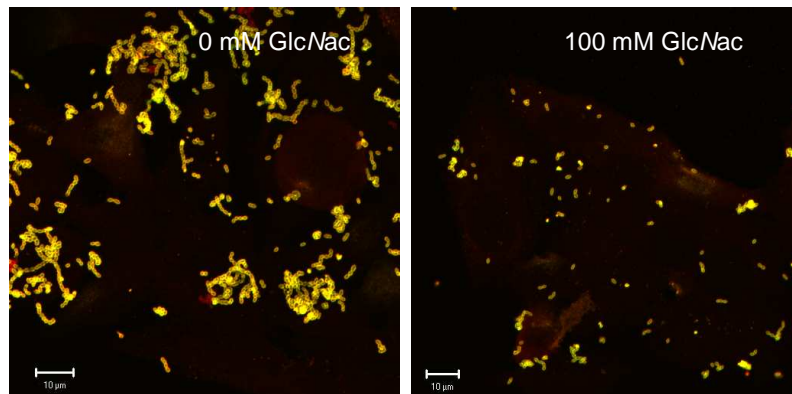


Abb. 31: Einfluss von *N*-Acetylglucosamin auf die TSP1 vermittelte Adhärenz. **A**, Konzentrationsabhängigkeit der *N*-Acetylglucosamin (GlcNac) vermittelten Inhibition von *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* (Serotyp 35A) an HEp-2 Epithelzellen. **B**, Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen verdeutlichen die *N*-Acetylglucosamin vermittelte Inhibition der TSP1 abhängigen Adhärenz von *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* (Serotyp 35A) an HEp-2 Epithelzellen.

GlcNac [mM]	adhärente <i>S. pneumoniae</i> pro Wirtszelle	
	unbehandelt	TSP1
0	14,5 ± 5,20	65,55 ± 2 4,74
10		30,1 ± 12,87
50		21,17 ± 2,65
100		11,57 ± 4,39
200		9,43 ± 6,13

Tab. 23: Inhibition der TSP1 vermittelten Adhärenz mit *N*-Acetylglucosamin. Anzahl adhärenter Bakterien pro Wirtszelle nach der Infektion von HEp-2-Zellen mit *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply*. Die Adhärenz und Invasion wurde mit aufsteigender *N*-Acetylglucosamin (GlcNac)-Konzentration inhibiert. Die Zahl adhärenter Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt.

Obwohl auch *N*-Acetylglukosamin einen inhibitorischen Effekt auf die TSP1 vermittelte Adhärenz von *S. pneumoniae* an Wirtszellen aufwies, war dieser jedoch wesentlich geringer als der des vollständigen Peptidoglykanmoleküls. Demnach wurde vermutet, dass der inhibitorische Effekt nicht nur in Zusammenhang mit den Zuckerbausteinen des Peptidoglykans, sondern mit der Gesamtstruktur des Peptidoglykans steht. Verschiedene Eluate aus Aufreinigungsschritten des Peptidoglykans (zur Verfügung gestellt von U. Zähringer, Borstel) wurden auf ihre Wirksamkeit als Inhibitor mit der des bisher verwendeten Peptidoglykans verglichen. Dafür wurden auf HEp-2 Epithelzellen 3 µg TSP1 für 30 min immobilisiert und mit 20 µg verschiedener Eluate aus der Aufreinigung des Peptidoglykans bzw. mit Peptidoglykanfragmenten die TSP1 vermittelte Adhärenz von Pneumokokken an HEp-2 Wirtszellen inhibiert (**Abb. 32**). In diesem Versuch bestätigte sich der inhibitorische Effekt des löslichen Peptidoglykans. In diesem Fall war das verwendete Peptidoglykan von einer Lipopeptid-Mutante (*lgt*-Mutante) von *S. aureus* isoliert, deren Zellwand die klassischen Lipopeptide der Bakterienoberfläche fehlen. Das *lgt* ist ein Enzym und modifiziert das Lipopeptid so, dass keine Verankerung des Peptids in der Zellwand erfolgen kann. Die Inhibitionen zeigten, dass lösliches Peptidoglykan einen deutlich stärkeren inhibitorischen Effekt als eine Suspension aus nicht gelöstem Peptidoglykan hatte, welches von der Firma Sigma gekauft wurde. Mit löslichem Peptidoglykan konnte eine 90%ige Inhibition, mit einer Suspension des nicht löslichen Peptidoglykans eine ebenfalls deutlich signifikante, jedoch nur 60%ige Inhibition der TSP1 vermittelten Adhärenz der Pneumokokken erreicht werden. Weitere Inhibitionsversuche wurden mit dem Park's Nukleotid von *E. coli* und mit Wandteichonsäuren (WTA) von *S. aureus* durchgeführt. Mit diesen Verbindungen konnte keine Reduktion der TSP1 vermittelten Adhärenz erzielt werden. Die Anwesenheit eines Muramyl-Dipeptids (MDP, Sigma) zeigte ebenfalls keinen inhibitorischen Effekt. Es konnte eine weitere sehr wichtige Beobachtung mit dem Einsatz dreier Fraktionen aus der Aufreinigung des Peptidoglykans aus *S. aureus* (WT) gemacht werden. Diese Fraktionen unterschieden sich in ihrer molekularen Größe, wobei Nr. 4 die Fraktion mit dem höchsten Molekulargewicht und Fraktion Nr. 6 die mit dem niedrigsten Molekulargewicht, allerdings der größten Anzahl von Molekülen pro µg war. Interessanterweise konnte eine stufenweise Inhibition dieser verschieden großen Fraktionen erreicht werden, wobei die kleinste Fraktion mit 70% die stärkste Reduktion bewirken konnte (**Abb. 32**).

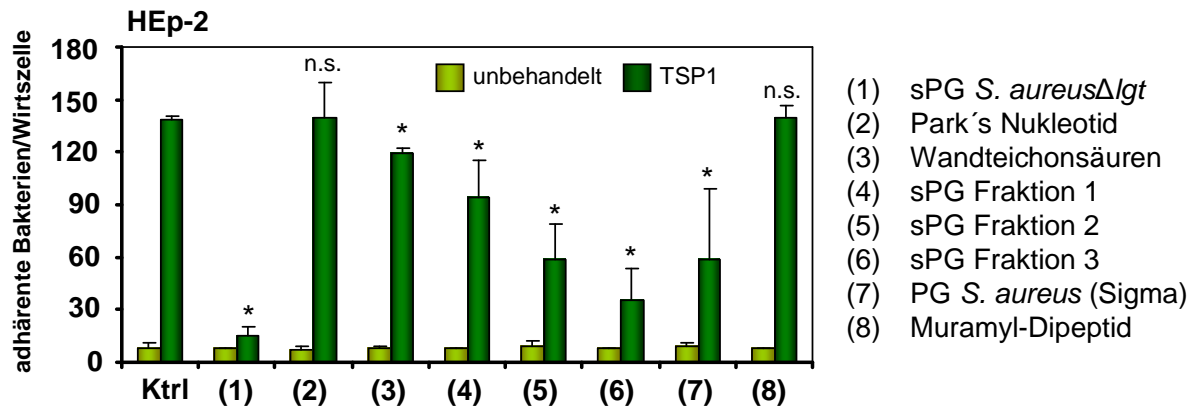


Abb. 32: Untersuchungen zur Inhibition der TSP1 vermittelten Adhärenz mit Peptidoglykan. Inhibitionsstudien der TSP1 vermittelten Adhärenz von *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* (Serotyp 35A) an HEp-2 Epithelzellen mit aufgereinigten Strukturen bzw. Eluaten (jeweils 20 μ g/ml) von Peptidoglykan. Ktrl: Infektion in Abwesenheit von Inhibitoren. Die Zahl adhärenter Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt. Ein p -Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant (*) angesehen (n.s.: nicht signifikant).

	adhärente <i>S. pneumoniae</i> pro Wirtszelle		
	unbehandelt	TSP1	p
ohne	8,01 \pm 2,88	138,58 \pm 1,66	7,0 $\times 10^{-8}$
sPG (1)	7,68 \pm 0,18	15,31 \pm 5,36	7,1 $\times 10^{-7}$
Park's Nukleotid (2)	7,05 \pm 1,63	139,46 \pm 20,74	0,92180
WTA (3)	7,95 \pm 1,34	119,05 \pm 3,46	0,00023
sPG (4)	7,75 \pm 0,64	93,95 \pm 21,71	0,00738
sPG (5)	9,03 \pm 2,86	58,98 \pm 19,98	0,00062
sPG (6)	7,85 \pm 0,35	34,98 \pm 18,70	0,00017
PG (7)	8,96 \pm 1,92	58,29 \pm 41,31	0,00892
MDP (8)	8,06 \pm 0,36	139,2 \pm 7,07	0,84337

Tab. 24: Untersuchungen zur Inhibition der TSP1 vermittelten Adhärenz mit Peptidoglykan. Anzahl adhärenter Bakterien pro Wirtszelle nach der Infektion von HEp-2 Zellen mit *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply*. Die Adhärenz und Invasion wurde mit unterschiedlichen aufgereinigten Zellwandfragmenten inhibiert. sPG: lösliches Peptidoglykan; WTA: Wandteichonsäuren; PG: nicht lösliches Peptidoglykan; MDP: Muramyl-Dipeptid. Die Zahl adhärenter Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt. Ein p -Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

Die Infektionsversuche und Bindungsstudien in diesem Kapitel konnten eindeutig eine wichtige Rolle für das bakterielle Peptidoglykan in der TSP1 vermittelten Adhärenz und Invasion aufzeigen.

3.3.4. Untersuchungen zur spezifischen Interaktion von Thrombospondin-1 mit Peptidoglykan

Eine spezifische Bindung zwischen TSP1 und Peptidoglykan wurde in einem Bindungsversuch, an dem ausschließlich beide Interaktionspartner beteiligt waren, untersucht. Dafür wurden aufsteigende Konzentrationen TSP1 in Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte immobilisiert. Das immobilisierte TSP1 wurde mit 3 μg Peptidoglykan (sPG der *lgt*-Mutante) für 1 h inkubiert. Anschließend wurde ungebundenes sPG durch Waschen entfernt. In einem weiteren Versuch wurden 0,5 μg TSP1 in Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte immobilisiert und das immobilisierte TSP1 mit aufsteigenden Konzentration von löslichem Peptidoglykan inkubiert (**Abb. 33**).

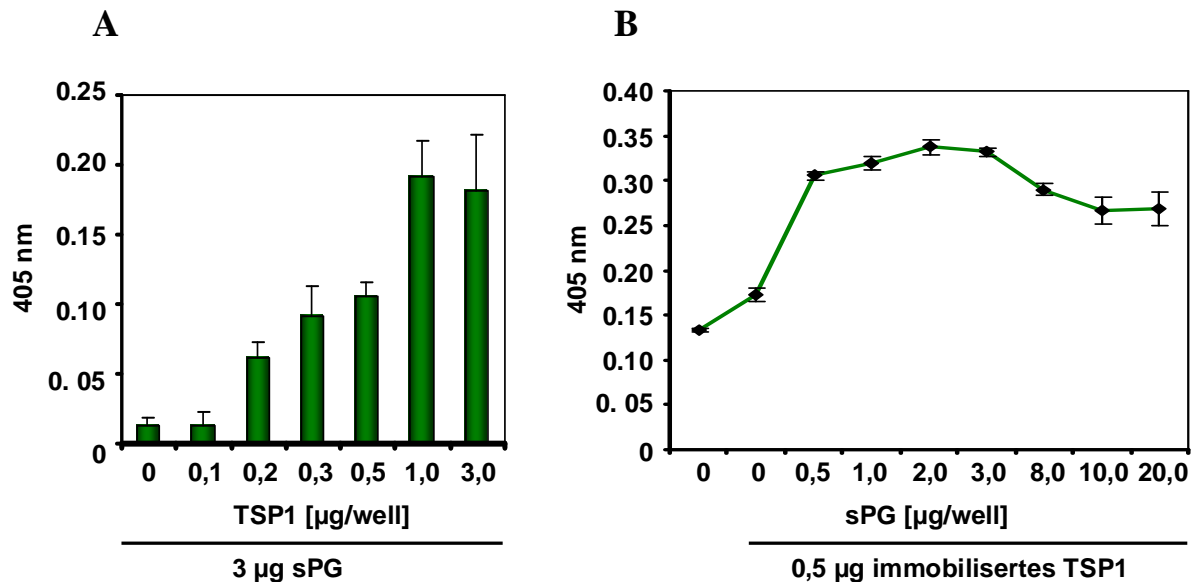


Abb. 33: Bindung des löslichen Peptidoglykans (sPG) an immobilisiertes TSP1. **A**, TSP1 wurde in aufsteigenden Mengen in den Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte immobilisiert und mit jeweils 3 μg sPG inkubiert. **B**, 0,5 μg TSP1 wurden in den Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte immobilisiert und mit aufsteigenden Mengen löslichem Peptidoglykan (sPG) inkubiert. Die Analyse der Bindung erfolgte nach einer Inkubation mit einem anti-Peptidoglykan Antikörper, einem sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper und einer enzymatischen Farbreaktion im ELISA-Reader bei 405 nm.

A	TSP1 [$\mu\text{g/well}$]	Bindung von 3 μg sPG an immobilisiertes TSP1 Emission bei 405 nm
	0	0,0013 \pm 0,0051
	0,1	0,0123 \pm 0,0103
	0,2	0,0616 \pm 0,0112
	0,3	0,0913 \pm 0,0218
	0,5	0,1057 \pm 0,0105
	1,0	0,1910 \pm 0,0263
	3,0	0,1810 \pm 0,04
B	sPG [$\mu\text{g/well}$]	Bindung von sPG an 0,5 μg immobilisiertes TSP1 Emission bei 405 nm
	0	0,173 \pm 0,008
	0,5	0,3055 \pm 0,0045
	1,0	0,3195 \pm 0,0075
	2,0	0,3375 \pm 0,0085
	3,0	0,332 \pm 0,005
	8,0	0,29 \pm 0,007
	10,0	0,267 \pm 0,015
	20,0	0,268 \pm 0,019

Tab. 25: Bindung des löslichen Peptidoglykans (sPG) an immobilisiertes TSP1. **A,** Die Bindungswerte ergeben sich durch die Subtraktion der Messwerte der Negativkontrolle (nur TSP1) von den Messwerten der Bindung von 3 μg Peptidoglykan (sPG) an TSP1. **B,** Die Bindungswerte sind die Messwerte der Bindung von aufsteigender Konzentration löslichem Peptidoglykan inkubiert mit 0,5 μg immobilisiertem TSP1.

Die Bindung des Peptidoglykans an das TSP1 wurde mit Hilfe der Inkubation eines anti-Peptidoglykan Antikörpers und der anschließenden Inkubation eines sekundären Peroxidasegekoppelten Antikörpers eine Farbreaktion mit dem Abt-Substrat detektiert. Als Negativkontrolle wurden aufsteigende Konzentrationen des immobilisierten TSP1 ohne anschließende Inkubation mit Peptidoglykan mit dem primären anti-Peptidoglykan Antikörper und dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert. Die Farbreaktion wurde im ELISA-Reader bei 405 nm analysiert. Tatsächliche Bindungswerte des Peptidoglykans an das immobilisierte TSP1 wurden ermittelt, indem die Messwerte der Negativkontrolle von den Messwerten des Peptidoglykans an das TSP1 subtrahiert wurden. Die Bindung des Peptidoglykans an das TSP1 war abhängig von der eingesetzten Menge von TSP1 (**Abb. 33A**). Weiterhin war die Interaktion zwischen immobilisiertem TSP1 abhängig von der Menge von eingesetztem Peptidoglykan und resultierte in einer Sättigung (**Abb. 33B**).

3.4. Analyse der Interaktion verschiedener Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien mit Thrombospondin-1

Das Peptidoglykan ist nicht nur der Hauptbestandteil der Pneumokokkenzellwand, sondern ist Hauptzellwandstrukturkomponente aller Gram-positiver Bakterien. Da es in die Zellwand von Gram-negativen Bakterien dagegen nur als dünne Schicht zwischen der äußeren Membran und der Zytoplasmamembran eingelagert ist, konnte vermutet werden, dass eine mögliche Interaktion von Peptidoglykan mit TSP1 bei Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien unterschiedlich stark ist. Darum sollte zunächst getestet werden, ob repräsentative Gram-negative und Gram-positive Bakterien sowohl an lösliches als auch an immobilisiertes TSP1 binden. Anschließend sollte aufgeklärt werden, ob das zellgebundene TSP1 als Brückenmolekül für die Adhärenz von verschiedenen bakteriellen Spezies genutzt werden kann.

3.4.1. Gram-positive Bakterien interagieren mit löslichem und immobilisiertem Thrombospondin-1

Repräsentative Stämme verschiedener Spezies wurden auf eine Bindung an immobilisiertes und lösliches TSP1 getestet. Für die Analyse der bakteriellen Bindung an die immobilisierte Form des TSP1, wurden zunächst 3 µg TSP1 auf einer Plastikoberfläche immobilisiert und mit FITC-markierten Bakterienstämmen inkubiert. Nach einer 1-stündigen Inkubationszeit erfolgte die Analyse der Bindung im Fluorocan. Dabei konnten für alle getesteten Gram-positiven Bakterienstämme eine deutliche Interaktion mit immobilisiertem TSP1 nachgewiesen werden. Die höchste Bindung zeigte *S. aureus* (32% an TSP1 gebundene Bakterien). Die Bindungswerte von *S. pneumoniae* NCTC 10319 (20% Bindung), *Streptococcus pyogenes* (15%) und *Listeria monocytogenes* (9%) zeigten ebenfalls eine deutliche Bindung an das immobilisierte TSP1. Im Gegensatz dazu konnten keine von den verwendeten Gram-negativen Stämmen, *Escherichia coli* (1%), *Legionella pneumophila* (0,5%), *Haemophilus influenzae* (0,3%) und *Neisseria meningitidis* (1,5%) an immobilisiertes TSP1 binden. Um einen möglichen inhibitorischen Effekt der Kapselpolysaccharide auf die Bindung an TSP1 zu vermeiden, wurden für *H. influenzae* und *N. meningitidis* die kapsellosen Stämme *H. influenzae* Rd bzw. *N. meningitidis* MC58 Δ asiaD in den Versuchen eingesetzt (**Abb. 34**).

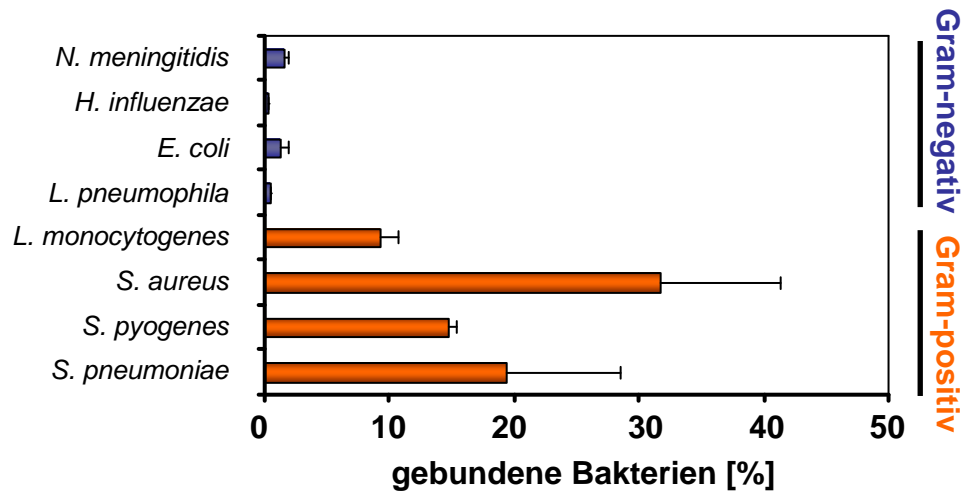


Abb. 34: Interaktion verschiedener Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien mit immobilisiertem TSP1. Bindungswerte von FITC-markierten Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien an 3 µg immobilisiertes TSP1 in Prozent. Der 100%-Wert entspricht der Menge eingesetzter FITC-markierter Bakterien im Versuch. Die Analyse der Bindung erfolgte im Fluorocan.

Bakterienstamm	gebundene Bakterien in %
<i>S. pneumoniae</i> NCTC 10319	19,35 ± 9,12
<i>S. pyogenes</i> M6	14,67 ± 0,64
<i>S. aureus</i> Cowan-1	31,76 ± 9,54
<i>L. monocytogenes</i> 1/2a	9,36 ± 1,30
<i>L. pneumophila</i> Corby	0,53 ± 0,03
<i>E. coli</i> 536	1,23 ± 0,62
<i>H. influenzae</i> RD	0,32 ± 0,04
<i>N. meningitidis</i> MC58 Δ asiaD	1,60 ± 0,27

Tab. 26: Interaktion verschiedener Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien mit immobilisiertem TSP1. Bindungswerte (in %) von FITC-markierten Gram-positiven und Gram-negativen Bakterienstämmen an immobilisiertes TSP1 (3 µg). Der 100%-Wert entspricht der Menge eingesetzter FITC-markierter Bakterien im Versuch.

Zusätzlich wurden Bindungsstudien mit 100 µg/ml löslichem, FITC-markiertem TSP1 und verschiedenen Gram-positiven Bakterien durchgeführt und im Durchflusszytometer gemessen (**Abb. 35**). Das lösliche TSP1 zeigte eine signifikante Bindung an alle getesteten Gram-positiven Bakterien (**Abb. 35A**). Die bei einer positiven Bindung deutlich nach rechts verschobenen Punktwolkendiagramme illustrieren die signifikante Bindung von löslichem TSP1 an Gram-positive Bakterien. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte zusätzlich, wie

schon für *S. pneumoniae*, eine konzentrationsabhängige Bindung von löslichem FITC-markiertem TSP1 an das Gram-positive Bakterium *S. aureus* gezeigt werden (Abb. 35B). FITC-markiertes, lösliches TSP1 zeigte dagegen eine vernachlässigbare Bindung an das Gram-negative Bakterium *E. coli* (Abb. 35B). Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass TSP1 spezifisch mit den getesteten Gram-positiven, nicht jedoch mit den getesteten Gram-negativen Bakterien interagieren konnte.

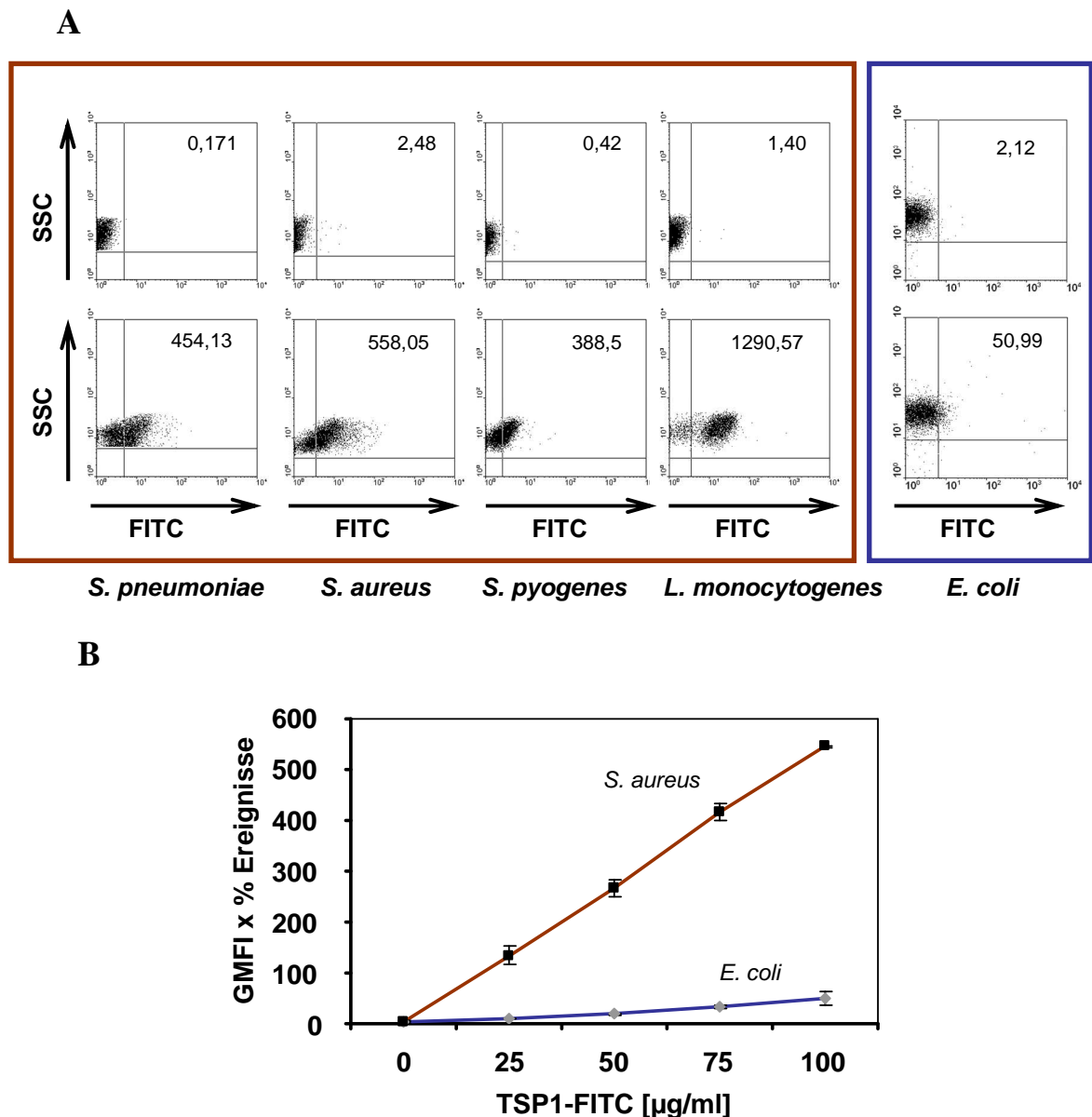


Abb. 35: Interaktion verschiedener Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien mit löslichem TSP1. **A**, Repräsentative Punktwolkendiagramme der Bindung von TSP1 (100 µg/ml) an verschiedene Gram-positive Bakterien (rot) und an *E. coli* (blau). SSC: side scatter, Maß für die Granularität. **B**, Konzentrationsabhängigkeit der TSP1-Bindung an *S. aureus* und an *E. coli*.

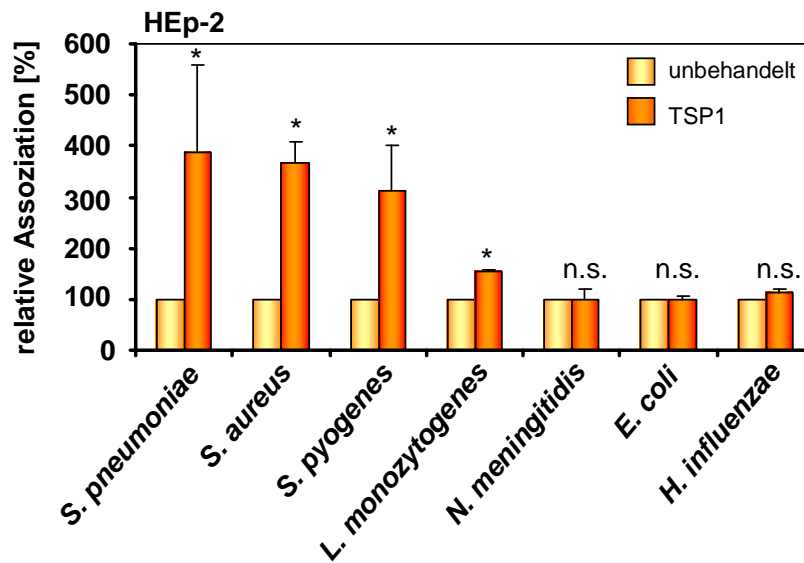
TSP1-FITC [$\mu\text{g/ml}$]	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
0	1,87 \pm 1,64	4,31 \pm 3,11
25	10,95 \pm 0,63	134,08 \pm 19,05
50	18,58 \pm 0,78	265,83 \pm 16,18
75	32,49 \pm 3,90	415,52 \pm 16,51
100	50,50 \pm 12,82	546,12 \pm 1,41

Tab. 27: Bindungswerte (GMFI x % Ereignisse) der Bindung von löslichem, FITC-markiertem TSP1 an *E. coli* und *S. aureus*.

3.4.2. Thrombospondin-1 vermittelt die Adhärenz von Gram-positiven Bakterien an humane Wirtszellen

In Bindungsstudien mit immobilisiertem und löslichem TSP1 konnte gezeigt werden, dass alle in den Versuchen eingesetzten Gram-positiven Bakterien mit TSP1 interagieren konnten. Es wurden Infektionsversuche mit HEp-2 Epithelzellen durchgeführt, um zu testen, ob eine Rekrutierung des TSP1 bei Gram-positiven Bakterien, wie schon für *S. pneumoniae* gezeigt, ebenfalls zu einer gesteigerten Adhärenz an die Wirtszellen führte. Dafür wurden jeweils 3 μg TSP1 pro Infektionsansatz auf HEp-2 Zellen immobilisiert und die Zellen anschließend mit verschiedenen Stämmen pathogenen und apathogenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien infiziert. Nach 2 h wurden die zellassoziierten (adhärenten und invasiven) Bakterien in geeigneten Verdünnungen auf entsprechenden Festmedien ausplattiert. Die Assoziation wurde durch das Auszählen der Kolonie-bildenden-Einheiten (CFU) bestimmt (**Abb. 36**).

A



B

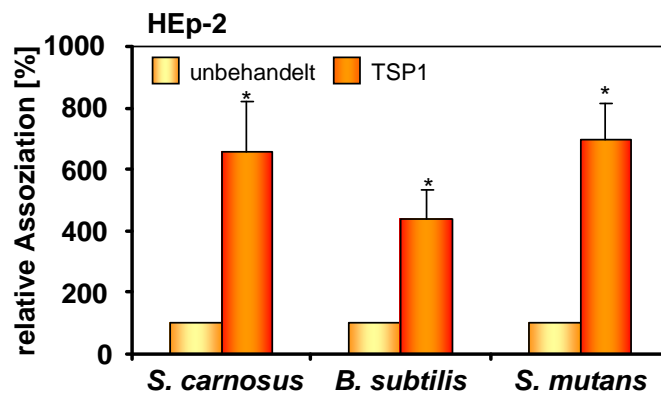


Abb. 36: Einfluss von TSP1 auf die Assoziation von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien an HEp-2 Epithelzellen. **A**, TSP1 vermittelte Assoziation von Gram-positiven und von Gram-negativen pathogenen Spezies an HEp-2 Zellen. **B**, TSP1 vermittelte Assoziation von Gram-positiven apathogenen Bakterien an HEp-2 Epithelzellen. HEp-2 Zellen wurden für 2 h mit den verschiedenen Bakterien infiziert, die Anzahl assoziierter Mikroorganismen wurde durch anschließendes Ausplattieren der Bakterien und Auszählen der Kolonien ermittelt. Die Infektionen wurden in An- bzw. Abwesenheit von 3 μg zellgebundenem TSP1 durchgeführt. Die Anzahl assoziierter Bakterien in Abwesenheit von TSP1 wurde als 100% definiert. Ein p -Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant (*) angesehen (n.s.: nicht signifikant).

Bakterienstämme	relative Assoziation [%]		
	unbehandelt	TSP1	p
<i>S. pneumoniae</i> NCTC 10319	100	389,1 ± 169,38	0,04168
<i>S. aureus</i> Cowan-1	100	367,75 ± 38,58	0,00027
<i>S. pyogenes</i> M6	100	313,01 ± 87,41	0,01346
<i>L. monocytogenes</i> 1/2a	100	155,59 ± 1,92	2,3 × 10 ⁻⁷
<i>N. meningitidis</i> MC58 Δ siaD	100	98,21 ± 20,12	0,88501
<i>E. coli</i> 536	100	100,37 ± 4,71	0,89720
<i>H. influenzae</i> RD	100	113,40 ± 5,91	0,00515
<i>S. carnosus</i> TM300	100	654,69 ± 165,99	0,00442
<i>B. subtilis</i> 168	100	435,58 ± 100,83	0,00123
<i>S. mutans</i> UA159	100	697,95 ± 117,80	0,00024

Tab. 28: Einfluss von TSP1 auf die Assoziation von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien an HEp-2 Epithelzellen. TSP1 abhängige und unabhängige relative Assoziation (in %) verschiedener Bakterienstämme an HEp-2 Zellen nach einer 2-stündigen Infektion. Die Anzahl assoziierter Bakterien wurde durch Ausplattieren der Bakterien und Auszählen der Kolonien ermittelt. Die Assoziation der Bakterien in Abwesenheit von TSP1 wurde als 100% definiert. Ein *p*-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

Dabei konnte für die pathogenen Gram-positiven Bakterien *S. aureus*, *S. pyogenes* und *L. monocytogenes* in Anwesenheit von TSP1 eine signifikant erhöhte Assoziation der Bakterien an die Wirtszellen nachgewiesen werden. Die verwendeten Gram-negativen Bakterien *N. meningitidis*, *E. coli* und *H. influenzae* konnten nicht mit TSP1 interagieren und das zellgebundene TSP1 nicht zu einer Anheftung an HEp-2 Epithelzellen nutzen (**Abb. 36A**). Die apathogenen Gram-positiven Bakterien *Staphylococcus carnosus*, *Bacillus subtilis* und *Streptococcus mutans* konnten wie die pathogenen Bakterien das TSP1 für eine gesteigerte Assoziation mit den HEp-2 Wirtszellen nutzen (**Abb. 36B**).

In Infektionsversuchen in der Zellkultur wurde die Wirkung eines anti-TSP1 Antikörpers (mAB 6.1, Calbiochem) auf eine TSP1 vermittelte bakterielle Adhärenz getestet. Dafür wurden HEp-2 Zellen nach der Immobilisierung des TSP1 auf der Wirtszelloberfläche mit dem TSP1-blockierenden Antikörper für 30 min inkubiert. Vor der Infektion mit *S. pneumoniae* NCTC 10319 bzw. mit *S. aureus* MA12 wurde der Antikörper entfernt. Die

Assoziation der Bakterien an die Wirtszellen wurde durch Ausplattieren und Auszählen der Kolonie-bildenden Einheiten bestimmt.

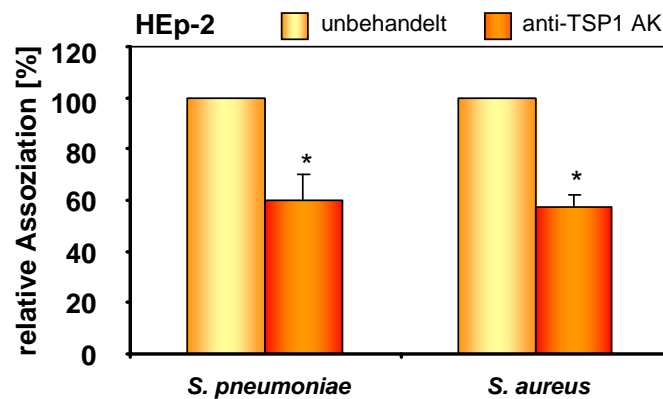


Abb. 37: Einfluss eines TSP1-blockierenden Antikörpers auf die TSP1 vermittelte Assoziation von *S. pneumoniae* und von *S. aureus* an HEp-2 Wirtszellen. Assoziation von *S. p.* NCTC 10319 Δ *ply* und *S. aureus* MA12 an HEp-2 Epithelzellen nach der Inkubation des zellgebundenen TSP1 (3 μ g/ml) mit einem anti-TSP1 Antikörper (1:200, Calbiochem). Die Infektionen wurden über 2 h durchgeführt. Die Anzahl der assoziierten Bakterien wurde durch Ausplattieren und Auszählen der Kolonie-bildenden Einheiten erhalten. Ein *p*-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant (*) angesehen.

Stamm	relative Assoziation [%]		
	TSP1	TSP1 + anti-TSP1	<i>p</i>
<i>S. pneumoniae</i> NCTC 10319	100	59,98 \pm 10,17	0,00242
<i>S. aureus</i> MA12	100	57,22 \pm 4,79	0,00010

Tab. 29: Einfluss eines TSP1-blockierenden Antikörpers auf die TSP1 vermittelte Assoziation von *S. pneumoniae* NCTC 10319 und von *S. aureus* MA12 an HEp-2 Wirtszellen. Die Tabelle zeigt die relativen Assoziationswerte (in %) der TSP1 vermittelten Assoziation von *S. pneumoniae* und von *S. aureus* in An- bzw. Abwesenheit des anti-TSP1 Antikörpers (1:200, Calbiochem). Die Assoziation der Bakterien mit den TSP1-behandelten Wirtszellen (3 μ g/ml) in Abwesenheit des blockierenden Antikörpers wurde als 100% definiert. Ein *p*-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

Der TSP1-blockierende Antikörper hatte für *S. pneumoniae* und *S. aureus* einen signifikant inhibierenden Effekt auf die TSP1 vermittelte Anheftung an HEp-2 Wirtszellen. Durch den Einsatz des Antikörpers konnte die Assoziation der getesteten Gram-positiven Bakterien im Vergleich zu nicht blockiertem, zellgebundenem TSP1 um ca. 40% reduziert werden (Abb. 37).

