

Aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene,
Zentrum für Infektionskrankheiten der medizinischen Fakultät der
Universität des Saarlandes, Homburg (Saar)

**Nutztier-assoziiertes Methicillin resistenter *Staphylococcus aureus* des Klonalen Komplexes 398:
Faktoren der Wirtsadhäsion und Immunevasion bei
Menschen und Nutztieren**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes**

vorgelegt von
Jan Philipp Jung
geb. am 16.09.1981

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2011 bis Mai 2016 am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität des Saarlandes angefertigt.

Abbildungen und Text dieser Dissertation sind in Teilen eine Reproduktion von Materialien bzw. Untersuchungen der unten aufgeführten Publikationen. Eine vollständige Publikationsübersicht des Autors wird im Abschnitt Publikationen und Kongressbeiträge gegeben.

- **Jung, P.**, Abdelbary, M.M., Kraushaar, B., Fetsch, A., Geisel, J., Herrmann, M., Witte, W., Cuny, C., Bischoff, M., 2016. Impact of bacteriophage *Saint3* carriage on the immune evasion capacity and hemolytic potential of *Staphylococcus aureus* CC398. **Vet Microbiol.**
- Ballhausen, B*, **Jung, P***, Kriegeskorte, A., Makgotlho, P.E., Ruffing, U., von Muller, L., Kock, R., Peters, G., Herrmann, M., Ziebuhr, W., Becker, K*, Bischoff, M*, 2014. LA-MRSA CC398 differ from classical community acquired-MRSA and hospital acquired-MRSA lineages: functional analysis of infection and colonization processes. **Int J Med Microbiol** 304, 777-786.
**contributed equally*

Der Autor dieser Dissertation ist Erstautor bzw. geteilter Erstautor beider Publikationen und hat, in experimenteller Hinsicht, durch die Untersuchung des Einflusses der Insertion von Bakteriophage *Saint3* auf die Phagozytose von *S. aureus* CC398 Isolaten und isogenen CC398 Isolatpaaren durch PMN sowie der hämolytischen Aktivität von isogenen CC398 Isolatpaaren beigetragen (Fig.1, Fig. 2, Fig. 3 aus Jung *et al.*, 2016). Außerdem hat der Autor mit der Untersuchung der Adhäsionskapazität von MRSA Isolaten an humane Epithelzellen, an humanes und bovines Plasma Fibronectin, der Adhäsionskraft-Spektroskopie zwischen LA-MRSA CC398 Isolaten und humanem Plasma-Fibronectin sowie der Phagozytoserate von MRSA Isolaten durch humane PMN in Vollblut zur Publikation Ballhausen *et al.*, 2014 beigetragen (Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4, Fig. 6). Im Folgenden wird eine Übersicht der Abbildungen dieser Dissertation gegeben, die auf der Grundlage der Materialien bzw. Untersuchungen der beiden Publikationen reproduziert und adaptiert wurden.

Abbildung in der Dissertation:

Publikation:

- Abb. 6:** Adhäsionskapazität von 44 MRSA Isolaten an humanes/bovines Plasma-Fibronektin. Ballhausen *et al.*, 2014
- Abb. 7:** Adhäsionskraft-Spektroskopie zwischen LA-MRSA CC398 Isolaten und humanem Plasma-Fibronektin. Ballhausen *et al.*, 2014
- Abb. 16:** Phagozytoserate von 44 MRSA Isolaten durch humane PMN in Vollblut. Ballhausen *et al.*, 2014
- Abb. 19:** Einfluss von ϕ Saint3 auf die Phagozytose von *S. aureus* CC398 durch PMN. Jung *et al.*, 2016
- Abb. 20:** Phagozytose von isogenen *S. aureus* CC398 Isolatpaaren mit bzw. ohne ϕ Saint3 Integration durch PMN. Jung *et al.*, 2016
- Abb. 21:** Einfluss von ϕ Saint3 auf die Hämolyseaktivität von *S. aureus* CC398 Isolatpaaren. Jung *et al.*, 2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
Zusammenfassung	XII
Summary	XIV
1 Einleitung	1
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1.1 <i>S. aureus</i> Infektionen und Antibiotikaresistenz.....	1
1.1.2 Horizontaler Gentransfer in <i>S. aureus</i>	2
1.1.3 Typisierung und Epidemiologie von <i>S. aureus</i> Isolaten.....	4
1.2 Nutztier assoziierter MRSA des Klonalen Komplexes 398.....	6
1.2.1 Ursprung und Verbreitung von LA-MRSA CC398 beim Menschen.....	6
1.2.2 Verbreitung von LA-MRSA CC398 bei Tieren.....	7
1.2.3 Übertragungswege von LA-MRSA CC398.....	9
1.2.4 Der genetische Hintergrund von LA-MRSA CC398.....	10
1.3 <i>S. aureus</i> Adhäsion, Zell- und Zellwandmechanik.....	11
1.3.1 Die Zellwand Gram-positiver Bakterien.....	11
1.3.2 Einfluss von Zell- und Zellwandelastizität auf die bakterielle Adhäsion ..	13
1.3.3 Unspezifische Adhäsion von <i>S. aureus</i>	14
1.3.4 Spezifische Adhäsion von <i>S. aureus</i>	15
1.3.5 Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie.....	18
1.3.6 Möglichkeiten der Rasterkraftmikroskopie in der Mikrobiologie.....	21
1.4 Strategien der Immunevasion von <i>S. aureus</i>	23
1.4.1 Grundlagen der zellulären Immunreaktion auf bakterielle Pathogene	23
1.4.2 Inhibierung des Komplementsystems.....	24
1.4.3 <i>S. aureus</i> Phagozytoseschutz.....	27
1.4.4 Intrazelluläres Überleben.....	29
1.4.5 Immunevasions-relevante Toxine.....	30
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit.....	33
2 Material	35

2.1	Bakterienisolate und eukaryotische Zellen	35
2.1.1	Bakterienisolate.....	35
2.1.2	Eukaryotische Zelllinien	38
2.2	Medien und Medienzusätze.....	39
2.2.1	Medien zur Anzucht von Bakterien	39
2.2.2	Medien zur Anzucht eukaryotischer Zellen	39
2.2.3	Medienzusätze	39
2.3	Puffer und Lösungen	40
2.4	Antibiotika	41
2.5	Oligonukleotide und Nukleinsäuren	41
2.6	Verwendete Proteine und Enzyme	43
2.7	Farbstoffe.....	43
2.8	Reagenzsysteme (Kits).....	44
2.9	Laborgeräte und Systeme	44
2.10	Messsonden für die Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie	45
2.11	Software.....	46
2.12	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	47
3	Methoden	48
3.1	Kultivierung und Kryokonservierung von Bakterien	48
3.2	Kultivierung und Kryokonservierung eukaryotischer Zellen.....	48
3.3	Zellkultur Adhäsionsassay	50
3.4	Protein-Wirtsfaktor Adhäsionsassay.....	52
3.5	Vollblut Phagozytose Assay	53
3.6	Assay zur Bestimmung des intrazellulären Überlebens in Makrophagen.....	55
3.7	Bestimmung der Hämolyseaktivität von <i>S.aureus</i> Kulturüberständen.....	57
3.8	Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie	58
3.8.1	Adhäsionskraft-Spektroskopie mit humanem Fibronectin.....	58
3.8.2	Elastizitäts-Mapping von <i>S. aureus</i> Isolaten	59
3.9	Molekularbiologische Methoden	60
3.9.1	Isolierung genomischer DNA aus <i>S. aureus</i>	60
3.9.2	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	60
3.9.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	61
3.9.4	Agarosegel Elektrophorese.....	62

3.9.5	DNA-Sequenzierung	62
3.9.6	Isolierung der Gesamt-RNA aus <i>S. aureus</i> Isolaten	62
3.9.7	Reverse Transkription von RNA.....	63
3.9.8	Quantitative Real Time PCR (qPCR).....	64
3.10	Statistische Analysen und graphische Darstellung	66
4	Ergebnisse	67
4.1	Untersuchung der <i>S. aureus</i> Wirtsadhäsion	67
4.1.1	Adhäsionskapazität an humane Keratinozyten	67
4.1.2	Adhäsionskapazität an humanes/bovines Plasma-Fibronektin.....	69
4.1.3	Adhäsionskraft-Spektroskopie mit humanem Plasma-Fibronektin.....	71
4.1.4	Adhäsionskapazität an humanes Fibrinogen	73
4.1.5	Transkriptionsanalyse von <i>fnbA/B</i> , <i>clfA/B</i> , <i>asp23</i> und <i>RNAIII</i>	75
4.1.6	Einfluss der Zell und Zellwandelastizität auf die Adhäsion	78
4.2	Untersuchung von <i>S. aureus</i> Immunevasions-Eigenschaften	83
4.2.1	Schutz vor der Phagozytose durch humane, polymorphkernige Neutrophile (PMN) in Vollblut	83
4.2.2	Intrazelluläres Überleben in THP-1 Makrophagen	86
4.3	Einfluss einer ϕ <i>Saint3</i> Integration auf die Wirtsspezifität von <i>S. aureus</i> CC398	89
4.3.1	Phagozytoseschutz von <i>S. aureus</i> CC398 Isolaten mit bzw. ohne ϕ <i>Saint3</i> Integration durch PMN.....	89
4.3.2	Phagozytoseschutz von isogenen <i>S. aureus</i> CC398 Isolatpaaren mit bzw. ohne ϕ <i>Saint3</i> Integration, durch PMN.....	91
4.3.3	Hämolyseaktivität isogener <i>S. aureus</i> CC398 Isolatpaare mit bzw. ohne Integration von ϕ <i>Saint3</i>	93
4.4	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	95
5	Diskussion	97
5.1	Untersuchung der LA-MRSA CC398 Wirtsadhäsion	97
5.2	Untersuchung der LA-MRSA CC398 Immunevasions-Eigenschaften.....	107
5.3	Einfluss einer ϕ <i>Saint3</i> Integration auf die Wirtsspezifität von <i>S. aureus</i> CC398	113
5.4	Beantwortung der Fragestellungen.....	118
5.5	Ausblick	120

6 Literaturverzeichnis	121
Publikationen und Kongressbeiträge	143
Danksagung	147
Lebenslauf	148
Anhang.....	149

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung:	Volltext:
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ad	adde (auffüllen bis)
agr	engl. accessory gene regulator
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CA-MRSA	engl. Community acquired MRSA
ca.	circa
CAMP	Christie, Atkins, Munch-Petersen
CC	engl. Clonal Complex
cDNA	engl. complementary DNA
CFDA-SE	Carboxyfluorescein diacetate succinimid ester
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CHIP	Chemotaxis inhibierendes Protein
CifA/B	Clumpingfaktor A/B
Coa	engl. coagulase
CT	engl. cycle threshold
d.h.	das heißt
DAPI	4`6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Eap	Extrazelluläres Adhärenzprotein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Emp	Extrazelluläres Matrixprotein
et al.	et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
FACS	engl. fluorescence activated cell sorting
FCS	engl. fetal calf serum
Fn	Fibronectin
FnbA/B	engl. fibronectin-binding protein A/B
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
h	Stunde

H₂O	im Rahmen dieser Arbeit: deionisiertes Wasser (<18 MΩ.cm, bei 25°C)
HA-MRSA	engl. Hospital acquired MRSA
HGT	Horizontaler Gentransfer
Hla	Hämolysin α
Hlb	Hämolysin β
IEC	Immunevasions Cluster
IgG	Immunglobulin G
IL2	Interleukin 2
IFN- γ	Interferon γ
KbE	Kolonien bildende Einheiten
kbp	Kilo Basenpaar
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LA-MRSA	engl. Livestock associated MRSA
LB	Luria Bertani
M	Mol
Mbp	Mega Basenpaar
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MGE	Mobiles Genetisches Element
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
MLST	engl. Multi Locus Sequence Typing
mM	Millimol
Mol	engl. Multiplicity of Infection
MRSA	Methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	engl. microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
NEAA	engl. non-essential amino acid
nm	Nanometer
OD₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PBP2A	Penicillin-bindendes Protein 2A
PBP4	Penicillin-bindendes Protein 4
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pM	Pikomol
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
PVL	Panton-Valentine Leukocidin

qPCR	quantitative Real-Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Saint3	<i>Staphylococcus aureus</i> Integrase Typ 3 Bakteriophage
SAK	Staphylokinase
SaPI	<i>Staphylococcus aureus</i> Pathogenitätsinsel
Sbi	engl. Staphylococcal binder of immunoglobulin
SCC	engl. Staphylococcal cassette chromosome
SCIN	Staphylokokken Komplement Inhibitor
SEA	engl. staphylococcal enterotoxin A
SERAM	engl. secretable expanded repertoire adhesive molecules
SLST	engl. Single Locus Sequence Typing
<i>spa</i>	engl. staphylococcal protein A
TE	Tris-EDTA
Tris	Trisaminomethan
TSA	engl. Trypticase Soy Agar
TSB	engl. Trypticase Soy Broth
TNF-α	engl. Tumor Necrosis factor α
TSST-1	engl. Toxic shock-syndrom toxin 1
UpM	Umdrehungen pro Minute
vWF	Von-Willebrand-Faktor
WTA	Wandteichonsäuren
z.B.	zum Beispiel
Δ	Delta
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
σB, SigB	Alternativer Sigmafaktor B

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau der Gram-positiven Zellwand.	12
Abb. 2: Die Prinzipien der Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie.	20
Abb. 3: Die Aktivierung des Komplementsystems.	26
Abb. 4: Maximum Parsimony Baum von 44 MRSA Isolaten.	37
Abb. 5: Adhäsionskapazität von 44 MRSA Isolaten an humane Keratinozyten.	68
Abb. 6: Adhäsionskapazität von 44 MRSA Isolaten an humanes/bovines Plasma-Fibronectin.	70
Abb. 7: Adhäsionskraft-Spektroskopie zwischen LA-MRSA CC398 Isolaten und humanem Plasma-Fibronectin.	72
Abb. 8: Adhäsionskapazität von LA-MRSA CC398 an humanes Fibrinogen.	74
Abb. 9: Transkriptionsanalyse der Gene <i>fnbA</i> und <i>fnpB</i>	75
Abb. 10: Transkriptionsanalyse der Gene <i>clfA</i> und <i>clfB</i>	76
Abb. 11: Transkriptionsanalyse der Markergene <i>asp23</i> und <i>RNAIII</i>	77
Abb. 12: Bestimmung der Zellwandelastizität von <i>S. aureus</i> Isolaten.	79
Abb. 13: Zur Zellwandelastizität korrespondierende Adhäsionskapazität von <i>S. aureus</i> Isolaten.	80
Abb. 14: Turgordruck-abhängige Zellelastizität von <i>S. aureus</i> 8325-4.	81
Abb. 15: Die Adhäsionskapazität von <i>S. aureus</i> 8325-4, in Abhängigkeit von Zellelastizität und Turgordruck.	82
Abb. 16: Phagozytoserate von 44 MRSA Isolaten durch humane PMN in Vollblut. ..	84
Abb. 17: CFDA-SE-Fluoreszenz gefärbte LA-MRSA CC398 nach der Phagozytose durch humane Neutrophile und Makrophagen.	85
Abb. 18: Intrazelluläres Überleben von LA-MRSA CC398 in THP-1 Makrophagen. .	87
Abb. 19: Einfluss von ϕ <i>Saint3</i> auf die Phagozytose von <i>S. aureus</i> CC398 durch PMN.	90
Abb. 20: Phagozytose von isogenen <i>S. aureus</i> CC398 Isolatpaaren mit bzw. ohne ϕ <i>Saint3</i> Integration, durch PMN.	92
Abb. 21: Einfluss von ϕ <i>Saint3</i> auf die Hämolyseaktivität von <i>S. aureus</i> CC398 Isolatpaaren.	94
Abb. 22: Anhang zu Versuchsteil 4.1.3, Kraft-Distanz-Kurven (vergl. Abb. 7)	149
Abb. 23: Anhang zu Versuchsteil 4.1.5, Elastizitätskarten (vergl. Abb. 12).	150

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: LA-MRSA CC398, CA-MRSA und HA-MRSA Isolate mit Typisierungsinformationen, verwendet in den Versuchsteilen 4.1 und 4.2.....	35
Tab. 2: ϕ Saint3 positive/negative <i>S. aureus</i> CC398 Isolate mit Typierungs- informationen, verwendet in Versuchsteil 4.3.	37
Tab. 3: Etablierte <i>S. aureus</i> Laborisolate und Mutanten.....	38
Tab. 4: Verwendete humane, eukaryotische Zelllinien	38
Tab. 5: Medien zur Anzucht von Bakterien	39
Tab. 6: Medien zur Anzucht eukaryotischer Zellen.....	39
Tab. 7: Medienzusätze für die Anzucht von Bakterien und eukaryotischer Zellen	39
Tab. 8: Puffer und Lösungen	40
Tab. 9: Verwendete Antibiotika	41
Tab. 10: PCR Primer bzw. Primer für die Sequenzierung	42
Tab. 11: Quantitative Real-Time PCR Primer.....	42
Tab. 12: Proteine	43
Tab. 13: Enzyme.....	43
Tab. 14: Farbstoffe.....	43
Tab. 15: Reagenzsysteme	44
Tab. 16: Laborgeräte und Systeme	44
Tab. 17: Messsonden	46
Tab. 18: Software.....	46
Tab. 19: Thermocycler-Programm PCR	61
Tab. 20: PCR-Ansatz, exemplarisch für 1 Probe	61
Tab. 21: RT Ansatz zur Umschreibung in cDNA, exemplarisch für 1 Probe.....	64
Tab. 22: Thermocycler-Programm Reverse Transkription von RNA	64
Tab. 23: qPCR Ansatz, exemplarisch für eine Probe	65
Tab. 24: Thermocycler-Programm qPCR	65
Tab. 25: Konzentration der Immunzellen im Blut verschiedener Wirte	90
Tab. 26: Statistische Signifikanzverhältnisse der Transkriptomanalyse von <i>fnbA</i> (vergl. Abb. 9 A).....	151
Tab. 27: Statistische Signifikanzverhältnisse der Transkriptomanalyse von <i>fnbB</i> (vergl. Abb. 9 B).....	152

Tab. 28: Statistische Signifikanzverhältnisse der Transkriptomanalyse von <i>clfA</i> (vergl. Abb. 10 A).....	153
Tab. 29: Statistische Signifikanzverhältnisse der Transkriptomanalyse von <i>clfB</i> (vergl. Abb. 10 B).....	154
Tab. 30: Statistische Signifikanzverhältnisse der Transkriptomanalyse von <i>asp23</i> (vergl. Abb. 11 A).....	155
Tab. 31: Statistische Signifikanzverhältnisse der Transkriptomanalyse von <i>RNAIII</i> (vergl. Abb. 11 B).....	156
Tab. 32: Statistische Signifikanzverhältnisse der Phagozytoserate zu Beginn des Assays zur Bestimmung des intrazellulären Überlebens (vergl. Abb. 18 B).....	157
Tab. 33: Statistische Signifikanzverhältnisse des intrazellulären Überlebens nach 23 h (vergl. Abb. 18 C).....	158
Tab. 34: IEC assoziierte Gene des <i>S. aureus</i> CC398 Isolats aus Versuchsteil 4.3 (vergl. Tab. 2).	159

Zusammenfassung

Methicillin resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) ist einer der bedeutendsten Erreger nosokomialer Infektionen. Während des letzten Jahrzehnts tritt Nutztier assoziierter MRSA des Klonalen Komplexes 398 (engl. Livestock associated MRSA Clonal Complex 398, LA-MRSA CC398) in Europa verstärkt auf. Besonders in Regionen mit einer hohen Dichte an Schweine-haltenden Betrieben wird zunehmend von Kolonisierung und Infektionen auch beim Menschen berichtet.

In einem ersten Teil dieser Arbeit wurden die Eigenschaften der bakteriellen Adhäsion von LA-MRSA CC398 Isolaten untersucht und mit humanadaptierten *S. aureus* Isolaten verglichen. Es wurde erstmals festgestellt, dass LA-MRSA CC398 Isolate über eine deutlich geringere Adhäsionskapazität an humane Epithelzellen verfügen als humanadaptierte CA-MRSA (engl. Community acquired MRSA) und HA-MRSA (engl. Hospital acquired MRSA) Linien. Allerdings stellt eine epidemiologische CC398 Subgruppe (*spa* Typ t108) eine Ausnahme dar und zeigte Adhäsionskapazitäten, welche die von anderen CC398 Subgruppen, wie *spa* Typ t011 und t034, deutlich überstiegen und in einer ähnlichen Größenordnung lagen, wie die getesteten humanadaptierten Linien. Die abweichenden Adhäsionskapazitäten könnten durch ein verändertes Adhäsionspotential an das Wirtsprotein Fibronectin, auf Grund massiver Transkriptionsunterschiede der Gene der zellwandgebundenen Fibronectin binden Proteine A und B (*fnbA/B*) sowie durch die Häufigkeit von Mutationen im Gen *fnbB* zu erklären sein.

Mehrere Studien beschreiben außerdem den Einfluss der Zellwandelastizität auf die bakterielle Adhäsion. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zellwandelastizität einer Auswahl an LA-MRSA CC398 Isolaten mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht und mit human-adaptierten *S. aureus* Isolaten verglichen. Der Theorie einer Zellwandelastizität-abhängigen Adhäsion folgend, ist ebenso ein Einfluss der Elastizität der gesamten Zelle auf die Adhäsion denkbar. Deshalb wurde in dieser Arbeit eine Methode entwickelt, um die Turgordruck-abhängige Elastizität einzelner *S. aureus* Zellen zu messen. Ein Einfluss der Zell- und Zellwandelastizität auf die Adhäsion konnte, für die untersuchten *S. aureus* Isolate, ausgeschlossen werden.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurden die Immunevasionseigenschaften von Nutztier assoziierten und humanadaptierten MRSA Linien charakterisiert. Isolate des *spa* typs t108 wurden weniger effektiv durch humane, polymorphkernige Neutrophile

(PMN) phagozytiert, als andere Isolate der CC398 Linie, wie *spa* Typ t011, t034 und CA-MRSA. Die Phagozytoserate von HA-MRSA war mit jener der *spa* Typ t108 Isolate vergleichbar. Allerdings konnte beobachtet werden, dass Isolate des *spa* Typs t108, sollten sie dennoch phagozytiert werden, nach der Phagozytose weniger effektiv intrazellulär überleben können, als andere LA-MRSA CC398 Isolate.

Der Fokus eines dritten Teils dieser Arbeit lag auf der Rolle des Immunevasions Cluster (IEC), eines Bakteriophagen „*S. aureus* Integrase Typ 3“ (*Saint3*) codierten Mobilgenetischen Elements (MGE), auf die Wirtsspezifität von *S. aureus* CC398 Isolaten. In der Literatur wird ein Einfluss des IEC auf die Phagozytose durch PMN angenommen, indem es das Komplementsystem des Wirtes hemmt. Dieser Einfluss konnte, im Rahmen dieser Arbeit, erstmals in Vollblut und somit in Anwesenheit aller Komplementfaktoren bestätigt werden. Ferner gilt das IEC als exklusiv humanspezifisches MGE, kommt in humanadaptierten *S. aureus* Linien mit hoher Prävalenz vor, ist aber in CC398 Isolaten vom Schwein praktisch nicht vertreten. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Inaktivität der IEC Faktoren im Schwein als Wirt, zeigen allerdings auch, dass dieses MGE *S. aureus* effektiv vor der Phagozytose durch PMN in Pferdeblut schützt. Dies wird bestätigt, durch die Ergebnisse einer kürzlich veröffentlichten Prävalenzstudie, die IEC-positive CC398 Isolate als Erreger von Infektionen im Pferd beschreibt. Demnach ist das wirtsspezifische Wirkungsspektrum des IEC breiter als bislang in der Literatur angenommen. Des Weiteren stützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Hypothese der Aufnahme bzw. des Verlustes der Bakteriophage *Saint3*, als Wirtsadaptationsmechanismus der CC398 Linie.

Insgesamt deuten die Funde dieser Arbeit eine hohe Heterogenität an, mit der Virulenzeigenschaften innerhalb der CC398 Linie ausgeprägt sind. Zum Teil entsprechen diese den Virulenzeigenschaften etablierter, human-adaptierter MRSA Linien. In Verbindung mit den effektiven Verbreitungswegen über Tierkontakte und Kot-Aerosole sowie der hohen Anpassungsfähigkeit, stellt die LA-MRSA CC398 Linie eine potenziell große Herausforderung für die europäischen Gesundheitssysteme dar, mit der Gefahr ernster Infektionen in der breiten Masse der Bevölkerung.

Summary

Livestock associated Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* of Clonal Complex 398: Factors promoting adhesion and immune evasion in humans and livestock

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is the most prominent cause of nosocomial infections. Since the last decade, Livestock associated MRSA of the Clonal Complex 398 (LA-MRSA CC398) are increasingly found in Europe. Especially in regions with a high density of pig farming, colonization and infections with LA-MRSA CC398 in humans are described in increasing numbers.

In a first part of this thesis the bacterial adhesion properties of *S. aureus* CC398 isolates were investigated. Like described for the first time, LA-MRSA CC398 possesses a decreased adhesion capacity to human epithelial cells, when compared to widespread, human-adapted CA-MRSA (Community acquired MRSA) and HA-MRSA (Hospital acquired MRSA) lineages. However, an epidemiological CC398 sublineage (*spa* type t108) exhibited an adhesion capacity, which was on the same level than CA-MRSA and HA-MRSA, and exceeded the adhesion of other CC398 sublineages, such as *spa* type t011 and t034. These variations in the adhesion capacities might be due to an altered adhesive potential to the host protein fibronectin, attributed to massive transcriptional changes of the genes of both cell-wall anchored fibronectin binding proteins A and B (*fnbA/B*) and to the frequency of mutations in the gene *fnbB*.

Several studies described an impact of the cell wall elasticity on bacterial adhesion. In the scope of this thesis the cell wall elasticity of a selection of LA-MRSA CC398 isolates was investigated by Atomic Force Microscopy and compared to human-adapted *S. aureus* isolates. Following the theory of a cell wall elasticity-dependent adhesion, an influence of the elasticity of the whole bacterial cell on adhesion can be implied, as well. Therefore, a method to measure the turgor pressure-dependent cell elasticity of single *S. aureus* cells was developed in this work. However, an influence of the cell- and cell wall elasticity on adhesion was excluded for the isolates tested.

In a second part of this thesis the immune evasion properties of Livestock associated and human adapted MRSA isolates were characterized. Isolates of the *spa* type t108 isolates were less effectively phagocytosed by human polymorphonuclear neutrophils (PMN) than isolates of other *spa* types of the CC398 lineage, such as *spa* type t011

and t034 and CA-MRSA, but on the same level than HA-MRSA. However, it was shown that *spa* type t108 isolates, if still phagocytosed, demonstrated a decreased potential to survive intracellularly.

A third part of this thesis was focused on the role of the Immune evasion cluster (IEC), a bacteriophage „*S. aureus* Integrase Typ 3“ (*Saint3*) coded mobile genetic element (MGE), on the host specificity of *S. aureus* CC398. Several studies predict an impact of the IEC on phagocytosis, by inhibiting the hosts complement system. In this thesis, that impact on Polymorphonuclear Neutrophils (PMN) was experimentally confirmed in whole blood and thus, in presence of all host complement factors, for the first time. Moreover, the IEC is believed to be strictly human specific, is highly prevalent in human-adapted *S. aureus* lineages and is almost completely absent in CC398 isolates derived from pigs. The results of this thesis confirms the inactivity of the IEC in porcine blood, but revealed that this MGE mediates a protective effect against phagocytosis by PMN not only in human blood, but in equine blood, as well. A recently published prevalence study about the distribution of that MGE among CC398 isolates described IEC-positive isolates as a cause of *S. aureus* associated infections in horses, underlining the IEC impact in this host. Accordingly, the host specificity of the IEC factors might be broader than currently assumed. Moreover, the results support the idea of an uptake/loss of bacteriophage *Saint3* as a mechanism of host adaptation.

Altogether, the findings of this thesis imply a high grade of heterogeneity within the CC398 lineage, regarding virulence properties. These virulence properties partially match those of widespread, human-adapted MRSA lineages. With various distribution ways, like livestock contact or feces aerosols, combined with the ability to adapt to various host, the CC398 lineage represents a potential challenge for the European healthcare systems, with the danger of an intake of LA-MRSA CC398 and serious infections in the general community.

1 Einleitung

1.1 *Staphylococcus aureus*

1.1.1 *S. aureus* Infektionen und Antibiotikaresistenz

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ist einer der bedeutendsten nosokomialer Erreger (Voss *et al.*, 1994; Lowy, 1998). Auch wenn das Bakterium bereits seit den 1880er Jahren bekannt ist (Ogston, 1882), hat es bis heute nichts von seiner medizinischen und gesundheitsökonomischen Relevanz verloren. Als Teil einer normalen Hautflora des Menschen kolonisiert *S. aureus* bis zu 30 % der Bevölkerung dauerhaft, ohne dabei Infektionen oder Symptome auszulösen (Gordon und Lowy, 2008). Allerdings ist die Kolonisierung mit *S. aureus* ein entscheidender Risikofaktor für die Entstehung invasiver Haut und Weichteilinfektionen, die gegebenenfalls das weitere Vordringen des Pathogens ins Innere des Körpers ermöglichen (Wenzel und Perl, 1995). In Krankenhäusern und Pflegeeinrichtungen wird *S. aureus* häufig übertragen. Patienten mit Immunsuppression, postoperativen Wunden oder Kathetern haben ein erhöhtes Risiko an *S. aureus* Infektionen zu erkranken (Weinstein, 1959; Steinberg *et al.*, 1996).

Ist *S. aureus* ins Körperinnere vorgedrungen, besteht die Gefahr, dass das Pathogen in den Blutstrom gelangt und sich so im Organismus des Wirt ausbreitet. In Folge dessen können eine Reihe von potentiell tödlichen Erkrankungen, wie Endokarditis, Sepsis, Lungenentzündung oder das Toxischen Schock Syndrom (TSS) verursacht werden (Archer, 1998; Lowy, 1998). Diese breite Palette möglicher Infektionen und Krankheitsbilder wird durch ein großes Repertoire an Virulenzfaktoren, wie Toxine, lytische Enzyme, Immunevasions-Faktoren und Adhäsine ermöglicht. Da der Focus dieser Arbeit auf der *S. aureus* Adhäsion und Immunevasion liegt, werden Faktoren, die für diese Virulenzmechanismen von Bedeutung sind in den Abschnitten 1.3 und 1.4 dieser Einleitung näher vorgestellt. Entscheidend für die nosokomiale Verbreitung von *S. aureus* ist das Auftreten Methicillin resistenter *S. aureus* (MRSA). Die Methicillin-Resistenz wird durch ein alternatives Penicillin bindendes Protein 2a (PBP2a) vermittelt und wird durch das Gen *mecA* codiert. Dadurch wird ebenso eine Resistenz gegen andere Antibiotika der β -Lactam-Klasse bedingt (Chambers, 1997). Die Funktionen der Penicillin-bindenden Proteine in der Zellwandsynthese werden im

Detail im Abschnitt 1.3.1 besprochen. Darüber hinaus weisen MRSA häufig Mechanismen auf, die Resistenzen gegenüber auch anderen Antibiotikaklassen vermitteln (Berger-Bachi und Rohrer, 2002). Dieses breite Spektrum an Resistenzen, in Zusammenspiel mit dem großen Repertoire an Virulenzfaktoren, machen MRSA zu bedeutenden und schwierig zu behandelnden Krankheitserregern und einer Herausforderung für unsere Gesundheitssysteme (Archer, 1998; Lowy, 1998). Die folgenden Abschnitte beschäftigen sich mit der Bedeutung und den Mechanismen des Horizontalen Gentransfers für die Requirierung von Virulenzfaktoren und Resistenzen sowie moderner Typisierungsmethoden zur Erkennung epidemiologischer Verbreitungsmuster bestimmter *S. aureus* Isolate.

1.1.2 Horizontaler Gentransfer in *S. aureus*

Das Genom von *S. aureus* besteht aus einem zirkulären Chromosom mit einer Größe von ca. 2,8 Mbp. Davon sind bis zu 20 % auf mobilen genetischen Elementen (MGE) codiert, die entweder chromosomal integriert sind, oder extrachromosomal, etwa als Plasmide, vorliegen (Lindsay, 2010). Die große Variation mit der MGE zwischen, aber auch innerhalb, klonaler *S. aureus* Linien vorkommen, belegt die Häufigkeit der Aufnahme, des Verlust und der Übertragung von MGE innerhalb dieser Art. Neuere Studien sehen in den Mechanismen der Übertragung von MGE, dem sogenannten Horizontalen Gentransfer (HGT), Schlüsselmechanismen für die Adaptation von *S. aureus* an neue Nischen und die Anpassung an verschiedene Wirte und Habitate (Lindsay, 2010; McCarthy *et al.*, 2011).

Grundsätzlich sind drei Mechanismen des HGT in *S. aureus* bekannt. Der wichtigste Mechanismus ist die Übertragung bakterieller DNA per Transduktion durch Bakteriophagen (Lindsay, 2014).

Dabei sind die Prophagen häufig stabil chromosomal integriert und werden bei der Teilung an Tochterzellen weitergegeben. Stressbedingungen induzieren allerdings die Expression der Phagenproteine, in deren Folge es zur Bildung infektiöser Phagen, der Lyse der Bakterienzelle, Freisetzung der Phagen, Anbindung der Phagen an glykosylierte Wandteichonsäuren anderer *S. aureus* Zellen und deren Transfektion kommt (Xia *et al.*, 2011; Winstel *et al.*, 2013). Hierbei wird bei der Bildung neuer Phagen nicht immer die Phagen-DNA, sondern gegebenenfalls auch

ein Fragment der bakteriellen Wirts-DNA eingehüllt, die dann anstelle der Phagen-DNA an andere *S. aureus* Zellen übertragen wird. Ob dieses „fehlerhafte“ Einhüllen zufällig oder zielgerichtet verläuft ist nicht bekannt. Allerdings werden einige *S. aureus* DNA Fragmente mit einer hohen Transfektionseffizienz übertragen, was einen zielgerichteten Prozess vermuten lässt (Lindsay, 2014). Die Übertragung von *S. aureus* Pathogenitätsinseln (SaPI) stellt eine abgewandelte Form der DNA Übertragung durch Bakteriophagen dar. Diese SaPI sind ca. 15 kbp große, mit Prophagen verwandte, DNA Fragmente, die nicht über die notwendigen Gene für die Expression von Phagenpartikeln verfügen, sondern auf die Nutzung fremder Phagenpartikel zur Übertragung angewiesen sind (Ruzin *et al.*, 2001). Der Name SaPI legt bereits nahe, dass sie häufig für Gene codieren, die relevant für die Pathogenese von *S. aureus* sind. Zum Beispiel werden das Toxic Shock Syndrom Toxin (TSST) sowie mehrere Enterotoxine durch SaPI codiert (Lindsay, 2014).

Ein weiterer Mechanismus des HGT in *S. aureus* stellt die Konjugation dar. Dazu bedarf es dem direkten Kontakt zwischen *S. aureus* Zellen, die durch einen verbindenden Pilus bzw. Pore eine Plasmabrücke bilden, durch die Plasmide übertragen werden können (Grohmann *et al.*, 2003). Dabei ist auch die Übertragung relativ großer DNA Fragmente (> 45 kbp) möglich, welche für die Übertragung durch Bakteriophagen zu groß sind. Dennoch scheint die Transduktion durch Bakteriophagen der wichtigere und häufiger vorkommende Mechanismus des HGT in *S. aureus* zu sein (Lindsay, 2014).

Ein weiterer Mechanismus des HGT von, bislang ungeklärter Relevanz in *S. aureus*, ist die Aufnahme fremder DNA aus der Umgebung, vermittelt durch Kompetenzproteine. Dieser Mechanismus geschieht in vielen Bakterienspezies, wie *Streptococcus pneumoniae*, mit einer hohen Häufigkeit und Effizienz. Für *S. aureus* ist diese, natürliche Art der Transformation allerdings einzig in Anwesenheit von Phagenproteinen beschrieben (Thompson und Pattee, 1981; Jackson *et al.*, 1983; Lorenz und Wackernagel, 1994; Morikawa *et al.*, 2012).

Eine der am häufigsten beschriebenen MGE Familie in *S. aureus*, stellt das SCCmec (engl. Staphylococcal cassette chromosome *mec*) Element dar, welches das, bereits im letzten Abschnitt beschriebene, *mecA* beinhaltet (Archer und Niemeyer, 1994; Berger-Bachi und Rohrer, 2002; Hanssen und Ericson Sollid, 2006; Hanssen und Sollid, 2007). SCCmec tritt mit einer hohen strukturellen Diversität auf, sodass dem Komplex verschiedene SCCmec Typen zugeordnet werden, die zur Typisierung von

MRSA Isolaten verwendet werden können (Becker, Köck 2014). Trotz der großen Bedeutung der SCCmec ist der Transfermechanismus des, zwischen 21 kbp und 67 kbp großen, MGE noch ungeklärt.

Im Gegensatz dazu ist bei einem anderen weit verbreiteten MGE, dem Immunevasion Cluster (IEC), der Transfermechanismus bekannt. Es wird durch den Bakteriophagen *Saint3* übertragen. Das IEC ist von hoher Relevanz für die Virulenz von *S. aureus* und inseriert in das Gen des β -Hämolysin (*hlyB*). Es beinhaltet unter anderem die Gene, die für das Chemotaxis inhibierende Protein (CHIP), die Staphylokinase (SAK), den Staphylococcus Komplement Inhibitor (SCIN) und gegebenenfalls ein Enterotoxin (z.B. SEA) codieren (van Wamel *et al.*, 2006). Diese sekretierten Proteine dienen der Immunevasion von *S. aureus* und interagieren mit dem Komplementsystem des Wirtes. Die Wirkung und Interaktionspartner der IEC Faktoren werden im Abschnitt 1.4.2 im Detail vorgestellt. Interessanterweise wird dieses IEC in Mensch assoziierten *S. aureus* Isolaten sehr häufig gefunden, während es in Tier assoziierten *S. aureus* Isolaten seltener auftritt (Cuny *et al.*, 2015). Dies legt eine Humanspezifität dieser MGE-codierten Komponenten nahe, die für einzelne IEC Faktoren experimentell demonstriert wurde (Dohlsten *et al.*, 1993; Gladysheva *et al.*, 2003; de Haas *et al.*, 2004; Rooijackers *et al.*, 2005; van Wamel *et al.*, 2006).

1.1.3 Typisierung und Epidemiologie von *S. aureus* Isolaten

MRSA sind der weltweit häufigste Grund für nosokomiale Infektionen (Voss *et al.*, 1994; Chambers, 2001). Weiterhin wird weltweit ein deutlicher Zuwachs der MRSA kolonisierten Patienten in Krankenhäusern innerhalb des letzten Jahrzehnts beschrieben (Tiemersma *et al.*, 2004; Boucher und Corey, 2008). Aus diesem Grund sind verlässliche Typisierungsmethoden, um Verwandtschaft und Abstammung von MRSA Isolaten, und somit die Möglichkeit deren epidemiologische Verbreitungsmuster aufzudecken, umso wichtiger geworden. Grundsätzlich wird zwischen phänotypischen und genotypischen Typisierungsmethoden unterschieden. Phänotypische Typisierungsmethoden, wie Antibiogramm-Typisierung, Sero-Typisierung, Protein-Gelelektrophorese-Typisierung und Immunoblotting, sind sehr zeitaufwendig, häufig schlecht reproduzierbar und werden deshalb selten zur Typisierung von MRSA Isolaten angewendet (Mehndiratta und Bhalla, 2012).

Genotypischen Typisierungsmethoden sind hingegen von großer Bedeutung. Beispiele sind Methoden wie das Ribotyping bzw. die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), bei denen die, nach einem Restriktionsenzym-Verdau, entstehenden Fragmentierungsmuster der DNA, ribosomaler RNA oder der chromosomalen DNA mittels Southern Blot Analyse bzw. Gelelektrophorese analysiert werden (Tenover *et al.*, 1997). Unter den genotypischen Typisierungsmethoden von zentraler Bedeutung, sind Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) basierte Methoden, wie die Multi Locus Sequenz Typisierung (MLST) und die Single Locus Sequenz Typisierung (SLST) (Mehndiratta und Bhalla, 2012). Bei der MLST werden 400-450 bp große Sequenzen von sieben Haushaltsgenen untersucht und verglichen. Identische Isolate werden in Sequenztypen (ST), bzw. übergeordnet in klonale Komplexe (engl. clonal complex, CC), gegliedert (Enright *et al.*, 2000). Bei der SLST werden hingegen die Variationen der Sequenz eines einzelnen Gens zur Typisierung herangezogen. Bei *S. aureus* Isolaten ist die Typisierung einer Region des Protein A codierenden Gens *spa*, die aus einer variablen Abfolge 24 bp großer Tandem Abschnitte aufgebaut ist, weit verbreitet. Die Abfolge dieser Tandem Abschnitte ist innerhalb eng verwandter Gruppen von Isolaten relativ stabil und lässt somit die Gruppierung von Isolaten in sogenannte *spa* Typen zu (Frenay *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2000). Durch die technischen Entwicklungen der letzten Jahre ist die Ganzgenom Sequenzierung (engl. whole genome sequencing, WGS) von Bakteriengenomen immer schneller und kostengünstiger geworden. Es ist zu erwarten, dass zukünftig das WGS etablierte Typisierungsmethoden in der Forschung sowie der mikrobiologischen Diagnostik ablösen wird (Price *et al.*, 2013).

Grundsätzlich unterscheidet man MRSA Isolate gemäß ihrer Herkunft in klassische nosokomial erworbene MRSA Isolate (engl. hospital aquired MRSA, HA-MRSA), MRSA Isolate, die ohne Verbindung zu Krankenhäusern oder Pflegeeinrichtungen in der Gesellschaft übertragen werden (engl. community aquired MRSA, CA-MRSA) und MRSA Isolate, die häufig Nutztiere kolonisieren und gegebenenfalls zwischen Nutztieren und Menschen übertragen werden (engl. Livestock associated MRSA, LA-MRSA) (Stefani *et al.*, 2012). In der Gruppe der HA-MRSA sind die CC 5, 8 und 22 weltweit sehr häufig vertreten. Innerhalb der CA-MRSA Gruppe sind CC 8, 30 und 80 häufig zu finden. Besonders die zum CC8 gehörende USA300 Linie ist in den USA weit verbreitet (Carpaij *et al.*, 2011). Innerhalb der Gruppe der LA-MRSA ist CC398 von prominenter Bedeutung. Der Kern des CC398 Verbreitungsgebietes liegt in

Europa, auch wenn LA-MRSA CC398 bereits ebenso in Asien, Afrika und Nordamerika gefunden wurde (Ruffing *et al.*, 2012; Stefani *et al.*, 2012). LA-MRSA CC398 stellen den Focus dieser Arbeit dar und werden in den folgenden Abschnitten im Detail besprochen.

1.2 Nutztier assoziierter MRSA des Klonalen Komplexes 398

1.2.1 Ursprung und Verbreitung von LA-MRSA CC398 beim Menschen

Erste Funde von Kolonisierungen von Menschen mit Nutztier assoziiertem LA-MRSA CC398 gehen auf das Jahr 2003 zurück und wurden auf kolonisierte Schweine und Rinder in Mastbetrieben zurückgeführt (Lee, 2003; van Cleef *et al.*, 2011). Seither hat die Verbreitung von LA-MRSA CC398 in Europa insgesamt stark zugenommen, auch wenn regional sehr große Unterschiede bezüglich der Kolonisierung beim Menschen, mit Schwankungen von 0 % bis 25 % zu beobachten sind (Stefani *et al.*, 2012). Spitzenreiter unter den europäischen Ländern sind die Niederlande (11,9 - 25 %), Belgien (4,7 %) und Dänemark (1,6 – 2,1 %). Der in den Niederlanden besonders hohe Anteil an LA-MRSA CC398 ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Last an humanadaptierten MRSA, ähnlich wie in den Ländern Skandinaviens, in der Bevölkerung, Krankenhäusern und Pflegeeinrichtungen im Vergleich zu anderen Ländern des europäischen Kontinents besonders niedrig ist. Alle übrigen Länder zeigen üblicherweise landesweite LA-MRSA CC398 Kolonisierungsraten beim Menschen, die unter 1 % liegen (van Cleef *et al.*, 2011). Die Häufigkeit der Besiedlung mit LA-MRSA CC398 beim Menschen scheint dabei mit der Dichte von Schweinemastbetrieben bzw. Schweinefleisch-verarbeitender-Betriebe in Verbindung zu stehen. Beispielsweise liegen die Besiedlungsraten in Deutschland in der Gegend des nordwestlichen Nordrhein-Westfalen (eine Gegend mit großer geographischer Nähe zu den Niederlanden), insbesondere auf Grund der weitverbreiteten Schweinehaltung bei 11-20 % (Köck *et al.*, 2009a; Köck *et al.*, 2009b). Demgegenüber steht eine deutschlandweite Besiedlungsrate von weniger als 1 %. Dies unterstreicht die Bedeutung des Schweines als Wirt bei der Verbreitung von LA-MRSA CC398. Kürzlich veröffentlichte Studien gehen von einem Ursprung von LA-MRSA CC398 im Menschen aus und beschreiben einen humanen, Methicillin

sensitiven CC398 Stamm des *spa* Typs t571, der auf das Schwein übertragen wurde. Dieser Stamm hat sich vermutlich innerhalb von Schweinemastbetrieben von Schwein zu Schwein bzw. Betrieb zu Betrieb verbreitet und dessen Abkömmlinge stellen nun ein Reservoir für konstante Rückübertragung auf den Menschen dar (Uhlemann *et al.*, 2013; Cuny *et al.*, 2015). LA-MRSA CC398 Isolate sind in der Lage Infektionen im Menschen hervorzurufen (Lewis *et al.*, 2008). In Regionen mit hoher CC398 Prävalenz, sind bis zu 15 % der durch *S. aureus* verursachten Haut und Weichgewebe Infektionen in der Bevölkerung mit dieser Linie assoziiert. Bei *S. aureus* Infektionen in Kliniken und Pflegeeinrichtungen liegt der deutschlandweite CC398 Anteil bei 0,8 % bis 2 % (Cuny *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2009; Aspiroz *et al.*, 2010; Cuny *et al.*, 2013). Auch das Auftreten schwerer CC398 assoziierter Erkrankungen, wie postoperative Infektionen, Lungenentzündung, Sepsis und Endokarditis wurden beschrieben (Witte *et al.*, 2007; Mammina *et al.*, 2010; Schijffelen *et al.*, 2010). Das Potential von LA-MRSA CC398 Infektionen im Menschen hervorzurufen, scheint somit vergleichbar mit dem Potential der typischen HA-MRSA Linien zu sein (Cuny *et al.*, 2013).

1.2.2 Verbreitung von LA-MRSA CC398 bei Tieren

LA-MRSA CC398 ist als die vorherrschende *S. aureus* Linie bei der Kolonisierung von Schweinen anzusehen (Vanderhaeghen *et al.*, 2010). Jedoch variieren die, in der Literatur beschriebenen, Kolonisierungsraten für Europa von Studie zu Studie deutlich, was stark mit den untersuchten Ländern, häufig allerdings auch mit der Anzahl und der regionalen Verteilung der beprobten Mastbetriebe zusammenhängt (Vanderhaeghen *et al.*, 2010). So wurden für Dänemark in Schweinemastbetrieben Kolonisierungsraten von 1 % publiziert (Guardabassi *et al.*, 2007), während in Belgien und den Niederlanden in den Mastbetrieben Kolonisierungsraten um die 40% beobachtet wurden (de Neeling *et al.*, 2007). Eine in Deutschland durchgeführte Studie identifizierte LA-MRSA CC398 sogar in 47 % der untersuchten Mastbetriebe (Cuny *et al.*, 2012). Die Heterogenität der Kolonisierungsraten wird anhand zweier, in den Niederlanden durchgeführten Studien deutlich, in denen ein Anteil an LA-MRSA CC398 positiver Mastbetriebe von 81 % (44 von 54 beprobte Betriebe) (Huijsdens *et al.*, 2006) bzw. 23 % (7 von 31 beprobte Betriebe) (van Duijkeren *et al.*, 2008)

dokumentiert wurde. Nichts desto trotz ist von einer insgesamt hohen, wen auch regional stark schwankenden, Prävalenz von LA-MRSA CC398 kolonisierten Schweinen in Mitteleuropa auszugehen. Laut einer belgischen Studie sind Ferkel dabei deutlich häufiger kolonisiert als Muttersauen und Mastschweine (Crombe *et al.*, 2012). Eine kanadische Studie, die ebenfalls die Dynamik der LA-MRSA CC398 Kolonisierung in Ferkeln beschreibt, gibt eine vergleichsweise niedrige Kolonisierungsrate neugeborener Ferkel (10 %), eine ansteigende Kolonisierungsrate mit einem Höhepunkt im Ferkelalter von 42 Tagen (64 %) und eine zurückgehende Kolonisierungsrate der Ferkel im Alter von 70 Tagen bei Studienende (41 %) an (Hanssen und Sollid, 2007). Interessanterweise werden typische *S. aureus* assoziierte Infektionen in Nutztieren, wie die exsudative Epidermitis oder Infektionen des Urogenitaltraktes im Schwein nur selten durch LA-MRSA CC398 Isolate hervorgerufen, was in deutlichem Gegensatz zu den hohen Besiedlungsraten mit Isolaten dieser Linie steht (Sergio *et al.*, 2007; Schwarz *et al.*, 2008; van Duijkeren *et al.*, 2008).

In Rindern ist *S. aureus* bereits seit Jahrzehnten als ein Erreger der Euterentzündung (Bovine Mastitis) bekannt (Devriese *et al.*, 1972). Eine 2009 durchgeführte Studie wies LA-MRSA CC398 in 3,9 % bis 7,4 % der beprobten belgischen Milchbetriebe mit Fällen boviner Mastitis nach (Vanderhaeghen *et al.*, 2010). Auch in Deutschland wurden vereinzelt Fälle boviner Mastitis beschrieben, die mit LA-MRSA CC398 assoziiert waren (Monecke *et al.*, 2007; Fessler *et al.*, 2010). Die LA-MRSA CC398 Kolonisierungsraten bei Rindern sind bislang nur wenig untersucht. Allerdings wurden nasale Kolonisierungsraten von ca. 50 % bei Kälbern, in einem niederländischen Milchbetrieb beschrieben (Mooij, 2007; Vanderhaeghen *et al.*, 2010), sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch in anderen Milch- bzw. Rinderzuchtbetrieben hohe LA-MRSA CC398 Kolonisierungsraten vorherrschen.

Neben Funden in Schweinen und Rindern wurden LA-MRSA CC398 Isolate auch auf Geflügel bzw. Geflügelfleisch nachgewiesen (Nemati *et al.*, 2008). Dabei scheint in erster Linie Schlachtgeflügel betroffen zu sein (Persoons *et al.*, 2009). Von LA-MRSA CC398 Funden in Schafen wurde zwar berichtet (Fessler *et al.*, 2012), die MRSA Besiedlung scheint im Allgemeinen in Schafen allerdings von untergeordneter Bedeutung zu sein. Im Gegensatz dazu wurde eine Kolonisierung mit MRSA bei Pferden und Haustieren häufig nachgewiesen (Köck *et al.*, 2013; Köck *et al.*, 2014). Dabei wurden in Pferden MRSA Kolonisierungsraten zwischen 3,6 % und 9,4 %

beobachtet, die zu 87,5 % mit LA-MRSA CC398 assoziiert waren. Bei Hunden und Katzen hingegen wurden in erster Linie die auch beim Menschen vorherrschenden MRSA Linien CC5 und CC22 gefunden, während lediglich 10 % der auf Hunden und Katzen gefundenen MRSA dem CC398 zugeordnet werden konnten (Vincze *et al.*, 2014). Mögliche Verbreitungs- und Übertragungswege von LA-MRSA CC398 werden im nächsten Abschnitt behandelt.

1.2.3 Übertragungswege von LA-MRSA CC398

Für die Transmission von LA-MRSA CC398 von besiedelten Nutztieren zum Menschen genügen offenbar bereits kurze Kontakte (van Cleef *et al.*, 2011). Längerfristiger Kontakt führt zu hohen Kolonisierungsraten. Eine Prävalenzstudie aus dem Jahr 2009 beschrieb LA-MRSA CC398 Kolonisierungsraten von bis zu 86 % bei Mitarbeitern Schweine-haltender-Betriebe (Cuny *et al.*, 2009). Eine markante Besiedlung mit LA-MRSA CC398 wurde auch bei Schlachthof-Mitarbeitern und Tierärzten detektiert (Van Cleef *et al.*, 2010). Dabei geben längere Abwesenheiten vom Betrieb, wie etwa ein mehrwöchiger Urlaub, interessante Einblicke in die Übertragungsdynamik. Ein Teil der Mitarbeiter verlor während ihres Urlaubes die LA-MRSA CC398 Kolonisierung und war somit nur temporär besiedelt. Andere Mitarbeiter behielten auch nach einer mehrwöchigen Abwesenheit vom Betrieb ihre Kolonisierung (van Cleef *et al.*, 2011). Nähere Untersuchungen zu dieser Thematik aus dem Jahr 2012 ergaben eine Rate von 41 % dauerhaft besiedelter Mitarbeiter von Schweinemastbetrieben, während 59 % die Kolonisierung während ihres Urlaubes verloren (Köck *et al.*, 2012). Diese Funde belegen die Bedeutung des direkten Tier-Mensch Kontaktes für die Übertragung von LA-MRSA CC398. Eine Weiterübertragung von LA-MRSA CC398 auf Familienmitglieder von Menschen mit direktem Kontakt zu Nutztieren, oder Menschen die auf Schweine haltenden Betrieben leben, findet nur in vergleichsweise geringem Maß (4-5 %) statt (Cuny *et al.*, 2009). Eine weitere Übertragungsmöglichkeit in der Schweinehaltung stellen Kot-Aerosole dar. Diese tragen sehr wahrscheinlich sowohl zur Übertragung von Schwein zu Schwein, als auch von Schwein zu Mensch (Mitarbeiter) bei. Die Kot-Aerosole können durch Ventilationsanlagen mit ungefilterten Abluftauslässen auch in die Umwelt gelangen. So konnten LA-MRSA selbst in 300 m Entfernung zum Betrieb

in Bodenproben nachgewiesen werden (Schulz *et al.*, 2012). Dieser Verbreitungsweg ist vermutlich auch für die Kolonisierung der, in unmittelbaren Nähe zu Schweinehaltenden-Betrieben lebenden, Bevölkerung mit LA-MRSA verantwortlich, die ansonsten keinen direkten Kontakt zu den Tieren hat (Bisdorff *et al.*, 2012). Mehrere Studien beschreiben zudem LA-MRSA Kontaminationen in Schweine-, Rind- und Geflügelfleisch (11-30%) sowie Milchproben, die ebenfalls zu einer mögliche Übertragung auf Menschen beitragen können. (de Boer *et al.*, 2009; Kreausukon *et al.*, 2012; Cuny *et al.*, 2013). Die in Deutschland insgesamt geringe LA-MRSA CC398 Kolonisierungsrate bei Personen ohne direkten Kontakt zu Nutztieren legt allerdings nahe, dass kontaminiertes Fleisch/Milch bisher keinen effektiven Übertragungsweg darstellt.

1.2.4 Der genetische Hintergrund von LA-MRSA CC398

LA-MRSA CC398 unterscheidet sich durch mehrere genetische Merkmale von anderen *S. aureus* Linien. Sie gehören fast ausschließlich auch dem MLST 398 an und weisen üblicherweise die *SCCmec* Typen IV bzw. V auf (Vanderhaeghen *et al.*, 2010). Es treten verschiedene *spa* Typen auf, auch wenn der *spa* Typ t011 in Europa vorherrscht (Walther *et al.*, 2012). Eine Resistenz gegen Tetracycline, vermittelt durch die Faktoren des *tetM* bzw. *tetK* Locus, ist sehr weit verbreitet, die für das Panton-Valentin Leukozidin kodierenden Gene *luk F-PV* und *lukS-PV* sind hingegen sehr selten zu finden (Vanderhaeghen *et al.*, 2010; McCarthy *et al.*, 2011). Isolate des CC398 sind üblicherweise nicht nach einer *SmaI* Restriktion mittels PFGE typisierbar. Der Grund hierfür ist ein verändertes Restriktions-Modifikationssystem des Typ II, das zu einer abweichenden DNA Methylierung führt (Bens *et al.*, 2006; Lindsay, 2014). Darüber hinaus weicht bei LA-MRSA CC398 auch die Ausstattung des Restriktions-Modifikationssystems Typ II von anderen *S. aureus* Linien ab. Üblicherweise verfügen *S. aureus* Isolate über zwei unabhängige *hsdS* Gene, welche die Spezifität der DNA-Methylierung regulieren und somit die Aufnahme von Fremd-DNA beeinflussen. In der CC398 Linie ist eines dieser *hsdS* Gene inaktiv, was vermutlich eine erhöhte Affinität für HGT zur Folge hat. (Schijffelen *et al.*, 2010; Uhlemann *et al.*, 2013; Lindsay, 2014). Demgemäß beschreiben mehrere Studien eine erhöhte Häufigkeit des HGT bei LA-MRSA CC398 Isolaten sowie eine hohe

Variabilität der Ausstattung mit MGE (Stegger *et al.*, 2010; McCarthy *et al.*, 2011; McCarthy *et al.*, 2012a; Uhlemann *et al.*, 2013). Diese erhöhte genetische Dynamik innerhalb der LA-MRSA CC398 Linie legt eine verstärkte Anpassungsfähigkeit nahe. Bezüglich der MGE Ausstattung, ist die bereits im Abschnitt 1.1.2 beschriebene Seltenheit des Phagen-codierten IEC als weiteres Abgrenzungsmerkmal zwischen der CC398 Linie und anderer *S. aureus* Linien, wie den klassischen nosokomial erworbenen HA-MRSA, zu sehen (Schijffelen *et al.*, 2010). Dabei stellen die Mensch-assoziierten *S. aureus* CC398 Isolate des *spa* Typs t571, welche als Ursprung der CC398 Linie im Menschen gelten, eine Ausnahme dar. Bei ihnen tritt das IEC mit einer ähnlich hohen Prävalenz wie bei anderen Mensch assoziierten *S. aureus* Linien auf (Uhlemann *et al.*, 2012; Uhlemann *et al.*, 2013; Cuny *et al.*, 2015).

1.3 *S. aureus* Adhäsion, Zell- und Zellwandmechanik

1.3.1 Die Zellwand Gram-positiver Bakterien

Die bakterielle Zellwand stellt die äußerste Abgrenzung der Zelle zu ihrer Umwelt dar, muss zahlreichen Anforderungen gerecht werden und verschiedenste Funktionen erfüllen (Cabeen und Jacobs-Wagner, 2005). Sie muss eine stabile mechanische Barriere bilden, aber gleichzeitig flexibel genug sein, um Zellwachstum, Zellteilung und Transportvorgänge zu ermöglichen (Vollmer *et al.*, 2008; Beeby *et al.*, 2013). Als Widerlager zum Turgor der bakteriellen Zelle ist sie maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Zellgeometrie beteiligt. Darüber hinaus ist die Zellwand als äußere Grenzfläche der Zelle der Ort, an dem essentielle Interaktionsprozesse mit der Umwelt stattfinden (Madigan und Brock, 2009).

Die Grundstruktur Gram-positiver, bakterieller Zellwände bildet ein mehrschichtiges Peptidoglycan-Makromolekül, auch Murein-Sacculus genannt, das den Bakterienprotoplasten umschließt (Madigan und Brock, 2009). Das Peptidoglycan besteht aus Strängen glycosidisch miteinander verknüpfter N-Acetylglucosamin- und N-Acetylmuraminsäuremoleküle. Viele der N-Acetylmuraminsäuren sind über Oligopeptidbrücken mit einer N-Acetylmuraminsäure eines Nachbarstranges quervernetzt und formen so das netzartige Makromolekül (Scheffers und Pinho,

2005). Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau der Zellwand und deren Quervernetzung.

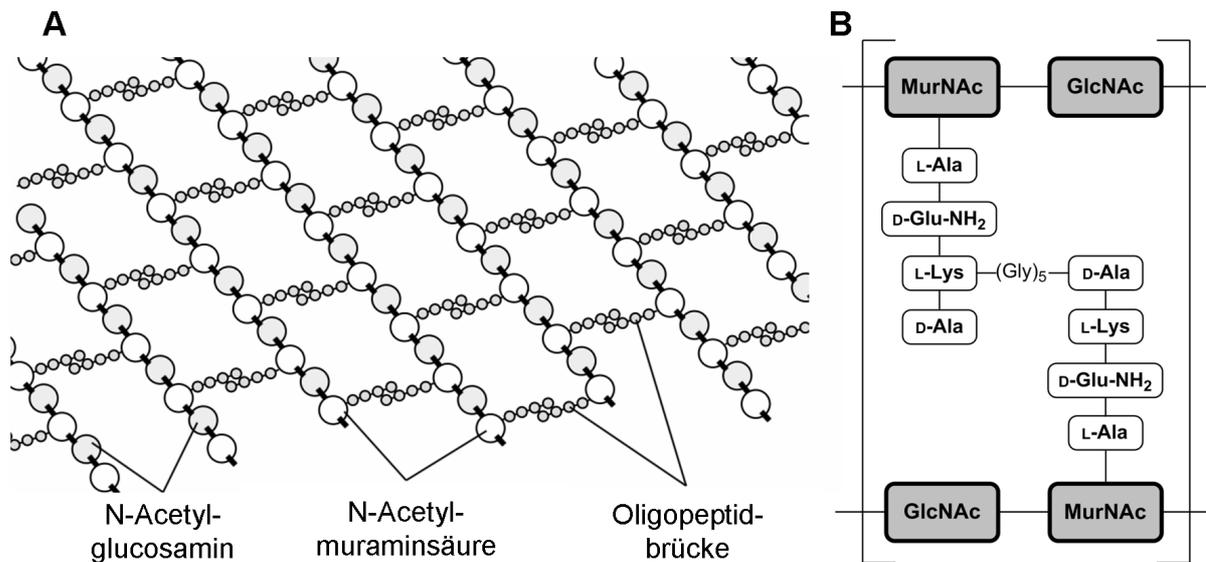


Abb. 1: Aufbau der Gram-positiven Zellwand.

(A) Schematische Darstellung der quervernetzten Stränge aus N-Acetylglucosamin (grau) und N-Acetylmuraminsäure (weiß). **(B)** Aufbau des quervernetzenden Oligopeptids bei *S. aureus* (modifiziert nach Madigan und Brock, 2009).

Die Aminosäuresequenz des quervernetzenden Oligopeptids unterscheidet sich von Art zu Art (Madigan und Brock, 2009). Die Quervernetzung im Zuge der Peptidoglycansynthese ist ein essentieller Prozess während der Zellteilung, der von Transpeptidasen katalysiert wird. Die Hemmung dieser Transpeptidase-Reaktion wirkt während der Zellteilung bakterizid. Bei β -Lactam Antibiotika wie z.B. Penicillin erfolgt die Hemmung durch irreversible Anbindung und Öffnung des β -Lactam Ringes am katalytischen Zentrum der Transpeptidase (Madigan und Brock, 2009).

S. aureus verfügt über insgesamt fünf Transpeptidasen, die an der Peptidoglycan-Quervernetzung beteiligt sind, die sogenannten Penicillin-bindenden-Proteine (PBP) (Scheffers und Pinho, 2005). Die verschiedenen PBP sind dabei in unterschiedlichen Phasen der Zellteilung aktiv. Während PBP2 bzw. PBP2a in den frühen Phasen der Zellwandsynthese aktiv sind und damit essentiell für das Überleben der *S. aureus* Zelle sind, katalysiert PBP4 die sekundäre Quervernetzung der Zellwand, was zu deren weiterer Versteifung führt, für das Überleben von *S. aureus* jedoch nicht essentiell ist (Scheffers und Pinho, 2005). Ein weiterer wichtiger Baustein der Zellwand Gram-positiver Bakterien sind Glycopolymere. Unter den Zellwand-

Glycopolymere sind der Aufbau und die Funktion der Wandteichonsäuren und Lipoteichonsäuren am besten charakterisiert (Weidenmaier und Peschel, 2008). Es handelt sich um langkettige Ribitol- bzw. Glycerol-Phosphat Polymere, die kovalent im Peptidoglycan bzw. in der Zellmembran verankert sind (Madigan und Brock, 2009). Bei *S. aureus* wurden für Teichonsäuren verschiedene infektionsrelevante Funktionen in der Adäsion und Immunevasion beschrieben (Foster, 2005; Weidenmaier und Peschel, 2008). Darüber hinaus ist die Zellwand mit zahlreichen Proteinen durchsetzt bzw. assoziiert. Diese spielen tragende Rollen in der Interaktion der Bakterienzelle mit ihrer Umwelt bzw. der Wirtszelle, aber auch im Rahmen der Nährstoffversorgung und Signalperzeption bzw. Signalweiterleitung (Madigan und Brock, 2009). Dazu gehören, unter anderem, verschiedenste Transporter, Porine oder Rezeptoren. Oberflächenproteine und spezifische Adhäsionsproteine, die in der unspezifischen und spezifischen Adhäsion von *S. aureus* an unbelebten Materialien bzw. biologische Oberflächen eine Rolle spielen, werden in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

1.3.2 Einfluss von Zell- und Zellwandelastizität auf die bakterielle Adhäsion

Für bakterielle Zellwände wurden viskoelastische Eigenschaften beschrieben (Chen *et al.*, 2012). Das bedeutet, sie vereinen mechanische Eigenschaften von Feststoffen und Flüssigkeiten (Popov *et al.*, 1976). Betrachtet man bakterielle Adhäsionsprozesse, so dürfen diese viskoelastischen Eigenschaften der Zellwand nicht vernachlässigt werden, da die Adhäsion von der Kontaktfläche zwischen Substrat und Zellwand beeinflusst wird. Hochelastische Zellwände sind in der Lage sich unter Krafteinwirkung stärker zu verformen und eine große Kontaktfläche zu bieten, während niederelastische Zellwände, auf Grund ihrer geringeren Verformbarkeit, eine deutlich kleinere Kontaktfläche bereitstellen (Liu *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2012). Um Verformungsprozesse und die Kontaktmechanik zwischen elastischen Kugeln (wie zum Beispiel Kokken-förmigen Bakterien) und einer flachen Oberfläche unter Einwirkung einer äußeren Kraft zu beschreiben, existieren verschiedene physikalische Modelle, wie die Kontaktmechanik-Modelle nach Hertz oder Derjaguin-Muller-Toporov (Hertz, 1882; Maugis, 1992). Beide Modelle benötigen zur Bestimmung der Verformbarkeit das materialeigene Elastizitätsmodul

eines Körpers (Schwarz, 2003; Gaboriaud *et al.*, 2005). Bezüglich ihrer Materialeigenschaften sind Bakterienzellen, aufgrund ihrer Schichtstruktur, komplexer als homogene Körper. Es ist zu erwarten, dass die verschiedenen Zellkomponenten, wie das weitestgehend flüssige Cytoplasma im Zellinneren und die Zellwand verschiedene viskoelastische Eigenschaften aufweisen, die sich gegebenenfalls gegenseitig beeinflussen. Eine Studie aus dem Jahr 2012, durchgeführt von Y. Chen und Kollegen, beschreibt ein Kontaktmodell, das zwar den Schichtcharakter von bakteriellen Zellwänden berücksichtigt, allerdings den Einfluss des Turgordrucks und somit die viskoelastischen Eigenschaften der Zelle selbst, außer Acht lässt (Chen *et al.*, 2012). Für vergleichende Adhäsionsstudien sollte demnach sowohl die Zellwandelastizität als auch der, die Zellelastizität beeinflussende, Turgordruck berücksichtigt werden.

1.3.3 Unspezifische Adhäsion von *S. aureus*

Die bakterielle Adhäsion ist für Infektions- und Wachstumsprozesse von zentraler Bedeutung. Für *S. aureus* stellt sie den initialen Schritt der Kolonisierung, der Biofilmbildung, oder alternativ der Internalisierung in die Zellen seines Wirtes dar (Krämer und Jung, 2010). Um das Adhären einer Bakterienzelle erst zu ermöglichen, muss die Bakterienoberfläche zunächst mit einem (abiotischen/biotischen) Substrat in Kontakt kommen. Um diesen Prozess zu erklären, muss man die physikalischen Kräfte betrachten, die den Übergang des Bakteriums von einem mobilen/planktonischen Stadium, in ein immobiles/sessiles Stadium vermitteln. Für diesen ersten Schritt der Kontaktaufnahme sind in erster Linie langreichweitige Van der Waals-Kräfte sowie elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der Bakterienzelle und dem Substrat verantwortlich (Busscher *et al.*, 1992; Planchon *et al.*, 2007). Bei der darauffolgenden, bakteriellen Adhäsion muss zwischen spezifischer und unspezifischer Adhäsion unterschieden werden. Allerdings werden sowohl die spezifische, als auch die unspezifische Adhäsion stark von Makromolekülen (Proteine und Polysaccharide), die mit der bakteriellen Oberfläche assoziiert sind, beeinflusst (Krämer und Jung, 2010; Thewes *et al.*, 2014).

Der Beitrag einzelner Proteine/Proteingruppen zur unspezifischen Adhäsion von *S. aureus* ist noch weitgehend unbekannt. Jedoch scheinen hier kurzreichweitige, hydrophobe Wechselwirkungen zwischen bakteriellen Oberflächenproteinen und dem Substrat eine tragende Rolle zu spielen. Diese hydrophoben Wechselwirkungen sind um ein Vielfaches (Faktor 8-10) stärker als die Van der Waals-Kräfte und die elektrostatischen Wechselwirkungen. Hierbei wirken bakterielle Oberflächenproteine vermutlich wie elastische Federn und können Abstände von bis zu 50 nm überbrücken (Thewes *et al.*, 2014). Des Weiteren wurde ein Einfluss von Wand- und Lipoteichonsäuren auf die Kolonisierung von abiotischen Oberflächen sowie humanem Nasenepithel und Endothel beschrieben (Gotz, 2002; Weidenmaier und Peschel, 2008). Im Gegensatz zur unspezifischen Adhäsion, ist der Beitrag einzelner Proteine zur spezifischen Adhäsion von *S. aureus* sehr gut charakterisiert. Die Oberflächen von, im Körperinneren befindlichen, Medizinprodukte (Katheter, Implantate etc.) werden bereits Sekunden nach dem Einbringen der Implantate in den Körper von adhäsiven Serumproteinen bedeckt (Edmiston *et al.*, 2006; Petrelli *et al.*, 2008; Wagner *et al.*, 2011). Da diese Serumproteine ihrerseits das Ziel von spezifischen *S. aureus* Adhäsionsproteinen sind, erscheint die spezifische Adhäsion, im Gegensatz zur unspezifischen Adhäsion, als der infektionsrelevanterer Prozess.

1.3.4 Spezifische Adhäsion von *S. aureus*

Die spezifische Adhäsion von *S. aureus* an biotische Oberflächen wie Wirtszellen, Gewebe, oder Komponenten der extrazellulären Matrix, wird durch spezifische Adhäsionsfaktoren vermittelt. Wichtige Vertreter der Adhäsionsfaktoren stellt eine Proteinfamilie kovalent in der Zellwand verankerter Oberflächenproteine, die so genannten MSCRAMMs (engl. microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) dar (Clarke und Foster, 2006). MSCRAMMs weisen eine gemeinsame Grundstruktur auf. Diese besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid, einer exponierten Liganden-bindenden Domäne, die häufig von einer Abfolge kurzer, sich wiederholender Aminosäuresequenzen unterbrochen bzw. flankiert wird, einer hydrophoben, die Zellwand und Membran überbrückenden Domäne und einem C-terminalen LPXTG Motiv (Schneewind *et al.*, 1993). Das LPXTG Motiv ist für die Verankerung des Proteins in der Zellwand verantwortlich. Hierbei wird das Motiv

zwischen den Aminosäuren Threonin und Glycin gespalten und die Carboxylgruppe des Threonins kovalent an eine Aminogruppe der, das Peptidoglycan quervernetzenden, Oligopeptide angebunden. Diese Reaktion wird durch die Transpeptidase Sortase A katalysiert (Schneewind *et al.*, 1993). Analog dazu wird das Schneiden von NPQTN Motiven durch die Transpeptidase Sortase B vermittelt. Insgesamt sind mehr als 20 MSCRAMMs in *S. aureus* bekannt, die in der Lage sind jeweils einen oder auch mehrere Wirtsfaktoren spezifisch zu binden. Wichtige Vertreter der MSCRAMMs sind die Fibronectin bindenden Proteine (Fnb) A und B (Signas *et al.*, 1989; Jonsson *et al.*, 1991) sowie die Clumpingfaktoren (engl. clumping factor, Clf) A und B (McDevitt *et al.*, 1997; Ni Eidhin *et al.*, 1998), die an dieser Stelle exemplarisch beschrieben werden.

Die FnbA und B sind in der Lage, sowohl an Fibronectin als auch an Fibrinogen verschiedener Wirte zu binden (Krämer und Jung, 2010). Fibronectin kommt sowohl in der extrazellulären Matrix des Wirtes, als auch als Plasmaprotein vor und vermittelt Zell-Zell Adhäsion eukaryotischer Zellen sowie die Geweberegeneration nach der Blutgerinnung (Alberts, 2002). Fibrinogen kommt ebenfalls als Protein im Blutplasma vor und erfüllt nach der Umwandlung durch Thrombin zu Fibrin zentrale Aufgaben in der Thrombozytenaggregation (Alberts, 2002). Die Bindekapazität von FnbA und B an Fibronectin wird von vier stark konservierten, sich wiederholenden D-Abschnitten (D repeats) vermittelt, die am C Terminus des Adhäsionsproteins lokalisiert sind. Jeder der Abschnitte ist 40 Aminosäuren groß. Ein fünfter, Fibronectin bindender, D-Abschnitt ist von der D-Abschnitt-Kaskade durch eine ca. 100 AS große C-Region mit unbekannter Funktion getrennt (Heilmann, 2011). Die, am N-Terminus lokalisierte, A-Domäne unterscheidet sich zwischen FnbA und B (Sequenzähnlichkeit von nur 40 %). Allerdings zeigt die A-Domäne des FnbA eine substantielle Sequenzähnlichkeit mit den A-Domänen der ClfA und B. Das Fibrinogen bindende Potential von FnbA wurde in einer Studie aus dem Jahr 2000 bestätigt (Wann *et al.*, 2000). Ein Großteil der *S. aureus* Isolate verfügt über beide *fnb* Gene (Greene *et al.*, 1995). *S. aureus* Isolate die nur ein *fnb* besitzen, scheinen sich nicht signifikant in ihrem Fibronectin-Bindepotential zu unterscheiden und nur eine Deletion beider *fnb* Gene führte zu einem deutlich reduzierten Fibronectin-Bindevverhalten (Greene *et al.*, 1995). Allerdings deutete eine Studie aus dem Jahr 2000 darauf hin, dass das Potential invasive Infektionen in *S. aureus* kolonisierten Patienten hervorzurufen mit der Anwesenheit beider *fnb* assoziiert ist (Peacock *et al.*, 2000). Darüber hinaus kommt

den Fnbs bei der *S. aureus* Internalisierung in Endothelzellen des Wirtes eine wichtige Bedeutung zu. Im Plasma gelöstes Fibronectin wird dabei gebunden und fungiert als ein Adaptermolekül zwischen den Fnbs und dem $\alpha 5\beta 1$ Integrin Rezeptor der Endothelzellen. Dies führt zur Signaltransduktion und schließlich zur Umstrukturierung des Cytoskeletts, was die Internalisierung von *S. aureus* begünstigt (Chavakis *et al.*, 2005).

Die Fibrinogen-bindenden ClfA und B wurden ursprünglich als Faktoren beschrieben, die eine Verklumpung von Blutzellen in humanem Plasma vermitteln (McDevitt *et al.*, 1997; Ni Eidhin *et al.*, 1998). *S. aureus* Deletionsmutanten der *clf* Gene sind nicht dazu in der Lage, Verklumpungen in einer Fibrinogen-haltigen Lösung zu verursachen und adhären nur schwach an Oberflächen-gebundenes Fibrinogen. (Ni Eidhin *et al.*, 1998). ClfA und B weichen bezüglich ihres Aufbaus etwas von der MSCRAMM Grundstruktur ab: Sie weisen eine R Domäne auf, die aus sich wiederholenden, Serin-Aspartat Dipeptiden aufgebaut ist und sich zwischen der A Domäne und der Zellwand/Membran überbrückenden Domänen befindet (Heilmann, 2011). Somit sind ClfA und B die bekanntesten Vertreter einer Untergruppe der MSCRAMMs, der Sdr Proteinfamilie (Heilmann, 2011). Die Fibrinogen bindenden A Domänen von ClfA und B unterscheiden sich erheblich voneinander und weisen eine Sequenzähnlichkeit von lediglich 26 % auf. Dies ist dadurch begründet, dass beide Clf an unterschiedliche Regionen des Fg binden können. Während ClfA an die Fibrinogen γ -Kette bindet, ist ClfB in der Lage an die α - oder β -Ketten zu binden (McDevitt *et al.*, 1997; Ni Eidhin *et al.*, 1998). Aufgrund ihrer Fibrinogen Bindekapazität sind ClfA und B dazu in der Lage, über den Fibrinogen Rezeptor $\alpha IIb\beta 3$ Integrin an Thrombozyten zu adhären und die Blutgerinnung auszulösen (Siboo *et al.*, 2001; O'Brien *et al.*, 2002a). Weiterhin wurde die Bedeutung von ClfA als Virulenzfaktor in Kaninchen- und Ratten Endokarditis Modellen sowie einem Maus Arthritis Modell gezeigt (Clarke und Foster, 2006). Darüber hinaus beschreiben eine Reihe von Studien eine Rolle von ClfA und B in der Adhäsion an Keratin bzw. nasale Epithelzellen. Dadurch kommt ClfA und B eine besondere Rolle in der nasalen Kolonisierung des Menschen zu (O'Brien *et al.*, 2002a; Wertheim *et al.*, 2008; Corrigan *et al.*, 2009; Haim *et al.*, 2010; Mulcahy *et al.*, 2012).

Neben den kovalent in der *S. aureus* Zellwand verankerten MSCRAMMs spielen die sogenannten SERAM (engl. secretable expanded repertoire adhesive molecules) eine wichtige Rolle. SERAM stellen eine Gruppe sekretierte Proteine dar, die an ein

breites Spektrum an Wirtsfaktoren binden können und in einem zweiten Schritt an die bakterielle Zellwand rückgebunden werden. Auf diese Weise die Adhäsion zwischen Bakterium und Wirt vermitteln (Chavakis *et al.*, 2005). Zur Gruppe der SERAM gehört das Extrazelluläre Adhäsionsprotein (Eap) sowie das Extrazelluläre Matrix Protein Bindeprotein (Emp). Eap und Emp sind in der Lage, an zahlreiche Komponenten der extrazellulären Matrix (u.a. Fibronektin, Fibrinogen,) des Wirtes zu binden (Heilmann, 2011). Deletionsmutanten des *emp* Gens zeigten ein reduziertes Adhäsionspotential an oberflächengebundenen Fibronektin und Fibrinogen. Neben der Vermittlung der Adhäsion, trägt Eap ebenso zur Internalisierung in Wirtszellen bei (Chavakis *et al.*, 2005; Bur *et al.*, 2013). Das Protein ist aus vier bis sechs dicht miteinander verwandter, aber nicht identischer Einzeldomänen aufgebaut, die alle eine Sequenzhomologie zu Komponenten des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse II (MHC-Klasse-II) aufweisen, sodass das Protein ursprünglich auch als Map (MHC class II analog protein) bezeichnet wurde (Chavakis *et al.*, 2005; Heilmann, 2011). Vergleichsstudien mit den Einzeldomänen zeigten jedoch, dass Eap für die meisten seiner adhäsiven und immunmodulierenden Eigenschaften aus mindestens 2 miteinander verbundenen Einzeldomänen bestehen muss. Eap vermag auch den ICAM-1 Rezeptor auf der Oberfläche von Endothelzellen zu hemmen und damit die Anheftung und Leukdiapedese von Neutrophilen zu verhindern (vergl. Abschnitt Phagozytoseschutz). Weiterhin wurden zytotoxische und angiostatische Funktionen von Eap beschrieben (Haggar *et al.*, 2005; Sobke *et al.*, 2006). Eap ist somit als ein multifunktionaler Virulenzfaktor anzusehen.

1.3.5 Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (engl. Atomic Force Microscopy, AFM) ist ein noch relativ junges Verfahren, das dank seiner Vielfältigkeit bereits in zahlreiche Gebiete der Oberflächenforschung Einzug gehalten hat (Binnig *et al.*, 1986; Dufrene, 2002). Seit einigen Jahren findet die Rasterkraftmikroskopie auch in der Biologie Anwendung (Dufrene, 2002; Parot *et al.*, 2007). Die Grundlage der bildgebenden Rasterkraftmikroskopie ist das „Erfühlen“ der dreidimensionalen Oberflächenstruktur einer Probe mit einer Nanometer-feinen Messsonde, die an einem flexiblen Federbalken angebracht ist, der mittels Piezostellelementen über die Probe bewegt

wird und diese Linie für Linie abrastert. Zur Erfassung der Bewegung der Messsonde dient ein Laser, der auf die Rückseite der Sonde gerichtet ist und reflektiert wird. Wird die Sonde durch die Oberfläche der Probe ausgelenkt, so ändert sich der Reflexionswinkel des Lasers. Diese Änderungen werden mittels einer segmentierten Photodiode aufgezeichnet, als Oberflächentopographie der Probe erfasst und als dreidimensionales Bild wiedergegeben. Dieses Verfahren stellt nur wenige Anforderungen an das, die Probe umgebende Medium. Somit sind Messungen im Vakuum, in verschiedenen Gasen, oder auch Flüssigkeiten möglich. In der Biologie ermöglicht das Messen in Wasser bzw. verschiedenster Nährmedien das Untersuchen nativer Proben, wie lebender Zellen (Dufrene, 2002; Pillet *et al.*, 2014; Dufrene, 2015).

Bei der bildgebenden Rasterkraftmikroskopie unterscheidet man zwischen zwei grundsätzlich Messtechniken: Dem Kontakt-Modus, bei dem die Sonde in direktem Kontakt mit der Probe bewegt wird und dem sogenannten Oszillations oder Tapping-Modus, bei dem die Sonde in unmittelbarer Nähe der Probenoberfläche nahe ihrer Resonanzfrequenz zum Schwingen gebracht wird, ohne dabei direkten Kontakt zur Probe herzustellen. Während der Annäherung der Sonde mit der Probenoberfläche kommt es zu Kraft-Wechselwirkungen, sodass sich die Schwingungsamplitude der Sonde mit der Oberflächentopographie der Probe ändert (Pillet *et al.*, 2014).

Neben der bildgebenden Rasterkraftmikroskopie ist die Messung lokaler Kräfte und Materialeigenschaften das zweite wichtige Anwendungsgebiet dieser Technik. Bei der Kraftspektroskopie werden, durch so genannte Kraft-Distanz Messungen, die punktuellen Wechselwirkungen zwischen einer Probe und der Spitze der Messsonde in Abhängigkeit mit dem vertikalen Annähern oder Zurückziehen der Sonde untersucht (Ducker *et al.*, 1992; Dufrene, 2002; Liu und Wang, 2010). Die Kraft-Distanz-Messung gibt Aufschluss über viele lokale Charakteristika der Probe. Bereits vor dem ersten Kontakt der Sonde mit der Probe lassen langreichweitige Interaktionen zwischen Sondenspitze und Probe Rückschlüsse über auftretende Ladungsverhältnisse und Van der Waals Kräfte zu. Dabei kann die Sonde beispielsweise zur Probe hingezogen oder von ihr abgestoßen werden.

Nach dem In-Kontakt-kommen der Sonde lässt sich die Elastizität der Probe in Abhängigkeit der Eindringtiefe der Sondenspitze messen. Das Zurückziehen der Messsonde wiederum gibt Aufschluss über etwaige Adhäsionkräfte, die zwischen Sondenspitze und Probe auftreten. (Dufrene, 2002; Yongho und Wonho, 2008).

Das Kombinieren bildgebender Rasterkraftmikroskopie und Kraft-Distanz Messungen ermöglicht das Erstellen von Kraftkarten, die beispielsweise lokale Adhäsionskräfte oder Elastizitätsmodule mit dem Höhenprofil überlagern. (Dufrene, 2002; Liu und Wang, 2010). Abbildung 2 zeigt den schematischen Aufbau eines Rasterkraftmikroskops, illustriert die Prinzipien der Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie und erklärt die Bereiche einer Kraft-Distanz-Kurve. Das nächste Kapitel gibt Beispiele möglicher Anwendungen der Rasterkraftmikroskopie in der Mikrobiologie.

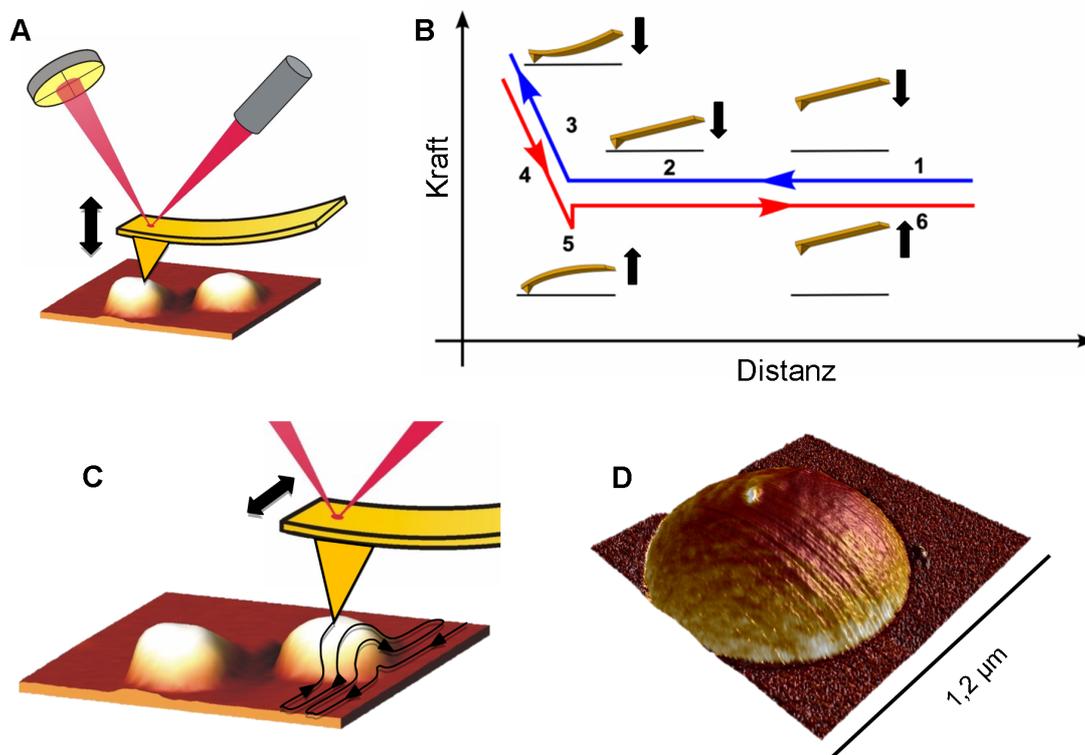


Abb. 2: Die Prinzipien der Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie.

(A) Bei der Kraftspektroskopie wird die Messsonde vertikal bewegt, mit der Probe in Kontakt gebracht und wieder zurückgezogen. Die Bewegungen der Messsonde werden durch einen Laser aufgenommen, der auf die Rückseite der Messsonde gerichtet ist und auf eine Photodiode reflektiert wird. (modifiziert nach (Roos und Wuite, 2009) (B) Die auftretenden Kräfte während der Bewegung der Messsonde werden als Kraft-Distanz-Kurve dargestellt (Annäherungsphase in blau, Rückziehphase in rot). (1) Während der Annäherung an die Probe befindet sich die Messsonde in einem Kräftegleichgewicht, die Kraft-Distanz-Kurve ist flach. Wenn die Sonde mit Oberfläche der Probe in Kontakt kommt (2) und auf die Probe gepresst wird, wird die Sonde nach oben ausgelenkt und eine Kraft wird gemessen (3). Sobald die Sonde wieder zurückgezogen wird sinkt die gemessene Kraft, bis sie sich wieder in einem Kräftegleichgewicht befindet (4). Durch weiteres Zurückziehen wird die Sonde nach unten ausgelenkt und die Adhäsionskraft zwischen Sondenspitze und

Probe wird gemessen. (6) Die Sonde hat sich von der Probe gelöst, ist im Kräftegleichgewicht und die Kraft Distanz-Kurve zeigt wieder einen flachen Verlauf.(modifiziert nach (Maver *et al.*, 2013) **(C)** In der bildgebenden Rasterkraftmikroskopie wird die Messsonde horizontal über die Probe bewegt und rastert diese Linie für Linie ab. Durch die Auslenkung der Sonde wird das Höhenprofil der Probe erfasst. **(D)** Höhenprofil einer *S. aureus* 8325-4 Zelle, eingebettet in eine Pore einer Polycarbonat-Membran.

1.3.6 Möglichkeiten der Rasterkraftmikroskopie in der Mikrobiologie

AFM bietet gegenüber konventionellen bildgebenden Verfahren, wie der optischen Mikroskopie oder der Elektronenmikroskopie, zahlreiche Vorteile. Während bei der Lichtmikroskopie die Auflösung auf den Mikrometer-Maßstab begrenzt ist, ist bei der Elektronenmikroskopie keine Darstellung lebender Zellen und Geweben in wässrigen Lösungen, wie etwa Nährmedien, möglich (Allison *et al.*, 2010). AFM hingegen bietet eine Auflösung im Maßstab weniger Nanometer. Darüber hinaus ist keine Vorbehandlung oder Fixierung des biologischen Materials nötig, wodurch auch lebende Zellen und sogar dynamische Prozesse, wie Zellteilungen oder Proteininteraktionen, dargestellt werden können. (Dufrene, 2002).

Eine AFM Anwendung mit großem Potential für die Biologie ist die Charakterisierung von mechanischen Oberflächeneigenschaften, wie Elastizitätsmodule oder auftretender Adhäsionskräfte. Durch die Kombination mit der bildgebenden Rasterkraftmikroskopie wird das Messen von Kraft- bzw. Elastizitätskarten möglich, wodurch gleichzeitig das Höhenprofil der Probe dargestellt wird. Ein Beispiel dieser Anwendung stellt der, auf dem Tapping-Modus basierende, Peak Force Tapping Modus dar. Dieser Modus bietet die Möglichkeit einer Nanometer-genauen Auflösung des Höhenprofils, bei gleichzeitiger Messung der lokalen, mechanischen Eigenschaften (Adamcik *et al.*, 2011; Berquand, 2011; Heu *et al.*, 2012).

Eine weitere, zentrale AFM Anwendung in der Biologie stellt das Arbeiten mit funktionalisierten Messsonden dar. Dabei werden vor dem Experiment Biomoleküle an der Sonde angebunden oder absorbiert und sind somit an der Oberfläche der Messsonde exponiert. Beim In-Kontakt-bringen der, auf diese Weise funktionalisierten, Sonde mit der Probe lassen sich spezifische Interaktionskräfte zwischen den angebundenen Biomolekülen und der Probenoberfläche bzw. auf der Probenoberfläche lokalisierten Bindepartner messen (Carvalho und Santos, 2012).

Gerade in der Infektionsbiologie ist die Funktionalisierung der Messsonde mit Wirtsproteinen eine interessante Möglichkeit, spezifische Adhäsionskräfte eines Pathogens zu untersuchen. Beispielsweise beschreibt eine Studie aus dem Jahr 2010 die spezifischen Adhäsionskräfte zwischen Messsonden, die durch die Absorption von Fibronectin funktionalisiert wurden, und immobilisierten *S. aureus* und *Lactobacillus lactis* Zellen (Buck *et al.*, 2010). Eine Weiterentwicklung des, in dieser Studie beschriebenen, Funktionalisierungsverfahrens stellt die Einzelmolekül Kraftspektroskopie (engl. Single Molecule Force Spectroscopy, SMFS) dar.

Dabei werden Biomoleküle, über ein bestimmtes Anker-molekül, kovalent an eine Nanometer-feine Messsonde angebunden, sodass beim In-Kontakt-bringen der Sonde nur ein bzw. wenige Moleküle mit der Oberfläche der Probe interagieren. Dadurch können Interaktionskräfte auf der Ebene einzelner Moleküle gemessen werden (Carvalho und Santos, 2012). Eine auf Polyethylenglykol Adaptermolekülen-basierte Funktionalisierungsmethode wurde beispielsweise in einer Studie aus dem Jahr 2010 angewendet, um erstmals die Anordnung eines Zellwand verankerten Proteins in Nanodomänen in der Zellwand der Hefe *Candida albicans* zu zeigen (Alsteens *et al.*, 2010). Auch gesamte Zellen können der Funktionalisierung von Messsonden zum Zweck der Einzelzell-Kraftspektroskopie (engl. single cell force spectroscopy, SCFS) dienen. Häufig werden dabei einzelne, lebende Zellen durch Kleben mit Polydopamin oder Poly-L-Lysin an einer Messsonde befestigt und mit einer Probe in Kontakt gebracht (Dufrene, 2015). Letztere Methode ist im Besonderen als Modell der Bakterienadhäsion von hohem Interesse. So konnten zum Beispiel in einer Studie aus dem Jahr 2014 die Kräfte, die während der Adhäsion von *Stapylococcus carnosus* an abiotische Oberflächen auftreten, mithilfe dieser Methode dargestellt werden (Thewes *et al.*, 2014).

1.4 Strategien der Immunevasion von *S. aureus*

1.4.1 Grundlagen der zellulären Immunreaktion auf bakterielle Pathogene

Das Immunsystem stellt ein System aus verschiedenen biologischen Strukturen und Prozessen dar, mit dem sich ein Organismus vor Krankheiten zu schützt. In diesem Abschnitt werden grundlegende Teile des Immunsystems besprochen, die für den Schutz gegen bakterielle Pathogene bzw. deren Virulenzfaktoren von Bedeutung sind. Grundsätzlich wird zwischen dem angeborenen Immunsystem und dem, entwicklungsgeschichtlich jüngeren, adaptiven Immunsystem unterschieden (Alberts, 2002). Dabei vermittelt das angeborene Immunsystem eine schnelle, jedoch unspezifische Immunantwort, während die Immunantwort des adaptiven Immunsystems auf der Immunreaktion des angeborenen Immunsystems aufbaut und hoch spezifisch ist (Alberts, 2002). Der Verlauf einer Immunreaktion ist ebenfalls davon abhängig, ob ein Wirtsorganismus bereits Kontakt zu einem bestimmten Pathogen hatte und bereits Pathogen-spezifische Antikörper durch das adaptive Immunsystem gebildet worden sind, oder ob es sich um einen Erstkontakt handelt und somit noch keine spezifischen Antikörper verfügbar sind (Janeway, 2005).

Das angeborene Immunsystem umfasst unter anderem die äußeren, physischen Barrieren des Wirtskörpers, wie Haut und Schleimhäute, zelluläre Bestandteile, wie Makrophagen, Neutrophile Granulozyten und Mastzellen sowie ein System aus Plasmaproteinen, dem Komplementsystem, das die Antikörper-vermittelte Opsonisierung, sowie die Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen (Alberts, 2002; Foster, 2005). Das adaptive Immunsystem besteht unter anderem aus den zellulären Bestandteilen der T-Zell und B-Zell Lymphozyten mit zahlreichen Funktionen wie der Erkennung wirtseigener und wirtsfremder Muster, der Ausschüttung von Cytokinen, der Sekretion von Antikörpern oder auch mit unmittelbar cytotoxischer Wirkung auf den eindringenden Erreger (Janeway, 2005).

Die, durch im Serum lösliche, nicht zellulären Bestandteile des angeborenen und adaptiven Immunsystems ausgelöste Immunantwort, wird auch als humorale Immunantwort bezeichnet (Alberts, 2002). Überwindet ein bakterielles Pathogen nun die äußeren, mechanischen Barrieren des Wirtskörpers, so wird es als erstes mit der humoralen Immunantwort durch Plasmaproteine des Komplementsystems und, sofern bereits vorhanden, Antikörper des adaptiven Immunsystems konfrontiert

(Foster, 2005). Hauptziele der Aktivierung des Komplementsystems sind einerseits die Opsonisierung der Pathogene zum Zweck der Phagozytose und andererseits die Rekrutierung und Einwanderung von Neutrophilen und Makrophagen in betroffene Gewebeteile (Foster, 2005). Sofern Pathogene in diesem initialen Schritt der Wirts-Pathogen-Interaktion durch phagozytierenden Zellen aufgenommen und in diesen lysiert wurden, erfolgt über Antigen-Präsentation die Aktivierung und Stimulation von T-Lymphozyten und B-Lymphozyten, als Teil einer spezifischen zellulären Immunantwort sowie die Sekretion spezifischer Antikörper (Janeway, 2005). Dadurch wird eine weiter erhöhte Phagozytose-Effizienz sowie eine Bindung und Neutralisation bakterieller Toxine erreicht (Foster, 2005).

S. aureus wiederum hat eine Vielzahl von Strategien entwickelt, um die Immunantwort seines Wirtes zu umgehen bzw. zu unterwandern. Auf einzelne Mechanismen und Faktoren der *S. aureus* Immunevasion wird in den folgenden Abschnitten eingegangen.

1.4.2 Inhibierung des Komplementsystems

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, finden im Blut des Wirtes zentrale Abläufe der Wirts-Pathogen-Interaktion statt. Dabei wird ein Teil der Immunantwort des Wirtes durch Serumproteine des Komplementsystems vermittelt. Die Komplementbindungsreaktion, mit der Spaltung des Komplementfaktors C3 auf der Bakterienoberfläche, ist dabei von zentraler Bedeutung (Foster, 2005). Dies kann auf drei verschiedenen Wegen erfolgen: Dem „Klassischen Weg“, dem „Lectin-Weg“ und dem „Alternativen Weg“ (Pier *et al.*, 2004; Janeway, 2005). Beim Klassischen Weg bedarf es einer Immunreaktion des adaptiven Immunsystems mit einer spezifischen IgG Antikörperbindung (Pier *et al.*, 2004). Am Fc-Teil des IgG Antikörpers kommt es nach Anbindung an das Antigen zur Bildung des C1-Komplexes, bestehend aus dem Faktor C1q und jeweils zwei Faktoren C1r und C1s. Dabei führt die Anbindung von C1q an den Fc-Teil des IgG zur Aktivierung der Serinproteasen C1r, die den Faktor C1s spaltet und somit den C1 Komplex aktiviert, der wiederum die Komplementfaktoren C2 und C4 spaltet. Die Spaltprodukte C4b und C2a bilden einen C4b-C2a Enzymkomplex. Der C4b-C2a Enzymkomplex agiert als C3 Convertase, der den Komplementfaktor C3 auf der Bakterienoberfläche in

C3a und C3b spaltet. C3b verbleibt gebunden an der Bakterienoberfläche und dient der Opsonisierung, das Peptid C3a hingegen wird nicht gebunden, übernimmt eine Rolle in der Chemotaxis-Steuerung und beeinflusst auf diese Weise die Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen (Foster, 2005).

Die Komplementbindungsreaktion über den Lectin-Weg wird durch die Anbindung von Mannose-bindendem Lectin (MBL) bzw. Ficolin an Kohlenhydratketten an der Bakterienoberfläche, wie Teichonsäuren oder Teile einer Kapsel, eingeleitet. Das MBL bildet mit den MBL assoziierten Serin Proteasen (MASP) 1 bis 3 und einem weiteren kleinen MBL assoziierten Protein (sMAP) einen Komplex, der analog zum C1 Komplex aus dem Klassischen Weg die Komplementfaktoren C2 und C4 spaltet und zur Aktivierung der C3 Convertase (C4b-C2a) führt. Somit kommt es auch hier zur Spaltung des Komplementfaktors C3 in das opsonisierende C3b und das regulatorische Peptid C3a. Der Komplex aus C4b-C2a und C3b ist darüber hinaus in der Lage, weitere Komplementfaktoren (C5-C9) zu aktivieren, unter anderem den an der Chemotaxis-Steuerung beteiligten Faktor C5a (Foster, 2005).

Der alternative Weg der Komplementbindungsreaktion wird durch den Komplementfaktor B eingeleitet, der durch bereits vorhandenes C3b gebunden und anschließend durch den Komplementfaktor D in den Faktor Bb gespalten wird. Der Komplex zwischen Bb und C3b bildet nun eine alternative C3 Convertase, die in der Lage ist, weitere C3 Moleküle zu spalten. Somit ist über den alternativen Weg eine Verstärkung der Immunreaktionen des Komplementssystems möglich. Durch die Anbindung des Faktors B bzw. Bb an den hydrolysierten Faktor C3 kann die Komplementbindungsreaktion im Alternativen Weg auch eigenständig eingeleitet werden (Foster, 2005). Abbildung 3 illustriert die drei Wege der Komplementbindungsreaktion.

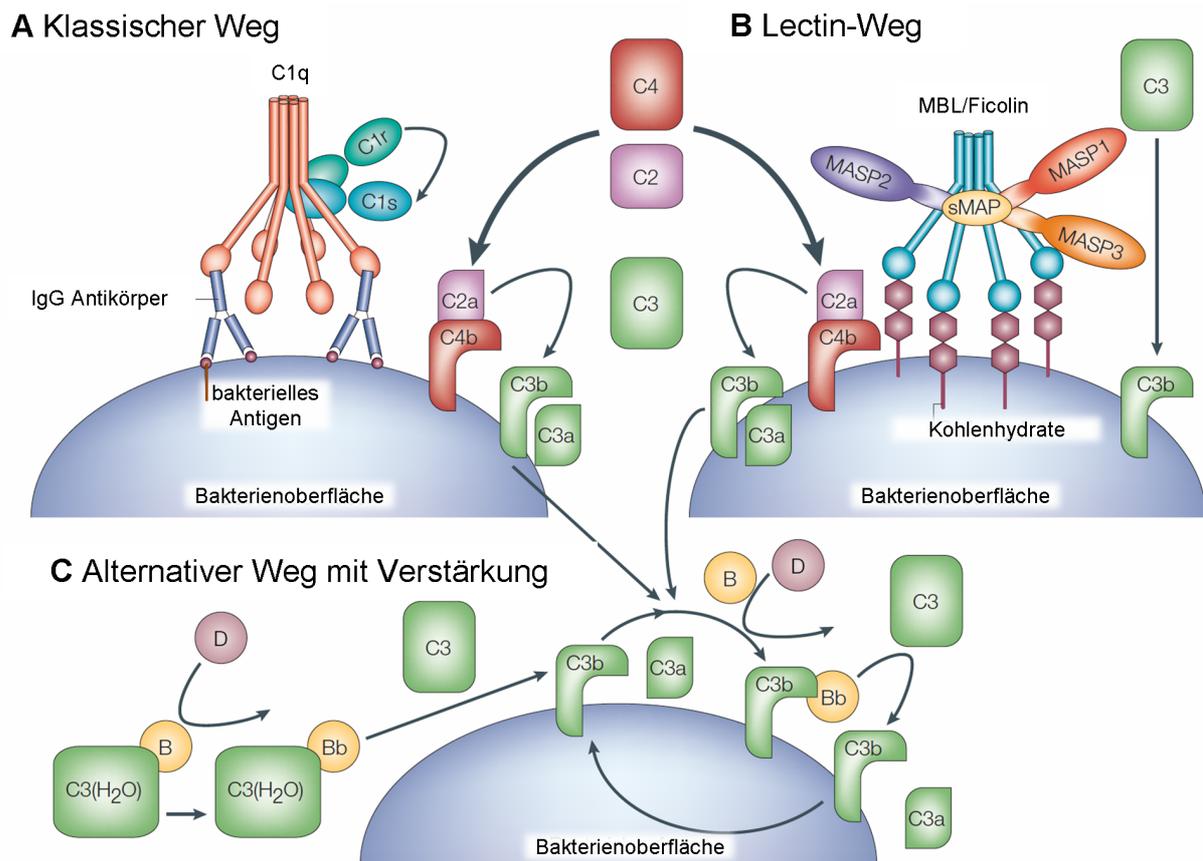


Abb. 3: Die Aktivierung des Komplementsystems.

Die Komplement-bindungsreaktion kann auf drei verschiedenen Wegen erfolgen: **(A)** Klassischer Weg, **(B)** Lectin-Weg und **(C)** Alternativer Weg (modifiziert nach Foster, 2005). Die Aktivierung einzelner Komplementfaktoren sowie deren Hemmung durch *S. aureus* werden in Abschnitt 1.4.2 beschrieben.

In jedem der Wege ist die Spaltung des Komplementfaktors C3 durch die C3 Convertasen der zentrale Schritt zur Aktivierung der Komplementbindungsreaktion. *S. aureus* hat mehrere Strategien zur Inhibierung der C3 Convertase Aktivität entwickelt. Insbesondere die *Saint3* codierten Faktoren des IEC spielen dabei eine wichtige Rolle (van Wamel *et al.*, 2006). Der Staphylococcus Komplement Inhibitor (SCIN) vermag beide C3 Convertase-Komplexe (C4b-C2a und C3b-Bb) zu binden (Rooijackers *et al.*, 2005). Somit kommt es zu keiner weiteren Spaltung des Komplementfaktors C3 und zu einer effektiven Hemmung der Komplementbindungsreaktion. Außerdem ist *S. aureus*, durch die sekretierte Staphylokinase (SAK), dazu in der Lage bereits an die Bakterienoberfläche

gebundenes C3b sowie IgG Antikörper zu spalten und zu inaktivieren (Rooijackers *et al.*, 2005; van Wamel *et al.*, 2006).

Neben den Faktoren des IEC ist auch das sekretierte extrazelluläre Fibrinogen-bindende Protein (Efb) dazu in der Lage, den Komplementfaktor C3 zu binden und so die Anbindung von C3 an die Bakterienoberfläche zu verhindern (Lee *et al.*, 2004a; Lee *et al.*, 2004b). Auch für Eap wurde ein Einfluss auf das Komplementsystem beschrieben, es vermag die Aktivierung des C3 Convertase-Komplexes –C3b-Bb zu inhibieren (Woehl *et al.*, 2014).

Mit diesen, das Komplementsystem betreffenden, Immunevasionsmechanismen wird insbesondere die Strategie verfolgt, die Phagozytose durch Neutrophile und Makrophagen zu reduzieren bzw. zu hemmen.

1.4.3 *S. aureus* Phagozytoseschutz

Ein weitere, bedeutende Strategie der Immunevasion von *S. aureus* ist die direkte Interaktion mit den Phagozyten seines Wirtes.

Dabei spielen zellwandgebundene Oberflächenproteine, wie die IgG Bindeproteine, welche die Antikörper Opsonisierung beeinflussen, eine wichtige Rolle. Protein A ist in der Lage IgG Antikörper am Fc-Teil zu binden (Uhlen *et al.*, 1984). Dies führt zu einem Einhüllen der Bakterienzelle mit umgekehrt orientierten IgG Antikörpern mit nicht exponierten Fc-Teilen, die nicht von den Fc-Rezeptoren von Neutrophilen als opsonisiertes Pathogen erkannt werden können. Dieser Mechanismus vermittelt einen wirksamen Phagozytoseschutz (Patel *et al.*, 1987; Cedergren *et al.*, 1993). Weitere Studien zeigten, dass Protein A ebenso die Proliferation, klonale Expansion und schließlich auch den Zelltod von B-Lymphozyten stimuliert (Forsgren *et al.*, 1976; Peterson *et al.*, 1977; Sjudahl, 1977) sowie mit dem Von Willebrand Faktor (vWF), der in der Blutgerinnung des Wirtes eine wichtige Rolle spielt, interagiert (Hartleib *et al.*, 2000). Protein A kann somit als multifunktionaler Virulenzfaktor von *S. aureus* angesehen werden.

Ein weiteres IgG Bindeprotein stellt das Staphylokokken-Immunglobulin-Bindeprotein (engl. Staphylococcal binder of immunoglobulin: Sbi) dar. Ähnlich wie Protein A ist Sbi in der Lage, IgG Antikörper zu binden (Kim *et al.*, 2012). Außerdem interagiert Sbi mit dem Komplementfaktor C3 und ist somit in der Lage, sowohl das

angeborene, als auch das adaptive Immunsystem zu beeinflussen (Haupt *et al.*, 2008).

Den bereits in Abschnitt 1.3.4 beschriebenen ClfA und B kommt, in ihrer Funktion als Fibrinogen-bindende Proteine auf der Zelloberfläche von *S. aureus*, ebenso eine Rolle beim Phagozytoseschutz zu (O'Brien *et al.*, 2002a). Die von *S. aureus* sekretierte Koagulase (Coa) bildet im Zusammenspiel mit dem wirtseigenen Prothrombin ein katalytisch aktives „Staphthrombin“. Staphthrombin induziert auch in Abwesenheit eines Calciumsignals die Bildung eines langkettigen Fibrins aus Fibrinogen. Mit Hilfe von ClfA und B vermag *S. aureus* dieses Fibrinogen bzw. Fibrin an seine Oberfläche anzubinden, ein vielschichtiges Fibrinnetzwerk zu bilden und sich so effektiv vor der Opsonisierung und Phagozytose zu schützen (McDevitt *et al.*, 1997).

Darüber hinaus umgeben sich viele *S. aureus* mit einer Kapsel, die aus Polysaccharidketten besteht und ebenso einen Phagozytoseschutz vermittelt (O'Riordan und Lee, 2004; Roghmann *et al.*, 2005). Dabei wird zwischen verschiedenen Serotypen bzw. Kapseltypen unterschieden. Bei klinischen Isolaten sind die Serotypen 5, 8 und 336 am häufigsten vertreten (Roghmann *et al.*, 2005). Verschiedene Tiermodellstudien sowie in vitro Phagozytose Assays haben für, die Serotypen 5 und 8 exprimierenden, *S. aureus* Isolate eine erhöhte Virulenz und eine reduzierte Phagozytose durch Neutrophile zeigen können. (Baddour *et al.*, 1992; Nilsson *et al.*, 1997; Thakker *et al.*, 1998). Es wird angenommen, dass die Komplementfaktoren zwar unter der Polysaccharidkapsel an der bakteriellen Zellwand Komplexe bilden bzw. gespalten werden können, dann allerdings für die Komplementrezeptoren der Neutrophilen nicht zugänglich sind (Foster, 2005).

Eine weitere Immunevasionsstrategie von *S. aureus* ist die direkte Hemmung der Komplementfaktoren auf den Neutrophilen und somit die Störung der Chemotaxis. Während der Komplementbindungsreaktion kommt es zur Ausschüttung chemotaktischer Peptide, wie den Komplementfaktoren C3a und C5a (Foster, 2005). Diese werden von membranständigen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Neutrophilen erkannt (Murdoch und Finn, 2000). Um diese Prozesse zu inhibieren, sekretieren etwa 60 % aller *S. aureus* Isolate, darunter 92 % der HA-MRSA Isolate das Chemotaxis-inhibierende-Protein (CHIP). Dieser ϕ Saint3 codierte IEC Faktor ist dazu in der Lage an den C5a Rezeptor zu binden und diesen zu blockieren, wodurch

die Chemotaxis und Einwanderung von Neutrophilen gehemmt wird (Foster, 2005; van Wamel *et al.*, 2006).

Auch Eap trägt unmittelbar zum Phagozytoseschutz von *S. aureus* bei. Das Exoprotein bindet und blockiert das interzelluläre Adhäsions-Molekül-1 (ICAM-1) auf der Oberfläche von Endothelzellen und verhindert so die Anbindung des Lymphozyten-Funktion-assoziierten Antigens (LFA-1) auf der Oberfläche von Neutrophilen und hemmt damit, ebenso wie CHIP, die Anheftung und Leukodiapedese der Neutrophilen in infiziertes Gewebe (Foster, 2005).

1.4.4 Intrazelluläres Überleben

Der vorherige Abschnitt beschäftigte sich mit den Möglichkeiten von *S. aureus*, sich vor der Phagozytose durch Immunzellen seines Wirtes zu schützen. Da aber immer noch ein signifikanter Anteil der im Wirt zirkulierenden *S. aureus* Zellen durch die Immunzellen aufgenommen wird, hat das Pathogen ebenso Strategien entwickelt, die ihm ein intrazelluläres Überleben nach der Phagozytose ermöglichen. Eine Studie von M. Kubica und Kollegen aus dem Jahr 2008 beschreibt sogar intrazelluläre Teilungen von *S. aureus* nach der Phagozytose durch Maus-Makrophagen (Kubica *et al.*, 2008). Ältere Arbeiten von Gresham und Kollegen weisen zudem darauf hin, dass *S. aureus*, je nach Umgebungsbedingung, sogar die Rekrutierung von Neutrophilen an den Infektionsort induzieren kann, um vermehrt durch diese Immunzellen aufgenommen zu werden, ohne dabei abgetötet zu werden und vor weiteren Immunreaktionen des Wirtes geschützt zu sein (Gresham *et al.*, 2000).