Insgesamt zeigten die Bindungsstudien und die Infektionen in der Zellkultur, dass es einen signifikanten Unterschied in der bakteriellen Bindung des TSP1 zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien gibt. Die Tatsache, dass sowohl pathogene als auch apathogene Gram-positive Bakterien das TSP1 für eine gesteigerte Adhärenz an die Wirtszellen rekrutieren konnten, deutete auf einen allgemeingültigen Mechanismus dieser Interaktion hin.

3.4.3. Untersuchungen zur chemischen Natur des Adhäsins Gram-positiver Bakterien für Thrombospondin-1

Es ist bekannt, dass bakterielle Pathogene, wie z. B. *Staphylococcus aureus* oder *Streptococcus pyogenes*, bei einer Kolonisierung des Wirtes an Komponenten der extrazellulären Matrix binden können (Dinkla *et al.*, 2003; Foster and Hook, 1998). Diese Adhärenz wird häufig durch adhäsive bakterielle Proteine vermittelt, die kovalent an Peptidoglykan gebunden sind. Allerdings können nicht nur Proteine, sondern auch andere Oberflächenstrukturen, wie Polysaccharide und Lipide eine Anheftung des Pathogens an die Wirtsstrukturen vermitteln.

Durch die proteolytische Behandlung der Pneumokokken konnte in dieser Arbeit in den Infektionsversuchen ein bakterielles Protein der Pneumokokken als Adhäsins für TSP1 ausgeschlossen werden (siehe auch 3.3). Im Folgenden wurde die Interaktion anderer Gram-positiver Bakterien mit TSP1 charakterisiert, um zu klären, ob es sich bei der bakteriellen Interaktion mit TSP1 eventuell um einen allgemeingültigen Mechanismus handelte. Dafür wurden auch *S. aureus* und *S. pyogenes* vor einer Infektion der Wirtszellen mit dem proteolytischen Enzym Pronase E behandelt. Die Anzahl der wirtszellassoziierten Bakterien wurde durch das Ausplattieren geeigneter Verdünnungen auf entsprechenden Agarplatten und Auszählen der Kolonie-bildenden Einheiten ermittelt. In den Infektionsversuchen konnte gezeigt werden, dass eine proteolytische Behandlung von *S. aureus* und *S. pyogenes* die TSP1 vermittelte und damit deutlich gesteigerte Assoziation der Bakterien nicht verhinderte (**Abb. 38**). Bei dem bakteriellen Adhäsins für TSP1 konnte es sich also auch bei *S. aureus* und *S. pyogenes* nicht um ein Protein handeln. Bemerkenswert war weiterhin, dass die Ergebnisse der Infektionen mit proteolytisch behandelten Bakterien eine vollständige Inhibition der TSP1 unabhängigen Adhärenz für *S. pneumoniae* NCTC 10319 und für *S. pyogenes* zeigten. Die TSP1 unvermittelte Adhärenz von *S. aureus* an HEp-2 Wirtszellen war dagegen durch die Pronase E-Behandlung nicht vollständig inhibierbar (**Abb. 38**).

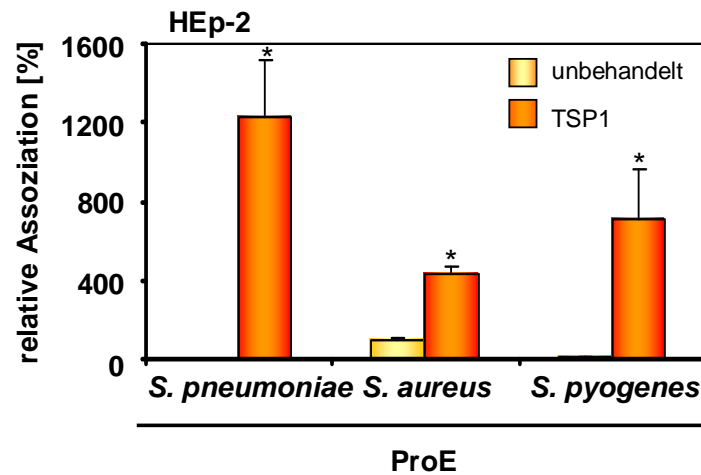


Abb. 38: Das Adhäsins Gram-positiver Bakterien für TSP1 ist kein Protein. TSP1 vermittelte Assoziation von Pronase E (ProE) behandelten *S. pneumoniae* (NCTC 10319), *S. aureus* und *S. pyogenes* an HEp-2 Zellen. Die Infektionen wurden ohne TSP1 bzw. mit 3 µg/ml immobilisiertem TSP1 für 2 h durchgeführt. Die Anzahl assoziierter Bakterien wurde durch Ausplattieren und Auszählen der Kolonien ermittelt. Die Assoziation der Bakterien ohne Pronase E-Behandlung in Abwesenheit von TSP1 wurde als 100% definiert. Ein *p*-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant (*) angesehen.

Pronase E-behandelte Bakterien	relative Assoziation [%]		
	unbehandelt	TSP1	<i>p</i>
<i>S. pneumoniae</i> NCTC 10319	0,38 ± 0,54	1225,45 ± 290,55	0,00049
<i>S. aureus</i> Cowan-1	93,29 ± 9,48	437,19 ± 27,60	8,6 × 10 ⁻⁶
<i>S. pyogenes</i> M6	7,33 ± 0,95	715 ± 247,49	0,00218

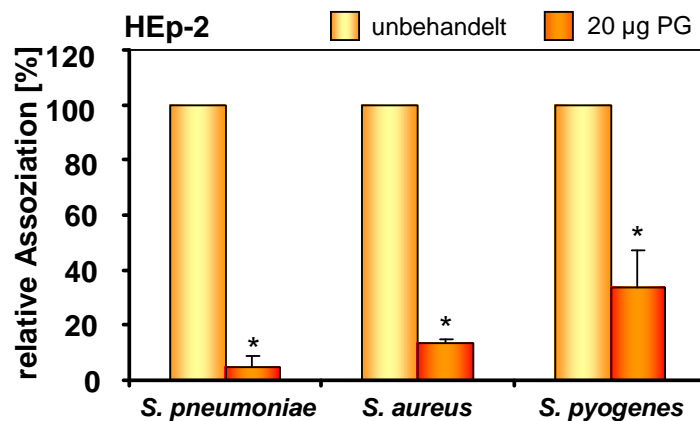
Tab. 30: Das Adhäsins Gram-positiver Bakterien für TSP1 ist kein Protein. Relative Assoziation von Pronase E-behandelten Gram-positiven Bakterien an HEp-2 Zellen. Die Infektionen wurden in An- bzw. Abwesenheit von zellgebundenem TSP1 (3 µg/ml) durchgeführt. Die Anzahl assoziierter Bakterien wurde durch Ausplattieren der Bakterien und Auszählen der Kolonien ermittelt. Ein *p*-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

3.4.4. Identifizierung des Adhäsins Gram-positiver Bakterien für Thrombospondin-1

Durch Inhibitionsversuche in der Zellkultur konnte Peptidoglykan als das TSP1-Adhäsins für *S. pneumoniae* identifiziert werden. Nun sollte analysiert werden, ob sich die TSP1 vermittelte Adhärenz anderer Gram-positiver Bakterien an Wirtszellen ebenfalls durch Peptidoglykan inhibieren ließ. In Infektionsexperimenten sollte die TSP1 vermittelte Assoziation von *S. aureus* und *S. pyogenes* an HEp-2 Zellen mit 20 µg Peptidoglykan pro

Infektionsansatz reduziert werden. Die Zahl wirtszellassoziierter Bakterien wurde im Plattierungsversuch ermittelt. Ähnlich wie für *S. pneumoniae* NCTC 10319 konnte das Peptidoglykan die TSP1 vermittelte Assoziation von *S. aureus* und *S. pyogenes* an Wirtszellen signifikant inhibieren (**Abb. 39A**).

A



B

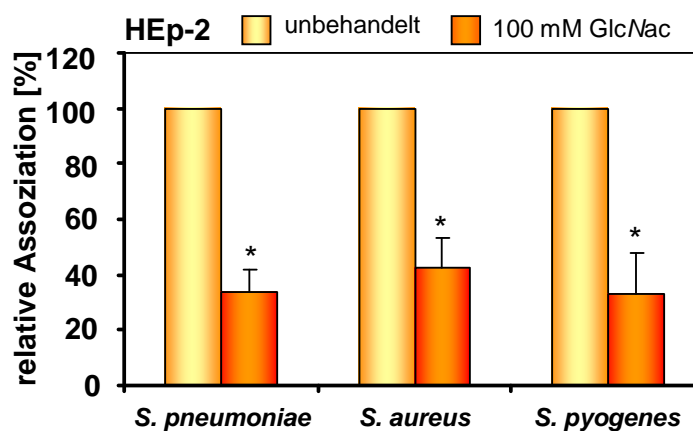


Abb. 39: Einfluss von Peptidoglykan und *N*-Acetylglukosamin auf die TSP1 vermittelte Assoziation von *S. pneumoniae* (NCTC 10319), von *S. aureus* und von *S. pyogenes* mit HEp-2 Zellen. **A**, Die Infektionsversuche mit HEp-2 Epithelzellen (+ 3 µg/ml TSP1) wurden in An- bzw. Abwesenheit von 20 µg Peptidoglykan (PG) pro Infektionsansatz durchgeführt. Die Assoziation der Bakterien mit den Zellen in Abwesenheit von Peptidoglykan wurde als 100% definiert. **B**, Die Infektionsversuche mit HEp-2 Epithelzellen (+ 3 µg/ml TSP1) wurden in An- bzw. Abwesenheit von 100 mM *N*-Acetylglukosamin (GlcNac) pro Infektionsansatz durchgeführt. Die Assoziation der Bakterien mit den Zellen in Abwesenheit von GlcNac wurde als 100% definiert. Die Anzahl assoziierter Bakterien wurde durch Ausplattieren der Bakterien und Auszählen der Kolonien ermittelt. Ein *p*-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant (*) angesehen.

Infektionsversuche in der Zellkultur zeigten ebenfalls einen inhibitorischen Effekt von 100 mM *N*-Acetylglukosamin auf die TSP1 vermittelte Assoziation von *S. aureus* und *S. pyogenes* an Epithelzellen (**Abb. 39B**). Dieses Ergebnis veranschaulicht, dass der Peptidoglykan vermittelte Prozess einer bakteriellen Interaktion mit TSP1 aller Voraussicht nach einen allgemeingültigen Mechanismus repräsentiert.

Bakterien	relative Assoziation [%]		
	TSP1	TSP1 + 20 µg PG	<i>p</i>
<i>S. pneumoniae</i> NCTC 10319	100	4,90 ± 3,58	3,3 × 10 ⁻⁷
<i>S. aureus</i> Cowan-1	100	13,17 ± 1,61	2,0 × 10 ⁻⁸
<i>S. pyogenes</i> M6	100	33,88 ± 13,05	0,00024
	TSP1	TSP1 + 100 mM GlcNac	<i>p</i>
<i>S. pneumoniae</i> NCTC 10319	100	33,68 ± 7,95	3,4 × 10 ⁻⁵
<i>S. aureus</i> Cowan-1	100	42,50 ± 10,64	0,00072
<i>S. pyogenes</i> M6	100	33,20 ± 14,51	0,00035

Tab. 31: Einfluss von Peptidoglykan und *N*-Acetylglukosamin auf die TSP1 vermittelte Assoziation von *S. pneumoniae* (NCTC 10319), von *S. aureus* und von *S. pyogenes* mit HEp-2 Zellen. Relative Assoziationswerte (in %) der TSP1 vermittelten Assoziation von Gram-positiven Bakterien in An- bzw. Abwesenheit von 20 µg Peptidoglykan (PG) pro Infektionsansatz. Die Assoziation der Bakterien mit zellgebundenem TSP1 (3 µg/ml) in Abwesenheit von PG wurde als 100% definiert. Die Anzahl assoziierter Bakterien wurde durch Ausplattieren der Bakterien und Auszählen der Kolonien ermittelt. Ein *p*-Wert von ≤ 0,05 wurde als signifikant angesehen.

3.5. Analyse der Interaktion zwischen Thrombospondin-1 und Wirtszellen

Um den Mechanismus der TSP1 vermittelten Adhärenz weiter aufzuklären, sollte der zelluläre Rezeptor für TSP1 auf den Wirtszellen identifiziert werden. Es ist bekannt, dass verschiedene Domänen im TSP1-Molekül eine Interaktion mit Oberflächenstrukturen von Wirtszellen vermitteln. Dazu gehören Glykosaminoglykane, wie z.B. Heparansulfat, Dermatansulfat und Chondroitinsulfat, sowie auch verschiedene Integrine. Weiterhin ist bekannt, dass sowohl Proteoglykane, als auch Integrine eine Adhärenz von Bakterien an Wirtszellen vermitteln können (Talay, 2005).

Um eine mögliche Beteiligung der zellulären Integrine an dieser Interaktion zu betrachten, wurde zunächst in der Durchflusszytometrie mit der Verwendung spezifischer Antikörper

geprüft, welche Integrine auf HEp-2 Zellen exprimiert werden, d.h. welche Integrine für eine Vermittlung der TSP1 vermittelten Adhärenz der Pneumokokken an die Wirtszellen zur Verfügung stehen. Dafür wurden HEp-2 Zellen mit Antikörpern inkubiert, die spezifisch gegen verschiedene Integrine gerichtet waren. Getestet wurde nur gegen diejenigen Integrine, die bekanntermaßen von den zahlreichen Bindungsstellen für Integrine im TSP1-Molekül erkannt werden können. In der Durchflusszytometrie wurden die an die HEp-2 Zellen gebundenen Antikörper mit Hilfe von Alexa 488-markierten Sekundärantikörpern detektiert. Zur Kontrolle wurden die Zellen nur mit dem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert und die Hintergrundfluoreszenz gemessen. Auf der Oberfläche von HEp-2 Zellen konnten Integrine der β_1 - und der β_3 -Familie detektiert werden (**Abb. 40**). Vor allem β_1 -Integrine wurden in hohem Maß auf den HEp-2 Larynx-Karzinomzellen exprimiert. Von der β_3 -Familie konnte das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin detektiert werden. Dagegen konnten CD36-Rezeptoren, $\alpha_5\beta_1$ - und $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrine nicht auf der Oberfläche von HEp-2 Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 40**).

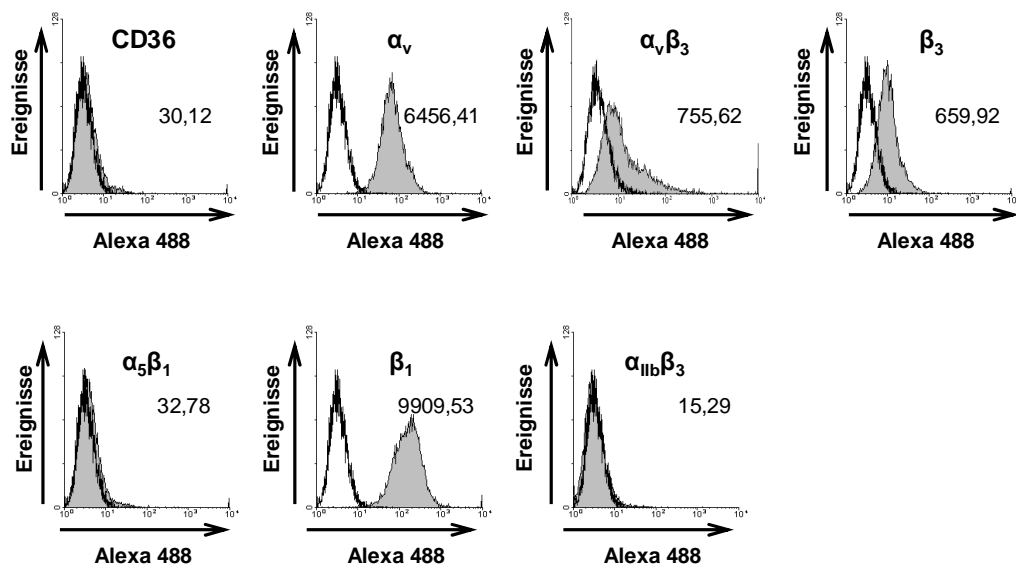


Abb. 40: Produktion verschiedener Integrine auf HEp-2 Zellen. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnten durch Integrin-spezifische Antikörper und Alexa 488-gekoppelte Sekundärantikörper verschiedene Integrine auf der Oberfläche von HEp-2 Epithelzellen detektiert werden. Repräsentative Histogramme zeigen die Expression (in GMFI x % Ereignisse, gemessen wurden 10 000 Ereignisse) verschiedener Integrine auf der Oberfläche von HEp-2 Zellen. Je weiter der Peak in den Histogrammen nach rechts verschoben war, desto mehr des jeweils detektierten Integrins wurde von den HEp-2 Zellen exprimiert. Grau unterlegt sind die Histogrammdata der getesteten Integrine, die Kontrollen mit Sekundärantikörper sind weiß unterlegt.

Bei einer Infektion würde eine Interaktion der Integrine mit dem TSP1-Molekül nicht nur in einer festen Bindung der Bakterien an die Wirtszelle resultieren, sondern auch eine Internalisierung der Mikroorganismen in die Epithel- und Endothelzellen fördern. Um eine Beteiligung der exprimierten Integrine an der TSP1 vermittelten Bindung an Wirtszellen zu testen, wurde in Gentamicin-Protektionsversuchen die bakterielle Invasion quantifiziert. Dabei sollte die TSP1 vermittelte Invasion von *S. pneumoniae* NCTC 10319 Δ *ply* in HEp-2 Epithelzellen mit blockierenden Antikörpern, die gegen die Integrine gerichtet waren, inhibiert werden. Die HEp-2 Wirtszellen wurden mit 10 μ g eines spezifischen Integrin-blockierenden Antikörpers für 30 min inkubiert. Der Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen der Zellen entfernt und 3 μ g TSP1 wurden durch eine 30-minütige Inkubation vor der Infektion mit *S. pneumoniae* NCTC 10319 Δ *ply* auf den HEp-2 Epithelzellen immobilisiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Blockierung der Integrine die TSP1 abhängige Invasion in diesen Versuchsansätzen nur in sehr geringem Maß inhibieren konnte. Immerhin konnte eine Inhibition der TSP1 vermittelten Invasion mit dem anti- $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Antikörper um 40% erreicht werden (**Abb. 41**). Eine um 30% verminderte TSP1 vermittelte Invasion durch den $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin spezifischen Antikörper konnte jedoch nicht erklärt werden, da das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ zuvor auf der Oberfläche der HEp-2 Zellen nicht detektiert werden konnte (vgl. auch **Abb. 40**). Somit konnte eine mögliche Beteiligung der hier getesteten Integrine an der TSP1 vermittelten Invasion nicht eindeutig nachgewiesen werden.

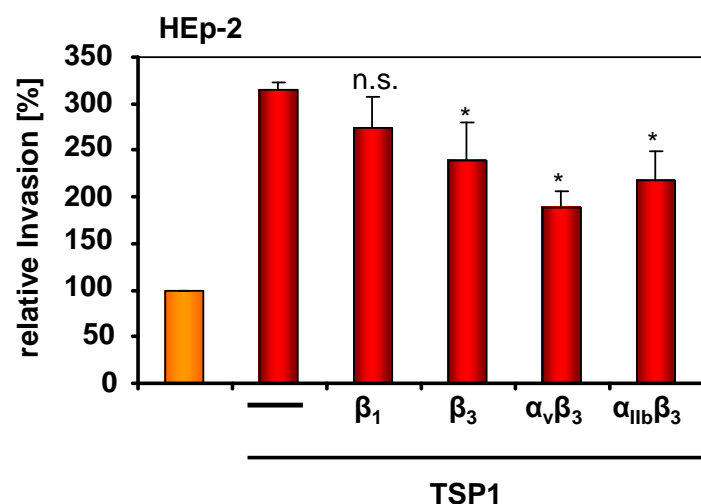


Abb. 41: Einfluss von Integrin-blockierenden Antikörpern auf die TSP1 vermittelte Invasion von *S. pneumoniae* NCTC 10319 in HEp-2 Zellen. Die Gentamicin-Protektionsversuche wurden in An- bzw. Abwesenheit von immobilisiertem TSP1 (3 μ g/ml) über 2 h durchgeführt. Die Anzahl invasiver Pneumokokken pro Wirtszelle in Abwesenheit von TSP1 und Antikörpern wurde als 100% definiert. Ein *p*-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant (*) angesehen (n.s.: nicht signifikant).

anti-Integrin AK	relative Invasion [%]		
	unbehandelt	TSP1	p
ohne	100	314,17 ± 9,20	
β ₁		274,33 ± 33,72	0,11960
β ₃		239,43 ± 40,19	0,03485
α _v β ₃		189,28 ± 16,18	0,00031
α _{IIb} β ₃		217,33 ± 31,01	0,00658

Tab. 32: Einfluss von Integrin-blockierenden Antikörpern auf die TSP1 vermittelte Invasion von *S. pneumoniae* NCTC 10319 in HEp-2 Zellen. Die Inhibitionen erfolgten durch eine Präinkubation der Epithelzellen mit verschiedenen anti-Integrin Antikörpern (AK). Die Anzahl invasiver Pneumokokken pro Wirtszellen ohne TSP1 und ohne Inhibitoren wurde als 100% definiert. Die Anzahl invasiver Bakterien wurde durch Ausplattieren der Bakterien und Auszählen der Kolonien ermittelt. Ein *p*-Wert von ≤ 0,05 wurde als signifikant angesehen.

Die N-terminale Heparinbindungsdomäne von TSP1 hat nicht nur Bindungsstellen für verschiedene Integrine, sondern auch für zelloberflächenlokalisierte Proteoglykane, wie z.B. Heparansulfat. Eine Bindung an Proteoglykanstrukturen der Wirtszelloberfläche ist essentiell für die Bindung und Internalisierung des TSP1-Moleküls und ermöglicht dadurch eine Regulation der Zell-Zell-Adhäsion (Elzie and Murphy-Ullrich, 2004). Eine mögliche Beteiligung von Proteoglykanen an der TSP1 vermittelten Adhärenz von Pneumokokken an Wirtszellen wurde untersucht, indem Wirtszellen mit dem Enzym Heparitinase behandelt wurden. Dieses Enzym bewirkt, dass oberflächenlokalisierte Proteoglykane abgespalten werden. Die Zahl adhärenter Bakterien wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung durch mikroskopisches Auszählen bestimmt.

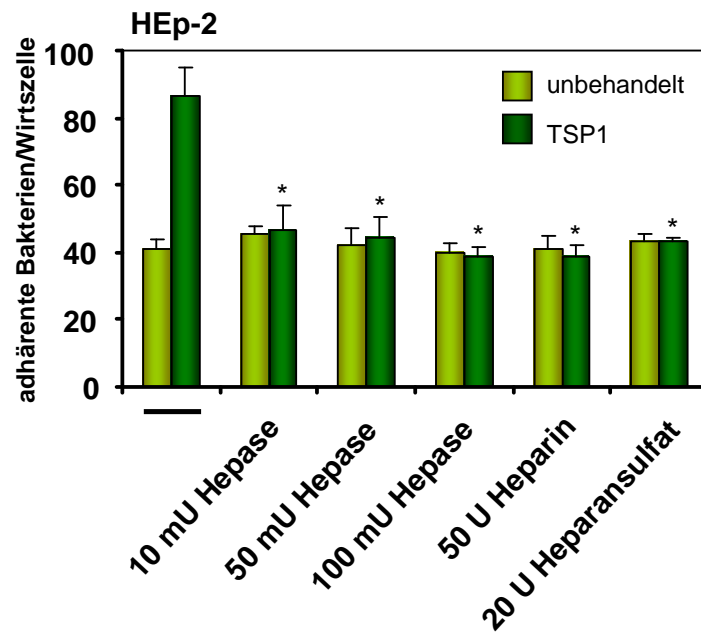


Abb. 42: Einfluss von Proteoglykanen auf die TSP1 vermittelte Adhärenz. Inhibition der Adhärenz von *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* (Serotyp 35A) an HEp-2 Epithelzellen durch Inkubation der Wirtszellen mit Heparitinase (Hepase) (10, 50 und 100 mU), bzw. durch Zugabe der Proteoglykane Heparin (50 U) und Heparansulfat (20 U) ins Infektionsmedium. Die Infektionen wurden in An- bzw. Abwesenheit von 3 μ g/ml immobilisiertem TSP1 über 3 h durchgeführt. Die Zahl adhärenter Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt. Ein *p*-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant (*) angesehen.

In Infektionsexperimenten mit den humanen HEp-2 Epithelzellen konnte die TSP1 vermittelte Adhärenz von *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* durch die Behandlung der Zellen mit Heparitinase vollständig reduziert werden. Schon eine Konzentration von 10 mU Heparitinase führte zu einer vollständigen Inhibition der TSP1 vermittelten Adhärenz von *S. pneumoniae* NCTC 10319 an HEp-2 Zellen (**Abb. 42**). Die Inhibitionsversuche mit Heparin (50 U) bzw. Heparansulfat (20 U) im Infektionsansatz zeigten ebenfalls, dass die TSP1 vermittelte Adhärenz der Pneumokokken von den Proteoglykanen auf der Zelloberfläche abhängig ist (**Abb. 42**).

	adhärente <i>S. pneumoniae</i> pro Wirtszelle		
	unbehandelt	TSP1	<i>p</i>
ohne	40,93 ± 3,15	86,38 ± 8,38	0,00024
10 mU Hepase	45,45 ± 2,19	46,65 ± 7,42	0,00096
50 mU Hepase	42,05 ± 5,30	44,45 ± 6,29	0,00060
100 mU Hepase	39,7 ± 2,83	38,7 ± 2,83	0,00019
50 U Heparin	41,15 ± 3,75	38,55 ± 3,75	0,00021
20 U Heparansulfat	43 ± 2,55	43,05 ± 1,20	0,00023

Tab. 33: Einfluss von Proteoglykanen auf die TSP1 vermittelte Adhärenz. Anzahl adhärenter Bakterien pro Wirtszelle bei der TSP1 vermittelten Adhärenz von *S.p.* NCTC 10319 Δ *ply* (Serotyp 35A) an HEp-2 Epithelzellen nach Inkubation der Wirtszellen mit Heparitinase (Hepase) (10, 50 und 100 mU), bzw. in Gegenwart der Proteoglykane Heparin (50 U) oder Heparansulfat (20 U). Die Infektionen wurden in An- bzw. Abwesenheit von 3 μ g/ml immobilisiertem TSP1 über 3 h durchgeführt. Die Zahl adhärenter Bakterien pro Wirtszelle wurde nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch bestimmt. Ein *p*-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Wirtszellproteoglykane eine essentielle Funktion bei der TSP1-geförderten bakteriellen Adhärenz an die Wirtszellen übernehmen. Um die Beteiligung von Integrinen an dem beschriebenen Mechanismus im Detail aufklären zu können, müssen noch weitere Versuche durchgeführt werden.

3.6. *In* bzw. *ex vivo* Studien zur Rolle von Thrombospondin-1 in Infektionsmodellen

3.6.1. Ratten Endokarditis/Sepsis-Modell

Thrombospondin-1 wird an Orten von Verletzungen besonders stark exprimiert. Dabei ist es vor allem für eine Blutplättchenaggregation und dadurch für einen Wundverschluss verantwortlich. Durch *in vitro* Bindungsstudien und Infektionsversuche konnte bereits eine bedeutende Rolle für das TSP1 bei der Infektion von Gram-positiven pathogenen und apathogenen Bakterien aufgezeigt werden. *In vivo* Studien sollten einen ersten Eindruck über die physiologische Relevanz des TSP1 im Infektionsprozess geben. In einem Ratten-Endokarditis/Sepsis-Modell wurde die Rolle von TSP1 bei einer Infektion mit *S. aureus* durch den Einsatz eines TSP1-blockierenden Antikörpers (monoklonaler AK, mAB 6.1 Calbiochem) getestet. Dieser Antikörper konnte in *in vitro* Infektionsversuchen die TSP1

vermittelte Adhärenz von *S. pneumoniae* NCTC 10319 und von *S. aureus* MA12 um ca. 40% reduzieren (**Abb. 37**). Im Folgenden wurde eine mögliche prophylaktische Wirkung des Antikörpers in einem Ratten Endokarditis/Sepsis-Infektionsmodell getestet. Dafür wurde in sechs Ratten jeweils ein Katheter von der Aorta in das Herz gelegt und somit eine Verletzung am Herzen bewirkt. Anschließend wurden drei Ratten mit jeweils 100 µg des anti-TSP1 Antikörpers behandelt, um das von den Thrombozyten als Antwort auf eine Verletzung sekretierte TSP1 zu blockieren. Alle Ratten wurden mit dem luminiszierenden *S. aureus* MA12 Stamm Xen 29 infiziert. Nach 24 h wurden Herz, Milz und beide Nieren entfernt, homogenisiert, das Homogenat ausplattiert und die Kolonie-bildenden Einheiten ausgezählt.

	ohne			100 µg anti-TSP1		
	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	Ratte 5	Ratte 6
	Kolonie-bildende Einheiten pro Organ					
Herz	3,33	66,67	1116,67	63300,00	26,67	323400,00
Milz	666,67	256,67	1523,33	93693,33	90,00	360200,00
Niere 1	3,33	133,33	333,33	11286,67	633,33	81306,67
Niere 2	750,00	1363,33	5153,33	6340,00	2833,33	225413,33
Blut	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	330,00

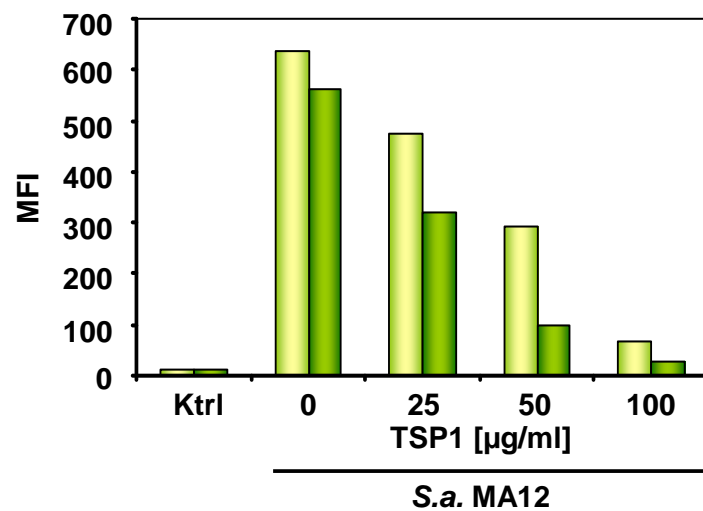
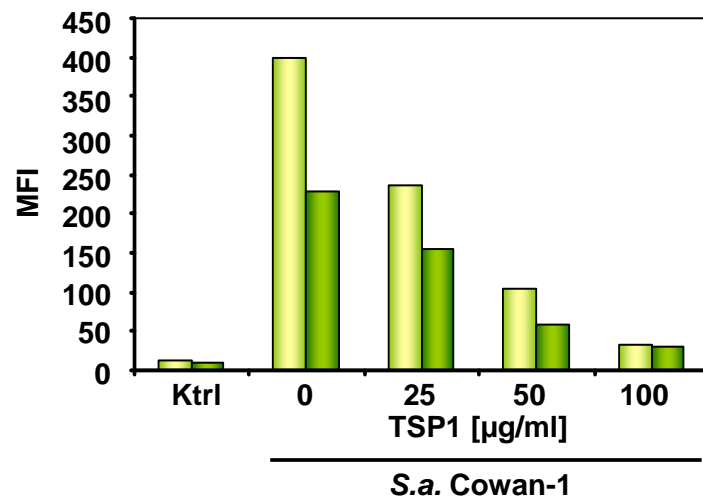
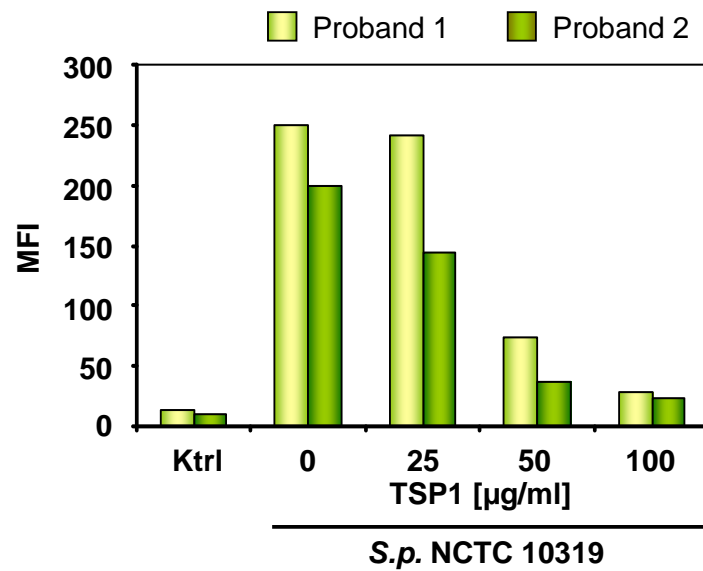
Tab. 34: Effekt des anti-TSP1 Antikörpers in einem Ratten-Endokarditis Modell. Aufgelistet sind die Werte der Kolonie-bildenden Einheiten pro Organ nach einer 24-stündigen Infektion der Ratten mit dem *S. aureus* MA12 Stamm Xen 29.

Es konnte gezeigt werden, dass vor allem diejenigen Ratten, die mit dem Antikörper behandelt wurden, eine höhere Vegetation am Herz, in der Milz und auch in den Nieren ausbildeten als die unbehandelten Ratten (**Tab. 34**). Es konnte kein prophylaktischer Effekt durch den Einsatz des anti-TSP1 Antikörpers, wie zuvor in der Zellkultur gezeigt, im Lebendmodell erzielt werden. Dieses Ergebnis muss in weiteren Versuchen näher untersucht und dazu der Versuchsaufbau weiter etabliert werden.

3.6.2. Untersuchungen zur Rolle des humanen Thrombospondin-1 bei der Phagozytose von Gram-positiven Bakterien durch primäre Granulozyten

Zur Untersuchung der Rolle von TSP1 auf die Opsonophagozytose durch Granulozyten, wurden FITC-markierte *S. pneumoniae* NCTC 10319 bzw. FITC-markierte *S. aureus*-Stämme

Cowan-1 und MA12 für 30 min mit frisch aufgereinigten Granulozyten in Gegenwart von aufsteigenden Konzentrationen TSP1 (0-100 µg/ml) inkubiert.