Eine Strategie, die zum intrazellulären Überleben beiträgt ist die Modifikation bakterieller Oberflächenstrukturen, wie Wandteichonsäuren, Lipoteichonsäuren oder auch von Bestandteile der bakteriellen Zellwand. Die *S. aureus* Dlt Proteine vermitteln die Anbindung von D-Alanin Resten an Ribitol-Teichonsäuren und Lipotechonsäuren (Peschel *et al.*, 1999). Ebenso wird die Anbindung von L-Lysin Resten an Phosphoglyceride der bakteriellen Zellmembran durch das MprF Protein katalysiert (Peschel *et al.*, 2001; Staubitz *et al.*, 2004). Beide Modifikationen dienen der teilweisen Neutralisierung negativer Ladungen der Teichonsäuren und von Teilen der Phosphoglyceride, die zu einer verminderten Affinität kationischer

antimikrobieller Peptide, wie den α - und β -Defensinen, führt, die im Phagosomen von Neutrophilen sekretiert werden (Foster, 2005). Diese Modifikationen negativ geladener Oberflächenmoleküle vermitteln einen wirkungsvollen Schutz im Phagosomen der Immunzellen des Wirtes. Studien zeigten, für *dlt* und *mprF* defiziente Mutanten, eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber kationischer antimikrobieller Peptide sowie eine reduzierte Virulenz *in vivo* in verschiedenen Tiermodellen. (Collins *et al.*, 2002; Kristian *et al.*, 2003). Des Weiteren gilt auch das, an der Spaltung von Komplementfaktoren und IgG-Antikörpern auf der bakteriellen Zelloberfläche beteiligte, Protein SAK als ein wichtiger Faktor für das intrazelluläre Überleben. Mehrere Studien beschreiben die Spaltung kationischer antimikrobieller Peptide durch SAK (Bokarewa und Tarkowski, 2004; Jin *et al.*, 2004).

Eine weitere wichtige Strategie für das intrazelluläre Überleben ist der Abbau reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), eine der Hauptkomponenten der intrazellulären Pathogenabwehr eukaryoter Zellen. Zu diesem Zweck exprimiert *S. aureus* unter anderem zwei Superoxid-Dismutasen und eine Katalase, die ROS in molekularen Sauerstoff und Wasser umzuwandeln vermögen (Karavolos *et al.*, 2003). Darüber hinaus wird das intrazelluläre Überleben sowie das Entkommen von *S. aureus* aus dem Phagosomen durch die PSM (engl. Phenol soluble modulins), eine Klasse kleiner, α -helikaler Peptide mit zytotoxischer Wirkung beeinflusst. Die PSM werden, neben anderer Toxine, im nächsten Abschnitt besprochen.

1.4.5 Immunevasions-relevante Toxine

Einen fundamentalen Beitrag zur Virulenz von *S. aureus* leisten sekretierte Toxine. Diese werden häufig auf mobilen genetischen Elementen codiert, was zu einer großen Heterogenität der Toxinausstattung in den verschiedenen *S. aureus* Stämmen führt (Grumann *et al.*, 2014). Dabei zeigen zahlreiche Toxine eine Wirkung auf Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems und spielen damit eine prominente Rolle in der *S. aureus* Immunevasion (Grumann *et al.*, 2014). Insbesondere Poren-bildende Toxine, wie das α -Hämolysin (Hla), sind hierbei von großer Bedeutung (Foster, 2005). Das für dieses Toxin codierende Gen *hla* ist nicht mit einem mobile genetischen Element assoziiert, sondern als Teil des *S. aureus* Kerngenoms in 95 % aller *S. aureus* Stämmen vorhanden. Hla bindet an den

membranständigen Wirts-Rezeptor ADAM10 und bildet Heptamer-förmige Poren (Inoshima *et al.*, 2011). Es ist in der Lage, ein weites Spektrum an Wirtszellen zu schädigen, zu denen, neben Epithelzellen und Erythrozyten, auch Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten zu zählen sind (Grumann *et al.*, 2014). Einen weiteren wichtigen Beitrag zur Immunevasion leisten die Zweikomponenten-Leukotoxine (Ventura *et al.*, 2010; Dumont *et al.*, 2011). Sie sind aus einer, ca. 32-35 kDa großen, F-Untereinheit und einer S-Untereinheit aufgebaut, die getrennt voneinander sekretiert werden. Es sind fünf verschiedene Klassen von Leukotoxin F-Untereinheiten (HlgB, LukF-PV, LukD, LukF-PV, LukG) und sechs verschiedene Leukotoxin S-Untereinheiten (HlgA, HlgC, LukS-PV, LukE, LukM, LukH) bekannt (Kaneko *et al.*, 1998; Prevost *et al.*, 2001; Morinaga *et al.*, 2003; Ventura *et al.*, 2010; Dumont *et al.*, 2011; Grumann *et al.*, 2011). Die Protein Untereinheiten haben als Monomere keine toxische Wirkung, sind allerdings in der Lage, als Hexamere bzw. Heptamere Membranporen in Monocyten, Makrophagen und Neutrophilen zu bilden (Dumont *et al.*, 2011). Dabei zeigen die meisten F- und S-Untereinheiten ein monogames Oligomerisierungsverhalten (Grumann *et al.*, 2014). Ein immunologisch besonders bedeutsames Leukotoxin stellt das Panton-Valentine Leukocidin (PVL) dar; ein Oligomer aus den Komponenten LukF-PV und LukS-PV. Beide Untereinheiten sind Phagen-codiert, sodass eine Übertragung via horizontalem Gentransfer möglich ist (Masiuk *et al.*, 2010).

PVL positive *S. aureus* Isolate werden inzwischen auf allen Kontinenten gefunden (Shrestha, 2013). Dennoch ist die PVL Produktion typisch für die, derzeit in den USA vermehrt kursierenden, CA-MRSA Isolate des Typs USA300. Dort wird PVL insbesondere mit einem erhöhten Virulenzpotential und den Krankheitsbildern der SSTI (engl. Soft Skin and tissue infection) und der nekrotisierenden Pneumonie in Verbindung gebracht (Gillet *et al.*, 2002; Vandenesch *et al.*, 2003; Badiou *et al.*, 2008; Diep und Otto, 2008; Carpaij *et al.*, 2011).

Neben den porenbildenden Toxinen hat *S. aureus* weitere Toxin-basierte Strategien der Immunevasion entwickelt. Die PSM (engl. Phenol soluble modulins) bezeichnen eine Klasse kleiner, α -helikaler, amphiphatischer Peptide mit zytotoxischen Eigenschaften (Grumann *et al.*, 2014). Dabei unterscheidet man zwei Hauptgruppen: Die kleineren PSM α Peptide (20-26 Aminosäuren), zu denen unter anderem das Hämolyisin δ gehört, sowie die größeren PSM β Peptide (43-44 Aminosäuren) (Wang *et al.*, 2007). Die PSMs sind üblicherweise Teil des *S. aureus* Kerngenoms und

werden mit dem Auftreten invasiver *S. aureus* Infektionen in Verbindung gebracht (Rautenberg *et al.*, 2011). Insgesamt werden den PSM das Potential zugeschrieben Neutrophile zu rekrutieren, lysieren sowie deren Chemotaxis und Aktivität zu beeinflussen und so zum intrazellulären Überleben und dem Entkommen von *S. aureus* aus dem Phagosomen von Immunzellen beizutragen (Wang *et al.*, 2007; Cheung *et al.*, 2010).

Als potente T-Lymphyten Mitogene, gehören die sogenannten Superantigene (SAG) zu den effektivsten *S. aureus* Mechanismen zur der Hemmung des adaptiven Immunsystems seines Wirtes (Foster, 2005). Neben ihrer mitogenen Wirkung, lösen einige Toxine dieser Klasse auch Erbrechen, Durchfälle oder Lebensmittelvergiftung aus. (Lina *et al.*, 2004). Eine Review von D. Grumann und Kollegen aus dem Jahr 2014 beschrieb 23 bis dato bekannte Superantigene in *S. aureus*, darunter die bekannten Enterotoxin A (SEA) und toxic shock-syndrome toxin 1 (TSST-1). Genetische Untersuchungen belegten, dass ca. 80 % der klinischen *S. aureus* Isolate über ein Repertoire aus fünf bis sechs Superantigenen verfügen (Baba *et al.*, 2002; Becker *et al.*, 2003; Holtfreter *et al.*, 2004; Holtfreter *et al.*, 2007). Da diese zumeist auf mobilen genetische Elementen codiert sind, gibt es eine große Heterogenität bezüglich dieses Superantigen Repertoires (Johns und Khan, 1988; Fitzgerald *et al.*, 2001; Lindsay und Holden, 2006; Ono *et al.*, 2008). Ihre Wirkungsweise beruht auf der unspezifischen Aktivierung der T-Lymphyten des Wirtes. Üblicherweise werden bakterielle Antigene in Verbindung mit dem MHC von Antigen-präsentierenden Zellen, wie Makrophagen präsentiert und von den T-Zell-Rezeptoren der T-Lymphyten erkannt, um eine adaptive Immunantwort auszulösen. Superantigene hingegen lösen eine Antigen-unspezifische Aktivierung der T-Lymphyten aus, indem sie als Brücken die beiden Rezeptorklassen verbinden (Proft und Fraser, 2003). Während bei einer spezifischen Immunantwort lediglich eine T-Lymphyte aus 10^5 bis 10^6 naiver T-Lymphyten spezifisch aktiviert werden, werden bei einer unspezifischen Superantigen-vermittelten Aktivierung bis zu 20 % aller T-Lymphyten gleichzeitig aktiviert (Proft und Fraser, 2003). Dies führt zu einer massiven Ausschüttung proinflammatorischer Cytokine, wie Interleukin 2 (IL2), Interferon γ (IFN- γ) und dem „Tumor Necrosis factor α “ (TNF- α), dem sogenannten „Cytokinsturm“, und in dessen Folge einer starken Entzündungsreaktion. (Bergdoll *et al.*, 1981; McCormick *et al.*, 2001). Dieser folgt allerdings eine Phase der Passivität bzw. Nicht-Aktivierbarkeit der T-Lymphyten,

oder gar deren Zelltod (Rellahan *et al.*, 1990; Alderson *et al.*, 1995). Somit ermöglichen Superantigene eine effektive Hemmung der adaptiven Immunantwort und der Sekretion spezifischer Antikörper.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Diese Arbeit wird als ein Teilprojekt des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Verbundprojekts „Med-Vet-Staph“ durchgeführt. Ziel dieses Forschungsverbundes ist es herauszufinden, warum *S. aureus* Isolate der klonalen Linie CC398 sowohl beim Mensch, als auch beim Tier gleichermaßen erfolgreich sind und sich zunehmend verbreiten. Dazu gehören die Untersuchung von MRSA-Verbreitungsmustern, Mechanismen der Spezies-Transmission, Resistenz und Pathogenität. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf drei Infektionsrelevanten Aspekten von *S. aureus* CC398:

- I. die Fähigkeit der bakteriellen Adhäsion an Wirtszellen und Wirtsproteine
- II. das Potential zur Immunevasion
- III. die Rolle des IEC in der Wirtsadaptation

(I.) Die bakterielle Adhäsion an den Wirt stellt die Grundbedingung für die Internalisierung in Wirtszellen, bzw. die Bildung eines Biofilms dar. Wie bereits oben beschrieben, wird ein Einfluss der viskoelastischen Eigenschaften der bakteriellen Zellwand auf die Adhäsion postuliert. Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Elastizitäts- und Adhäsions-Eigenschaften von LA-MRSA CC398 Isolaten an Wirtszellen sowie Wirtsproteine bestimmt und mit humanadaptierten MRSA Linien verglichen werden.

(II.) Als wichtige Strategien der Immunevasion von *S. aureus* wird die Fähigkeit des Phagozytoseschutzes sowie das Potential des intrazellulären Überlebens nach der Phagozytose von LA-MRSA CC398 Isolaten bestimmt und ebenso mit humanadaptierten MRSA Linien verglichen.

(III.) Die Aufnahme von MGE, im Zuge des Horizontalen Gentransfers, unterstützt die Adaptation von *S. aureus* Isolaten an veränderte Umweltbedingungen. Das seltene Vorkommen des IEC innerhalb der CC398 Linie stellt eine der genetischen

Besonderheiten dieser Linie bezüglich der MGE Ausstattung dar. Um die Rolle des IEC in der Wirtsadaptation zu untersuchen soll die Phagozytoseaktivität durch Immunzellen verschiedener Wirte untersucht werden.

Hauptfragestellungen dieser Arbeit sind:

- Gibt es bezüglich bakterieller Adhäsion und Immunevasion Unterschiede zwischen LA-MRSA CC398 Isolaten und MRSA Isolaten, die vorwiegend beim Menschen auftreten?
- Begründen eventuell veränderte Adhäsions- und Immunevasions-Eigenschaften die weite Verbreitung von LA-MRSA CC398?
- Sind die Mechanismen der Adhäsion und Immunevasion wichtig für die Fähigkeit der Spezies-Transmission?

2 Material

2.1 Bakterienisolate und eukaryotische Zellen

2.1.1 Bakterienisolate

Eine Übersicht der verwendeten *S. aureus* Isolate wird in den Tabellen 1, 2 und 3 gezeigt. Falls in den Experimenten *Stapylococcus carnosus* untersucht wurde, handelte es sich um *S. caronosus* TM300 (Schleifer und Fischer, 1982).

Tab. 1: LA-MRSA CC398, CA-MRSA und HA-MRSA Isolate mit Typisierungsinformationen, verwendet in den Versuchsteilen 4.1 und 4.2.

Isolat Nr.:	<i>S. aureus</i> Klasse:	<i>spa</i> Typ:	Klonaler Komplex:	Resistenz -muster:	Isolat- quelle:	ϕ Saint3 Status:	Referenz:
1719	LA-MRSA	t011	CC398	MRSA	Schwein	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
1716	LA-MRSA	t011	CC398	MRSA	Schwein	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
1712	LA-MRSA	t011	CC398	MRSA	Schwein	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
1711	LA-MRSA	t011	CC398	MRSA	Schwein	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
1710	LA-MRSA	t011	CC398	MRSA	Schwein	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
2127	LA-MRSA	t034	CC398	MRSA	Schwein	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
2118	LA-MRSA	t034	CC398	MRSA	Schwein	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
1714	LA-MRSA	t034	CC398	MRSA	Schwein	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
1713	LA-MRSA	t034	CC398	MRSA	Schwein	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
2121	LA-MRSA	t108	CC398	MRSA	Schwein	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
0435	LA-MRSA	t108	CC398	MRSA	Schwein	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
5172	LA-MRSA	t011	CC398	MRSA	Mensch	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
4856	LA-MRSA	t011	CC398	MRSA	Mensch	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
5192	LA-MRSA	t011	CC398	MRSA	Mensch	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
5191	LA-MRSA	t011	CC398	MRSA	Mensch	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
5199	LA-MRSA	t011	CC398	MRSA	Mensch	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
5345	LA-MRSA	t034	CC398	MRSA	Mensch	+	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
5363	LA-MRSA	t034	CC398	MRSA	Mensch	+	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
5328	LA-MRSA	t034	CC398	MRSA	Mensch	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
5332	LA-MRSA	t034	CC398	MRSA	Mensch	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
5327	LA-MRSA	t034	CC398	MRSA	Mensch	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
4949	LA-MRSA	t108	CC398	MRSA	Mensch	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
4969	LA-MRSA	t108	CC398	MRSA	Mensch	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
4741	LA-MRSA	t108	CC398	MRSA	Mensch	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014

5078	LA-MRSA	t108	CC398	MRSA	Mensch	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
5425	LA-MRSA	t108	CC398	MRSA	Mensch	-	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
4438	CA-MRSA	t008	CC8	MRSA	Mensch	+	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
3289	CA-MRSA	t008	CC8	MRSA	Mensch	+	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
4184	CA-MRSA	t008	CC8	MRSA	Mensch	+	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
4461	CA-MRSA	t019	CC30	MRSA	Mensch	+	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
2707	CA-MRSA	t019	CC30	MRSA	Mensch	+	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
3283	CA-MRSA	t019	CC30	MRSA	Mensch	+	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
3714	CA-MRSA	t044	CC80	MRSA	Mensch	+	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
3697	CA-MRSA	t044	CC80	MRSA	Mensch	+	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
4083	CA-MRSA	t044	CC80	MRSA	Mensch	+	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
4018	HA-MRSA	t003	CC5	MRSA	Mensch	+	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
3895	HA-MRSA	t003	CC5	MRSA	Mensch	+	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
3897	HA-MRSA	t003	CC5	MRSA	Mensch	+	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
4087	HA-MRSA	t032	CC22	MRSA	Mensch	+	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
3892	HA-MRSA	t032	CC22	MRSA	Mensch	+	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
3894	HA-MRSA	t032	CC22	MRSA	Mensch	+	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
4644	HA-MRSA	t065	CC45	MRSA	Mensch	+	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
4596	HA-MRSA	t065	CC45	MRSA	Mensch	+	Ballhausen <i>et al.</i> 2014
4568	HA-MRSA	t065	CC45	MRSA	Mensch	+	Ballhausen <i>et al.</i> 2014

Im Rahmen einer gemeinsamen Publikation wurden die in den Versuchsteilen 4.1 und 4.2 untersuchten 44 MRSA Isolate von Kooperationspartnern mit einem IdentibAC™ DNA-Microarray (Alere, Jena) charakterisiert (Ballhausen *et al.*, 2014). Um den Grad der genetische Ähnlichkeit zwischen den Isolaten zu zeigen und um die phylogenetische Clusterung, gemäß der klonalen Komplexe darzustellen, wurde anhand der DNA-Microarray Hybridisierungsmuster ein Maximum Parsimony Baum erstellt (Abb. 4).

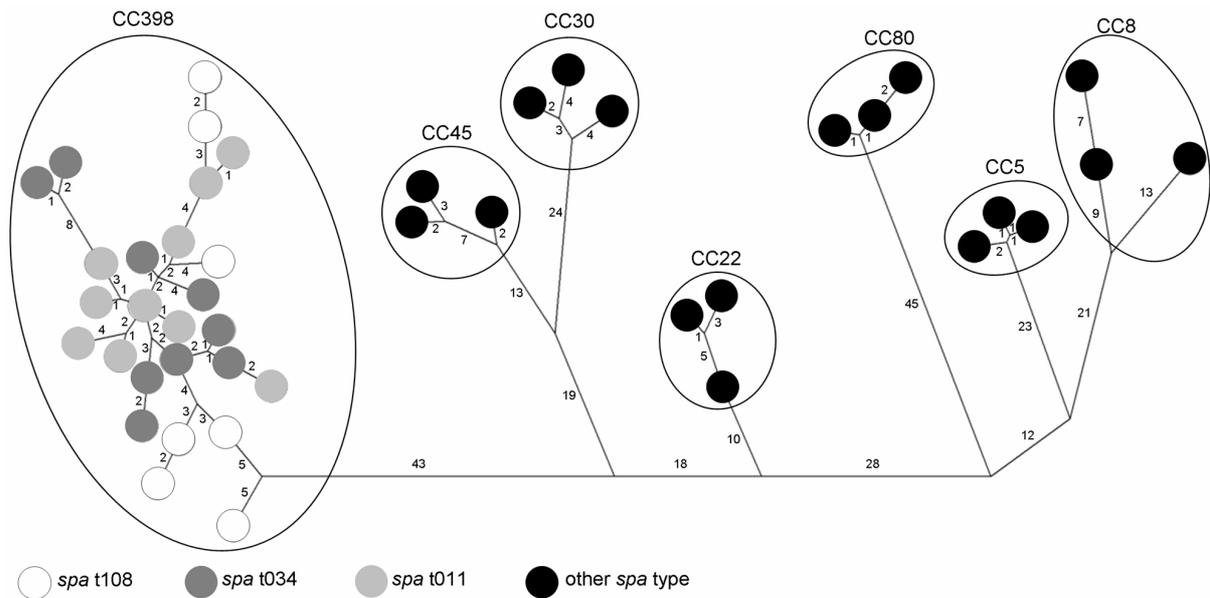


Abb. 4: Maximum Parsimony Baum von 44 MRSA Isolaten.

Der Maximum Parsimony Baum basiert auf den Alere IdentiBAC[®] DNA-Microarray Hybridisierungsmustern von 174 Genen von LA-MRSA CC398 (n = 26), CA-MRSA (n = 9) und HA-MRSA (n = 9). Jeder Punkt repräsentiert ein MRSA Isolat, die Astlängen des Baumes mit den dazugehörigen Zahlen repräsentieren einzelne, unterschiedliche Gene im DNA-Hybridisierungsmuster. Die *spa* Typen der CC398 Linie sind in weiß bzw. in Graustufen, CA-MRSA und HA-MRSA sind in schwarz dargestellt. Die vorkommenden klonalen Komplexe sind durch Kreise gekennzeichnet (Ballhausen *et al.*, 2014).

**Tab. 2: ϕ Saint3 positive/negative *S.aureus* CC398 Isolate mit Typisierungs-
informationen, verwendet in Versuchsteil 4.3.**

Isolat Nr.:	<i>S. aureus</i> Klasse:	<i>spa</i> Typ:	Klonaler Komplex:	Resistenz -muster:	Isolat- quelle:	ϕ Saint3 Status:	Referenz:
07-01429	LA-MRSA	t571	CC398	MSSA	Mensch	+	(Cuny <i>et al.</i> , 2015)
07-01494	LA-MRSA	t034	CC398	MRSA	Mensch	-	(Cuny <i>et al.</i> , 2015)
07-02239	LA-MRSA	t108	CC398	MRSA	Mensch	-	(Cuny <i>et al.</i> , 2015)
08-02710	LA-MRSA	t034	CC398	MSSA	Mensch	-	(Cuny <i>et al.</i> , 2015)
09-00444	LA-MRSA	t011	CC398	MRSA	Mensch	-	(Cuny <i>et al.</i> , 2015)
09-03591	LA-MRSA	t011	CC398	MSSA	Mensch	+	(Cuny <i>et al.</i> , 2015)
10-01386	LA-MRSA	t034	CC398	MSSA	Mensch	+	(Cuny <i>et al.</i> , 2015)
10-S01355	LA-MRSA	t034	CC398	MRSA	Schwein	-	(Cuny <i>et al.</i> , 2015)
11-00530	LA-MRSA	t034	CC398	MRSA	Geflügel	+	(Cuny <i>et al.</i> , 2015)
11-01119	LA-MRSA	t034	CC398	MRSA	Pferd	-	(Cuny <i>et al.</i> , 2015)
11-01189	LA-MRSA	t011	CC398	MRSA	Pferd	-	(Cuny <i>et al.</i> , 2015)

11-01553	LA-MRSA	t034	CC398	MRSA	Pferd	+	(Cuny <i>et al.</i> , 2015)
11-02281	LA-MRSA	t779	CC398	MRSA	Pferd	+	(Cuny <i>et al.</i> , 2015)
11-02407	LA-MRSA	t1451	CC398	MSSA	Mensch	+	(Cuny <i>et al.</i> , 2015)
11-02801	LA-MRSA	t011	CC398	MRSA	Pferd	+	(Cuny <i>et al.</i> , 2015)
11-02802	LA-MRSA	t011	CC398	MRSA	Pferd	+	(Cuny <i>et al.</i> , 2015)
11-S00282	LA-MRSA	t899	CC398	MRSA	Geflügel	+	(Cuny <i>et al.</i> , 2015)
12-S00148	LA-MRSA	t2123	CC398	MRSA	Rind	-	(Jung <i>et al.</i> , 2016)
13-ST00054	LA-MRSA	t011	CC398	MRSA	Geflügel	-	(Jung <i>et al.</i> , 2016)
13-ST00207	LA-MRSA	t1456	CC398	MRSA	Rind	-	(Jung <i>et al.</i> , 2016)

Bei ϕ Saint3 positiven *S. aureus* Isolaten setzt sich das IEC aus einer variierenden Komposition von IEC assoziierten Genen zusammen. Die genaue IEC Zusammensetzung der, in Tabelle 2 dargestellten, Isolate wird im Anhang gezeigt (Tab. 34). Die in Tabelle 3 dargestellten ϕ Saint3-positiven Derivate der Isolate 12-S00148, 13-ST00054 und 13-ST00207 wurden im Rahmen einer gemeinsamen Publikation (Jung *et al.*, 2016) von Kooperationspartnern hergestellt.

Tab. 3: Etablierte *S. aureus* Laborisolate und Mutanten.

Isolat:	Beschreibung:	Referenz:
8325-4	<i>rsbU</i> defizientes NCTC 8325 Derivat	(Novick, 1967)
8325-4 Δpbp4	<i>pbp4</i> Deletionsmutante von 8325-4	(Atilano <i>et al.</i> , 2010)
MW2	hochvirulentes CA-MRSA Isolat	(Baba <i>et al.</i> , 2002)
12-S00148 ϕSaint3	Isolat 12S00148 mit transduziertem ϕ Saint3	(Jung <i>et al.</i> , 2016)
13-ST00054 ϕSaint3	Isolat 13-ST00054 mit transduziertem ϕ Saint3	(Jung <i>et al.</i> , 2016)
13-ST00207 ϕSaint3	Isolat 12S00148 mit transduziertem ϕ Saint3	(Jung <i>et al.</i> , 2016)

2.1.2 Eukaryotische Zelllinien

Tab. 4: Verwendete humane, eukaryotische Zelllinien

Zelllinie:	Relevante Merkmale:	Referenz:
HaCaT	spontan immortalisierte, humane, epidermale Keratinozyten	(Boukamp <i>et al.</i> , 1988)
THP-1	akuten myeloische Leukämie Zelllinie, durch Behandlung mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) zu Makrophagen ausdifferenzierbar	(Tsuchiya <i>et al.</i> , 1980)

2.2 Medien und Medienzusätze

2.2.1 Medien zur Anzucht von Bakterien

Medien zur Anzucht von Bakterien wurden als Fertigprodukt bzw. Fertigmischung vom Hersteller bezogen (Tab. 5). Flüssigmedien wurden gemäß den Herstellerangaben mit H₂O angesetzt und vor der Verwendung autoklaviert. Zur Herstellung von Festmedien wurde 2 % Agar zugesetzt.

Tab. 5: Medien zur Anzucht von Bakterien

Medium:	Hersteller:
Lennox Broth (LB)	Difco [®] , BD (Heidelberg)
Trypticase Soy Agar II (TSA) mit 5% Schafsblut	BD (Heidelberg)
Trypticase Soy Broth (TSB)	Bacto [®] , BD (Heidelberg)

2.2.2 Medien zur Anzucht eukaryotischer Zellen

Medien zur Anzucht eukaryotischer Zellen wurden als Fertigprodukte vom Hersteller bezogen und mit entsprechenden Medienzusätzen supplementiert (Tab. 6).

Tab. 6: Medien zur Anzucht eukaryotischer Zellen

Medium:	Hersteller:
MCDB153 Basal Medium	Biochrom AG (Berlin)
RPMI 1640	Gibco [®] , Invitrogen (Darmstadt)

2.2.3 Medienzusätze

Tab. 7: Medienzusätze für die Anzucht von Bakterien und eukaryotischer Zellen

Medienzusatz:	Hersteller:	Konzentration/Verwendung:
Agar	Bacto [®] , BD (Heidelberg)	2 % in LB bzw. TSB; zur Herstellung von Festmedium zur Bakterienanzucht
Fetales Kälberserum Gold (FCS)	PAA (Cöbel)	10-30 % in MCDB153, RPMI 1640, zur Kultur eukaryotischer Zellen

L-Glutamin	Gibco [®] , Invitrogen (Darmstadt)	1 % in MCDB153 zur Anzucht von HaCaT
Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA)	Gibco [®] , Invitrogen (Darmstadt)	1 % in MCDB153 zur Anzucht von HaCaT
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, (Steinheim)	10 µg/ml in RPMI 1640, zum Ausdifferenzieren von Makrophagen aus THP-1 Suspensionszellen

2.3 Puffer und Lösungen

Verwendete Puffer und Lösungen werden in Tabelle 8 dargestellt. Bei Puffer/Lösungen die als Fertigprodukt bezogen wurden, wird der Hersteller angegeben, bei selbst angesetzten Puffer/Lösungen das Rezept. Die Lösungen wurden gegebenenfalls autoklaviert oder sterilfiltriert. Farbstoffe, Antibiotika und Protein-Lösungen werden gesondert aufgeführt.

Tab. 8: Puffer und Lösungen

Lösung/Puffer:	Hersteller/Rezept:	
Dopamin-Tris Puffer	Dopamin-Hydrochlorid Tris	4 g/l 1,21 g/l ad 1 l H ₂ O ,pH 8,0; sterilfiltrieren
FACS-Clean	BD (Heidelberg)	
FACS-Lysing™	BD (Heidelberg)	
FACS-Puffer	FCS NaN ₃ Stocklösung (1M)	20 ml 5 ml ad 1 l PBS
FACS-Rinse	BD (Heidelberg)	
Formaldehyd-Lösung 16 %	Formaldehyd	16 % ad 1 l H ₂ O
Loading Dye 6x	Fermentas, (St.Leon-Rot)	
Natriumchlorid (NaCl) Lösung 0,9 %	NaCl	9 g ad 1 l H ₂ O, autoklavieren
NaN₃ Puffer (10mM)	NaN ₃	0,65 g ad 1 l PBS
NaN₃ Stocklösung (1M)	NaN ₃	65 g ad 1 l H ₂ O
Phosphat gepufferte Saline	NaCl	80 g/l

(PBS) 10x	KCl	2 g/l
	Na ₂ HPO ₄	14,2 g/l
	KH ₂ PO ₄	2,7 g/l
	ad 1 l H ₂ O, pH 7,2; autoklavieren	
TBE-Puffer	Tris	108 g/l
	H ₃ BO ₃	55 g/l
	EDTA	9,3 g/l
	ad 1 l H ₂ O, pH 8,0	
Tris-EDTA (TE) Puffer	Tris	1,21 g/l
	EDTA	0,37 g/l
	pH 8,0, autoklavieren	

2.4 Antibiotika

Die, in Tabelle 9 gezeigten, Antibiotika wurden als gebrauchsfertige Lösung vom Hersteller bezogen und dienen der Subkultivierung eukaryotischer Zellen bzw. wurden während der Untersuchung des intrazellulären Überlebens verwendet.

Tab. 9: Verwendete Antibiotika

Antibiotika:	Hersteller:	Eingesetzte Konzentration:
Gentamicin (Refobacin)	Merck (Darmstadt)	100 µg/ml in RPMI1640
Penicillin-Streptomycin	Biochrom (Berlin)	100 µg/ml in MCDB153

2.5 Oligonukleotide und Nukleinsäuren

Als Größenstandard für die Agarosegel-Elektrophorese kam der 1kb DNA-Ladder (Invitrogen, Darmstadt) zum Einsatz. Alle in den Tabellen 10 und 11 dargestellten Oligonukleotide dienen als Primer während der Polymerase Kettenreaktion (PCR), der DNA-Sequenzierung und der quantitativen Real-Time PCR (qPCR) und wurden vom Hersteller Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg) bezogen. Die Primer wurden zunächst nach Herstellerangaben mit H₂O LiChrosolv® (Merck, Darmstadt) auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt und bei -20 °C gelagert. Vor der Verwendung wurden sie auf eine Konzentration von 5 pmol/µl verdünnt.

Tab. 10: PCR Primer bzw. Primer für die Sequenzierung

Primer:	Sequenz (5'-3'):
MBH 433	CTTAACTTTTCATTAACCTCGC
MBH 434	CTCCTGTTCTGTTACCTCATC
MBH 435	CAGATGGTAATGGTCAAAATGGTG
MBH 436	CCCGTCAATTTTAGATTGATTATGC
MBH 437	GCTACACAAAATCAAGCAGCAG
MBH 438	GGTTTAACGTAAGCTACATGTGTG
MBH 439	GTC AAGCACAAGGACCAATCG
MBH 440	GTTGACCTTCATTTTGACCAC
MBH 443	GAAGGTAGTGAAATAGTAGGGC
MBH 444	CAGTAATTCCTCGATTGGC
MBH 445	CAAAGGTATTGTAAGTGGCG
MBH 446	GTCATTGAGTATGTAATTATTTCTTGGG
MBH 449	ACACTTACTGGAAATGGTGG
MBH 450	GTTCCAAGTTAGTTGAACTGG
MBH 451	CAGTGTGCCACAAATTCATGG
MBH 452	CTCACTTGGTACCTCTGGTG

Tab. 11: Quantitative Real-Time PCR Primer

Primer:	Sequenz (5'-3'):
<i>asp23</i> forward	CAAGAACAAAATCAAGAGCCTCAAT
<i>asp23</i> reverse	CTTCACGTGCAGCGATACCA
<i>clfA</i> forward	CACAGATATTACGAATCAGTTGACGA
<i>clfA</i> reverse	CCAGAGTCAATACCAACTGTACAT
<i>clfB</i> forward	CGGTGTTGGATCAACTGGATTT
<i>clfB</i> reverse	GGCGGAAGTGCTGATGGT
<i>fnbA</i> forward	TAAACCAGAATGAGAAATATGATGGTTG
<i>fnbA</i> reverse	CCAATCGAGGAAATCACTGAAAAC
<i>fnbB</i> forward	TCTCCACCTGTTTCAGGTAGTTCAG
<i>fnbB</i> reverse	AGTGGCACCAACTAAACAAAAACAA
<i>gyrA</i> forward	GACTGATGCCGATGTGGA
<i>gyrB</i> reverse	AACGGTGGCTGTGCAATA
<i>rnalll</i> forward	AGGAGTGATTTCAATGGCACAAG
<i>rnalll</i> reverse	TGTGTCGATAATCCATTTTACTAAGTCA

2.6 Verwendete Proteine und Enzyme

Tab. 12: Proteine

Protein:	Hersteller:
Bovines Serum Albumin	VWR (Darmstadt)
Bovines Fibronectin	Sigma-Aldrich, (Steinheim)
Humanes Fibrinogen	Sigma-Aldrich, (Steinheim)
Humanes Fibronectin	Sigma-Aldrich, (Steinheim)

Tab. 13: Enzyme

Enzym:	Hersteller:
DNase I	Quiagen (Hilden)
RNaseOUT[®]	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe)
Taq DNA-Polymerase	MP Biomedicals (Eschwege)
Lysostaphin	Genmedics (Reutlingen)
Tryp-LE[®] Express	Invitrogen (Darmstadt)

2.7 Farbstoffe

Tabelle 14 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe. Diese kamen bei der Subkultivierung eukaryotischer Zellen, sowie bei den Zellkultur-Infektionsassays bzw. Vollblut-Infektionsassays zum Einsatz. Die eingesetzten Konzentrationen werden bei den entsprechenden Methode beschrieben.

Tab. 14: Farbstoffe

Farbstoff:	Hersteller:
Carboxyfluorescein diacetate succinimid ester (CFDA-SE)	Invitrogen (Darmstadt)
Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	Invitrogen (Darmstadt)
4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma-Aldrich, (Steinheim)
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Power SYBR[®] Green PCR Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt)
SYBR[®] Gold Nucleic Acid Gel Stain	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe)
Trypanblau	Biozym (Oldendorf)

2.8 Reagenzsysteme (Kits)

Tab. 15: Reagenzsysteme

Reagenzsystem:	Hersteller:
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG (Waldbronn)
FastStart High Fidelity PCR System	Roche (Mannheim)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
Maxwell[®]16 Buccal Swab DNA Purification Kit	Promega (Madison, USA)
Mycoplasmen-PCR-Detektions Kit Venor[®] GeM	Minerva Biolabs (Berlin)
NucleoSpin[®] RNA II Mini Kit	Machery-Nagel (Düren)
Power SYBR[®] Green Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt)
QiaQuick[®] PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Turbo-DNA free[™]	Ambion (Woodward Austin, USA)

2.9 Laborgeräte und Systeme

Tab. 16: Laborgeräte und Systeme

Laborgerät/System:	Hersteller:
ABI PRISM 7000	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe)
Axiovert 10 Mikroskop	Zeiss (Oberkochen)
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies Deutschland GmbH (Waldbronn)
BioScope Catalyst Rasterkraftmikroskop-System Aufbau auf Leica DMI4000B	Bruker (Santa Barbara, USA)
C4880-80 Multi-Format CCD Kamera	Hamamatsu (Herrsching am Ammersee)
CellCounter TC20	BioRad (München)
Countess[™] Automated Cell Counter	Invitrogen (Darmstadt)
DFC420 CCD Kamera	Leica (Wetzlar)
DMI4000B Fluoreszenzmikroskop	Leica (Wetzlar)
Elektrophorese-Kammer	von Keutz Labortechnik (Reiskirchen)
Elektrophoresis Power supply	Bio-Rad (München)
Eppendorf Research Fix[®] Pipettensatz	Eppendorf (Hamburg)
FacsCalibur[™] Durchflusszytometer	BD (Heidelberg)
GeneAmp PCR 9700 Thermocycler	Applied Biosystems (Darmstadt)
GeneQuant pro 1300 Spectrophotometer	Biochrom (Berlin)
GeneQuant pro Spectrophotometer	Biochrom (Berlin)

GFL 1004 Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Hera Safe II Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe)
HeraCell150i Inkubator	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe)
Heraeus B5042E	Willi Fischer KG Laboratoriumsbedarf (Frankfurt)
Labsonic 1510 Ultraschallsonde	B.Braun Melsung AG (Melsung)
Magnetrührer	IKA (Staufen)
Maxwell[®] MDx 16	Promega (Madison, USA)
Mettler AE100 Feinwaage	Mettler (Gießen)
MilliQ[™] Synthesis A10	Millipore (Billerica, USA)
Multitron Schüttelinkubator	Infors (Bottmingen, Schweiz)
Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe)
PC 4400 deltarange	Mettler (Gießen)
PHM220 pH-Meter	Radiometer, Meterlab (Meckenheim)
PIPETBOY acu 2	INTEGRA Biosciences AG (Zizers, Schweiz)
Ribolyser FastPrep FP120	ThermoSavant (Heidelberg)
Sputter Coater S150B	Edwards (Sussex, UK)
Thermoblock comfort	Eppendorf (Hamburg)
Thermocycler GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems (Darmstadt)
Transferpette[™] S	Brand Laborbedarf GmbH + CO KG (Wertheim)
UV/Ozone Pro Cleaner[™]	BioForce Nanosciences (Ames, USA)
Varioklav	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe)
Vortexmixer VV3	VWR (Darmstadt)
Wallac 1420 Victor² Multilabel Counter	Perkin-Elmer (Waltham, USA)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Sigma 4K15	Sigma Laborzentrifugen GmbH (Osterode)
Zentrifuge Universal 32R	Hettich (Tuttlingen)

2.10 Messsonden für die Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie

Tabelle 17 listet die Messsonden auf, die in dieser Arbeit für die Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie Experimenten verwendeten wurden. Alle Messsonden wurden vom Hersteller Bruker AFM Probes (Camillo, USA) bezogen. In der Tabelle werden die vom Hersteller angegebenen Federkonstanten der Messsonden gezeigt. Diese dienen lediglich als Richtwerte, zur Auswahl geeigneter Messsonden für die jeweilige Anwendung. Im Rahmen der Experimente wurden die individuellen Federkonstanten, experimentell durch die Thermal Tune

Technik (Hutter und Bechhoefer, 1993) bestimmt und für die Auswertungen der Kraft-Distanz-Kurven und Elastizitätskarten verwendet. Die Optische Sensitivität, d.h. der, von der Laser Positionierung abhängige, Zusammenhang zwischen der Messsonden-Auslenkung und des Signals auf dem optischen Sensor wurde, während des Aufpressens der Sonde auf eine harte Oberfläche (Glasobjektträger), kalibriert.

Tab. 17: Messsonden

Messsonde:	Material:	Federkonstante [N/m]:	Spitzenradius [nm]:
SNL-10 B	Siliziumnitrid	0,12	2
SNL-10 D	Siliziumnitrid	0,06	2
Scan Asyst Fluid	Siliziumnitrid	0,7	20
ScanAsyst Fluid +	Siliziumnitrid	0,7	2

2.11 Software

Tab. 18: Software

Software:	Hersteller:
ABI PRISM[®] 7000 SDS 1.2.3	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe)
Agilent 2100 Expert Software	Agilent Technologies Deutschland GmbH (Waldbronn)
CellQuest Pro[®]	BD (Heidelberg)
Nanodrop 2000 operation software v1.6	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe)
Nanoscope Analysis v1.4	Bruker (Santa Barbara, USA)
NanoScope v8.11	Bruker (Santa Barbara, USA)
Office[®] 2010/2011	Microsoft (Redmond, USA)
R v3.2	R foundation for statistical computing (Wien, Östereich)
SigmaPlot[®] -SigmaStat[®] v10/11	Systat Software GmbH (Erkrath)
Wallace 1420 Manager	Perkin-Elmer (Waltham, USA)

2.12 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle übrigen Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von den Herstellern: Applichem (Darmstadt), BioRad (München), Carl-Roth GmbH (Karlsruhe), Eppendorf (Hamburg), Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz), MAST Diagnostica (Reinfeld), MBI Fermentas (Vilnius, Litauen), Merck KG (Darmstadt), Merck Millipore (Billerica, USA), Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen), Serva Feinbiochemie GmbH & Co (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Die verwendeten Einweg-Kunststoffwaren stammten von den Herstellern: Greiner (Frickenhausen), Eppendorf (Hamburg), Sarstedt, (Nümbrecht), Sigma-Aldrich, (Steinheim) oder TTP-AG (Trasadingen, Schweiz).

3 Methoden

3.1 Kultivierung und Kryokonservierung von Bakterien

Die Kultivierung der untersuchten Bakterienisolate in Flüssigmedium erfolgte bei 37 °C und 150 UpM, in einem Multitron Schüttelinkubator (Infors, Bottmingen, Schweiz). Die Kultur wurde dabei in Schüttelkolben, mit einem Volumen:Medien Verhältnis von 10:1, oder alternativ in Reagenzgläsern mit 3 ml Medium inkubiert. Zum Beimpfen diente entweder eine Kultur auf Festmedium, oder alternativ eine Vorkultur in Flüssigmedium. Beim Beimpfen von Festmedium wurden wenige Kolonien mit einer sterilen Einweg-Impföse ins Medium eingerührt. Beim Beimpfen aus einer Vorkultur wurde das Medium mit Kulturbrühe entsprechend einer Optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) von 0,05 supplementiert.

Zur Kultivierung auf Festmedium wurden wenige Kolonien bzw. ein Abstrich aus einer Kryokultur gemäß dem Prinzip eines Drei-Ösen-Ausstriches auf der Platte ausgebracht. Die Kultivierung erfolgte in der Regel über Nacht, auf Trypticase Soy Agar (TSA), oder alternativ auf TSA mit 5% Schafsblut (BD, Heidelberg), bei 37 °C in einem Hereaus B5042E Inkubator (Willi Fischer KG, Frankfurt).

Für die Kryokonservierung der verwendeten Bakterienisolate dienten Über-Nacht Kulturen in Flüssigmedium. Dazu wurden 500 µl Kulturbrühe mit 500µl einer sterilen, 50 % Glycerin-Lösung versetzt, in Nunc® Cryo Tubes (Sigma-Aldrich, Steinheim) überführt und bei -70 °C gelagert. Alternativ wurde zur Kryokonservierung das Cryobank™ System (MAST Diagnostica, Reinheim), gemäß den Herstellerangaben verwendet.

3.2 Kultivierung und Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Zur Inkulturnahme eukaryotischer Zellen aus einer Kryokultur, wurde das Kryogefäß erst bei Raumtemperatur und anschließend im Wasserbad (GFL 1004, GFL, Burgwedel) auf 37 °C erwärmt. Die Viabilität und Zellzahl der Kultur wurde durch eine Trypanblau-Färbung und automatisierte Zellzählung mit einem CellCounter TC20 (BioRad, München) oder einem Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen, Darmstadt) bestimmt. Im Anschluss wurde die aufgetaute Kryokultur mit dem

entsprechenden Zellkulturmedium, inklusive Medienzusätze (Tab. 7), vermischt und in einem HeraCell150i Inkubator (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe) bei 37 °C und einer 5 % CO₂ Atmosphäre weiter kultiviert.

Um Kontaminationen durch Mycoplasmen auszuschließend, wurden beide Zelllinien regelmäßig im Abstand von ca. 8 Wochen mit dem Mycoplasmen-PCR-Detektions Kit Venor[®] GeM (Minerva Biolabs, Berlin) gemäß den Herstellerangaben getestet. Die anschließende Dokumentation erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese.

Zur Subkultivierung eukaryotischer Zellen wurde ein Kultur mit einer Viabilität < 95 % gesplittet. Da es sich bei der Zelllinie THP-1 (zunächst) um eine Suspensions-Zelllinie und bei HaCaT um eine adhärenente Zelllinie handelt, mussten beide Linien auf unterschiedliche Weise kultiviert werden:

Kultivierung von THP-1:

Nach der Bestimmung der Viabilität und Zellzahl (siehe oben), wurde die Kultur in ein steriles 50 ml Schraubröhrchen (Greiner, Frickenhausen) überführt und für 5 min bei 1400 g zentrifugiert (5810R, Eppendorf, Hamburg) um die Zellen zu sedimentieren. Im Anschluss wurde das verbrauchte Zellkulturmedium im Überstand abgenommen und durch neues RPMI1640 (Biochrom AG, Berlin), inklusive der Medienzusätze (Tab. 7), ersetzt. Dabei wurde die gewünschte Zellkonzentration zur Subkultivierung (üblicherweise $2,5 \cdot 10^5$) im Medium eingestellt. Danach wurde die Zellsuspension in belüftete 10 ml Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt und wie oben beschrieben inkubiert. Die Subkultivierung erfolgte üblicherweise alle 2-3 Tage.

Beim Assay zur Bestimmung des intrazellulären Überlebens von LA-MRSA CC398 wurden die THP-1 Zellen, durch Zugabe von 10 µg/ml PMA (Sigma-Aldrich, Steinheim) zu Makrophagen ausdifferenziert. Dadurch adhärerten diese am Boden des Kulturgefäßes. Die Induktion mit PMA erfolgte beim Aussäen der THP-1 Zellen in 24-Well-Platten (TPP-AG, Trasadingen, Schweiz), am Vortag des Assays. Das weitere Vorgehen wird bei der Methodenbeschreibung des Assays erklärt (Abschnitt 3.6).

Kultivierung von HaCaT:

Die Kultivierung der adhärenenten Zelllinie HaCaT erfolgte in Kulturschalen mit 95 mm Durchmesser (TPP-AG, Trasadingen, Schweiz). Das Splitten erfolgte in der Regel, sobald die Zellen eine konfluente bzw. subkonfluente Monolage am Boden der

Kulturschale gebildet hatten. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 5 ml 1x PBS gewaschen. Danach wurde die HaCaT Monolage, zu Ablösen der Zellen, mit 2 ml Tryp-LE® Express (Invitrogen, Darmstadt) überschichtet und für 15 min im Inkubator belassen. Nach Ablauf der 15 min wurden die Kulturschale mikroskopisch hinsichtlich einer vollständigen bzw. nahezu vollständigen Ablösung der Zellen, überprüft und die Zellen in ein steriles 50 ml Schraubröhrchen überführt. Im Anschluss wurde analog zur Subkultivierung der THP-1 Zellen, die Zellzahl und Viabilität bestimmt, die Zellen abzentrifugiert, das verbrauchte MCDB153 Medium gegen neues Medium inklusive Medienzusätze (Tab. 7) ausgetauscht und die gewünschte Zellzahl zur Subkultivierung (üblicherweise $2 \cdot 10^5$) eingestellt. Alternativ wurden beim Splitten die Kultur im Verhältnis 1:3 oder 1:5 verdünnt d.h. die Zellen aus einer bewachsen Kulturschale auf 3 bzw. 5 Schalen aufgeteilt ohne die Zellzahl zu berücksichtigen. In der Regel wurde dem MCDB153 Medium eine Penicillin-Streptomycin Lösung (Biochrom, Berlin) mit einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben (Tab. 9) um Kontaminationen zu vermeiden. Zur Verwendung im Zellkultur-Adhäsionsassay, wurden die Zellen am Vortag des Assays in 96-Well-Platten ausgesät (Greiner, Frickenhausen). Dabei wurde auf die Zugabe der Penicillin-Streptomycin Lösung verzichtet. Der weitere Ablauf des Assays wird in der dazugehörigen Methodenbeschreibung erklärt (Abschnitt 3.3).

Zur Kryokonservierung beider Zelllinien wurde, wie bereits oben beschrieben, eine Zellzahl von $2 \cdot 10^6$ oder höher eingestellt. Anschließend wurden die Zellen in, auf 4 °C vortemperiertem, Einfriermedium, bestehend aus 60 % RPMI1640 bzw. MCDB153, 30 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen und über Nacht bei -70 °C eingefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

3.3 Zellkultur Adhäsionsassay

Zur Untersuchung der Adhäsionskapazität von *S. aureus* Isolaten an HaCaT-Zellen, wurden am Vortag des Assays jeweils 50 µl einer Zellsuspension, mit $6 \cdot 10^5$ Zellen/ml, in den Wells einer schwarzen, sterilen 96-Well-Platte mit Flachboden (Greiner, Frickenhausen) ausgesät. Zur Mikroskopischen Kontrolle wurde dieselbe

Zellsuspension parallel in einigen Wells einer klaren, sterilen 96-Well-Platte mit Flachboden ausgebracht. Demnach wurden pro Well $3 \cdot 10^4$ Zellen ausgesät, was in der Regel ausreichte um über Nacht eine konfluente Monolage am Boden des Wells bilden zu können. Am Tag des Assays wurden Flüssigkulturen der zu untersuchenden Isolate in 3 ml TSB in Reagenzgläsern angelegt und für 3 h wie bereits oben beschrieben inkubiert. Zum Beimpfen dienten 20 µl Kulturbrühe einer Übernachtkultur des jeweiligen Isolates in TSB. Das entsprach in der Regel einer OD_{600} von 0,05 in der 3 h Kultur. Nach der 3-stündigen Inkubation wurde 1 ml Kulturbrühe in ein 1,5 ml Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt und für 1 min bei 12.000 g zentrifugiert (5417R, Eppendorf, Hamburg oder Universal 32R, Hettich, Tuttlingen), um die Bakterien zu pelletieren. Im Folgenden wurden die Bakterienpellets durch wiederholtes zentrifugieren und resuspendieren zweimal in 1xPBS gewaschen. Um die spätere Detektion der *S. aureus* Isolate zu ermöglichen, wurden die Bakterien mit dem DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Steinheim) markiert. Dazu wurden die gewaschenen Kulturen in 1 ml einer 1 µg/ml Hoechst-Lösung resuspendiert, für 15 min bei 1000 UpM im Heizblock (Thermoblock comfort, Eppendorf, Hamburg) inkubiert und im Anschluss erneut dreimal mit 1xPBS gewaschen. Danach wurde die OD_{600} der gefärbten Bakteriensuspensionen bestimmt (GeneQuant pro Spectrophotometer/ GeneQuant pro 1300 Spectrophotometer, Biochrom Berlin) und durch Verdünnen mit 1xPBS, auf einen Faktor von 1 eingestellt.

Nachdem die Wells mit jeweils 200 µl 1xPBS und anschließend 200 µl MCDB153 (ohne Medienzusätze) gewaschen worden waren, wurden jeweils 50 µl der gefärbten Bakteriensuspension in die Wells pipettiert. Dies erfolgte mit drei bzw. sechs Wiederholungen pro Isolat. Im Anschluss wurde die 96-Well-Platte für 30 min bei Zellkultur-Bedingungen inkubiert. Nach Ablauf der 30 min, wurde die Platte dreimal mit 1xPBS gewaschen, um die nicht-adhärenenten Bakterien zu entfernen. Dabei wurden jeweils 50 µl 1xPBS in den Wells belassen. Unmittelbar vor der Messung der Fluoreszenzintensität wurden 50 µl der gefärbten Bakteriensuspension als Referenz in, noch leere Wells der 96-Well-Platte pipettiert. Auch dies erfolgte mit drei bzw. sechs Wiederholungen. Als Negativkontrolle wurden 50 µl 1xPBS, an Stelle von Bakteriensuspension, in die Wells gegeben. Die Messung wurde mit einem Wallac 1420 Victor² Multilabel Counter (Perkin-Elmer, Waltham, USA) im Fluoreszenzprogramm (Filterpaar: 355 Kurzpass, 460 Langpass) durchgeführt. Dabei wurde

jedes Well für 0,1s belichtet. Bei der Auswertung wurden die Werte der Adhäsionskapazität in Relation zur Referenz betrachtet und als Prozent der eingesetzten Bakterienmenge angegeben. Die Werte der Negativkontrolle wurden dabei als Hintergrund von allen anderen Werten subtrahiert.

In Versuchsteil 4.1.6 wurde die Adhäsionskapazität an HaCaT Zellen bei verschiedenen Salzkonzentrationen bestimmt, um den Einfluss des Turgordrucks auf die Adhäsionsfähigkeit von *S. aureus* zu untersuchen. Dazu wurden die HaCaT-Zellen vor Beginn des Experimentes fixiert indem 50 µl einer 16 % Formaldehyd-Lösung in jedes Well pipettiert, für 15 Minuten inkubiert und der Überstand aus den Wells abgenommen wurde. Im Anschluss wurden die Wells getrocknet und vor Versuchsbeginn mit der NaCl-Lösung der gewünschten Konzentration (0,15 mol/l bzw. 1,5 mol/l) rekonstituiert. Danach wurde das Adhäsionsassay wie oben beschrieben durchgeführt, dabei wurde die NaCl-Lösung analog zu 1xPBS verwendet.

3.4 Protein-Wirtsfaktor Adhäsionsassay

Zunächst wurden, analog zur Vorgehensweise des Zellkultur Adhäsionsassays, 3 h Kulturen der zu testenden Bakterienisolate in TSB angesetzt. Parallel wurde eine schwarze 96-Well-Platte mit Flachboden mit dem Wirtsfaktor (im Rahmen dieser Arbeit humanes/bovines Fibronectin, humanes Fibrinogen) ge-coated, indem jeweils 50 µl einer 40 µg/ml Lösung in die Wells gegeben und für 1 h inkubiert wurde. Nach der Inkubationszeit wurden jeweils 200 µl einer 6 % Bovines Serum Albumin (BSA) Lösung in die Wells pipettiert und erneut für 1 h inkubiert, um eine spätere, unspezifische Adhäsion der Bakterien an das Plastik der 96-Well-Platte zu blocken. Im Anschluss an das Blocken, wurden die Wells dreimal mit je 200 µl 1xPBS gewaschen um überschüssigen gelösten Wirtsfaktor und BSA zu entfernen. Dabei wurden jeweils 50 µl 1xPBS in den Wells belassen.

Nach der dreistündigen Kultur der Bakterien wurde je 1 ml Kulturbrühe in 1,5 ml Röhren überführt und dreimal mit 1xPBS gewaschen. Die OD₆₀₀ der Bakteriensuspension wurde bestimmt und auf den Faktor 0,25 verdünnt. Anders als beim Zellkultur Adhäsionsassay, wurden die *S. aureus* Isolate nicht im Vorfeld gefärbt, sondern es wurden 50 µl verdünnte, ungefärbte Bakteriensuspension in die

Wells gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Wells dreimal mit je 200 µl 1xPBS gewaschen um nicht-adhärenente Bakterien zu entfernen, dabei wurden bei jedem Waschschrift 50 µl 1xPBS in den Wells belassen. Die in den Wells verbleibenden adhärenente Bakterien wurden fixiert, indem 200 µl einer 70 % Methanol-Lösung (in H₂O) zugegeben und die Platte für 15 min inkubiert wurde. Danach wurden die Wells erneut mit 200 µl 1xPBS gewaschen und es wurden 50 µl einer 1 µg/ml DAPI-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim) in die Wells gegeben und für 15 min inkubiert, um die adhärenente Bakterien fluoreszent zu markieren. Vor der Messung der Fluoreszenzintensität wurden die Wells von neuem dreimal mit jeweils 200 µl 1xPBS gewaschen um überschüssigen, ungebundenen Farbstoff zu entfernen. Als Negativkontrolle dienten Wells mit 1xPBS, an Stelle von Bakteriensuspension. Die Messung erfolgte, analog zur Vorgehensweise des Zellkultur Adhäsionsassays, mit einem Wallac 1420 Victor² Multilabel Counter, mit dem Filterpaar: 355 Kurzpass, 460 Langpass und einer Belichtungszeit von 0,1s. Die Ergebnisse wurden in Relativen Lichteinheiten (engl. Relative Light Units, RLU) angegeben, die Werte der Negativkontrolle wurden dabei von allen anderen Werten subtrahiert.