A

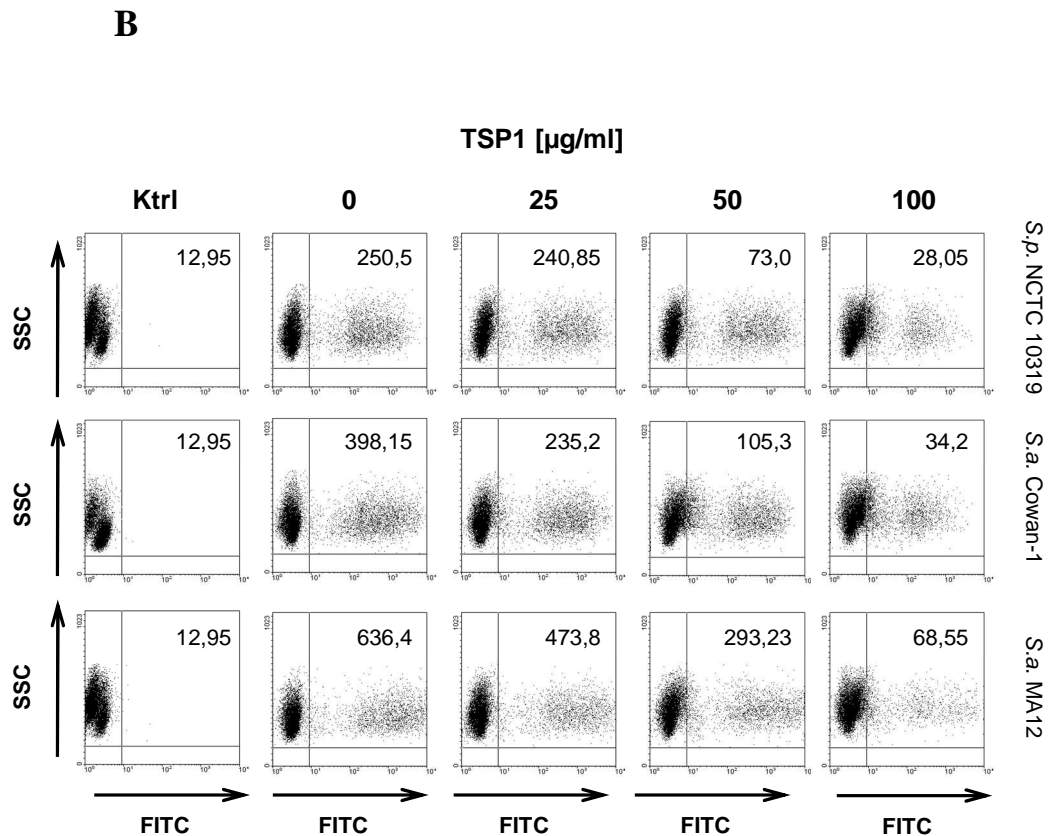


Abb. 43: Einfluss von TSP1 auf die Opsonophagozytose von *S. pneumoniae* NCTC 10319, von *S. aureus* Cowan-1 und von *S. aureus* M12 durch primäre Granulozyten. **A**, TSP1 inhibiert konzentrationsabhängig die Opsonophagozytose von verschiedenen Gram-positiven Mikroorganismen. Die FITC-markierten Bakterien wurden in Gegenwart von aufsteigenden TSP1-Konzentrationen mit frisch isolierten Granulozyten zweier Probanden für 30 min inkubiert. Das Verhältnis von Bakterien zu Granulozyten im Infektionsansatz war 1:200. Die Phagozytose wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie quantifiziert und als MFI (mittlere Fluoreszenz-Intensität) der Granulozyten-Population dargestellt. **B**, Repräsentative Punktwolkendiagramme der Phagozytose von FITC-markierten *S. pneumoniae* NCTC 10319, von *S. aureus* Cowan-1 und von *S. aureus* MA12 durch Granulozyten (Proband 1) in Anwesenheit von aufsteigenden TSP1-Konzentrationen. Ktrl: Kontrolle, keine Inkubation der Granulozyten mit FITC-markierten Bakterien. SSC: side scatter, Maß für die Granularität.

Die Phagozytose erfolgte in Gegenwart von TSP1, um die physiologischen Bedingungen im menschlichen Wirt möglichst genau *ex vivo* zu simulieren. Im Blut liegt das TSP1 löslich und ebenso immobilisiert auf der Oberfläche von verschiedenen Zellen, u.a. auch auf Effektorzellen der humoralen Immunabwehr vor. Die Opsonophagozytose der Bakterien durch die Granulozyten wurde im Durchflusszytometer analysiert (**Abb. 43**). Die Zugabe von TSP1 zum Phagozytoseansatz resultierte in einer reduzierten Phagozytose der Bakterien. Die Opsonophagozytose der getesteten Pneumokokken und Staphylokokken wurde durch die

Zugabe von TSP1 in den Phagozytoseansatz konzentrationsabhängig inhibiert. Mit 100 µg/ml konnte die Phagozytose bei allen getesteten Stämmen nahezu vollständig inhibiert werden (**Abb. 43**). Diese Ergebnisse zeigten deutlich den durch TSP1 vermittelten anti-phagozytotischen Effekt auf *S. pneumoniae* NCTC 10319, auf *S. aureus* Cowan-1 und auf *S. aureus* MA12.

Stämme	TSP1 µg/ml				
	Ktrl	0	25	50	100
	MFI (Proband 1/Proband2)				
<i>S. pneumoniae</i> NCTC 10319	12,95/10,5	250,5/198,9	240,85/143,7	73/36,75	28,05/23,45
<i>S. aureus</i> Cowan-1	12,95/10,5	398,15/22,95	235,2/155,55	105,3/57,65	34,2/29,75
<i>S. aureus</i> MA12	12,95/10,5	636,4/560,2	473,8/320,8	293,25/98,0	68,55/29,25

Tab. 35: Einfluss von TSP1 auf die Opsonophagozytose von *S. pneumoniae* NCTC 10319, von *S. aureus* Cowan-1 und von *S. aureus* M12 durch Granulozyten. Aufgelistet sind die MFIs (mittlere Fluoreszenzintensitäten, Mittelwerte aus Doppelwerten) der Granulozyten von Proband 1 (schwarz) und von Proband 2 (grau), inkubiert mit FITC-markierten *S. pneumoniae* NCTC 10319, *S. aureus* Cowan-1 und *S. aureus* MA12. Ktrl: Kontrolle, keine Inkubation der Granulozyten mit FITC-markierten Bakterien.

4. Diskussion

Streptococcus pneumoniae ist ein natürlicher Kommensale des Menschen und besiedelt bei bis zu 60% der Normalbevölkerung asymptomatisch den unteren und oberen Respirationstrakt. Weiterhin stellen die Pneumokokken einen der wichtigsten Erreger von Atemwegsinfektionen und lebensbedrohlichen invasiven Erkrankungen dar. Eine Voraussetzung für ein Vordringen der Pneumokokken in tiefere Gewebe ist ihre Fähigkeit die Epithel- bzw. Endothelbarriere zu durchbrechen. Dadurch bekommen sie Zugang zu submukosalen Strukturen wie auch zum Blut. Diese Vorgänge werden durch die bakterielle Expression verschiedener Virulenzfaktoren ermöglicht. Dabei sind vor allem verschiedene Oberflächenmoleküle der Pneumokokken wie Proteine, oberflächenlokalisierte Toxine und auch Kohlenhydratstrukturen als wichtige Virulenz-Faktoren identifiziert worden. Sie ermöglichen durch eine spezifische Interaktion mit den verschiedenen Wirtsstrukturen eine Adhäsion an und Invasion in verschiedene Gewebetypen. Weiterhin verfügen die Erreger über Mechanismen zum Schutz vor dem Immunsystem.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *S. pneumoniae* und andere Gram-positive Bakterien wie *S. aureus*, *S. pyogenes* und *L. monocytogenes* mit dem humanen matrizellulären Glykoprotein TSP1 interagieren können. Vor allem am Beispiel von *S. pneumoniae* konnte gezeigt werden, dass durch eine Rekrutierung des TSP1 eine Adhärenz und Invasion von Gram-positiven Bakterien in humane Wirtszellen deutlich gesteigert werden konnte. Dabei wurde das Peptidoglykan als bakterielles Adhäsion für TSP1 identifiziert.

4.1. Bedeutung von Thrombospondin-1 für die Anheftung von *S. pneumoniae* an humane Wirtsstrukturen

TSP1 ist ein multifunktionelles und multimeres Calcium-bindendes Glykoprotein, welches als Brückenmolekül in der Zell-Zell-Interaktion, wie auch in der Zell-Matrix-Interaktion eine bedeutende Rolle spielt. Durch eine Vielzahl an Domänen und Bindungsstellen kann es an verschiedene Wirtsmoleküle binden, darunter an Fibrinogen, Fibronectin und andere Proteine der extrazellulären Matrix (Adams, 2004). TSP1 wird von verschiedenen Zellen gebildet, wobei den Thrombozyten eine besondere Bedeutung zukommt. Durch eine Thrombin-

Aktivierung der Blutplättchen als Antwort auf eine bakterielle Infektion oder als Reaktion auf Verletzungen kommt es zu einer Sekretion der Inhalte der α -Granula der Thrombozyten. Dabei werden u.a. große Mengen an TSP1 freigesetzt, das in der normalen Physiologie des Wirtes vor allem für eine Aggregation der Blutplättchen und damit für einen schnellen Wundverschluß verantwortlich ist. Thrombozyten bieten Pathogenen eine adhäsive Oberfläche auf verletztem Gewebe, welche die Erreger zur Adhärenz und als Vehikel für einen Transfer in andere Wirtsbereiche nutzen können. Aufgrund dieser möglichen pathogenetischen Bedeutung der Thrombozyten und dem Umstand, dass aktivierte Blutplättchen große Mengen an TSP1 produzieren, wurde im ersten Teil der Arbeit eine mögliche Bindung der Pneumokokken an Thrombozyten untersucht. Dabei zeigten *S. pneumoniae*-Stämme eine Bindung an Thrombin-aktivierte Blutplättchen. Es konnten deutliche Unterschiede in der Bindung an Thrombozyten zwischen unbekapselten, schwach bekapselten und stark bekapselten *S. pneumoniae*-Stämmen nachgewiesen werden. Das Pneumokokken-Kapselpolysaccharid hat dabei einen negativen Einfluss auf eine bakterielle Interaktion mit den Thrombozyten. In anderen Studien konnte bereits eine Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten nach einer Thrombin-Aktivierung der Blutplättchen nachgewiesen werden (Niemann *et al.*, 2004). Dabei wurde gezeigt, dass es an der Thrombozyten-Oberfläche zu einer Komplexbildung zwischen Fibrin und Thrombospondin-1 kommt. Diesen Komplex kann *S. aureus* für eine Adhäsion an die Thrombozyten ausnutzen. Dadurch wurde ein Modell postuliert, in dem das Thrombospondin-1 nur indirekt an einer Adhäsion der Bakterien an die Thrombozyten beteiligt ist. Weiterhin konnte für die Matrixmoleküle Fibrinogen, Fibronectin und für den von Willebrand Faktor eine Beteiligung an der Bindung von *S. aureus* an Blutplättchen nachgewiesen werden (Fitzgerald *et al.*, 2006). Auf der Seite der Bakterien wurden für *S. aureus* verschiedene oberflächenassoziierte Proteine identifiziert, die eine Bindung an die Blutplättchen vermitteln und deren Aktivierung stimulieren können. Dabei haben vor allem ClfA/B und FnBPA/B eine besondere Bedeutung. Diese Proteine können über eine Interaktion mit einer Fibronectin- bzw. Fibrinogen-Brücke an den Thrombozytenoberflächenrezeptor GPIIb/IIIa binden. Auf diese Weise kommt es zu einer Aktivierung der Blutplättchen und zu einer Adhäsion der Mikroorganismen (Fitzgerald *et al.*, 2006; Heilmann *et al.*, 2004). Die Interaktion von *S. pneumoniae* mit Thrombozyten wurde auch in der Arbeit von Guckian (Guckian, 1975) bestätigt, jedoch waren bisher die beteiligten Bindungsmoleküle weder auf der Seite der Bakterien noch auf der Wirtseite bekannt (Fitzgerald *et al.*, 2006). Eine mögliche Rolle von TSP1 bei dieser Interaktion sollte daher untersucht werden. Dazu wurden die Bakterien mit dem sekretierten Proteinüberstand

von aktivierten Blutplättchen inkubiert. Mit Hilfe eines anti-Thrombospondin-1 Antikörpers, mit dem das aus dem Proteinüberstand an die Pneumokokken spezifisch gebundene TSP1 nachgewiesen wurde, konnte gezeigt werden, dass das Thrombospondin-1 eine Rolle bei dieser Interaktion spielt. Eine Rekrutierung des TSP1 durch *S. pneumoniae* direkt aus dem Blut könnte für die Bakterien ein wichtiger initialer Schritt bei der weiteren Pathogenese sein. TSP1 kann physiologisch in zwei verschiedenen Formen vorliegen. Einerseits als immobilisierte Form auf der Oberfläche von Thrombozyten und verschiedenen Endothel- bzw. Epithelzellen. Andererseits kommt es in löslicher Form im Blut vor. Zur Klärung der Frage, ob die Pneumokokken direkt an das Thrombospondin-1 binden können, wurden verschiedene Bindungsversuche mit löslichem und immobilisiertem TSP1 durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine direkte Interaktion von *S. pneumoniae* mit beiden Konformationen des TSP1. Dabei wurden die Charakteristika einer Rezeptor-vermittelten Interaktion erfüllt. Die Bindung war abhängig von der TSP1-Konzentration und der Menge der eingesetzten Mikroorganismen. Dabei zeigten sich wie bei der Adhäsion der Pneumokokken an Thrombozyten deutliche Stamm-spezifische Unterschiede. Stark bekapselte Stämme zeigten keine oder eine nur sehr geringe Interaktion mit löslichem bzw. immobilisiertem TSP1. Dagegen wurde bei unbekapselten und schwach bekapselten Stämmen eine signifikante Interaktion mit den verschiedenen Konformationen des TSP1 nachgewiesen. Der Einfluss des Kapselpolysaccharids wurde in weiteren Versuchen mit isogenen Kapselmutanten von verschiedenen Wildtypstämmen näher untersucht. Die Bindungsstudien zeigten dabei eine erhöhte TSP1-Bindung für die Kapselmutanten im Vergleich zu ihren isogenen Wildtypstämmen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass das Pneumokokken-Kapselpolysaccharid das oder die potentielle/n bakterielle/n Adhäsion/e für TSP1 maskiert. Eine Assoziation von Bakterien und TSP1 konnte bereits vor einigen Jahren mit dem Mikroorganismus *S. aureus* nachgewiesen werden (Herrmann *et al.*, 1991). Die Bindung zwischen Bakterien und TSP1 war spezifisch und Calcium-abhängig, wurde aber nicht weiter charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit konnte eine notwendige Anwesenheit von Calcium-Ionen in Bindungsstudien mit *S. pneumoniae* und TSP1 nicht bestätigt werden. Allerdings wurde bei Herrmann *et al.* diskutiert, dass nur besonders hohe Konzentrationen von TSP1 zur Verhinderung einer Aggregatbildung Calcium-Ionen benötigen.

Eine Infektion mit Pneumokokken wird vor allem durch Aerosole verbreitet und beginnt mit einer Adhäsion des Erregers an mukosale Epithelzellen des Nasenrachenraumes. Die Pneumokokken können im weiteren Verlauf der Infektion in das Mittelohr oder bei Versagen der verschiedenen Abwehrreaktionen der Schleimhäute in die Lungenepithelzellen eindringen

(Boulnois, 1992). Weiterhin kann es zu einem Übertritt der Bakterien in das Blut, zu einer Überquerung der Blut-Hirn-Schranke (Tuomanen *et al.*, 1985) und zu einer Bakterien-induzierten Aufnahme in Wirtszellen kommen (Hammerschmidt *et al.*, 2005). Bei all diesen Infektionsschritten sind verschiedene Adhäsine auf der Bakterien- wie auch Rezeptoren auf der Wirtsseite beteiligt. Der Einfluss von TSP1 auf das Adhärenz- und Invasionsverhalten von *S. pneumoniae* wurde entsprechend der Pathogenese mit verschiedenen eukaryontischen Wirtszellen untersucht. In den Infektionsexperimenten in der Zellkultur wurden humane Nasopharynx- (Detroit 562), Lungen- (A549), Larynx-Epithelzellen (HEp-2) und Hirnendothelzellen (HBMEC) als Modellzelllinie für die Blut-Hirn-Schranke eingesetzt.

In den Zellkultur-Experimenten wurde insbesondere der funktionelle Aspekt der Bindung der Pneumokokken an TSP1, mit TSP1 als möglichem Brückenmolekül zwischen Pneumokokken und humanen Wirtszellen, betrachtet. Dabei konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine Anheftung der Pneumokokken an wirtszellgebundenes TSP1 in einer deutlich erhöhten bakteriellen Adhärenz an und Invasion in die Wirtszellen resultiert. Wie in den Bindungsversuchen mit verschiedenen TSP1 Konformationen konnten auch hier eindeutige Merkmale einer Rezeptor-vermittelten Interaktion nachgewiesen werden. Die Adhärenz der Pneumokokken an die Wirtszellen war abhängig von der TSP1 Dosis in den Infektionsexperimenten, von der eingesetzten Menge der infizierenden Mikroorganismen, sowie von der Infektionsdauer. Der Adhärenz- und Invasions-verstärkende Effekt durch TSP1 konnte bei den getesteten Epithelzelllinien Detroit 562, A549 und HEp-2, wie auch bei der getesteten Endothelzelllinie HBMEC gezeigt werden. Insgesamt verdeutlichen die Infektionsversuche, dass zellgebundenes TSP1 von *S. pneumoniae* als Brückenmolekül genutzt werden kann und eine Adhärenz und Invasion in eukaryontische Wirtszellen vermittelt. Weiterhin wurde deutlich, dass die TSP1 vermittelte Interaktion zwischen Pneumokokken und Wirtszellen unabhängig von der Art der eukaryontischen Wirtszelle ist. Das Kapselpolysaccharid ist ein besonders essentieller Virulenzfaktor der Pneumokokken. Es bietet einen sehr effektiven Schutz vor der Immunabwehr des Wirtes und wird bei allen virulenten Stämmen exprimiert (AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995). Zur Charakterisierung der Anheftung von Pneumokokken an Wirtsstrukturen sollte auch ein Einfluss der Kapsel berücksichtigt werden, da diese möglicherweise Bindungsmoleküle auf der Bakterienoberfläche maskiert. Entsprechend konnte beobachtet werden, dass die Kapsel eine Adhäsion der Pneumokokken an Epithel- und Endothelzellen verhindern kann (Hammerschmidt *et al.*, 2005). In Infektionsmodellen in der Maus konnte gezeigt werden, dass der transparente Phänotyp, den nur wenig Kapselpolysaccharid umgibt, mukosale

Oberflächen weitaus erfolgreicher kolonisieren konnte als opaque, stark bekapselte Varianten (Weiser *et al.*, 2001). Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen konnte illustriert werden, wie die Pneumokokken während eines Infektionsprozesses die Ausbildung der Kapsel stadienspezifisch modulieren. Dadurch wird kurz vor einer Assoziation mit einer Wirtszelle die Stärke der Kapsel verringert und eine Freilegung der an einer spezifischen Adhärenz beteiligten bakteriellen Rezeptoren gewährt (Hammerschmidt *et al.*, 2005). Bindungsstudien mit der löslichen und der immobilisierten Form des TSP1 zeigten die unterschiedliche Bindung der verschiedenen Pneumokokkenstämme an das Glykoprotein TSP1. Da TSP1 die Adhärenz von *S. pneumoniae* an Wirtszellen vermittelt, wurde auch die Bedeutung des bakteriellen Kapselpolysaccharids bei einer TSP1 vermittelten Adhärenz an Wirtszellen untersucht. Dafür wurden Stämme mit unterschiedlicher Modulation der Kapsel und isogene Kapselmutanten in der Infektion eingesetzt. Es konnten drastische Unterschiede im Adhärenzverhalten der getesteten *S. pneumoniae*-Stämme aufgezeigt werden. Dabei hatte wiederum die Expression des Kapselpolysaccharids der Pneumokokken einen negativen Einfluss auf die TSP1 vermittelte Adhärenz. Somit wurde vermutet, dass durch das Kapselmaterial der Pneumokokken das für eine TSP1-Bindung notwendige bakterielle Adhäsion maskiert wird und das zellgebundene TSP1 mit dem Kapselpolysaccharid nicht interagieren kann. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Kapsel der Bakterien nicht generell eine Adhärenz an Oberflächen verhindert. Für *S. aureus* konnte gezeigt werden, dass an einer Kolonisierung von oralen Oberflächen und an der Bildung von Biofilmen vor allem die oberflächenlokalisierten Polysaccharide beteiligt sind. Dabei können bekapselte Bakterien u.a. eine adhäsive Oberfläche für andere Bakterien darstellen und somit die Biofilm- oder Plaquebildung begünstigen. Diese Interaktion wird zum Teil durch Lektin-Ligand Interaktionen zwischen Wirtszellen und bakteriellen Oberflächenpolysacchariden vermittelt (Costerton *et al.*, 1987).

Bei der Vermittlung einer erhöhten Anheftung der Pneumokokken an Wirtszellen durch TSP1 war die Art und Weise der Präinkubation der Zellen mit TSP1 von besonderer Bedeutung. Eine erhöhte Assoziation der Pneumokokken mit den Wirtszellen war nur durch eine Präinkubation der Wirtszellen mit TSP1 und anschließendem Entfernen des ungebundenen TSP1 zu erreichen. Dagegen wurde in Anwesenheit von überschüssigem TSP1 im Infektionsansatz die Adhärenz der Pneumokokken nicht gesteigert. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Pneumokokken bei Anwesenheit von zusätzlichem, löslichem TSP1 im Infektionsansatz zunächst an ungebundenes TSP1 binden und dadurch die Bindungsstellen auf ihrer Oberfläche für zellgebundenes TSP1 belegen. Somit könnte das immobilisierte TSP1

auf den Wirtszellen nicht mehr als Brückenmolekül für eine gesteigerte Adhäsion der Pneumokokken an die Wirtszellen fungieren. Daher wird vermutet, dass die lösliche und die immobilisierte Form des TSP1 über dieselben bakteriellen Oberflächenstrukturen der Pneumokokken gebunden werden.

Durch die Vielzahl seiner Bindungsstellen kann TSP1 an verschiedene Zelloberflächenrezeptoren binden. Strukturanalysen des TSP1 ergaben, dass es sich beim TSP1-Molekül um ein Trimer mit multiplen Domänen handelt. Es besteht aus einer N- und C-terminalen globulären Domäne und aus drei verbindenden Sequenzwiederholungsmotiven Typ 1, 2 und 3 (Lawler and Hynes, 1986). Für die verschiedenen Bereiche des TSP1-Moleküls konnten unterschiedliche Rezeptoren für eukaryontische Wirtszellen identifiziert werden. Dazu gehören das LRP (low density lipoprotein receptor-related protein), Proteoglykane, CD 36, CD 47 (IAP-integrin-associated protein) und verschiedene Integrine (Chen *et al.*, 2000). Eine besonders charakteristische Eigenschaft des TSP1-Moleküls ist seine Heparinbindung. Der N-terminale globuläre Teil des Moleküls wird auch als Heparin-Bindungs-Domäne (TSPN1) bezeichnet, weil vor allem hier verschiedene Sequenzen lokalisiert werden konnten, die eine hohe Heparin-Bindungsaktivität zeigen (Elzie and Murphy-Ullrich, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass diese Domäne neben der hohen Affinität zu Proteoglykanen auch für die Aufnahme des TSP1-Moleküls in Wirtszellen verantwortlich ist. Bei näherer Betrachtung des TSP1-Moleküls fiel auf, dass sich zwischen der N-terminalen globulären TSPN1-Domäne und der Trimerisations-Stelle eine Verknüpfung aus ca. 30 Aminosäuren befindet. Diese Verknüpfung stellt eine sehr flexible Struktur dar und ermöglicht es dem gesamten TSP1-Molekül verschiedene Orientierungen anzunehmen, um eine Bindung an unterschiedliche Liganden zu ermöglichen (Tan *et al.*, 2006). Bei einer Proteoglykan-Bindung des globulären N-Terminus wäre der Rest des Moleküls somit nutzbar für andere Interaktionen, wie z.B. für eine Bindung an ein bakterielles Adhäsin. Für verschiedene andere extrazelluläre Matrixproteine, wie z.B. auch für multimeres Vitronektin konnte bereits eine Interaktion mit Glykosaminoglykanen über Heparinbindungsstellen im Vitronektin-Molekül auf Endothelzellen beobachtet werden (Francois *et al.*, 1999). Proteoglykane werden auf nahezu allen Epithelzelltypen exprimiert. Dabei tragen Proteoglykane hauptsächlich Heparansulfat-Ketten. Das Heparansulfat Polysaccharid besteht aus alternierenden Einheiten von Hexuronsäure und D-Glukosamin-Einheiten, die an verschiedenen Positionen mit Sulfatgruppen substituiert sind und Bindungsstellen für Proteinliganden bieten (Kreuger *et al.*, 2006). Weitere wirtsoberflächenlokalisierte Rezeptoren sind die Integrine. Integrine sind Heterodimere, die aus einer α - und einer β -

Untereinheit aufgebaut sind und die eukaryontische Zellmembran als Transmembranproteine durchspannen. Integrine binden verschiedene Proteine der extrazellulären Matrix und sind an Zell-Zell-Interaktionen sowie an verschiedenen Signalkaskaden zur Internalisierung von Bakterien beteiligt (Hauck and Ohlsen, 2006; Hynes, 1987). In dieser Arbeit wurde durch Infektionsexperimente in der Zellkultur ein wichtiger wirtszellulärer Rezeptor identifiziert, der für die TSP1 vermittelte bakterielle Assoziation mit Wirtszellen verantwortlich ist. Eine Vorbehandlung der HEP-2 Zellen mit Heparitinase, eine anschließende Inkubation der Zellen mit TSP1 und eine Infektion mit *S. pneumoniae* konnte die TSP1 vermittelte Adhärenz vollständig auf das Niveau einer TSP1 unabhängigen Adhärenz reduzieren. Ebenfalls konnte eine kompetitive Inkubation der Wirtszellen mit Heparin bzw. Heparansulfat und TSP1 die TSP1 abhängige bakterielle Adhärenz stark reduzieren. Die TSP1 abhängige Anheftung der Pneumokokken an die Wirtszellen wird daher vermutlich über Proteoglykanstrukturen vermittelt. In anderen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Proteoglykane, dabei vor allem das Heparansulfat, eine Rolle bei der Adhärenz von Pneumokokken an nasopharyngeale Epithelzellen spielen. Heparansulfat konnte dabei durch Untersuchungen an der Oberfläche von mukosalen Epithelzellen lokalisiert werden (Tonnaer *et al.*, 2006). Inhibitionsversuche mit verschiedenen Integrin blockierenden Antikörpern konnten keine eindeutige Beteiligung der Integrine an der TSP1 vermittelten Adhärenz und Invasion von Pneumokokken zeigen. Ob die TSP1 vermittelte Adhärenz der Pneumokokken an Wirtszellen tatsächlich unabhängig von Integrinen ist, muss in Inhibitionsexperimenten näher untersucht werden. Dabei könnte der Einsatz von siRNAs (small interfering RNAs), die die Expression relevanter Integrine in den Wirtszellen reduzieren können, besonders aufschlussreich sein.

4.2. Die Charakterisierung des bakteriellen Adhäsins für Thrombospondin-1

Pathogene Bakterien besitzen eine Reihe von oberflächenexponierten Adhäsinen, die an verschiedene Wirtsmoleküle binden und so während einer Infektion die Adhärenz an Wirtszellen vermitteln können (Talay, 2005). Eine Adhärenz an extrazelluläre Matrixkomponenten wird häufig durch oberflächenlokalisierte Proteinstrukturen vermittelt, die allgemein als MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) bezeichnet werden (Foster and Hook, 1998). Für eine spezifische Anheftung der Pneumokokken an Wirtsstrukturen konnten bisher vor allem bakterielle Proteine identifiziert werden. Das PavA-Protein der Pneumokokken erkennt das extrazelluläre Matrixprotein

Fibronektin (Pracht *et al.*, 2005), die glykolytischen Enzyme α -Enolase und GAPDH werden als Plasminogen-Bindungsproteine bezeichnet (Bergmann *et al.*, 2001). Auch die Cholinbindenden Proteine SpsA und PspA erkennen verschiedene Wirtskomponenten und vermitteln dadurch eine bakterielle Kolonisierung verschiedener Wirtsbereiche (Elm *et al.*, 2004; Hammerschmidt *et al.*, 1999). Bei *S. pneumoniae* wurde bisher nur eine Zuckerstruktur, das Phosphorylcholin, identifiziert, die spezifisch mit Wirtsrezeptoren interagiert und dadurch zu einer Kolonisierung von Wirtszellen beitragen kann. Das Phosphorylcholin ist spezifisch für *S. pneumoniae*, in Ausnahmen ist es auch bei *Neisseria* spp., bei *H. influenzae* und bei Pseudomonaden Bestandteil der Zellwand (Kolberg *et al.*, 1997). Das Phosphorylcholin konnte als bakterielles Adhäsins für den PAF-Rezeptor (platelet-activating-factor-receptor) identifiziert werden (Cundell *et al.*, 1995; Cundell *et al.*, 1995). Dabei wird eine Internalisierung der Pneumokokken in aktivierte Endothelzellen durch eine Interaktion zwischen dem Phosphorylcholin und dem PAF-Rezeptor vermittelt. Durch strukturelles Mimikry simuliert das Phosphorylcholin den PAF, kann spezifisch an den Rezeptor binden und zusammen mit dem Rezeptor internalisiert werden (Cundell *et al.*, 1995; Cundell *et al.*, 1995). Für eine Charakterisierung des Pneumokokken-Adhäsins für TSP1 wurde zunächst geklärt, ob es sich bei dem bakteriellen Adhäsins um eine Protein- oder um eine Zuckerstruktur handelt. Dafür wurden die Bakterien vor dem Einsatz in Infektionsexperimenten in der Zellkultur mit dem proteolytischen Enzym Pronase E bzw. der Zucker oxidierenden Verbindung Natriumperiodat behandelt. Eine proteolytische Behandlung der Pneumokokken reduzierte die TSP1 abhängige Adhärenz auf den getesteten Epithelzellen Detroit 562, A549 und HEp-2 bzw. auf der Endothelzelllinie HBMEC nicht. Ebenfalls konnte die Adhärenz der Pneumokokken in Anwesenheit von zellgebundenem TSP1 durch eine Präinkubation der Bakterien mit einem anti-Pneumokokken Antikörper, der vor allem oberflächenlokalisierte Proteine aber auch Zuckerstrukturen erkennt, nicht verringert werden. Andere Ergebnisse wurden durch eine Inkubation der Bakterien mit Natriumperiodat erzielt. Es zeigte sich, dass durch eine Veränderung der oberflächenlokalisierten Zuckerstrukturen von *S. pneumoniae* die TSP1 vermittelte Adhärenz und Invasion der Pneumokokken an bzw. in die getesteten Wirtszellen verhindert werden konnte. Interessant war auch zu beobachten, dass eine TSP1 unabhängige Adhärenz und Invasion von Pneumokokken an und in die Wirtszellen durch eine Pronase E-Behandlung der Pneumokokken vollständig reduziert werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde die Adhärenz von Natriumperiodat-behandelten Bakterien im Vergleich zu unbehandelten Bakterien in einer TSP1 unabhängigen Infektion nicht verringert. Es ist bekannt, dass die TSP1 unabhängige Adhärenz zum größten Teil über Proteinstrukturen

auf der Oberfläche von Pneumokokken vermittelt wird, wogegen die Zuckerstrukturen auf der Bakterienoberfläche nur in diesem speziellen Fall der TSP1 vermittelten Adhärenz eine Rolle spielen. Es wurde angenommen, dass es sich bei dem bakteriellen Adhäsins für TSP1 um eine Zuckerstruktur handeln musste, deren biologische Aktivität durch die oxidative Behandlung irreparabel zerstört wurde. Eine Zuckerstruktur als bakterielles Adhäsins erschien zunächst ungewöhnlich. Diese Annahme wurde jedoch durch eine Studie unterstützt, in der die Interaktion zwischen *S. aureus* und TSP1 untersucht wurde. Dort wurde beschrieben, dass die Bindung von *S. aureus* an TSP1 nicht sensitiv gegenüber Trypsin sei (Herrmann et al., 1991). Durch Inhibitionsstudien in der Zellkultur wurde die für eine TSP1-Bindung verantwortliche Zuckerstruktur auf der Oberfläche der Pneumokokken identifiziert. Eine Beteiligung der Kapselpolysaccharide konnte durch die in den Bindungsstudien und Infektionsexperimenten erhaltenen Ergebnisse vorab ausgeschlossen werden. Bekapselte Pneumokokken wiesen in Bindungsversuchen mit immobilisiertem und löslichem TSP1 eine jeweils stark verringerte TSP1-Bindungsaktivität auf. Dagegen zeigten die isogenen Kapselmutanten in verschiedenen Versuchen besonders hohe Bindungswerte an das Glykoprotein TSP1. Offensichtlich verhindern die Kapselpolysaccharide eher die Interaktion zwischen Pneumokokken und TSP1, als dass sie einer Bindung förderlich wären. Weitere Zuckerstrukturen der äußeren Zellwand der Pneumokokken sind das Peptidoglykan, die Teichon- und Lipoteichonsäuren sowie das Phosphorylcholin. In Infektionsexperimenten wurde als erstes die Rolle des Phosphorylcholins in der TSP1 vermittelten Adhärenz der Bakterien untersucht. Das Phosphorylcholin wurde ausgewählt, da es sich dabei um eine Pneumokokken-spezifische Struktur handelt und vor allem nach einem Pneumokokken-spezifischen Adhäsins für TSP1 gesucht wurde. Weiterhin wurde es ausgewählt, da bereits gezeigt wurde, dass das Phosphorylcholin durch die Interaktion mit dem PAF-Rezeptor eine Kolonisierung der Pneumokokken an Wirtsstrukturen vermitteln kann (Cundell et al., 1995; Cundell et al., 1995). Durch die Kultivierung der Bakterien in Cholin-freiem Medium und anschließender Infektion in Abwesenheit bzw. in Anwesenheit von zellgebundenem TSP1 wurde die TSP1 vermittelte Adhärenz der Pneumokokken an Epithelzellen nicht negativ beeinflusst. Durch eine Behandlung der Pneumokokken mit rekombinanter Phosphorylcholin-Esterase bzw. mit einem anti-Phosphorylcholin Antikörper konnte die TSP1 vermittelte Adhärenz der Pneumokokken an die Wirtszellen ebenfalls nicht reduziert werden. Dabei wurde die bakterielle Adhärenz im Vergleich zu unbehandelten Pneumokokken sogar leicht erhöht. Die rekombinante Phosphorylcholin-Esterase wurde vor der Inkubation mit den Pneumokokken in einem kolorimetrischen Test auf ihre Enzymaktivität getestet. Eine Farbreaktion durch

Zugabe des Substrates *p*-Nitrophenyl-Phosphorylcholin bestätigte die Aktivität des rekombinanten Enzyms. Eine aktive Phosphorylcholin-Esterase moduliert die Menge an Phosphorylcholin auf der Pneumokokkenzellwand, indem sie die endständigen Phosphorylcholine von den Teichonsäuren entfernt (Garau *et al.*, 2005). Die Ergebnisse zeigten, dass das Phosphorylcholin der Pneumokokken keine Adhärenz vermittelnde Rolle im TSP1 abhängigen Infektionsprozess spielt. Die erhöhte Adhärenz der Pneumokokken in Anwesenheit von wirtszellgebundenem TSP1 könnte daher resultieren, dass durch eine Entfernung des Phosphorylcholins eventuell die für eine TSP1-Bindung relevanten Strukturen auf der Bakterienseite freigelegt werden. Nachdem das Phosphorylcholin nicht als Pneumokokken-Adhäsion für TSP1 in Frage kam, musste weiter nach der für eine TSP1-Bindung verantwortlichen Glykostruktur gesucht werden. Durch Experimente in der Zellkultur wurden Lipoteichonsäuren (LTAs), Peptidoglykan (PG) und die beiden Zuckereinheiten des Peptidoglykans *N*-Acetylglukosamin (GlcNac) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNac) als potenzielle Inhibitoren der TSP1 vermittelten Adhärenz der Pneumokokken an HEp-2 Zellen getestet. Teichon- und Lipoteichonsäuren haben einen bedeutenden Einfluss auf eine Vielzahl biologischer Prozesse, wie z.B. auf Adhäsionsprozesse, auf die Ausbildung von Biofilmen und auf die Stimulation einer Immunantwort (Kovacs *et al.*, 2006). Es muss berücksichtigt werden, dass die Lipoteichonsäuren von *S. aureus* eine vollkommen andere Struktur als die der Pneumokokken besitzen. Das Polyglycerolphosphat-Rückgrat der Staphylokokken LTAs ist bei *S. pneumoniae* durch ein Pentamer sich wiederholender Einheiten bestehend aus Ribitol und einem Tetrasaccharid ersetzt. Ein weiterer Unterschied besteht im Gehalt an reduzierten Phosphaten der Pneumokokken LTAs gegenüber *S. aureus* LTAs. Die LTA-Strukturen von *S. aureus* tragen *N*-Acetyl-D-Glukosamin- und D-Alanin-Anhänge, wogegen die Pneumokokken LTAs mit Phosphorylcholin und *N*-Acetyl-D-Galaktosamin substituiert sind (Draing *et al.*, 2006). Durch den Einsatz der Lipoteichonsäuren von *S. aureus* und der Lipoteichonsäuren von *S. pneumoniae* als Inhibitoren konnte jeweils keine Inhibition der TSP1 vermittelten Adhärenz der Pneumokokken an HEp-2 Zellen erreicht werden. Anschließend wurde lösliches, aufgereinigtes Peptidoglykan von *S. aureus* als Inhibitor der TSP1 abhängigen bakteriellen Adhärenz eingesetzt. Erstaunlicherweise zeigte Peptidoglykan schon in geringen Konzentrationen einen deutlich inhibierenden Effekt auf die Adhärenz von *S. pneumoniae* an HEp-2 Wirtszellen in Gegenwart von zellgebundenem TSP1. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig und konnte mit 30 µg/ml Peptidoglykan nahezu auf das Niveau einer bakteriellen Adhärenz in Abwesenheit von TSP1 reduziert werden, die IC₅₀ (Konzentration

eines Inhibitors, die eine 50%ige Hemmung bewirkt) lag bei 20 µg/ml. Eine der beiden Zuckerkomponenten des Peptidoglykans, das *N*-Acetylglukosamin, konnte in hoher Konzentration ebenfalls die TSP1 abhängige Adhärenz von *S. pneumoniae* signifikant reduzieren. Im Gegensatz dazu zeigte die *N*-Acetylmuraminsäure keine signifikante Reduktion der TSP1 vermittelten Adhärenz. Eine spezifische Bindung zwischen TSP1 und Peptidoglykan konnte in einem Bindungsversuch, an dem ausschließlich beide Interaktionspartner beteiligt waren, zusätzlich bestätigt werden. In diesem Versuch konnte die Interaktion zwischen dem Glykoprotein TSP1 und löslichem Peptidoglykan ohne zusätzliche Einflüsse der Bakterien- bzw. der Wirtszellen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis schließt aus, dass andere Komponenten der Bakterienoberfläche zur Vermittlung einer Bindung der Pneumokokken an TSP1 notwendig sind. Weiterhin wird bewiesen, dass die Interaktion der beiden Komponenten direkt und nicht indirekt ist. Durch die Untersuchungen im zellfreien System konnte weiterhin gezeigt werden, dass das Peptidoglykan nicht nur an wirtszellimmobilisiertes, sondern auch an Polystyren-immobilisiertes TSP1 binden kann. Die konzentrationsabhängige, in einer Sättigung resultierende Bindung des Peptidoglykans an das immobilisierte TSP1 zeigt typische Charakteristika einer spezifischen Interaktion. Durch diese Ergebnisse konnte das Peptidoglykan eindeutig als bakterielles Adhäsion für TSP1 identifiziert und erstmalig überhaupt als Adhäsions-vermittelnde Struktur von Bakterien für Wirtskomponenten beschrieben werden.

Peptidoglykan ist ein sehr komplexes Makromolekül der bakteriellen Zellwand. Es ist aus einem Gerüst der beiden Zuckereinheiten *N*-Acetylglukosamin und *N*-Acetylmuraminsäure aufgebaut. Die endgültige Komplexität wird durch die Zusammensetzung der quervernetzenden Peptide erreicht, die von Spezies zu Spezies variieren können. Das angeborene Immunsystem kann Mikroorganismen mit Hilfe verschiedener PRRs (pattern-recognition receptor) erkennen. PRRs sind Schlüsselmoleküle des angeborenen Immunsystems. Sie können auf der Oberfläche von Wirtszellen oder intrazellulär vorliegen bzw. als Antwort auf eine bakterielle Infektion sekretiert werden. Anhand verschiedener hoch konservierter Pathogen-assoziiertes molekulare Muster (PAMPs) werden Pathogene von PRRs identifiziert und von eigenen Strukturen unterschieden. PRRs, die mit einer Immunantwort gegen Pneumokokken in Verbindung gebracht werden, sind das C-reaktive Protein (CRP) (Volanakis and Kaplan, 1971), Mitglieder der Toll-like-Rezeptor Familie (TLR) (Han *et al.*, 2003; Yoshimura *et al.*, 1999), das LBP (Weber *et al.*, 2003), der CD14-Rezeptor (Han *et al.*, 2003) und verschiedene NOD- (nucleotide-binding oligomerization domain) Proteine (Opitz *et al.*, 2004). Das Peptidoglykan von Gram-positiven und Gram-

negativen Bakterien wird zur Familie der PAMPs gezählt. Es wird als ein besonders starkes biologisches Effektormolekül beschrieben, ähnlich dem Endotoxin LPS (Lipopolysaccharid) von Gram-negativen Bakterien (Myhre *et al.*, 2006). Die Lipoteichonsäuren von *S. pneumoniae* werden durch den TLR2 erkannt (Yoshimura *et al.*, 1999; Yoshimura *et al.*, 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das LBP (lipopolysaccharide-binding-protein) während einer Immunantwort die Zellwand der Pneumokokken als inflammatorische Komponente erkennt (Weber *et al.*, 2003). Als Immunantwort auslösende Moleküle des Peptidoglykans gelten vor allem verschiedene Muropeptide. Dabei wurde das Muramyl-Dipeptid (MDP) als Minimalstruktur mit immunstimulatorischer Wirkung identifiziert (Dziarski and Gupta, 2005). Die Zytosol-lokalisierten eukaryontischen Rezeptoren NOD1 und NOD2 erkennen das MDP von Gram-positiven und von Gram-negativen Bakterien bzw. die Diaminopimelinsäure (DAP) Gram-negativer Bakterien. Weiterhin sind verschiedene andere Peptidoglykan erkennende Proteine in den Granula von Granulozyten lokalisiert. Diese sind an der Prozessierung von phagozytierten Bakterien beteiligt (Lu *et al.*, 2006). Das bakterielle Peptidoglykan erkennt das Glykoprotein TSP1 sehr wahrscheinlich über einen anderen Weg, als über den für bakterizide Proteine beschriebenen Mechanismus. In Inhibitionsexperimenten in der Zellkultur wurde das MDP und das Park's Nukleotid (UDP-MurNac-Pentapeptid), ein Zwischenprodukt bei der Peptidoglykan-Biosynthese, auf eine mögliche inhibitorische Wirkung bei der TSP1 vermittelten Adhärenz der Pneumokokken an HEp-2 Zellen getestet. Dabei zeigte die Gegenwart von MDP und dem Park's Nukleotid im Infektionsansatz keine Reduktion der TSP1 vermittelten Adhärenz. Bereits die Ergebnisse mit *N*-Acetylmuraminsäure belegen, dass die Muramyl-Einheiten bei der untersuchten Interaktion zwischen Pneumokokken und TSP1 keine Rolle spielen. Das *N*-Acetylglukosamin hat für den beschriebenen Mechanismus wahrscheinlich eine größere Bedeutung. Der inhibitorische Effekt des GlcNac ist allerdings deutlich schwächer als der des gesamten Peptidoglykanmoleküls. Die IC_{50} für GlcNac liegt bei 2400 $\mu\text{g/ml}$ (10 mM), wobei mit löslichem Peptidoglykan eine 50%ige Inhibition schon mit ca. 20 $\mu\text{g/ml}$ zu erreichen war. Daher wurde vermutet, dass die Adhäsion der Pneumokokken an TSP1 nicht nur in Zusammenhang mit dem Zucker GlcNac, sondern eher mit der Gesamtstruktur des Peptidoglykans steht. Um die kleinste Struktur im Peptidoglykan zu identifizieren, die für eine Interaktion mit dem TSP1-Molekül verantwortlich ist, müssen weitere Untersuchungen mit dem Einsatz synthetischer Peptidoglykanfragmente gemacht werden. Weiterhin könnten dadurch eventuell störende Einflüsse von restlichen Peptideinheiten des aufgereinigten Peptidoglykans vermieden werden. Der Mechanismus der Interaktion zwischen TSP1 und

Peptidoglykan war vergleichbar bereits für eine Interaktion zwischen dem Mannose-binding Lektin (MBL) und Peptidoglykan beschrieben worden (Nadesalingam *et al.*, 2005). Nadesalingam *et al.* postulieren, dass das MBL durch seine C-Typ Lektin-Domänen an die GlcNac-Einheit des Peptidoglykans bindet. Allerdings wurden in Inhibitionsexperimenten vergleichbar hohe GlcNac-Konzentrationen (20 mM) wie in der vorliegenden Arbeit (10 mM-100 mM) eingesetzt. MBL bindet sowohl die lösliche wie auch die nicht-lösliche Form des Peptidoglykans. Bei der Interaktion von TSP1 und Peptidoglykan konnten dagegen Unterschiede zwischen der inhibitorischen Wirkung einer Peptidoglykan-Suspension und löslichem Peptidoglykan nachgewiesen werden. Mit 40 µg/ml löslichem Peptidoglykan konnte eine 90%ige Inhibition der TSP1 vermittelten Adhärenz der Pneumokokken an HEp-2 Epithelzellen erreicht werden. Mit einer Suspension von 40 µg/ml nicht gelöstem Peptidoglykan konnte ebenfalls eine signifikante Inhibition, allerdings nur um 60% erreicht werden.

4.3. Peptidoglykan als Thrombospondin-1-Adhäsion Gram-positiver Bakterien

Das Peptidoglykan ist nicht nur Hauptbestandteil der Zellwand von Pneumokokken, sondern es ist eine Hauptstrukturkomponente von Bakterien im Allgemeinen. Daher wurde im nächsten Schritt untersucht, ob das zellgebundene TSP1 als Brückenmolekül für eine Anheftung an Wirtsstrukturen von verschiedenen bakteriellen Spezies genutzt werden kann. In Bindungsstudien mit löslichem und immobilisiertem TSP1 zeigte sich ein großer Unterschied im Bindungsverhalten zwischen den ausgewählten Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Gram-positive pathogene Bakterien wie *S. aureus*, *S. pyogenes* und *L. monocytogenes* zeigten eine Interaktion mit beiden Konformationen des TSP1. Auffällig war, dass die *Listeria* jeweils die geringste, aber eine dennoch signifikante Bindung an TSP1 zeigten. Bei den getesteten Gram-negativen Bakterien wie *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *E. coli* und *L. pneumophila* konnte in Studien mit löslichem und immobilisiertem TSP1 keine Interaktion mit dem Glykoprotein nachgewiesen werden. In Infektionsversuchen in der Zellkultur konnte entsprechend gezeigt werden, dass die getesteten Gram-positiven Spezies, ebenso wie die Pneumokokken, zellgebundenes TSP1 als Brückenmolekül für eine gesteigerte Anheftung an eukaryontische Wirtszellen nutzen können. Weiterhin wurde deutlich, dass die Rekrutierung von TSP1 kein Mechanismus ist, der nur von pathogenen Erregern genutzt werden kann. Apathogene Gram-positive Bakterien, wie *Staphylococcus carnosus*,

Bacillus subtilis und *Streptococcus mutans* konnten das auf den Wirtszellen immobilisierte TSP1 ebenfalls für eine gesteigerte Assoziation an die eukaryontischen Zellen nutzen. Da für alle getesteten Gram-positiven Bakterien, unabhängig von ihrer Pathogenität, eine Interaktion mit TSP1 nachgewiesen werden konnte, wurde angenommen, dass es sich bei der beschriebenen Interaktion um einen für Gram-positive Bakterien allgemeingültigen Mechanismus handeln könnte. Unterstützt wurde diese Annahme durch weitere Untersuchungen mit Gram-positiven Mikroorganismen. Die TSP1 vermittelte bakterielle Assoziation ist ebenso wie bei den Pneumokokken unabhängig von Proteinstrukturen. Ebenfalls kann wie bei *S. pneumoniae* die Bindung an zellgebundenes TSP1 durch Peptidoglykan signifikant inhibiert werden. Durch den Einsatz von *N*-Acetylglukosamin als Inhibitor wurde eine Inhibition der TSP1 abhängigen Assoziation verschiedener Gram-positiver Bakterien an eukaryontische Epithelzellen erreicht. Demnach konnte deutlich gemacht werden, dass es sich bei der Interaktion der getesteten Gram-positiven Bakterien mit TSP1 um denselben Mechanismus handelt, der in dieser Arbeit bereits für die Pneumokokken beschrieben wurde.

Ein Unterschied zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien besteht vor allem im Aufbau der Zellwand (**Abb. 44**). Gram-positive Bakterien besitzen ein dickes (20-28 nm) Peptidoglykan-Gerüst, welches als Hauptstrukturkomponente der Zellwand die Bakterienzelle umgibt. In die Zellwand verankert sind Teichonsäuren oder Lipoteichonsäuren. Gram-negative Bakterien enthalten neben einer sehr dünnen (2 nm) Peptidoglykanschicht eine zusätzliche Schicht aus Polysacchariden, Proteinen und Phospholipiden. Lipide und Polysaccharidstrukturen bilden die für die Gram-negative Zellwand spezifischen Lipopolysaccharide (LPS), die äußere Membran der Gram-negativen Bakterien (Vollmer and Holtje, 2004).

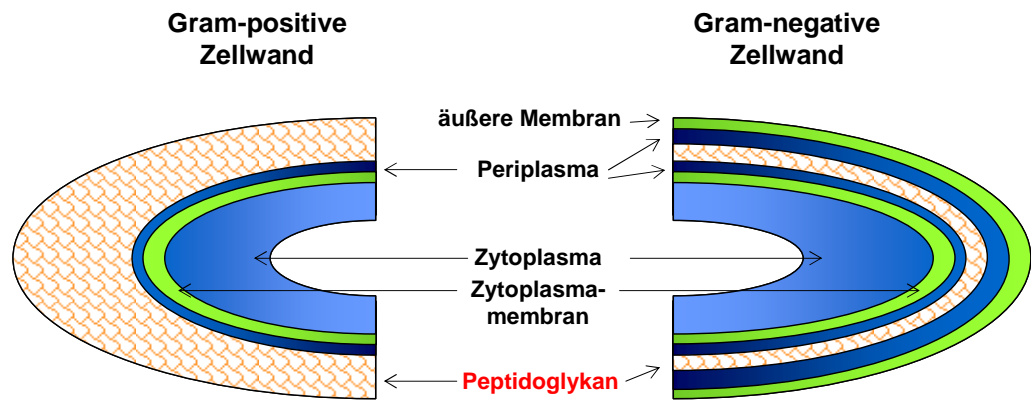


Abb. 44: Übersicht über die Zellwandstruktur von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Gram-positive Bakterien besitzen eine dicke oberflächenexponierte Peptidoglykanschicht. Gram-negative Bakterien besitzen dagegen ein dünnes Peptidoglykannetzwerk mit einer zusätzlichen äußeren Membran bestehend aus Lipopolysacchariden. Gram-negative Bakterien können im Gegensatz zu Gram-positiven Mikroorganismen zellgebundenes TSP1 nicht erkennen.

Weitere bedeutende Unterschiede zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien bestehen in der Zusammensetzung der Peptide im Peptidoglykan. Die meisten Gram-positiven Bakterien haben eine positiv geladene L-Lysin Aminosäure an Position 3 der quervernetzenden Peptide. Bei allen Gram-negativen Bakterien und bei wenigen Gram-positiven Bakterien wie z.B. bei den Gattungen *Listeria* und *Bacillus*, besteht die 3. Position aus einer negativ geladenen *m*-Diaminopimelinsäure (*m*-DAP). Beim *m*-DAP-Typ erfolgt die Peptidquervernetzung untereinander zwischen der Aminogruppe des *m*-DAP und der Carboxylgruppe des terminalen D-Alanins (D-Ala) (Fiedler, 1988). Beim Lysin-Typ werden die Peptidketten untereinander durch eine Peptidbrücke quervernetzt, bei der die Art und Anzahl der „Brückenaminosäuren“ von Spezies zu Spezies variiert. Bei *S. aureus* besteht die Verbindung aus einer Pentaglycinbrücke zwischen L-Lys und dem terminalen D-Ala (Royet and Dziarski, 2007) (**Abb. 45**). Bei *S. pneumoniae* und *S. pyogenes* vernetzt eine Dialaninbrücke die Peptideinheiten (**Abb. 3**) (Kovacs *et al.*, 2006; Navarre and Schneewind, 1999). Im unterschiedlichen Zellwandaufbau von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien kann eine Erklärung für den Unterschied in der Fähigkeit TSP1 zu binden gefunden werden. Bei den Gram-positiven Bakterien liegt die dicke Mureinschicht exponiert an der Bakterienoberfläche und kann TSP1 binden. Im Gegensatz dazu ist die dünne Peptidoglykanschicht der Gram-negativen Bakterien von der äußeren Membran mit Lipoteichonsäuren umgeben und kann somit vom TSP1 nicht erreicht und damit nicht erkannt werden. Die Zusammensetzung der quervernetzenden Peptide scheint keine Rolle bei der

Vermittlung einer bakteriellen Interaktion mit TSP1 zu spielen. Durch Infektionsversuche in der Zellkultur mit verschiedenen Stämmen wurde deutlich, dass der L-Lys-Typ (*S. aureus*, *S. pneumoniae* und *S. pyogenes*) dabei ebenso vom TSP1 Protein erkannt wird wie der *m*-DAP-Typ (*L. monocytogenes* und *B. subtilis*). Auffällig war, dass die Listerien jeweils die geringsten Bindungswerte an lösliches und immobilisiertes, wie auch an zellgebundenes TSP1 aufweisen konnten. Die Listerien gehören dem *m*-DAP-Peptidoglykan-Typ an und haben somit eine zusätzliche negative Ladung auf der äußeren Zellwand, im Gegensatz zu den Bakterien des L-Lys-Typs. Allerdings scheinen die Ladungsunterschiede nicht der Grund für eine geringere Bindung an TSP1 zu sein, da *B. subtilis* ebenfalls dem *m*-DAP-Typ angehört und keine verringerte TSP1 vermittelte Assoziation an HEp-2 Epithelzellen in Infektionsversuchen in der Zellkultur zeigte. Die niedrigen Bindungswerte für die Listerien können demnach nicht durch Ladungsunterschiede in der Zellwand erklärt werden.

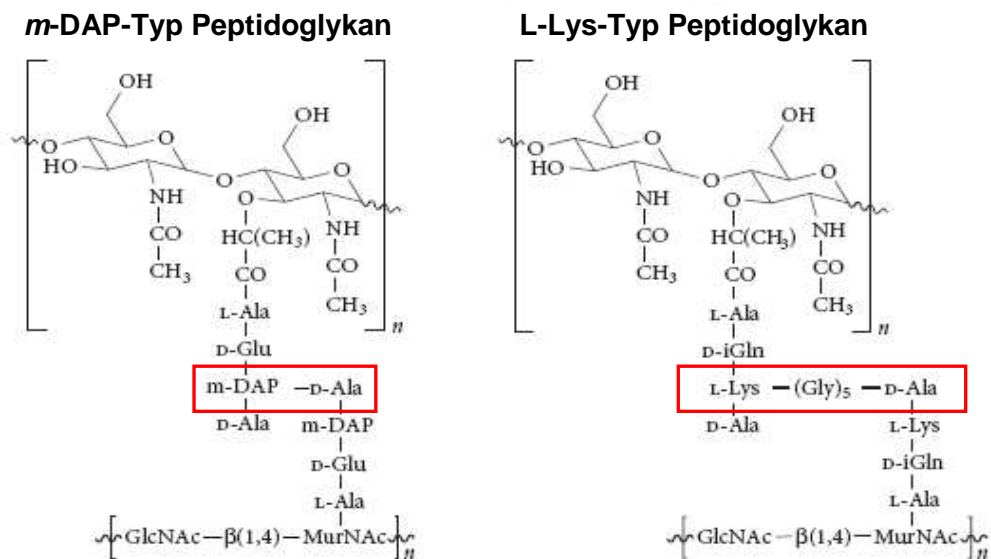


Abb. 45: Unterschiede im Zellwandaufbau zwischen dem *m*-DAP Peptidoglykan Typ und dem L-Lys Peptidoglykan Typ. Beim *m*-DAP-Typ erfolgt die Quervernetzung der Peptidketten zwischen der Aminogruppe des *m*-DAP und der Carboxylgruppe des N-terminalen D-Alanins. Beim L-Lys-Typ werden die Peptidketten durch eine Pentaglycinbrücke quervernetzt. Die Unterschiede im Zellwandaufbau zwischen beiden Peptidoglykan-Typen sind rot eingerahmt (Royet and Dziarski, 2007).

4.4. Ein putatives LysM-Motiv im Thrombospondin-1 könnte an der Bindung von bakteriellem Peptidoglykan beteiligt sein

Ein möglicher Kandidat für die Peptidoglykan-erkennende Sequenz im TSP1-Molekül ist eine LysM-Motiv enthaltene Domäne. Die LysM-Domäne ist ein weit verbreitetes Proteinmotiv und wurde ursprünglich in Zellwand-degradierenden bakteriellen Enzymen identifiziert. Inzwischen wurden LysM-Motive auch in eukaryontischen Proteinen gefunden. Es wird angenommen, dass es sich dabei um ein allgemeines Peptidoglykan-bindendes Motiv handelt (Bateman and Bycroft, 2000).

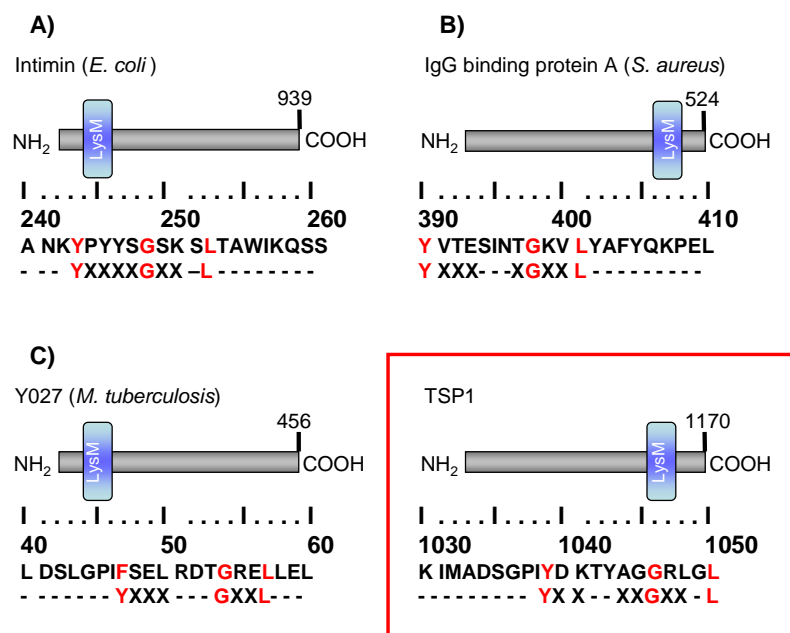


Abb. 46: Aminosäuresequenzanalyse von verschiedenen LysM-Motiv-tragenden Proteinen. Die LysM-Konsensus-Sequenz ist rot gefärbt. Eine C-terminale Sequenz im TSP1 ähnelt den LysM-Motiven der dargestellten Proteine.

Die LysM-Konsensus Sequenz ist YXXXXGXXHyd, wobei es sich bei Hyd um eine hydrophobe Aminosäure handelt (Turner *et al.*, 2004). In **Abb. 46** wurden die Aminosäuresequenzen von verschiedenen prokaryontischen Proteinen in Hinblick auf das LysM-Motiv verglichen. Bei den Proteinen A, B und C handelt es sich um repräsentative Proteine, die das LysM-Motiv beinhalten. Das LysM-Motiv befindet sich zumeist am C- oder N-Terminus des jeweiligen Proteins (Bateman and Bycroft, 2000). Darüber hinaus sind auch Proteine bekannt, die nicht nur ein, sondern zwei oder drei LysM-Motive enthalten, wobei dem Motiv in dreifacher Ausführung die höchste Peptidoglykanbindungsaktivität

zugeschrieben werden konnte (Steen *et al.*, 2005). Am C-Terminus des TSP1-Moleküls konnte durch einen Vergleich der Aminosäuresequenz mit der LysM-Konsensus Sequenz ein Motiv ausgemacht werden, welches den bereits beschriebenen LysM-Motiven anderer Proteine sehr ähnelt. Da das TSP1-Molekül unter nativen Bedingungen als Trimer vorkommt, würde das LysM-Motiv entsprechend dreimal vorkommen. Dieser Umstand könnte die Bindung von TSP1 an Peptidoglykan letztlich beeinflussen. Eine Analyse im Emini-Plot, welcher die Oberflächenwahrscheinlichkeit von Proteindomänen berechnet, zeigte eine deutliche Lokalisierung des LysM-Motivs im TSP1 an der Oberfläche des Proteins, so dass es als Bindungsdomäne für Peptidoglykan in Frage kommen könnte. Um aber eine tatsächliche Aussage über die Rolle des putativen LysM-Motivs in der TSP1 vermittelten bakteriellen Adhärenz machen zu können, müssten noch weitere Untersuchungen mit rekombinanten TSP1-Fragmenten durchgeführt werden.

4.5. *In* bzw. *ex vivo* Studien zur Aufklärung der Rolle von Thrombospondin-1 im Infektionsprozess

Thrombospondin-1 konnte als Brückenmolekül für die Vermittlung einer Anheftung von *S. pneumoniae* und anderen Gram-positiven Bakterien an Wirtsstrukturen identifiziert werden. Dabei wurden Bindungsstudien und Infektionsversuche bisher ausschließlich *in vitro* durchgeführt. Diese Studien belegen eine wichtige Funktion für das Glykoprotein TSP1 in der Kolonisierung. Einen ersten Hinweis darauf, dass das TSP1 auch *in vivo* essentiell für die Pathogenese von *S. pneumoniae* und anderen Gram-positiven Bakterien sein könnte, lieferten bereits die Inkubationen der Mikroorganismen mit humanem Plasma. Die Plasma-Inkubationsversuche zeigten, dass TSP1 von *S. pneumoniae* aus dem Plasma rekrutiert werden kann. Jaffe *et al.* (1982) konnten das TSP1 als ein endogenes Lektin humaner Thrombozyten identifizieren. Die Lektin-Aktivität des TSP1 ist wichtig für eine Aggregation der Blutplättchen und vermittelt eine Bindung an spezifische Rezeptoren auf anderen Thrombozyten (Jaffe *et al.*, 1982). Ein weiteres Plasma-Lektin ist das Mannose-bindende Lektin (MBL). Es wird in die Familie der Collektine eingruppiert, die in ihrer Struktur Lektindomänen und eine kollagen-ähnliche Region aufweisen. Aufgrund einer Kohlenhydrat-erkennenden Domäne (carbohydrate recognition domain) wird das MBL zu den C-Typ Lektinen gezählt. MBL gehört zu den Effektormolekülen der angeborenen Immunabwehr, als Akutphaseprotein und PRR sorgt es für die Anlagerung von Komplementfaktoren auf relevanten Oberflächen (Dommett *et al.*, 2006; Gadjeva *et al.*, 2004) und löst die

Komplementkaskade aus. Mikroorganismen können daraufhin von Immunzellen erkannt und phagozytiert werden. Dabei erkennt MBL vor allem verschiedene Kohlenhydrateinheiten auf der Oberfläche von Mikroorganismen. MBL liegt im Serum häufig in einem Komplex mit verschiedenen MASPs (MBL-associated serine proteases) vor. Dieser Komplex aktiviert durch eine Spaltung der Komplementfaktoren C4 und C2 den Lektin-Weg des Komplementsystems (Brouwer *et al.*, 2006). Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit, konnte für das MBL eine Bindung an bakterielles Peptidoglykan und dabei an die *N*-Acetylglukosamin-Einheit nachgewiesen werden (Nadesalingam *et al.*, 2005). Dabei konnte ebenfalls beobachtet werden, dass vor allem Gram-positive Bakterien mit dem MBL-Protein interagieren können. Die meisten Gram-negativen Isolate zeigten in der Studie keine Interaktion mit MBL (Neth *et al.*, 2000). Die Erkennungsmechanismen für Mikroorganismen scheinen bei TSP1 und MBL sehr ähnlich zu sein. Zur Aufklärung der Rolle des TSP1 in der Opsonophagozytose wurden Versuche mit frisch isolierten Granulozyten und *S. pneumoniae* bzw. *S. aureus* in Gegenwart von TSP1 durchgeführt. Dabei konnte eine deutlich reduzierte Phagozytose der getesteten Mikroorganismen in Anwesenheit von TSP1 nachgewiesen werden. Die Opsonophagozytose der Mikroorganismen wurde in Abhängigkeit der TSP1-Konzentration bei allen getesteten Mikroorganismen inhibiert. Durch die Interaktion mit TSP1 können sich die Bakterien demnach vor einer Phagozytose durch Effektorzellen des Immunsystems schützen. Phagozytose-Studien mit MBL zeigten einen entgegengesetzten Effekt. Mit ansteigender Menge von MBL-MASP (0-5 µg/ml) konnte eine erhöhte Phagozytose in Neutrophile beobachtet werden (Neth *et al.*, 2002). Es ist bekannt, dass MBL, als C-Typ Lektin, eine spezifische Erkennungsdomäne für Peptidoglykan besitzt und eine Immunantwort gegen Peptidoglykan modulieren kann (Royet and Dziarski, 2007). Studien mit dendritischen Zellen zeigten, dass TSP1 auch als Reaktion auf apoptotische Zellen gebildet werden kann. Dabei wurde ein Modell postuliert, in dem das TSP1 an die Oberfläche von unreifen dendritischen Zellen oder anderen professionell phagozytierenden Zellen binden kann. Die apoptotische Zelle bindet über TSP1 als Brückenmolekül an die phagozytierende Zelle und induziert damit ihre Phagozytose. TSP1 kann über LRP, CD36, $\alpha_v\beta_3$ oder andere für phagozytierende Zellen spezifische Rezeptoren wie CD11b, CD18 oder $\alpha_v\beta_5$ z.B. an dendritische oder andere professionell phagozytierende Zellen binden (Krispin *et al.*, 2006). In der Zukunft könnte in zusätzlichen *in vivo* Studien die Relevanz des vorgestellten Infektionsmechanismus überprüft werden. In dieser Arbeit wurde bereits ein erster Versuch durchgeführt, um die *in vivo* Relevanz für TSP1 im Sepsis-Infektionsverlauf von *S. aureus* näher zu untersuchen. Dafür wurde bei Ratten ein Katheter von der Aorta ins Herz gelegt und

dadurch eine Verletzung am Herzen induziert. Die physiologische Antwort auf eine Verletzung ist die Aktivierung der Thrombozyten und eine Sekretion der Proteine der α -Granula, wobei TSP1 das mengenmäßig häufigste Protein der Granula ist. In verschiedenen Studien konnte bereits die Relevanz verschiedener Thrombozyten-assoziiierter Proteine in einem infektiösen Endokarditis-Modell mit *S. aureus* aufgezeigt werden (Dhawan *et al.*, 1998; Kupferwasser *et al.*, 2002; Peerschke *et al.*, 2006; Scheld *et al.*, 1978). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob ein anti-TSP1 Antikörper eine prophylaktische Wirkung auf eine bakterielle Infektion hat. Dafür wurde der Antikörper über den Katheter in die Herzregion dreier Ratten gegeben, andere Ratten blieben unbehandelt. Die TSP1 Antikörper behandelten bzw. unbehandelten Kontroll-Ratten wurden anschließend mit dem *S. aureus* MA12-Stamm Xen 29 infiziert. Überraschenderweise zeigte die Auswertung des Versuchs eine deutlich gesteigerte bakterielle Besiedlung von Organen der Ratten, die prophylaktisch mit dem TSP1 Antikörper behandelt waren. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu einer Studie, in der die *in vivo* Relevanz eines Thrombozyten-Proteins, dem gC1qR/p33 Protein, in einem Ratten-Endokarditis/Sepsis Modell getestet wurde (Peerschke *et al.*, 2006). Durch den Einsatz verschiedener Antikörper gegen funktionelle Domänen des gC1qR/p33 Proteins konnte eine Reduktion der Vegetation von *S. aureus* vor allem am Herzen der Ratten erreicht werden. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für den Einsatz des anti-TSP1 Antikörpers in dieser Arbeit erwartet. In Vorversuchen in der Zellkultur konnte eine Reduktion der TSP1 vermittelten bakteriellen Adhärenz an Wirtszellen bei *S. pneumoniae* NCTC10319 und *S. aureus* Cowan-1 beobachtet werden. Es konnte allerdings auch beobachtet werden, dass der anti-TSP1 Antikörper in hohen Konzentrationen (1:50/1:100) eine Aggregation der Bakterien und damit eine verstärkte Assoziation an die Wirtszellen auslöste (Daten nicht gezeigt). Eine Erklärung für die hohe Organlast der mit Antikörper behandelten Ratten könnte eine Aggregation des Antikörpers mit den Bakterien gewesen sein. Eine Unterstützung dieser Annahme gab ein Immunblot, bei dem der anti-TSP1 Antikörper mit dem Bakterienlysat des *S. aureus* Cowan-1- bzw. des MA12-Stammes positiv reagierte. Durch den Einsatz von rekombinanten TSP1-Peptiden oder Antikörpern gegen TSP1-Fragmente muss weiterhin nach der funktionellen Domäne im TSP1-Molekül gesucht werden, die eine Bindung der Pathogene an die Wirtsstrukturen vermittelt. Vor allem ein rekombinantes TSP1-Peptid, dem die potenzielle Peptidoglykan-bindende LysM-Domäne fehlt, könnte wichtige Informationen für die Charakterisierung der TSP1-Bakterien-Interaktion liefern. Aufgrund der beschriebenen Allgemeingültigkeit der TSP1 vermittelten Adhärenz für Gram-positive Bakterien muss berücksichtigt werden, dass der beschriebene

Infektionsweg nicht vorrangig eine Bedeutung bei Pneumokokkeninfektionen haben muss. Möglicherweise könnte dieser Mechanismus besonders wichtig für klassische Sepsis- oder Endokarditis-Erreger wie Staphylokokken und verschiedene Streptokokkenarten sein. Allerdings deutet eine Untersuchung mit einer TSP1 Knock-out Maus, die hauptsächlich Abnormalitäten verschiedener Lungenfunktionen entwickelte, an, dass TSP1 für eine Aufrechterhaltung der Hämostase in der Lunge von großer Bedeutung ist (Lawler *et al.*, 1998). Daher besteht die Möglichkeit, dass TSP1 von *S. pneumoniae*, als einem Erreger des unteren und oberen Respirationstraktes, für eine Kolonisierung des Lungengewebes genutzt werden kann.

5. Material

5.1. Verwendete Bakterienstämme

5.1.1. *S. pneumoniae* Wildtyp-Stämme

Stamm	Quelle	Genotyp	Serotyp	Referenz
P 37	NCTC 10319	Wildtyp	35A	(Pracht <i>et al.</i> , 2005)
P 51	ATCC 11733	Wildtyp	2	(Hammerschmidt <i>et al.</i> , 2005)
P 173 (R800)	Laborstamm	Wildtyp	Δcps	(Hammerschmidt <i>et al.</i> , 2005)
P 165 (D39)	Laborstamm	Wildtyp	2	(Hammerschmidt <i>et al.</i> , 2005)
P 261 (TIGR4)	klin. Isolat	Wildtyp	4	(Tettelin <i>et al.</i> , 2001)

Tab. 36: Verwendete *S. pneumoniae*-Stämme. cps: Kapselpolysaccharid

5.1.2. *S. pneumoniae* Mutanten

Stamm	Wildtyp	Genotyp	Resistenz	Referenz
PN 65	NCTC 10319	pJDC9:: <i>pdb</i>	erm ^R	(Pracht <i>et al.</i> , 2005)
PN 111	D39 (P 165)	Δcps	kana ^R	diese Arbeit
PN 107	TIGR4 (P 261)	Δcps	kana ^R	(Pearce <i>et al.</i> , 2002)

Tab. 37: Verwendete *S. pneumoniae* Mutanten

5.1.3. Andere Stämme

Stamm	Genotyp	Serotyp	Referenz/Quelle
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Wildtyp	M6	(Molinari, 1998)
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	Wildtyp		(Clarke, 1924)
<i>Staphylococcus aureus</i> Cowan-1	Wildtyp		(Herrmann, 1991)
<i>Staphylococcus aureus</i> MA12	Wildtyp		Knut Ohlsen
<i>Staphylococcus aureus</i> Xen 29			Knut Ohlsen
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Wildtyp		Knut Ohlsen
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Wildtyp	TM300	Knut Ohlsen
<i>Listeria monocytogenes</i>	Wildtyp	1/2a	(Bubert <i>et al.</i> , 1999)

Stamm	Genotyp	Serotyp	Referenz
<i>Legionella pneumophila</i> (Corby)	Wildtyp	1	(Jepras <i>et al.</i> , 1985)
<i>Neisseria meningitidis</i> (MC58)	Wildtyp	Serogruppe B	(Unkmeir <i>et al.</i> , 2002)
<i>N.m.</i> MC58 Δ <i>siaD</i>	Δ <i>siaD</i>		(Unkmeir <i>et al.</i> , 2002)
<i>Haemophilus influenzae</i> (RD)	Δ <i>cps</i>	Δ <i>cps</i>	(Wilcox, 1975)
<i>Escherichia coli</i> 536	WT	O6:K15:H31	(Berger <i>et al.</i> , 1982)
<i>Bacillus subtilis</i> 168	WT	kein	Knut Ohlsen

Tab. 38: Verwendete Bakterienstämme verschiedener Gattungen

5.2. Nährmedien und Kulturbedingungen

5.2.1. Nährmedien und Kulturbedingungen für Streptokokken

Zur Kultivierung von Streptokokken wurden die Stämme aus -80°C Glycerin-Stammkulturen auf Blutagarplatten ausgestrichen. Für die Anzucht von *S. pneumoniae* und *S. pyogenes* in Flüssigkultur wurde standardgemäß das THY-Medium (Todd-Hewitt-Medium mit Hefeextrakt) benutzt. Weiterhin wurde *S. pneumoniae* in CD-Medium (Chemisch-definiertes Medium) oder in dem semisynthetischen Komplettmedium CpH8 kultiviert.