In Versuchsteil 4.1.6 wurde die Adhäsionskapazität an humanes Plasma Fibronectin bei verschiedenen Salzkonzentrationen bestimmt um den Einfluss des Turgordrucks auf *S. aureus* zu untersuchen. Dazu wurde eine 0,15 mol/l bzw. 1,5 mol/ NaCl Lösung analog zu 1xPBS eingesetzt.

3.5 Vollblut Phagozytose Assay

Zur Bestimmung der Phagozytoserate von *S. aureus* Isolaten durch PMN, wurden Übernachtskulturen in TSB verwendet. 1 ml Kulturbrühe wurde in 1,5 ml Röhrchen überführt, 1 min bei 12.000 g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 1xPBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Bakteriensuspension erneut zentrifugiert, in 1 ml 500 µM CFDA-SE bzw. CFSE Lösung (Invitrogen, Darmstadt) aufgenommen und für 15 min bei 37 °C im Heizblock inkubiert, um die Bakterien zu fluoreszent zu markieren. Danach wurde die Fluoreszenz-markierte Bakteriensuspension dreimal mit je 1 ml 1xPBS gewaschen und die OD₆₀₀ wurde bestimmt. Im Anschluss wurde eine Bakteriensuspension mit einer OD₆₀₀ eingestellt

die einer Mol von ca. 50 (Versuchsteil 4.2.1) bzw. 100 (Versuchsteil 4.3.1) in Relation der Anzahl an PMN im Vollblut entsprach. Um die Konzentration der PMN und anderer Immunzellen im Vollblut der Spender zu bestimmen, wurden von Kooperationspartnern im Rahmen einer gemeinsamen Publikation (Jung *et al.*, 2016) Hämatogramme des verwendeten Vollbluts durchgeführt. Dazu kam ein XE-5000 Hämatologie-Systems (Sysmex Europe GmbH, Norderstedt) nach den Protokollen des Herstellers zum Einsatz.

Die im Vorfeld der Experimente durchgeführte Bestimmung der Kolonien bildenden Einheiten (KbE) der gefärbten Bakteriensuspension zeigte, dass eine OD₆₀₀ von 1 etwa $2 \cdot 10^8$ *S. aureus* Zellen entspricht. Die Konzentration der Bakteriensuspension wurde anhand der OD₆₀₀ so eingestellt, dass bei der späteren Inokulation bei jedem der Isolate einheitlich ein Volumen von 50 µl zum Vollblut gegeben werden konnten.

Das Vollblut vom Menschen, das im Rahmen der Experimente dieser Arbeit verwendet wurde, stammte von insgesamt sieben gesunden Spendern beider Geschlechter und wurde mit Hilfe des Safety-Multifly[®] Schlauch-Kanülen Sets, sowie S-Monovette[®] 9 ml Lithium-Heparin Blutentnahme-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) entnommen. Das Blut vom Schwein und Pferd wurde von örtlichen Schlachthöfen bezogen und wurde, unter Verwendung derselben Blutentnahme-Röhrchen, aus der Ohrvene bzw. Drosselvene entnommen bzw. direkt bei der Schlachtung in die Blutentnahme-Röhrchen abgefüllt. Je 1 ml antikoaguliertes Vollblut wurde in 1,5 ml Röhrchen überführt, mit 50 µl gefärbter Bakteriensuspension inokuliert und für insgesamt 60 min bei 37 °C und 1000 UpM inkubiert.

Parallel wurde in Polystyrol-Rundboden Röhrchen je 1 ml FACS-Lysing[™] (BD, Heidelberg) vorgelegt. Je 200 µl Proben des infizierten Vollbluts wurden nach 15 min, 30 min und 60 min in die Rundboden-Röhrchen gegeben und für mindestens 15 min bei Raumtemperatur inkubiert um die Erythrozyten zu lysieren. Im Anschluss wurden die infizierten und lysierten Blutproben für 5 min bei 450 g zentrifugiert (Sigma 4K15, Sigma-Laborzentrifugen GmbH Osterode). Der Überstand wurde abgenommen und 200 µl FACS-Puffer wurden zu den Proben gegeben. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines FacsCalibur[™] Durchflusszytometers (BD, Heidelberg). Dabei wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) pro Zelle der Monozyten, Lymphozyten und PMN Fraktionen, mit einem 530 nm Bandpass Filter gemessen und dadurch die individuelle Phagozytoserate, mit der die Fluoreszenz-gefärbten Bakterien aufgenommen worden waren, bestimmt. Im Ergebnisteil wird lediglich die

Phagozytoserate durch PMN dargestellt. Als Negativkontrollen dienten Nicht-Lysiertes Vollblut, sowie lysiertes Vollblut ohne die Zugabe von Bakterien.

Der Assay wurde in den Versuchsteilen 4.2.1 und 4.3.1 mit anderen Farbstoffvarianten durchgeführt. Während bei den Experimenten des Versuchsteils 4.2.1 CFDA-SE verwendet wurde, kam bei Versuchsteil 4.3.1 CFSE zum Einsatz. Während CFDA-SE über eine gute Membrangängigkeit verfügt und somit im Inneren der Zelle akkumuliert wird, färbt CFSE lediglich die extrazellulären Proteine der Bakterienzelle an. Demnach konnten bei der Färbung mit CFDA-SE verglichen mit CFSE-Färbung insgesamt höhere Fluoreszenzsignale erwartet werden.

3.6 Assay zur Bestimmung des intrazellulären Überlebens in Makrophagen

Zur Bestimmung des intrazellulären Überlebens von LA-MRSA CC398 Isolaten wurden THP-1 Suspension Zellen, wie bereits in Abschnitt 3.2 beschrieben, mit PMA induziert um die Ausdifferenzierung in Makrophagen bzw. Makrophagen ähnliche Zellen herbeizuführen (Tsuchiya *et al.*, 1980). Am Vortag des Assays wurden 500 µl Zellsuspension mit $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in einer sterilen 24-Well-Platte (TPP-AG, Trasadingen, Schweiz) ausgesät. Die Bestimmung des intrazellulären Überlebens erfolgte in Duplikaten. Außerdem wurde für jedes Isolat bzw. für jeden Zeitpunkt der Probenahme ein weiteres Well, zur Bestimmung der Zellzahl der Makrophagen eingeplant. Zur Bestimmung der Zellzahl und Viabilität der Makrophagen, wurden die Wells mit 500 µl 1xPBS gewaschen, 200 µl Tryp-LE® Express wurden zugegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 800 µl RPMI1640 inklusive 10 % FCS zugegeben und die Zellzahl wurde, wie bereits im Abschnitt 3.2 beschrieben, mit einem automatisierten CellCounter bestimmt.

Am Versuchstag wurde das Medium der 24-Well-Platte abgenommen. Die Wells wurden mit je 500 µl 1xPBS gewaschen und 500 µl neues RPMI1640, inklusive Medienzusätze, wurde in die Wells pipettiert. Im Experiment kamen 3 h alte *S. aureus* Kulturen in TSB zum Einsatz, die, wie bereits im Abschnitt 3.3 beschrieben, aus einer Übernachtskultur angeimpft wurden. Nach der Messung der OD₆₀₀ wurde die Bakteriensuspension so verdünnt, dass sie mit einer Mol von 30 und in einem für jedes Isolat einheitlichen Volumen von 50 µl pro Well zu den Makrophagen gegeben werden konnten. Parallel zur Inokulation wurden die KbE einer Verdünnungsreihe

der eingesetzten Bakteriensuspension bestimmt, indem 100 µl auf TSA ausplattiert und am nächsten Tag ausgezählt wurden. Vor der Zugabe der Bakteriensuspension wurden die Bakterienzellen durch eine Sonifizierung von 10 s bei 50 W vereinzelt (Labsonic 1510 Ultraschallsonde, B. Braun Melsung AG, Melsung). Nach der Inokulation wurde die 24-Well-Platte für 5 min bei 1000 g zentrifugiert, um die Bakterienzellen mit den Makrophagen in Kontakt zu bringen und für 60 min bei Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde dem Medium Gentamicin (Merck, Darmstadt) und Lysostaphin (Genmedics, Reutlingen) mit einer Konzentration von 100 µg/ml bzw. 20 µg/ml zugesetzt, um Bakterien, die nicht von den Makrophagen aufgenommen worden waren, abzutöten.

Bei den Probenahmen wurden die Wells mit 500 µl 1xPBS gewaschen und für 60 min mit frischem RPMI1640 mit Gentamicin und Lysostaphin bei Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach der Inkubation wurde die 24-Well-Platte geschwenkt und 100 µl des Überstandes wurden entnommen und mittels KbE-Bestimmung auf eine vollständige Abtötung der extrazellulären Bakterien im Antibiotika-haltigen Kulturmedium hin überprüft. Anschließend wurden die Wells erneut mit 500 µl 1xPBS gewaschen, 200 µl Tryp-LE[®] Express wurden zugegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 800 µl RPMI1640 inklusive Medienzusätze in die Wells pipettiert und dabei der Boden und Wände der Wells mit dem Medium gespült um eine vollständige Ablösung der infizierten Makrophagen zu gewährleisten. Die abgelöste Zellsuspension wurde in 1,5 ml Röhrchen überführt, die Makrophagen durch eine Sonifizierung (2x 10 s bei 50 W) aufgeschlossen und die Zahl der aus dem Makrophagen-Lysat rückgewonnenen Bakterien, durch eine KbE-Bestimmung einer Verdünnungsreihe des Lysats, ermittelt.

Die erste Probenahme erfolgte direkt im Anschluss der Gentamycin und Lysostaphin-Behandlung, zur Bestimmung der Aufnahmezeit zu Beginn des Experimentes. Weitere Probenahmen wurden nach 2, 4, 6, 14 und 23 h, zur Bestimmung der intrazellulären Überlebensrate durchgeführt. Bei jeder Probenahme wurden die Zellzahl und Viabilität der Makrophagen, wie bereits oben beschrieben, überprüft. Die Zellzahl lag konstant bei ca. $4 \cdot 10^5$ Makrophagen/Well; die Viabilität lag bei mindestens 87 % lebender Zellen.

3.7 Bestimmung der Hämolyseaktivität von *S.aureus* Kulturüberständen

Die Bestimmung der Hämolyseaktivität wurde, gemäß der von Nilsson und Kollegen beschriebenen Methode, durchgeführt (1999). Dazu wurden Übernachtkulturen der *S. aureus* Isolate in TSB verwendet. Die OD₆₀₀ der Kulturbrühe wurde bestimmt und mit frischem TSB auf einen Faktor von 10 eingestellt und sterilfiltriert (Porengröße des Filters 0,2 µm). Von der sterilfiltrierten Kulturbrühe der zu testenden Stämme, wurden jeweils 100 µl in die Reihe 1 einer klaren, sterilen 96-Well-Platte mit Rundboden pipettiert und anschließend durch serielle Verdünnungen mit je 100 µl 0,9 % NaCl Lösung bis zu Reihe 12 der Platte verdünnt. Dadurch entstanden Kulturüberstand-Verdünnungsstufen von 2 bis 2048.

In einem nächsten Schritt wurden 250 µl Vollblut vom Menschen, Pferd oder Schwein für 5 min bei 4000 g zentrifugiert um das Plasma und die Erythrozyten zu trennen (zur Entnahme und Quelle des Vollbluts; vergl. Abschnitt 3.5). Anschließend wurde das Plasma verworfen und das Erythrozyten-Pellet mehrfach mit 1 ml 0,9 % NaCl Lösung gewaschen bis der Überstand klar war und keine Färbungen mehr, durch Reste des gelblich bis orangenen Plasmas, zu erkennen waren. In der Regel wurde das Pellet drei- bis fünfmal gewaschen. Danach wurde die Erythrozyten-Suspension um den Faktor 1:10 mit 0,9 % NaCl Lösung verdünnt und jeweils 100 µl wurden in die Wells mit verdünntem, bakteriellen Kulturüberstand gegeben. Je nach individueller Hämolyseaktivität des Kulturüberstandes, wurden die Erythrozyten bei einer unterschiedlichen Verdünnungsstufe lysiert. Dies führte dazu, dass die Wells der entsprechenden Verdünnungsstufe klar wurden. Die Erythrozyten einer höheren Verdünnungsstufe blieben intakt, sammelten sich am Grund des Rundboden der Wells und waren dort als Pellet zu erkennen. Somit konnten der Hämolysetiter anhand der Erythrozyten-Pellets ausgezählt werden. Der CAMP Test (Christie, Atkins, Munch-Petersen) wurde nach Christie *et al.*, 1944, in Kokultur mit *Streptococcus agalactiae* durchgeführt. *S. aureus* β-Hämolysin führt, in Verbindung mit dem Hämolysemuster von *S. agalactiae*, zu vollständigen Hämolysehöfen auf Blutagar. Dadurch können β-Hämolysin produzierende *S. aureus* Isolate nachgewiesen werden. Die entstandenen Höfe mit vollständiger/nicht vollständiger Hämolyse wurden photographisch dokumentiert.

3.8 Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie

3.8.1 Adhäsionskraft-Spektroskopie mit humanem Fibronectin

Die Adhäsionskraft-Spektroskopie wurde mit Hilfe eines BioScope Catalyst Rasterkraftmikroskop-Systems, aufgebaut auf einem Leica DMI4000B Fluoreszenzmikroskop (Bruker, Santa Barbara, USA/ Leica, Wetzlar) durchgeführt. Zur Funktionalisierung der verwendeten SNL-10 B Messsonden (Bruker AFM Probes, Camillo, USA), wurden diese zunächst für 15 min in einem UV/Ozone Pro Cleaner™ (BioForce Nanosciences, Ames, USA) gereinigt und danach mit Hilfe eines Sputter Coater S150B (Edwards, Sussex, UK) mit einer 10 nm dicken Lage aus Chrom und anschließend einer 60 nm dicken Goldlage beschichtet. Unmittelbar nach der Beschichtung wurden die Messsonden für 60 min in einen Tropfen 10 µg/ml Fibronectin-Lösung (in H₂O) eingelegt und anschließend dreimal mit H₂O gespült. Die funktionalisierten Messsonden wurden für weniger als 32 h in H₂O gelagert oder unmittelbar verwendet.

Zur Herstellung der Bakteriensubstrate wurden 3 h Kulturen in TSB verwendet, die wie bereits in Abschnitt 3.3 beschrieben, aus Übernachtskulturen beimpft wurden. Nach Ablauf der 3 h wurde 1 ml Kulturbrühe in ein 1,5 ml Röhrchen überführt, 1 min bei 12.000 g zentrifugiert und dreimal mit jeweils 1 ml 1xPBS gewaschen. Anschließend wurde die OD₆₀₀ bestimmt und auf einen Faktor von 2 eingestellt. Parallel wurden Glasobjektträger mit H₂O und 70 % Ethanol-Lösung gereinigt, und unter einem schwachen N₂ Fluss, bzw. mit staubarmen Papiertüchern (Kimwipes®, Kimberly-Clark, Irving, USA) getrocknet. Danach wurden 30 µl Dopamin-Tris Puffer auf den gereinigten Objektträger pipettiert und im Inneren einer Staubfreien Petrischale für 30 min bei 37 °C inkubiert um einen Dopamin-Tris-Klebeplatz zu erzeugen. Im Anschluss wurde der Klebeplatz dreimal mit jeweils 50 µl 1xPBS gewaschen, 30 µl der Bakteriensuspension wurden auf den Klebeplatz pipettiert, erneut für 30 min bei 37 °C inkubiert und weitere dreimal mit 1xPBS gewaschen um nicht-gebundene Bakterien zu entfernen.

Die Messungen fanden in 1xPBS, mit einer Auslösekraft von 1 nN statt. Während der Experimente für Versuchsteil 4.1.3, wurden insgesamt acht LA-MRSA CC398 Isolate charakterisiert. Diese waren durch mindestens sechs einzelne Zellen pro Isolat vertreten. Insgesamt wurden 1154 Kraft-Distanz-Kurven, mit einem Minimum von 22

Kurven pro Zelle, gemessen. Dabei kamen insgesamt neun funktionalisierte Messsonden zum Einsatz, die jeweils zur Charakterisierung mehrere Isolate verwendet wurden. Um eine Degradierung der Fibronektin-Funktionalisierung auszuschließen, wurden die erste und letzte Messreihe einer Sonde auf demselben Isolat durchgeführt und anschließend verglichen. Gab es Abweichungen musste von einer Degradierung während der Messungen ausgegangen werden und die gemessenen Kraft-Distanz-Kurven wurden verworfen.

Die Auswertungen wurde mit der Nanoscope Analysis v1.4 Software (Bruker, Santa Barbara, USA) durchgeführt. Dabei wurde die Differenz zwischen dem größten Adhäsionspeak der sägezahnförmigen Rückziehphase der Kurve und der Basislinie berechnet und als Maximaladhäsion betrachtet.

3.8.2 Elastizitäts-Mapping von *S. aureus* Isolaten

Um den Elastizitätsmodulus nach Derjaguin-Muller und Toporov (DMT-Modulus) (Maugis, 1992) der *S. aureus* Isolate zu bestimmen, wurden 3 h Kulturen in TSB verwendet. Zunächst wurde 1 ml Kulturbrühe in ein 1,5 ml Röhrchen überführt und mit 1 ml NaCl-Lösung einer Konzentration von 0,15 mol/l bzw. 1,5 mol/l gewaschen. Danach wurde die OD₆₀₀ der Bakteriensuspension bestimmt und auf einen Faktor von 2 eingestellt. Anschließend wurde 1 ml der Suspension in ein 15 ml Schraubröhrchen (Greiner, Frickenhausen) überführt und mit 3 ml NaCl-Lösung verdünnt. In einem nächsten Schritt wurde die verdünnte Bakteriensuspension durch eine Polycarbonat-Membran mit einer Porengröße von 1,2 µm (Isopore™, Millipore, Billerica, USA) gefiltert um einzelne *S. aureus* Zellen in den Membranporen zu immobilisieren. Nach dem Filtern wurde die Membran beidseitig mit NaCl-Lösung gespült, invertiert und mit einem doppelseitigen Klebestreifen auf einen Objektträger geklebt. Zur weiteren Fixierung wurde ein ca. 5 x 5 mm Fenster in einen weiteren Klebestreifen geschnitten und dieser auf die Membran geklebt. Im Anschluss wurde ein Silikonstreifen mit Reaktionskammer (UltraGAPS™, Sigma-Aldrich, Steinheim) auf den Objektträger gesetzt, sodass über dem offenen Stück der Polycarbonat-Membran mit immobilisierten *S. aureus* Zellen eine Silikonkammer entstand, die mit 400 µl NaCl-Lösung gefüllt werden konnte und die für die Messsonde zugänglich war.

Das Elastizitäts-Mapping wurde mit Hilfe eines BioScope Catalyst Rasterkraftmikroskop-Systems, aufgebaut auf einem Leica DMI4000B Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Dabei wurden ScanAsyst Fluid bzw. ScanAsyst Fluid+ Messsonden (Bruker AFM Probes, Camillo, USA) verwendet. Die Messungen erfolgten im PeakForce QNM[®] Modus (Berquand, 2011) mit einer Scanrate von 0,5 Hz, einer Auflösung von 256 Samples/Linien bei einer Messfrequenz von 1 Hz und einer Auslösekraft von 1 nN bzw. 5 nN. Für die Datenauswertungen wurde die Nanoscope Analysis v1.4 Software (Bruker, Santa Barbara, USA) genutzt. Das Höhenprofil wurde mit der gemessene Elastizitätskarte überlagert und graphisch dargestellt. Die DMT Moduli einzelner Zellen wurden in einem apikal auf der Bakterienzelle positionierten 300 x 300 nm Quadrat bestimmt. Für Versuchsteil 4.1.6 wurden insgesamt 182 Zellen, mit einem Minimum an 9 Zellen pro Isolat/Bedingung, untersucht.

3.9 Molekularbiologische Methoden

3.9.1 Isolierung genomischer DNA aus *S. aureus*

Zur Isolierung genomischer DNA wurden zunächst *S. aureus* Übernachtskulturen auf TSA angelegt. Die anschließende Aufreinigung erfolgte automatisiert, mit Hilfe des Maxwell[®] MDx 16 Instrumentes sowie des Maxwell[®]16 Buccal Swab DNA Aufreinigungs-Kits (Promega Madison, USA), nach Angaben des Herstellers.

3.9.2 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Bestimmung der DNA und RNA Konzentration erfolgte mittels Nanodrop 2000 UV Spektrometer in Verbindung mit der Nanodrop Operation software v1.6 (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe).

3.9.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Vor der Sequenzierung von *fnbA* und *B*, mussten die Gensequenzen mittels PCR amplifiziert werden. Dazu kam der Thermocycler GeneAmp PCR 9700 (Applied Biosystems, Darmstadt) sowie das FastStart High Fidelity PCR System (Roche, Mannheim) nach den Protokollen des Herstellers zum Einsatz. Die Tabellen 19 und 20 zeigen exemplarisch das Thermocycler-Programm bzw. den verwendeten PCR-Ansatz. Die Elongationszeit wurde dabei der Länge des zu erwartenden PCR-Produktes angepasst (ca. 1 min / kb). Die Annealing-Temperatur wurde ebenfalls variiert und lag in der Regel 5 °C unterhalb der, vom Hersteller der Primer angegebenen Schmelztemperatur. Die anschließende Aufreinigung wurde mit dem QiaQuick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

Die Mycoplasmen Testung, mit Hilfe des Mycoplasmen-PCR-Detektions Kit Venor® GeM erfolgte, wie vom Hersteller vorgesehen, mit den mitgelieferten Random-Primern.

Tab. 19: Thermocycler-Programm PCR

Schritt:	Temperatur [°C]:	Dauer:
Initiale Denaturierung	95	5 min
32 Zyklen:		
Denaturierung	95	30 s
Annealing	variabel	30 s
Elongation	72	variabel
Finale Elongation	72	5 min

Tab. 20: PCR-Ansatz, exemplarisch für 1 Probe

Komponente:	Konzentration [µl]:
10x FastStart High Fidelity Reaktionspuffer	2,5
Nucleotid Mix (10 mM)	1
Primer forward (10 pmol/µl)	2
Primer reverse (10 pmol/µl)	2
genomische DNA (i.d.R. 100-250 ng/µl)	1
FastStart High Fidelity Enzyme Blend (5 u/µl)	0,5
H₂O	ad 25

3.9.4 Agarosegel Elektrophorese

Die Agarosegel Elektrophorese kam zum Einsatz, um die Ergebnisse der Mycoplasmen Testung zu dokumentieren. Dazu wurde ein 1 % Agarosegel in 0,5xTBE-Puffer hergestellt (Biozym, Oldendorf). Zur späteren Visualisierung der Proben auf dem Agarosegel wurde der 6x Loading Dye mit SYBR[®] Gold Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe) im Verhältnis 10 000:1 gemischt. In der Regel wurden 5 µl Probe mit 1 µl 6x Loading Dye vermischt und auf das Agarosegel geladen. Die Elektrophorese erfolgte in einer Elektrophorese-Kammer von Keutz Labortechnik (Reiskirchen) in 0,5xTBE-Puffer, bei einer Spannung von 100 V für ca. 30 min. Als Spannungsgeber diente dabei ein Elektrophoresis Power Supply (Bio-Rad, München). Als Größenstandard wurde der 1kb DNA-Ladder (Invitrogen, Darmstadt) verwendet.

3.9.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde bei der 4baselab GmbH (Reutlingen) durchgeführt.

3.9.6 Isolierung der Gesamt-RNA aus *S. aureus* Isolaten

Für die Arbeiten mit RNA wurden RNase-freie Plastikwaren und Pipettenspitzen mit Filtern verwendet. Zum Ansetzen der verwendeten Puffer und Lösungen wurde H₂O LiChrosolv[®] bzw. Ethanol absolut (GC-grade) verwendet und soweit möglich, wurden die Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Vor Beginn der Arbeiten wurde die Laborbank, Röhren-Ständer und Oberflächen der Pipetten mit RNase-Exitus Plus[™] (VWR, Darmstadt) gereinigt.

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurden zunächst 3 h Kulturen von *S. aureus* in 10 ml TSB im Schüttelkolben angeimpft. Dies erfolgte aus TSB Übernachtskulturen mit einer OD₆₀₀ von 0,05. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils 1 ml Kulturbrühe in ein 2 ml-Röhrchen überführt, mit 500 µl 10 mM NaN₃ Puffer supplementiert und gemischt. Im Anschluss wurden die 2 ml-Röhrchen für 15 min, bei

16.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien-Pellets wurden in 100 µl TE-Puffer resuspendiert oder alternativ, bis zur weiteren Aufreinigung, bei -70 °C gelagert.

Die anschließende Aufreinigung der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® RNA II Mini Kits (Machery-Nagel, Düren), gemäß dem Protokoll des Herstellers. Dabei diente die Lysing Matrix B (MP Biomedicals, Eschwege) im Ribolyser FastPrep FP120 (ThermoSavant, Heidelberg), mit 2 Läufen zu je 30 s und Geschwindigkeitsstufe 6.0, dem Aufschluss der Bakterien.

Die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA wurde, wie bereits im Abschnitt 3.9.2 beschrieben, mit einem Nanodrop 2000 UV Spektrometer bestimmt.

Das NucleoSpin® RNA II Protokoll sieht einem Arbeitsschritt zum Verdau der DNA vor. Zusätzlich wurde, nach der Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung, ein zweiter DNase Verdau mit Hilfe des Turbo-DNA free™ Kits (Ambion, Woodward Austin, USA), nach der Anleitung des Herstellers angeschlossen.

Um die RNA-Integrität zu überprüfen kam nach Abschluss der Isolierung und Aufreinigung eine Bioanalyzer 2100, unter Verwendung des Agilent RNA 6000 Nano Kits (Agilent Technologies, Deutschland GmbH & Co. KG, Waldbronn) zum Einsatz.

3.9.7 Reverse Transkription von RNA

Vor der qPCR mussten die RNA Proben, aus Gründen der Thermostabilität, in die komplementäre cDNA umgeschrieben werden. Dazu wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Darmstadt), nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Um die RNA während der Umschreibung vor der Degradierung zu schützen, wurde dem Ansatz RNaseOUT® (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe) zugesetzt. Tabelle 21 zeigt exemplarisch den Ansatz zur Umschreibung von 1 Probe. Die Umschreibung erfolgte im Thermocycler. Das verwendete Programm wird in Tabelle 22 dargestellt. Nach der Umschreibung wurde die cDNA auf eine Konzentration von 1 ng/µl verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Tab. 21: RT Ansatz zur Umschreibung in cDNA, exemplarisch für 1 Probe

Komponente:	Konzentration [μ l]:
10x High Capacity RT buffer	3
dNTP Mix (100 mM)	1,2
10x High Capacity Random Primer Mix	3
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,5
RNaseOut™ (2 u/ μ l)	0,38
Gesamt-RNA	variabel
H ₂ O	ad 30

Tab. 22: Thermocycler-Programm Reverse Transkription von RNA

Schritt:	Temperatur [$^{\circ}$ C]:	Dauer [min]:
1	25	10
2	37	120
3	85	5
4	4	∞

3.9.8 Quantitative Real Time PCR (qPCR)

Die qPCR dient der Quantifizierung des Transkriptionsniveaus einzelner Gene. Dabei ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung während der qPCR den Nachweis auch kleiner Ausgangsmengen eines Transkriptes, bzw. die Auflösung geringer Transkriptionsunterschiede. Im Rahmen dieser Arbeit kam der ABI PRISM 7000 Thermocycler, in Verbindung mit der zugehörigen Software ABI PRISM® 7000 SDS 1.2.3 (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe) zum Einsatz. Für die qPCR Ansätze wurde der Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Die Quantifizierung erfolgte demnach anhand der Fluoreszenzintensität dieses, in doppelsträngige DNA interkalierenden, Farbstoffs während des Elongationsschritts. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Menge neu-synthetisierter DNA, welche wiederum von der Ausgangsmenge des betrachteten Transkriptes abhängt.

Die qPCR wurden im 25 μ l Ansatz durchgeführt. Dabei wurde das spezifische Primerpaar einheitlich im Konzentrationsverhältnis 300 nM / 300 nM eingesetzt und

die Ansätze enthielten stets 2,5 µg umgeschriebene cDNA. Tabelle 23 zeigt exemplarisch einen qPCR Ansatz für eine Probe.

Tab. 23: qPCR Ansatz, exemplarisch für eine Probe

Komponente:	Konzentration [µl]:
Power SYBR[®] Green PCR Master Mix 2x	12,5
Primer forward (300 nM)	1,5
Primer reverse (300 nM)	1,5
cDNA Template (1 ng/µl)	2,5

Die Messung erfolgte in MicroAmp[®] Optical 96-Well-Platten (Applied Biosystems, Darmstadt). Tabelle 24 zeigt das verwendete qPCR Programm.

Tab. 24: Thermocycler-Programm qPCR

Schritt:	Temperatur [°C]:	Dauer:
Initiale Denaturierung	95	10 min
40 Zyklen:	95	15 s
Denaturierung	60	1 min
Annealing und Elongation		
Schmelzkurve:	95	15 s
	60	20 s
	95	15 s

Nach dem qPCR Lauf, diente die Analyse der Schmelzkurven dazu, die Spezifität der Amplifikate zu überprüfen. Die Auswertung der qPCR Ergebnisse erfolgte anhand des C_T -Wertes (engl. cycle treshold). Der C_T -Wert gibt den qPCR Zyklus an, bei dem das Fluoreszenzsignal der exponentielle Vervielfältigung eines Amplifikats einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Somit zeigen geringe C_T -Werte eine große Ausgangsmenge Transkript an, während hohe C_T -Werte auf eine kleine Ausgangsmenge eines Transkriptes hindeuten.

Die Auswertung erfolgte in Relation zur Transkription des Topoisomerase II codierenden und konstitutiv exprimierten Haushaltsgens *gyrB*. Dies diente der Normalisierung etwaiger Transkriptionsunterschiede, die lediglich auf einem stärkeren/schwächeren Stoffwechsel der Isolate bzw. auf Pipettierungenauigkeiten beim Einsetzen der cDNA beruhen. Dazu wurde der C_T -Werte von *gyrB* vom Wert

des zu untersuchenden Zielgens subtrahiert. Als Gegenoperation der exponentiellen Vervielfältigung während der qPCR, wurde der erhaltene ΔC_T -Wert als negativer Exponent von 2 eingesetzt ($2^{-\Delta C_T}$), um so die n-fache Transkription des Zielgens relativ zu *gyrB* zu bestimmen.

3.10 Statistische Analysen und graphische Darstellung

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit den Programmen SigmaStat® 11 (Systat Software GmbH, Erkrath) und R v3.2 (R foundation for statistical computing Wien, Österreich) durchgeführt. Je nachdem ob der Datensatz normalverteilt war oder nicht, wurde ein *t*-Test oder ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Für die anschließende graphische Darstellung wurden die Programme Sigmaplot® 10 und 11 (Systat Software GmbH, Erkrath) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der *S. aureus* Wirtsadhäsion

4.1.1 Adhäsionskapazität an humane Keratinozyten

Keratinozyten stellen den vorherrschenden Zelltyp in der Epidermis von Säugetieren dar. Darüber hinaus sind sie, durch ihre Migrationsfähigkeit, in der Wundheilung von zentraler Bedeutung (Alberts, 2002). Als Erreger von Hautinfektionen und persistierender Wunden ist die Adhäsion an Keratinozyten für *S. aureus* ein wichtiger Virulenzmechanismus. Eine Studie von Uhlemann und Kollegen beschreibt für zehn Nutztier-assoziierte *S. aureus* CC398 Isolate aus der Region Manhattan, USA, eine geringere Adhäsion, verglichen mit Nutztier-unabhängigen *S. aureus* CC398 Isolaten des *spa* Typs 571 (Uhlemann *et al.*, 2012). Untersuchungen einer größeren, repräsentativen Auswahl an Isolaten, die in europäischen Schweine-haltenden Betrieben zirkulieren und konstant auf den Menschen übertragen werden fehlen bislang. Um Einblicke in die Adhäsionskapazität der in Europa verbreiteten CC398 Linien zu gewinnen, wurde ein Set von 26 LA-MRSA CC398 Isolaten, die vom Menschen bzw. Schwein isoliert wurden (Tab. 1), in einem Zellkulturmodell mit humanen Keratinozyten getestet und mit jeweils 9 humanadaptierten CA-MRSA und HA-MRSA Isolate (Abb. 5).

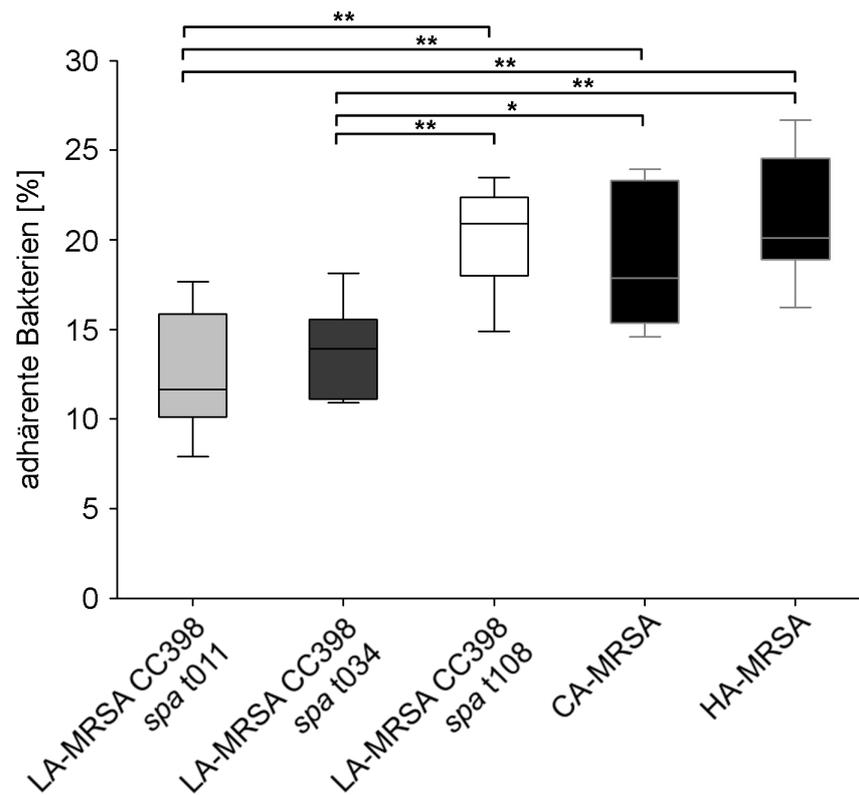


Abb. 5: Adhäsionskapazität von 44 MRSA Isolaten an humane Keratinozyten.

Fluoreszenz-gefärbte Bakterien wurden mit humanen Keratinozyten (HaCaT) kokultiviert, nicht adhärenente Bakterien wurden durch Waschen entfernt und adhärenente Bakterien wurden anhand ihrer Fluoreszenzintensität relativ zum eingesetzten Inokulum quantifiziert. Dargestellt werden LA-MRSA CC398 ($n = 26$), CA-MRSA ($n = 9$) und HA-MRSA ($n = 9$), wobei die LA-MRSA CC398 Isolate in die drei am häufigsten vorkommenden *spa* Typen unterteilt werden. Die Daten repräsentieren mindestens sechs unabhängige Wiederholungen (Box: Median mit Interquartilsabstand, Antennen: 10 % und 90 % des Datenbereiches, *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).

Es zeigte sich, dass alle getesteten Isolate dazu in der Lage waren an humane Keratinozyten zu adhären. Allerdings zeigten die LA-MRSA CC398 eine deutlich geringere Adhäsionskapazität als die CA-MRSA und HA-MRSA Isolate. Bei der getrennten Betrachtung einzelner LA-MRSA CC398 Subgruppen, den *spa* Typen, wurden weitere Unterschiede deutlich. Verglichen mit Isolaten der *spa* Typen t011 und t034 zeigten Isolate des *spa* Types t108 eine deutlich höhere Adhäsionskapazität. Diese lag in einer ähnlichen Größenordnung wie die Adhäsionskapazitäten der humanadaptierten CA-MRSA und HA-MRSA Isolate. Die Ergebnisse weisen auf eine insgesamt niedrige Adhäsionsfähigkeit der CC398 Linie

hin, deuten allerdings auch eine Heterogenität der Adhäsionseigenschaften bezüglich epidemiologischer Subgruppen dieser Linie an. Wirtsspezifische Unterschiede in der Adhäsionskapazität, in Hinblick auf die Isolatquelle (Mensch oder Schwein) wurden nicht gefunden.

4.1.2 Adhäsionskapazität an humanes/bovines Plasma-Fibronectin

Fibronectin ist ein Glykoprotein, das Teil der extrazellulären Matrix von Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen ist oder als lösliche Variante ins Blutplasma von Säugetieren ausgeschüttet wird. Als lösliche Variante ist es, als so genanntes Plasma-Fibronectin, neben Fibrinogen bei der Blutgerinnung und Bildung von Fibrin-Gerinnsel beteiligt (Alberts, 2002). Außerdem ist es dazu in der Lage, Keratinozyten und Fibroblasten zu binden und so zu Wundheilungsprozessen beizutragen. Sowohl als Matrixprotein, als auch in Wunden stellt Fibronectin einen potentieller Wirtsfaktor zu Adhäsion von *S. aureus* dar (Heilmann, 2011). Auch bei der Adhäsion auf, im Körperinneren befindlicher Medizinprodukte (Katheter, Implantate), spielt Fibronectin eine wichtige Rolle, da dieses Wirtsprotein, wie auch andere adhäsive Serumproteine, die in den Körper eingebrachten artifiziellen Oberflächen innerhalb kürzester Zeit beschichten und damit *S. aureus* eine Möglichkeit zur Adhäsion und potentiellen Biofilmbildung bieten (Edmiston *et al.*, 2006; Petrelli *et al.*, 2008; Wagner *et al.*, 2011).

Um die Adhäsionskapazität an Fibronectin von *S. aureus* CC398 zu bestimmen, wurde dasselbe Set aus 44 MRSA Isolaten, bestehen aus 26 LA-MRSA, 9 CA-MRSA und 9 HA-MRSA Isolaten eingesetzt, welches bereits bei der Bestimmung der Adhäsionskapazität an humane Keratinozyten verwendet wurde (Tab. 1). Die Isolate wurden in einem Adhäsionsassay mit immobilisiertem, humanem oder bovinem Plasma Fibronectin eingesetzt (Abb. 6).

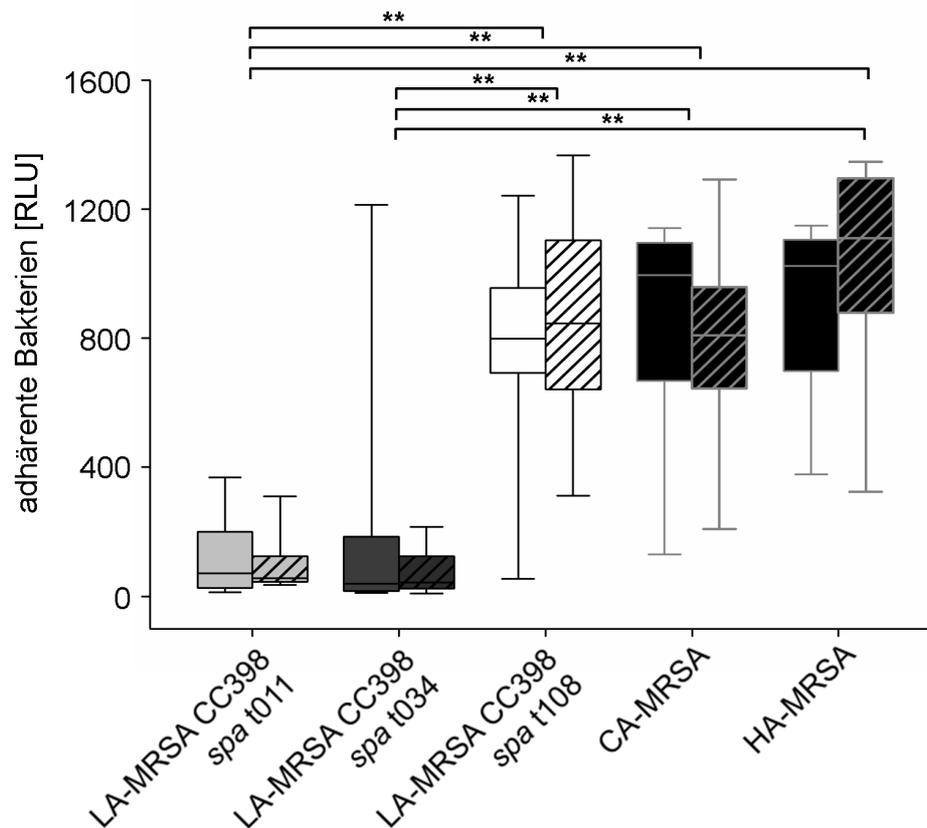


Abb. 6: Adhäsionskapazität von 44 MRSA Isolaten an humanes/bovines Plasma-Fibronektin.

Fluoreszenz-gefärbte Bakterien wurden mit immobilisiertem Plasma-Fibronektin koinkubiert, nicht adhärenente Bakterien wurden durch Waschen entfernt und adhärenente Bakterien wurden anhand ihrer Fluoreszenzintensität in RLU quantifiziert. Dargestellt wird die Adhäsion von LA-MRSA CC398 ($n = 26$), CA-MRSA ($n = 9$) und HA-MRSA ($n = 9$) an humanes Plasma-Fibronektin (klare Boxen) und bovines Plasma-Fibronektin (schraffierte Boxen). Dabei wird der LA-MRSA CC398 Isolatpool in die drei am häufigsten vorkommenden *spa* Typen unterteilt. Die Daten repräsentieren mindestens sechs unabhängige Wiederholungen (Box: Median mit Interquartilsabstand, Antennen: 10 % und 90 % des Datenbereiches, $**p < 0,01$).

Dabei wurde ein ähnliches Muster der Adhäsionskapazität beobachtet, wie es sich auch bei der Adhäsion an humane Keratinozyten zeigte. Insgesamt betrachtet wiesen die getesteten LA-MRSA CC398 Isolate eine geringere Adhäsionskapazität auf, als die CA-MRSA und HA-MRSA Isolate. Betrachtete man die, der CC398 Linie untergeordneten, *spa* Typen, so wies der *spa* Typ t108 eine deutlich höhere Adhäsionskapazität auf, als die Isolate der *spa* Typen t011 und t034 und in derselben Größenordnung wie CA-MRSA und HA-MRSA. Diese Ergebnisse erweitern das, für humane Keratinozyten gefundene Adhäsionsmuster auf Strukturen, wie Blutgerinnsel

oder Medizinprodukte, in denen Fibronectin als Wirtsfaktor involviert ist. Signifikante Unterschiede im Adhäsionsverhalten an Plasma Fibronectin aus humaner bzw. boviner Quelle wurden hingegen nicht festgestellt. Der bioinformatische Vergleich der Aminosäuresequenzen beider Proteine zeigt eine Übereinstimmung von ca. 82 %. Darüber hinaus wurden, so wie bei der Adhäsionskapazität an humane Keratinozyten, keine Unterschiede bezüglich der Isolatquelle (Mensch oder Schwein) beobachtet.

4.1.3 Adhäsionskraft-Spektroskopie mit humanem Plasma-Fibronectin

Die Funktionalisierung von Messsonden in der Rasterkraftmikroskopie bietet unter anderem die Möglichkeit, Adhäsionskräfte während der Interaktion von Proteinen bzw. Zellen zu messen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die auftretenden Adhäsionskräfte zwischen acht LA-MRSA CC398 Isolaten und, mit humanem Plasma-Fibronectin funktionalisierten, Messsonden untersucht (Abb. 7).

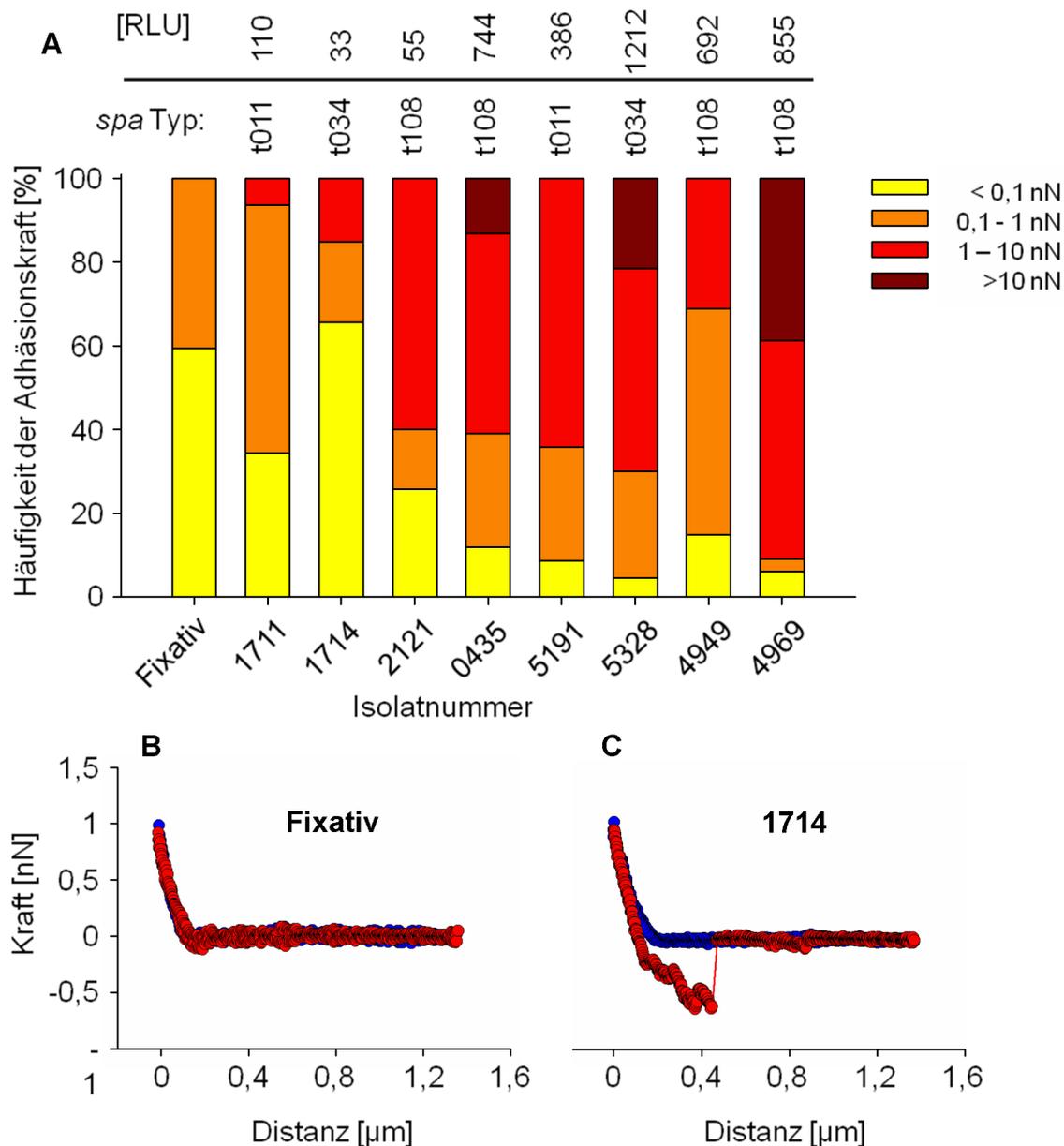


Abb. 7: Adhäsionskraft-Spektroskopie zwischen LA-MRSA CC398 Isolaten und humanem Plasma-Fibronectin.

Die Adhäsionskräfte wurden durch Kraftspektroskopie zwischen, mit Plasma-Fibronectin funktionalisierten, Messsonden und lebenden, auf einem Objektträger immobilisierten Bakterien bestimmt. Als Fixativ diente eine Dopamin Hydrochlorid-Tris Lösung. **(A)** Häufigkeit der auftretenden Adhäsionskräfte von acht LA-MRSA CC398 Isolaten, der *spa* Typen t011, t034 und t108. Die entsprechenden Adhäsionskapazitäten in RLU der Isolate (vergl. Abb. 6) werden mit den auftretenden Adhäsionskräften verglichen. **(B)**, **(C)** Exemplarische Kraft-Distanz-Kurven gemessen auf dem Fixativ und Isolat 1714. Die Annäherungsphase der Messsonde wird in blau und die Rückziehphase in rot dargestellt. Beispiele für Kraft-Distanz-Kurven aller acht untersuchten LA-MRSA CC398 Isolate werden im Anhang gegeben (Abb. 22).

Die getesteten LA-MRSA Isolate stellen eine Auswahl, des Sets aus 44 MRSA Isolaten dar, mit denen zuvor in Teil 4.1.1 und 4.1.2 die Adhäsionskapazität an humane Keratinozyten und Plasma-Fibronektin getestet wurden (Tab. 1) und repräsentieren die *spa* Typen t011 (n=2), t034 (n=2) und t108 (n=4). Dabei stammte jeweils ein Isolat der *spa* Typen t011 und t034 vom Schwein und ein Isolat vom Mensch. Bei *spa* Typ t108 stammten jeweils zwei Isolate vom Schwein bzw. Menschen. Die Ergebnisse der Adhäsionskraft Spektroskopie zeigten deutliche Unterschiede zwischen den acht Isolaten. Insgesamt entspricht die Häufigkeit der, bei der Spektroskopie auftretenden Adhäsionskräfte, dem Muster der ermittelten Adhäsionskapazitäten an Plasma Fibronektin aus Versuchsteil 4.1.2. Eine Ausnahme diesbezüglich stellten das *spa* Typ t108 Isolat 2121 dar, das eine, für diesen *spa* Typ ungewöhnlich niedrige Adhäsionskapazität (55 RLU) aufwies, allerdings auch nur moderat hohe Adhäsionskräfte an Plasma-Fibronektin zeigte. Das *spa* Typ t108 Isolat 4949 stellte eine weitere Ausnahme dar, welches eine, dem *spa* Typ entsprechend, hohen Adhäsionskapazität (692 RLU) aufwies, aber einer niedrigen Adhäsionskraft an Plasma-Fibronektin zeigte. Insgesamt aber konnte ein Zusammenhang zwischen der Adhäsionskapazität der Isolate und der gemessenen Adhäsionskraft gezeigt werden.

4.1.4 Adhäsionskapazität an humanes Fibrinogen

Das Glykoprotein Fibrinogen wird im Blutplasma von Säugetieren ausgeschüttet und ist an Blutgerinnungsprozessen beteiligt. Zum Zweck des Wundverschlusses wird Fibrinogen durch die Wirkung von Thrombin zu Fibrin vernetzt. Der Thrombus, der schließlich die Wunde verschließt, wird maßgeblich aus polymerisiertem Fibrin, Thrombozyten und Erythrozyten gebildet (Alberts, 2002). Als adhäsives Serumprotein bedeckt Fibrinogen, vergleichbar mit Plasma-Fibronektin, artifizielle Oberflächen von Medizinprodukten im Körperinneren (Katheter, Implantate) innerhalb kürzester Zeit. Somit ist Fibrinogen ein weiterer wichtiger Wirtsfaktor der *S. aureus* Adhäsion und potentiellen Bildung eines Biofilmes. Abbildung 8 zeigt die Adhäsionskapazität einer Auswahl von acht LA-MRSA CC398 Isolaten aus dem Set aus Tabelle 1 an humanes Fibrinogen.

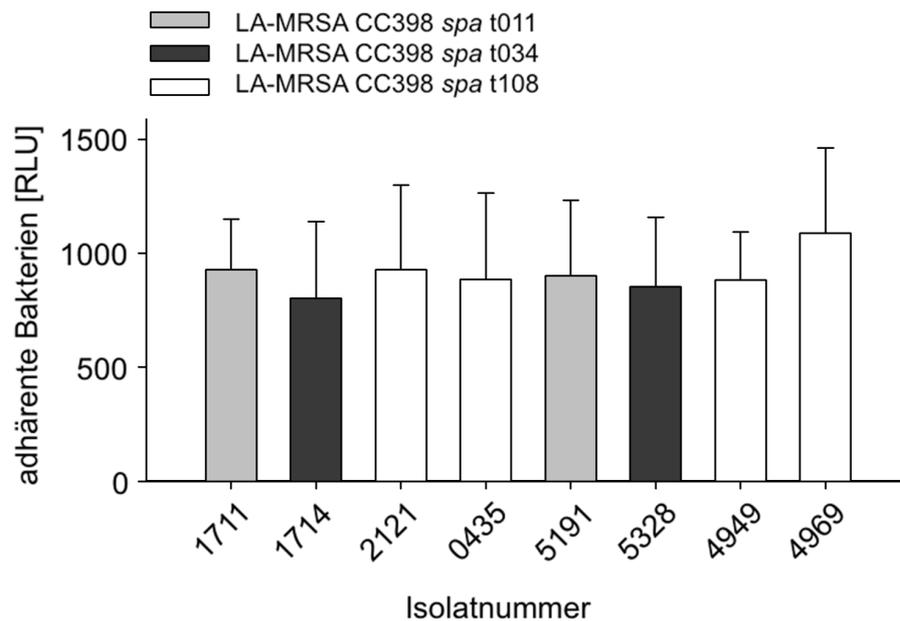


Abb. 8: Adhäsionskapazität von LA-MRSA CC398 an humanes Fibrinogen.

Fluoreszenz-gefärbte Bakterien wurden mit immobilisiertem, humanem Fibrinogen koinkubiert, nicht adhärenente Bakterien wurden durch Waschen entfernt und adhärenente Bakterien wurden anhand ihrer Fluoreszenzintensität in RLU quantifiziert. Dargestellt werden acht LA-MRSA CC398 Isolate der *spa* Typen t011, t034 und t108, untersucht in sechs unabhängigen Wiederholungen (Balken: Mittelwert; Fehlerbalken: Standardabweichung).

Die Isolate wurden gleichermaßen vom Menschen und vom Schwein isoliert und repräsentieren die *spa* Typen t011 (n=2), t034 (n=2) und t108 (n=4). Die Ergebnisse zeigen dass alle getesteten LA-MRSA CC398 Isolate ähnlich gut dazu in der Lage waren an Fibrinogen zu adhären. Dabei wurden weder Unterschiede bezüglich der *spa*-Typen noch der Isolatquelle (Mensch oder Schwein) festgestellt. Die Bestimmung der Adhäsionskapazität des CA-MRSA Isolates MW2 (ohne Abbildung) zeigte, mit 854 RLU, einen Wert in derselben Größenordnung wie die getesteten LA-MRSA CC398 Isolate. Im Gegensatz dazu, wies das schwach-adhärenente *Staphylococcus carnosus* Isolat TM300 (ohne Abbildung) eine Adhäsionskapazität von lediglich 260 RLU auf.

4.1.5 Transkriptionsanalyse von *fnbA/B*, *clfA/B*, *asp23* und *RNAIII*

Die Fnb A und B sowie die Clf A und B sind wichtige Vertreter der Gruppe der MSCRAMMs und vermitteln eine spezifische Adhäsion von *S. aureus* an Fibronectin bzw. Fibrinogen (Heilmann, 2011). Um den Einfluss auf die beobachteten Adhäsionsmuster innerhalb der CC398 Linie zu untersuchen, wurde die Transkription der, für diese Adhäsine kodierenden Gene, bei 3 Stunden alten Flüssigkulturen (exponentielle Wachstumsphase) mittels qPCR quantifiziert. Dabei wurde die gleiche Auswahl an Isolaten, aus *spa* Typ t011 (n=2), t034 (n=2) und t108 (n=4) untersucht, welche auch bei der Bestimmung der Adhäsionskapazität an Fibrinogen, sowie der Adhäsionskraft-Spektroskopie an Plasma-Fibronectin verwendet wurde. Abbildung 9 stellt die relative Transkription der, für die Fibronectin-bindenden Proteine *fnbA* und *fnbB* dar.