Nährmedien und Platten	Zusammensetzung
Blutagarplatten (Oxoid)	23 g Pepton, 5 gNaCl, 14 g Agar, 65 ml Hammelblut, pH 7,4
THY-Medium	36,4 g THB (Todd-Hewitt-Medium) pro Liter H ₂ O, 0,5% Hefeextrakt, autoklaviert
CpH8-Medium	800 ml PreC, 26 ml Supplement, 20 ml 0,1% Glutamin, 20 ml Adams III, 10 ml 2% Natriumpyruvat, 30 ml Phosphatpuffer (pH 8,0), 18 ml 5% Hefeextrakt, autoklaviert
CD-Medium	Zusammensetzung der Einzellösungen siehe 5.2.1.1 Zusammensetzung der Lösungen siehe 5.2.1.2

Tab. 39: Nährmedien für die Anzucht von *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* und *S. mutans*

CpH8-Medium: Zusammensetzung der Einzellösungen

Pre C:	1,208 g Natrium-Acetat, 5 g Caseinhydrolysat, 5 mg L-Tryptophan, 5 mg L-Cystein pro Liter H ₂ O bidest., pH 7,5 mit NaOH
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)
Adams III:	160 ml Adams I, 40 ml Adams II, 2 g L-Asparagin, 400 mg Cholin-HCl, 17 mg CaCl ₂
Phosphatpuffer:	947 ml K ₂ HPO ₄ (1M), 53 ml KH ₂ PO ₄ (1M), pH 8,0

CpH8-Medium: Die Einzelkomponenten:

Adams I:	0,15 mg Biotin, 150 mg Nikotinsäure, 175 mg Pyridoxin-HCl, 600 mg Ca-Pantothenat, 160 mg Thiamin-HCl, 70 mg Riboflavin pro Liter H ₂ O bidest.
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. pro Liter H ₂ O bidest.
„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 pro Liter H ₂ O bidest.

CD-Medium: Zusammensetzung der Lösungen und ihre Einzelkomponenten

Lösung	Komponenten	Endkonzentration [mg/l]	Stock
Lösung 1a	FeSO ₄ × 7 H ₂ O	5	10 x
	Fe(NO ₃) ₂ × 9 H ₂ O	1	10 x
	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	700	10 x
	MnSO ₄	5	10 x
Lösung 1b	K ₂ HPO ₄	200	10 x
	KH ₂ PO ₄	1000	10 x
Lösung 2 (Aminosäuren, Applichem)	L-Alanin	100	1000 x
	L-Arginin	100	1000 x
	L-Asparagin	100	125 x
	L-Aspartat	100	50 x
	L-Cystin	50	500 x

Lösung	Komponenten	Endkonzentration [mg/l]	Stock
Lösung 2	L-Glutamat	100	100 x
(Fortsetzung)	L-Glutamin	200	125 x
	Glycin	100	1000 x
	L-Histidin	100	400 x
	L-Isoleucin	100	300 x
	L-Leucin	100	200 x
	L-Methionin	100	400 x
	L-Phenylalanin	100	250 x
	L-Prolin	100	1000 x
	Hydroxy-L-prolin	100	1000 x
	L-Serin	100	1000 x
	L-Threonin	200	450 x
	L-Tryptophan	100	500 x
	L-Tyrosin	100	500 x
	L-Valin	100	500 x
Lösung 3	<i>p</i> -Aminobenzoessäure	0,2	20 x
(Vitamine)	Biotin	0,2	20 x
	Folsäure	0,8	20 x
	Niacinamid	1	20 x
	NAD	2,5	20 x
	Panthothenat Calcium Salz	2	20 x
	Pyridoxal	1	20 x
	Pyridoxamin Dihydrochlorid	1	20 x
	Riboflavin	2	20 x
	Thiamin Hydrochlorid	1	20 x
	Vitamin B12	0,1	20 x
Lösung 4	Glukose	10000	10 x
Lösung 5	Adenin	20	10 x
	Guanin Hydrochlorid	20	10 x
	Uracil	20	10 x
Lösung 6a	CaCl ₂ x 6 H ₂ O	10	100 x
Lösung 6b	NaC ₂ H ₃ O ₂ x 3 H ₂ O	4500	50 x
Lösung 6c	L-Cystein	50	100 x
Lösung 6d	NaHCO ₃	2500	25 x
Lösung 6e	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	3195	10 x
	Na ₂ HPO ₄	7350	10 x
Lösung 7	Cholin-HCl	20	100 x

Tab. 40: Zusammensetzung der Lösungen für das CD-Medium

5.2.2. Nährmedien und Kulturbedingungen für *S. aureus*, *S. epidermidis* und *S. carnosus*

Zur Kultivierung von *S. aureus*, *S. epidermidis* und *S. carnosus* wurden die Stämme aus der -80°C Glycerin-Stammkultur auf BHI-Agar-Platten (Brain-Heart-Infusion) oder auf MKP-Agar-Platten (Mannit-Kochsalz-Pepton) ausgestrichen. Für die Anzucht von Staphylokokken in Flüssigkultur wurde standardmäßig das BHI-Medium benutzt.

Nährmedien	Zusammensetzung
BHI-Medium	37 g BHI-Medium (Becton Dickinson) pro Liter H ₂ O bidest., autoklaviert
BHI-Agar	31,5 BHI-Agar (Becton Dickinson) pro 600 ml H ₂ O bidest.
MKP-Agar	10 g Pepton, 1 g Fleischextrakt, 75 g NaCl, 10 g D-Mannit, 15 g Agar, 0,025 g Phenolrot, pro Liter H ₂ O bidest.

Tab. 41: Nährmedien für die Anzucht von *S. aureus*, *S. epidermidis* und *S. carnosus*

5.2.3. Nährmedien und Kulturbedingungen für *L. monocytogenes*, *E. coli* und *B. subtilis*

Zur Kultivierung von *L. monocytogenes*, *E. coli* und *B. subtilis* wurden die Stämme aus der -80°C Glycerin-Stammkultur auf LB-Agar-Platten (Luria-Bertani) ausgestrichen. Für die Anzucht der Stämme in Flüssigkultur wurde standardmäßig das LB-Medium benutzt.

Nährmedien und Platten	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g Trypton, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, pro Liter H ₂ O bidest, pH 7,4 mit 5 N NaOH eingestellt, autoklaviert
LB-Agar-Platten	1 l LB-Medium, 15 g Bacto-Agar

Tab. 42: Nährmedien für die Anzucht von *L. monocytogenes*, *E. coli* und *B. subtilis*

5.2.4. Nährmedien und Kulturbedingungen für *L. pneumophila*

Zur Kultivierung und Anzucht von *L. pneumophila* wurde der Stamm aus der -80°C Glycerin-Stammkultur auf Aktivkohle-Agar-Platten ausgestrichen.

Nährmedien	Zusammensetzung
Aktivkohle-Agar-Platten	3 g Aktivkohle, 9 g Hefeextrakt, 13 g Agar-Agar, pro Liter H ₂ O bidest.

Tab. 43: Nährmedium für die Anzucht von *L. pneumophila*

5.2.5. Nährmedien und Kulturbedingungen für *H. influenzae*

Zur Kultivierung von *H. influenzae* wurde der Stamm aus der -80°C Glycerin-Stammkultur auf BHI-Agar-Platten mit speziellen Zusätzen ausgestrichen. Für die Anzucht des Stammes in Flüssigkultur wurde BHI-Medium mit Zusätzen benutzt.

Nährmedien	Zusammensetzung
BHI-Medium mit Zusätzen	37 g BHI-Medium (Becton Dickinson) pro Liter H ₂ O bidest., autoklaviert, 1:50 Haemin (steril), 1:1000 NAD (steril) (beides von Applichem)
BHI-Agar mit Zusätzen	31,5 g BHI-Agar (Becton Dickinson) pro 600 ml H ₂ O bidest., 1:50 Haemin (steril), 1:1000 NAD (steril) (beides von Applichem)

Tab. 44: Nährmedien für die Anzucht von *H. influenzae*

5.2.6. Nährmedien für *N. meningitidis*

Zur Kultivierung und Anzucht von *N. meningitidis* wurde der Stamm aus der -80°C Glycerin-Stammkultur auf GC-Platten ausgestrichen.

Nährmedien und Platten	Zusammensetzung
GC-Agar-Platten	36 g GC-Agar pro Liter H ₂ O bidest., 10 ml IsovitaleX TM (Becton Dickinson)

Tab. 45: Platten für die Anzucht von *N. meningitidis*

5.3. Verwendete Zelllinien

5.3.1. Epithelzelllinien

Epithelzelllinien	Quelle
HEp-2	ATCC CCL-23, aus epidermoidem Kehlkopfkarzinom
A549	ATCC CCL-185, humane Lungen-Karzinom Zelllinie
Detroit 562	ATCC CCL-138, humane Pharynx-Karzinom Zelllinie

Tab. 46: Verwendete Epithelzelllinien

5.3.2. Endothelzelllinie

Endothelzelllinie	Quelle
HBMEC	Kwang S. Kim (John Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland), human-brain-derived microendothelial cells, entnommen bei Gehirnbioptie bei einem an Epilepsie erkrankten Patienten

Tab. 47: Verwendete Endothelzelllinie

5.4. Zellkulturmedien und Kulturbedingungen

Für die Zelllinien A549, HEp-2, Detroit 562 und HBMEC wurde mit Medien der Firma PAA gearbeitet. Diese Medien enthielten ein isotonisches, gepuffertes Grundmedium mit anorganischen Salzen, Nährstoffen und Aminosäuren.

5.4.1. Kultivierung der humanen Epithelzelllinien HEp-2 und A549

HEp-2 und A549 Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% FBS (Fetal Bovine Serum "Gold", PAA), 2 mM Glutamin (PAA), 0,1 mg/ml Streptomycin und mit 100 Units/ml Penicillin kultiviert. Die Zelllinien wurden für maximal 15 Passagen subkultiviert.

5.4.2. Kultivierung der humanen Epithelzelllinie Detroit 562

Detroit 562 Zellen wurden in RPMI-1640 Medium mit 10% FBS, 1% Natriumpyruvat, 0,1 mg/ml Streptomycin und mit 100 Units/ml Penicillin kultiviert. Die Zelllinie wurde für maximal 10 Passagen subkultiviert.

5.4.3. Kultivierung der humanen Endothelzelllinie HBMEC

HBMEC Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% FBS, 10% NU-Serum (PAA), 2 mM L-Glutamin (PAA), 0,1 mM MEM nicht-essentiellen Aminosäuren (PAA), 1% MEM-Vitaminen (PAA), 1 mM Natriumpyruvat (PAA), 0,1 mg/ml Streptomycin und 100 Units/ml Penicillin kultiviert. Die Zelllinie wurde für maximal 10 Passagen subkultiviert.

5.4.4. Zusätze zu den Zellkulturmedien

Einfriermedium	1 ml DMEM (PAA), 100 µl FBS, 100 µl DMSO
FBS	Fetal Bovine Serum "Gold" (PAA)
Penicillin/Streptomycin	0,1 mg/ml Streptomycin, 100 Units/ml Penicillin (PAA)
Trypsin/EDTA	5 mg/ml Trypsin, 2,2 mg/ml EDTA (PAA)
Accutase	(PAA)

5.5. Antikörper

Bezeichnung	eingesetzte Verdünnung	Quelle/Literatur
Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Kaninchen IgG	1:260	Mobitec
Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Maus IgG	1:300	Mobitec
Alexa Fluor 568 Ziege-anti-Kaninchen IgG	1:350	Mobitec
Kaninchen-anti- <i>S. pneumoniae</i> (generiert gegen SP139 und SP51) IgG	1:100	Eurogentec
Maus-anti-TSP1 (A 6.1)	1:400	Calbiochem
Maus-anti-Phosphorylcholin (TEPC15)	1:200	Sigma
Ziege-anti-Maus Peroxidase gekoppelt	1:5000	JacksonImmuno
Schwein-anti-Kaninchen Peroxidase gekoppelt	1:5000	Dako
Maus-anti-Integrin β1 (MAB 1959)	1:100	Chemicon

Bezeichnung	eingesetzte Verdünnung	Quelle/Literatur
Maus-anti-Integrin α v (MAB 1980)	1:100	Chemicon
Maus-anti-Integrin α IIb/ β 3 (A2A9/6)	1:100	Santa Cruz
Maus-anti-Integrin β 3 (MAB 2023Z)	1:100	Chemicon
Kaninchen-anti- <i>S. pneumoniae</i> -Enolase- Serum	1:200	Bergmann <i>et al.</i> , 2001
Ziege-anti-Faktor H	1:2000	Chemicon
Maus-anti- <i>S. mutans</i> -Peptidoglykan IgG	1:50	Serotec
Maus-anti CD42a PE-gekoppelt, anti-human	0,75 μ g/ml	Exalpha

Tab. 48: Verwendete Antikörper und ihre eingesetzte Verdünnung

5.6. Plasmide und Vektoren

Vektor/Plasmid	Selektionsbedingungen	Quelle/Literatur
pGEM-T-Easy	amp (100 μ g/ml)	Invitrogen
pJDC9	erm (5 μ g/ml)	(Chen and Morrison, 1988)
pQE30	amp (100 μ g/ml)	Qiagen

Tab. 49: Verwendete Plasmide und Vektoren und ihre Selektionsbedingungen

5.7. Reagenzien

5.7.1. Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration	Konzentration	Lösungsmittel
	<i>E. coli</i> in μ g/ml	<i>S. pneumoniae</i> in μ g/ml	
Ampicillin	100	100	H ₂ O dest.
Kanamycin	50	200	H ₂ O dest.
Erythromycin	250	5	70% Ethanol
Tetracyclin	10	10	Methanol
Spectinomycin	100	50	H ₂ O dest.
Chloramphenicol	50	8	100% Ethanol
Penicillin		10 000 Units ml ⁻¹ für die Zellkultur	
Streptomycin		10 mg ml ⁻¹ für die Zellkultur	

Tab. 50: Verwendete Antibiotika und ihre eingesetzten Konzentrationen

5.7.2. Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs (NEB) bezogen.

Restriktionsendonuklease	Schnittstelle
<i>Bam</i> HI	G↓GATCC
<i>Hind</i> III	A↓AGCTT

Tab. 51: Verwendete Restriktionsendonukleasen und ihre Schnittstellen

5.7.3. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma bezogen.

Name	T _A (°C)	Sequenz (5' – 3')
dexBF ₁	62	5' – GGATGATAATGGCTATGATATTGC – 3'
aliAR ₂	68,4	5' – CAAGGTAGGTTGATGGATCGGC – 3'
dex19F revers	67,8	5' – GCTCTCGTCCCATTGCATAGG – 3'
Pce1 forward	76	5' – <u>GGATCC</u> CAAGAAAGTTCAGGAAATAAAATCC – 3'
Pce2 revers	74	5' – <u>AAGCTT</u> CTTCATAGAACCATCAACATCC – 3'

Tab. 52: Verwendete Oligonukleotide. Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen. T_A bezeichnet die Annealing-Temperatur bei der PCR.

5.7.4. Molekularbiologische Kits

Name	Firma
Abi Sequenzierung 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
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR-Purification Kit	Qiagen
Peqlab Kits	Peqlab
E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit	
E.Z.N.A.® Plasmid-Miniprep Kit II	

Tab. 53: Verwendete molekularbiologische Kits

5.7.5. DNA-Größenstandard

DNA-Größenstandard	DNA-Fragmente in bp	Firma
λ HindIII-Marker	23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564	NEB
Smart Ladder	10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400, 200	Eurogentech
1 KB-Ladder	10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250	MBI
HindIII-Marker Dig markiert	23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564	Roche

Tab. 54: DNA-Größenstandards

5.7.6. Protein-Größenstandard

Als Größenstandard diente ein Molekulargewichtsstandard mit vorgefärbten Eichproteinen von NEB. Die Proteine wurden bei 200 V für ca. 1 h aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt, das Trenngel konnte angefärbt werden oder direkt für einen Immunblot verwendet werden.

Vorgefärbter Proteinstandard, 6-175 kDa von NEB:

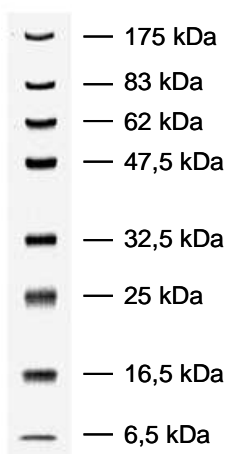


Abb. 47: Vorgefärbter Proteinstandard von NEB (aus Datenblatt von New England Biolabs)

5.7.7. Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Citratpuffer	0,106 M Na-Citrat ad 1 l H ₂ O
DIF-Fixierungslösung	3,7% PFA in 1 x PBS,
6 x DNA Probenpuffer	25% Bromphenolblau, 25% Xylencyanol, 15% Ficoll
Ethidiumbromid-Lösung	100 µl EtBr Stock, 200 ml dest. H ₂ O
FACS-Fixierungslösung	2% PFA, 1% FBS in 1x PBS, pH 7,4
Glukose-Puffer	30 mM Na-Citrat, 100 mM NaCl, 3 mM KCl, 9,6 mM D-Glukose, pH 6,5
IPTG-Stock	1 M IPTG in dest. H ₂ O,
KGB-10 x-Puffer	1 M Kaliumglutamat, 0,25 M Tris-Acetat pH 7,6, 0,1 M Magnesiumacetat, 5% BSA, 0,04% 2-Mercaptoethanol (5 mM)
Natriumcarbonatpuffer	10 ml 0,1 mol/l Na-carbonat, 90 ml 0,1 mol/l Na-hydrogencarbonat
PBS	37 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 80 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 M KH ₂ PO ₄ ad 1 l, pH 7,4
PBS/EDTA	10 mM PBS, 2 mM EDTA, pH 7,5
PBST	PBS mit 0,05% Tween [®] , Phosphatpuffer 0,05M, pH 7,4
Phosphatpuffer	0,05 M Phosphatpuffer
20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0
50 x TAE	2 M Tris, 0,6 M EDTA, 0,57% Eisessig
TBS	10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,3
TBS/Cl	10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , pH 7,3
Trichloressigsäure (100%)	500 g Trichloressigsäure, 227 ml dH ₂ O

Tab. 55: Allgemeine Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
SDS-Page-Probenpuffer	25% 0,5 M Tris-HCl, pH6,8, 20% Glycerin, 5% SDS, 5% Bromphenolblaulösung, 10% 2-Mercaptoethanol
8 x SDS-Page-Laufpuffer	120 mM Tris, 0,96 M Glycin, 0,5% SDS

Tab. 56: Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Lösung	Zusammensetzung
Coomassie	
Coomassie-Färbelösung	50% Methanol, 5,8% Eisessig, 0,2% Coomassie Brilliant Blue TM
Coomassie-Entfärber	40% Methanol, 10% Eisessig
Kolloidal Coomassie	
Lösung I: Blue Stocklösung	5 g Coomassie Brilliant Blue TM G-250 100 ml dest. H ₂ O
Lösung II: Dye Stocklösung	50 g Ammoniumsulfat, 12 ml 85% Phosphorsäure ad 490 ml dest. H ₂ O, 10 ml Lösung I
Lösung III: Färbelösung	200 ml Lösung II, 50 ml Ethanol

Tab. 57: Puffer und Lösungen für Protein-Färbungen

Puffer	Zusammensetzung
Transfer-Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol
Chloronaphthol-Färber	eine 4-Chloro-1-Naphthol Tablette (Sigma) in 10 ml Methanol

Tab. 58: Puffer und Lösungen für das Western Blot-Verfahren

Puffer	Zusammensetzung
Puffer B1	50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, pH 8,0, 0,5% Tween [®] , 0,5 % Triton X-100
Puffer B2	3 M Guanidin HCl, 20% Tween [®]
Puffer QBT	750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15% Isopropanol 0,15% Triton-X-100
Puffer QC	1 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15% Isopropanol
Puffer QF	1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 15% Isopropanol

Tab. 59: Puffer und Lösungen für die Isolierung chromosomaler DNA aus *S. pneumoniae*

Puffer	Zusammensetzung
Lösung 1	50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA
Lösung 2	0,2 N NaOH, 1% SDS
Lösung 3	7,5 M Ammonium-Acetat

Tab. 60: Puffer und Lösungen für die Isolierung chromosomaler DNA aus *E. coli*

Puffer	Zusammensetzung
Lösung A	0,25 M HCl
Lösung B	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
Lösung C	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 5,1

Tab. 61: Puffer und Lösungen für das Southern Blot-Verfahren

Puffer	Zusammensetzung
High-SDS-Puffer	7% SDS, 50% Formamid, 5 x SSC, 50 mM NaPO ₃ , pH 7,0, 0,1% N-Laurylsarcosin, 2% Blockreagenz (Roche)
Maleinsäure-Puffer	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5
Waschpuffer	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5, 0,3% Tween®
Absättigungspuffer	Maleinsäure-Puffer, 1% Blockingreagenz (Boehringer)
Detektionspuffer	0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5

Tab. 62: Puffer und Lösungen für die DNA-DNA Hybridisierung

	Sammelgel		Trenngel	
	4%		10%	12%
dest. H ₂ O	2,5 ml		3,0 ml	2,5 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (30%)	20,5 ml		2,5 ml	3,0 ml
Tris-HCL 1,5M, pH 8,8			1,9 ml	1,9 ml
Tris-HCL 0,5M, pH 6,8	1,0 ml			
10% SDS	40 µl		75 µl	75 µl
APS (10%)	20 µl		40 µl	40 µl
TEMED	4 µl		4 µl	4 µl

Tab. 63: Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamidgele

5.8. Zellwandkomponenten

Bezeichnung	Beschreibung
lösliches Peptidoglykan (sPG)	isoliert aus <i>S. aureus</i> WT, bzw. <i>S. aureus</i> Δ <i>lgt</i> , wasserlöslich, Pool aus G50 Sephadex TM -Chromatographie, erhalten von U. Zähringer (Borstel) 1mg/ml in dH ₂ O (Rosenthal and Dziarski, 1994)
Park's Nukleotid	isoliert aus <i>E. coli</i> (UDP-MurNac-Pentapeptid), wasserlöslich, AS-Sequenz: UDP-MurNac-L-Ala-D-isoGlu-m-DAP-D-Ala-D-Ala, erhalten von W. Vollmer, 1mg/ml in dH ₂ O
Wandteichonsäuren (WTA)	isoliert aus <i>S. aureus</i> , wasserlöslich, erhalten von T. Hartung, (Konstanz), 1mg/ml in dH ₂ O (Draing <i>et al.</i> , 2006)
Peptidoglykan-Fraktionen 4-6	verschiedene Elutions-Fraktionen von sPG aus G50 Sephadex TM -Chromatographie, wasserlöslich, unterscheiden sich in ihrer molekularen Größe, erhalten von S. Inamura, 1mg/ml in dH ₂ O (Inamura <i>et al.</i> , 2006)
Peptidoglykan-Suspension (PG)	isoliert aus <i>S. aureus</i> WT, nicht wasserlöslich, (Sigma) 1mg/ml in dH ₂ O
Muramyl-Dipeptid (MDP)	AS-Sequenz: MurNac-L-Ala-D-isoGlu, wasserlöslich, (Sigma) 1mg/ml in dH ₂ O
N-Acetylglukosamin (GlcNac)	wasserlöslich (Sigma)
N-Acetylmuraminsäure (MurNac)	wasserlöslich (Sigma)

Tab. 64: Verwendete Zellwandkomponenten

6. Methoden

6.1. Kultivierung von Bakterien

6.1.1. Kultivierung von Streptokokken

Die Streptokokken wurden auf Blutagarplatten, falls erforderlich mit entsprechendem Antibiotikazusatz, bei 37°C über Nacht kultiviert. THY-Flüssigkulturen wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,05-0,08 von den Blutagarplatten angeimpft. Die Kultivierung der Flüssigkulturen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank bis zu einer OD₆₀₀ von 0,35-0,45.

6.1.2. Kultivierung von Staphylokokken und Listerien

Die verschiedenen Staphylokokken- und Listerien-Stämme wurden auf BHI-Platten kultiviert. Für die Übernachtskulturen wurden 10 ml BHI-Medium mit einer Kolonie beimpft und über Nacht bei 37°C mit 200-250 rpm (rotations per minute) geschüttelt.

6.1.3. Kultivierung von *H. influenzae*

H. influenzae wurde auf BHI-Platten, welche mit NAD und Haemin supplementiert waren, kultiviert. Für die Übernachtskulturen wurden 10 ml supplementiertes BHI-Medium mit einer Kolonie beimpft und über Nacht bei 37°C mit 200-250 rpm geschüttelt.

6.1.4. Kultivierung von *N. meningitidis*

Die Meningokokken wurden auf GC-Platten bei 37°C und 5% CO₂ für 48 Stunden kultiviert.

6.1.5. Kultivierung von *L. pneumophila*

Die Legionellen wurden auf Aktivkohleplatten bei 37°C und 5% CO₂ für 72 Stunden kultiviert.

6.1.6. Kultivierung von *E. coli* und *B. subtilis*

E. coli und *B. subtilis* wurden auf LB-Platten, die bei Bedarf die zur Selektion notwendigen Antibiotika enthielten, bei 37°C bzw. 30°C für *B. subtilis* und 5% CO₂ über Nacht kultiviert. Für die Übernachtskulturen wurden 10 ml LB-Medium mit einer Kolonie beimpft und über Nacht bei 37°C bzw. 30°C für *B. subtilis* mit 200-250 rpm geschüttelt.

6.1.7. Konservierung der Bakterienstämme

Die Stämme wurden unter den genannten Kulturbedingungen angezogen und mit Glycerin in einer Endkonzentration von 25% bei -80°C eingefroren.

Bei Streptokokken:

Die Stämme wurden auf den entsprechenden Agar-Platten über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Bakterienmaterial mit einem Wattestab abgenommen und in 1 ml Medium mit 25% Glycerin ausgedrückt und bei -80°C eingefroren.

6.2. Methoden für das Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

6.2.1. Kultivierung der Zelllinien

Die Kultivierung der Epithel- und Endothelzelllinien erfolgte in 25 cm² Zellkulturflaschen oder in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm bei 37°C, ca. 95% relativer Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5%. Nach etwa 3 Tagen wurde das Kulturmedium durch frisches Medium ersetzt. Alle in der Zellkultur verwendeten Medien und Lösungen wurden vor der Benutzung in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 700 rpm für 4 min durchgeführt. Zum Splitten eines konfluenten Zellrasens auf neue Kulturflaschen oder zum Aussäen der Zellen für Infektionsversuche wurden diese mit Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Nach 2 min Inkubation der Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA bei 37°C wurden die Zellen abgenommen, die Trypsinwirkung wurde mit zusätzlichen 5 ml Infektionsmedium abgestoppt, und für 4 min bei 700 rpm zentrifugiert. Für die Subkultivierung wurden die Zellen nach der Zentrifugation in frischem Kulturmedium resuspendiert, nach Bedarf verdünnt und in neue Zellkulturflaschen ausgesät. Zum Aussäen mit definierter Zellzahl, z.B. bei der Vorbereitung eines Infektionsversuchs, wurden die Zellen mittels einer Neubauer-

Zählkammer ausgezählt. Die ausgezählten Zellen wurden je nach Versuchsansatz in 96-well, 24-well oder in 6-well Platten eingestellt und ausgesät.

6.2.2. Kryokonservierung der Zelllinien

Durch Lagerung in flüssigem Stickstoff können Zellen über viele Jahre kryokonserviert werden. Der konfluente Zellrasen wurde mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale abgelöst und für 4 min bei 700 rpm zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 2 ml Kulturmedium aufgenommen und pro Kryoröhrchen mit 1 ml Zellsuspension, supplementiert mit 10% FBS und 10% DMSO, eingefüllt. Die Röhrchen wurden in einem mit Isopropanol gefüllten Einfriercontainer (Nalgene™Cryo 1°C Freezing Container) für 12 Stunden bei -80°C gelagert. Der Einfriercontainer ermöglicht eine kontrollierte Verringerung der Temperatur um 1°C/min, somit wird die Bildung von Kristallen und damit eine Schädigung der Zellen vermieden. Nach etwa 12 Stunden wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

6.2.3. Auftauen der Zelllinien

Zur Kultivierung der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden diese in einem 37°C warmen Wasserbad soweit aufgetaut bis noch ein kleiner Eiskern vorhanden war. Sofort wurde 1 ml vorgewärmtes Kulturmedium zugegeben und resuspendiert, um die Konzentration des zum Einfrieren verwendeten DMSO zu verdünnen. Die Zellsuspension wurde 4 min bei 700 rpm zentrifugiert und die Zellen in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

6.3. Methoden zur Untersuchung der Adhärenz und der Invasion von Bakterien an und in humane Wirtszellen

Die bakterielle Interaktion mit den Wirtszellen wurde experimentell mit Hilfe von *in vitro* Infektionsversuchen quantitativ erfasst. Dabei wurden in Kultur gehaltene verschiedene Zelllinien mit unterschiedlichen Bakterienkulturen unter definierten Laborbedingungen infiziert und die Adhärenz und Invasion der Bakterien quantifiziert.

6.3.1. Infektionsversuche

Die Epithel- und Endothelzellen wurden mit 5×10^4 Zellen pro Vertiefung in 24-well-Platten auf Glas-Deckgläschen ausgesät und über 48 Stunden bei 37°C in 5% CO_2 kultiviert. Zum Zeitpunkt der Infektion war ein semikonfluenter Zellrasen mit ca. 2×10^5 Zellen gewachsen. Vor der Infektion wurde das antibiotikahaltige Zellkulturmedium durch dreimaliges Waschen gegen 1 ml antibiotikafreies Infektionsmedium (DMEM-HEPES (25 mM) mit 1% FBS ausgetauscht. Die Infektion des semikonfluenten Monolayers erfolgte standardmäßig mit 5×10^6 Bakterien, was einer MOI (multiplicity of infection) von 25 entspricht. Das Endvolumen eines Infektionsansatzes betrug im Standardversuch 1 ml. Für die Infektion mit Pneumokokken wurden die Bakterien in THY-Flüssigmedium angezogen und bei einer optischen Dichte von OD_{600} 0,35-0,45 für die Infektion vorbereitet und im Versuch eingesetzt. Die Bakterien wurden auf eine OD_{600} von 0,1 eingestellt, was einer Bakterienzahl von 10^8 Pneumokokken pro ml entspricht. Für die Infektion mit anderen in Flüssigkultur kultivierten Bakterien (*S. aureus*, *S. mutans*, *S. pyogenes*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *B. subtilis*) wurden die Übernachtskulturen auf eine optische Dichte von 0,1 bei 600 nm eingestellt. Für die Infektion von *N. meningitidis* wurden über zwei Tage kultivierte Bakterien von den GC-Agar-Platten mit PBS abgeschwemmt und die so erhaltene Bakteriensuspension auf eine OD_{600} von 0,1 eingestellt. Aus den eingestellten Bakteriensuspensionen wurden die Wirtszellen standardmäßig mit 50 μl (entsprechen 5×10^6 Bakterien für Pneumokokken und etwa 2×10^6 für Staphylokokken, *S. pyogenes* und *L. monocytogenes*) inokuliert. Die Infektionen der Zellen wurden in der Regel über 2 bis 4 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank durchgeführt.

6.3.2. Vorbereiten der Bakterien für Infektionsversuche

Die Inhibition, Blockierung oder der enzymatische Verdau potenzieller Adhäsine erfolgte durch die Inkubation der Bakterien mit Proteinen, Antikörpern oder Enzymen. Durch eine Pronase E-Behandlung der Bakterien sollten oberflächenlokalisierte Proteine proteolytisch abgedaut werden. Dafür wurden 1×10^9 Pneumokokken mit 100 μl Pronase E-Lösung (1 mg/ml) für 15 min bei 37°C inkubiert. Zur Oxidation zellwandassoziierter Zuckerstrukturen wurden 1 ml OD_{600} von 1 der Pneumokokken mit 5 μl Natriumperiodatlösung (1 mg/ml) für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien mit 1 x PBS gewaschen, auf eine OD_{600} von 0,1 eingestellt und die Wirtszellen mit 50 μl dieser eingestellten Pneumokokkensuspension infiziert. Das zellwandassoziierte Phosphorylcholin

wurde maskiert, indem 1×10^9 Pneumokokken mit 20 μl TEPC 15 (anti-Phosphorylcholin Antikörper, Sigma) für 15 min bei 37°C inkubiert wurden. Um das Phosphorylcholin von der Zellwand abzudauen wurden 1 ml OD_{600} von 1 der Pneumokokken mit 200 μl aufgereinigter Phosphorylcholin-Esterase (entsprachen 10 μg) für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien mit 1 x PBS gewaschen, auf eine OD_{600} von 0,1 eingestellt und die Zellen mit 50 μl dieser eingestellten Pneumokokkensuspension infiziert.

6.3.3. Vorbereiten der Wirtszellen für Infektionsversuche

Zur Charakterisierung der TSP1 vermittelten Adhärenz und Invasion von Pneumokokken an humane Wirtszellen wurde das TSP1 vor der Infektion auf den Wirtszellen immobilisiert. Dafür wurden ein semikonfluenter Wirtszellrasen, wenn nicht anders angegeben, mit 3 μg TSP1 pro Kavität einer 24-well-Zellkulturschale für 30 min bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Das ungebundene überschüssige TSP1 wurde vor der Infektion durch dreimaliges Waschen mit dem Infektionsmedium (DMEM-HEPES) entfernt.

6.3.4. Inhibitionsexperimente in der Zellkultur

Zur Identifizierung des potentiellen Adhäsins der Pneumokokken für TSP1 wurden die Zellen nach der Immobilisierung des TSP1 auf den Wirtszellen in 500 μl Infektionsmedium aufgenommen und mit 100 μg Sa LTA (aufgereinigten Lipoteichonsäuren von *S. aureus*), mit 100 μg Sp LTA (aufgereinigten Lipoteichonsäuren von *S. pneumoniae*), mit 100 μg sPG (lösliches Peptidoglykan von *S. aureus*), 100 mM *N*-Acetylglukosamin und 100 mM *N*-Acetylmuraminsäure für 10 min inkubiert und anschließend mit der eingestellten Bakteriensuspension infiziert. Die weitere Charakterisierung des potenziellen Adhäsins der Pneumokokken bzw. der anderen Gram-positiven Bakterien für TSP1 erfolgte durch Inhibitionsexperimente mit verschiedenen Eluaten aus der Peptidoglykanaufreinigung bzw. Peptidoglykanfragmenten der bakteriellen Zellwand. Nach der Immobilisierung des TSP1 auf der Zelloberfläche wurden die Zellen für 10 min mit 20 μg sPG (lösliches Peptidoglykan von *S. aureus*), mit 20 μg Park's Nukleotid isoliert aus *E. coli*, mit 20 μg WTA (Wandteichonsäuren), mit 20 μg dreier verschiedener gelchromatographischer Eluate (GPC-Fractionen) aus der Aufreinigung von sPG, mit 20 μg nicht löslichem Peptidoglykan von *S. aureus* (Sigma) bzw. mit 20 μg MDP (Muramyl-Dipeptid, Sigma) in 500 μl

Infektionsmedium (DMEM-HEPES) inkubiert und anschließend mit der eingestellten Bakteriensuspension infiziert.

Sollten potenzielle Rezeptoren der Wirtszellen blockiert oder enzymatisch verdaut werden, wurden die Wirtszellen vor der Infektion in den Vertiefungen der Kulturplatte mit Proteinen, Antikörpern oder Enzymen inkubiert. Für eine Identifizierung des potenziellen zellulären Rezeptors für TSP1 wurden die Zellen in 300 µl Infektionsmedium aufgenommen und mit 10 µg der anti- β_1 -Integrin (Chemicon), β_3 -Integrin (Chemicon), $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (Chemicon) oder gegen $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin Antikörper (Santa Cruz) für 30 min inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Infektionsmedium in den Ansatz pipettiert, 3 µg TSP hinzugegeben und für weitere 30 min inkubiert. Die Wirtszellen wurden dreimal mit Infektionsmedium gewaschen und mit der eingestellten Bakteriensuspension infiziert.

Zur Identifizierung der Proteoglykane als potentielle zelluläre Rezeptoren für TSP1, wurde der konfluente Zellrasen dreimal mit Infektionsmedium gewaschen und für 3 h mit 10 mU, 50 mU bzw. 100 mU Heparitinase in 500 µl Infektionsmedium inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Weiterhin wurden die Zellen mit 50 U Heparin (ICN) oder mit 20 µg Heparansulfat (Sigma) in 500 µl Infektionsmedium für 30 Minuten inkubiert und gewaschen. Es folgte eine 30-minütige Immobilisierung von 3 µg TSP1 auf die Wirtszellen. Vor der Infektion mit der eingestellten Bakteriensuspension wurden die Zellen dreimal mit Infektionsmedium gewaschen.

Bei der spezifischen Inhibition der TSP1 vermittelten Adhärenz und Invasion von Pneumokokken an humane Wirtszellen durch einen anti-TSP1 Antikörper wurde zunächst das TSP1 auf den Wirtszellen immobilisiert. Dafür wurden die Wirtszellen mit 3 µg TSP1 pro Kavität einer 24-well-Zellkulturschale für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Das ungebundene, überschüssige TSP1 wurde nach 30 min durch dreimaliges Waschen mit dem Infektionsmedium (DMEM-HEPES) entfernt. Die Zellen wurden in 300 µl Infektionsmedium aufgenommen und für 30 min mit dem anti-TSP1 Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Vor der Infektion wurde der Antikörper durch einmaliges Waschen mit 500 µl Infektionsmedium entfernt.

6.3.5. Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Nach abgelaufener Infektion wurden die Infektionsansätze dreimal mit PBS gewaschen. Die Fixierung der Infektion erfolgte durch Zugabe von 300 µl 3,7%iger PFA-Lösung in PBS. Die Proben wurden bis zur Färbung in der Fixierlösung bei 4°C aufbewahrt. Die Darstellung

adhärenter und invasiver Bakterien erfolgte durch eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung. Dabei wurde zuerst mit einem primären Antikörper das gewünschte Antigen detektiert. Gegen den ersten Antikörper wurde dann ein zweiter, Fluorochrom-gekoppelter Antikörper eingesetzt, der im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden konnte. In dieser Arbeit wurden zwei Fluorochrome, Alexa 488 und Alexa 568, jeweils gekoppelt an Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper oder an Ziege-anti-Maus-IgG Antikörper verwendet. Alexa 488 besitzt eine Anregungswellenlänge im blauen Spektralbereich und emittiert im grünen Bereich. Alexa 568 absorbiert im grünen Spektralbereich und emittiert rot. Die Immunfluoreszenz-Präparate wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop Axioskop von Zeiss bei 1000-facher Vergrößerung ausgewertet oder am konfokalen Mikroskop fotografiert.

Für die Immunfluoreszenzfärbung von Pneumokokken wurden die infizierten und fixierten Zellen zunächst in PBS mit 10% FBS für 30 min abgesättigt. Die extrazellulären, d.h. die adhärenenten Pneumokokken, wurden anschließend mit Kaninchen-anti-Pneumokokken IgG Antikörpern inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die infizierten Wirtszellen mit einem Alexa 488 gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper inkubiert, um die extrazellulären Bakterien zu färben. Die invasiven Pneumokokken konnten nach der Permeabilisierung der Wirtszellen mit 0,1% Triton-X-100 mit einer Inkubation mit dem anti-Pneumokokken Antikörper und einer anschließenden Inkubation mit einem Alexa 568 gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper detektiert werden. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte in PBS mit 10% FBS für 30 bis 45 min. Nach der Immunfärbung der Bakterien wurden die Deckgläser mit einem Tropfen Moviol auf einem Glasobjektträger eingebettet und mit Nagellack luftdicht verschlossen. Die Präparate können so bei 4°C über einige Jahre aufbewahrt werden. Die Auszählung der adhärenenten und invasiven Pneumokokken erfolgte mit einem Fluoreszenz-Mikroskop bei einer 1000-fachen Vergrößerung. Adhärenente Bakterien konnten im Doppelfilter als gelbe Zellen detektiert werden, invasive Bakterien erschienen dagegen rot.

6.3.6. Bestimmung der wirtszellassozierten und der intrazellulären Bakterien im Plattierungsversuch

Zur weiteren Bestimmung der wirtszellassozierten und der intrazellulären Bakterien wurden Assoziations- oder Gentamicinversuche durchgeführt. Dafür wurden zwei Tage vor dem Versuch 5×10^4 Wirtszellen pro Kavität in 24-well-Platten ohne Deckgläschen ausgesät und über 48 Stunden bei 37°C in 5% CO₂ kultiviert. Die Infektion mit den Bakterien erfolgte wie beschrieben. Die Wirtszellen wurden für diese Versuche standardmäßig für zwei Stunden

infiziert. Zur Bestimmung der wirtszellassozierten Bakterien, d.h. der Gesamtzahl der angehefteten und intrazellulären Bakterien, an die Epithel- bzw. Endothelzellen wurden die Wirtszellen nach der Infektion mit Infektionsmedium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 300 µl Infektionsmedium mit 1% Saponin für 10 min bei 37°C und 5% CO₂ lysiert. Dabei wurden intrazelluläre, d. h. invasive, Bakterien freigesetzt. Die Versuchsansätze wurden in entsprechenden Verdünnungen (bis zu 1:10 000) auf Blutagarplatten ausplattiert. Über Nacht wuchsen die überlebenden extra- und intrazellulären Bakterien zu Kolonien, welche ausgezählt und graphisch dargestellt werden konnten. Die Bestimmung der intrazellulären, d. h. invasiven und überlebenden Bakterien erfolgte nach dem Abtöten der extrazellulären Bakterien mit dem Antibiotikum Gentamicin. Nach einer Infektionszeit von zwei Stunden erfolgte nach der Entfernung der ungebundenen Bakterien eine Behandlung des Infektionsansatzes mit 100 Units/ml Gentamicin und 100 Units/ml Penicillin im Infektionsmedium. Das Abtöten der extrazellulären Bakterien erfolgte für eine Stunde mit den Antibiotika bei 37°C und 5% CO₂. Zusätzlich wurde eine Bakterienkontrolle mit dem Antibiotikagemisch inkubiert, um die vollständige Abtötung der Bakterien zu überprüfen. Nach einer Stunde wurde der Infektionsansatz sorgfältig mit Infektionsmedium gewaschen, um die Antibiotika zu entfernen. Zur Lyse der eukaryontischen Zellen und Freisetzung der invasiven Bakterien wurden die Wirtszellen nun in 300 µl 1%iger sterilfiltrierter Saponinlösung für 10 min im Brutschrank inkubiert. Die Infektionssuspension wurde in entsprechenden Verdünnungen in PBS aufgenommen und auf entsprechenden Agar-Platten ausplattiert. Über Nacht wuchsen noch intakte Bakterien heran, welche ausgezählt und ausgewertet werden konnten.

6.3.7. Phagozytoseversuche

Isolierung von Granulozyten

Zur Gewinnung von Granulozyten wurden 10-20 ml peripheres Vollblut aus der Armbeuge eines gesunden, allergiefreien Spenders mit einer 50 ml Spritze abgenommen. In dieser Spritze waren 2,5 ml Citratpuffer zur Gerinnungshemmung vorgelegt. Zur Trennung der verschiedenen Blutzelltypen wurden zunächst 12 ml Histopaque mit 10 ml raumtemperiertem Ficoll überschichtet. Das Spenderblut wurde vor der vorsichtigen Beladung auf den Gradienten 1:1 mit PBS verdünnt. Die Dichtegradienten wurden für 20 min bei 800 x g (1700 rpm) in einer Schwingzentrifuge ohne Bremse abzentrifugiert. Auf Grund der unterschiedlichen Größe und Dichte der Zellen erfolgte eine Auftrennung in verschiedene

Lagen mit Blutzellen und Blutbestandteilen. Die oberen Schichten mit Monozyten, Plasma und Ficoll wurden mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgenommen. Die darunterliegenden Granulozyten wurden mit einer Pipette vorsichtig aufgenommen, in ein neues Röhrchen überführt, sofort mit 50 ml eiskaltem RPMI versetzt und für 10 min bei 800 x g und 4°C mit Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment durch kurzes Vortexen gelöst. Anschließend wurde das Granulozytensediment mit 9 ml MilliQ Wasser für genau 30 sec zu den Zellen gegeben, um die Erythrozyten zu zerstören. Danach wurde 1 ml 10 x PBS zugegeben, vorsichtig vermischt und mit eiskaltem RPMI auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt. Die gesamte Suspension wurde für 10 min bei 1700 rpm und 4°C mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellsediment in 1 ml RPMI aufgenommen. Für den anschließenden Phagozytoseversuch wurden die Zellen auf 6×10^4 Zellen/50 μ l eingestellt. Bis zur Infektion mit den Bakterien konnten die Granulozyten bis zu 8 h auf Eis gelagert werden.

Durchführung des Phagozytoseversuchs mit frisch isolierten Granulozyten

Die Pneumokokkenstämme wurden bis zu einer OD_{600} von 0,35-0,45 in THY-Medium kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien für 5 min bei 3500 x g zentrifugiert und das Sediment mit 5 ml Natrium-Carbonatpuffer (pH 9,5) gewaschen. Die gewaschenen Bakterien wurden in 1 ml Natrium-Carbonatpuffer aufgenommen und in diesem Puffer auf eine OD_{600} von 1 eingestellt. 2 ml (2×10^9) der eingestellten Bakteriensuspension wurden erneut sedimentiert und in 200 μ l FITC-Lösung (1 mg/ml in Natrium-Carbonatpuffer) aufgenommen. Die Bakterien-FITC-Suspension wurde für 1 h bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Bakterien dreimal mit jeweils 1 ml Natrium-Carbonatpuffer gewaschen bis der abzentrifugierte Überstand klar war. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Bakteriensediment in 2 ml PBS/0,5% FBS resuspendiert. 6×10^4 (50 μ l von der eingestellten Zellsuspension) Granulozyten wurden je Phagozytoseansatz in ein FACS-Röhrchen vorgelegt. Sollten die Granulozyten mit einem Protein präinkubiert werden, so wurde das Protein dazugegeben, der Ansatz mit PBS/0,5% FBS auf ein Gesamtvolumen von 100 μ l aufgefüllt und die Zellen mit dem Protein für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 5 min bei 1360 x g bei 4°C zentrifugiert und in 100 μ l PBS/0,5% FBS aufgenommen. Sollte die Phagozytose in Anwesenheit der Proteine erfolgen, so wurde das Protein vor der Infektion mit den Bakterien nicht entfernt. Für die Phagozytose wurden 5 μ l der eingestellten FITC-markierten Bakterien (ca. $1,5 \times 10^6$) zu den Zellen pipettiert und für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Der Phagozytoseansatz wurde

nach 30 min bei 1360 x g für 5 min zentrifugiert, das Zellsediment in 200 µl PBS/0,5% FBS/1% PFA aufgenommen und für mindestens 1h im Kühlschrank fixiert. Anschließend erfolgte die Messung im Zytometer.

6.3.8. Ratten Endokarditis/Sepsis-Modell

Bei sechs mit Isofluoarane anästhesierte Ratten (männliche Crl:CD Ratten, 251-275 g, Charles River, Sulzfeld) wurde jeweils ein Polyethylen-Katheter (0,28 x 0,61 mm, Hartenstein SX01) von der Aorta ins Herz gelegt. Die Operation der Tiere wurde von Herrn Dr. Udo Lorenz (Chirurgische Klinik, Würzburg) durchgeführt. 24h nach der Katheterlegung wurde bei drei Ratten über den Katheter jeweils 100 µg anti-TSP1 Antikörper (mAB 6.1, Calbiochem) (in 500 µl PBS) in die Herzregion gegeben. Drei Ratten wurden nicht mit dem Antikörper behandelt. 45 min nach der Antikörperzugabe wurden alle Ratten durch eine Hinterlaufvene mit 5×10^5 *S. aureus* Xen 29 (in 200 µl PBS) infiziert. 24 h nach der Infektion wurden die Ratten euthanasiert. Es wurden jeweils das Herz, die Milz und beide Nieren entnommen und bis zur Homogenisierung in 200 µl PBS aufbewahrt. 20 µl Blut wurden direkt auf MKP-Agar-Platten ausplattiert. Die Organe wurden homogenisiert, das Homogenat konzentriert bzw. in zwei Verdünnungsstufen auf MKP-Agar-Platten ausplattiert und die Kolonie-bildenden Einheiten am nächsten Tag ausgezählt.

6.4. Methoden zur Analyse der Bindung und der Expression von Proteinen auf humanen Wirtszellen oder auf Bakterien

6.4.1. Durchflusszytometrie mit Epithel- und Endothelzellen

Die eukaryontischen Zellen in einer konfluent bewachsenen 25 cm² Zellkulturschale wurden möglichst vorsichtig vom Schalenboden abgelöst, um die oberflächenexponierten Strukturen zu schonen. Dafür wurden die Zellen für 15 min mit 5 ml Accutase bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden für 4 min bei 700 rpm zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 1 ml Medium aufgenommen. Die Zellen wurden mit 0,5% FBS in PBS (FACS-Puffer) auf eine Zellzahl von 10 000 Zellen/µl eingestellt. Zur Bestimmung der Bindungsaktivität von FITC-markierten Proteinen an eukaryontische Zellen wurden 20 µl der eingestellten Zellsuspension mit der gewünschten Konzentration des Proteins für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit dem FACS-Puffer (PBS/0,5% FBS) gewaschen

und mit einer 1%igen PFA-Lösung in 100 μl für mindestens eine Stunde bei 4°C fixiert. Zur quantitativen Kontrolle der Expression von oberflächenassoziierten Strukturen, wie z.B. verschiedenen Rezeptoren und Integrinen, wurden diese mittels Antikörpern fluoreszenzmarkiert. Dafür wurden 20 μl des eingestellten Ansatzes (2×10^5 Zellen) in 80 μl PBS/0,5% FBS resuspendiert. Zu dieser Suspension wurde der entsprechende Antikörper gegen das nachzuweisende Integrin gegeben. Der Ansatz wurde für 1 h auf Eis inkubiert, mit FACS-Puffer gewaschen und in 100 μl FACS-Puffer resuspendiert. Der FITC-gekoppelte Zweitantikörper wurde dazugegeben und der Ansatz ebenfalls für 1 h auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen mit FACS-Puffer wurde die Probe in 200 μl FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Probenröhrchen überführt, vorsichtig mit Ultraschall behandelt, und bis zur Messung im Zytometer abgedunkelt auf Eis gelagert.

6.4.2. Untersuchungen zur Interaktion der Thrombozyten mit *S. pneumoniae* in der Durchflusszytometrie

Zur Separation der Thrombozyten von anderen Blutbestandteilen wurde frisches humanes Blut für 10 min bei 200 x g zentrifugiert und der erhaltene Plasmaüberstand in dem die Thrombozyten enthalten waren vorsichtig abgenommen. Die Zellzahl der Thrombozyten wurde in TBS Ca^{2+} auf 25 000 Thrombozyten/ μl eingestellt. Die Pneumokokkenstämme wurden bis zu einer OD_{600} von 0,35-0,45 in THY-Medium kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien für 5 min bei 3500 x g zentrifugiert und das Sediment mit 5 ml TBS Ca^{2+} gewaschen. Die gewaschenen Bakterien wurden in 1 ml TBS Ca^{2+} aufgenommen und in diesem Puffer auf eine OD_{600} von 1 eingestellt. Zwei ml (2×10^9) der eingestellten Bakteriensuspension wurde 1:100 mit dem Farbstoff Syto 13 (Molecular Probes) versetzt. Die Bakterien wurden für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit dem Farbstoff inkubiert, anschließend gewaschen und auf eine Bakterienzahl von 250 000 Pneumokokken/ μl in TBS Ca^{2+} eingestellt. Für die Inkubation der Bakterien mit den Thrombozyten wurde ein Verhältnis von 10:1 (Bakterien:Thrombozyten) gewählt. In die Probenröhrchen wurde für einen Gesamtinkubationsansatz von 500 μl 15 μl anti-CD42a-PE zur Fluoreszenzmarkierung der Thrombozyten, 10 μl GPRP (Gly-Pro-Arg-Pro, 1,25 M) für eine Verhinderung einer Gerinnselbildung und 7 μl Thrombin (aus Vorverdünnungen für 0,2 U/ml bzw. 1 U/ml Thrombin) für eine Thrombozytenaktivierung vorgelegt. Anschließend wurden im 5 Sekunden-Takt 100 μl der eingestellten Thrombozyten in die Ansätze gegeben und für genau 5 min voraktiviert. Nach 5 min wurden 100 μl der eingestellten Pneumokokkensuspension zu den voraktivierten Thrombozyten gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur mit den

Blutplättchen koinkubiert. Zum Abstoppen und Fixieren der Reaktion wurden 250 µl einer 1%-igen PFA-Lösung in den Ansatz pipettiert, für mindestens 1 h im Kühlschrank fixiert, vorsichtig mit Ultraschall behandelt und im Zytometer analysiert.

6.4.3. Durchflusszytometrie mit Bakterien

Die Bindungsaktivität von FITC-markiertem TSP1 an Bakterien wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie im Zytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson) analysiert. 5×10^7 Bakterien in 50 µl TBS Ca^{2+} wurden mit FITC-markierten Proteinen in einem Konzentrationsbereich von 0-100 µg/ml für 20 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend zweimal mit TBS Ca^{2+} gewaschen (3500 rpm, 5 min) und in 200 µl 1%iger PFA-Lösung für mindestens eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die fixierten Bakterien wurden vorsichtig mit Ultraschall behandelt und bis zur Messung abgedunkelt bei 4°C gelagert.

Zur Analyse der Rekrutierung von TSP1 aus Thrombin-aktiviertem Blutplättchenkonzentrat wurden 0-200 µl Überstand von Thrombin-aktivierten Thrombozyten mit 5×10^7 Bakterien in 200 µl TBS Ca^{2+} für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 200 µl TBS Ca^{2+} gewaschen (3500 rpm, 5 min). Zur Detektion des bakteriengebundenen TSP1 wurden die Bakterien mit dem anti-Thrombospondin-1 Antikörper (Calbiochem) in einer Verdünnung von 1:400 in TBS Ca^{2+} für 30 min inkubiert und anschließend gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit einem Alexa 488 gekoppelten anti-Maus Antikörper in einer Verdünnung von 1:300 für 30 min. Anschließend wurden die Bakterien gewaschen, in 200 µl TBS Ca^{2+} mit 1% PFA aufgenommen, vorsichtig mit Ultraschall behandelt und bis zur Messung abgedunkelt bei 4°C gelagert.

6.4.4. Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen

Die durchflusszytometrischen Analysen wurden mit dem Gerät FACSCalibur von Becton Dickinson durchgeführt. Sobald eine Zelle den fokussierten Laserstrahl passiert, wird die Richtung und die Wellenlänge des anregenden Lichts verändert, so dass die charakteristische Streuung des blauen Lichts in Vorwärtsstreulicht (**forward scatter**, FSC) und Seitwärtsstreulicht (**side scatter**, SSC) aufgetrennt wird. Der FSC stellt das Maß für die Zellgröße dar, während der SSC der spezifischen intrazellulären Granularität der Zelle entspricht.

Das Durchflusszytometer misst Signale sowohl im logarithmischen als auch im linearen Modus. Für die Detektion von Immunfluoreszenzen wurde immer die logarithmische Darstellung gewählt, da diese Darstellung den dynamischen Messbereich vergrößert, dass sowohl schwächere als auch stärkere Signale mit derselben Skalierung erfasst werden können. Die Zweiparameterdarstellung von FSC zu SSC zur Unterscheidung von Zellpopulationen wurde in Form eines Punktwolkendiagramms („Dotplot“), bzw. eines Histogrammes visualisiert. Durch das Eingrenzen („gaten“) einer Zellpopulation konnten Zellpopulationen getrennt voneinander betrachtet werden.

Für die statistische Auswertung wurde die Zweiparameterdarstellung in Form eines Punktwolkendiagramms der gemessenen Fluoreszenz (FI-1) relativ zum SSC herangezogen. Die „geometrische mittlere Fluoreszenz- Intensität“ (GMFI) multipliziert mit den Prozent der fluoreszenz-markierten und eingegrenzten ("gated") Zellen bestimmte das Maß der Bindungsaktivität. Das Programm WinMDI (<http://www.facs.scripps.edu/software.html>) wurde für die Auswertung der erhaltenen Daten benutzt.

6.4.5. Bindung von Pneumokokken an immobilisierte Proteine

Mikrotiterplatten (Maxisorp-Platten, Nunc) wurden mit dem zu testenden Protein beladen und das Protein konnte über Nacht bei 4°C an die Plastikoberfläche der Mikrotiterplatten immobilisieren. Es wurden, wenn nicht anders angegeben, Proteinmengen zwischen 0,1 µg und 10 µg Protein in einem Volumen von 50 µl Puffer (PBS oder TBS Ca²⁺) pro Kavität einer 96-well Mikrotiterplatte immobilisiert. Am nächsten Morgen wurden die Näpfe der 96-well Mikrotiterplatten jeweils dreimal mit 100 µl Puffer gewaschen und mit 1% BSA (bovines Serum Albumin) für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Kavitäten zweimal mit Puffer gewaschen.

Die Pneumokokkenstämme wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,35-0,45 in THY-Medium kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien für 5 min bei 3500 x g zentrifugiert und das Sediment mit 5 ml Natrium-Carbonatpuffer (pH 9,5) gewaschen. Die gewaschenen Bakterien wurden in 1 ml Natrium-Carbonatpuffer aufgenommen und in diesem Puffer auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt. 5 ml (5 x 10⁹) der eingestellten Bakteriensuspension wurden erneut sedimentiert und in 500 µl FITC-Lösung (1 mg/ml in Natrium-Carbonatpuffer) aufgenommen. Die Bakterien-FITC-Suspension wurde für 1 h bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Bakterien dreimal mit jeweils 1 ml Natrium-Carbonatpuffer gewaschen bis der abzentrifugierte Überstand klar war. Nach dem letzten Waschschrift wurde

das Sediment in 3 ml PBS resuspendiert. Die immobilisierten Proteine wurden mit jeweils 150 μ l (ca. 2×10^8) der Bakteriensuspension inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde im Brutschrank bei 37°C. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte ohne vorheriges Waschen im Fluoroscan Ascent Reader gemessen. Dieser Messwert wurde in der späteren Evaluierung als 100%-Wert gesetzt. Nach der Messung des Maximalwertes wurden die Näpfe mit PBS gewaschen und nach jedem Waschschrift mit 150 μ l PBS aufgefüllt und die Fluoreszenz gemessen. Durch diese Messungen wurde der Bindungswert ermittelt, der zu dem 100%-Wert in Relation gesetzt wurde und nach dem Abzug der BSA-Negativ-Kontrolle die tatsächlichen Bindungswerte ergab. Die Bindungswerte wurden in Prozent oder der Anzahl der gebundenen Bakterien angegeben.

6.4.6. Bindungsversuche mit 125 Iod-Thrombospondin-1

Markierung von TSP1 mit 125 Iod

Zur radioaktiven Markierung von TSP1 mit dem Radioisotop 125 Iod wurden 20 μ g TSP1 in 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,5) in silikonisierte Glasröhrchen gegeben. Nach Zugabe von 70 μ l 125 Iod erfolgte die Oxidierungsreaktion für 5 min mit 5 μ l frisch gelöstem Chloramin T (1 mg/ml in Phosphatpuffer). Zum Beenden der Reaktion wurden 5 μ l Na-Metabisulfid (1 mg/ml) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde mit 2,5 ml PBS/0,05% Tween[®] aufgefüllt und auf eine PD 10-Säule (Pharmacia) geladen. Die PD-10 Säule wurde anschließend 1 x mit PBST gewaschen und das iodierte Protein mit 3,5 ml PBST eluiert. Die radioaktive Proteinlösung wurde aliquotiert und für maximal 2 Wochen bei 4°C aufbewahrt.

Durchführung der Bindungsversuche mit 125 Iod-markiertem TSP1

Die Pneumokokkenstämme wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 kultiviert. Sie wurden für 5 min bei 3500 x g sedimentiert und in PBS 0,05 % Tween 20 mit 2 mM Ca²⁺ (PBSTCa²⁺) auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt. Jeweils 350 μ l dieser Suspension wurden mit 15 μ l 125 I-TSP1 (ca. 20 ng Protein) für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 650 μ l PBSTCa²⁺ beendet und die Bakterien für 5 min bei 3500 x g sedimentiert. Der Überstand mit ungebundener Radioaktivität wurde abgenommen, das Sediment in 2 ml Zintilationsflüssigkeit aufgenommen und die Radioaktivität im Gamma-Counter gemessen. Zur Quantifizierung der Bindung wurde der Maximalwert bestimmt. Dazu wurde das iodierte Protein ohne Bakteriensuspension für 40 min mit 25 μ l FBS bei Raumtemperatur inkubiert und vor der cpm-Messung mit 1 ml Trichloressigsäure (10%)

präzipitiert. Die Berechnung der Bindung in Prozent erfolgte durch Korrelation der Messwerte mit dem Maximalwert und war das Maß für die Menge von Bakterien-gebundenem Protein. Als Berechnungsgrundlage wurden die Mittelwerte aus jeweils drei identischen Versuchsansätzen gebildet.

6.4.7. Thrombospondin-1-Peptidoglykan Bindungsversuch

Am Abend vor dem Versuchstag wurden 96-well Mikrotiterplatten (Maxisorp, Nunc) mit TSP1 inkubiert und das Protein über Nacht bei 4°C an die Plastikoberfläche der Mikrotiterplatten immobilisiert. Es wurden Protein-Konzentrationen zwischen 0,1 µg und 3 µg TSP1 in einem Volumen von 50 µl TBS Ca²⁺ pro Vertiefung eingesetzt. Am Versuchstag wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte jeweils 3 x mit TBS Ca²⁺ gewaschen und mit 200 µl 5% Magermilch in TBS Ca²⁺/0,1% Tween[®] für 5 h bei 4°C abgesättigt. Die Platten wurden 3 x mit TBS Ca²⁺ gewaschen und das immobilisierte TSP1 mit löslichem Peptidoglykan (sPG) in 50 µl TBS Ca²⁺ für 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten gewaschen und mit einem anti-Peptidoglykan Antikörper (1:50 in TBS Ca²⁺, Serotec) für 1 h bei 4°C inkubiert. Der Antikörper wurde durch Waschen mit TBS Ca²⁺ entfernt. Es folgte eine Inkubation von 45 min mit einem anti-Maus-Peroxidase-gekoppelten Antikörper (1:5000 in TBS Ca²⁺, JacksonImmuno). Pro Vertiefung wurden 50 µl einer ABTS-Lösung (mit 2µl H₂O₂/ml ABTS) gegeben, um eine enzymatische Farbreaktion auszulösen. Die Messung im ELISA-Reader erfolgte nach 15 min bei 405 nm.

6.5. Graphische Darstellung und statistische Auswertung

Bei Infektionsversuchen oder Bindungsversuchen wurde nach mindestens dreimaliger Durchführung unter identischen Bedingungen der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde durch den Student t-Test ermittelt. Der t-Test wurde ungepaart und zweiseitig durchgeführt. Signifikanz-Werte von (p) ≤ 0,05 wurden als statistisch signifikant angenommen. Zur Kalkulation der statistischen Werte und der graphischen Darstellung wurde das Computerprogramm Excel und Power Point (Microsoft) verwendet.

6.6. Methoden für das Arbeiten mit Proteinen

6.6.1. Herstellung von Bakterienlysaten

Zur Herstellung von Bakterienlysaten von *S. pneumoniae* wurden 3 ml einer Bakterienkultur ($OD_{600} = 0,4$) bei $3500 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 100 μ l PBS aufgenommen und mit 100 μ l Protein-Probenpuffer versetzt. Die Suspension wurde für 10 min aufgeköcht. 10 μ l dieses Bakterienlysats wurden auf eine SDS-Page aufgetragen. Diese Menge entspricht einer Anzahl von $1,5 \times 10^7$ Bakterien und die Proteinmenge kann für Immunblots verwendet werden.

6.6.2. Ausschüttung von Thrombospondin-1 aus Blutplättchen durch Thrombin-Aktivierung

Thrombozytenkonzentrate (Transfusionsmedizin, Uniklinikum Würzburg), die ca. $1,5 \times 10^4$ Blutplättchen pro ml enthielten, wurden für 10 min bei $1000 \times g$ zentrifugiert. Das Sediment aus 200 ml (3×10^6 Thrombozyten) Thrombozytenkonzentrat wurde mit 10 ml Glukose-Puffer gewaschen und in 5 ml Glukose-Puffer resuspendiert. Zur Aktivierung der Blutplättchen wurden 3 Units Thrombin (Sigma) unter Rühren zu den gewaschenen Thrombozyten gegeben und für 2 min bei 37°C inkubiert. Die Aktivierung wurde nach 2 min mit 6 Units/ml Hirudin (Sigma) gestoppt. Die aktivierten Plättchen wurden über Nacht bei -20°C eingefroren, um eine Aggregatbildung zu unterstützen. Nach dem Auftauen wurden die aktivierten und aggregierten Plättchen zentrifugiert ($10\,000 \times g$, 30 min). 200 μ l Überstand aus Thrombin-aktivierten Plättchen enthielt verschiedene sekretierte Proteine unter anderem das am häufigsten vorhandene Protein TSP1 aus 3×10^5 Thrombozyten. Der Überstand wurde abgenommen, fraktioniert und bei -80°C eingefroren.

6.6.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine Elektrophorese Methode, bei der Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Für die in dieser Arbeit verwendete diskontinuierliche SDS-PAGE wurde ein Polyacrylamidgel bestehend aus einem Sammelgel (4% Acrylamid, pH 6,8) und einem Trenngel (10 oder 12% Acrylamid, pH 8,8) (Zusammensetzung der Gele siehe 5.8) verwendet. Die Polymerisation der Gele wurde durch

Zugabe von TEMED (Tetramethyldiamin) als Katalysator und APS (Ammoniumperoxidisulfat) als freier Radikalbildner ausgelöst.

6.6.4. Protein-Färbungen

Proteine, die durch die SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, sind entweder mit Coomassie Brilliant Blue R205 oder mit kolloidaler Coomassie-Lösung angefärbt worden. Bei Proteinmengen oberhalb von 1 µg pro Proteinbande wurde die Coomassie Brilliant Blue™ (G-250) Lösung zur Proteinfärbung eingesetzt. Das Gel wurde in einer sauren alkoholischen Farbstofflösung für 1 bis 2 Stunden eingelegt. Das Protein wurde durch Denaturierung im Gel fixiert und bildete einen Komplex mit dem Farbstoff. Zur Entfärbung wurde das Gel in einem Entfärbebad (40% EtOH, 10% Essigsäure, 50% dH₂O) geschüttelt bis alle Banden deutlich sichtbar waren. Vor der Trocknung der Gele wurden diese in Wasser aufbewahrt.

Eine deutlich sensitivere Färbung ist mit kolloidalem Coomassie möglich. Dafür wurde das Gel für 24 Stunden unter leichtem Schwenken in einem kolloidalen Coomassie Färbebad eingelegt. Zur Entfärbung wurde das Gel in Wasser geschüttelt. Das Wasser wurde so oft gewechselt, bis es sich nicht mehr blau verfärbte und alle Banden im Gel deutlich sichtbar waren. Die gefärbten Gele wurden in einem Bio-Rad Gelrockner zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet.

6.6.5. Western-Blot: Semidry-Verfahren

Beim Western-Blot werden die mittels Elektrophorese aufgetrennten Proteine einer SDS-PAGE elektrophoretisch auf eine mit Methanol aktivierte PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran oder auf Nitrocellulose übertragen. Anschließend konnten die transferierten Proteine spezifisch durch Antikörper nachgewiesen werden.

Beim Semidry-Verfahren lag die mit Transfer-Puffer angefeuchtete PVDF-Membran auf drei Lagen in Puffer getränktem Filterpapier. Das Gel wurde luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Auf das Gel kamen wiederum drei Lagen von getränktem Filterpapier. Der Transfer erfolgte für 45 min bei 15 V, wobei die Membran auf der Anodenseite und das Gel auf der Kathodenseite liegen musste. Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurden die freien Bindungsstellen der Membran mit 10% Magermilch (Applichem) in PBS für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C abgesättigt. Nach

dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Membran mit dem spezifischen Primärantikörper für mindestens zwei Stunden inkubiert. Nach einem dreimaligen 10-minütigen Waschschrift mit PBS wurde die Membran mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper für 1 Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die enzymatische Reaktion in 10 ml PBS durch den Zusatz von 6 μ l H₂O₂ und 500 μ l Chloronaphthol (Sigma) ausgelöst und positive Banden anhand einer Farbreaktion detektiert.

Die ECL-Reaktion (enhanced chemiluminescence) ist etwa 10-mal sensitiver als die Entwicklung mit Chloronaphthol. Der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper wurde stärker verdünnt als bei der Entwicklung mit Chloronaphthol. Die ECL-Entwicklerlösungen 1 und 2 (Amersham) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran für 1 min mit der Lösung inkubiert. Die Membran wurde in Frischhaltefolie eingeschlagen und ein Röntgenfilm aufgelegt.

6.6.6. Dot-Spot-Analyse

Zur Untersuchung der Protein-Bakterien Interaktion unter nativen Bedingungen wurden Proteine in unterschiedlichen Konzentrationen auf eine Nitrozellulose-Membran immobilisiert. Durch Anlegen eines Vakuums an eine Spot-Apparatur (BioRad) konnten die in PBS gelösten Proteine auf eine in PBS getränkte Membran immobilisiert werden. Anschließend wurde die Membran mit 10% Magermilch in PBS für mindestens 1 Stunde abgesättigt. Nun konnte die Bindung von z.B. bakteriellen Proteinen oder auch anderen Wirtsproteinen untersucht und durch spezifische Antikörper sowie Sekundärantikörper detektiert werden.

6.6.7. Expression von Proteinen in *E. coli*

Für eine *E. coli*-Expressionskultur wurde eine Vorkultur mit 5 ml LB-Medium, supplementiert mit den für die Selektion des entsprechenden rekombinanten Stamms erforderlichen Antibiotika, angesetzt. 250 ml antibiotikahaltiges LB-Medium wurde mit der Vorkultur beimpft und bei 30°C über Nacht unter Schütteln kultiviert. Für die Proteinexpression wurde zu der Flüssigkultur noch einmal die gleiche Menge an antibiotikafreiem Medium gegeben und mit 1 mM IPTG (β -D-Isopropyl-Thiogalactopyranosid) induziert. Nach 4-5 Stunden Inkubation bei 30°C wurde die Kultur für 10 min bei 5000 x g zentrifugiert und das Sediment bei -20°C eingefroren.

6.6.8. Aufreinigung von Proteinen mit der Affinitätschromatographie

Die Fusionsproteine mit einem His₆-Tag Proteine wurden affinitätschromatographisch über Nickel-NTA-Agarose Säulen aufgereinigt. Die Proteine binden spezifisch und umkehrbar durch Imidazol, dessen Struktur ähnlich der Histidine ist und somit die gekoppelten Proteine durch einen Konzentrationsüberschuss verdrängt, an die Säule. Die Aufreinigung erfolgte unter nativen Bedingungen.

Das aus 250 ml Expressionskultur gewonnene Bakteriensediment wurde in 2 ml Lysepuffer aufgenommen und in der French Press bei 40 000 psi aufgeschlossen. Das Lysat wurde erneut bei 10 000 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der klare Überstand für die Aufreinigung der Fusionsproteine auf eine Ni-NTA-Säule gegeben. Die Säule wurde mit 20 mM imidazolhaltigem Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 250 mM Imidazol, wobei das Eluat in drei Fraktionen aufgefangen wurde. Die Qualität der Aufreinigung wurde durch die SDS-Gelelektrophorese und anschließende Coomassie-Färbung überprüft. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte im Kühlraum und die Protein-Fraktionen wurden zunächst auf Eis gelagert.