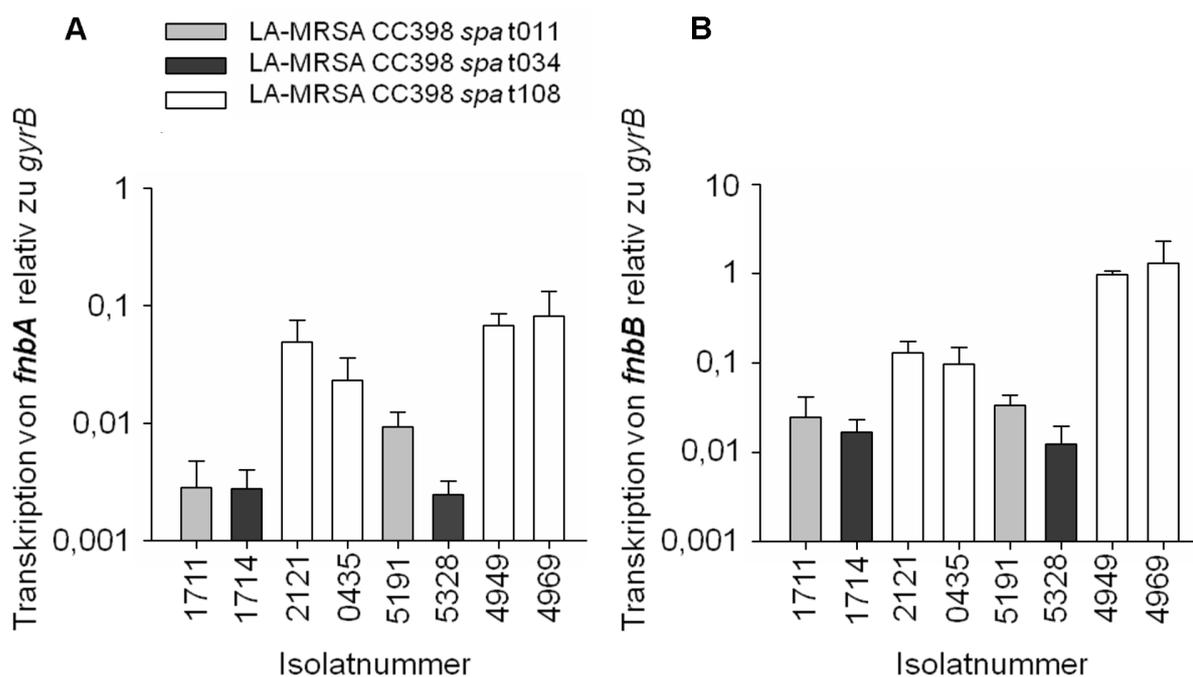


Abb. 9: Transkriptionsanalyse der Gene *fnbA* und *fnbB*.

Die Transkription wurde für acht LA-MRSA CC398 Isolate der *spa* Typen t011, t034 und t108, mittels qPCR untersucht und relativ zum Haushaltsgen *gyrB* bestimmt. Dazu wurde die Gesamt RNA in der exponentiellen Wachstumsphase nach 3h in TSB isoliert. Dargestellt wird die Transkription von *fnbA* (**A**) sowie *fnbB* (**B**) in drei unabhängigen RNA Isolaten in Doppelbestimmung (Balken: Mittelwert; Fehlerbalken: Standardabweichung). Einzelne Signifikanzverhältnisse zwischen den Isolaten werden tabellarisch im Anhang dargestellt (Tab 26 und Tab 27).

Isolate des *spa* Typs t108 zeigten eine zum Teil massiv höhere Transkription der beiden Adhäsine, als Isolate der *spa* Typen t011 und t034. Darüber hinaus wies Isolat 5191 (*spa* Typ t011) eine höhere *fnbA* Transkription auf, als die übrigen *spa* Typ t011 und t034 Isolate (Abb. 9 A). Außerdem zeigten die *spa* Typ t108 Isolate 4949 und 4969, die vom Menschen isoliert wurden, eine *fnbB* Expression, welche die Expression der t108 Isolate 2121 und 0435, die vom Schwein stammten, noch überstieg. (Abb. 9 B). Die DNA-Sequenzierung von *fnbA* und *fnbB* machte jedoch deutlich, dass alle *spa* Typ t011 und t034 Isolate eine Punktmutation in *fnbB* aufwiesen, welche zu einem Stoppcodon bei Aminosäure 372 führt. Dieselbe Punktmutation wurde lediglich in einem der getesteten *spa* Typ t108 Isolat festgestellt (ohne Abbildung). Im Gegensatz zur Transkriptionsanalyse von *fnbA* und *fnbB*, konnten bei den Clumpingfaktor codierenden Genen, *clfA* und *clfB* keine generell höhere Expression bei den *spa* Typ t108 Isolaten, verglichen mit den *spa* Typ t011 und t034 Isolaten beobachtet werden (Abb. 10).

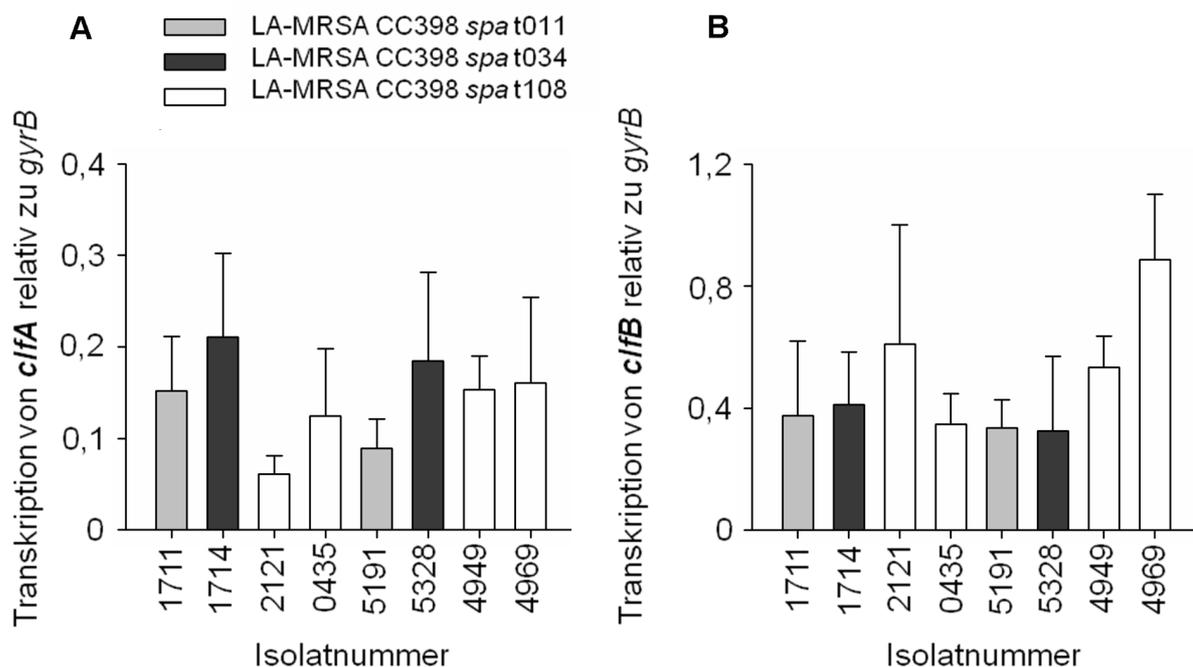


Abb. 10: Transkriptionsanalyse der Gene *clfA* und *clfB*.

Die Transkription wurde für acht LA-MRSA CC398 Isolate der *spa* Typen t011, t034 und t108, mittels qPCR untersucht und wird relativ zum Haushaltsgen *gyrB* bestimmt. Dazu wurde die Gesamt RNA in der exponentiellen Wachstumsphase nach 3h in TSB isoliert. Dargestellt wird die Transkription von *clfA* (**A**), sowie *clfB* (**B**) in drei unabhängigen RNA Isolaten in Doppelbestimmung (Balken: Mittelwert; Fehlerbalken: Standardabweichung). Einzelne Signifikanzverhältnisse zwischen den Isolaten werden tabellarisch im Anhang dargestellt (Tab 28 und Tab 29).

Dennoch wurden geringfügigere Unterschiede in der Genexpression gefunden. Das t108 Isolat 2121, sowie das t011 Isolat 5191 zeigten eine niedrigere *clfA* Expression als die übrigen Isolate. Beim t108 Isolat 4969 wurde hingegen eine höhere *clfB* Expression als bei den anderen Isolaten gefunden.

Die Expression der MSCRAMMs wird stark durch globale Regulatoren wie dem alternativen Sigmafaktor σ^B oder dem *agr*-Lokus beeinflusst. In diesem Zusammenhang wurde die Expression der Markergene *asp23* (σ^B) und *RNAIII* (*agr*) in 3 Stunden alten Flüssigkulturen untersucht. (Abb. 11).

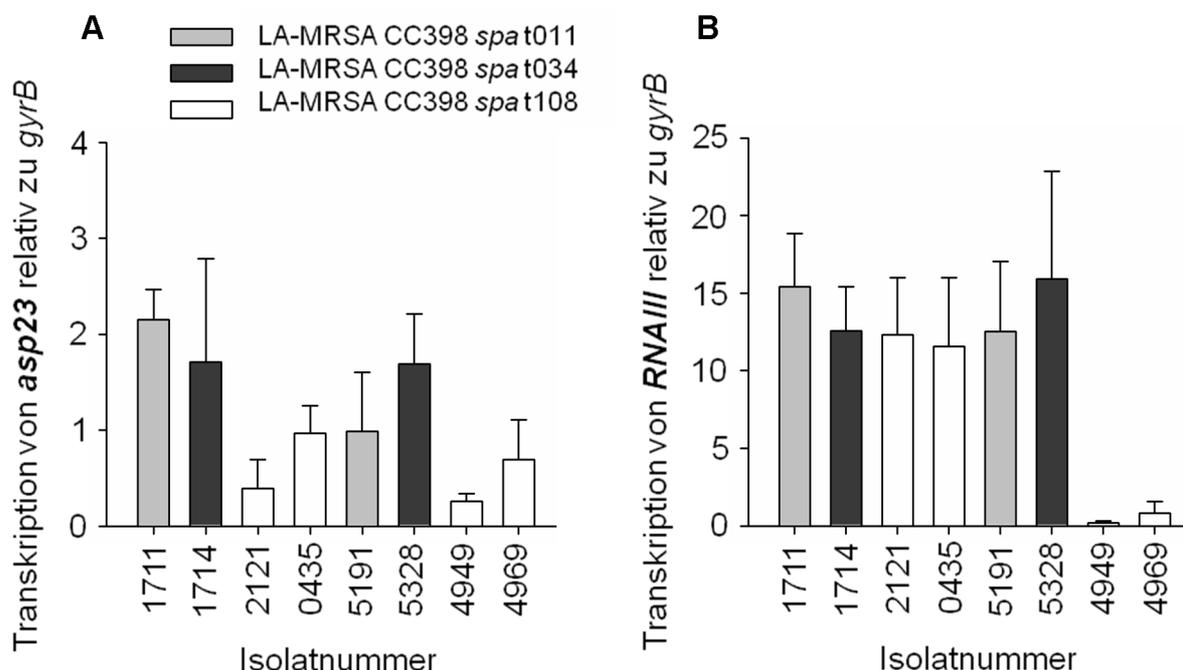


Abb. 11: Transkriptionsanalyse der Markergene *asp23* und *RNAIII*.

Die Transkription wurde für acht LA-MRSA CC398 Isolate der *spa* Typen t011, t034 und t108, mittels qPCR untersucht und wird relativ zum Haushaltsgen *gyrB* bestimmt. Dazu wurde die Gesamt RNA in der exponentiellen Wachstumsphase nach 3h in TSB isoliert. Dargestellt wird die Transkription von *asp23* (A) und *RNAIII* (B) in drei unabhängigen RNA Isolaten in Doppelbestimmung (Balken: Mittelwert; Fehlerbalken: Standardabweichung). Einzelne Signifikanzverhältnisse zwischen den Isolaten werden tabellarisch im Anhang dargestellt (Tab 30 und Tab 31).

Ein stringenter Zusammenhang der Transkription der Regulatoren mit der Transkription eines der getesteten MSCRAMMs oder den *spa* Typen der Isolate wurde dabei nicht beobachtet. Die *asp23* Expression zeigte, dass der alternative Sigma Faktor σ^B in den acht getesteten LA-MRSA CC398 Isolaten aktiv ist. Die

Expression schwankte dabei zwischen 0,38 und 2,14 relativ zur Transkription von *gyrB*. Die *RNAIII* Expression schwankte zwischen 11,56 und 15,9 relativ zur Transkription von *gyrB*. Ausnahmen bilden dabei die, vom Menschen isolierten *spa* Typ t108 Isolate 4949 und 4969. Beide Isolate zeigten eine deutlich geringere *RNAIII* Expression, von Faktor 0,21 bzw. 0,83, als die übrigen Isolate.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die deutlich höhere Adhäsionsfähigkeit der *spa* Typ t108 Isolate an Plasma-Fibronektin (gezeigt in den Versuchsteilen 4.1.2 und 4.13), verglichen mit Isolaten der *spa* Typen t011 und t034, zumindest teilweise mit der massiv höheren *fnbA* und *fnbB* Transkription bei den t108 Isolaten begründet werden kann. Eine mögliche zweite Erklärung ist, dass die Punktmutation, die bei *fnbB* zu einem verfrühten Stoppcodon bei Aminosäure 372 führt, offenbar bei den *spa* Typen t011 und t034 Isolaten häufig auftritt, bei *spa* Typ t108 Isolaten jedoch selten zu sein scheint.

4.1.6 Einfluss der Zell und Zellwandelastizität auf die Adhäsion

Nach Studien von Liu und Kollegen (2008) sowie Chen und Kollegen (2012) müssen ,bei der Betrachtung von bakteriellen Adhäsionsprozessen, die viskoelastischen Zellwandeigenschaften berücksichtigt werden. Demnach sind hochelastische Zellwände dazu in der Lage, sich bei Kontakt mit einem Substrat stärker zu verformen als niederelastische Zellwände und bieten somit eine größere Kontaktfläche. Es kann erwartet werden, dass mit zunehmender Kontaktfläche die Adhäsion zunimmt. Um diesen Einfluss auf die Adhäsion zu untersuchen, wurde die Zell- und Zellwandelastizität sowie die Adhäsionskapazität von *S. aureus* Isolaten untersucht und verglichen. Zur Bestimmung der Zellwandelastizität wurden Elastizitätskarten lebender *S. aureus* Zellen mittels AFM gemessen. Die Ergebnisse werden in Abbildung 12 dargestellt.

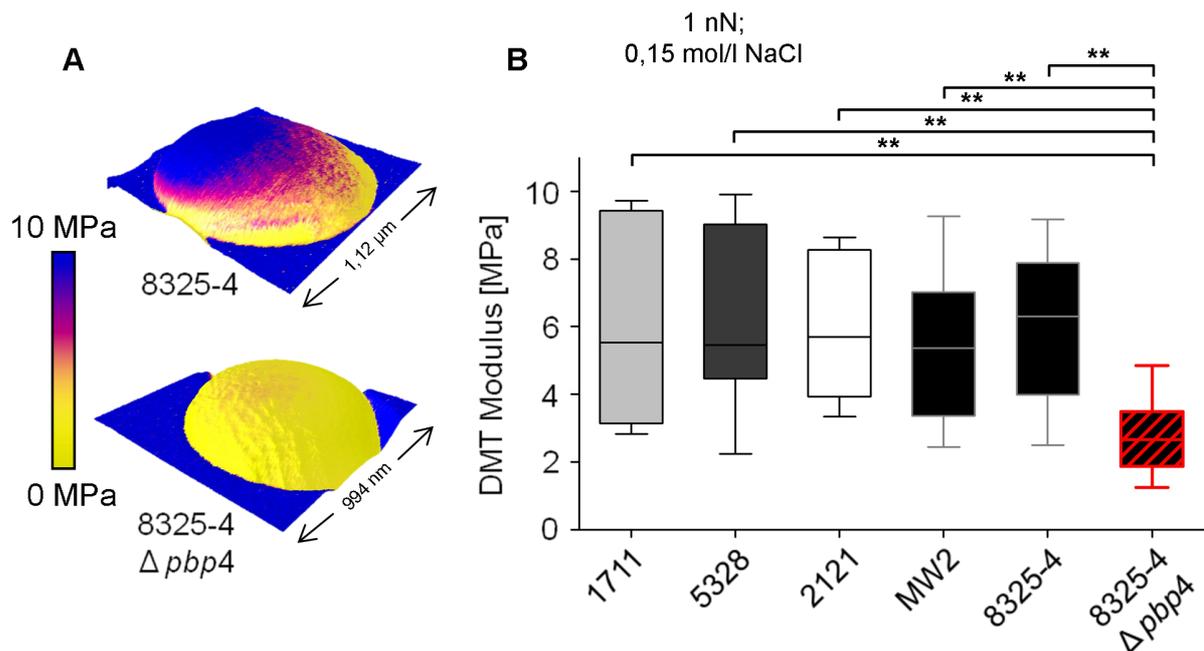


Abb. 12: Bestimmung der Zellwandelastizität von *S. aureus* Isolaten.

Zur Messung der Zellwandelastizität wurden Elastizitätskarten einzelner Zellen mittels AFM im Peak Force Tapping Modus gemessen. Pro Isolat wurden zwischen 87.000 und 160.000 einzelne Elastizitätsmessungen an mindestens 12 einzelnen lebenden Zellen durchgeführt. **(A)** Exemplarische Darstellung einer Überlagerung des Höhenprofils mit der Elastizitätskarte einzelner Zellen der Stämme 8325-4 und 8325-4 $\Delta pbp4$ umgeben von einer Polycarbonat-Membran zur Immobilisierung. Beispiele für Höhenprofile und Elastizitäts-Karten aller untersuchten Stämme und Messbedingungen werden im Anhang dargestellt (Abb. 23). **(B)** DMT Moduli von drei LA-MRSA CC398 Isolaten (*spa* Typ t011, t034, t108), CA-MRSA Isolat MW2, MSSA Isolat 8325-4 sowie einer 8325-4 *pbp4* Deletionsmutante. Zur Bestimmung der Zellwandelastizität wurde die Messsonde mit 1 nN aufgepresst. Der, die Zellen umgebende Messpuffer hatte eine NaCl Konzentration von 0,15 mol/l (isotonisch).

Untersucht wurden die LA-MRSA CC398 Isolate 1711 (*spa* Typ t011), 5328 (*spa* Typ t034) und 2121 (*spa* Typ t108), das CA-MRSA Isolat MW2, das MSSA Isolat 8325-4, sowie eine 8325-4 *pbp4* Deletionsmutante, mit einer reduzierten sekundären Zellwandquervernetzung. Die Zellwandelastizitäten der getesteten LA-MRSA CC398 Isolate sowie die Isolate MW2 und 8325-4 unterschieden sich nur geringfügig. Lediglich das Isolatderivat 8325-4 $\Delta pbp4$ zeigte eine signifikant reduzierte Steifigkeit und war somit elastischer (Abb. 12 B). Die korrespondierenden Adhäsionskapazitäten der Isolate, an humane Keratinozyten und humanes Plasma-Fibronectin, werden in Abbildung 13 gezeigt.

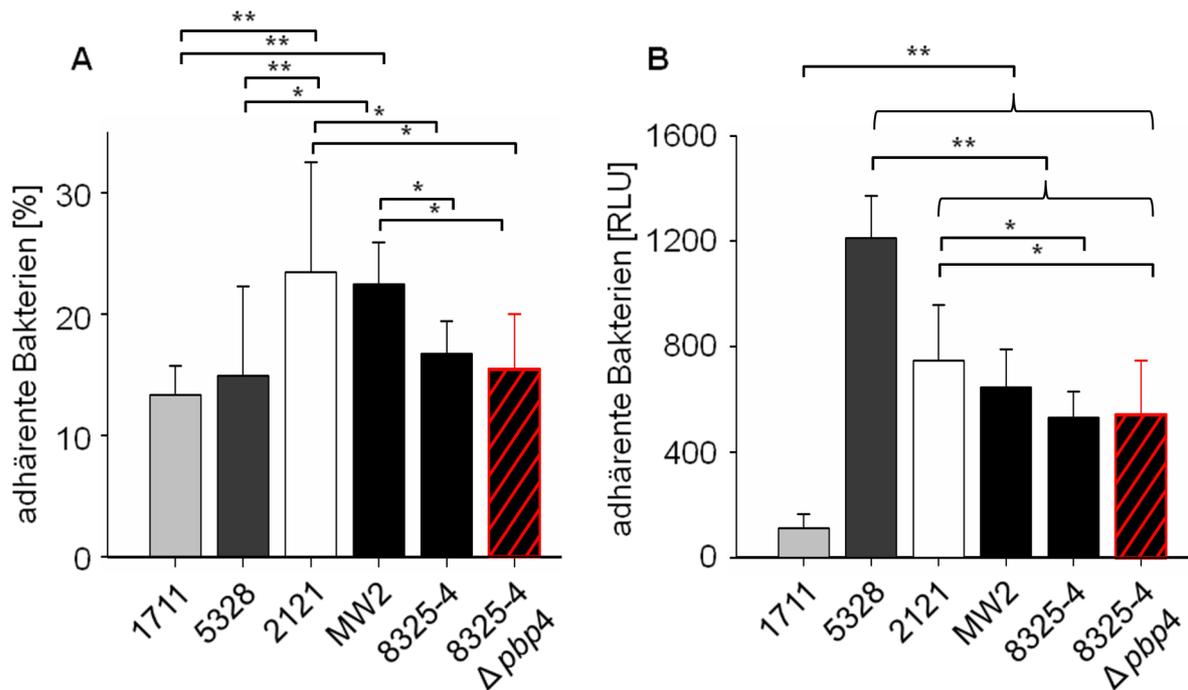


Abb. 13: Zur Zellwandelastizität korrespondierende Adhäsionskapazität von *S. aureus* Isolaten.

Während Abbildung 12, die Zellwandelastizität von drei LA-MRSA CC398 Isolaten (Isolat 1711, 5328, 2121), CA-MRSA Isolat MW2, MSSA Isolat 8325-4 und 8325-4 Δ pbp4 zeigt, werden hier die korrespondierenden Adhäsionskapazitäten dieser Isolate an **(A)** humane Keratinozyten und an **(B)** humanes Plasma-Fibronektin dargestellt.

Die Adhäsionskapazitäten der LA-MRSA CC398 Isolate unterschieden sich und folgten dem, in den Teilen 4.1.1 und 4.1.2, beschriebenen Muster. Das Isolat 8325-4 zeigte eine niedrige bis moderate Adhäsionskapazität, dabei beeinflusste die *pbp4* Deletion die Adhäsionskapazität nicht. Zusammenfassend konnte, anhand der getesteten Stämme und Bedingungen kein Zusammenhang zwischen Zellwandelastizität und Adhäsion festgestellt werden.

Der Theorie eines Einflusses der Zellwandelastizität auf die Adhäsion folgend, kann ebenso ein Einfluss der Elastizität der gesamten Zelle auf die Adhäsion angenommen werden. Die Elastizität der Zelle wird wiederum maßgeblich vom Turgordruck beeinflusst, der durch osmotisch-aktive Bestandteile des Cytoplasmas aufrechterhalten wird. Darüber hinaus presst der Turgordruck die Cytoplasmamembran gegen die Innenseite der Zellwand und ist somit für die Zellgeometrie mitbestimmend. Bei AFM basierten Elastizitätsmessungen ist die

Auslösekraft (und somit Indentationstiefe), die während der Messung von der Messsonde auf die Probe ausgeübt wird, ein entscheidender Parameter. Bei den bisher beschriebenen Elastizitätsmessungen wurde eine vergleichsweise niedrige Auslösekraft von 1 nN verwendet. Die Bestimmung der Elastizität in Abhängigkeit der verminderten Zellwandquervernetzung von 8325-4 $\Delta pbp4$ zeigte, dass die Auslösekraft von 1 nN geeignet war, um die Elastizitätseigenschaften der Zellwand zu ermitteln. Die Erhöhung der Auslösekraft auf 5 nN hingegen, lieferte Zellwand-unabhängige Elastizitätswerte der Stämme 8325-4 und 8325-4 $\Delta pbp4$, da die Indentationstiefe der Messsonde die Dicke der Zellwand überstieg und somit die Elastizitätseigenschaften des Cytoplasmas unterhalb der Zellwand gemessen wurden (Abb.14).

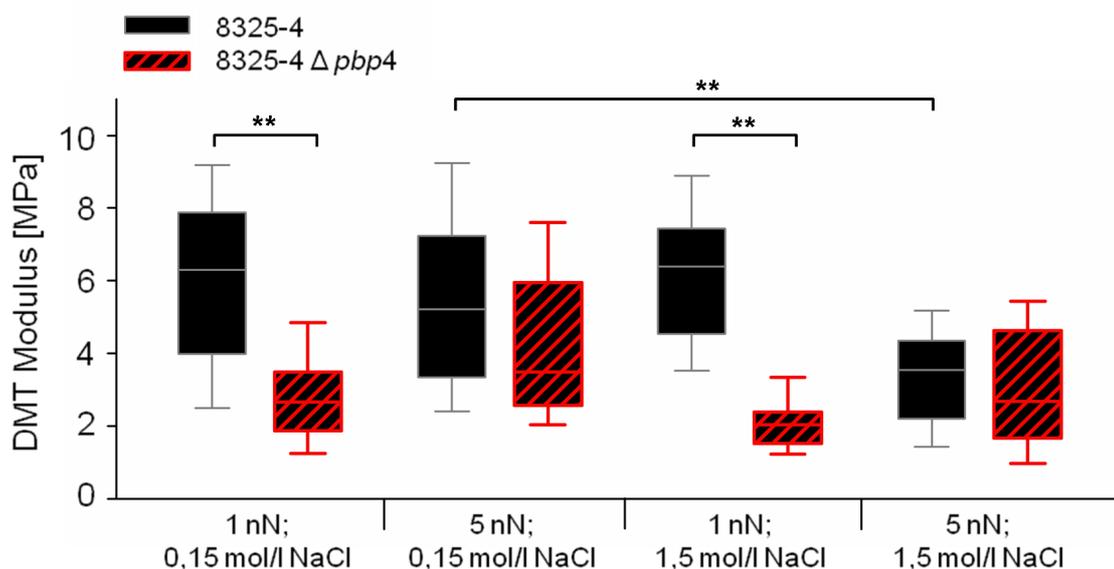


Abb. 14: Turgordruck-abhängige Zellelastizität von *S. aureus* 8325-4.

DMT Moduli der Isolate 8325-4 und 8325-4 $\Delta pbp4$. Zur Bestimmung der Turgordruck-abhängigen Zellelastizität, wurde die aufgewendete Auslösekraft der Messsonden von 1 nN, auf 5 nN erhöht. Der Messpuffer hatte eine NaCl Konzentration von 0,15 mol/l (isotonisch) bzw. 1,5 mol/l (hyperton). (Box: Median mit Interquartilsabstand, Antennen: 10 % und 90 % des Datenbereiches, **p < 0,01).

Der Turgordruck einer Zelle ist abhängig von der osmotischen Konzentration der Lösung, die die Zelle umgibt. Somit sollte die Erhöhung der NaCl-Konzentration des Messpuffers während der Messung den Turgordruck und damit den Elastizitätsmodulus senken. Elastizitätsmessungen bei einer erhöhten NaCl-

Konzentration (von 0,15 mol/l auf 1,5 mol/l NaCl) zeigten bei einer Auslösekraft von 1 nN weiterhin den, durch die reduzierte Zellwandquervernetzung der *pbp4* Deletion bedingten Unterschied in der Zellwandelastizität. Im Gegensatz dazu war bei einer Auslösekraft von 5 nN, bei keiner der NaCl-Konzentrationen ein Einfluss der Zellwandelastizität messbar. Darüber hinaus zeigte 8325-4 bei 1,5 mol/l NaCl, auf Grund des verringerten Turgordrucks, einen deutlich verringerten Elastizitätsmodulus gegenüber den Messungen bei 0,15 mol/l NaCl. Demnach konnte die Zellelastizität, unabhängig von der Zellwandelastizität, bestimmt werden. Dies stellt eine völlig neue AFM-Anwendung dar, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde. Um den Einfluss der Zellelastizität auf die Adhäsion zu untersuchen, wurden die Adhäsionskapazität der Stämme 8325-4 und 8325-4 $\Delta pbp4$ an humane Keratinozyten und humanes Plasma Fibronectin analog bei 1,5 mol/l NaCl bestimmt (Abb. 15).

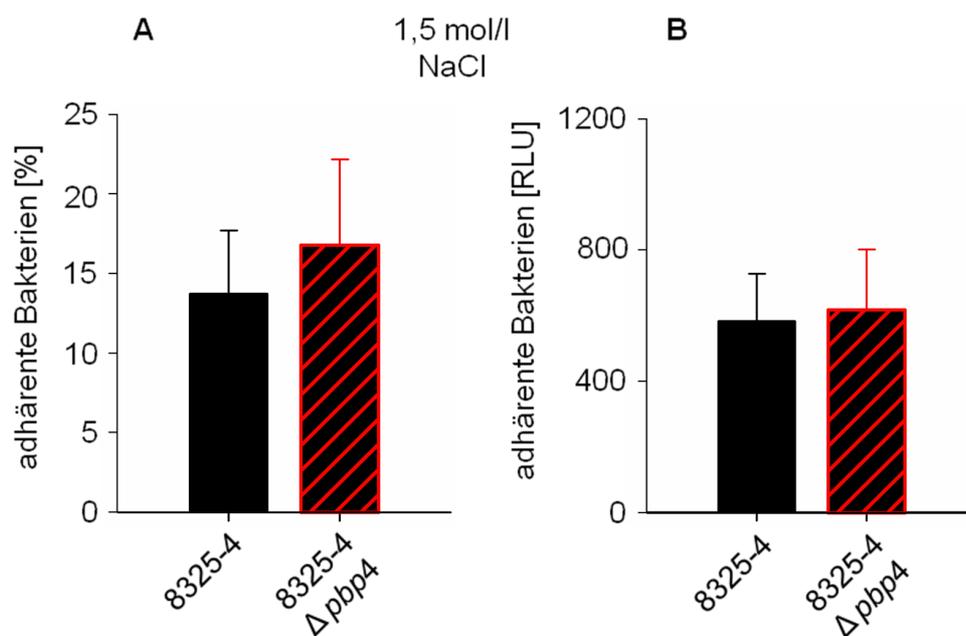


Abb. 15: Die Adhäsionskapazität von *S. aureus* 8325-4, in Abhängigkeit von Zellelastizität und Turgordruck.

Adhäsionskapazität von 8325-4 und 8325-4 $\Delta pbp4$, bei einer NaCl-Konzentration von 1,5 mol/l (hyperton), an **(A)** humane Keratinozyten und **(B)** humanes Plasma-Fibronectin.

Es konnten lediglich geringfügige Adhäsionsunterschiede zwischen den beiden Isolaten, oder zwischen den NaCl Konzentrationen von 0,15 mol/l und 1,5 mol/l beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Methode etabliert werden die Turgordruck-abhängige Zellelastizität zu messen. Der von Liu und Cheng postulierte Einfluss der Zellwandelastizität (Liu *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2012), und in logischer Folge auch der Zellelastizität, auf die Adhäsion konnte anhand der getesteten Stämme und experimentellen Bedingungen nicht bestätigt werden.

4.2 Untersuchung von *S. aureus* Immunevasions-Eigenschaften

4.2.1 Schutz vor der Phagozytose durch humane, polymorphkernige Neutrophile (PMN) in Vollblut

Die Fähigkeit sich vor der Phagozytose durch Immunzellen seines Wirtes zu schützen stellt eine bedeutende Immunevasions-Strategie von *S. aureus* dar. Zu den wichtigsten Strategien des Phagozytoseschutzes gehört die Hemmung der Opsonisierung durch Antikörper bzw. Faktoren des Komplementsystems (Uhlen *et al.*, 1984; Patel *et al.*, 1987; Cedergren *et al.*, 1993; Haupt *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2012), die Hemmung der Chemotaxis von Neutrophilen (Murdoch und Finn, 2000; Foster, 2005), die Bildung einer Polysaccharid-Kapsel (Baddour *et al.*, 1992; Thakker *et al.*, 1998; Nilsson *et al.*, 1999), sowie die Induktion der Bildung eines Fibrinnetzwerks aus Wirts-Fibrinogen als mechanische Barriere (McDevitt *et al.*, 1997; O'Brien *et al.*, 2002a).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Phagozytoseschutz von LA-MRSA CC398 Isolaten vor humanen PMN in einem Vollblutassay untersucht und mit CA-MRSA und HA-MRSA Isolaten verglichen. Es kamen 44 MRSA Isolate, darunter LA-MRSA CC398 Isolate (n=26) der *spa* Typen t011, t034 und t108, CA-MRSA Isolate (n=9) und HA-MRSA Isolate (n=9), zum Einsatz (Tab. 1). Im Vorfeld des Versuchs wurde das Blut der Spender durch Hämatogramme charakterisiert und enthielt im Mittel $3,17 \cdot 10^6$ PMN/ml (\pm Standardabweichung 1,1). Fluoreszenz-markierte *S. aureus* Zellen wurden mit einer Mol von ca. 50, in Relation der Anzahl an PMN zum Vollblut gegeben, für eine Stunde mit dem Vollblut koinkubiert und nachfolgend die

Aufnahme der Bakterien durch die PMN mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei konnten deutliche Unterschiede bezüglich der Phagozytoserate zwischen LA-MRSA CC398, CA-MRSA und HA-MRSA beobachtet werden (Abb. 16).

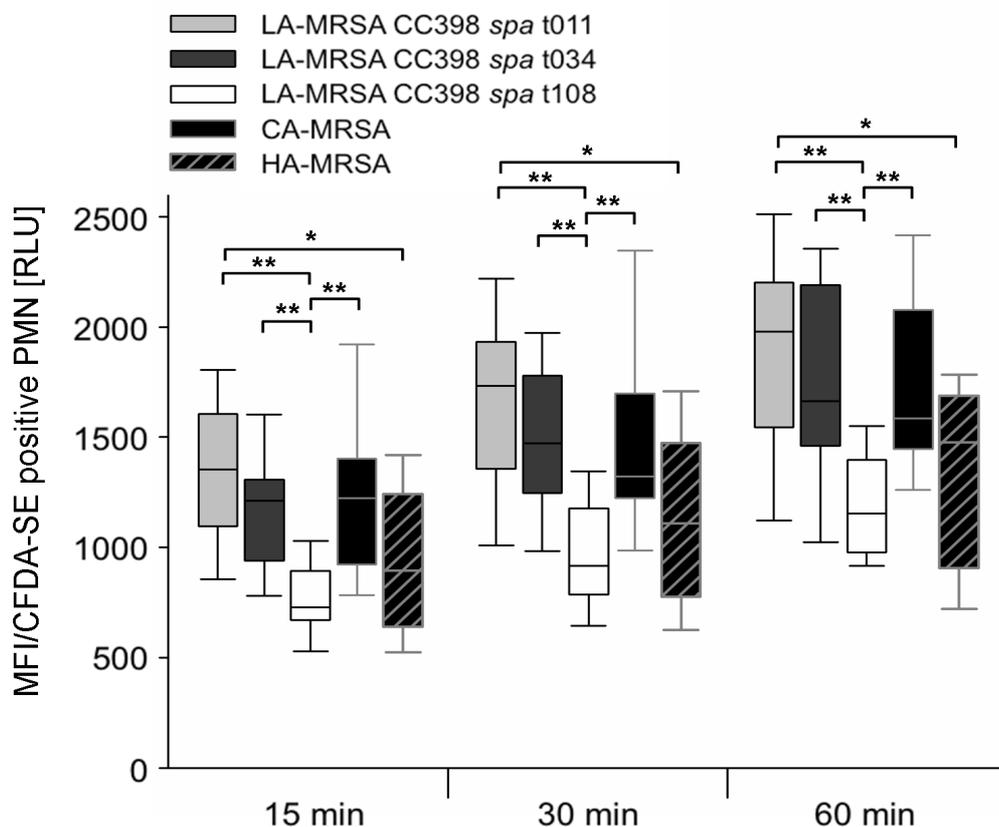


Abb. 16: Phagozytoserate von 44 MRSA Isolaten durch humane PMN in Vollblut.

CFSE-Fluoreszenz gefärbte Bakterien wurden mit humanem Vollblut koinkubiert, das infizierte Vollblut wurde nach 15, 30 und 60 min fraktioniert und die Erythrozyten wurden lysiert. Im Anschluss wurden die, von den PMN phagozytierten, Bakterien mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Dargestellt wird die MFI pro CFSE positiver PMN von LA-MRSA CC398 ($n = 26$), CA-MRSA ($n = 9$) und HA-MRSA ($n = 9$). Dabei wird LA-MRSA CC398 in die drei am häufigsten vorkommenden *spa* Typen unterteilt. Die Daten repräsentieren sechs unabhängige Wiederholungen (Box: Median mit Interquartilsabstand, Antennen: 10 % und 90 % Datenbereich, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Isolate des *spa* Types t108 wurden deutlich weniger effektiv von humanen PMN aufgenommen, als *spa* Typ t011 Isolate, t034 Isolate und CA-MRSA Isolate. Die HA-MRSA Isolate wurden mit einer vergleichbaren Rate durch die PMN phagozytiert, wie die *spa* Typ t108 Isolate. Insgesamt nahm die Phagozytoserate während der einstündigen Koinkubation, wenn auch geringfügig so doch konstant, zu, so dass

davon ausgegangen werden kann, dass bei dieser Mol innerhalb des Beobachtungsfensters noch keine Sättigung der Aufnahmefähigkeit der Immunzellen erreicht wurde. Abbildung 17 A zeigt mehrere humane PMN nach der Phagozytose des *spa* Typ t011 Isolats 1711 in Vollblut, umgeben von Erythrozyten.

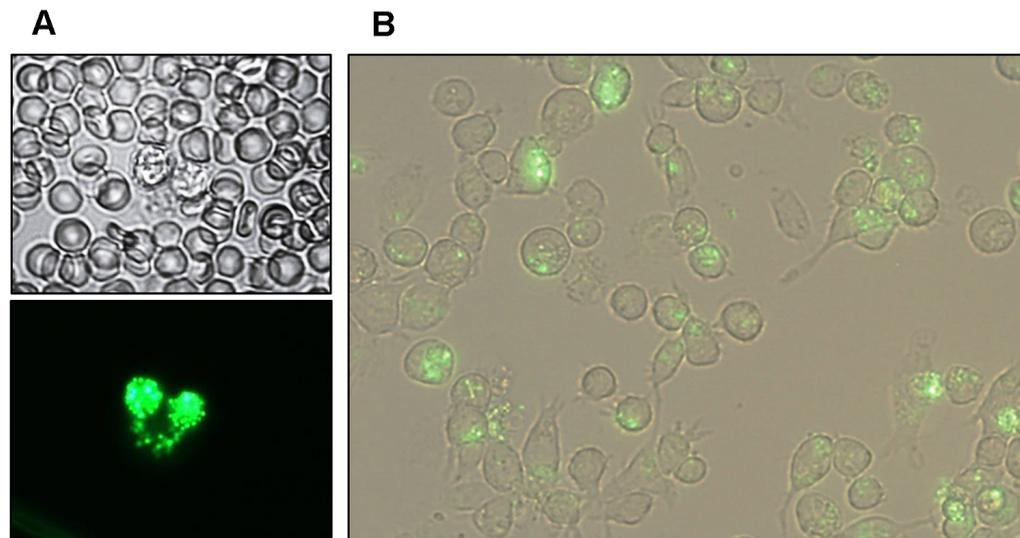


Abb. 17: CFDA-SE-Fluoreszenz gefärbte LA-MRSA CC398 nach der Phagozytose durch humane Neutrophile und Makrophagen.

(A) Mikroskopische Hellfeld- (oben) und Fluoreszenzaufnahme (unten; Anregungsfilter: 450-490 nm, Emissionsfilter: 515nm Langpass) einer lichtmikroskopischen Aufnahme mehrerer humaner PMN, nach der Phagozytose von LA-MRSA CC398 Isolat 1711 in humanem Vollblut, umgeben von Erythrozyten in 400-facher Vergrößerung. Isolat 1711 wurde 60 min mit Vollblut kokkubiert. (B) Überlagerung des Hellfeldes und Fluoreszenzkanals einer lichtmikroskopischen Aufnahme von THP-1 Makrophagen, nach der Phagozytose von LA-MRSA CC398 Isolat 1711 in 400-facher Vergrößerung. Die Makrophagen und Bakterien wurden für 90 min kokkubiert und die extrazellulären Bakterien wurden durch eine Lysostaphin und Gentamycin Behandlung zerstört.

4.2.2 Intrazelluläres Überleben in THP-1 Makrophagen

Auch wenn *S. aureus* dazu in der Lage ist, sich effektiv vor der Phagozytose durch Immunzellen seines Wirtes zu schützen, wird dennoch ein bedeutender Anteil von im Blutstrom zirkulierender *S. aureus* Zellen von Immunzellen aufgenommen. Deshalb hat *S. aureus* Strategien entwickelt die zum intrazellulären Überleben nach der Phagozytose beitragen (Foster, 2005). Dies geht so weit, dass die Rekrutierung von Neutrophilen am Infektionsort von *S. aureus* sogar induziert werden kann, um gezielt phagozytiert zu werden und sich somit anderer Immunreaktionen zu entziehen (Gresham *et al.*, 2000). Zum intrazellulären Überleben trägt beispielsweise die Modifikation negativ geladener Oberflächenstrukturen, wie Wand- und Lipoteichonsäuren bei. Dies führt zur verringerten Sensitivität gegenüber kationischer, antimikrobieller Peptide, die im Phagolysosomen von Neutrophilen ausgeschüttet werden (Foster, 2005). Eine weitere Strategie, die das intrazelluläre Überleben ermöglicht, ist die Sekretion von Superoxid Dismutasen und Katalase, um reaktive Sauerstoffspezies des Wirtes abzubauen (Karavolos *et al.*, 2003).

Vor diesem Hintergrund wurde die intrazelluläre Überlebensfähigkeit einer Auswahl von acht LA-MRSA CC398 Isolaten der *spa* Typen t011 (n=2), t034 (n=2) und t108 (n=4) für einen Zeitraum von bis zu 23 h in THP-1 Makrophagen untersucht. Die Isolate wurden mit einer Mol von 30 eingesetzt und nach 60 Minuten wurden zwischen 1,77 % und 8,73 % der Bakterienzellen von den Makrophagen aufgenommen. Abbildung 17 B zeigt Makrophagen, nach der Phagozytose Fluoreszenz-gefärbter LA-MRSA CC398 des Isolats 1711 (*spa* Typ t011), nach der Behandlung mit Lysostaphin und Gentamycin zum Entfernen der extrazellulären Bakterien. Die Anzahl der, aus dem Makrophagen-Lysat rückgewonnenen KbE nahm im Verlauf der 23 Stunden deutlich ab, wobei klare Unterschiede zwischen den getesteten Isolaten beobachtet wurden (Abb 18 A).

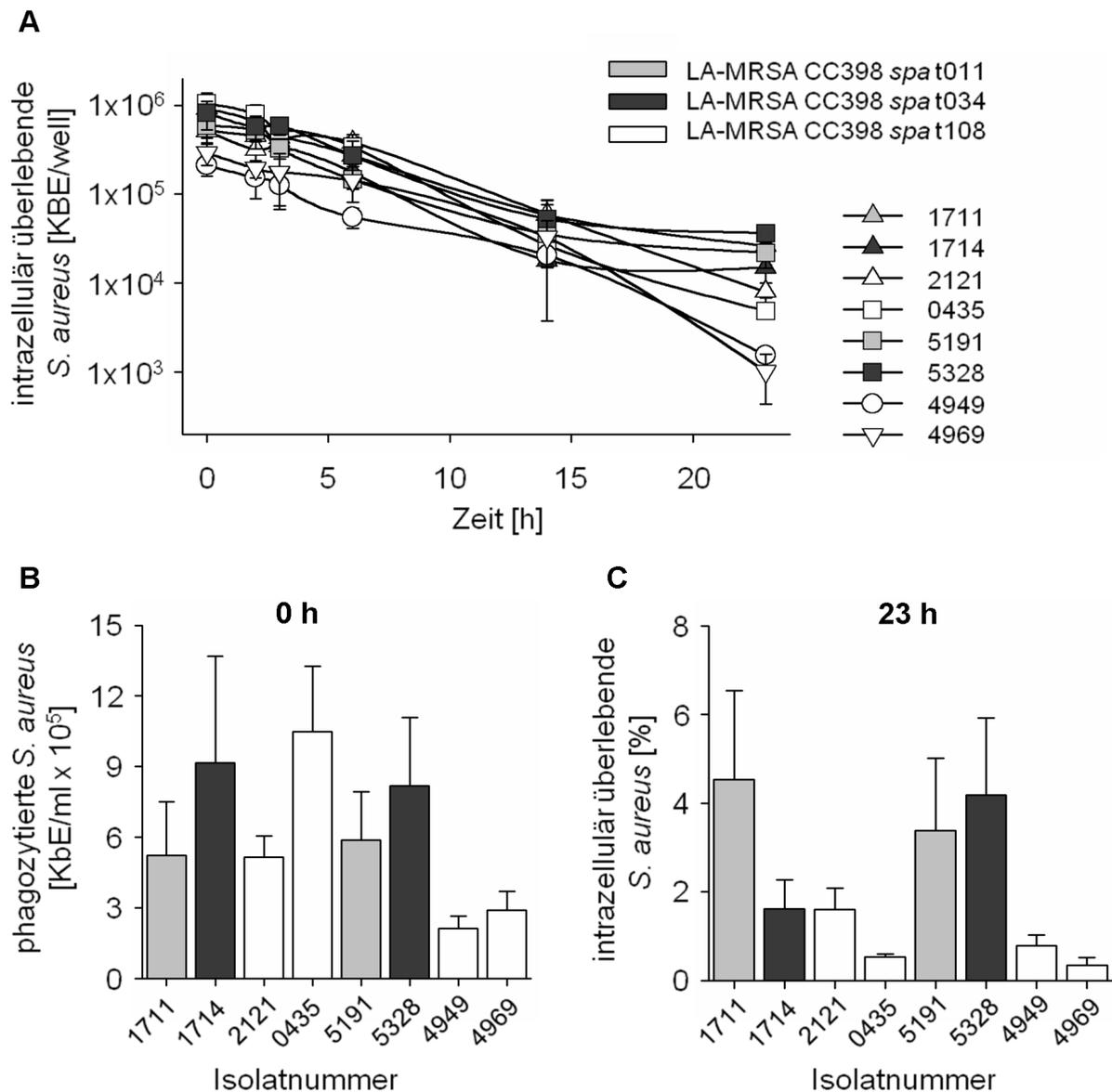


Abb. 18: Intrazelluläres Überleben von LA-MRSA CC398 in THP-1 Makrophagen.

Zellen der akuten myeloische Leukämie-Zelllinie THP-1 wurden durch Behandlung mit PMA zu THP-1 Makrophagen ausdifferenziert und mit LA-MRSA CC398 Isolaten koinkubiert (Mol 30). Extrazelluläre Bakterien wurden durch eine Behandlung mit Gentamycin und Lysostaphin entfernt. In Anwesenheit von Gentamycin wurden die infizierten Makrophagen für 2, 4, 6, 14 und 23 h weiter kultiviert. Die intrazellulär überlebenden Bakterien wurden nach der Lyse der Makrophagen rückgewonnen und die KbE/ml bestimmt. Die Daten repräsentieren mindestens sechs unabhängige Wiederholungen. **(A)** Zeitlicher Verlauf des intrazellulären Überlebens von acht LA-MRSA CC398 Isolaten der *spa* Typen t011, t034 und t108 in KbE/ml. **(B)** Phagozytoseraten zu Beginn des Experimentes. **(C)** Intrazelluläres Überleben nach 23 h, relativ zur Phagozytoserate. Isolate des *spa* Typs t108 überlebten signifikant schlechter als Isolate der *spa* Typen t011 und t034. Einzelne Signifikanzverhältnisse der Phagozytoserate und des intrazellulären Überlebens zwischen den Isolaten werden tabellarisch im Anhang dargestellt (Tab 32 und Tab 33).

Von den Isolaten des *spa* Typs t108 konnten insgesamt weniger KbE/ml rückgewonnen werden, als bei den *spa* Typen t011 und t034 Isolaten. Abbildung 18 B stellt die Phagozytose zu Beginn des Experimentes dar. Die *spa* Typ t034 Isolate 1714 und 5328, sowie das *spa* Typ t108 Isolat 0435 wurden mit einer vergleichsweise hohen Rate phagozytiert. Im Gegensatz dazu wurden die *spa* Typ t108 Isolate 4949 und 4969 deutlich schlechter durch die THP-1 Zellen aufgenommen. Insgesamt zeigte sich kein klares *spa* Typ-abhängiges Phagozytosemuster.

Die intrazellulären Überlebensraten der acht Isolate werden relativ zur jeweiligen Phagozytoserate dargestellt. Abbildung 18 C zeigt die Überlebensrate nach 23 Stunden. Dabei wurde bei den getesteten *spa* Typ t108 Isolaten eine deutlich geringere, relative Überlebensrate beobachtet, als bei den *spa* t011 und t034 Isolaten. Das *spa* Typ t011 Isolat 1714 zeigte ebenfalls eine reduzierte Überlebensrate, gegenüber den übrigen *spa* Typ t011 und t034 Isolaten. Interessanterweise wurden für die Isolate 1714 und 0435, welche mit am Besten durch die THP-1 Zellen phagozytiert worden waren nur vergleichsweise geringe relative Überlebensraten festgestellt.

Abschließend kann festgehalten werden, dass sich die intrazelluläre Überlebensrate der LA-MRSA CC398 Isolate in einem Zeitraum von 23 Stunden deutlich verringerte. Dabei überlebten Isolate des *spa* Typs t108 schlechter als Isolate der *spa* Typen t011 und t034. Ein Zusammenhang zwischen der Phagozytoserate durch THP-1 Makrophagen und die relative Überlebensrate wurde nicht festgestellt.

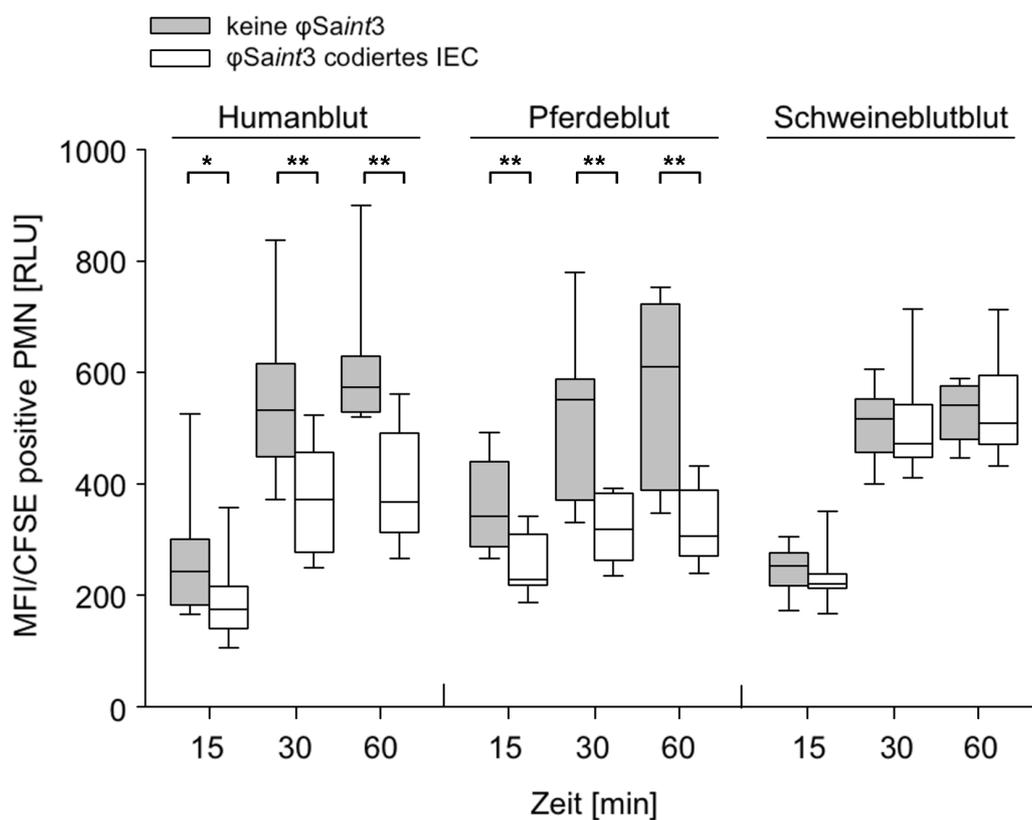
4.3 Einfluss einer ϕ Saint3 Integration auf die Wirtsspezifität von *S. aureus* CC398

4.3.1 Phagozytoseschutz von *S. aureus* CC398 Isolaten mit bzw. ohne ϕ Saint3 Intergration durch PMN

Das Komplementsystem von Säugetieren ist ein System aus Plasmaproteinen und an der angeborenen und adaptiven Immunantwort beteiligt. Insbesondere trägt es zur Opsonisierung von, im Blutstrom zirkulierenden Pathogenen, sowie der Rekrutierung und Chemotaxis von PMN bei (Foster, 2005). Die Faktoren des *S. aureus* Immunevasions Clusters (IEC) sind in der Lage, durch eine Inhibierung der C3 Konvertase, die Komplementbindungsreaktion zu hemmen und so die Opsonisierung der Bakterienoberfläche zu unterdrücken. Des Weiteren wird die chemotaktische Attraktion von PMN inhibiert, wodurch insgesamt ein Phagozytoseschutz vermittelt wird (van Wamel *et al.*, 2006). Für die einzelnen Komponenten des IEC wird eine primär humanspezifische Wirkung beschrieben (van Wamel *et al.*, 2006; McCarthy *et al.*, 2011). Das IEC wird durch ein MGE codiert, den Bakteriophagen *Saint3*. Der ϕ Saint3 ist in humanadaptierten *S. aureus* Isolaten, wie den nosokomial erworbenen HA-MRSA, sehr weit verbreitet, wird allerdings in Nutztier-assoziierten *S. aureus* Isolaten der CC398 Linie nur selten gefunden. Diese seltenen Funde gehen wiederum häufig auf Isolate zurück, die vom Menschen oder Pferd stammen (Cuny *et al.*, 2015). Um die Wirtsspezifität des IEC und dessen Einfluss auf die Virulenz von *S. aureus* CC398 zu testen, wurde die Phagozytose einer Auswahl von 20 *S. aureus* CC398 Isolaten (je 10 Isolate mit bzw. ohne Integration von ϕ Saint3 (Tab 2) durch PMN vom Menschen, Pferd und Schwein in Vollblut untersucht. Diese Isolate stehen in keinem Zusammenhang mit der Isolat-Auswahl, die für die Untersuchungen in den Versuchsteilen 4.1 und 4.2 verwendet wurden. Im Vorfeld der Untersuchungen wurde das Blut der Spender durch Hämatogramme charakterisiert (Tabelle 25) und die *S. aureus* Isolate wurden mit einer Mol von 100, in Relation der Anzahl der PMN zum Vollblut gegeben (Abb. 19).

Tab. 25: Konzentration der Immunzellen im Blut verschiedener Wirte

Wirt	Leukozyten (10^6 ml^{-1})	PMN (10^6 ml^{-1})	Monozyten (10^6 ml^{-1})	Lymphozyten (10^6 ml^{-1})
Mensch	$6,57 \pm 1.5$	$3,17 \pm 1.1$	$0,65 \pm 0.1$	$2,56 \pm 0.2$
Pferd	$8,88 \pm 0.4$	$6,15 \pm 0.3$	$0,57 \pm 0.4$	$1,71 \pm 0.4$
Schwein	$18,4 \pm 3.3$	$5,01 \pm 1.4$	$2,28 \pm 0.6$	$10,2 \pm 1.8$

**Abb. 19: Einfluss von ϕ Saint3 auf die Phagozytose von *S. aureus* CC398 durch PMN.**

CFSE-Fluoreszenz gefärbte Bakterien wurden mit Vollblut vom Menschen, Pferd und Schwein koinkubiert. Das infizierte Vollblut wurde nach 15, 30 und 60 min fraktioniert und die Erythrozyten lysiert. Im Anschluss wurden die, von den PMN phagozytierten, Bakterien mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Dargestellt wird die MFI pro CFSE positiver PMN von *S. aureus* CC398 ($n = 20$) mit bzw. ohne Integration von ϕ Saint3. Die Daten repräsentieren mindestens fünf unabhängige Wiederholungen (Box: Median mit Interquartilsabstand, Antennen: 10 % und 90 % des Datenbereiches, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

In Humanblut und Pferdeblut wurde festgestellt, dass Isolate mit einer ϕ Saint3 Integration deutlich weniger effektiv phagozytiert wurden, als Isolate ohne eine Integration von ϕ Saint3. Im Gegensatz dazu zeigte die ϕ Saint3 zu keinem Zeitpunkt einen Einfluss auf die Phagozytoserate in Schweineblut. Die Ergebnisse deuten an, dass das ϕ Saint3 codierte IEC nicht nur einen Schutz gegen die Phagozytose durch humane PMN vermittelt, sondern diese Funktion ebenso in equinen PMN erfüllt. Darüber hinaus wurde beobachtet dass die Phagozytoserate während einer einstündigen Koinkubation bei allen drei Wirten zunahm. Dabei verdoppelte sie sich zwischen 15 und 30 Minuten fast und erreichte im Verlauf der übrigen 30 Minuten eine annähernde Sättigung mit nur geringfügigem weiterem Ansteigen.

4.3.2 Phagozytoseschutz von isogenen *S. aureus* CC398 Isolatpaaren mit bzw. ohne ϕ Saint3 Integration, durch PMN

Im vorangegangenen Versuchsteil 4.3.1 wurde der Effekte einer ϕ Saint3 Integration auf PMN verschiedener Wirte mit einer Auswahl aus 20 *S. aureus* CC398 Isolaten gezeigt. Es ist davon auszugehen dass diese 20 verschiedenen Isolat-Hintergründe, über die Anwesenheit/Abwesenheit des IEC hinaus, über eine unterschiedliche Komposition an Immunevasionsfaktoren verfügen, welche die Phagozytose beeinflussen. Um Isolat-spezifische Effekte auszuschließen, wurden ϕ Saint3 positive/negative Paare, mit dem gleichen Isolat-Hintergrund hergestellt und nachfolgend untersucht. Diese isogenen Isolatpaare wurden hergestellt, indem ϕ Saint3 aus dem *spa* Typ t899 Isolat 11S00282 mobilisiert und anschließend in die Isolate 12-ST00**148** (t2123), 13-ST00**054** (t011) und 13-ST00**207** (t1456) transduziert wurde. Abbildung 20 zeigt die Phagozytoseraten der ϕ Saint3-negativen Mutterisolate, sowie der jeweiligen ϕ Saint3-positiven Isolatderivate, durch PMN vom Mensch, Pferd und Schwein nach einer 30 minütigen Koinkubation in Vollblut.

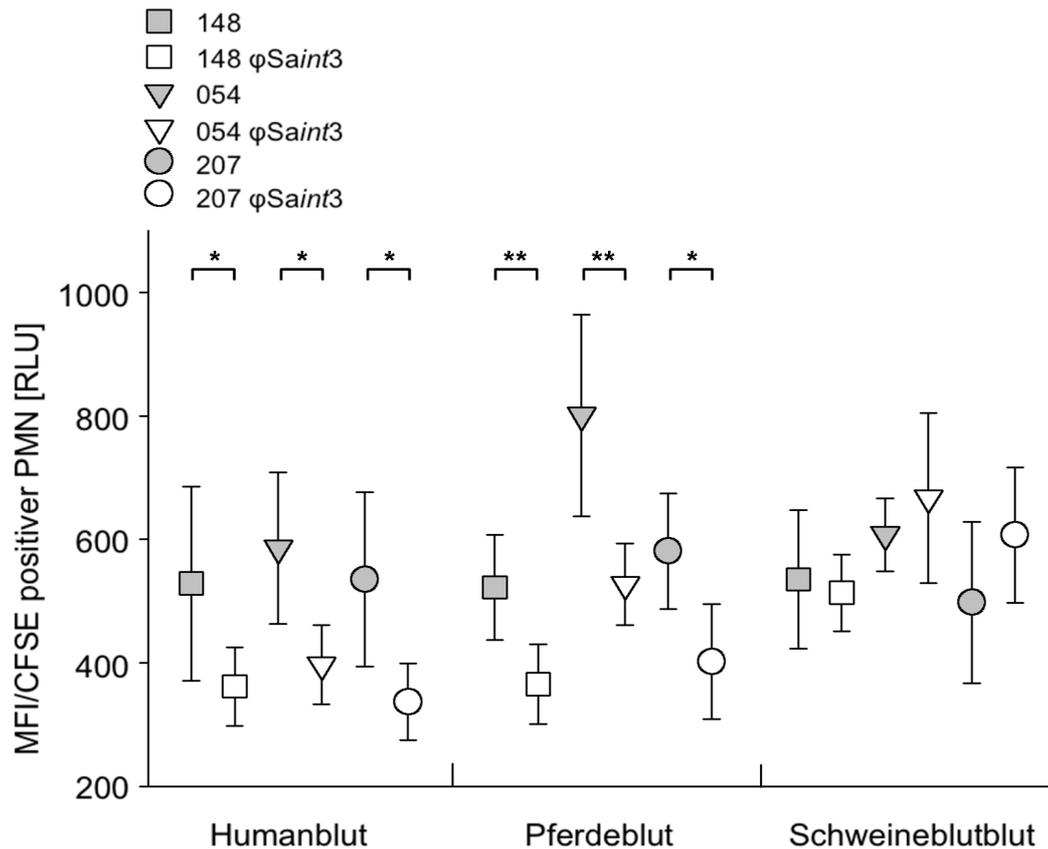


Abb. 20: Phagozytose von isogenen *S. aureus* CC398 Isolatpaaren mit bzw. ohne ϕ Saint3 Integration, durch PMN.

CFSE-Fluoreszenz gefärbte Bakterien wurden mit Vollblut vom Menschen, Pferd und Schwein kokkubiert. Das infizierte Vollblut wurde nach 30 min fraktioniert und die Erythrozyten lysiert. Im Anschluss wurden die von den PMN phagozytierten Bakterien mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Dargestellt wird die MFI pro CFSE-positiver PMN von drei isogenen *S. aureus* CC398 Isolatpaaren mit, bzw. ohne ϕ Saint3 Integration nach einer 30-minütigen Kokkubation. Die Daten repräsentieren mindestens vier unabhängige Wiederholungen (Mittelwerte mit Standardabweichungen, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Analog zu den vorangegangenen Untersuchungen zeigten die ϕ Saint3-positiven Isolatderivate eine geringere Phagozytoserate in humane und equine PMN, als ihre ϕ Saint3-negativen Mutterisolate. Auch der fehlende Effekt bei porcinen PMN konnte mit den isogenen Isolatpaaren bestätigt werden. Die Ergebnisse belegen den Einfluss der ϕ Saint3 codierenden Faktoren auf den Phagozytoseschutz in humanen und equinen PMN.

4.3.3 Hämolyseaktivität isogener *S. aureus* CC398 Isolatpaare mit bzw. ohne Integration von ϕ Saint3

Die Hämolyse von Erythrozyten ist ein wichtiger Virulenzmechanismus von *S. aureus* und sorgt für die Freisetzung von Eisen, das als Spurenelement benötigt wird. Dies wird durch spezifische Exotoxine, den sogenannten Hämolsinen, vermittelt. Dabei spielt das β -Hämolsin eine wichtige Rolle. Es beeinflusst unter anderem die Lyse von Erythrozyten, die Schädigung von Monozyten und Lymphozyten sowie die Viabilität von Keratinozyten (Walev *et al.*, 1996; Marshall *et al.*, 2000; Huseby *et al.*, 2007; Katayama *et al.*, 2013). Das β -Hämolsin codierende Gen *hlyB*, stellt die bevorzugte Insertionsstelle des ϕ Saint3 dar. Das bedeutet, dass die Fähigkeit, ein funktionelles β -Hämolsin zu produzieren durch die Insertion des Bakteriophagen verloren geht. Untersucht man den Einfluss einer ϕ Saint3 Insertion auf die Virulenz von *S. aureus*, muss, neben dem Gewinn der IEC Faktoren, auch der Verlust eines funktionellen *hlyB* berücksichtigt werden. Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit die Hämolyseaktivität der drei isogenen *S. aureus* CC398 Isolatpaare, die auch im Versuchsteil 4.3.2 verwendet wurden, analysiert. Dabei zeigte ein CAMP Test (Christie, Atkins, Munch-Petersen) (Christie *et al.*, 1944), bei den ϕ Saint3 negativen Mutterisolaten klare Hämolysehöfe in Regionen mit Überlappung mit *Streptococcus agalactiae*. Die ϕ Saint3 positiven Isolatderivate zeigten diese Hämolysehöfe nicht (Abb. 21 A). Dies belegt die Produktion von β -Hämolsin in den Mutterstämmen und zeigt die, durch ϕ Saint3 Insertion in den *hlyB* Locus, verlorengegangene Fähigkeit der Isolatderivate β -Hämolsin zu produzieren. Um die quantitative Hämolyseaktivität der Isolatpaare zu bestimmen, wurden Verdünnungsreihen sterilfiltrierter Kulturüberstände mit Erythrozyten vom Menschen, Pferd und Schwein kokkubiert. Insgesamt wurden dabei deutliche Unterschiede bezüglich des Hämolysetiters beobachtet (Abb. 21 B).

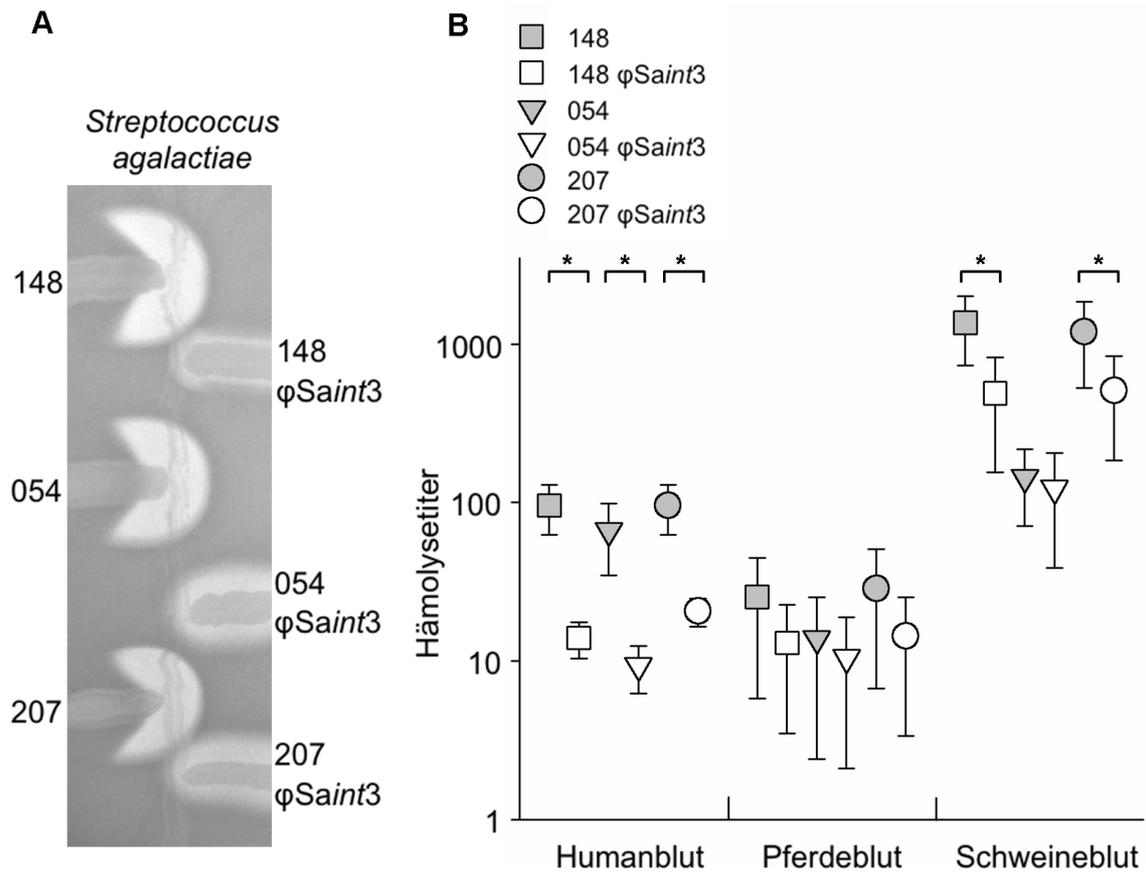


Abb. 21: Einfluss von ϕ Saint3 auf die Hämolyseaktivität von *S. aureus* CC398 Isolatpaaren.

(A) CAMP Test von *S. agalactiae* mit drei isogenen *S. aureus* CC398 Isolatpaaren mit bzw. ohne Integration von ϕ Saint3, zur Darstellung der Produktion von β -Hämolysin. Die Isolate wurden auf TSA mit 5 % Schafsblut ausgestrichen. (B) Hämolyseaktivität von sterilfiltrierten Kulturüberständen von drei isogenen *S. aureus* CC398 Isolatpaaren, mit bzw. ohne ϕ Saint3 Integration, auf Erythrozyten vom Menschen, Pferd und Schwein. Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs unabhängigen Wiederholungen (* $p < 0,05$).

Während humane Erythrozyten bereits bei Kulturüberstand-Verdünnungen zwischen 1:64 und 1:256 lysiert wurden, waren Verdünnungsstufen zwischen 1:8 und 1:32 erforderlich, um equine Erythrozyten zu lysieren. Die Sensitivität porciner Erythrozyten schien hingegen stark erhöht zu sein, diese wurden bereits bei Verdünnungen zwischen 1:512 und 1:2048 vollständig lysiert. Dies verdeutlicht das wirtsabhängige Hämolysepotential von *S. aureus* CC398.

Weiterhin zeigte sich ein deutlicher Einfluss der ϕ Saint3 Insertion bei der Lyse humaner Erythrozyten. Diese wurden von den ϕ Saint3 negativen Mutterisolaten etwa

10-fach effizienter lysiert als von den ϕ Saint3 positiven Isolatderivaten. Auch bei porcinen Erythrozyten wurde bei zwei von drei isogenen Isolatpaaren ein signifikanter Einfluss der ϕ Saint3 Insertion festgestellt. Dieser war allerdings deutlich geringer als bei Erythrozyten vom Menschen. Im Gegensatz dazu, wurde bei der Lyse equiner Erythrozyten keine Abhängigkeit von einer ϕ Saint3 Insertion beobachtet. Die Ergebnisse deuten an, dass das β -Hämolysin substantziell zur Hämolyse humaner Erythrozyten beiträgt, bei der Lyse porciner und equiner Erythrozyten jedoch von geringer bzw. keiner Bedeutung ist.

4.4 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Wie bereits in einer Studie von Uhlemann und Kollegen (2012) für einzelne CC398 Isolate beschrieben, zeigten Isolate der CC398 Linie insgesamt eine geringe Adhäsionsfähigkeit an humane Keratinozyten. Allerdings stellt die epidemiologische Subgruppe des *spa* Typs t108, mit einer deutlich erhöhten Adhäsionskapazität gegenüber anderen CC398 *spa* Typen, eine Ausnahme dar. Diese liegt in einem vergleichbaren Bereich wie, typische humanadaptierte CA-MRSA und HA-MRSA Isolate. Bei humanem und bovinem Plasma-Fibronektin wurde ein vergleichbares Adhäsionsmuster wie bei humanen Keratinozyten beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde bei *spa* Typ t108 Isolaten keine erhöhte Adhäsionskapazität an humanes Fibrinogen festgestellt. Die erhöhte Plasma-Fibronektinadhäsion von Isolaten dieses *spa* Typs kann, zumindest teilweise, durch eine deutlich erhöhte Transkription der Gene der Fibronektin-bindenden Proteine FnbA und FnbB gegenüber Isolaten anderer *spa* Typen der CC398 Linie erklärt werden. Weiterhin trägt eine Punktmutation, die zu einem Stoppcodon bei Aminosäure 372 bei *fnbB* führt, zu dem *spa* Typ abhängigen Fibronektin-Adhäsionsmustern bei. Diese Punktmutation scheint bei *spa* Typ t108 Isolaten nur selten vorzukommen, ist bei Isolaten anderer *spa* Typen der CC398 Linie jedoch häufiger zu finden.

Der durch Liu (2008), Chen (2012) und Kollegen beschriebene Einfluss der viskoelastischen Zellwandeigenschaften während der Adhäsion von Staphylokokken an ein Substrat konnte nicht bestätigt werden. Weiterführend wurde im Rahmen dieser Arbeit ein AFM-basiertes Verfahren entwickelt, um die Turgordruck-abhängige Zellelastizität messen zu können. Die Zellelastizität scheint die Adhäsionskapazität

allerdings ebensowenig zu beeinflussen wie die Elastizität der Zellwand. Demnach scheint die Zell- und Zellwandelastizität, zumindest unter den hier gegebenen experimentellen Bedingungen, von keiner bzw. untergeordneter Bedeutung für die Adhäsionskapazität der untersuchten *S. aureus* Isolate zu sein und nicht zu den beobachteten Adhäsionsmustern an humane Keratinozyten, bzw. Plasma-Fibronektin beizutragen.

Weiterhin wurden die Immunevasions-Strategien des Phagozytoseschutzes vor PMN sowie des intrazellulären Überlebens nach der Phagozytose durch Makrophagen untersucht. Auch hier wurden Besonderheiten der epidemiologischen Subgruppe der *spa* Typ t108 Isolate deutlich. Diese Isolate wurden weniger effizient von PMN aufgenommen als Isolate anderer *spa* Typen der CC398 Linie und CA-MRSA Isolate. Interessanterweise schien das Potential von *spa* Typ t108 Isolaten nach der Phagozytose intrazellulär zu überleben, im Vergleich mit anderen CC398 Isolaten, reduziert zu sein. Die Ergebnisse legen nahe, dass Isolate dieses *spa* Typs zwar dazu in der Lage sind, sich besser als andere Isolate der CC398 Linie vor der Phagozytose durch PMN zu schützen, sollten sie allerdings dennoch phagozytiert werden, werden sie effizienter intrazellulär abgetötet.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde der Einfluss des ϕ *Saint3* codierten IEC auf die Wirtsspezifität von *S. aureus* CC398 bestimmt. Für die Komponenten des IEC wird eine Humanspezifität in Mensch assoziierten *S. aureus* Isolaten beschrieben (van Wamel *et al.*, 2006). Untersuchungen der Phagozytoserate durch PMN zeigten jedoch, dass die ϕ *Saint3* Integration in *S. aureus* CC398 Isolaten nicht nur einen Phagozytoseschutz vor PMN vom Menschen sondern auch vor PMN vom Pferd vermittelt. Im Gegensatz dazu beeinflusste die ϕ *Saint3* Integration die Aufnahmen durch PMN vom Schwein nicht. ϕ *Saint3* inseriert bevorzugt in das Gen des β -Hämolytins, wodurch dessen Funktion verloren geht. Dieser Verlust führte zum Teil zu einem deutlich reduzierten hämolytischen Potential von ϕ *Saint3* positiven *S. aureus* CC398 Isolaten, im Vergleich mit isogenen ϕ *Saint3* negativen Isolatderivaten. Dieser Unterschied war bei Erythrozyten vom Menschen deutlich stärker ausgeprägt als bei Erythrozyten vom Schwein. Bei Pferde-Erythrozyten hingegen verursachte der Verlust eines funktionellen β -Hämolytins kein reduziertes hämolytisches Potential.

5 Diskussion

5.1 Untersuchung der LA-MRSA CC398 Wirtsadhäsion

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, spielt die spezifische Adhäsion, vermittelt durch die kovalent in der Zellwand verankerten MSCRAMMs, eine wichtige Rolle bei der Anbindung von *S. aureus* an die Zellen seines Wirtes. Verschiedene MSCRAMMs adhären dabei spezifisch an nur einen bzw. wenige Wirtsfaktoren der extrazellulären Matrix oder der Zellwand. In diesem Zusammenhang wird unter anderem die Adhäsion an Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin, Keratin, Bonesialprotein, Elastin, Collagen und den von Willebrand Faktor beschrieben (Heilmann, 2011). Dabei adhären die MSCRAMMs FnbA und B spezifisch an Fibronectin, Elastin und eingeschränkt an Fibrinogen (Signas *et al.*, 1989). ClfA und B sind die primären Fibrinogen bindenden Faktoren, adhären aber ebenso an Keratin (McDevitt *et al.*, 1997; Ni Eidhin *et al.*, 1998; O'Brien *et al.*, 2002b). Protein A bindet unter anderem den von Willebrand Faktor (Corrigan *et al.*, 2009; Heilmann, 2011). Collagen wird insbesondere durch Cna (engl. Collagen binding adhesin) gebunden (Patti *et al.*, 1995) und Bbp (bone sialoprotein-binding protein) adhärert an das Knochen-Sialprotein (Tung *et al.*, 2000). Neben den MSCRAMMs vermitteln ebenso die SERAM eine spezifische Adhäsion (Heilmann, 2011). Dabei bewirken Eap und Emp unter anderem die Adhäsion an Vitronectin, Fibronectin und Fibrinogen (Wann *et al.*, 2000; Roche *et al.*, 2004; Corrigan *et al.*, 2009; Heilmann, 2011). Das Set aus 44 MRSA Isolaten, mit dem im Rahmen dieser Arbeit Experimente zur Adhäsion von *S. aureus* durchgeführt wurden, wurde mit einem DNA-Microarray (Alere, StaphyType Microarray I) charakterisiert (Ballhausen *et al.*, 2014). Dabei wurde die codierenden Gene von FnbA und B, Clf A und B, Protein A, Bba, sowie Eap, und Emp in allen getesteten Isolaten nachgewiesen. Das Gen des Cna hingegen war zwar in allen LA-MRSA CC398 Isolaten vorhanden, fehlte allerdings in drei der CA-MRSA Isolate bzw. sechs der HA-MRSA Isolate.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist die *S. aureus* Adhäsion an Fibronectin und Fibrinogen von prominenter Bedeutung. Beim Wirt sind diese beiden Faktoren im Verschluss von Wunden und der anschließenden Reepithelisation beteiligt (Alberts, 2002). Im Blutplasma gelöstes Plasma-Fibronectin wird dabei von Keratinozyten über Integrin Rezeptoren (im Besonderen $\alpha 5\beta 1$ Integrin) gebunden,

was zur Migration der Keratinozyten und schließlich zur Bildung einer neuen Gewebematrix führt. (Larjava *et al.*, 1993; Putnins *et al.*, 1999). In Hinblick auf die *S. aureus* Adhäsion an Wirtsgewebe fungiert Fibronectin als Adaptermolekül zwischen den Zellwand-gebundenen Fnbs und Integrin. Auch Endothelzellen verfügen über Plasma Fibronectin bindende Integrine. Außerdem ist Fibronectin Teil der extrazellulären Matrix von Endothelzellen (Short *et al.*, 1998).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Adhäsion verschiedener *S. aureus* Linien zeigten große Ähnlichkeiten zwischen dem Adhäsionsmuster an humane Keratinozyten (Abb. 5) und humanes/bovines Fibronectin (Abb. 6), mit einer insgesamt niedrigen Adhäsionskapazität der LA-MRSA CC398 Isolate im Vergleich zu den getesteten humanadaptierten CA-MRSA und HA-MRSA Isolaten. Isolate des *spa* Typ t108 bildeten eine Ausnahme innerhalb der CC398 Linie und adhärten ähnlich effektiv wie die Mensch-assoziierten CA-MRSA und HA-MRSA Stämme. Untersuchungen, die parallel zu dieser Arbeit im Zuge einer gemeinsamen Publikation von Kooperationspartnern durchgeführt wurden, zeigten das gleiche Muster bei der humanen Endothel-Zelllinie EA.hy926 (Ballhausen *et al.*, 2014).

Im Blutplasma ist Fibronectin in größeren Mengen (300-400 µg/ml) vorhanden (Mosher, 2006) und steht Zellen zum Beispiel während Wundheilungsprozessen zur Bindung zur Verfügung. Unter den experimentellen Bedingungen eines Zellkulturmodells ist das nicht zwingend der Fall. Den Zellen, die in den hier durchgeführten Adhäsionsassays verwendet wurden, wurde zwar kein humanes Plasma Fibronectin zugesetzt, allerdings war in den Zellkulturmedien FCS und somit bovines Plasma Fibronectin enthalten, das potentiell von den Zellen rückgebunden worden sein könnte und die Adäsion an Zellen mitvermittelt haben könnte. Die Beobachtung, dass es zwischen bovinem und humanem Plasma Fibronectin keine Unterschiede bezüglich der Adhäsion der getesteten MRSA Isolate gab, stützt diese Hypothese. Die Ähnlichkeiten der Adhäsionsmuster zwischen Fibronectin und den beschriebenen Zelltypen unterstreicht die Bedeutung von Fibronectin als Bindefaktor der Adhäsion von *S. aureus*. Die Ergebnisse legen somit nahe, dass die Vermittlung der spezifischen Adhäsion an Fibronectin, über FnbA und FnbB, eine bedeutende Rolle in der Anbindung von *S. aureus* an Epithel und Endothelzellen spielt.

Die mittels Spektroskopie gemessenen Adhäsionskräfte zwischen den acht CC398 Isolaten und humanem Plasma-Fibronektin folgten insgesamt dem Muster der Adhäsionskapazitäten, das mit der 96 Well-Platten basierten Methode bestimmt wurde (Abb. 7). Allerdings wich ein Isolat (Isolat 2121) von diesem Muster ab und zeigte eine moderate bis hohe Adhäsionskraft, trotz einer geringen Adhäsionskapazität an Fibronektin. Ein zweites Isolat (Isolat 4949) wies hingegen eine relativ geringe Adhäsionskraft bei hoher Adhäsionskapazität auf. Mögliche Erklärungsansätze für diese Abweichungen sind die grundsätzlich anderen Messverfahren, mit denen die Daten ermittelt wurden und die damit verbundenen unterschiedlichen experimentellen Ablöseprozesse. Bei der Bestimmung der Adhäsionskapazität mit der 96 Well-Platten-basierten Methode wird eine große Zahl an Bakterien (ca. $1,5 \cdot 10^8$) pro Well eingesetzt und diese liegen zunächst planktonisch im Überstand vor. Nach dem Sedimentieren und Anbinden an das immobilisierte Fibronektin werden nicht adhärente bzw. schlecht adhärente Bakterien durch Waschen mit Puffer entfernt. Das Spülen mit Puffer bringt eine relative große horizontale Kraftkomponente und Scherkräfte mit sich. Es ist zu erwarten, dass dies zu einer horizontalen Abrollbewegung, anstelle eines einfachen vertikalen Ablösens führt. Im Gegensatz dazu werden bei der Kraftspektroskopie Fibronektin-beschichtete Messsonden mit einzelnen immobilisierten Bakterien in Kontakt gebracht und zur Messung wieder abgelöst. Dabei überwiegt die vertikale Kraftkomponente, eine vernachlässigbare horizontale Kraftkomponente kommt lediglich durch die Schrägstellung bzw. Auslenkung der Messsonde zustande. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass FnbA und B auf der Bakterienoberfläche nicht gleichmäßig verteilt sind, sondern in dichteren/weniger dichten Clustern vorliegen. Eine Studie aus dem Jahr 2010 beschreibt eine solche Clusterung bei einem zellwandgebundenen Adhäsionsprotein (Als5p) auf der Zelloberfläche von *Candida albicans*, im Hefestadium (Alsteens *et al.*, 2010). Sollte bei *S. aureus* eine ähnliche Clusterung zellwandgebundener Proteine vorliegen, wird die Kraftspektroskopie mit Fibronektin, neben der Dichte von FnbA und B, auch von der Orientierung der *S. aureus* Zellen während der Immobilisierung beeinflusst. Insgesamt aber scheint die unterschiedliche Fähigkeit von *S. aureus* Isolaten, an Fibronektin zu adhären, zumindest teilweise mit einer variierenden Adhäsionskraft erklärbar zu sein. Der wahrscheinlichste Grund für diese variierende

Adhäsionsstärke bzw. Adhäsionskapazität ist eine dichtere Packung von FnbA und B auf der bakteriellen Zelloberfläche.

Die deutlich erhöhte Transkription der für die Fibronectin-bindenden Proteine FnbA und FnbB in CC398 Isolaten des *spa* Typs t108 codierenden Gene, gegenüber der *fnbA* und *fnbB* Transkription in *spa* Typ t011 und t034 Isolaten, bestätigt diese Vermutung (Abb. 9). Dabei übersteigt die *fnbA* Transkription der t108 Isolate die der t011 und t034 Isolate bis zu einem Faktor von 30. Bei *fnbB* wurde sogar eine bis zu 100-fach stärkere Expression bestimmt. Der regulatorische Grund für diese Transkriptionsunterschiede konnte nicht abschließend aufgeklärt werden. Die Transkription der MSCRAMMs und Virulenzfaktoren im Allgemeinen, wird bei *S. aureus* durch ein komplexes Netzwerk an Regulatoren gesteuert und in Abhängigkeit von Nährstoffverfügbarkeit, Umwelteinflüssen und der Wachstumsphase moduliert (Bronner *et al.*, 2004; Cheung *et al.*, 2004). Häufig liegen diese Regulatoren in Form von Zwei-Komponenten-Systemen vor (Arvidson und Tegmark, 2001). Zwei Regulationssysteme mit zentraler Bedeutung für die Expression der Fibronectinbindeproteine sind der *agr*-Lokus (engl. Accessory gene regulator), sowie der alternative Sigmafaktor σ^B . Der *agr*-Lokus dient dem Quorum sensing, der Zelldichtemessung der *S. aureus* Population (Novick, 2003; Yarwood *et al.*, 2004). Weiterhin beeinflusst er die Transkription von Oberflächenproteinen, wie den MSCRAMMs, negativ (Cheung *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu ist σ^B in der Anpassung an veränderte Umwelteinflüsse bzw. Stresssituationen sowie Infektionsprozessen beteiligt (Chan *et al.*, 1998). Die Transkription vieler MSCRAMMs wird durch die Aktivität von σ^B positiv reguliert (Gertz *et al.*, 2000; Nair *et al.*, 2003; Bischoff *et al.*, 2004). Um den Einfluss dieser beiden Regulatorsysteme auf die *fnbA* und *B* Expression innerhalb der acht CC398 Isolate zu untersuchen, wurde die Transkription des σ^B Markergens *asp23* (Gertz *et al.*, 1999; Gertz *et al.*, 2000) sowie des Gens des *agr* Effektor-Moleküls *RNAIII* in 3 Stunden alten Flüssigkulturen bestimmt. Dabei zeigte die Transkription von *asp23* in den untersuchten Isolaten nur geringfügige Unterschiede. Dies legt nahe, dass die stark erhöhte *fnbA* und *B* Expression der *spa* Typ t108 Isolate nicht auf eine veränderte σ^B Aktivität zurückzuführen ist. Allerdings wiesen zwei der *spa* Typ 108 Isolate (Isolat 4949 und 4969) eine reduzierte *RNAIII* und somit *agr*-Aktivität auf. Da *agr* die Transkription von Oberflächenproteinen negativ beeinflusst, ist eine erhöhte *fnbA* und *B* Transkription bei reduzierter *agr* Aktivität plausibel und mag somit zu der

erhöhten Adhäsionsfähigkeit der Isolate 4949 und 4969 beigetragen haben. Allerdings zeigten die beiden übrigen *spa* Typ t108 Isolate (2121 und 0435) keine veränderte *agr* Aktivität und wiesen dennoch die bereits beschriebene, erhöhte *fnbA* und *B* Transkription auf. Deshalb stellt sich die Frage, welche weiteren Regulatoren an der Modulation der *fnbA* und *B* Transkription beteiligt sind und somit das hohe Expressionslevel dieser Adhäsine bei den *spa* Typ t108 Isolaten erklären könnten. Dafür kommt unter anderem der von Cheung und Kollegen (Cheung *et al.*, 1992) erstbeschriebene *sarA* (engl. staphylococcal accessory regulator A) Locus in Frage. SarA reguliert die *fnbA* und *B* Transkription positiv und unabhängig von der Aktivität des *agr* Locus (Wolz *et al.*, 2000). Mehrere Studien beschreiben außerdem einen positiv regulierenden Einfluss des *sae* Operons auf die Transkription von *fnbA* und *B* (Steinhuber *et al.*, 2003). Beim *sae* System handelt es sich allerdings um ein nachgeordnetes Regulatorsystem, dessen Aktivität unter anderem von *agr* und σ^B beeinflusst wird (Mainiero *et al.*, 2010). Für weiterführende Studien zur Aufklärung der hohen *fnbA* und *B* Expression der *spa* Typ t108 Isolate könnte ein möglicher Einfluss dieser Regulatoren untersucht werden.

Neben der erhöhten *fnbA* und *B* Transkription der *spa* Typ t108 Isolate wurde eine genetische Besonderheit gefunden, die ebenfalls zu Unterschieden in der Adhäsionsfähigkeit an Fibronektin beitragen kann. Bei fünf der acht untersuchten CC398 Isolate wurde eine Punktmutation bei *fnbB*, bei Aminosäure 372 identifiziert. Diese Punktmutation führt zu einem verfrühten Stopcodon und legt nahe, dass Isolate, die diese Punktmutation tragen, nicht in der Lage sind ein funktionelles, zellwandgebundenes FnbB zu produzieren. Dieselbe Punktmutation wurde bereits zuvor in zwei Ganzgenom-sequenzierten CC398 Isolaten aus den Niederlanden bzw. Kanada gefunden und beschrieben: Isolat S0385 (GeneBank: AM990992.1) und Isolat 08BA02176, (GeneBank: CP003808.1) (Schijffelen *et al.*, 2010; Golding *et al.*, 2012). Es ist nicht unwahrscheinlich dass diese Punktmutation und somit das nicht-funktionale FnbB innerhalb der CC398 Linie recht verbreitet ist. Interessanterweise trugen alle getesteten *spa* Typ t011 und t034 Isolate die Punktmutation, während lediglich eines von vier getesteten *spa* Typ t108 Isolaten (Isolat 2121) das nicht-funktionale *fnbB* aufwies.

In diesem Zusammenhang muss angemerkt werden, dass vereinzelte *spa* Typ t011 und t034 Isolate (Isolat 5191 und 5328) trotz einem vergleichsweise niedrigen *fnbA* Expressionsniveau sowie dem Tragen der Punktmutation in *fnbB* dennoch eine

moderate bis hohe Adhäsionskapazität an Fibronectin zeigten. Diese genetischen, bzw. transkriptionalen Besonderheiten sind demnach lediglich als Faktoren zu sehen, die einen Einfluss auf das Adhäsionspotential der CC398 Linie ausüben und nicht als umfassende Erklärung für die Unterschiede im Adhäsionsverhalten.

Die erhöhte Adhäsionskapazität der *spa* Typ t108 Isolate gegenüber den t011 und t034 Isolaten war bislang unbekannt, so dass die gemeinsame Publikation mit Kooperationspartnern des Universitätsklinikums Münster die Erstbeschreibung dieser besonderen Virulenzeigenschaft innerhalb der CC398 Linie ist (Ballhausen *et al.*, 2014). Vor dem Hintergrund der erhöhten Adhäsionskapazität von Isolaten des *spa* Typs t108 stellt sich die Frage, ob diese Besonderheit zu veränderten Verbreitungsmustern gegenüber anderer Subgruppen des CC398 führt, bzw. ob *spa* Typ t108 Isolate generell eine Sonderstellung innerhalb der CC398 Linie einnehmen. Epidemiologisch stellt der *spa* Typ t108 (08-16-02-25-24-25) eine *spa* Repeat Variante von t011 (08-16-02-25-34-24-25) und t034 (08-16-02-25-02-25-34-24-25) dar und leitet sich ursprünglich von *spa* Typ t011 ab (Harmsen *et al.*, 2003).

Eine ganze Reihe von Studien beschreibt im Zusammenhang mit CC398 die hohe Prävalenz von Isolate der *spa* Typen t011, t034 und t108 in Deutschland und den Niederlanden (Köck *et al.*, 2009b; Fessler *et al.*, 2012; Schaumburg *et al.*, 2012; Tavakol *et al.*, 2012; Köck *et al.*, 2013; van Duijkeren *et al.*, 2014). Betrachtet man dieses *spa* Typ Triplet, scheint t108 der lediglich am dritthäufigsten vorkommende *spa* Typ zu sein. Beispielsweise gibt die Studie von Köck und Kollegen aus dem Jahr 2009 das prozentuale Vorkommen der *spa* Typen bei Patienten mit einer Kolonisierung durch LA-MRSA CC398 im Universitätsklinikum Münster (UKM) mit 56 % (t011), 39 % (t034) und 3 % (t108) an. Dabei sind am UKM insgesamt 18,6 % der MRSA Kolonisierungen von Patienten mit der CC398 Linie assoziiert (Köck *et al.*, 2013). Dies deutet an, dass die erhöhte Adhäsionsfähigkeit von Isolaten des *spa* Typs t108 sich nicht in einer höheren Kolonisierungsrate gegenüber t011 und t034 Isolaten widerspiegelt. Zwar berichtete eine niederländische Studie von 2007 von deutlich höheren *spa* Typ t108 Kolonisierungsraten (40 % aller CC398 Isolate) verglichen mit Isolaten der *spa* Typen t011 (23 %) und t034 (17 %) (van Loo *et al.*, 2007), weitere Studien bestätigen dieses Verbreitungsmuster jedoch nicht.

Auch CC398 assoziierte Infektionen beim Menschen werden bei *spa* Typ t108 und anderen *spa* Typen gleichermaßen beschrieben (Görge *et al.*, 2015). Allerdings

scheint die geografische Verbreitung eine Besonderheit des *spa* Typ t108 darzustellen. In diesem Zusammenhang werden Infektionen mit diesem *spa* Typ vorrangig in Nordeuropa, im Nordwesten Deutschlands, Teilen Frankreichs, Dänemark und den Niederlanden beschrieben (Voss *et al.*, 2005; Huijsdens *et al.*, 2006; Witte *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2008; Köck *et al.*, 2009a; Köck *et al.*, 2009b; Stegger *et al.*, 2010; Köck *et al.*, 2011; Valentin-Domelier *et al.*, 2011; van der Meer-Marquet *et al.*, 2011; Omland und Hoffmann, 2012; Köck *et al.*, 2013; Smith und Wardyn, 2015). Eine Ausnahme stellt dabei Spanien dar, wo ebenfalls von Infektionen mit CC398 *spa* Typ t108 berichtet wurde (Aspiroz *et al.*, 2010; Lozano *et al.*, 2012). Im Gegensatz dazu scheinen CC398 *spa* Typ t011 und t034 Isolate beinahe weltweit humane Infektionen zu verursachen. Studien beschreiben Fälle unter anderem in den USA, Kanada, Afrika, Teilen Asiens und Großbritanniens (Ip *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2008; Golding *et al.*, 2010; Smith und Wardyn, 2015). Das abweichende Verbreitungsmuster der *spa* Typ t108 Isolate korreliert jedoch nicht mit der festgestellten, erhöhten Adhäsionskapazität, sodass der tatsächliche Einfluss dieses Fundes ungeklärt bleibt.

Neben der Adhäsionskapazität an humane Keratinozyten und humanes/bovines Plasma Fibronektin wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Adhäsionskapazität an humanes Fibrinogen bestimmt.

Die Untersuchung von acht LA-MRSA CC398 Isolaten belegte die gleichermaßen ausgeprägte Kapazität, an humanes Fibrinogen zu adhären. Die Adhäsionskapazitäten überstiegen die eines *S. carnosus* Isolat (TM300), das auf Grund fehlender humanspezifischer Adhäsionsfaktoren über eine naturgemäß geringe Adhäsionsfähigkeit an humane Proteine verfügt, um das drei bis vierfache. Ein untersuchtes CA-MRSA Isolat zeigte dabei eine vergleichbare Adhäsionskapazität wie die getesteten LA-MRSA CC398 Isolate. Unterschiede bezüglich der *spa* Typen, innerhalb der CC398 Linie, wie sie bei der Adhäsion an Plasma-Fibronektin gefunden wurden, wurden bei humanem Fibrinogen nicht festgestellt. Bei der Untersuchung der Transkription der primär für die Adhäsion an Fibrinogen verantwortlichen MSCRAMMs *ClfA* und *B* codierenden Gene wurden bei einzelnen Isolaten geringfügige Unterschiede gefunden. Die Isolate 2121 und 5191 zeigten eine niedrigere *clfA* Expression als die übrigen Isolate, bei Isolat 4969 wurde hingegen eine höhere *clfB* Expression, als bei sechs der übrigen Isolate bestimmt.

Unterschiede, wie bei *fnbA* und *B*, die auf eine *spa* Typ Abhängigkeit hindeuten, zeigten sich bei *clfA* und *B* nicht. Als MSCRAMMs werden *clfA* und *B* auf die gleiche Weise durch den *agr* Locus und das σ^B Operon reguliert, wie bereits oben für *fnbA* und *B* beschrieben (Nair *et al.*, 2003; Cheung *et al.*, 2004). Die deutlich niedrigere *agr* Aktivität der Isolate 4949 und 4969 könnte eine erhöhte *clfA* und *B* Transkription erklären. Diese besteht allerdings nur in geringem Maße bei Isolat 4969 für *clfB*. Die *clfB* Expression von Isolat 4949, sowie die *clfA* Transkription der beiden Isolate, bleiben unbeeinflusst.

Zwei Studien beschreiben den Einfluss der viskoelastischen Zellwandeigenschaften auf die bakterielle Adhäsion unter einer externen Kraftereinwirkung (Liu *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2012). Demzufolge sind hochelastische Zellwände in der Lage, sich bei Kontakt mit einem Substrat stärker zu verformen als niederelastische Zellwände und bieten so eine größere Kontaktfläche mit potentiellen Wechselwirkungen zwischen Substrat und Zelloberfläche. Um zu ermitteln, ob die Elastizitätseigenschaften der Zellwand die Adhäsionseigenschaften der Isolate beeinflussen, wurden deren zellwandeigenen Elastizitätsmodule bestimmt und mit den ermittelten Adhäsionskapazitäten verglichen. Die Untersuchung der drei LA-MRSA CC398 Isolate zeigte nur geringfügige Unterschiede bezüglich der Zellwandelastizität, es wurden Elastizitätsmoduli zwischen 5,8 und 6,1 MPa bestimmt (Abb. 12). Auch die Zellwandelastizität des CA-MRSA Isolats MW2 sowie des MSSA Isolates 8325-4 wiesen ähnliche Elastizitätsmoduli von 5,4 bzw. 6 MPa auf. Im Gegensatz dazu variierten die Adhäsionskapazitäten der CC398 Isolate, wie zuvor schon besprochen, deutlich. Das Isolat MW2 zeigte eine vergleichsweise hohe Adhäsionskapazität, während Stamm 8325-4 mit einer moderaten Effektivität an humane Keratinozyten und Fibronectin adhärierte. Eine veränderte Zellwandelastizität kann somit als Begründung der variierenden Adhäsionskapazität der getesteten CC398 Isolate weitestgehend ausgeschlossen werden.

Weiterführend wurde die Hypothese des Einflusses der Zellwandelastizität auf die bakterielle Adhäsion grundsätzlich überprüft, indem eine 8325-4 *pbp4* Deletionsmutante charakterisiert wurde (Atilano *et al.*, 2010). Die Deletion von *pbp4* bewirkte eine signifikante Reduzierung des Elastizitätsmodulus von 6 MPa (8325-4 Wildtyp) auf 2,9 Mpa (8325-4 $\Delta pbp4$), die Zellwand war somit elastischer. Allerdings wurden weder bezüglich der Adhäsionskapazität an humane Keratinozyten, noch an

humanes Plasma-Fibronektin, Unterschiede zwischen 8325-4 und der isogenen *pbp4* Deletionsmutante festgestellt. Ein Zusammenhang zwischen der Zellwandelastizität und der bakteriellen Adhäsionskapazität konnte demnach auch vor dem Hintergrund der deutlich erhöhten Zellwandelastizität der 8325-4 $\Delta pbp4$ Mutante nicht bestätigt werden.

In der Studie von Chen und dem dazugehörigen Kontaktmodell wurde die Bakterienzelle selbst als „harter Kern“ beschrieben, der sich unter einer Kraftereinwirkung bzw. bei Adhäsionsprozessen nicht verformt (Chen *et al.*, 2012). Es wurde lediglich eine elastische Verformung der Zellwand berücksichtigt. Allerdings sollte eine Veränderung der Elastizität der gesamten Bakterienzelle ebenso einen Einfluss auf die Verformbarkeit, die Kontaktfläche mit dem Substrat und somit der potentiellen Adhäsionskapazität haben. Eine Veränderung des Turgordrucks der Zelle sollte eine solche Elastizitätsänderung bewirken. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine AFM-basierte Methode entwickelt, die es ermöglicht die Turgordruck-abhängige Elastizität einer Bakterienzelle, unabhängig von der Zellwandelastizität messen zu können. Dazu wurde während des Messens der Elastizitätskarten eine höhere Auslösekraft mit der Messsonde ausgeübt, wodurch eine Indentation der Sonde erreicht wurde, welche die Zellwanddicke überstieg. Durch eine Erhöhung der NaCl-Konzentration des Messpuffers (von 0,15 mol/l NaCl auf 1,5 mol/l NaCl) konnte ein erhöhter osmotischer Druck hervorgerufen werden, wodurch Wasser aus den gemessenen Bakterienzellen ausströmte und der Turgordruck sank. Bei der anschließenden Elastizitätsmessungen mit einer Auslösekraft von 5 nN wurden nur geringfügige Unterschiede zwischen Isolat 8325-4 und der 8425-4 $\Delta pbp4$ Mutante festgestellt, die wiederum in keinem Zusammenhang mit der Zellwandelastizität standen. Außerdem zeigte Isolat 8325-4 eine deutliche, mit dem gesunkenen Turgordruck einhergehende, Zunahme der Zellelastizität. Umgekehrt ergaben Elastizitätsmessungen bei einer Auslösekraft von 1 nN, unabhängig von der NaCl-Konzentration die, durch die *pbp4* Deletion bedingten, Unterschiede in der Zellwandelastizität (Abb. 14). Insgesamt kann also mit einer Auslösekraft von 1 nN die Elastizität der Zellwand und mit 5 nN die Elastizität der Zelle, unabhängig von der Zellwand, gemessen werden. Die Zellelastizität ist dabei abhängig vom Turgordruck der Zelle und somit vom osmotischen Milieu, das die Zelle umgibt.

Durch eine Erhöhung der NaCl-Konzentration (und damit des osmotischen Drucks) während des 96 Well Platten basierten Adhäsionsassays sollte sich der Turgordruck der eingesetzten Bakterien verringern und die Bakterienzellen somit elastischer werden. Die Untersuchung von 8325-4 Wildtyp und $\Delta pbp4$ zeigte, dass die auf diese Weise erhöhte Zellelastizität keine bzw. nur eine geringfügig erhöhte Adhäsion an humane Keratinozyten und Fibronektin vermittelt (Abb. 15).

Insgesamt konnte der von Liu und Chen postulierte Einfluss der Zellwandelastizität und weiterführend der Elastizität der gesamten Zelle auf das Adhäsionsverhalten von *S. aureus* im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Hierbei gilt zu berücksichtigen, dass Chen und Kollegen in ihrer Studie ein Modell verwendeten, in dem lediglich ein einzelnes Bakterium an eine Messsonde fixiert wurde, mit dem Substrat in Kontakt gebracht und wieder abgelöst wurde, um die auftretenden Adhäsionskräfte zu messen. Das Modell erscheint in dieser einfachen Kontaktsituation, ohne maßgebliche horizontale Kraftkomponente und unter Vernachlässigung des Turgordrucks plausibel. In einer komplexeren Ablösesituation mit horizontaler Kraftkomponente, Scherkräften und gegebenenfalls turbulenter Umströmung der Zellen, so wie dies während des 96 Well Platten basierten Adhäsionsassays auftritt, scheint das Modell nicht anwendbar zu sein. Bei einer *S. aureus* Zelle, die während einer Bakteriämie/Sepsis im Blutstrom des Wirtes zirkuliert und auf einem, mit Serumproteinen bedeckten Medizinprodukt oder dem Endothel adhäriert, muss von einer komplexen Kontaktsituation in Strömung ausgegangen werden. Dies macht das Kontaktmodell nach Chen nur eingeschränkt anwendbar.

Zusammenfassend stellt sich die bakterielle Adhäsion als komplexer Vorgang dar, in dessen Betrachtung, neben der biologischen Komponente (wie spezifische Adhäsionsproteine), die experimentellen Rahmenbedingungen mit den entsprechenden Ablösemechaniken eine wichtige Rolle spielen und berücksichtigt werden müssen. Die Untersuchung der Adhäsionseigenschaften Nutztier-assoziiertes MRSA Isolate der CC398 Linie bestätigte die, in der Literatur beschriebenen, niedrigen Adhäsionseigenschaften Tier-assoziiertes *S. aureus* Isolate gegenüber human-assoziiertes Isolate (Uhlemann *et al.*, 2012), zeigte allerdings auch das abweichende Adhäsionsmuster der CC398 Subgruppe des *spa* Typ t108 und stellt somit ein Beispiel für die Heterogenität und Anpassungsfähigkeit dar mit der Virulenzeigenschaften innerhalb der CC398 Linie auftreten.

5.2 Untersuchung der LA-MRSA CC398 Immunevasions-Eigenschaften

Bei der Untersuchung der Phagozytoserate von MRSA Isolaten durch humane PMN wurden die Bakterien mit einer Mol von ca. 50, in Relation zur Anzahl der PMN, zum Vollblut gegeben. Die Ergebnisse zeigten einen geringfügigen Anstieg der Phagozytose während der einstündigen Koinkubation (Abb. 16). Weiterhin wurden deutliche Unterschiede bezüglich der Phagozytoserate zwischen LA-MRSA CC398, CA-MRSA und HA-MRSA beobachtet. Dabei wurden Isolate des *spa* Typs t108 weniger effektiv von PMN aufgenommen, als *spa* Typ t011 Isolate, t034 Isolate und CA-MRSA Isolate. HA-MRSA Isolate zeigten eine mit *spa* Typ t108 vergleichbare Phagozytoserate. Bei der genotypischen Charakterisierung der Isolate-Auswahl mithilfe eines DNA-Microarrays (Alere, StaphyType Microarray I) wurden unter anderem Gene untersucht, die in der Immunevasion sowie dem Phagozytoseschutz involviert sind (Ballhausen *et al.*, 2014). Dabei wurden die Gene der Koagulase (*coa*), des von Willebrand Faktor-Bindeproteins (*vwb*), sowie von *clfA* und *B* bei allen 44 Isolaten nachgewiesen. Coa und Vwb vermitteln im Zusammenspiel mit wirtseigenem Prothrombin die Bildung des katalytisch aktiven Staphthrombin. Dadurch wird die Umsetzung des Serumproteins Fibrinogen zu Fibrin induziert und schließlich ein Fibrinklumpen gebildet (McAdow *et al.*, 2012). ClfA und B ermöglichen wiederum die Adhäsion an Fibrinogen bzw. Fibrin und damit die Anlagerung an/in diese Fibrinklumpen, was einen mechanischen Phagozytoseschutz bedingt (McDevitt *et al.*, 1997; O'Brien *et al.*, 2002a; McAdow *et al.*, 2012). Die Transkription von *vwb* sowie *coa*, reguliert durch SigB, wird insbesondere in der exponentiellen Wachstumsphase beschrieben, während *clfA* bevorzugt in der post-exponentiellen Wachstumsphase exprimiert wird (Bischoff *et al.*, 2004). Beim Phagozytoseassay wurden Kulturen der stationären Wachstumsphase verwendet. Außerdem konnten während der Durchführung des Assays, auch mikroskopisch, keine Koagulation des Blutes bzw. Bildung von Fibrinklumpen beobachtet werden. Ein Einfluss dieses Mechanismus des Phagozytoseschutzes auf die gezeigten *spa* Typ-abhängigen Effekte kann somit zumindest angezweifelt werden.

Ein weiterer Mechanismus der zum Phagozytoseschutz beiträgt, ist die Bildung einer Polysaccharidkapsel (Baddour *et al.*, 1992). Die Kapsel ermöglicht zwar die Anbindung und Spaltung der Komplementfaktoren an der bakteriellen Zellwand, die

Rückbindung an die Komplementrezeptoren von PMN ist dadurch allerdings deutlich erschwert (Foster, 2005). Bei klinischen Isolaten sind die Kapseltypen 5 und 8 am häufigsten vertreten (Roghmann *et al.*, 2005). Für beide Kapseltypen wurde sowohl in Tiermodellen als auch in in-vitro Phagozytose Assays eine erhöhte Virulenz und eine reduzierte Phagozytose durch Neutrophile beschrieben (Baddour *et al.*, 1992; Nilsson *et al.*, 1997; Thakker *et al.*, 1998). Durch die DNA-Microarrays wurde in allen untersuchten LA-MRSA CC398 Isolaten das *cap5* Gen (verantwortlich für die Bildung des Kapseltyps 5) nachgewiesen. Die CA-MRSA und HA-MRSA Isolate zeigten die Kapseltypen 5 oder 8. Um die Unterschiede bezüglich der Phagozytoserate innerhalb der LA-MRSA CC398 Linie bzw. die Unterschiede zwischen HA-MRSA und den CC398 Isolaten zu erklären, kommen unterschiedliche Kapseltypen demnach nicht in Frage.

Neben Zellwand-assoziierten Faktoren, wie den MSCRAMMs oder der Kapsel, wird das Potential des Phagozytoseschutzes ebenso von sekretierten Proteinen beeinflusst. Beispielsweise beschreibt eine Studie von Inoshima und Kollegen (2011) die Bindung von α -Toxin (Hla) an den membranständigen Wirts-Rezeptor ADAM10 auf der Oberfläche humaner Zellen und die Bildung Heptamer-förmiger Poren. Der Einfluss dieser Porenbildung auf PMN bleibt umstritten. Eine Studie von Pang und Kollegen bestätigt den Einfluss von Hla auf die Membranstabilität von PMN nach der Phagozytose von *S. aureus* (Pang *et al.*, 2010), während eine weitere Studie diesen Einfluss nicht nachweisen konnte (Nygaard *et al.*, 2012). Die Microarray Analysen zeigten die Anwesenheit von *hla* in allen getesteten LA-MRSA CC398, CA-MRSA und HA-MRSA, sodass eine Hla-Einfluss auf die Phagozytoserate der Isolate nicht auszuschließen ist, allerdings nicht in Frage kommt, um Isolat-spezifische Unterschiede zu erklären.

Im Gegensatz zu *hla* wurden die Gene *lukF-PV* und *lukS-PV*, welche die F und S Untereinheiten des Zweikomponenten Leukotoxins PVL codieren, ausschließlich in sieben der untersuchten CA-MRSA Isolaten nachgewiesen, in allen anderen Isolaten fehlten sie. PVL ist, wie schon in der Einleitung beschrieben, dazu in der Lage, Makrophagen und PMN zu schädigen, indem es Membranporen bildet (Löffler *et al.*, 2010; Shallcross *et al.*, 2013; Grumann *et al.*, 2014). Da die CA-MRSA Isolate jedoch mit einer vergleichsweise hohen Rate phagozytiert wurden, schien PVL, zumindest unter den getesteten Bedingungen und bei den untersuchten Isolaten, keinen signifikanten Einfluss auf den Phagozytoseschutz zu haben.

Die Betrachtung der Gene des ϕ *Saint3* codierten IEC zeigte ein interessantes Verteilungsmuster. In den LA-MRSA CC398 Isolaten, die zusammen mit den HA-MRSA und CA-MRSA diesbezüglich untersucht wurden (Tab. 1), waren die IEC Komponenten *chp*, *sak* und *scn* nicht vorhanden. Lediglich zwei der *spa* Typ t034 Isolate (Isolat 5345 und 5363) bildeten eine Ausnahme und beherbergten alle drei Gene. Diese beiden Isolate zeigten eine moderate Phagozytoserate durch humanen PMN. Im Gegensatz dazu wurde die Anwesenheit von *chp*, *sak* und *scn* bzw. die Integration von ϕ *Saint3* in allen HA-MRSA Isolaten beobachtet. Auf Grund der niedrigen Phagozytoserate der HA-MRSA Isolate kann vermutet werden, dass die Anwesenheit der IEC Gene und die damit verbundene Hemmung des Komplementsystems zum Phagozytoseschutz der Isolate beitrug. Die getesteten CA-MRSA Isolate wiesen zwar die ϕ *Saint3* Integration auf, allerdings fehlte in fünf der neun getesteten Isolate das Gen *chp*. Diese Isolate verfügten lediglich über die Gene *sak* und *scn*. Bemerkenswerterweise wurden diese CA-MRSA im Rahmen des Phagozytoseassays insgesamt zwar deutlich effektiver von PMN aufgenommen als HA-MRSA, allerdings wurde zwischen den *chp* positiven- und *chp* negativen CA-MRSA Isolaten kein signifikanter Unterschied bezüglich der Phagozytoserate festgestellt. Demnach sollte das unterschiedliche Potential der HA-MRSA und CA-MRSA Isolate, sich vor der Phagozytose zu schützen, andere Ursachen haben als das Tragen/Fehlen von *chp*. Da lediglich zwei der LA-MRSA CC398 Isolate *chp*, *sak* und *scn* trugen, lässt sich der erhöhte Phagozytoseschutz der *spa* Typ t108 Isolate gegenüber den t011 und t034 Isolaten ebenfalls nicht durch die Wirkung des IEC erklären.