6.6.9. Immunglobulin G-Aufreinigung

Zur Aufreinigung von Immunglobulin G Antikörpern aus Serum wurde die Probe über Protein A-Sepharose aufgereinigt. 0,5 g der Protein A-Sepharose wurden in 20 ml dest. Wasser unter Rühren aufgequell. Anschließend wurde die Säule luftblasenfrei gefüllt. Nach dem Füllen wurde die Säule (Ø 1,6 cm) für 15 min mit PBS gespült und 5 ml des Serums auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Sepharose erneut mit PBS gewaschen. Die fraktionsweise Elution der IgGs erfolgt mit 0,1 mM Glycin/HCL (pH 3,0). Das Eluat wurde mit 1 M Tris/HCL (pH 8,0) neutralisiert, das Säulenbett mit 2 M Harnstoff gewaschen und mit PBS equilibriert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die optische Dichte des Eluats bei 280 nm bestimmt. Dabei entspricht eine OD₂₈₀ von 1 einer Konzentration von 0,8 mg IgG pro ml.

6.6.10. Dialyse

Die Dialyse ist ein Trennverfahren, das mittels semipermeabler Membranen Moleküle gemäß ihrer Größe trennt. Die Poren erlauben es niedermolekularen Substanzen durch die Membran zu diffundieren, während hochmolekulare Substanzen zurückgehalten werden. Die Lösungen

wurden für die Dialyse in einen Dialyseschlauch eingeschlossen, der in 4-5 Liter PBS eingetaucht wurde. Nach 16-stündigem Rühren bei 4°C sollten sich die beiden Lösungen innerhalb und außerhalb des Dialyseschlauchs im Gleichgewicht befinden, während die Makromoleküle, wie z.B. Proteine, im Inneren des Dialyseschlauchs verblieben.

6.6.11. Kolorimetrischer Funktionstest der Phosphorylcholinesterase (Vollmer and Tomasz, 2001)

Die Esterase-Aktivität des aus *E. coli* aufgereinigten Pneumokokkenenzym Phosphorylcholinesterase (Pce) wurde in einem kolorimetrischen Funktionstest untersucht. Dazu wurden verschiedene Mengen 0,1-20 µl (ca. 0,05-10 µg) des aufgereinigten Enzyms in einer 96-well Mikrotiterplatte abgedunkelt für 10 min bei 37°C mit 100 µl des Substrats *p*-Nitrophenyl-Phosphorylcholin (1 mg/ml in 0,5 M Kaliumphosphatpuffer) inkubiert. Nach 10 min war die Farbreaktion der aktiven Esterase deutlich zu erkennen und die Reaktivität wurde bei 405 nm im ELISA-Reader analysiert.

6.7. Methoden für das Arbeiten mit DNA

6.7.1. Isolierung chromosomaler DNA aus *S. pneumoniae*

Die Isolierung chromosomaler DNA aus Pneumokokken erfolgte aus dem Bakteriensediment einer 30 ml THY-Flüssigkultur. Die Bakterien wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 kultiviert und anschließend für 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Die Lösungen B1, B2, QBT, QC und QF wurden nach Anleitung des Herstellers Qiagen erstellt. Das Bakteriensediment wurde in 3,5 ml Lösung B1 aufgenommen, welche zuvor mit 50 µl RNaseA (5 mg/ml) supplementiert wurde. Das resuspendierte Sediment wurde anschließend mit 50 µl Lysozym (25 mg/ml), 100 µl Pronase E (25 mg/ml) und 50 µl Mutanolysin (5000 U/ml) für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe der Enzyme wurde die Lyse der Bakterienzellen unterstützt, störende Proteine und RNA wurden abgebaut. 1,2 ml der Lösung B2 wurden dazugegeben und für 30 min bei 50°C inkubiert. Eine mit Lösung QBT äquilibrierte Genomic-Tipp 100/G-Säule wurde mit der Bakteriensuspension beladen. Die Säule wurde zweimal mit dem Waschpuffer QC gewaschen und die bakterielle DNA anschließend mit dem Elutionspuffer QF aus der Säule eluiert. Mit dem 0,7-fachen Volumen an Isopropanol wurde die DNA gefällt und für 30 min bei 5000 x g zentrifugiert, mit eiskalten 70% Ethanol gewaschen, nochmals für 10 min bei 5000 x g und 4°C zentrifugiert. Die DNA wurde in 200 µl bidest. H₂O gelöst.

6.7.2. Plasmidisolierung aus *E. coli*

Zur Plasmidisolierung aus *E. coli* wurde 1 ml einer Übernachtskultur für 3 min bei 6800 x g zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 200 µl Lösung 1 (Zusammensetzung der Lösungen siehe 5.8) resuspendiert. Zur Lyse der Zellwand wurde die Bakteriensuspension für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. 400 µl Lösung 2 wurden zugegeben und die Bakteriensuspension für 5 min auf Eis inkubiert. Zur Fällung der Membranproteine und der genomischen DNA wurde Lösung 3 zugegeben, sofort invertiert und der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 16 000 x g von Membranfraktionen und chromosomaler DNA getrennt. 750 µl der sich im Überstand befindenden Plasmid-DNA wurden zum Fällern der DNA mit 750 µl Isopropanol versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 16 000 x g wurde die DNA in 100 µl 70% EtOH gewaschen, wiederum zentrifugiert und anschließend 10 min bei 37°C getrocknet. Die DNA wurde in 40 µl dH₂O gelöst und zum Abbau vorhandener RNA mit 1 µl RNaseA (10 mg/ml) für 30 min bei 37°C inkubiert.

Zur Isolierung großer Mengen an Plasmid-DNA wurde eine 20 ml *E. coli*-Kultur in LB-Medium angezogen und über das E.Z.N.A. Peqlab Plasmid Midi Kit nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

6.7.3. Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können mittels der Agarose-Gelelektrophorese voneinander getrennt und identifiziert werden. Ein Gel aus Agarose formt ein Netzwerk aus Poren, durch welches die negativ-geladenen DNA-Moleküle zum positiv geladenen Pol wandern. Die Trennung der DNA-Moleküle erfolgt in Abhängigkeit ihrer Größe.

Je nach der Größe der zu untersuchenden DNA wurden 0,8 bis 2,0%ige Agarose-Gele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer suspendiert, aufgeköcht und nach dem Abkühlen in eine Gelkammer gegossen. Als Laufpuffer enthielten die Gelkammern 1 x TAE. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 6 x DNA-Probenpuffer vermischt. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 120 Volt für ca. 1 Stunde. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden durch das Färben des Gels für 10 min in einer Ethidiumbromidlösung (3 µg/ml Ethidiumbromid in H₂O) und der anschließenden Bestrahlung mit einer UV-Lampe ($\lambda = 366$ nm) sichtbar gemacht.

6.7.4. DNA-Elution aus Agarosegelen

Zur Fragmentisolierung aus einem DNA-Gemisch wurde die DNA in einem TAE-Agarosegel vorsichtig (ca. 60 V) elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde durch Färben mit Ethidiumbromid und durch die Bestrahlung mit einer UV-Lampe sichtbar gemacht. Das gewünschte Fragment wurde als Agaroseblöckchen aus dem Gel ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) oder des E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kits (Peqlab) gemäß den Protokollen der Hersteller.

6.7.5. Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Für die Spaltung der chromosomalen DNA oder Plasmid-DNA wurde die DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym inkubiert. Als Puffer wurde der KGB-Puffer oder ein vom Hersteller empfohlener Puffer (von NEB) verwendet. Die Restriktion erfolgte für 2 Stunden bei 37°C und hatte die folgende Zusammensetzung:

5 µl DNA
1 µl Restriktionsenzym (20 U)
2 µl Restriktionspuffer (abhängig vom Enzym)
12 µl H ₂ O
<hr/>
20 µl Ansatz

6.7.6. Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurde 1 Liter LB-Medium mit 5 ml einer Vorkultur von *E. coli* M15, DH5 α oder XL1-blue angeimpft. Die Bakterien wurden bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert und 15 min bei 3000 x g zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde zweimal in einem Liter eiskaltem 1 mM HEPES und anschließend in 20 ml 10% Glycerin gewaschen. Die Bakterien wurden in 2,5 ml eiskaltem 10%igem Glycerin aufgenommen und in 40 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

6.7.7. Elektroporation von *E. coli*

Bei der Elektroporation werden Zellmembranen durch das Anlegen einer Spannung kurzzeitig permeabilisiert. Durch die vorübergehende Öffnung der Poren können DNA-Moleküle in die Zelle übertragen werden. Für die Transformation wurden 50 ng Plasmid-DNA mit 40 µl kompetenten Bakterien gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Mischung in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte mit folgenden Parametern: 2,5 kV Spannung, 25 µF Kapazität und 400 Ω Widerstand. Direkt nach dem Impuls wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37°C geschüttelt. Danach wurden die Bakterien auf selektiven LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.7.8. Transformation von *S. pneumoniae*

S. pneumoniae besitzt eine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von Fremd-DNA. Für die Transformation erfolgte die Kultivierung von *S. pneumoniae* in CpH8-Medium bei 37°C. Die Stämme wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,03-0,05 angeimpft und bis zu einer Stamm-abhängigen zur Transformation optimalen OD₆₀₀ kultiviert. *S. pneumoniae* Typ 35A (NCTC 10319) und der D39 (Typ 2 Stamm) weisen bei einer OD₆₀₀ von 0,15 die höchste Kompetenzrate auf. Von der Bakterienkultur wurden 1,5 ml abgenommen und mit 1,5 µg des Kompetenz-stimulierenden Peptids CSP-1 (D. Morrison, University of Illinois at Chicago, Chicago) versetzt. Die Bakteriensuspension wurde für 20 min bei 37°C inkubiert und anschließend für 4 min auf Eis gestellt. 250 µl der Bakteriensuspension wurden zu 1 µg Plasmid-DNA gegeben und für 30 min bei 30°C inkubiert. Danach folgt eine 90-minütige Inkubation bei 37°C. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf selektiven Blutagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag konnten die gewachsenen Transformanten auf Blutagarplatten mit erhöhter Antibiotikakonzentration überstrichen werden und auf molekularer Ebene überprüft werden.

6.7.9. Polymerase-Kettenreaktion

DNA-Fragmente konnten mittels der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) und der Verwendung geeigneter Oligonukleotide sowie der Taq-DNA-

Polymerase amplifiziert werden. Die PCR wurde mit folgendem Reaktionsgemisch und PCR-Programm durchgeführt:

15 µl H ₂ O
2,5 µl 10 x Reaktionspuffer
0,5 µl 10 mM dNTPs
1 µl Oligonucleotid 5' (20 pmol)
1 µl Oligonucleotid 3' (20 pmol)
0,4 µl Taq-DNA-Polymerase rekombinant
0,08 U (Invitrogen)
1 µl DNA
0,75 µl 25 mM MgCl ₂
<hr/>
22,15 µl Ansatz

Für die Amplifizierung wurde folgender Reaktionszyklus verwendet:

Start:	95°C	7 min	
Denaturierung:	95°C	30 sec	} 30 Zyklen
Hybridisierung:	X	1 min	
Polymerisation:	72°C	Y min	
Finale Elongation:	72°C	4 min	

Die Hybridisierungstemperatur (X) °C wurde in Abhängigkeit der Oligonukleotide etwa 5°C unterhalb ihrer Schmelztemperatur gewählt. Die Polymerisationsdauer (Y) min wurde in Abhängigkeit von der Länge des zu amplifizierenden Fragments gewählt (1 kb ≈ 1 min). Die erhaltenen Produkte wurden durch die Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

6.7.10. Digoxigenin (DIG)-Markierung von Oligonukleotiden

Zur Herstellung von nicht-radioaktiven DNA-Sonden wurden DNA-Fragmente mit Digoxigenin markiert, um sie zum Nachweis von homologen Sequenzen in der DNA-DNA Hybridisierung einsetzen zu können. Die Markierung der linearen DNA erfolgte durch den Einbau von Digoxigenin-dUTP während einer PCR. Zur Detektion dieser markierten Fragmente wurde ein an alkalische Phosphatase gekoppelter polyklonaler Schaf-anti-DIG

Antikörper verwendet, der mit dem Substrat CSPD reagierte. Die enzymatische Dephosphorylierung löste eine Lichtemission aus, die auf einem Röntgenfilm als positives Signal sichtbar gemacht werden konnte.

Die DIG-Markierung in der PCR wurde mit folgendem Reaktionsgemisch durchgeführt:

0,6 µl MgCl₂ (50 mM)
2 µl 10 x Reaktionspuffer
2 µl DIG-Labeling Mix (200 µM dNTPs)
1 µl Oligonukleotid 5' (20 pmol)
1 µl Oligonukleotid 3' (20 pmol)
0,2 µl Taq- Polymerase (Invitrogen)
1 µl DNA
ad 20 µl bidest. H₂O

Die erhaltenen Produkte wurden durch die Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Durch die markierte Sonde weist das DNA-Fragment ein leicht verändertes Laufverhalten auf. Vor dem Einsatz in der Southern-Analyse wurde die Sonde mit dem QIAquick PCR-Purification Kit aufgereinigt.

6.7.11. DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden nach der Sanger-Methode, welcher das Kettenabbruchverfahren zu Grunde liegt, durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Die Reaktionen mit den zu sequenzierenden DNA-Proben wurden in einem PCR-Gerät in Anwesenheit spezifischer Oligonukleotide, Desoxynukleotide und markierter Didesoxynukleotide (ddNTPs), bei dessen Einbau es zum Kettenabbruch kommt, durchgeführt.

Standardgemäß wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

2 µl Premix (Dye-ddNTPs, Ampli-Taq-Polymerase, dNTP-Mix)
 2 µl 5 x Reaktionspuffer
 1 µl Plasmid-DNA bzw. PCR-Produkt
 1 µl Oligonukleotid (10 pmol)
 ad 10 µl H₂O

Für die Sequenzierreaktion wurden folgende Einstellungen gewählt:

Start:	94°C	3 min	} 25 Zyklen
Denaturierung:	94°C	30 sec	
Hybridisierung:	X °C	15 sec	
Polymerisation:	60°C	4 min	

Die Hybridisierungstemperatur (X) °C wurde in Abhängigkeit der Oligonukleotide etwa 5°C unterhalb ihrer Schmelztemperatur gewählt. Nach der Sequenzierreaktion wurde der Reaktions-Ansatz mit einer Ethanol-Fällung aufgereinigt. Dazu wurden dem Reaktionsansatz 90 µl bidest H₂O, 10 µl 3 M Natrium-Acetat (pH 4,6) und 250 µl 100% Ethanol zugegeben. Die DNA wurde für 15 min bei 16 000 x g gefällt, der Überstand entfernt und mit 250 µl 70%igen Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 16 000 x g für 5 min wurde das Ethanol vollständig entfernt. Die DNA wurde getrocknet und in 25 µl Sequenzier-Puffer der Firma ABI aufgenommen. Die Analyse der Sequenz erfolgte automatisch in einem ABI-Sequenziergerät.

6.7.12. Ligation und Klonierung von PCR-Fragmenten in Vektoren

Bei der Ligation werden durch eine enzymatische Reaktion doppelsträngige Nukleinsäuren unter Bildung einer Phosphodiester-Bindung miteinander verknüpft. Durch die Ligation werden PCR-Fragmente in ein linearisiertes Plasmid integriert, welches als Vektor zur Transformation eingesetzt werden kann. In dieser Arbeit wurde die T4-DNA-Ligase (Invitrogen) aus dem T4-Phagen verwendet. Diese Ligase ligiert sowohl glatte als auch überhängende Enden bei 12-14°C.

Reaktionsansatz einer Ligation:

5 µl 2x Rapid Ligation Buffer
100 ng Vektor-DNA
1 µl PCR-Produkt
1 µl T4 DNA-Ligase
ad 10 µl bidest. H₂O

Die Ligation erfolgte für mindestens 16 Stunden bei 12°C.

6.7.13. Southern-Blot

Ziel des Southern-Blots ist es, DNA-Fragmente, die zuvor mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, auf eine positive geladene Nylonmembran zu fixieren, um durch Hybridisierung mit markierten Sonden einzelne DNA-Fragmente spezifisch nachweisen zu können.

In dieser Arbeit wurde genomische DNA aus *S. pneumoniae* Stämmen über Nacht mit dem Restriktionsenzym *Hind*III geschnitten. Die DNA-Fragmente wurden durch Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und mittels der Vakuum-Blot-Methode auf eine Nylonmembran übertragen. Vor dem DNA-Transfer wurde die Nylonmembran für 1-2 min in H₂O bidest. und anschließend für 5 min in 20 x SSC geschwenkt. Die Nylonmembran wurde auf den Vakuumblotter gelegt und mit einer in Gelgröße zugeschnittenen Schablone bedeckt. Das Gel wurde darüber gelegt und für 15 min zur Depurinierung mit Lösung A bedeckt. Das Vakuum wurde auf 50 mbar eingestellt. Nach vollständiger Depurinierung wurde die restliche Lösung A abgesaugt und anschließend wurde die DNA für weitere 15 min mit Lösung B denaturiert. Nach 15 min wurde die restliche Lösung B abgesaugt und für 15 min mit Lösung C neutralisiert. Nach der Neutralisierung wurde die Lösung C durch 20 x SSC ersetzt und die DNA für 90 min auf die Nylonmembran transferiert. Anschließend wurde das Vakuum abgestellt, das Gel entfernt und die Membran zum Denaturieren 30 sec in 0,4 N NaOH gelegt. Es folgte ein Neutralisationsschritt für 30 sec in 0,2 M Tris-HCl (pH 7,5). Nach kurzem Antrocknen wurde die DNA mit dem UV-Crosslinker auf der Nylon-Membran fixiert.

6.7.14. DNA-DNA-Hybridisierung

Die Hybridisierung mit einer DIG-markierten DNA-Sonde ermöglichte die Detektion homologer und nicht-homologer DNA-Sequenzen innerhalb eines Genoms.

Die Nylonmembran wurde für 2 Stunden bei 42°C in High-SDS-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde die einzelsträngige DIG-markierte DNA-Sonde (10 ng/ml) und 50 µl einzelsträngige Heringssperm-DNA zur Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte im Hybridisierungssofen bei 42°C über Nacht. Es folgten jeweils zwei Waschschrte für 15 min bei 30°C mit 2 x SSC/0,1% SDS und für weitere 15 min bei 60°C mit 0,1 x SSC / 0,1% SDS. Anschließend wurde die Membran für 5 min in Waschpuffer geschwenkt und 30 min mit dem Absättigungspuffer inkubiert. Nach der Absättigung wurde die Membran mit dem anti-DIG Antikörper in der Verdünnung 1:10 000 für 30 min inkubiert. Durch zwei 15 minütige Waschschrte mit Waschpuffer wurden ungebundene Antikörper entfernt. Die Membran wurde 2 x für jeweils 5 min mit Detektionspuffer äquilibriert. Anschließend wurde das Substrat CSPD in einer 1:100 Verdünnung zu dem Detektionspuffer gegeben und für 5 min inkubiert. Die Membran wurde in Frischhaltefolie eingeschlagen und zur Verstärkung der Enzymreaktion für 15 min bei 37°C inkubiert. Zur Detektion der Signale wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und entwickelt.

6.7.15. Herstellung einer kapsellosen Pneumokokken Mutante

In der bereits kapsellosen Mutante des bekapselten TIGR4 (Serotyp4) (F. Ianelli, Siena) wurden die Gene des Kapsellokus durch eine Kanamycin-Resistenz-Kassette ersetzt. Die flankierenden Gene, *dexB* und *aliA*, des ursprünglich intakten Kapsellokus sind noch vorhanden. Zur Herstellung einer kapsellosen Mutante des D39 (Serotyp2) wurde mittels PCR mit dem Primer-Paar dexBF₁/aliAR₂ amplifiziert, als Template diente chromosomale DNA des Tigr4Δ*cps*. Primer dexBF₁ bindet an DNA-Sequenzen des *dexB*-Gens von Position 171 und 194 (+Strang, das A im Startcodon von dexB ist +1). Primer aliAR₂ bindet an Sequenzen des *aliA*-Gens von Position 1544 bis 1521 (-Strang). Der D39 Wildtyp (P165) wurde mit dem aufgereinigten PCR-Produkt transformiert und anschließend Kanamycin-resistente Transformanten selektioniert. Eine spezifische Integration des DNA-Fragments wurde durch eine Southern-Blot-Analyse mit einer *dexB*-spezifischen Sonde überprüft. Zur weiteren Charakterisierung der Mutante wurde eine Serotypisierung am Nationalen Referenzzentrum für Streptokokken (Prof. Reinert, Aachen) durchgeführt.

7. Anhang

7.1. Literaturverzeichnis

- Adams, J.C.** (2001) Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17: 25-51.
- Adams, J.C.** (2004) Functions of the conserved thrombospondin carboxy-terminal cassette in cell-extracellular matrix interactions and signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1102-1114.
- Agerer, F., Michel, A., Ohlsen, K., and Hauck, C.R.** (2003) Integrin-mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src family protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 278: 42524-42531.
- Alcantara, R.B., Preheim, L.C., and Gentry-Nielsen, M.J.** (2001) Pneumolysin-induced complement depletion during experimental pneumococcal bacteremia. *Infect Immun* 69: 3569-3575.
- AlonsoDeVelasco, E., Verheul, A.F., Verhoef, J., and Snippe, H.** (1995) *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol Rev* 59: 591-603.
- Armstrong, L.C., and Bornstein, P.** (2003) Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix Biol* 22: 63-71.
- Bateman, A., and Bycroft, M.** (2000) The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *J Mol Biol* 299: 1113-1119.
- Berger, H., Hacker, J., Juarez, A., Hughes, C., and Goebel, W.** (1982) Cloning of the chromosomal determinants encoding hemolysin production and mannose-resistant hemagglutination in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 152: 1241-1247.
- Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G.S., and Hammerschmidt, S.** (2001) alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* 40: 1273-1287.
- Bergmann, S., and Hammerschmidt, S.** (2006) Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology* 152: 295-303.

- Black, S., Shinefield, H., Fireman, B., Lewis, E., Ray, P., Hansen, J.R., Elvin, L., Ensor, K.M., Hackell, J., Siber, G., Malinoski, F., Madore, D., Chang, I., Kohberger, R., Watson, W., Austrian, R., Edwards, K.** (2000) Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19: 187-195.
- Bleuel, K., Popp, S., Fussenig, N.E., Stanbridge, E.J., and Boukamp, P.** (1999) Tumor suppression in human skin carcinoma cells by chromosome 15 transfer or thrombospondin-1 overexpression through halted tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2065-2070.
- Boneca, I.G.** (2005) The role of peptidoglycan in pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 46-53.
- Boulnois, G.J.** (1992) Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol* 138: 249-259.
- Brouwer, N., Dolman, K.M., van Zwieten, R., Nieuwenhuys, E., Hart, M., Aarden, L.A., Roos, D., and Kuijpers, T.W.** (2006) Mannan-binding lectin (MBL)-mediated opsonization is enhanced by the alternative pathway amplification loop. *Mol Immunol* 43: 2051-2060.
- Brown, J.S., Gilliland, S.M., and Holden, D.W.** (2001) A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Mol Microbiol* 40: 572-585.
- Bruyn, G.A., Zegers, B.J., and van Furth, R.** (1992) Mechanisms of host defense against infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 14: 251-262.
- Bubert, A., Sokolovic, Z., Chun, S.K., Papatheodorou, L., Simm, A., and Goebel, W.** (1999) Differential expression of *Listeria monocytogenes* virulence genes in mammalian host cells. *Mol Gen Genet* 261: 323-336.
- Chen, H., Herndon, M.E., and Lawler, J.** (2000) The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biol* 19: 597-614.
- Chen, J.D., and Morrison, D.A.** (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: 155-164.
- Cheng, Q., Finkel, D., and Hostetter, M.K.** (2000) Novel purification scheme and functions for a C3-binding protein from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochemistry* 39: 5450-5457.
- Chugh, T.D., Burns, G.J., Shuhaiber, H.J., and Bahr, G.M.** (1990) Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to fibrin-platelet clots in vitro mediated by lipoteichoic acid. *Infect Immun* 58: 315-319.

- Clarke, J.K.** (1924) On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Br J Exp Pathol* 5: 141-147.
- Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., and Marrie, T.J.** (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 41: 435-464.
- Cundell, D., Masure, H.R., and Tuomanen, E.I.** (1995) The molecular basis of pneumococcal infection: a hypothesis. *Clin Infect Dis* 21 Suppl 3: S204-211.
- Cundell, D.R., Gerard, N.P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I., and Tuomanen, E.I.** (1995) Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 377: 435-438.
- Dave, S., Brooks-Walter, A., Pangburn, M.K., and McDaniel, L.S.** (2001) PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. *Infect Immun* 69: 3435-3437.
- Davies, T., Goering, R.V., Lovgren, M., Talbot, J.A., Jacobs, M.R., and Appelbaum, P.C.** (1999) Molecular epidemiological survey of penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae from Asia, Europe, and North America. *Diagn Microbiol Infect Dis* 34: 7-12.
- Dhawan, V.K., Bayer, A.S., and Yeaman, M.R.** (1998) In vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein is associated with enhanced progression and hematogenous dissemination in experimental Staphylococcus aureus infective endocarditis. *Infect Immun* 66: 3476-3479.
- Dinkla, K., Rohde, M., Jansen, W.T., Carapetis, J.R., Chhatwal, G.S., and Talay, S.R.** (2003) Streptococcus pyogenes recruits collagen via surface-bound fibronectin: a novel colonization and immune evasion mechanism. *Mol Microbiol* 47: 861-869.
- Dommett, R.M., Klein, N., and Turner, M.W.** (2006) Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens* 68: 193-209.
- Draing, C., Pfitzenmaier, M., Zummo, S., Mancuso, G., Geyer, A., Hartung, T., and von Aulock, S.** (2006) Comparison of lipoteichoic acid from different serotypes of Streptococcus pneumoniae. *J Biol Chem* 281: 33849-33859.
- Dziarski, R., and Gupta, D.** (2005) Peptidoglycan recognition in innate immunity. *J Endotoxin Res* 11: 304-310.
- Ekdahl, K., Ahlinder, I., Hansson, H.B., Melander, E., Molstad, S., Soderstrom, M., and Persson, K.** (1997) Duration of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae: experiences from the South Swedish Pneumococcal Intervention Project. *Clin Infect Dis* 25: 1113-1117.

- Elm, C., Rohde, M., Vaerman, J.P., Chhatwal, G.S., and Hammerschmidt, S.** (2004) Characterization of the interaction of the pneumococcal surface protein SpsA with the human polymeric immunoglobulin receptor (hpIgR). *Indian J Med Res* 119 Suppl: 61-65.
- Elzie, C.A., and Murphy-Ullrich, J.E.** (2004) The N-terminus of thrombospondin: the domain stands apart. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1090-1101.
- Feitsma, K., Hausser, H., Robenek, H., Kresse, H., and Vischer, P.** (2000) Interaction of thrombospondin-1 and heparan sulfate from endothelial cells. Structural requirements of heparan sulfate. *J Biol Chem* 275: 9396-9402.
- Fiedler, F.** (1988) Biochemistry of the cell surface of *Listeria* strains: a locating general view. *Infection* 16 Suppl 2: S92-97.
- Fine, D.P.** (1975) Pneumococcal type-associated variability in alternate complement pathway activation. *Infect Immun* 12: 772-778.
- Fischer, H., and Tomasz, A.** (1985) Peptidoglycan cross-linking and teichoic acid attachment in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 163: 46-54.
- Fischer, W.** (2000) Phosphocholine of pneumococcal teichoic acids: role in bacterial physiology and pneumococcal infection. *Res Microbiol* 151: 421-427.
- Fischetti, V.A., Pancholi, V., and Schneewind, O.** (1990) Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci. *Mol Microbiol* 4: 1603-1605.
- Fitzgerald, J.R., Foster, T.J., and Cox, D.** (2006) The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol* 4: 445-457.
- Foster, T.J., and Hook, M.** (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 6: 484-488.
- Francois, P.P., Preissner, K.T., Herrmann, M., Haugland, R.P., Vaudaux, P., Lew, D.P., and Krause, K.H.** (1999) Vitronectin interaction with glycosaminoglycans. Kinetics, structural determinants, and role in binding to endothelial cells. *J Biol Chem* 274: 37611-37619.
- Gadjeva, M., Takahashi, K., and Thiel, S.** (2004) Mannan-binding lectin--a soluble pattern recognition molecule. *Mol Immunol* 41: 113-121.
- Garau, G., Lemaire, D., Vernet, T., Dideberg, O., and Di Guilmi, A.M.** (2005) Crystal structure of phosphorylcholine esterase domain of the virulence factor choline-binding protein e from *Streptococcus pneumoniae*: new structural features among the metallo-beta-lactamase superfamily. *J Biol Chem* 280: 28591-28600.

- Garcia-Bustos, J.F., Chait, B.T., and Tomasz, A.** (1987) Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan. *J Biol Chem* 262: 15400-15405.
- Garcia, E., Garcia, J.L., Garcia, P., Arraras, A., Sanchez-Puelles, J.M., and Lopez, R.** (1988) Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 914-918.
- Garcia, P., Gonzalez, M.P., Garcia, E., Lopez, R., and Garcia, J.L.** (1999) LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol Microbiol* 31: 1275-1281.
- Greene, C., McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P.E., Lew, D.P., and Foster, T.J.** (1995) Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. *Mol Microbiol* 17: 1143-1152.
- Griffith, F.** (1928) The significance of pneumococcal types. *J Hyg* 27: 113-159.
- Grimbert, P., Bouguermouh, S., Baba, N., Nakajima, T., Allakhverdi, Z., Braun, D., Saito, H., Rubio, M., Delespesse, G., and Sarfati, M.** (2006) Thrombospondin/CD47 interaction: a pathway to generate regulatory T cells from human CD4+ CD25- T cells in response to inflammation. *J. Immunol.* 177: 3534-3541.
- Guckian, J.C.** (1975) Effect of pneumococci on blood clotting, platelets, and polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 12: 910-918.
- Hacker, J., Heesemann, J.** (2000) *Molekulare Infektionsbiologie: Spektrum.*
- Hammerschmidt, S., Talay, S.R., Brandtzaeg, P., and Chhatwal, G.S.** (1997) SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol Microbiol* 25: 1113-1124.
- Hammerschmidt, S., Bethe, G., Remane, P.H., and Chhatwal, G.S.** (1999) Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 67: 1683-1687.
- Hammerschmidt, S., Wolff, S., Hocke, A., Rosseau, S., Muller, E., and Rohde, M.** (2005) Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 73: 4653-4667.
- Hammerschmidt, S.** (2007) *Pneumococcal Virulence Factors and Adhesion Proteins Targeting the Host.* Wymondham, Norfolk, U.K.: Horizon Scientific Press.
- Han, S.H., Kim, J.H., Martin, M., Michalek, S.M., and Nahm, M.H.** (2003) Pneumococcal lipoteichoic acid (LTA) is not as potent as staphylococcal LTA in stimulating Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 71: 5541-5548.

- Hartleib, J., Kohler, N., Dickinson, R.B., Chhatwal, G.S., Sixma, J.J., Hartford, O.M., Foster, T.J., Peters, G., Kehrel, B.E., and Herrmann, M.** (2000) Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood* 96: 2149-2156.
- Hauck, C.R., and Ohlsen, K.** (2006) Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol* 9: 5-11.
- Heilmann, C., Niemann, S., Sinha, B., Herrmann, M., Kehrel, B.E., and Peters, G.** (2004) *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein (FnBP)-mediated adherence to platelets, and aggregation of platelets induced by FnBPA but not by FnBPB. *J Infect Dis* 190: 321-329.
- Hermans, P.W., Adrian, P.V., Albert, C., Estevao, S., Hoogenboezem, T., Luijendijk, I.H., Kamphausen, T., and Hammerschmidt, S.** (2006) The streptococcal lipoprotein rotamase A (SlrA) is a functional peptidyl-prolyl isomerase involved in pneumococcal colonization. *J Biol Chem* 281: 968-976.
- Herrmann, M., Suchard, S.J., Boxer, L.A., Waldvogel, F.A., and Lew, P.D.** (1991) Thrombospondin binds to *Staphylococcus aureus* and promotes staphylococcal adherence to surfaces. *Infect Immun* 59: 279-288.
- Holmes, A.R., McNab, R., Millsap, K.W., Rohde, M., Hammerschmidt, S., Mawdsley, J.L., and Jenkinson, H.F.** (2001) The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol Microbiol* 41: 1395-1408.
- Holtje, J.V., and Tomasz, A.** (1974) Teichoic acid phosphorylcholine esterase. A novel enzyme activity in pneumococcus. *J Biol Chem* 249: 7032-7034.
- Hynes, R.O.** (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48: 549-554.
- Inamura, S., Fujimoto, Y., Kawasaki, A., Shiokawa, Z., Woelk, E., Heine, H., Lindner, B., Inohara, N., Kusumoto, S., and Fukase, K.** (2006) Synthesis of peptidoglycan fragments and evaluation of their biological activity. *Org Biomol Chem* 4: 232-242.
- Isenberg, J.S., Ridnour, L.A., Dimitry, J., Frazier, W.A., Wink, D.A., and Roberts, D.D.** (2006) CD47 is necessary for inhibition of nitric oxide-stimulated vascular cell responses by thrombospondin-1. *J. Biol. Chem.* 281: 26069-26080.
- Jaffe, E.A., Leung, L.L., Nachman, R.L., Levin, R.I., and Mosher, D.F.** (1982) Thrombospondin is the endogenous lectin of human platelets. *Nature* 295: 246-248.
- Janulczyk, R., Iannelli, F., Sjöholm, A.G., Pozzi, G., and Björck, L.** (2000) Hic, a novel surface protein of *Streptococcus pneumoniae* that interferes with complement function. *J Biol Chem* 275: 37257-37263.

- Jarva, H., Janulczyk, R., Hellwage, J., Zipfel, P.F., Bjorck, L., and Meri, S.** (2002) Streptococcus pneumoniae evades complement attack and opsonophagocytosis by expressing the pspC locus-encoded Hic protein that binds to short consensus repeats 8-11 of factor H. *J Immunol* 168: 1886-1894.
- Jedrzejak, M.J.** (2001) Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 187-207; first page, table of contents.
- Jepras, R.I., Fitzgeorge, R.B., and Baskerville, A.** (1985) A comparison of virulence of two strains of Legionella pneumophila based on experimental aerosol infection of guinea-pigs. *J Hyg (Lond)* 95: 29-38.
- Johnson, M.K., Geoffroy, C., and Alouf, J.E.** (1980) Binding of cholesterol by sulfhydryl-activated cytolysins. *Infect Immun* 27: 97-101.
- Johnson, M.K., Hamon, D., and Drew, G.K.** (1982) Isolation and characterization of pneumolysin-negative mutants of Streptococcus pneumoniae. *Infect Immun* 37: 837-839.
- Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J., Zinkernagel, R.M.** (1998) *Medizinische Mikrobiologie*.
- King, S.J., Hippe, K.R., Gould, J.M., Bae, D., Peterson, S., Cline, R.T., Fasching, C., Janoff, E.N., and Weiser, J.N.** (2004) Phase variable desialylation of host proteins that bind to Streptococcus pneumoniae in vivo and protect the airway. *Mol Microbiol* 54: 159-171.
- Kolberg, J., Hoiby, E.A., and Jantzen, E.** (1997) Detection of the phosphorylcholine epitope in streptococci, Haemophilus and pathogenic Neisseriae by immunoblotting. *Microb Pathog* 22: 321-329.
- Kovacs, M., Halfmann, A., Fedtke, I., Heintz, M., Peschel, A., Vollmer, W., Hakenbeck, R., and Bruckner, R.** (2006) A functional dlt operon, encoding proteins required for incorporation of d-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in Streptococcus pneumoniae. *J Bacteriol* 188: 5797-5805.
- Kreuger, J., Spillmann, D., Li, J.P., and Lindahl, U.** (2006) Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity. *J Cell Biol* 174: 323-327.
- Krispin, A., Bledi, Y., Atallah, M., Trahtenberg, U., Verbovetski, I., Nahari, E., Zelig, O., Linial, M., and Mevorach, D.** (2006) Apoptotic cell thrombospondin-1 and heparin-binding domain lead to dendritic-cell phagocytic and tolerizing states. *Blood* 108: 3580-3589.