Insgesamt konnten zur Deutung der festgestellten Muster der Phagozytoserate von LA-MRSA CC398, CA-MRSA und HA-MRSA sowie der verringerten Phagozytoserate von *spa* Typ t108 Isolaten durch PMN, die oben beschriebenen Mechanismen weitestgehend ausgeschlossen werden. Die Gründe für die gezeigten Effekte bleiben damit bis auf weiteres unbekannt. Allerdings könnten unterschiedliche Expressionslevels der Kapsel-codierenden Gene bzw. der IEC Komponenten zum gezeigten Muster der Phagozytoserate beitragen und sollten in weiterführenden Studien untersucht werden.

Neben der Phagozytoserate durch PMN in Vollblut wurde im Rahmen dieser Arbeit die Phagozytose und das intrazelluläre Überleben von LA-MRSA CC398 in THP-1

Makrophagen untersucht (Abb. 18). Bei zwei von vier getesteten *spa* Typ t108 Isolaten (Isolat 4949 und 4969) wurde eine verringerte Phagozytoserate gegenüber den restlichen Isolaten festgestellt. Diese Beobachtung passt zum Muster der oben beschriebenen, niedrigen Phagozytoserate von *spa* Typ t108 Zellen durch humane PMN in Vollblut. Im Gegensatz dazu zeigten die beiden anderen untersuchten *spa* Typ t108 Isolate 2121 und 0435 diese verringerte Phagozytoserate durch Makrophagen nicht. Allerdings wiesen diese beiden Isolate bereits bei der Betrachtung der Phagozytose durch humane PMN in Vollblut ungewöhnlich hohe Phagozytoseraten, im Vergleich zu den anderen Isolaten des *spa* Typs t108 auf. Somit kann festgehalten werden, dass die beobachtete Phagozytoserate in THP-1 Makrophagen das in Versuchsteil 4.2.1 beschriebene Muster der Phagozytose bestätigt.

Das intrazelluläre Überleben der phagozytierten Bakterienzellen wurde für die Dauer von 23 Stunden beobachtet und nahm in diesem Zeitraum bei allen getesteten Isolaten stetig ab. Relativ zur Phagozytoserate betrachtet, zeigten die untersuchten *spa* Typ t108 Isolaten nach 23 Stunden ein deutlich geringere Überlebensrate, als die *spa* Typ t011 und t034 Isolate. Das *spa* Typ t034 Isolat 1714 bildete dabei eine Ausnahme und zeigte eine ebenfalls geringe Überlebensrate. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wird das Potential von *S. aureus* intrazellulär zu überleben unter anderem von der Fähigkeit beeinflusst bakterielle Oberflächenstrukturen zu modifizieren, um sie weniger affin für kationische antimikrobielle Peptide zu machen. Dabei werden D-Alanin bzw. L-Lysin Reste an Ribitol- und Lipoteichonsäuren sowie die Phosphoglyceride der bakteriellen Zellmembran angebunden. Dies wird durch die *dlt* Operon codierten Proteine und das MprF Protein katalysiert (Peschel *et al.*, 1999; Peschel *et al.*, 2001; Staubitz *et al.*, 2004). Die DNA Microarray Analysen zeigten dass *mprF* in keinem der getesteten LA-MRSA CC398 Isolate vorhanden war, weshalb dessen Wirkung nicht als Ursache des abweichenden intrazellulären Überlebenspotentials der *spa* Typ t108 Isolate in Frage kommt. Die Gene des *dlt* Operon waren leider nicht Teil der, durch den DNA-Microarray nachgewiesenen Gene, sodass über deren Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Isolate im Rahmen dieser Untersuchungen keine Aussage getroffen werden kann. Allerdings ist dieses Operon häufig die Integrationsstelle von Transposons (zum Beispiel *TN917*) bzw. Resistenzgenen, was zur Unterbrechung und Inaktivierung einzelner oder mehrerer *dlt* Gene führt (Peschel *et al.*, 1999). Es kann daher vermutet werden, dass

die Komposition, mit der aktive *dlt* Gene in verschiedenen *S. aureus* Isolaten bzw. Linien auftreten, variiert. Für weiterführende Untersuchungen zur Aufklärung der Ursache des abweichenden Überlebenspotentials der *spa* Typ t108 Isolate sollten die *dlt* Operons der untersuchten Isolate durch DNA-Sequenzierung auf Insertionen hin untersucht und verglichen werden.

Ein weiterer Mechanismus der einen Einfluss auf das intrazelluläre Überleben von *S. aureus* ausübt, ist der Abbau von ROS, durch bakterielle Katalasen und Superoxid-Dismutasen (Karavolos *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2008). Als Speziesmarker für *S. aureus* wurde Katalase von allen getesteten Isolaten produziert und auch im DNA-Microarray durch die Anwesenheit des Katalase codierenden Gens *katA* nachgewiesen. Die Gene der beiden *S. aureus* Superoxid-Dismutasen, *sodA* und *sodM* waren nicht Teil des DNA-Microarrays. Ihr möglicher Einfluss auf die unterschiedliche Überlebensfähigkeit der getesteten CC398 Isolate bleibt deshalb ungeklärt.

Der Einfluss Phenol löslicher Moduline (engl. Phenol soluble modulins, PSM) wurde bereits in der Einleitung im Abschnitt 1.4.5 beschrieben. Das Gen des Hämolyisin δ (*hld*) war Teil des DNA-Microarrays und wurde, unabhängig von Klonalem Komplex und *spa* Typ, in allen untersuchten Isolaten nachgewiesen. Die PSM α und PSM β codierenden Operons waren auf dem DNA-Microarray hingegen nicht repräsentiert. Diese sind jedoch, als Teil des Kerngenoms, unter *S. aureus* Isolaten weit verbreitet (Grumann *et al.*, 2014), sodass ein Einfluss von PSM α und PSM β auf das Überlebenspotential der untersuchten CC398 Isolate nicht auszuschließen ist.

Weiterhin belegte das DNA-Microarray die Anwesenheit des ACME Cluster (engl. Arginine Catabolic Mobile Element Cluster) bei einem der CA-MRSA CC8 Isolate (Isolat 3289). Das ACME Cluster ist insbesondere bei Isolaten dieses CCs weit verbreitet (Shore *et al.*, 2011) und trägt potenziell zum intrazellulären Überleben von *S. aureus* bei (Diep und Otto, 2008). Die LA-MRSA CC398 Isolate, die im Rahmen des Assays zur Bestimmung des intrazellulären Überlebens untersucht wurden, wiesen das ACME Cluster allerdings nicht auf, sodass es nicht als beeinflussender Faktor einer veränderten Überlebensrate dieser Isolateauswahl in Frage kommt.

In weiterführenden Untersuchungen könnten, neben dem Nachweis von *sodA*, *sodM* und der *dlt* Gene, auch deren Transkription sowie die Transkription von *katA*, *mprF*, *hld* und der PSM-codierenden Gene zur Aufklärung des reduzierten Überlebenspotentials der *spa* Typ t108 Isolate beitragen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich Isolate des *spa* Typ t108 zwar effektiver vor der Phagozytose durch humane Immunzellen schützen können als andere Isolate dieser Linie, sollten sie allerdings dennoch aufgenommen werden, sind sie weniger effektiv dazu in der Lage, intrazellulär zu überleben. Die Gründe sind bislang ungeklärt. Allerdings zeigen die Ergebnisse, dass der Fokus der Immunevasions-Strategien dieser epidemiologischen Untergruppe auf dem Phagozytoseschutz liegt und nicht auf intrazellulärem Überleben nach gegebenenfalls gezielt herbeigeführter Phagozytose, wie es bereits von Gresham und Kollegen für andere *S.aureus* Isolate gezeigt wurde (Gresham *et al.*, 2000). Wie bereits im Abschnitt 5.1 beschrieben, werden Infektionen mit *spa* Typ t108 Isolaten gleichermaßen gefunden wie Infektionen, die mit Isolaten anderer *spa* Typen der CC398 Line assoziiert sind, sodass die Immunevasion-spezifischen Besonderheiten der *spa* Typ t108 Untergruppe die Fähigkeit, Infektionen im Menschen zu verursachen, zumindest nicht negativ zu beeinflussen scheint.

5.3 Einfluss einer ϕ Saint3 Integration auf die Wirtsspezifität von *S. aureus* CC398

Wie bereits in der Einleitung vorgestellt, übt das Komplementsystem einen wichtigen Einfluss auf die Effektivität aus, mit der bakterielle Pathogene durch PMN phagozytiert werden können. Die Aktivierung des Komplementsystems, die sogenannte Komplementbindungsreaktion, kann dabei mit, oder auch ohne Einflussnahme des adaptiven Immunsystems, auf verschiedenen Wegen erfolgen. Dies führt zu einer komplexen Kaskade an Spaltungen und Komplexbildungen verschiedener Komplementfaktoren. Von zentraler Bedeutung ist dabei die Spaltung des Komplementfaktors C3 auf der Bakterienoberfläche, was zur Opsonisierung führt und schließlich die Aufnahme von Pathogenen durch die Immunzellen fördert. Weiterhin werden in Folge der Komplementbindungsreaktion chemotaktisch aktive Peptide frei, die die Rekrutierung weiterer Immunzellen zum Ort der Immunreaktion induzieren (Foster, 2005).

Die Hemmung des Komplementsystems durch die Gene des ϕ Saint3 codierten IEC trägt somit, als wichtige Strategie der Immunevasion von *S. aureus*, zum Phagozytoseschutz bei. Die Gene des IEC (*scn*, *chp* und *sak*, sowie gegebenenfalls *sea*) treten dabei nicht immer in derselben Zusammenstellung auf. Van Wamel und Kollegen beschreiben sieben verschiedene IEC Typen, die sich bezüglich ihrer Komposition unterscheiden (van Wamel *et al.*, 2006). Dabei sind SCIN und SAK die prominentesten IEC Faktoren und treten in nahezu allen, bzw. dreiviertel aller Cluster auf. CHIP ist in etwa der Hälfte aller Cluster vertreten und Enterotoxine (wie SEA) werden nur in etwa einem Drittel der Cluster gefunden (van Wamel *et al.*, 2006). Mehrere Studien beschrieben bereits das immunevasive Potential einzelner IEC Faktoren und wiesen dabei auf die humanspezifische Wirkung dieser Faktoren hin (Dohlsten *et al.*, 1993; Gladysheva *et al.*, 2003; de Haas *et al.*, 2004; Rooijackers *et al.*, 2005). Diese Hypothese zur Wirtsspezifität passt gut zum Muster, mit dem das IEC in *S. aureus* Isolaten von verschiedenen Wirten gefunden wird. Humanadaptierte *S. aureus* Stämme beherbergen den IEC codierenden Bakteriophagen Saint3 in aller Regel, während er in Nutztier-assoziierten Isolaten, wie den meisten CC398 Isolaten, nur selten zu finden ist (McCarthy *et al.*, 2012b). Eine aktuelle Prävalenzstudie wies ϕ Saint3 in keinem von 94 untersuchten Isolaten vom Schwein nach. Allerdings beschreibt dieselbe Studie die Anwesenheit von ϕ Saint3 in ca. 6 % der, in Nüstern

von Pferden isolierten, CC398 Stämmen und sogar in 10 % der aus Pferdewunden gewonnenen Isolate (Cuny *et al.*, 2015). Dies stellt die Idee einer rein humanspezifischen Wirkungsweise der IEC Faktoren in Frage.

Die Experimente dieser Arbeit zur Wirtsspezifität von ϕ Saint3 untersuchten den Einfluss des IEC codierenden ϕ Saint3 auf den Phagozytoseschutz in Vollblut und somit in Anwesenheit der Komplementfaktoren in drei Wirten: Mensch, Pferd und Schwein. Dabei zeigten Isolate die ϕ Saint3 trugen eine deutlich reduzierte Phagozytoserate durch humane und interessanterweise auch equine PMN. Auf die Phagozytose durch porcine PMN hingegen schien der ϕ Saint3 Status keinen Einfluss zu haben. Diese Effekte wurden sowohl in einem Set aus 20 ϕ Saint3 positiven/negativen CC398 Isolaten verschiedener Wirte und *spa* Typen, als auch bei drei isogenen ϕ Saint3 positiven/negativen Isolatpaaren festgestellt. Die Ergebnisse zeigen erstmals, dass durch das Vorhandensein des ϕ Saint3 und damit sehr wahrscheinlich durch das Zusammenspiel der IEC Faktoren ein effektiver Phagozytoseschutz vor PMN sowohl in Humanblut als auch Pferdeblut vermittelt wird, während ϕ Saint3 auf den Phagozytoseschutz in Schweineblut keinen wesentlichen Einfluss ausübt (Jung *et al.*, 2016). Diese Befunde erklären zumindest teilweise die Häufigkeit, mit der ϕ Saint3 positive *S. aureus* Isolate in diesen Wirten gefunden werden (Mensch > Pferd >> Schwein) (McCarthy *et al.*, 2012b; Cuny *et al.*, 2015). Des Weiteren kann aus diesen Beobachtungen geschlossen werden, dass das Wirtsspektrum der IEC Faktoren, das bislang als humanspezifisch galt (Verkaik *et al.*, 2011; Xia und Wolz, 2014), wahrscheinlich breiter ist als bisher angenommen.

Tabelle 25 zeigt die Konzentration der Immunzellen im Blut der drei untersuchten Wirte, die im Vorfeld der Experimente durch Hämatogramme bestimmt wurde. Dabei ist auffällig, dass die PMN Konzentrationen in Schweine- und Pferdeblut um den Faktor 1,6 bzw. 2 höher sind als im Blut von Menschen. Die zu erwartende, normale PMN Konzentration hat einen breiten Toleranzbereich und überschneidet sich bei Menschen, Schweinen und Pferden. Eine generell höhere Konzentration bei Schweinen und Pferden ist dabei nicht üblich (Armbruster und Miller, 2007; Karalyan *et al.*, 2012; Melo *et al.*, 2016). Allerdings stellte eine ältere Studie von Dalin und Kollegen ebenfalls eine erhöhte Konzentration von Immunzellen im Blut von Schweinen fest und liefert dazu einen interessanten Erklärungsansatz (Dalin *et al.*, 1993). Gemäß dieser Studie wird die erhöhte Konzentration von PMN, sowie

Leukozyten im Allgemeinen, durch ein erhöhtes Stresslevel während des Transports der Schweine verursacht. Die Schweine und Pferde, deren Blut im Rahmen der Experimente dieser Arbeit verwendet wurden, stammten von lokalen Schlachthöfen und waren vor der Blutentnahme ebenso transportiert worden. Die Beobachtung bei Schweinen lässt sich möglicherweise auf Pferde übertragen und könnte die vergleichsweise hohen PMN-Konzentrationen erklären.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, geht die CC398 Linie ursprünglich auf humanspezifische MSSA CC398 Isolate des *spa* Typs t571 zurück, die auf Nutztiere (insbesondere Schweine) übertragen wurden. Interessanterweise wird ϕ Saint3, und damit das IEC, in MSSA CC398 *spa* Typ t571 mit einer ähnlich hohen Prävalenz nachgewiesen wie bei anderen humanadaptierten *S. aureus* Linien, fehlt in CC398 Isolaten vom Schwein hingegen nahezu vollständig (McCarthy *et al.*, 2012a; Uhlemann *et al.*, 2012; Uhlemann *et al.*, 2013; Cuny *et al.*, 2015). Dies deutet darauf hin, dass dieser Bakteriophage beim Übergang vom Mensch zu Schwein regelmäßig verloren geht, bei der Rückübertragung vom Schwein auf den Menschen jedoch häufig wieder zurückgewonnen wird. Cuny und Kollegen geben hierzu eine Rückgewinnungsrate von ca. 73,3 % in MSSA CC398 Isolaten an (Cuny *et al.*, 2015). Ein Grund für den regelmäßigen Verlust von ϕ Saint3 beim Übergang von Mensch zu Schwein könnten unter anderem die in dieser Arbeit gezeigte fehlende Funktion bezüglich des Phagozytoseschutzes im Schwein als Wirt sein. Der Verlust des Bakteriophagen könnte eine eventuelle Fitnessseinbuße, die durch die Produktion und Sekretion der in diesem Wirt wirkungslosen IEC Faktoren besteht, ausgleichen. Ein solcher Fitnessnachteil sollte unter anderem das bakterielle Wachstum beeinflussen. Unterschiede bezüglich des *in vitro* Wachstums konnten allerdings, zumindest für die getesteten isogenen CC398 Isolatpaare, anhand der Messung der OD₆₀₀ in TSB Medium nicht beobachtet werden (ohne Abbildung).

Insgesamt betrachtet unterstreichen die Ergebnisse dieser Arbeit, sowie die Ergebnisse der Prävalenzstudie von Cuny und Kollegen (2015), die Bedeutung des IEC codierenden ϕ Saint3 in der Speziesadaptation der CC398 Linie. Das Tragen von ϕ Saint3 innerhalb der CC398 Linie scheint somit eng mit dem Menschen als Wirt verknüpft zu sein, allerdings zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass eine alleinige Humanspezifität dieses MGE, so wie es bislang angenommen wurde, nicht besteht.

Durch die Integration von ϕ Saint3 in das *hly* Gen wird dessen Sequenz unterbrochen und die β -Hämolytaseaktivität geht verloren. Somit könnte ein weiterer Grund für den Verlust des ϕ Saint3 in Schweineisolaten die Rückgewinnung eines funktionellen β -Hämolytaseproteins sein. Das 35 kDa große β -Hämolytaseprotein war eins der ersten Toxine, das in *S. aureus* identifiziert wurde (Glenny und Stevens, 1935). β -Hämolytase zeigt eine Sphingomyelinase-Aktivität und katalysiert die Spaltung der Phosphodiesterbindung von Sphingomyelin auf der Oberfläche von Erythrozyten. Während β -Hämolytase dazu in der Lage ist, Schaf-Erythrozyten effektiv zu lysieren, zeigt es gegenüber Kaninchen-Erythrozyten keine Aktivität. Diese Aktivitätsunterschiede sind durch den unterschiedlichen Sphingomyelin Gehalt auf der jeweiligen Erythrozytenoberfläche begründet (Doery *et al.*, 1963; Doery *et al.*, 1965). Neben seiner hämolytischen Aktivität wirkt β -Hämolytase auch toxisch auf eine Reihe von Immunzellen, wie Monozyten und Lymphozyten und ist außerdem dazu in der Lage, Keratinozyten zu schädigen (Walev *et al.*, 1996; Marshall *et al.*, 2000; Huseby *et al.*, 2007; Katayama *et al.*, 2013). Darüber hinaus vermittelt β -Hämolytase eine DNA-Bindeaktivität, trägt zur Biofilm-Bildung in einem Kaninchen Endokarditis Modell bei und unterstützt die Fähigkeit, murine Haut zu kolonisieren (Huseby *et al.*, 2007; Katayama *et al.*, 2013). Weiterhin beschreibt eine Studie von Aarestrup und Kollegen einen verstärkenden Einfluss von β -Hämolytase auf die Entstehung von Mastitiden in Milchkühen (Aarestrup *et al.*, 1999). Die Befunde dieser Studien legen nahe, dass ein intaktes β -Hämolytaseprotein zur erfolgreichen Kolonisierung/Infektion in verschiedenen Wirten beiträgt. Um den Einfluss der ϕ Saint3 Integration auf das hämolytische Potential von CC398 zu untersuchen, wurden die Lysekapazitäten der drei ϕ Saint3 positiven/negativen isogenen CC398 Isolatpaare von Erythrozyten verschiedener Wirte bestimmt. Alle ϕ Saint3 negativen Rezipienten Isolate zeigten in einem CAMP Test (Christie *et al.*, 1944) auf TSA mit Schafblut, in Kokultur mit *S. agalactiae* eine vollständige Hämolyse, was die Produktion eines funktionellen β -Hämolytaseproteins belegt (Abb. 21 A). Im Gegensatz dazu zeigten die ϕ Saint3 positiven Isolatderivate mit unterbrochenem *hly*, wie erwartet, keine vollständige Hämolyse, was den Verlust der β -Hämolytaseaktivität in diesen Isolaten deutlich macht. Bemerkenswerterweise zeigte die Bestimmung des Hämolysetiters einen deutlichen Einfluss der ϕ Saint3 Insertion auf die Hämolyseaktivität in Humanblut. Dabei lysierten die Kulturüberstände der ϕ Saint3 negativen Mutterisolate die humanen Erythrozyten um den Faktor 10 effektiver als die ϕ Saint3 positiven Isolatderivate. Derselbe Effekt konnte, wenn auch

in abgeschwächter Form, bei Erythrozyten aus Schweineblut beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte die ϕ Saint3 Insertion keinen Einfluss auf die Hämolyseaktivität von Pferde-Erythrozyten. Weiterhin konnten, neben den ϕ Saint3 abhängigen Effekten, wirtsabhängige Unterschiede bezüglich der Hämolyseaktivität beobachtet werden. Erythrozyten aus Schweineblut wurden dabei deutlich effektiver lysiert (Faktor 10 - 60) als Erythrozyten vom Menschen oder Pferd.

Diskutiert man die Wichtigkeit der Rückgewinnung eines funktionellen *hly* beim Verlust von ϕ Saint3 während der Anpassung an das Schwein als Wirt, so erlauben die Ergebnisse interessante, aber gegensätzliche Deutungen. Einerseits scheint die Rückgewinnung eines funktionellen β -Hämolsins in Schweinen als Wirte zu einer verstärkten Hämolyseaktivität beizutragen und somit für das Bakterium von Vorteil sein, was den Verlust des ϕ Saint3 unterstützen könnte. Andererseits wurde im Menschen ebenfalls eine verstärkte *hly* abhängige Hämolyseaktivität beobachtet und da humanadaptierte *S. aureus* Linien für gewöhnlich den ϕ Saint3 tragen, scheint die Rückgewinnung des *hly* als treibendes Argument für den Verlust des Bakteriophagen unwahrscheinlich. Da der Verlust des β -Hämolsins bei der Hämolyse von Pferde-Erythrozyten keinen messbaren Einfluss zu haben scheint, scheidet die Rückgewinnung eines intakten *hly* als Triebfeder für einen etwaigen Verlust von ϕ Saint3 in Pferden zirkulierenden *S. aureus* Isolaten ebenfalls aus. Einzig das insgesamt deutlich erhöhte Hämolysepotential von Schweineerythrozyten gegenüber Erythrozyten vom Mensch und Pferd könnte darauf hinweisen, dass β -Hämolsin-abhängige Lyseprozesse bei Infektionen im Schwein von größerer Bedeutung sind, als bei den anderen beiden untersuchten Wirten und damit die Rückgewinnung eines funktionellen *hly* bei Schweinen wichtiger ist als bei Menschen und Pferden ist. Somit ist die Rückgewinnung des *Hly*, als Triebfeder für den Verlust von ϕ Saint3 aus Gründen der rückgewonnenen Hämolyseeigenschaften zumindest fraglich. Allerdings beeinflusst *Hly* neben der Hämolyseaktivität, wie bereits oben beschrieben, auch Adhäsions- und Kolonisierungsprozesse, so dass eine verbesserte Adhäsionskapazität bzw. Kolonisierungsfähigkeit, in Verbindung mit einem rückgewonnenen *hly* nicht unplausibel ist und Teil weiterführender Untersuchungen sein könnte.

5.4 Beantwortung der Fragestellungen

Gibt es bezüglich der bakteriellen Adhäsion und Immunevasion Unterschiede zwischen LA-MRSA CC398 Isolaten und MRSA Isolaten, die vorwiegend beim Menschen auftreten?

Ja, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass LA-MRSA CC398 Isolate über eine insgesamt schwächere Adhäsionskapazität an humane Epithel- und Endothelzellen verfügen, als die in Europa weit verbreiteten humanen CA-MRSA und HA-MRSA Linien. Auch innerhalb der CC398 Linie wurden bei der Adhäsionskapazität Unterschiede bezüglich epidemiologischer Subgruppen festgestellt. Isolate des *spa* Typs t108 zeigten ein deutlich höheres Adhäsionspotential an humane Epithel- und Endothelzellen, als Isolate anderer *spa* Typen der CC398 Linie. Diese erhöhte Adhäsion an Wirtszellen könnten zumindest teilweise auf eine verbesserte Adhäsionskapazität an Fibronectin zurückzuführen sein, die wahrscheinlich durch eine erhöhte Transkription der, für die Fibronectin-bindenden Proteine codierenden Gene *fnbA* und *B* begründet ist. Außerdem tritt eine Mutation in *fnbB*, die zu einem verfrühten Stoppcodon bei AS 372 führt und unter anderen Isolaten der CC398 Linie weit verbreitet ist, bei Isolaten des *spa* Typs t108 nur selten auf.

Auch bezüglich der Immunevasions-Eigenschaften wurden Unterschiede zwischen LA-MRSA CC398, CA-MRSA und HA-MRSA sowie auch innerhalb der CC398 Linie festgestellt. Isolate des *spa* Typs t108 wurden weniger effektiv durch humane PMN aufgenommen als *spa* Typ t011 Isolate, t034 Isolate und CA-MRSA. HA-MRSA Isolate hingegen zeigten eine mit *spa* Typ t108 Isolaten vergleichbare Phagozytoserate. Darüber hinaus wurde bei *spa* Typ t108 eine reduzierte intrazelluläre Überlebensfähigkeit im Makrophagen beobachtet. Isolate dieser epidemiologischen Subgruppe werden demnach weniger effizient phagozytiert, sollten sie jedoch durch PMN aufgenommen werden, so sind sie weniger effektiv dazu in der Lage, innerhalb dieses Immunzelltyps zu überleben.

Begründen eventuell veränderte Adhäsions- und Immunevasions-Eigenschaften die weite Verbreitung von LA-MRSA CC398?

Auch wenn zu erwarten ist, dass die Fähigkeit, an seine Wirte zu adhären, wichtig für das Kolonisierungspotential von *S. aureus* ist, scheint ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen abweichender Adhäsions- und Immunevasions-Eigenschaften und den Verbreitungsmechanismen der CC398 Linie nicht zu bestehen. Isolate des *spa* Typs t108 unterscheiden sich zwar deutlich in ihren Adhäsions- und Immunevasioneigenschaften von *spa* Typ t011 und t034 Isolaten, von Kolonisierung und Infektionen wird aber bei allen drei *spa* Typen gleichermaßen berichtet (Görge *et al.*, 2015). Stattdessen gibt eine kürzlich veröffentlichte Studie die Häufigkeit der Transportvorgänge bei der Aufzucht, Mast und Schlachtung von Schweinen als einen der Hauptgründe für die weite Verbreitung von LA-MRSA CC398 an (Bangerter *et al.*, 2016). Diese Studie begründet allerdings nicht die hohe Prävalenz von Isolaten der CC398-Linie beim Schwein verglichen mit anderen *S. aureus* Isolaten.

Sind die Mechanismen der Adhäsion und Immunevasion wichtig für die Fähigkeit der Spezies-Transmission?

Mit dem IEC codierenden ϕ *Saint3* liegt ein MGE vor, dass, wie in dieser Arbeit gezeigt, einen wirkungsvollen Phagozytoseschutz vor PMN im Menschen und Pferd, nicht aber im Schwein vermittelt und wirtsspezifisch ins Genom integriert wird bzw. verloren geht. Der Verlust bzw. die Aufnahme des Bakteriophagen während der Übertragung zwischen Menschen und Schweinen kann somit als Wirtsadaptationsprozess verstanden werden. Die ursprüngliche Mensch-assoziierte MSSA CC398 *spa* Typ t571 Linie trägt den Bakteriophagen in der Regel, der Bakteriophage geht erst bei der Übertragung auf das Schwein als Wirt verloren. Auch wenn das Potential von *S. aureus* Infektionen im Menschen zu verursachen nicht zwingend die Insertion von ϕ *Saint3* erfordert, so wird dieser Bakteriophage bei der Rückübertragung von LA-MRSA CC398 auf den Menschen dennoch häufig rückgewonnen (Cuny *et al.*, 2015). Die bislang angenommene exklusive

Humanspezifität der IEC Komponenten dieses MGE besteht allerdings nicht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Faktoren des IEC ebenso bei Pferden als Wirt aktiv sind, was die Funde ϕ Saint3 positiver Isolate bei CC398 assoziierten Infektionen bei Pferden zumindest teilweise erklärt.

5.5 Ausblick

Untersuchungen die als Fortsetzung der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente sinnvoll sind, werden in den entsprechenden Kapiteln 5.1, 5.2 und 5.3 diskutiert. Im Folgenden werden weitere Ansätze ohne unmittelbaren Zusammenhang mit den durchgeführten Experimenten besprochen.

Für *S. aureus* stellt der Nasen-Rachenraum eines der Haupthabitate dar (Lowy, 1998). In weiterführende Studien könnte die Untersuchung der Adhäsion an Nasenepithel vom Menschen und Schwein dazu beitragen, das individuelle Kolonisierungspotential von CC398 Isolaten und dessen Rolle auf die Verbreitungsmuster der CC398 Linie besser einzuschätzen zu können.

Ein weiterer interessanter Ansatz ist die Untersuchung der Verteilung von FnbA und B auf der Zelloberfläche von *S. aureus*. Wie bereits beschrieben, zeigte eine Studie von Alsteens und Kollegen aus dem Jahr 2010 eine Clusterung von zellwandgebundenen Adhäsionsproteinen (Als5p) auf der Zelloberfläche von *C. albicans* (Alsteens *et al.*, 2010). Das Verteilungsmuster von FnbA und B, bzw. aller MSCRAMMs, auf der Oberfläche von *S. aureus* ist bislang noch weitestgehend unbekannt. Eine eventuelle Clusterung könnte die spezifische Adhäsion beeinflussen, indem die Orientierung der *S. aureus* Zelle während der Bindung eine Rolle spielt. In weiterführenden Studien könnte das Verteilungsmuster von FnbA und B durch das Messen von Kraftkarten mittels Rasterkraftmikroskopie mit Fibronektin funktionalisierten Messsonden bestimmt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. **Aarestrup, F.M., Larsen, H.D., Eriksen, N.H., Elsberg, C.S., Jensen, N.E.**, 1999. Frequency of alpha- and beta-haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression. *APMIS* 107, 425-430.
2. **Adamcik, J., Berquand, A., Mezzenga, R.**, 2011. Single-step direct measurement of amyloid fibrils stiffness by peak force quantitative nanomechanical atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* 98.
3. **Alberts, B.**, 2002. *Molecular biology of the cell*, 4th Edition. Garland Science, New York, xxxiv, 1464 p. pp.
4. **Alderson, M.R., Tough, T.W., Davis-Smith, T., Braddy, S., Falk, B., Schooley, K.A., Goodwin, R.G., Smith, C.A., Ramsdell, F., Lynch, D.H.**, 1995. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med* 181, 71-77.
5. **Allison, D.P., Mortensen, N.P., Sullivan, C.J., Doktycz, M.J.**, 2010. Atomic force microscopy of biological samples. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2, 618-634.
6. **Alsteens, D., Garcia, M.C., Lipke, P.N., Dufrene, Y.F.**, 2010. Force-induced formation and propagation of adhesion nanodomains in living fungal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20744-20749.
7. **Archer, G.L.**, 1998. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Clin Infect Dis* 26, 1179-1181.
8. **Archer, G.L., Niemeyer, D.M.**, 1994. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends Microbiol* 2, 343-347.
9. **Armbruster, D., Miller, R.R.**, 2007. The Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM): a global approach to promote the standardisation of clinical laboratory test results. *Clin Biochem Rev* 28, 105-113.
10. **Arvidson, S., Tegmark, K.**, 2001. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 291, 159-170.
11. **Aspiroz, C., Lozano, C., Vindel, A., Lasarte, J.J., Zarazaga, M., Torres, C.**, 2010. Skin lesion caused by ST398 and ST1 MRSA, Spain. *Emerg Infect Dis* 16, 157-159.
12. **Atilano, M.L., Pereira, P.M., Yates, J., Reed, P., Veiga, H., Pinho, M.G., Filipe, S.R.**, 2010. Teichoic acids are temporal and spatial regulators of peptidoglycan cross-linking in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18991-18996.
13. **Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T., Kuroda, H., Cui, L., Yamamoto, K., Hiramatsu, K.**, 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* 359, 1819-1827.

14. **Baddour, L.M., Lowrance, C., Albus, A., Lowrance, J.H., Anderson, S.K., Lee, J.C.**, 1992. Staphylococcus aureus microcapsule expression attenuates bacterial virulence in a rat model of experimental endocarditis. *J Infect Dis* 165, 749-753.
15. **Badiou, C., Dumitrescu, O., Croze, M., Gillet, Y., Dohin, B., Slayman, D.H., Allaouchiche, B., Etienne, J., Vandenesch, F., Lina, G.**, 2008. Panton-Valentine leukocidin is expressed at toxic levels in human skin abscesses. *Clin Microbiol Infect* 14, 1180-1183.
16. **Ballhausen, B., Jung, P., Kriegeskorte, A., Makgotlho, P.E., Ruffing, U., von Muller, L., Kock, R., Peters, G., Herrmann, M., Ziebuhr, W., Becker, K., Bischoff, M.**, 2014. LA-MRSA CC398 differ from classical community acquired-MRSA and hospital acquired-MRSA lineages: functional analysis of infection and colonization processes. *Int J Med Microbiol* 304, 777-786.
17. **Bangerter, P.D., Sidler, X., Perreten, V., Overesch, G.**, 2016. Longitudinal study on the colonisation and transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pig farms. *Vet Microbiol* 183, 125-134.
18. **Becker, K., Friedrich, A.W., Lubritz, G., Weilert, M., Peters, G., Von Eiff, C.**, 2003. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of Staphylococcus aureus isolated from blood and nasal specimens. *J Clin Microbiol* 41, 1434-1439.
19. **Beeby, M., Gumbart, J.C., Roux, B., Jensen, G.J.**, 2013. Architecture and assembly of the Gram-positive cell wall. *Mol Microbiol* 88, 664-672.
20. **Bens, C.C., Voss, A., Klaassen, C.H.**, 2006. Presence of a novel DNA methylation enzyme in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates associated with pig farming leads to uninterpretable results in standard pulsed-field gel electrophoresis analysis. *J Clin Microbiol* 44, 1875-1876.
21. **Bergdoll, M.S., Crass, B.A., Reiser, R.F., Robbins, R.N., Davis, J.P.**, 1981. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome Staphylococcus aureus isolates. *Lancet* 1, 1017-1021.
22. **Berger-Bachi, B., Rohrer, S.**, 2002. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol* 178, 165-171.
23. **Berquand, A.**, 2011. Quantitative Imaging of Living Biological Samples by PeakForce QNM Atomic Force Microscopy. Bruker Corporation Application Note, AN135: 131-110.
24. **Binnig, G., Quate, C.F., Gerber, C.**, 1986. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* 56, 930-933.
25. **Bischoff, M., Dunman, P., Kormanec, J., Macapagal, D., Murphy, E., Mounts, W., Berger-Bachi, B., Projan, S.**, 2004. Microarray-based analysis of the Staphylococcus aureus sigmaB regulon. *J Bacteriol* 186, 4085-4099.
26. **Bisdorff, B., Scholholter, J.L., Claussen, K., Pulz, M., Nowak, D., Radon, K.**, 2012. MRSA-ST398 in livestock farmers and neighbouring residents in a rural area in Germany. *Epidemiol Infect* 140, 1800-1808.

27. **Bokarewa, M., Tarkowski, A.**, 2004. Human alpha -defensins neutralize fibrinolytic activity exerted by staphylokinase. *Thromb Haemost* 91, 991-999.
28. **Boucher, H.W., Corey, G.R.**, 2008. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 46 Suppl 5, S344-349.
29. **Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N.E.**, 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106, 761-771.
30. **Bronner, S., Monteil, H., Prevost, G.**, 2004. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev* 28, 183-200.
31. **Buck, A.W., Fowler, V.G., Jr., Yongsunthon, R., Liu, J., DiBartola, A.C., Que, Y.A., Moreillon, P., Lower, S.K.**, 2010. Bonds between fibronectin and fibronectin-binding proteins on *Staphylococcus aureus* and *Lactococcus lactis*. *Langmuir* 26, 10764-10770.
32. **Bur, S., Preissner, K.T., Herrmann, M., Bischoff, M.**, 2013. The *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein promotes bacterial internalization by keratinocytes independent of fibronectin-binding proteins. *J Invest Dermatol* 133, 2004-2012.
33. **Busscher, H.J., Cowan, M.M., Vandermei, H.C.**, 1992. On the relative importance of specific and nonspecific approaches to oral microbial adhesion. *Fems Microbiology Letters* 88, 199-209.
34. **Cabeen, M.T., Jacobs-Wagner, C.**, 2005. Bacterial cell shape. *Nat Rev Microbiol* 3, 601-610.
35. **Carpaij, N., Willems, R.J., Rice, T.W., Weinstein, R.A., Hinds, J., Witney, A.A., Lindsay, J.A., Bonten, M.J., Fluit, A.C.**, 2011. Genetic variation in spatio-temporal confined USA300 community-associated MRSA isolates. *PLoS One* 6, e16419.
36. **Carvalho, F.A., Santos, N.C.**, 2012. Atomic force microscopy-based force spectroscopy--biological and biomedical applications. *IUBMB Life* 64, 465-472.
37. **Cedergren, L., Andersson, R., Jansson, B., Uhlen, M., Nilsson, B.**, 1993. Mutational analysis of the interaction between staphylococcal protein A and human IgG1. *Protein Eng* 6, 441-448.
38. **Chambers, H.F.**, 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 10, 781-791.
39. **Chambers, H.F.**, 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis* 7, 178-182.
40. **Chan, P.F., Foster, S.J., Ingham, E., Clements, M.O.**, 1998. The *Staphylococcus aureus* Alternative Sigma Factor ζ (B) Controls the Environmental Stress Response but Not Starvation Survival or Pathogenicity in a Mouse Abscess Model. *Journal of Bacteriology* 180, 6082-6089.
41. **Chavakis, T., Wiechmann, K., Preissner, K.T., Herrmann, M.**, 2005. *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire

- adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost* 94, 278-285.
42. **Chen, Y., Norde, W., van der Mei, H.C., Busscher, H.J.**, 2012. Bacterial cell surface deformation under external loading. *MBio* 3.
 43. **Cheung, A.L., Bayer, A.S., Zhang, G., Gresham, H., Xiong, Y.Q.**, 2004. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 40, 1-9.
 44. **Cheung, A.L., Koomey, J.M., Butler, C.A., Projan, S.J., Fischetti, V.A.**, 1992. Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6462-6466.
 45. **Cheung, G.Y., Rigby, K., Wang, R., Queck, S.Y., Braughton, K.R., Whitney, A.R., Teintze, M., DeLeo, F.R., Otto, M.**, 2010. *Staphylococcus epidermidis* strategies to avoid killing by human neutrophils. *PLoS Pathog* 6, e1001133.
 46. **Christie, K., Atkins, N.E., Munch-Petersen, E.**, 1944. A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Aust J Exp Biol Med* 22, 197-200.
 47. **Clarke, S.R., Foster, S.J.**, 2006. Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Adv Microb Physiol* 51, 187-224.
 48. **Collins, L.V., Kristian, S.A., Weidenmaier, C., Faigle, M., Van Kessel, K.P., Van Strijp, J.A., Gotz, F., Neumeister, B., Peschel, A.**, 2002. *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *J Infect Dis* 186, 214-219.
 49. **Corrigan, R.M., Miajlovic, H., Foster, T.J.**, 2009. Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells. *BMC Microbiol* 9, 22.
 50. **Crombe, F., Willems, G., Dispas, M., Hallin, M., Denis, O., Suetens, C., Gordts, B., Struelens, M., Butaye, P.**, 2012. Prevalence and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among pigs in Belgium. *Microb Drug Resist* 18, 125-131.
 51. **Cuny, C., Abdelbary, M., Layer, F., Werner, G., Witte, W.**, 2015. Prevalence of the immune evasion gene cluster in *Staphylococcus aureus* CC398. *Vet Microbiol* 177, 219-223.
 52. **Cuny, C., Friedrich, A.W., Witte, W.**, 2012. Absence of livestock-associated methicillin-resistant *staphylococcus aureus* clonal complex CC398 as a nasal colonizer of pigs raised in an alternative system. *Appl Environ Microbiol* 78, 1296-1297.
 53. **Cuny, C., Kock, R., Witte, W.**, 2013. Livestock associated MRSA (LA-MRSA) and its relevance for humans in Germany. *Int J Med Microbiol* 303, 331-337.
 54. **Cuny, C., Nathaus, R., Layer, F., Strommenger, B., Altmann, D., Witte, W.**, 2009. Nasal colonization of humans with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 with and without exposure to pigs. *PLoS One* 4, e6800.

55. **Dalin, A.M., Magnusson, U., Haggendal, J., Nyberg, L.**, 1993. The effect of transport stress on plasma levels of catecholamines, cortisol, corticosteroid-binding globulin, blood cell count, and lymphocyte proliferation in pigs. *Acta Vet Scand* 34, 59-68.
56. **Das, D., Saha, S.S., Bishayi, B.**, 2008. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus*: correlating production of catalase and superoxide dismutase with levels of inflammatory cytokines. *Inflamm Res* 57, 340-349.
57. **de Boer, E., Zwartkruis-Nahuis, J.T., Wit, B., Huijsdens, X.W., de Neeling, A.J., Bosch, T., van Oosterom, R.A., Vila, A., Heuvelink, A.E.**, 2009. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *Int J Food Microbiol* 134, 52-56.
58. **de Haas, C.J., Veldkamp, K.E., Peschel, A., Weerkamp, F., Van Wamel, W.J., Heezius, E.C., Poppelier, M.J., Van Kessel, K.P., van Strijp, J.A.**, 2004. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J Exp Med* 199, 687-695.
59. **de Neeling, A.J., van den Broek, M.J., Spalburg, E.C., van Santen-Verheuevel, M.G., Dam-Deisz, W.D., Boshuizen, H.C., van de Giessen, A.W., van Duijkeren, E., Huijsdens, X.W.**, 2007. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet Microbiol* 122, 366-372.
60. **Devriese, L.A., Van Damme, L.R., Fameree, L.**, 1972. Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zentralbl Veterinarmed B* 19, 598-605.
61. **Diep, B.A., Otto, M.**, 2008. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends Microbiol* 16, 361-369.
62. **Doery, H.M., Magnusson, B.J., Cheyne, I.M., Sulasekharam, J.**, 1963. A phospholipase in staphylococcal toxin which hydrolyses sphingomyelin. *Nature* 198, 1091-1092.
63. **Doery, H.M., Magnusson, B.J., Gulasekharam, J., Pearson, J.E.**, 1965. The properties of phospholipase enzymes in staphylococcal toxins. *J Gen Microbiol* 40, 283-296.
64. **Dohsten, M., Bjorklund, M., Sundstedt, A., Hedlund, G., Samson, D., Kalland, T.**, 1993. Immunopharmacology of the superantigen staphylococcal enterotoxin A in T-cell receptor V beta 3 transgenic mice. *Immunology* 79, 520-527.
65. **Ducker, W.A., Senden, T.J., Pashley, R.M.**, 1992. Measurement of forces in liquids using a force microscope. *Langmuir* 8, 1831-1836.
66. **Dufrene, Y.F.**, 2002. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *J Bacteriol* 184, 5205-5213.
67. **Dufrene, Y.F.**, 2015. Sticky microbes: forces in microbial cell adhesion. *Trends Microbiol* 23, 376-382.
68. **Dumont, A.L., Nygaard, T.K., Watkins, R.L., Smith, A., Kozhaya, L., Kreiswirth, B.N., Shopsin, B., Unutmaz, D., Voyich, J.M., Torres, V.J.**, 2011. Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Mol Microbiol* 79, 814-825.

69. **Edmiston, C.E., Seabrook, G.R., Goheen, M.P., Krepel, C.J., Johnson, C.P., Lewis, B.D., Brown, K.R., Towne, J.B.**, 2006. Bacterial adherence to surgical sutures: can antibacterial-coated sutures reduce the risk of microbial contamination? *J Am Coll Surg* 203, 481-489.
70. **Enright, M.C., Day, N.P., Davies, C.E., Peacock, S.J., Spratt, B.G.**, 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 38, 1008-1015.
71. **Fessler, A., Scott, C., Kadlec, K., Ehricht, R., Monecke, S., Schwarz, S.**, 2010. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *J Antimicrob Chemother* 65, 619-625.
72. **Fessler, A.T., Olde Riekerink, R.G., Rothkamp, A., Kadlec, K., Sampimon, O.C., Lam, T.J., Schwarz, S.**, 2012. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 obtained from humans and animals on dairy farms. *Vet Microbiol* 160, 77-84.
73. **Fitzgerald, J.R., Monday, S.R., Foster, T.J., Bohach, G.A., Hartigan, P.J., Meaney, W.J., Smyth, C.J.**, 2001. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J Bacteriol* 183, 63-70.
74. **Forsgren, A., Svedjelund, A., Wigzell, H.**, 1976. Lymphocyte stimulation by protein A of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Immunol* 6, 207-213.
75. **Foster, T.J.**, 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* 3, 948-958.
76. **Frenay, H.M., Bunschoten, A.E., Schouls, L.M., van Leeuwen, W.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Verhoef, J., Mooi, F.R.**, 1996. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15, 60-64.
77. **Gaboriaud, F., Bailet, S., Dague, E., Jorand, F.**, 2005. Surface structure and nanomechanical properties of *Shewanella putrefaciens* bacteria at two pH values (4 and 10) determined by atomic force microscopy. *J Bacteriol* 187, 3864-3868.
78. **Gertz, S., Engelmann, S., Schmid, R., Ohlsen, K., Hacker, J., Hecker, M.**, 1999. Regulation of sigmaB-dependent transcription of sigB and asp23 in two different *Staphylococcus aureus* strains. *Mol Gen Genet* 261, 558-566.
79. **Gertz, S., Engelmann, S., Schmid, R., Ziebandt, A.-K., Tischer, K., Scharf, C., Hacker, J., Hecker, M.**, 2000. Characterization of the $\zeta(B)$ Regulon in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 182, 6983-6991.
80. **Gillet, Y., Issartel, B., Vanhems, P., Fournet, J.C., Lina, G., Bes, M., Vandenesch, F., Piemont, Y., Brousse, N., Floret, D., Etienne, J.**, 2002. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 359, 753-759.
81. **Gladysheva, I.P., Turner, R.B., Sazonova, I.Y., Liu, L., Reed, G.L.**, 2003. Coevolutionary patterns in plasminogen activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9168-9172.

-
82. **Glenny, A.T., Stevens, M.F.**, 1935. Staphylococcus toxins and antitoxins. The Journal of Pathology and Bacteriology 40, 201-210.
83. **Golding, G.R., Bryden, L., Levett, P.N., McDonald, R.R., Wong, A., Graham, M.R., Tyler, S., Van Domselaar, G., Mabon, P., Kent, H., Butaye, P., Smith, T.C., Kadlec, K., Schwarz, S., Weese, S.J., Mulvey, M.R.**, 2012. whole-genome sequence of livestock-associated st398 methicillin-resistant staphylococcus aureus Isolated from Humans in Canada. J Bacteriol 194, 6627-6628.
84. **Golding, G.R., Bryden, L., Levett, P.N., McDonald, R.R., Wong, A., Wylie, J., Graham, M.R., Tyler, S., Van Domselaar, G., Simor, A.E., Gravel, D., Mulvey, M.R.**, 2010. Livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus sequence type 398 in humans, Canada. Emerg Infect Dis 16, 587-594.
85. **Gordon, R.J., Lowy, F.D.**, 2008. Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. Clin Infect Dis 46 Suppl 5, S350-359.
86. **Görge, T., Lorenz, M.B., van Alen, S., Hubner, N.O., Becker, K., Kock, R.**, 2015. MRSA colonization and infection among persons with occupational livestock exposure in Europe: Prevalence, preventive options and evidence. Vet Microbiol.
87. **Gotz, F.**, 2002. Staphylococcus and biofilms. Mol Microbiol 43, 1367-1378.
88. **Greene, C., McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P.E., Lew, D.P., 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.
89. **Gresham, H.D., Lowrance, J.H., Caver, T.E., Wilson, B.S., Cheung, A.L., Lindberg, F.P.**, 2000. Survival of Staphylococcus aureus inside neutrophils contributes to infection. J Immunol 164, 3713-3722.
90. **Grohmann, E., Muth, G., Espinosa, M.**, 2003. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 67, 277-301, table of contents.
91. **Grumann, D., Nubel, U., Broker, B.M.**, 2014. Staphylococcus aureus toxins--their functions and genetics. Infect Genet Evol 21, 583-592.
92. **Grumann, D., Ruotsalainen, E., Kolata, J., Kuusela, P., Jarvinen, A., Kontinen, V.P., Broker, B.M., Holtfreter, S.**, 2011. Characterization of infecting strains and superantigen-neutralizing antibodies in Staphylococcus aureus bacteremia. Clin Vaccine Immunol 18, 487-493.
93. **Guardabassi, L., Stegger, M., Skov, R.**, 2007. Retrospective detection of methicillin resistant and susceptible Staphylococcus aureus ST398 in Danish slaughter pigs. Vet Microbiol 122, 384-386.
94. **Haggar, A., Shannon, O., Norrby-Teglund, A., Flock, J.I.**, 2005. Dual effects of extracellular adherence protein from Staphylococcus aureus on peripheral blood mononuclear cells. J Infect Dis 192, 210-217.

-
95. **Haim, M., Trost, A., Maier, C.J., Achatz, G., Feichtner, S., Hintner, H., Bauer, J.W., Onder, K.**, 2010. Cytokeratin 8 interacts with clumping factor B: a new possible virulence factor target. *Microbiology* 156, 3710-3721.
 96. **Hanssen, A.M., Ericson Sollid, J.U.**, 2006. SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46, 8-20.
 97. **Hanssen, A.M., Sollid, J.U.**, 2007. Multiple staphylococcal cassette chromosomes and allelic variants of cassette chromosome recombinases in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from Norway. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 1671-1677.
 98. **Harmsen, D., Claus, H., Witte, W., Rothganger, J., Claus, H., Turnwald, D., Vogel, U.**, 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J Clin Microbiol* 41, 5442-5448.
 99. **Hartleib, J., Kohler, N., Dickinson, R.B., Chhatwal, G.S., Sixma, J.J., Hartford, O.M., Foster, T.J., Peters, G., Kehrel, B.E., Herrmann, M.**, 2000. Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood* 96, 2149-2156.
 100. **Haupt, K., Reuter, M., van den Elsen, J., Burman, J., Halbich, S., Richter, J., Skerka, C., Zipfel, P.F.**, 2008. The *Staphylococcus aureus* protein Sbi acts as a complement inhibitor and forms a tripartite complex with host complement Factor H and C3b. *PLoS Pathog* 4, e1000250.
 101. **Heilmann, C.**, 2011. Adhesion mechanisms of staphylococci. *Adv Exp Med Biol* 715, 105-123.
 102. **Hertz, H.**, 1882. Über die Berührung fester elastischer Körper. *Journal für die reine und angewandte Mathematik* 92, 156-171.
 103. **Heu, C., Berquand, A., Elie-Caille, C., Nicod, L.**, 2012. Glyphosate-induced stiffening of HaCaT keratinocytes, a Peak Force Tapping study on living cells. *J Struct Biol* 178, 1-7.
 104. **Ho, P.L., Chuang, S.K., Choi, Y.F., Lee, R.A., Lit, A.C., Ng, T.K., Que, T.L., Shek, K.C., Tong, H.K., Tse, C.W., Tung, W.K., Yung, R.W.**, 2008. Community-associated methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: skin and soft tissue infections in Hong Kong. *Diagn Microbiol Infect Dis* 61, 245-250.
 105. **Holtfreter, S., Bauer, K., Thomas, D., Feig, C., Lorenz, V., Roschack, K., Friebe, E., Selleng, K., Lovenich, S., Greve, T., Greinacher, A., Panzig, B., Engelmann, S., Lina, G., Broker, B.M.**, 2004. egc-Encoded superantigens from *Staphylococcus aureus* are neutralized by human sera much less efficiently than are classical staphylococcal enterotoxins or toxic shock syndrome toxin. *Infect Immun* 72, 4061-4071.
 106. **Holtfreter, S., Grumann, D., Schmutde, M., Nguyen, H.T., Eichler, P., Strommenger, B., Kopron, K., Kolata, J., Giedrys-Kalemba, S., Steinmetz, I., Witte, W., Broker, B.M.**, 2007. Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 45, 2669-2680.

107. **Huijsdens, X.W., van Dijke, B.J., Spalburg, E., van Santen-Verheuevel, M.G., Heck, M.E., Pluister, G.N., Voss, A., Wannet, W.J., de Neeling, A.J.**, 2006. Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 5, 26.
108. **Huseby, M., Shi, K., Brown, C.K., Digre, J., Mengistu, F., Seo, K.S., Bohach, G.A., Schlievert, P.M., Ohlendorf, D.H., Earhart, C.A.**, 2007. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 189, 8719-8726.
109. **Hutter, J.L., Bechhoefer, J.**, 1993. Calibration of atomic-force microscope tips. Review of *Scientific Instruments* 64, 1868-1873.
110. **Inoshima, I., Inoshima, N., Wilke, G.A., Powers, M.E., Frank, K.M., Wang, Y., Bubeck Wardenburg, J.**, 2011. A *Staphylococcus aureus* pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. *Nat Med* 17, 1310-1314.
111. **Ip, M., Yung, R.W., Ng, T.K., Luk, W.K., Tse, C., Hung, P., Enright, M., Lyon, D.J.**, 2005. Contemporary methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Hong Kong. *J Clin Microbiol* 43, 5069-5073.
112. **Jackson, M.P., DeSena, J., Lednicky, J., McPherson, B., Haile, R., Garrison, R.G., Rogolsky, M.**, 1983. Isolation and characterization of a bacteriophage factor that confers competence for genetic transformation to an exfoliative toxin-producing strain of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 39, 939-947.
113. **Janeway, C.**, 2005. *Immunobiology : the immune system in health and disease*, 6th Edition. Garland Science, New York, xxiii, 823 p. pp.
114. **Jin, T., Bokarewa, M., Foster, T., Mitchell, J., Higgins, J., Tarkowski, A.**, 2004. *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol* 172, 1169-1176.
115. **Johns, M.B., Jr., Khan, S.A.**, 1988. Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with a discrete genetic element. *J Bacteriol* 170, 4033-4039.
116. **Jonsson, K., Signas, C., Muller, H.P., Lindberg, M.**, 1991. Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *Eur J Biochem* 202, 1041-1048.
117. **Jung, P., Abdelbary, M.M., Kraushaar, B., Fetsch, A., Geisel, J., Herrmann, M., Witte, W., Cuny, C., Bischoff, M.**, 2016. Impact of bacteriophage Saint3 carriage on the immune evasion capacity and hemolytic potential of *Staphylococcus aureus* CC398. *Vet Microbiol*.
118. **Kaneko, J., Kimura, T., Narita, S., Tomita, T., Kamio, Y.**, 1998. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage phiPVL carrying Panton-Valentine leukocidin genes. *Gene* 215, 57-67.
119. **Karalyan, Z., Zakaryan, H., Arzumanyan, H., Sargsyan, K., Voskanyan, H., Hakobyan, L., Abroyan, L., Avetisyan, A., Karalova, E.**, 2012. Pathology of porcine peripheral white blood cells during infection with African swine fever virus. *BMC Vet Res* 8, 18.