- Kupferwasser, L.I., Yeaman, M.R., Shapiro, S.M., Nast, C.C., and Bayer, A.S.** (2002) In vitro susceptibility to thrombin-induced platelet microbicidal protein is associated with reduced disease progression and complication rates in experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis: microbiological, histopathologic, and echocardiographic analyses. *Circulation* 105: 746-752.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lancefield, R.C.** (1933) A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 57: 571-595.
- Lawler, J., and Hynes, R.O.** (1986) The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J Cell Biol* 103: 1635-1648.
- Lawler, J., and Hynes, R.O.** (1987) Structural organization of the thrombospondin molecule. *Semin Thromb Hemost* 13: 245-254.
- Lawler, J., Sunday, M., Thibert, V., Duquette, M., George, E.L., Rayburn, H., and Hynes, R.O.** (1998) Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *J Clin Invest* 101: 982-992.
- Loda, F.A., Collier, A.M., Glezen, W.P., Strangert, K., Clyde, W.A., Jr., and Denny, F.W.** (1975) Occurrence of *Diplococcus pneumoniae* in the upper respiratory tract of children. *J Pediatr* 87: 1087-1093.
- Lu, X., Wang, M., Qi, J., Wang, H., Li, X., Gupta, D., and Dziarski, R.** (2006) Peptidoglycan recognition proteins are a new class of human bactericidal proteins. *J Biol Chem* 281: 5895-5907.
- Marra, A., Lawson, S., Asundi, J.S., Brigham, D., and Hromockyj, A.E.** (2002) In vivo characterization of the *psa* genes from *Streptococcus pneumoniae* in multiple models of infection. *Microbiology* 148: 1483-1491.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr.** (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 4-9.
- Mold, C., Rodic-Polic, B., and Du Clos, T.W.** (2002) Protection from *Streptococcus pneumoniae* infection by C-reactive protein and natural antibody requires complement but not Fc gamma receptors. *J Immunol* 168: 6375-6381.
- Molinari, G., and Chhatwal, G.S.** (1998) Invasion and survival of *Streptococcus pyogenes* in eukaryotic cells correlates with the source of the clinical isolates. *J Infect Dis* 177: 1600-1607.

- Mosser, J.L., and Tomasz, A.** (1970) Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J Biol Chem* 245: 287-298.
- Musher, D.M.** (1992) Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin Infect Dis* 14: 801-807.
- Myhre, A.E., Aasen, A.O., Thiemermann, C., and Wang, J.E.** (2006) Peptidoglycan--an endotoxin in its own right? *Shock* 25: 227-235.
- Nadal, D.** (1999) [Progress in the understanding of the pathogenesis and prevention of bacterial otitis media and meningitis]. *Schweiz Med Wochenschr* 129: 2017-2020.
- Nadesalingam, J., Dodds, A.W., Reid, K.B., and Palaniyar, N.** (2005) Mannose-binding lectin recognizes peptidoglycan via the N-acetyl glucosamine moiety, and inhibits ligand-induced proinflammatory effect and promotes chemokine production by macrophages. *J Immunol* 175: 1785-1794.
- Navarre, W.W., and Schneewind, O.** (1999) Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 174-229.
- Neth, O., Jack, D.L., Dodds, A.W., Holzel, H., Klein, N.J., and Turner, M.W.** (2000) Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect Immun* 68: 688-693.
- Neth, O., Jack, D.L., Johnson, M., Klein, N.J., and Turner, M.W.** (2002) Enhancement of complement activation and opsonophagocytosis by complexes of mannose-binding lectin with mannose-binding lectin-associated serine protease after binding to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 169: 4430-4436.
- Niemann, S., Spehr, N., Van Aken, H., Morgenstern, E., Peters, G., Herrmann, M., and Kehrel, B.E.** (2004) Soluble fibrin is the main mediator of *Staphylococcus aureus* adhesion to platelets. *Circulation* 110: 193-200.
- Opitz, B., Puschel, A., Schmeck, B., Hocke, A.C., Rosseau, S., Hammerschmidt, S., Schumann, R.R., Suttorp, N., and Hippenstiel, S.** (2004) Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* 279: 36426-36432.
- Overweg, K., Pericone, C.D., Verhoef, G.G., Weiser, J.N., Meiring, H.D., De Jong, A.P., De Groot, R., and Hermans, P.W.** (2000) Differential protein expression in phenotypic variants of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 68: 4604-4610.
- Paterson, G.K., and Mitchell, T.J.** (2006) Innate immunity and the pneumococcus. *Microbiology* 152: 285-293.

- Paton, J.C., Andrew, P.W., Boulnois, G.J., and Mitchell, T.J.** (1993) Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annu Rev Microbiol* 47: 89-115.
- Pearce, B.J., Iannelli, F., and Pozzi, G.** (2002) Construction of new unencapsulated (rough) strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol* 153: 243-247.
- Peerschke, E.I., Bayer, A.S., Ghebrehiwet, B., and Xiong, Y.Q.** (2006) gC1qR/p33 blockade reduces *Staphylococcus aureus* colonization of target tissues in an animal model of infective endocarditis. *Infect Immun* 74: 4418-4423.
- 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.
- Raugi, G.J., Olerud, J.E., and Gown, A.M.** (1987) Thrombospondin in early human wound tissue. *J. Invest. Dermatol.* 89: 551-554.
- Rietschel, E.T., Schletter, J., Weidemann, B., El-Samalouti, V., Mattern, T., Zahringer, U., Seydel, U., Brade, H., Flad, H.D., Kusumoto, S., Gupta, D., Dziarski, R., and Ulmer, A.J.** (1998) Lipopolysaccharide and peptidoglycan: CD14-dependent bacterial inducers of inflammation. *Microb. Drug. Resist.* 4: 37-44.
- Roberts, I.S.** (1996) The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 50: 285-315.
- Rosenthal, R.S., and Dziarski, R.** (1994) Isolation of peptidoglycan and soluble peptidoglycan fragments. *Methods Enzymol* 235: 253-285.
- Royet, J., and Dziarski, R.** (2007) Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nat Rev Microbiol* 5: 264-277.
- Sanchez-Puelles, J.M., Sanz, J.M., Garcia, J.L., and Garcia, E.** (1990) Cloning and expression of gene fragments encoding the choline-binding domain of pneumococcal murein hydrolases. *Gene* 89: 69-75.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
- Scheld, W.M., Valone, J.A., and Sande, M.A.** (1978) Bacterial adherence in the pathogenesis of endocarditis. Interaction of bacterial dextran, platelets, and fibrin. *J Clin Invest* 61: 1394-1404.
- Sebert, M.E., Palmer, L.M., Rosenberg, M., and Weiser, J.N.** (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: 4059-4067.

- Shakhnovich, E.A., King, S.J., and Weiser, J.N.** (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: 7161-7164.
- Short, S.M., Derrien, A., Narsimhan, R.P., Lawler, J., Ingber, D.E., and Zetter, B.R.** (2005) Inhibition of endothelial cell migration by thrombospondin-1 type-1 repeats is mediated by beta1 integrins. *J Cell Biol* 168: 643-653.
- Sinha, B., Herrmann, M., and Krause, K.H.** (2000) Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? *Trends Microbiol* 8: 343-344.
- Steen, A., Buist, G., Horsburgh, G.J., Venema, G., Kuipers, O.P., Foster, S.J., and Kok, J.** (2005) AcmA of *Lactococcus lactis* is an N-acetylglucosaminidase with an optimal number of LysM domains for proper functioning. *Febs J* 272: 2854-2868.
- Talay, S.R.** (2005) Gram-positive adhesins. *Contrib Microbiol* 12: 90-113.
- Tan, K., Duquette, M., Liu, J.H., Zhang, R., Joachimiak, A., Wang, J.H., and Lawler, J.** (2006) The structures of the thrombospondin-1 N-terminal domain and its complex with a synthetic pentameric heparin. *Structure* 14: 33-42.
- Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R.T., Haft, D.H., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Gwinn, M., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Peterson, J.D., Umayam, L.A., White, O., Salzberg, S.L., Lewis, M.R., Radune, D., Holtzapple, E., Khouri, H., Wolf, A.M., Utterback, T.R., Hansen, C.L., McDonald, L.A., Feldblyum, T.V., Angiuoli, S., Dickinson, T., Hickey, E.K., Holt, I.E., Loftus, B.J., Yang, F., Smith, H.O., Venter, J.C., Dougherty, B.A., Morrison, D.A., Hollingshead, S.K., and Fraser, C.M.** (2001) Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 293: 498-506.
- Tomasz, A.** (1970) Cellular metabolism in genetic transformation of pneumococci: requirement for protein synthesis during induction of competence. *J Bacteriol* 101: 860-871.
- Tonnaer, E.L., Hafmans, T.G., Van Kuppevelt, T.H., Sanders, E.A., Verweij, P.E., and Curfs, J.H.** (2006) Involvement of glycosaminoglycans in the attachment of pneumococci to nasopharyngeal epithelial cells. *Microbes Infect* 8: 316-322.
- Tu, A.H., Fulgham, R.L., McCrory, M.A., Briles, D.E., and Szalai, A.J.** (1999) Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 67: 4720-4724.
- Tuomanen, E., Liu, H., Hengstler, B., Zak, O., and Tomasz, A.** (1985) The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J. Infect. Dis.* 151: 859-868.

- Tuomanen, E.M., T.; Morrison, D.; Spratt, B.** (2004) *The Pneumococcus*. Washington: ASM Press.
- Turner, M.S., Hafner, L.M., Walsh, T., and Giffard, P.M.** (2004) Identification and characterization of the novel LysM domain-containing surface protein Sep from *Lactobacillus fermentum* BR11 and its use as a peptide fusion partner in *Lactobacillus* and *Lactococcus*. *Appl Environ Microbiol* 70: 3673-3680.
- Unkmeir, A., Latsch, K., Dietrich, G., Wintermeyer, E., Schinke, B., Schwender, S., Kim, K.S., Eigenthaler, M., and Frosch, M.** (2002) Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *Mol. Microbiol.* 46: 933-946.
- van der Flier, M., Chhun, N., Wizemann, T.M., Min, J., McCarthy, J.B., and Tuomanen, E.I.** (1995) Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to immobilized fibronectin. *Infect Immun* 63: 4317-4322.
- Volanakis, J.E., and Kaplan, M.H.** (1971) Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. *Proc Soc Exp Biol Med* 136: 612-614.
- Vollmer, W., and Tomasz, A.** (2001) Identification of the teichoic acid phosphorylcholine esterase in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 39: 1610-1622.
- Vollmer, W., and Holtje, J.V.** (2004) The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer(s)? *J Bacteriol* 186: 5978-5987.
- Vollmer, W.** (2007) *Molecular Biology of Streptococci - Preparation and analysis of pneumococcal murein (peptidoglycan)*. Wymondham, Norfolk, U.K: Horizon Scientific Press.
- Watson, D.A., and Musher, D.M.** (1990) Interruption of capsule production in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 by insertion of transposon Tn916. *Infect Immun* 58: 3135-3138.
- Weber, J.R., Freyer, D., Alexander, C., Schroder, N.W., Reiss, A., Kuster, C., Pfeil, D., Tuomanen, E.I., and Schumann, R.R.** (2003) Recognition of pneumococcal peptidoglycan: an expanded, pivotal role for LPS binding protein. *Immunity* 19: 269-279.
- Weidemann, B., Schletter, J., Dziarski, R., Kusumoto, S., Stelter, F., Rietschel, E.T., Flad, H.D., and Ulmer, A.J.** (1997) Specific binding of soluble peptidoglycan and muramyl dipeptide to CD14 on human monocytes. *Infect Immun* 65: 858-864.
- Weiser, J.N., Austrian, R., Sreenivasan, P.K., and Masure, H.R.** (1994) Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* 62: 2582-2589.

- Weiser, J.N., Goldberg, J.B., Pan, N., Wilson, L., and Virji, M.** (1998) The phosphorylcholine epitope undergoes phase variation on a 43-kilodalton protein in *Pseudomonas aeruginosa* and on pili of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 66: 4263-4267.
- Weiser, J.N., Bae, D., Epino, H., Gordon, S.B., Kapoor, M., Zenewicz, L.A., and Shchepetov, M.** (2001) Changes in availability of oxygen accentuate differences in capsular polysaccharide expression by phenotypic variants and clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 69: 5430-5439.
- Weiser, J.N., Bae, D., Fasching, C., Scamurra, R.W., Ratner, A.J., and Janoff, E.N.** (2003) Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4215-4220.
- Wilcox, K.W., and Smith, H.O.** (1975) Isolation and characterization of mutants of *Haemophilus influenzae* deficient in an adenosine 5'-triphosphate-dependent deoxyribonuclease activity. *J Bacteriol* 122: 443-453.
- Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R.R., Tuomanen, E., Dziarski, R., and Golenbock, D.** (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: 1-5.
- Yoshimura, A., Takada, H., Kaneko, T., Kato, I., Golenbock, D., and Hara, Y.** (2000) Structural requirements of muramylpeptides for induction of Toll-like receptor 2-mediated NF-kappaB activation in CHO cells. *J Endotoxin Res* 6: 407-410.
- Yother, J., Leopold, K., White, J., and Fischer, W.** (1998) Generation and properties of a *Streptococcus pneumoniae* mutant which does not require choline or analogs for growth. *J Bacteriol* 180: 2093-2101.

7.2. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazolinesulfonic acid)
APS	Ammoniumperoxidisulfat
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CDM	chemisch definiertes Medium
CFU	colony-forming units
cps	capsular polysaccharide
CSP	Competence stimulating peptide
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspirol {1,2-dioxetan-3,2-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}] decan}-4yl) phenylphosphat
C	Cytosin
Da	Dalton
d.h.	das heißt
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP
ECM	extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
FBS	bovines Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiacyanate
g	Gramm
G	Guanin

Abkürzung	Beschreibung
GlcNac	<i>N</i> -Acetylglukosamin
Gly	Glycin
GMFI	geometric mean fluorescence intensity
h	Stunde
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropylthio- β -galactosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
LB	Luria Bertani
Lsg.	Lösung
LTA	lipoteichoicacid
M	molar(mol/l)
m	milli (10^{-3})
MDP	Muramyl-Dipeptid
MFI	mean fluorescence intensity
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOI	multiplicity of infection
MurNac	<i>N</i> -Acetylmuraminsäure
MW	Molekulargewicht
μ	mikro (10^{-6})
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
n	nano (10^{-9})
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
OD	Optische Dichte

Abkürzung	Beschreibung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PG	Peptidoglykan
PVDF	Polyvinylidinfluoride
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sPG	soluble Peptidoglykan
TSP1	Thrombospondin-1
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THY	Todd Hewitt Broth
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
TRIS-HCL	Tris- (hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
U	Unit (Enzymeinheit)
u.a.	unter anderem
V	Volt (Einheit der Spannung)
vgl.	Vergleiche
WTA	wallteichoicacid
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

7.3. Verbrauchsmaterial

Die Hersteller bzw. Vertreiber von benötigtem Verbrauchsmaterial sind in der folgenden Auflistung angegeben:

Verbrauchsmaterial	Hersteller bzw. Vertreiber
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner
Falcon-Röhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner
Handschuhe	AsidBonz
Injektionskanüle	Rose GmbH
Micro Spin TM S-400 HR Säule	Amersham
Mikrotiterplatten (Maxisorp F96)	Nunc
Mikrotiterröhrchen MC10	Hartenstein
Nitrocellulosemembran	Macherey-Nagel
Nylonmembran	Macherey-Nagel
Parafilm	ANC
Pasteur-Pipetten	Brand
PCR-Reaktionsgefäße (0,5 ml)	ABgene
Petrischalen	Greiner
PD 10-Säule	Pharmacia
Pipettenspitzen Easy Load (200 µl und 1000 µl)	Greiner
Pipettenspitzen 10 µl	Starlab
Plastikküvetten 1 ml	Brand
Polyethylenschlauch (0,28 x 0,61 mm)	Hartenstein
PVDF-Membran	Millipore
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarsted
Röntgenfilme	Amersham
Skalpellklingen	Braun
Steril-Filter (0,2 µm)	Schleicher und Schüll
Whatman-Filterpapier	Schleicher und Schüll
Zellkulturflaschen (25 cm ²)	Greiner
Zellkulturplatte (4-well, 24-well, 96-well)	Nunc, Greiner
Zentrifugenröhrchen (12 ml)	Greiner

Verbrauchsmaterial	Hersteller bzw. Vertreiber
Vinyl-Handschuhe	Ansell

7.4. Proteine und Chemikalien

Die Hersteller bzw. Vertreiber von benötigten Chemikalien sind in der folgenden Auflistung angegeben:

Proteine und Chemikalien	Hersteller bzw. Vertreiber
ABTS	Boehringer
Aceton	Roth
Acrylamid-N, N-Methylen-Bisacrylamid	Roth
Agar-Agar	Difco
Agarose	Peqlab, Seekem
Aktivkohle	Roth
Ampicillin	Sigma
Ammonium-Persulfat	BioRad
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Blockreagenz	Roche
Blutagarplatten	Oxoid
Bromphenolblau	Applichem
BSA	Biolabs
Chloramin T	Sigma
Chloronaphtol	Sigma
Kollagen IV	Sigma
Coomassie Brilliant Blue TM R250	BioRad
CSPD	Roche
Glukose	Applichem
DMEM	PAA
Dimethylsulfoxid	Sigma

Proteine und Chemikalien	Hersteller
ECL-Reagenz	Amersham
EDTA	Applichem
Erythromycin	Sigma
Eisessig	Baker
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Applichem
Ficoll	Sigma
Fibronektin	ICN
Fibrinogen	Sigma
Gelatine	Sigma
Glycerin	Merck
Glycin	Applichem
Harnstoff	Roth
Hefe-Extrakt	Roth
Heparansulfat	Sigma
Heparin	ICN
Heparitinase	Sigma
Hering Sperm DNA	Gibco
Hirudin	Sigma
Histopaque	Sigma
Immersionsöl	Zeiss
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid	Roth
Isopropano	Baker
KCL	Roth
KH ₂ PO ₄	Sigma
K ₂ HPO ₄	Sigma
Laktoferrin	Sigma
Laminin	Roche
Lysozym	Applichem
Magermilchpulver	Applichem
Maleinsäure	Applichem

Proteine und Chemikalien	Hersteller
Mannosidase	Sigma
Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Roth
Moviol	Aldrich
Mutanolysin	Sigma
Natriumacetat	Applichem
Natriumcitrat	Merck
NaCl	Roth
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaH ₂ PO ₄	Merck
NaOH	Roth
Natriumperiodat	Aldrich
<i>p</i> -Nitrophenyl-Phosphocholin	Sigma
Ammoniumacetat	Riedel de Haen
Paraformaldehyd	Fluka
Pepton	Roth
Penicillin/Streptomycin-Lösung	PAA
pH-Meter Kalibrierlösungen	Sigma
PMSF	Applichem
PNGase F	Sigma
Pronase E	Merck
Proteinase K	Sigma
RNAseA	Serva
Salzsäure	Roth
SDS	Roth
Spectinomycin	Sigma
Stickstoff	Linde
Syto 13	Molecular Probes
TEMED	Roth
Tetracyclin	Serva
Thrombin	Sigma

Proteine und Chemikalien	Hersteller
Thrombospondin-1	Calbiochem; HTI; S. Niemann, Münster
Todd Hewitt Broth	Roth
Tris	Applichem
Triton-X-100	Applichem
Trockenmilchpulver	Applichem
Trypton	Roth
Trypsin/EDTA	Gibco
Tween [®]	Sigma
Wasserstoffperoxid	Merck

7.5. Geräte

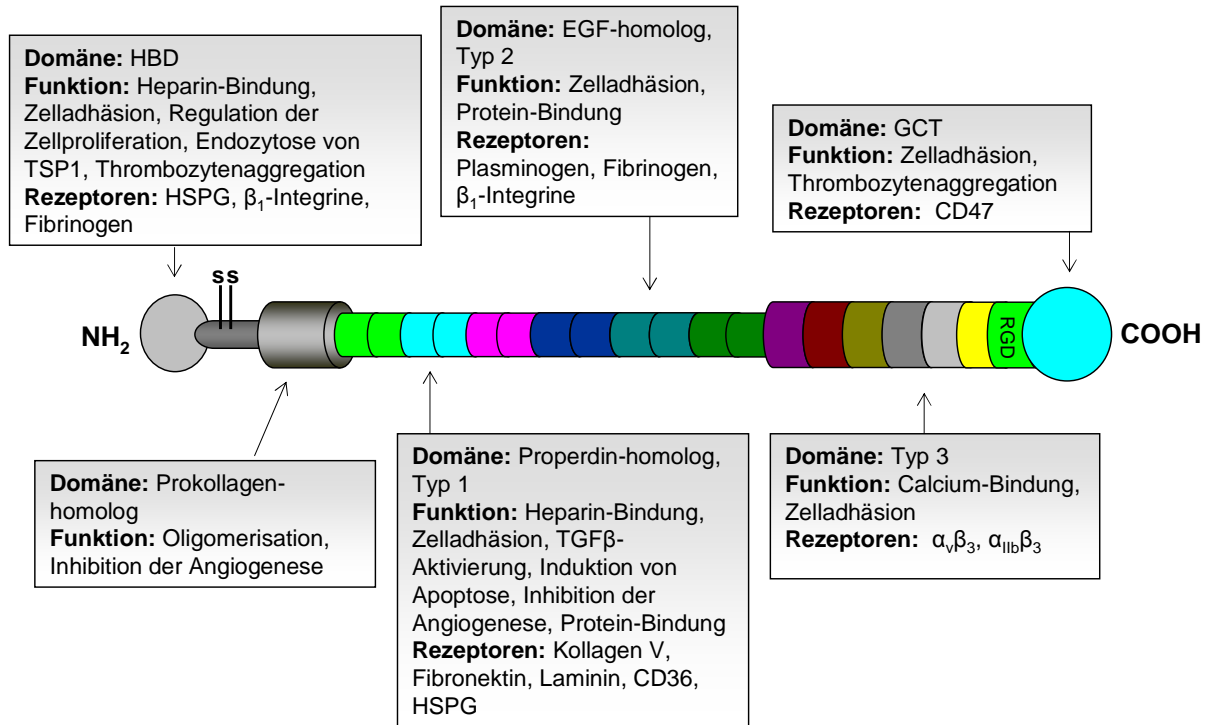
Die Hersteller bzw. Vertreiber von benötigten Geräten sind in der folgenden Auflistung angegeben:

Geräte	Hersteller
Agarosegel-Elektrophoresekammer	Gibco
Autoklav	Tecnomara
Brutschrank 37°C, 30°C	Heraeus
Eismaschine	Ziegra
Elektroporationsgerät	BioRad
Elektroporationsküvetten	Peqlab
ELISA-Reader	Thermo Labsystems
FACSCalibur [™]	Becton Dickinson
Feinwaage	Chyo
Fluoroscans Ascent Reader	Thermo Labsystems
French Pressure Cell Press	SLMAminco
Gefrierschränke	Privileg
Gel Air Drying System	BioRad
Heizblock	Eppendorf

Geräte	Hersteller
Hybridisierungsöfen	Hybaid
Inkubationsschüttler	HAT
Kühlschränke	Privileg
Magnetrührer	Ikamag
Mikrowelle	AEG
PCR-Thermocycler	Hybaid
pH-Meter CG 804	Schott
Quarzküvetten	Hellma
Schüttler	Marienfeld
SDS-Gelkammer	Peqlab
Semi-Dry-Trans-Blot SD	BioRad
Steril-Werkbank	Nunc
Thermomixer	Eppendorf
Tiefkühlschrank	Privileg
Ultraschallgerät	B. Brown
UV-Stratalinker	Stratagene
Vakuum-Dot-Spot	BioRad
Video-Dokumentation	Herolab
Vortex-Genie	Hobein AG
Waage	Navigator
Wasserheizbad	GFL
Wasserstrahlpumpe	Knf Laboport
Zählkammer	Neubauer, Thoma
Zentrifugen	Sorvall, Eppendorf, Heraeus

7.6. Thrombospondin-1-Modell

7.6.1. Strukturmodell des Thrombospondin-1



Signal Heparin-Bindungs Domäne Typ1 repeat 1. Typ1 repeat 2. Typ 1 repeat 3. EGF-like1. EGF-like 2. EGF-like 3. Typ 3 repeat 1. Typ 3 repeat 2. Typ 3 repeat 3. Typ 3 repeat 4. Typ 3 repeat 5. Typ 3 repeat 6. Typ 3 repeat 7. RGD-Sequenz: cell attachment site LysM-Motiv C-Terminus

Abb. 48: Struktur, Funktion und Rezeptoren der Domänen von Thrombospondin-1.

7.6.2. Nukleotid- und Aminosäuresequenz von Thrombospondin-1

Accession: NM_003246

```

      10      20      30      40      50      60
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
atggggctggcctggggactaggcgtcctgttcctgatgcatgtgtgtggcaccaaccgc
M G L A W G L G V L F L M H V C G T N R

      70      80      90     100     110     120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
attccagagtctggcggagacaacagcgtgtttgacatctttgaactcaccggggccgcc
I P E S G G D N S V F D I F E L T G A A

     130     140     150     160     170     180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cgcaaggggtctgggcgccgactgggtgaaggcccccagacccttcagcccagctttccgc
R K G S G R R L V K G P D P S S P A F R

     190     200     210     220     230     240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
atcaggatgccaacctgatccccctgtgcctgatgacaagttccaagacctggtgat
I E D A N L I P P V P D D K F Q D L V D

     250     260     270     280     290     300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gctgtgctggcagaaaagggtttcctccttctggcatcctgaggcagatgaagaagacc
A V R A E K G F L L L A S L R Q M K K T

     310     320     330     340     350     360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cggggcacgctgctggccctggagcggaaagaccactctggccaggtcttcagcgtggtg
R G T L L A L E R K D H S G Q V F S V V

     370     380     390     400     410     420
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
tccaatggcaaggcggccaccctggacctcagcctgaccgtccaaggaaagcagcacgtg
S N G K A G T L D L S L T V Q G K Q H V

     430     440     450     460     470     480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gtgtctgtggaagaagctctcctggcaaccggccagtggaagagcatcacctgtttgtg
V S V E E A L L A T G Q W K S I T L F V

     490     500     510     520     530     540
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
caggaagacagggcccagctgtacatcgactgtgaaaagatggagaatgctgagttggac
Q E D R A Q L Y I D C E K M E N A E L D

     550     560     570     580     590     600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gtccccatccaagcgtcttcaccagagacctggccagcatcgccagactccgcacgca
V P I Q S V F T R D L A S I A R L R I A

```


1270 1280 1290 1300 1310 1320
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 cggacctgccacattcaggagtgtgacaagagatttaaacaggatgggtggctggagccac
 R T C H I Q E C D K R F K Q D G G W S H

1330 1340 1350 1360 1370 1380
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 tggccccgtggatcatcttgttctgtgacatgtgggtgatgggtgatcacaaggatccgg
 W S P W S S C S V T C G D G V I T R I R

1390 1400 1410 1420 1430 1440
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 ctctgcaactctcccagccccagatgaacgggaaaccctgtgaaggcgaagcgcgggag
 L C N S P S P Q M N G K P C E G E A R E

1450 1460 1470 1480 1490 1500
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 accaaagcctgcaagaaagacgcctgccccatcaatggaggctggggctcttggtcacca
 T K A C K K D A C P I N G G W G P W S P

1510 1520 1530 1540 1550 1560
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 tgggacatctgttctgtcacctgtggaggaggggtacagaaacgtagtcgtctctgcaac
 W D I C S V T C G G G V Q K R S R L C N

1570 1580 1590 1600 1610 1620
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 aaccacacaccagtttggaggcaaggactgctgttgggtgatgtaacagaaaccagatc
 N P T P Q F G G K D C V G D V T E N Q I

1630 1640 1650 1660 1670 1680
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 tgcaacaagcaggactgtccaattgatggatgctgtccaatccctgctttgccggcgtg
 C N K Q D C P I D G C L S N P C F A G V

1690 1700 1710 1720 1730 1740
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 aagtgtactagctaccctgatggcagctggaatgtgggtgcttgtcccctgggttacagt
 K C T S Y P D G S W K C G A C P P G Y S

1750 1760 1770 1780 1790 1800
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 ggaaatggcatccagtgacagatggtgatgagtgcaaagaagtgcctgatgctgcttc
 G N G I Q C T D V D E C K E V P D A C F

1810 1820 1830 1840 1850 1860
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 aaccacaatggagagcaccgggtgtgagaacacggaccccggtacaactgctgcccctgc
 N H N G E H R C E N T D P G Y N C L P C

1870 1880 1890 1900 1910 1920
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 ccccacgcttcaccggctcacagcccttcggccagggtgtcgaacatgccacggccaac
 P P R F T G S Q P F G Q G V E H A T A N


```

          1930          1940          1950          1960          1970          1980
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
aaacaggtgtgcaagccccgtaaccctgcacggatgggacccacgactgcaacaagaac
K Q V C K P R N P C T D G T H D C N K N

          1990          2000          2010          2020          2030          2040
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gccaaagtgcaactacctgggccactatagcgaccccatgtaccgctgcgagtgcaagcct
A K C N Y L G H Y S D P M Y R C E C K P

          2050          2060          2070          2080          2090          2100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ggctacgctggcaatggcatcatctgcgggggaggacacagacctggatggctggccaat
G Y A G N G I I C G E D T D L D G W P N

          2110          2120          2130          2140          2150          2160
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gagaacctgggtgtgctggccaatgcgacttaccactgcaaaaaggataattgccccaac
E N L V C V A N A T Y H C K K D N C P N

          2170          2180          2190          2200          2210          2220
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cttcccaactcagggcaggaagactatgacaaggatggaattggtgatgacctgtgatgat
L P N S G Q E D Y D K D G I G D A C D D

          2230          2240          2250          2260          2270          2280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gacgatgacaatgataaaattccagatgacagggacaactgtccattccattacaacca
D D D N D K I P D D R D N C P F H Y N F

          2290          2300          2310          2320          2330          2340
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gctcagtatgactatgacagagatgatgtgggagaccgctgtgacaactgtccctacaac
A Q Y D Y D R D D V G D R C D N C P Y N

          2350          2360          2370          2380          2390          2400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cacaaccagatcaggcagacacagacaacaatggggaaggagacgcctgtgctgcagac
H N P D Q A D T D N N G E G D A C A A D

          2410          2420          2430          2440          2450          2460
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
attgatggagacggtatcctcaatgaacgggacaactgccagtacgtctacaatgtggac
I D G D G I L N E R D N C Q Y V Y N V D

          2470          2480          2490          2500          2510          2520
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cagagagacactgatatggatggggttgagatcagtggtgacaattgcccttggaacac
Q R D T D M D G V G D Q C D N C P L E H

          2530          2540          2550          2560          2570          2580
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
aatccgatcagctggactctgactcagaccgcatggagatacctgtgacaacaatcag
N P D Q L D S D S D R I G D T C D N N Q

```

2590 2600 2610 2620 2630 2640
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 gatattgatgaagatggccaccagaacaatctggacaactgtccctatgtgcccaatgcc
 D I D E D G H Q N N L D N C P Y V P N A

2650 2660 2670 2680 2690 2700
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 aaccaggctgaccatgacaaagatggcaaggagatgcctgtgaccacgatgatgacaac
 N Q A D H D K D G K G D A C D H D D D N

2710 2720 2730 2740 2750 2760
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 gatggcattcctgatgacaaggacaactgcagactcgtgcccaatcccgaccagaaggac
 D G I P D D K D N C R L V P N P D Q K D

2770 2780 2790 2800 2810 2820
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 tctgacggcgatggctcgaggtgatgcctgcaaagatgattttgaccatgacagtgtgcc
 S D G D G R G D A C K D D F D H D S V P

2830 2840 2850 2860 2870 2880
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 gacatcgatgacatctgtcctgagaatgttgacatcagtgagaccgatttccgccgattc
 D I D D I C P E N V D I S E T D F R R F

2890 2900 2910 2920 2930 2940
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 cagatgattcctctggaccccaaggacatcccaaatgaccctaactgggttgtagcc
 Q M I P L D P K G T S Q N D P N W V V R

2950 2960 2970 2980 2990 3000
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 catcagggtaaagaactcgtccagactgtcaactgtgatcctggactcgctgtaggttat
 H Q G K E L V Q T V N C D P G L A V G Y

3010 3020 3030 3040 3050 3060
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 gatgagtttaatgctgtggacttcagtgccaccttcttcatcaacaccgaaagggacgat
 D E F N A V D F S G T F F I N T E R D D

3070 3080 3090 3100 3110 3120
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 gactatgctggatttgtctttggctaccagtcagcagccgcttttatgttgtgatgtgg
 D Y A G F V F G Y Q S S S R F Y V V M W

3130 3140 3150 3160 3170 3180
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 aagcaagtcacccagtcctactgggacaccaaccccacgagggctcagggatactcgggc
 K Q V T Q S Y W D T N P T R A Q G Y S G

3190 3200 3210 3220 3230 3240
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 ctttctgtgaaagttgtaactccaccacagggcctggcgagcacctgcggaacgcctg
 L S V K V V N S T T G P G E H L R N A L

3250 3260 3270 3280 3290 3300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
tggcacacaggaaacacccctggccaggtgcgccaccctgtggcatgaccctcgtcacata
W H T G N T P G Q V R T L W H D P R H I

3310 3320 3330 3340 3350 3360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ggctggaaagatttcaccgcctacagatggcgtctcagccacaggccaaagacgggttc
G W K D F T A Y R W R L S H R P K T G F

3370 3380 3390 3400 3410 3420
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
attagagtggatgatgaaggaagaaaatcatggctgactcaggaccatctatgat
I R V V M Y E G K K I M A D S G P I Y D

3430 3440 3450 3460 3470 3480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
aaacctatgctggtagactaggggtgtttgtcttctctcaagaaatgggtgttcttc
K T Y A G G R L G L F V F S Q E M V F F

3490 3500 3510
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
tctgacctgaaatcgaatgtagagatccctaa
S D L K Y E C R D P *

7.7. Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen bereits vorab veröffentlicht:

Publikation:

Claudia Rennemeier, Sven Hammerschmidt, Silke Niemann, Seiichi Inamura, Ulrich Zähringer, Beate E. Kehrel. Thrombospondin-1 mediates adherence of Gram-positive bacteria to host cells via recognition of the peptidoglycan backbone, FASEB Journal, in Revision

Tagungsbeiträge:

Claudia Rennemeier, Silke Niemann, Beate E. Kehrel und Sven Hammerschmidt (2004). Thrombospondin-1 mediates adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to eukaryotic cells. Jahrestagung DGHM, Münster (Poster)

Claudia Rennemeier, Silke Niemann, Beate E. Kehrel und Sven Hammerschmidt (2004). Thrombospondin-1 mediates adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to eukaryotic cells. Jahrestagung VAAM, Braunschweig (Poster)

Claudia Rennemeier, Silke Niemann, Beate E. Kehrel und Sven Hammerschmidt (2005). Thrombospondin-1 mediates adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to human eukaryotic cells. EuroPneumo, Braunschweig (Poster)

Claudia Rennemeier, Silke Niemann, Ulrich Zähringer, Beate E. Kehrel und Sven Hammerschmidt (2006). Thrombospondin-1 mediates adherence of *Streptococcus pneumoniae* to host cells via recognition of the peptidoglycan backbone. ASM conference on streptococcal genetics, St. Malo, Frankreich (Poster)

Simone Bergmann, Anke Lang, **Claudia Rennemeier**, Klaus T. Preissner und Sven Hammerschmidt (2006). Adherence of *Streptococcus pneumoniae* is promoted by host cell-bound Vitronectin. Jahrestagung VAAM, Jena (Poster)

Claudia Rennemeier, Silke Niemann, Ulrich Zähringer, Beate E. Kehrel und Sven Hammerschmidt (2006). Thrombospondin-1 mediates adherence of Gram-positive bacteria to host cells via recognition of the peptidoglycan backbone. Jahrestagung DGHM Würzburg (Vortrag)

Claudia Rennemeier. Thrombospondin-1 mediates adherence of Gram-positive bacteria to host cells via recognition of peptidoglycan (2006). 2nd international symposium on biomedical research, Würzburg (Vortrag)

7.8. Lebenslauf

Claudia Rennemeier

geb. am 14.04.1978 in Haltern am See

Schulbildung

1984 – 1988 Grundschule, Haltern

1988 – 1997 Städtisches Gymnasium Haltern; Abschluss Abitur

Hochschulausbildung

1997 – 2003 Studium der Biologie an der Universität Würzburg, Schwerpunkte:
Mikrobiologie (Hauptfach), Biochemie, Tierphysiologie, Sportbiologie
(Zusatzfach)

April 2003: Diplom, Gesamtnote: sehr gut

Thema der Diplomarbeit: "Etablierung eines Cokultivierungsassays von
marinen Bakterien mit Schwammeinzelzellen“, Institut für molekulare
Infektionsbiologie

05/2003 – 03/2007 Promotionsstudium am Zentrum für Infektionsforschung der Universität
Würzburg, unter Betreuung von Prof. Dr. Sven Hammerschmidt,
Thema der Doktorarbeit: "Charakterisierung der Thrombospondin-1
vermittelten Anheftung von *Streptococcus pneumoniae* an humane
Wirtszellen“.

Mitglied der „International Graduate School University of Wuerzburg,
"Class of Biomedicine“

Würzburg, März 2007