120. **Karavolos, M.H., Horsburgh, M.J., Ingham, E., Foster, S.J.**, 2003. Role and regulation of the superoxide dismutases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 149, 2749-2758.
121. **Katayama, Y., Baba, T., Sekine, M., Fukuda, M., Hiramatsu, K.**, 2013. Beta-hemolysin promotes skin colonization by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 195, 1194-1203.
122. **Kim, H.K., Thammavongsa, V., Schneewind, O., Missiakas, D.**, 2012. Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol* 15, 92-99.
123. **Köck, R., Ballhausen, B., Bischoff, M., Cuny, C., Eckmanns, T., Fetsch, A., Harmsen, D., Goerge, T., Oberheitmann, B., Schwarz, S., Selhorst, T., Tenhagen, B.A., Walther, B., Witte, W., Ziebuhr, W., Becker, K.**, 2014. The impact of zoonotic MRSA colonization and infection in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 127, 384-398.
124. **Köck, R., Brakensiek, L., Mellmann, A., Kipp, F., Henderikx, M., Harmsen, D., Daniels-Haardt, I., von Eiff, C., Becker, K., Hendrix, M.G., Friedrich, A.W.**, 2009a. Cross-border comparison of the admission prevalence and clonal structure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect* 71, 320-326.
125. **Köck, R., Harlizius, J., Bressan, N., Laerberg, R., Wieler, L.H., Witte, W., Deurenberg, R.H., Voss, A., Becker, K., Friedrich, A.W.**, 2009b. Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28, 1375-1382.
126. **Köck, R., Loth, B., Koksai, M., Schulte-Wulwer, J., Harlizius, J., Friedrich, A.W.**, 2012. Persistence of nasal colonization with livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farmers after holidays from pig exposure. *Appl Environ Microbiol* 78, 4046-4047.
127. **Köck, R., Schaumburg, F., Mellmann, A., Koksai, M., Jurke, A., Becker, K., Friedrich, A.W.**, 2013. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as causes of human infection and colonization in Germany. *PLoS One* 8, e55040.
128. **Köck, R., Siam, K., Al-Malat, S., Christmann, J., Schaumburg, F., Becker, K., Friedrich, A.W.**, 2011. Characteristics of hospital patients colonized with livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 versus other MRSA clones. *J Hosp Infect* 79, 292-296.
129. **Krämer, R., Jung, K.**, 2010. *Bacterial signaling*. Wiley-VCH, Weinheim, xxv, 489 p. pp.
130. **Kreusokun, K., Fetsch, A., Kraushaar, B., Alt, K., Müller, K., Kromker, V., Zessin, K.H., Kasbohrer, A., Tenhagen, B.A.**, 2012. Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bulk tank milk of dairy herds. *J Dairy Sci* 95, 4382-4388.
131. **Kristian, S.A., Durr, M., Van Strijp, J.A., Neumeister, B., Peschel, A.**, 2003. MprF-mediated lysinylation of phospholipids in *Staphylococcus aureus* leads to protection against oxygen-independent neutrophil killing. *Infect Immun* 71, 546-549.

132. **Kubica, M., Guzik, K., Koziel, J., Zarebski, M., Richter, W., Gajkowska, B., Golda, A., Maciag-Gudowska, A., Brix, K., Shaw, L., Foster, T., Potempa, J., 2008.** A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 3, e1409.
133. **Larjava, H., Salo, T., Haapasalmi, K., Kramer, R.H., Heino, J., 1993.** Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. *J Clin Invest* 92, 1425-1435.
134. **Lee, J.H., 2003.** Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl Environ Microbiol* 69, 6489-6494.
135. **Lee, L.Y., Hook, M., Haviland, D., Wetsel, R.A., Yonter, E.O., Syribeys, P., Vernachio, J., Brown, E.L., 2004a.** Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. *J Infect Dis* 190, 571-579.
136. **Lee, L.Y., Liang, X., Hook, M., Brown, E.L., 2004b.** Identification and characterization of the C3 binding domain of the *Staphylococcus aureus* extracellular fibrinogen-binding protein (Efb). *J Biol Chem* 279, 50710-50716.
137. **Lewis, H.C., Molbak, K., Reese, C., Aarestrup, F.M., Selchau, M., Sorum, M., Skov, R.L., 2008.** Pigs as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in humans, Denmark. *Emerg Infect Dis* 14, 1383-1389.
138. **Lina, G., Bohach, G.A., Nair, S.P., Hiramatsu, K., Jouvin-Marche, E., Mariuzza, R., 2004.** Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J Infect Dis* 189, 2334-2336.
139. **Lindsay, J.A., 2010.** Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 300, 98-103.
140. **Lindsay, J.A., 2014.** *Staphylococcus aureus* genomics and the impact of horizontal gene transfer. *Int J Med Microbiol* 304, 103-109.
141. **Lindsay, J.A., Holden, M.T., 2006.** Investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. *Funct Integr Genomics* 6, 186-201.
142. **Liu, S., Wang, Y., 2010.** Application of AFM in microbiology: a review. *Scanning* 32, 61-73.
143. **Liu, Y., Strauss, J., Camesano, T.A., 2008.** Adhesion forces between *Staphylococcus epidermidis* and surfaces bearing self-assembled monolayers in the presence of model proteins. *Biomaterials* 29, 4374-4382.
144. **Löffler, B., Hussain, M., Grundmeier, M., Bruck, M., Holzinger, D., Varga, G., Roth, J., Kahl, B.C., Proctor, R.A., Peters, G., 2010.** *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog* 6, e1000715.
145. **Lorenz, M.G., Wackernagel, W., 1994.** Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev* 58, 563-602.
146. **Lowy, F.D., 1998.** *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339, 520-532.

147. **Lozano, C., Rezusta, A., Gomez, P., Gomez-Sanz, E., Baez, N., Martin-Saco, G., Zarazaga, M., Torres, C.**, 2012. High prevalence of spa types associated with the clonal lineage CC398 among tetracycline-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother* 67, 330-334.
148. **Madigan, M.T., Brock, T.D.**, 2009. Brock biology of microorganisms, 12th Edition. Pearson/Benjamin Cummings, San Francisco, CA, xxviii, 1061 p. pp.
149. **Mainiero, M., Goerke, C., Geiger, T., Gonser, C., Herbert, S., Wolz, C.**, 2010. Differential target gene activation by the *Staphylococcus aureus* two-component system saeRS. *J Bacteriol* 192, 613-623.
150. **Mamma, C., Cala, C., Plano, M.R., Bonura, C., Vella, A., Monastero, R., Palma, D.M.**, 2010. Ventilator-associated pneumonia and MRSA ST398, Italy. *Emerg Infect Dis* 16, 730-731.
151. **Marshall, M.J., Bohach, G.A., Boehm, D.F.**, 2000. Characterization of *Staphylococcus aureus* beta-toxin induced leukotoxicity. *J Nat Toxins* 9, 125-138.
152. **Masiuk, H., Kopron, K., Grumann, D., Goerke, C., Kolata, J., Jursa-Kulesza, J., Giedrys-Kalemba, S., Broker, B.M., Holtfreter, S.**, 2010. Association of recurrent furunculosis with Panton-Valentine leukocidin and the genetic background of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 48, 1527-1535.
153. **Maugis, D.**, 1992. Adhesion of spheres - The JKR-DMT Transition using a dugdale model. *J. Colloid Interface Sci.* 150, 243-269.
154. **Maver, U., Maver, T., Peršin, Z., Stana-Kleinschek, K., Mozetič, M., Vesel, A.**, 2013. Polymer Characterization with the Atomic Force Microscope.
155. **McAdow, M., Missiakas, D.M., Schneewind, O.**, 2012. *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. *J Innate Immun* 4, 141-148.
156. **McCarthy, A.J., van Wamel, W., Vandendriessche, S., Larsen, J., Denis, O., Garcia-Graells, C., Uhlemann, A.C., Lowy, F.D., Skov, R., Lindsay, J.A.**, 2012a. *Staphylococcus aureus* CC398 clade associated with human-to-human transmission. *Appl Environ Microbiol* 78, 8845-8848.
157. **McCarthy, A.J., Witney, A.A., Gould, K.A., Moodley, A., Guardabassi, L., Voss, A., Denis, O., Broens, E.M., Hinds, J., Lindsay, J.A.**, 2011. The distribution of mobile genetic elements (MGEs) in MRSA CC398 is associated with both host and country. *Genome Biol Evol* 3, 1164-1174.
158. **McCarthy, A.J., Witney, A.A., Lindsay, J.A.**, 2012b. *Staphylococcus aureus* lysogenic bacteriophage: carriage and horizontal gene transfer (HGT) is lineage associated. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2.
159. **McCormick, J.K., Yarwood, J.M., Schlievert, P.M.**, 2001. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu Rev Microbiol* 55, 77-104.

-
160. **McDevitt, D., Nanavaty, T., House-Pompeo, K., Bell, E., Turner, N., McIntire, L., Foster, T., Hook, M.**, 1997. Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. *Eur J Biochem* 247, 416-424.
161. **Mehndiratta, P.L., Bhalla, P.**, 2012. Typing of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: a technical review. *Indian J Med Microbiol* 30, 16-23.
162. **Melo, S.K., Diniz, A.I., de Lira, V.L., de Oliveira Muniz, S.K., da Silva, G.R., Manso, H.E., Manso Filho, H.C.**, 2016. Antioxidant and haematological biomarkers in different groups of horses supplemented with polyunsaturated oil and vitamin E. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*.
163. **Monecke, S., Kuhnert, P., Hotzel, H., Slickers, P., Ehricht, R.**, 2007. Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. *Vet Microbiol* 125, 128-140.
164. **Mooij, R.** 2007. MRSA in calves. In *Infectieziekten Bulletin* 18, 234–236.
165. **Morikawa, K., Takemura, A.J., Inose, Y., Tsai, M., Nguyen Thi le, T., Ohta, T., Msadek, T.**, 2012. Expression of a cryptic secondary sigma factor gene unveils natural competence for DNA transformation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* 8, e1003003.
166. **Morinaga, N., Kaihou, Y., Noda, M.**, 2003. Purification, cloning and characterization of variant LukE-LukD with strong leukocidal activity of staphylococcal bi-component leukotoxin family. *Microbiol Immunol* 47, 81-90.
167. **Mosher, D.F.**, 2006. Plasma fibronectin concentration: a risk factor for arterial thrombosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1193-1195.
168. **Mulcahy, M.E., Geoghegan, J.A., Monk, I.R., O'Keeffe, K.M., Walsh, E.J., Foster, T.J., McLoughlin, R.M.**, 2012. Nasal colonisation by *Staphylococcus aureus* depends upon clumping factor B binding to the squamous epithelial cell envelope protein loricrin. *PLoS Pathog* 8, e1003092.
169. **Murdoch, C., Finn, A.**, 2000. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 95, 3032-3043.
170. **Nair, S.P., Bischoff, M., Senn, M.M., Berger-Bächi, B.**, 2003. The $\sigma(B)$ Regulon Influences Internalization of *Staphylococcus aureus* by Osteoblasts. *Infection and Immunity* 71, 4167-4170.
171. **Nemati, M., Hermans, K., Lipinska, U., Denis, O., Deplano, A., Struelens, M., Devriese, L.A., Pasmans, F., Haesebrouck, F.**, 2008. Antimicrobial resistance of old and recent *Staphylococcus aureus* isolates from poultry: first detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 3817-3819.
172. **Ni Eidhin, D., Perkins, S., Francois, P., Vaudaux, P., Hook, M., Foster, T.J.**, 1998. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 30, 245-257.

173. **Nilsson, I.M., Hartford, O., Foster, T., Tarkowski, A.**, 1999. Alpha-toxin and gamma-toxin jointly promote *Staphylococcus aureus* virulence in murine septic arthritis. *Infect Immun* 67, 1045-1049.
174. **Nilsson, I.M., Lee, J.C., Bremell, T., Ryden, C., Tarkowski, A.**, 1997. The role of staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis. *Infect Immun* 65, 4216-4221.
175. **Novick, R.**, 1967. Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. *Virology* 33, 155-166.
176. **Novick, R.P.**, 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* 48, 1429-1449.
177. **Nygaard, T.K., Pallister, K.B., DuMont, A.L., DeWald, M., Watkins, R.L., Pallister, E.Q., Malone, C., Griffith, S., Horswill, A.R., Torres, V.J., Voyich, J.M.**, 2012. Alpha-toxin induces programmed cell death of human T cells, B cells, and monocytes during USA300 infection. *PLoS One* 7, e36532.
178. **O'Brien, L., Kerrigan, S.W., Kaw, G., Hogan, M., Penades, J., Litt, D., Fitzgerald, D.J., Foster, T.J., Cox, D.**, 2002a. Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. *Mol Microbiol* 44, 1033-1044.
179. **O'Brien, L.M., Walsh, E.J., Massey, R.C., Peacock, S.J., Foster, T.J.**, 2002b. *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. *Cell Microbiol* 4, 759-770.
180. **O'Riordan, K., Lee, J.C.**, 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev* 17, 218-234.
181. **Ogston, A.**, 1882. Micrococcus Poisoning. *J Anat Physiol* 17, 24-58.
182. **Omland, O., Hoffmann, L.**, 2012. Occupational acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans--a description of MRSA carrier and infected cases from the Region of North Jutland in Denmark. *Ann Agric Environ Med* 19, 637-640.
183. **Ono, H.K., Omoe, K., Imanishi, K., Iwakabe, Y., Hu, D.L., Kato, H., Saito, N., Nakane, A., Uchiyama, T., Shinagawa, K.**, 2008. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. *Infect Immun* 76, 4999-5005.
184. **Pan, A., Battisti, A., Zoncada, A., Bernieri, F., Boldini, M., Franco, A., Giorgi, M., Iurescia, M., Lorenzotti, S., Martinotti, M., Monaci, M., Pantosti, A.**, 2009. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 infection, Italy. *Emerg Infect Dis* 15, 845-847.
185. **Pang, Y.Y., Schwartz, J., Thoendel, M., Ackermann, L.W., Horswill, A.R., Nauseef, W.M.**, 2010. agr-Dependent interactions of *Staphylococcus aureus* USA300 with human polymorphonuclear neutrophils. *J Innate Immun* 2, 546-559.

-
186. **Parot, P., Dufrene, Y.F., Hinterdorfer, P., Le Grimellec, C., Navajas, D., Pellequer, J.L., Scheuring, S.**, 2007. Past, present and future of atomic force microscopy in life sciences and medicine. *J Mol Recognit* 20, 418-431.
187. **Patel, A.H., Nowlan, P., Weavers, E.D., Foster, T.**, 1987. Virulence of protein A-deficient and alpha-toxin-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele replacement. *Infect Immun* 55, 3103-3110.
188. **Patti, J.M., House-Pompeo, K., Boles, J.O., Garza, N., Gurusiddappa, S., Hook, M.**, 1995. Critical residues in the ligand-binding site of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding adhesin (MSCRAMM). *J Biol Chem* 270, 12005-12011.
189. **Peacock, S.J., Day, N.P., Thomas, M.G., Berendt, A.R., Foster, T.J.**, 2000. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in *fnb* genes and adhesion to human fibronectin. *J Infect* 41, 23-31.
190. **Persoons, D., Van Hoorebeke, S., Hermans, K., Butaye, P., de Kruif, A., Haesebrouck, F., Dewulf, J.**, 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in poultry. *Emerg Infect Dis* 15, 452-453.
191. **Peschel, A., Jack, R.W., Otto, M., Collins, L.V., Staubitz, P., Nicholson, G., Kalbacher, H., Nieuwenhuizen, W.F., Jung, G., Tarkowski, A., van Kessel, K.P., van Strijp, J.A.**, 2001. *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J Exp Med* 193, 1067-1076.
192. **Peschel, A., Otto, M., Jack, R.W., Kalbacher, H., Jung, G., Gotz, F.**, 1999. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* 274, 8405-8410.
193. **Peterson, P.K., Verhoef, J., Sabath, L.D., Quie, P.G.**, 1977. Effect of protein A on staphylococcal opsonization. *Infect Immun* 15, 760-764.
194. **Petrelli, D., Repetto, A., Di Luca, M.C., Parente, B., Tavolini, V., Cao, P., Ripa, C., Prenna, M., Vitali, L.A.**, 2008. Characterization of a *Staphylococcus aureus* strain showing high levels of biofilm formation isolated from a vascular graft: case report. *Int J Immunopathol Pharmacol* 21, 745-750.
195. **Pier, G.B., Lyczak, J.B., Wetzler, L.M.**, 2004. Immunology, infection, and immunity. ASM Press, Washington, D.C., xxiii, 718 p. pp.
196. **Pillet, F., Chopinet, L., Formosa, C., Dague, E.**, 2014. Atomic Force Microscopy and pharmacology: from microbiology to cancerology. *Biochim Biophys Acta* 1840, 1028-1050.
197. **Planchon, S., Gaillard-Martinie, B., Leroy, S., Bellon-Fontaine, M.N., Fadda, S., Talon, R.**, 2007. Surface properties and behaviour on abiotic surfaces of *Staphylococcus carnosus*, a genetically homogeneous species. *Food Microbiol* 24, 44-51.
198. **Popov, E.P., Nagarajan, S., Lu, Z.A.**, 1976. Mechanics of materials, 2d Edition. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., xiii, 590 p. pp.

199. **Prevost, G., Mourey, L., Colin, D.A., Menestrina, G.**, 2001. Staphylococcal pore-forming toxins. *Curr Top Microbiol Immunol* 257, 53-83.
200. **Price, J., Gordon, N.C., Crook, D., Llewelyn, M., Paul, J.**, 2013. The usefulness of whole genome sequencing in the management of *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Microbiol Infect* 19, 784-789.
201. **Proft, T., Fraser, J.D.**, 2003. Bacterial superantigens. *Clin Exp Immunol* 133, 299-306.
202. **Putnins, E.E., Firth, J.D., Lohachitranont, A., Uitto, V.J., Larjava, H.**, 1999. Keratinocyte growth factor (KGF) promotes keratinocyte cell attachment and migration on collagen and fibronectin. *Cell Adhes Commun* 7, 211-221.
203. **Rautenberg, M., Joo, H.S., Otto, M., Peschel, A.**, 2011. Neutrophil responses to staphylococcal pathogens and commensals via the formyl peptide receptor 2 relates to phenol-soluble modulins release and virulence. *FASEB J* 25, 1254-1263.
204. **Rellahan, B.L., Jones, L.A., Kruisbeek, A.M., Fry, A.M., Matis, L.A.**, 1990. In vivo induction of anergy in peripheral V beta 8+ T cells by staphylococcal enterotoxin B. *J Exp Med* 172, 1091-1100.
205. **Roche, F.M., Downer, R., Keane, F., Speziale, P., Park, P.W., Foster, T.J.**, 2004. The N-terminal A domain of fibronectin-binding proteins A and B promotes adhesion of *Staphylococcus aureus* to elastin. *J Biol Chem* 279, 38433-38440.
206. **Roghamann, M., Taylor, K.L., Gupte, A., Zhan, M., Johnson, J.A., Cross, A., Edelman, R., Fattom, A.I.**, 2005. Epidemiology of capsular and surface polysaccharide in *Staphylococcus aureus* infections complicated by bacteraemia. *J Hosp Infect* 59, 27-32.
207. **Rooijackers, S.H., Ruyken, M., Roos, A., Daha, M.R., Presanis, J.S., Sim, R.B., van Wamel, W.J., van Kessel, K.P., van Strijp, J.A.**, 2005. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nature immunology* 6, 920-927.
208. **Roos, W.H., Wuite, G.L.**, 2009. Nanoindentation Studies Reveal Material Properties of Viruses. *Advanced Materials* 21, 1187-1192.
209. **Ruffing, U., Akulenko, R., Bischoff, M., Helms, V., Herrmann, M., von Muller, L.**, 2012. Matched-cohort DNA microarray diversity analysis of methicillin sensitive and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospital admission patients. *PLoS One* 7, e52487.
210. **Ruzin, A., Lindsay, J., Novick, R.P.**, 2001. Molecular genetics of SaPI1--a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 41, 365-377.
211. **Schaumburg, F., Kock, R., Mellmann, A., Richter, L., Hasenberg, F., Kriegeskorte, A., Friedrich, A.W., Gatermann, S., Peters, G., von Eiff, C., Becker, K.**, 2012. Population dynamics among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Germany during a 6-year period. *J Clin Microbiol* 50, 3186-3192.
212. **Scheffers, D.J., Pinho, M.G.**, 2005. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 585-607.

-
213. **Schijffelen, M.J., Boel, C.H., van Strijp, J.A., Fluit, A.C.**, 2010. Whole genome analysis of a livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolate from a case of human endocarditis. *BMC Genomics* 11, 376.
214. **Schleifer, K.H., Fischer, U.**, 1982. Description of a New Species of the Genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 32, 153-156.
215. **Schneewind, O., Mihaylova-Petkov, D., Model, P.**, 1993. Cell wall sorting signals in surface proteins of gram-positive bacteria. *EMBO J* 12, 4803-4811.
216. **Schulz, J., Friese, A., Klees, S., Tenhagen, B.A., Fetsch, A., Rosler, U., Hartung, J.**, 2012. Longitudinal study of the contamination of air and of soil surfaces in the vicinity of pig barns by livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 78, 5666-5671.
217. **Schwarz, S., Kadlec, K., Strommenger, B.**, 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the BfT-GermVet monitoring programme 2004-2006 in Germany. *J Antimicrob Chemother* 61, 282-285.
218. **Schwarz, U.D.**, 2003. A generalized analytical model for the elastic deformation of an adhesive contact between a sphere and a flat surface. *J Colloid Interface Sci* 261, 99-106.
219. **Sergio, D.M., Koh, T.H., Hsu, L.Y., Ogden, B.E., Goh, A.L., Chow, P.K.**, 2007. Investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs used for research. *J Med Microbiol* 56, 1107-1109.
220. **Shallcross, L.J., Fragaszy, E., Johnson, A.M., Hayward, A.C.**, 2013. The role of the Pantone-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 13, 43-54.
221. **Shore, A.C., Rossney, A.S., Brennan, O.M., Kinnevey, P.M., Humphreys, H., Sullivan, D.J., Goering, R.V., Ehricht, R., Monecke, S., Coleman, D.C.**, 2011. Characterization of a novel arginine catabolic mobile element (ACME) and staphylococcal chromosomal cassette mec composite island with significant homology to *Staphylococcus epidermidis* ACME type II in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* genotype ST22-MRSA-IV. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 1896-1905.
222. **Short, S.M., Talbott, G.A., Juliano, R.L.**, 1998. Integrin-mediated signaling events in human endothelial cells. *Mol Biol Cell* 9, 1969-1980.
223. **Shrestha, B.**, 2013. Review on Pantone Valentine leukocidin toxin carriage among *Staphylococcus aureus*. *J Nepal Health Res Counc* 11, 305-312.
224. **Siboo, I.R., Cheung, A.L., Bayer, A.S., Sullam, P.M.**, 2001. Clumping factor A mediates binding of *Staphylococcus aureus* to human platelets. *Infect Immun* 69, 3120-3127.
225. **Signas, C., Raucchi, G., Jonsson, K., Lindgren, P.E., Anantharamaiah, G.M., Hook, M., Lindberg, M.**, 1989. Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from

- Staphylococcus aureus: use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides. Proc Natl Acad Sci U S A 86, 699-703.
226. **Sjodahl, J.**, 1977. Repetitive sequences in protein A from Staphylococcus aureus. Arrangement of five regions within the protein, four being highly homologous and Fc-binding. Eur J Biochem 73, 343-351.
227. **Smith, T.C., Wardyn, S.E.**, 2015. Human Infections with Staphylococcus aureus CC398. Curr Environ Health Rep 2, 41-51.
228. **Sobke, A.C., Selimovic, D., Orlova, V., Hassan, M., Chavakis, T., Athanasopoulos, A.N., Schubert, U., Hussain, M., Thiel, G., Preissner, K.T., Herrmann, M.**, 2006. The extracellular adherence protein from Staphylococcus aureus abrogates angiogenic responses of endothelial cells by blocking Ras activation. FASEB J 20, 2621-2623.
229. **Staubitz, P., Neumann, H., Schneider, T., Wiedemann, I., Peschel, A.**, 2004. MprF-mediated biosynthesis of lysylphosphatidylglycerol, an important determinant in staphylococcal defensin resistance. FEMS Microbiol Lett 231, 67-71.
230. **Stefani, S., Chung, D.R., Lindsay, J.A., Friedrich, A.W., Kearns, A.M., Westh, H., Mackenzie, F.M.**, 2012. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. Int J Antimicrob Agents 39, 273-282.
231. **Stegger, M., Lindsay, J.A., Sorum, M., Gould, K.A., Skov, R.**, 2010. Genetic diversity in CC398 methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates of different geographical origin. Clin Microbiol Infect 16, 1017-1019.
232. **Steinberg, J.P., Clark, C.C., Hackman, B.O.**, 1996. Nosocomial and community-acquired Staphylococcus aureus bacteremias from 1980 to 1993: impact of intravascular devices and methicillin resistance. Clin Infect Dis 23, 255-259.
233. **Steinhuber, A., Goerke, C., Bayer, M.G., Doring, G., Wolz, C.**, 2003. Molecular architecture of the regulatory Locus sae of Staphylococcus aureus and its impact on expression of virulence factors. J Bacteriol 185, 6278-6286.
234. **Tang, Y.W., Waddington, M.G., Smith, D.H., Manahan, J.M., Kohner, P.C., Highsmith, L.M., Li, H., Cockerill, F.R., 3rd, Thompson, R.L., Montgomery, S.O., Persing, D.H.**, 2000. Comparison of protein A gene sequencing with pulsed-field gel electrophoresis and epidemiologic data for molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol 38, 1347-1351.
235. **Tavakol, M., Riekerink, R.G., Sampimon, O.C., van Wamel, W.J., van Belkum, A., Lam, T.J.**, 2012. Bovine-associated MRSA ST398 in the Netherlands. Acta Vet Scand 54, 28.
236. **Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V.**, 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. Infect Control Hosp Epidemiol 18, 426-439.

-
237. **Thakker, M., Park, J.S., Carey, V., Lee, J.C.**, 1998. Staphylococcus aureus serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect Immun* 66, 5183-5189.
238. **Thewes, N., Loskill, P., Jung, P., Peisker, H., Bischoff, M., Herrmann, M., Jacobs, K.**, 2014. Hydrophobic interaction governs unspecific adhesion of staphylococci: a single cell force spectroscopy study. *Beilstein J Nanotechnol* 5, 1501-1512.
239. **Thompson, N.E., Pattee, P.A.**, 1981. Genetic transformation in *Staphylococcus aureus*: demonstration of a competence-conferring factor of bacteriophage origin in bacteriophage 80 alpha lysates. *J Bacteriol* 148, 294-300.
240. **Tiemersma, E.W., Bronzwaer, S.L., Lyytikainen, O., Degener, J.E., Schrijnemakers, P., Bruinsma, N., Monen, J., Witte, W., Grundman, H.**, 2004. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerg Infect Dis* 10, 1627-1634.
241. **Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K.**, 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26, 171-176.
242. **Tung, H., Guss, B., Hellman, U., Persson, L., Rubin, K., Ryden, C.**, 2000. A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. *Biochem J* 345 Pt 3, 611-619.
243. **Uhlemann, A.C., Hafer, C., Miko, B.A., Sowash, M.G., Sullivan, S.B., Shu, Q., Lowy, F.D.**, 2013. Emergence of sequence type 398 as a community- and healthcare-associated methicillin-susceptible *staphylococcus aureus* in northern Manhattan. *Clin Infect Dis* 57, 700-703.
244. **Uhlemann, A.C., Porcella, S.F., Trivedi, S., Sullivan, S.B., Hafer, C., Kennedy, A.D., Barbian, K.D., McCarthy, A.J., Street, C., Hirschberg, D.L., Lipkin, W.I., Lindsay, J.A., DeLeo, F.R., Lowy, F.D.**, 2012. Identification of a highly transmissible animal-independent *Staphylococcus aureus* ST398 clone with distinct genomic and cell adhesion properties. *MBio* 3.
245. **Uhlen, M., Guss, B., Nilsson, B., Gatenbeck, S., Philipson, L., Lindberg, M.**, 1984. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *J Biol Chem* 259, 1695-1702.
246. **Valentin-Domelier, A.S., Girard, M., Bertrand, X., Violette, J., Francois, P., Donnio, P.Y., Talon, D., Quentin, R., Schrenzel, J., van der Mee-Marquet, N.**, 2011. Methicillin-susceptible ST398 *Staphylococcus aureus* responsible for bloodstream infections: an emerging human-adapted subclone? *PLoS One* 6, e28369.
247. **Van Cleef, B.A., Broens, E.M., Voss, A., Huijsdens, X.W., Zuchner, L., Van Benthem, B.H., Kluytmans, J.A., Mulders, M.N., Van De Giessen, A.W.**, 2010. High prevalence of nasal MRSA carriage in slaughterhouse workers in contact with live pigs in The Netherlands. *Epidemiol Infect* 138, 756-763.

-
248. **van Cleef, B.A., Monnet, D.L., Voss, A., Krziwanek, K., Allerberger, F., Struelens, M., Zemlickova, H., Skov, R.L., Vuopio-Varkila, J., Cuny, C., Friedrich, A.W., Spiliopoulou, I., Paszti, J., Hardardottir, H., Rossney, A., Pan, A., Pantosti, A., Borg, M., Grundmann, H., Mueller-Premru, M., Olsson-Liljequist, B., Widmer, A., Harbarth, S., Schweiger, A., Unal, S., Kluytmans, J.A.**, 2011. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans, Europe. *Emerg Infect Dis* 17, 502-505.
249. **van der Mee-Marquet, N., Francois, P., Domelier-Valentin, A.S., Coulomb, F., Decreux, C., Hombrock-Allet, C., Lehiani, O., Neveu, C., Ratovohery, D., Schrenzel, J., Quentin, R.**, 2011. Emergence of unusual bloodstream infections associated with pig-borne-like *Staphylococcus aureus* ST398 in France. *Clin Infect Dis* 52, 152-153.
250. **van Duijkeren, E., Hengeveld, P.D., Albers, M., Pluister, G., Jacobs, P., Heres, L., van de Giessen, A.W.**, 2014. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying *mecA* or *mecC* in dairy cattle. *Vet Microbiol* 171, 364-367.
251. **van Duijkeren, E., Ikawaty, R., Broekhuizen-Stins, M.J., Jansen, M.D., Spalburg, E.C., de Neeling, A.J., Allaart, J.G., van Nes, A., Wagenaar, J.A., Fluit, A.C.**, 2008. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. *Vet Microbiol* 126, 383-389.
252. **van Loo, I., Huijsdens, X., Tiemersma, E., de Neeling, A., van de Sande-Bruinsma, N., Beaujean, D., Voss, A., Kluytmans, J.**, 2007. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg Infect Dis* 13, 1834-1839.
253. **van Wamel, W.J., Rooijackers, S.H., Ruyken, M., van Kessel, K.P., van Strijp, J.A.**, 2006. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *Journal of bacteriology* 188, 1310-1315.
254. **Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M.C., Lina, G., Nimmo, G.R., Heffernan, H., Liassine, N., Bes, M., Greenland, T., Reverdy, M.E., Etienne, J.**, 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 9, 978-984.
255. **Vanderhaeghen, W., Hermans, K., Haesebrouck, F., Butaye, P.**, 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. *Epidemiol Infect* 138, 606-625.
256. **Ventura, C.L., Malachowa, N., Hammer, C.H., Nardone, G.A., Robinson, M.A., Kobayashi, S.D., DeLeo, F.R.**, 2010. Identification of a novel *Staphylococcus aureus* two-component leukotoxin using cell surface proteomics. *PLoS One* 5, e11634.
257. **Verkaik, N.J., Benard, M., Boelens, H.A., de Vogel, C.P., Nouwen, J.L., Verbrugh, H.A., Melles, D.C., van Belkum, A., van Wamel, W.J.**, 2011. Immune evasion cluster-positive bacteriophages are highly prevalent among human *Staphylococcus aureus* strains, but they are not essential in the first stages of nasal colonization. *Clin Microbiol Infect* 17, 343-348.

-
258. **Vincze, S., Brandenburg, A.G., Espelage, W., Stamm, I., Wieler, L.H., Kopp, P.A., Lubke-Becker, A., Walther, B.**, 2014. Risk factors for MRSA infection in companion animals: results from a case-control study within Germany. *Int J Med Microbiol* 304, 787-793.
259. **Vollmer, W., Blanot, D., de Pedro, M.A.**, 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* 32, 149-167.
260. **Voss, A., Loeffen, F., Bakker, J., Klaassen, C., Wulf, M.**, 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis* 11, 1965-1966.
261. **Voss, A., Milatovic, D., Wallrauch-Schwarz, C., Rosdahl, V.T., Braveny, I.**, 1994. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13, 50-55.
262. **Wagner, C., Aytac, S., Hansch, G.M.**, 2011. Biofilm growth on implants: bacteria prefer plasma coats. *Int J Artif Organs* 34, 811-817.
263. **Walev, I., Weller, U., Strauch, S., Foster, T., Bhakdi, S.**, 1996. Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 64, 2974-2979.
264. **Walther, B., Wieler, L.H., Vincze, S., Antao, E.M., Brandenburg, A., Stamm, I., Kopp, P.A., Kohn, B., Semmler, T., Lubke-Becker, A.**, 2012. MRSA variant in companion animals. *Emerg Infect Dis* 18, 2017-2020.
265. **Wang, R., Braughton, K.R., Kretschmer, D., Bach, T.H., Queck, S.Y., Li, M., Kennedy, A.D., Dorward, D.W., Klebanoff, S.J., Peschel, A., DeLeo, F.R., Otto, M.**, 2007. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med* 13, 1510-1514.
266. **Wann, E.R., Gurusiddappa, S., Hook, M.**, 2000. The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *J Biol Chem* 275, 13863-13871.
267. **Weidenmaier, C., Peschel, A.**, 2008. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat Rev Microbiol* 6, 276-287.
268. **Weinstein, H.J.**, 1959. The relation between the nasal-staphylococcal-carrier state and the incidence of postoperative complications. *N Engl J Med* 260, 1303-1308.
269. **Wenzel, R.P., Perl, T.M.**, 1995. The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and the incidence of postoperative wound infection. *J Hosp Infect* 31, 13-24.
270. **Wertheim, H.F., Walsh, E., Choudhury, R., Melles, D.C., Boelens, H.A., Miajlovic, H., Verbrugh, H.A., Foster, T., van Belkum, A.**, 2008. Key role for clumping factor B in *Staphylococcus aureus* nasal colonization of humans. *PLoS Med* 5, e17.
271. **Winstel, V., Liang, C., Sanchez-Carballo, P., Steglich, M., Munar, M., Broker, B.M., Penades, J.R., Nubel, U., Holst, O., Dandekar, T., Peschel, A., Xia, G.**, 2013. Wall teichoic acid structure governs horizontal gene transfer between major bacterial pathogens. *Nat Commun* 4, 2345.

272. **Witte, W., Strommenger, B., Stanek, C., Cuny, C.,** 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg Infect Dis* 13, 255-258.
273. **Woehl, J.L., Stapels, D.A., Garcia, B.L., Ramyar, K.X., Keightley, A., Ruyken, M., Syriga, M., Sfyroera, G., Weber, A.B., Zolkiewski, M., Ricklin, D., Lambris, J.D., Rooijackers, S.H., Geisbrecht, B.V.,** 2014. The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* inhibits the classical and lectin pathways of complement by blocking formation of the C3 proconvertase. *J Immunol* 193, 6161-6171.
274. **Wolz, C., Pohlmann-Dietze, P., Steinhuber, A., Chien, Y.T., Manna, A., van Wamel, W., Cheung, A.,** 2000. Agr-independent regulation of fibronectin-binding protein(s) by the regulatory locus *sar* in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 36, 230-243.
275. **Xia, G., Corrigan, R.M., Winstel, V., Goerke, C., Grundling, A., Peschel, A.,** 2011. Wall teichoic Acid-dependent adsorption of staphylococcal siphovirus and myovirus. *J Bacteriol* 193, 4006-4009.
276. **Xia, G., Wolz, C.,** 2014. Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution. *Infect Genet Evol* 21, 593-601.
277. **Yarwood, J.M., Bartels, D.J., Volper, E.M., Greenberg, E.P.,** 2004. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 186, 1838-1850.
278. **Yongho, S., Wonho, J.,** 2008. Atomic force microscopy and spectroscopy. *Reports on Progress in Physics* 71, 016101.

Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen in internationalen „Peer-reviewed“ Journalen:

- **Jung, P.**, Abdelbary, M.M., Kraushaar, B., Fetsch, A., Geisel, J., Herrmann, M., Witte, W., Cuny, C., Bischoff, M., 2016. Impact of bacteriophage *Saint3* carriage on the immune evasion capacity and hemolytic potential of *Staphylococcus aureus* CC398. **Vet Microbiol.**
- Ballhausen B., Kriegeskorte A., van Alen S., **Jung P.**, Köck R., Peters G., Bischoff M., Becker K., 2016. The pathogenicity of *S. aureus* CC398. **Vet Microbiol.**
- Saul, S., Gibhardt, C.S., Schmidt, B., Lis, A., Pasiaka, B., Conrad, D., **Jung, P.**, Gaupp, R., Wonnenberg, B., Diler, E., Stanisz, H., Vogt, T., Schwarz, E.C., Bischoff, M., Herrmann, M., Tschernig, T., Kappl, R., Rieger, H., Niemeyer, B.A., Bogeski, I., 2016. A calcium-redox feedback loop controls human monocyte immune responses: The role of ORAI Ca²⁺ channels. **Sci Signal** 9, ra26.
- Thewes, N., Loskill, P., **Jung, P.**, Peisker, H., Bischoff, M., Herrmann, M., Jacobs, K., 2014. Hydrophobic interaction governs unspecific adhesion of staphylococci: a single cell force spectroscopy study. **Beilstein J Nanotechnol** 5, 1501-1512.
- Ballhausen, B*, **Jung, P***, Kriegeskorte, A., Makgotlho, P.E., Ruffing, U., von Muller, L., Kock, R., Peters, G., Herrmann, M., Ziebuhr, W., Becker, K*, Bischoff, M*, 2014. LA-MRSA CC398 differ from classical community acquired-MRSA and hospital acquired-MRSA lineages: functional analysis of infection and colonization processes. **Int J Med Microbiol** 304, 777-786.
**contributed equally*

- Loskill, P., Pereira, P.M., **Jung, P.**, Bischoff, M., Herrmann, M., Pinho, M.G., Jacobs, K., 2014. Reduction of the peptidoglycan crosslinking causes a decrease in stiffness of the *Staphylococcus aureus* cell envelope. **Biophys J** 107, 1082-1089.

Vorträge auf nationalen und internationalen Konferenzen:

- **Jung P.**, Bleses K., Ballhausen B., Feßler A. T., Schwarz S., Köck R., Becker K., von Müller L., Herrmann M. and Bischoff M. Host adhesion and immune evasion as mechanisms of host adaptation of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of clonal complex 398. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). 27-30 April 2013, Berlin.
- **Jung P.**, Ballhausen B., Kriegeskorte A., von Müller L., Köck R., Brandt K., Schwarz S., Feßler A., Walther B, Vincze S., Peters G., Herrmann M, Bischoff M. and Becker K. Livestock-associated MRSA of the clonal complex 398: Characterization of infection properties. National Symposium on Zoonoses Research. 11-12 Oktober 2012, Berlin.

Posterpräsentationen und publizierte Abstracts auf nationalen und internationalen Konferenzen:

- **Jung P.**, Abdelbary M.M., Kraushaar B., Fetsch A. von Müller L., Herrmann M., Witte W., Cuny C. and Bischoff M. Impact of the immune evasion cluster on phagocytosis of *Staphylococcus aureus* CC398 isolates by granulocytes in whole blood assays. Gordon Research Conference-Staphylococcal Diseases. 10-17. Juli 2015, Il Ciocco, Italien.
- **Jung P.**, Abdelbary M.M, Köck R., von Müller L., Herrmann M., Witte W., Cuny C. and Bischoff M. Immune evasion and intracellular survival of phagocytosed Livestock-associated MRSA isolates of clonal complex 398.

66th Annual Conference of the German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM). 5-8. Oktober 2014, Dresden.

- **Jung P.**, Peisker H., Thewes N., Loskill P., Pereira P., Pinho M., Bischoff M., Jacobs K. and Herrmann M. *Staphylococcus aureus*: cell wall elasticity and turgor pressure. Cell Physics Conference. 23-26. September 2014, Saarbrücken.
- Ballhausen B., Kriegeskorte A., **Jung P.**, Köck R., Friedrich A.W., Bischoff M., Peters G. and Becker K. Host cell interaction models and host adaptation of livestock-associated MRSA CC398. National Symposium on Zoonoses Research. 19-20. September, 2013, Berlin.
- **Jung P.**, Loskill P., Pereira P., Thewes N., Spengler C., Peisker H., Pinho M., Jacobs K., Bischoff M., Herrmann M. Physical phenomena at interfaces - staphylococcal adhesion revisited. Gordon Research Conference- Staphylococcal Diseases. 28. Juli-02. August, 2013, Waterville, USA.
- Ballhausen B., Kriegeskorte A., **Jung P.**, Friedrich A.W., Köck R., Bischoff M., Peters G. and Becker K. Livestock-associated MRSA CC398: In vitro characterization of infection properties. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). 27-30 April, 2013, Berlin.
- Ruffing U., **Jung P.**, Bischoff M., Herrmann M., von Müller L. Phenotypic analysis of *Staphylococcus aureus* isolates by adhesion comparison regarding three different host factors. 64th Annual Conference of the German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM). 30. September-2. Oktober 2012, Hamburg.
- Ballhausen B., Kriegeskorte A., Brandt K., **Jung P.**, Friedrich A.W., Köck R., Bischoff M., Peters G. and Becker K. In vitro cytotoxic potential of livestock-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) of the clonal complex CC398. 64th Annual Conference of the German Society for

Hygiene and Microbiology (DGHM). 30. September-2. Oktober 2012, Hamburg.

- **Jung P.**, Bleses K., Feßler A., Blatt J., Ballhausen B., Vincze S., Schwarz S., Köck R., Becker K., Cuny C., Walther B., von Müller L., Herrmann M. and Bischoff M. Host cell adhesion and immune evasion of zoonotic and non-zoonotic MRSA. Tagung zum Verbraucherschutz der Deutschen Antibiotika Resistenzstrategie (DART) 22-23. Mai, 2012, Berlin.
- Ballhausen B., Kriegeskorte A., **Jung P.**, Bischoff M., Hermann M, Köck R., Peters G. and Becker K. Investigations on the pathogenic potential of CC398 livestock-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) isolates. Tagung zum Verbraucherschutz der Deutschen Antibiotika Resistenzstrategie (DART) 22-23. Mai 2012, Berlin.
- **Jung P.**, Bleses K., Feßler A., Blatt J., Ballhausen B., Vincze S., Schwarz S., Köck R., Becker K., Cuny C., Walther B., von Müller L., Herrmann M. and Bischoff M. Host cell adhesion and immune evasion of zoonotic and non-zoonotic MRSA. Annual Conference of the Association of General and Applied Microbiology (VAAM). 18-21 März 2012, Tübingen.
- **Jung P.**, Herrmann M., von Müller L. and Bischoff M. Non-zoonotic and zoonotic MRSA: Factors promoting colonization and defence resistance in humans and animals. National Symposium on Zoonoses Research. 6-7 Oktober 2011, Berlin

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mathias Herrmann und Markus Bischoff danke ich für die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene durchführen zu können. Markus Bischoff danke ich besonders für die vielen hilfreichen Diskussionen, die zahlreichen Hilfestellungen, die unermühtlichen Korrekturen von Abstracts und Publikationen und seine Förderung während der Zeit meiner Dissertation. Bei Lutz von Müller möchte ich mich für seine Hilfe bei den FACS Analysen bedanken. Barbara Niemeyer danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit.

Ich möchte mich ebenfalls bei allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern und Studierenden des IMMH für das freundschaftliche Miteinander und das gute Arbeitsklima bedanken. Mein besonderer Dank geht dabei an Katharina Bleses und Karin Hilgert für die tatkräftige technische Unterstützung und den nie-versiegenden Materialnachschub. Bei den Studierenden, die ich während meiner Zeit am IMMH betreuen durfte danke ich für ihr Interesse und das große Engagement.

Außerdem bedanke ich mich bei unseren Kooperationspartnern aus der Biologie, Medizin, Veterinärmedizin und Physik für die freundliche und erfolgreiche Zusammenarbeit und die interessanten Einblicke in andere Fachgebiete die ich gewinnen konnte.

Besonders herzlich möchte ich mich meinen Eltern Christine und Wolfgang Jung, meiner Schwester Luisa Jung und ganz besonders meiner Freundin Dominica Pfaff für ihre Unterstützung während der Zeit meiner Dissertation bedanken. Bei Dominica entschuldige ich mich außerdem „for being at the Lab so often“ ;-)

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Jan Philipp Jung

Geburtstag und Ort: 16.09.1981, Homburg/Saar

Schulausbildung:

1988-1992 Rothenfeld Grundschule Waldmohr

1992-2001 Gymnasium Kusel,
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst:

2001-2002 4. Fallschirmjägerbataillon 261,
Graf Haeseler-Kaserne Lebach

Studium:

2002-2004 Fachhochschule Bingen,
Studiengang: Biotechnologie

2004-2010 Technische Universität Kaiserslautern,
Studiengang: Diplom-Biologie
Hauptfach: Biotechnologie
Abschluss als Diplom-Biologe

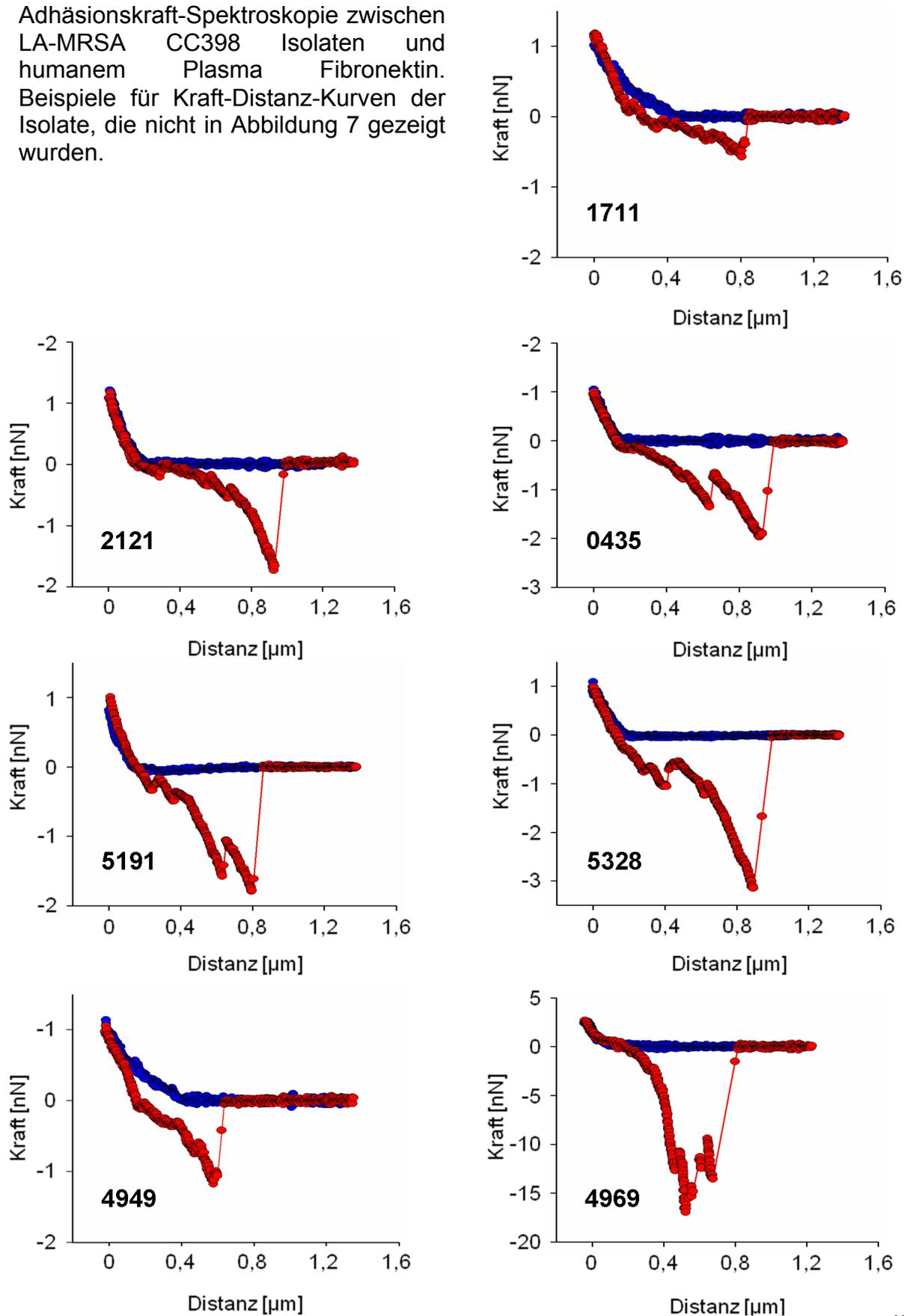
Promotion:

seit 2011 Universität des Saarlandes,
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Anhang

Abb. 22: Anhang zu Versuchsteil 4.1.3, Kraft-Distanz-Kurven (vergl. Abb. 7)

Adhäsionskraft-Spektroskopie zwischen LA-MRSA CC398 Isolaten und humanem Plasma Fibronectin. Beispiele für Kraft-Distanz-Kurven der Isolate, die nicht in Abbildung 7 gezeigt wurden.



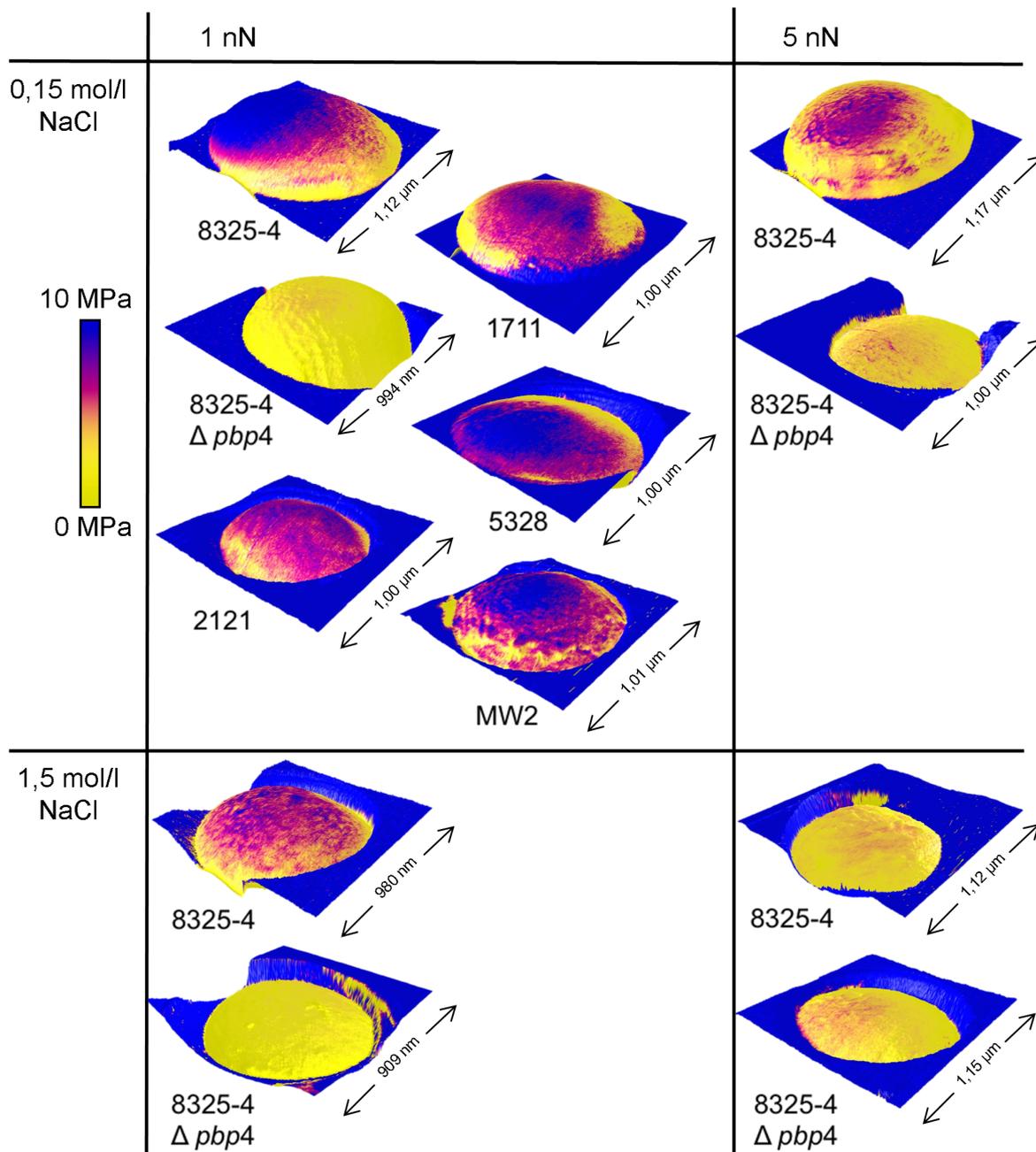


Abb. 23: Anhang zu Versuchsteil 4.1.5, Elastizitätskarten (vergl. Abb. 12).

Beispiele für Elastizitätskarten von drei LA-MRSA CC398 Isolaten (1711, 2121, 5328), CA-MRSA Isolat MW2, MSSA Isolat 8325-4 und 8325-4 $\Delta pbp4$, bei zwei verschiedenen NaCl-Konzentrationen (0,15 mol/l und 1,5 mol/l) sowie zwei verschiedenen Auslösekräften der Messsonde (1 nN und 5 nN). Die mittleren DMT-Moduli der Zellen werden in Abbildung 11 gezeigt.

Tab. 26: Statistische Signifikanzverhältnisse der Transkriptomanalyse von *fnbA* (vergl. Abb. 9 A).

zu vergleichende Isolate:				Signifikanzverhältnisse: * ≤ p-Wert 0,05; ** ≤ p-Wert 0,01
Isolat A		Isolat B		
Isolat Nummer:	<i>spa</i> Typ:	Isolat Nummer:	<i>spa</i> Typ:	
1711	t011	1714	t034	n.s.
1711	t011	2121	t108	**
1711	t011	0435	t108	**
1711	t011	5191	t011	**
1711	t011	5328	t034	**
1711	t011	4949	t108	**
1711	t011	4969	t108	**
1714	t034	2121	t108	**
1714	t034	0435	t108	**
1714	t034	5191	t011	**
1714	t034	5328	t034	n.s.
1714	t034	4949	t108	**
1714	t034	4969	t108	**
2121	t108	0435	t108	n.s.
2121	t108	5191	t011	*
2121	t108	5328	t034	**
2121	t108	4949	t108	n.s.
2121	t108	4969	t108	n.s.
0435	t108	5191	t011	*
0435	t108	5328	t034	**
0435	t108	4949	t108	*
0435	t108	4969	t108	**
5191	t011	5328	t034	**
5191	t011	4949	t108	**
5191	t011	4969	t108	**
5328	t034	4949	t108	**
5328	t034	4969	t108	**
4949	t108	4969	t108	n.s.

Tab. 27: Statistische Signifikanzverhältnisse der Transkriptomanalyse von *fnbB* (vergl. Abb. 9 B).

zu vergleichende Isolate:				Signifikanzverhältnisse:
Isolat A		Isolat B		* ≤ p-Wert 0,05; ** ≤ p-Wert 0,01
Isolat Nummer:	<i>spa</i> Typ:	Isolat Nummer:	<i>spa</i> Typ:	
1711	t011	1714	t034	n.s.
1711	t011	2121	t108	**
1711	t011	0435	t108	**
1711	t011	5191	t011	n.s.
1711	t011	5328	t034	n.s.
1711	t011	4949	t108	**
1711	t011	4969	t108	**
1714	t034	2121	t108	**
1714	t034	0435	t108	**
1714	t034	5191	t011	n.s.
1714	t034	5328	t034	n.s.
1714	t034	4949	t108	**
1714	t034	4969	t108	**
2121	t108	0435	t108	n.s.
2121	t108	5191	t011	**
2121	t108	5328	t034	**
2121	t108	4949	t108	**
2121	t108	4969	t108	**
0435	t108	5191	t011	**
0435	t108	5328	t034	**
0435	t108	4949	t108	**
0435	t108	4969	t108	**
5191	t011	5328	t034	*
5191	t011	4949	t108	**
5191	t011	4969	t108	**
5328	t034	4949	t108	**
5328	t034	4969	t108	**
4949	t108	4969	t108	n.s.

Tab. 28: Statistische Signifikanzverhältnisse der Transkriptomanalyse von *clfA* (vergl. Abb. 10 A).

zu vergleichende Isolate:				Signifikanzverhältnisse: * ≤ p-Wert 0,05; ** ≤ p-Wert 0,01
Isolat A		Isolat B		
Isolat Nummer:	<i>spa</i> Typ:	Isolat Nummer:	<i>spa</i> Typ:	
1711	t011	1714	t034	n.s.
1711	t011	2121	t108	*
1711	t011	0435	t108	n.s.
1711	t011	5191	t011	n.s.
1711	t011	5328	t034	n.s.
1711	t011	4949	t108	n.s.
1711	t011	4969	t108	n.s.
1714	t034	2121	t108	**
1714	t034	0435	t108	n.s.
1714	t034	5191	t011	*
1714	t034	5328	t034	n.s.
1714	t034	4949	t108	n.s.
1714	t034	4969	t108	n.s.
2121	t108	0435	t108	*
2121	t108	5191	t011	n.s.
2121	t108	5328	t034	*
2121	t108	4949	t108	**
2121	t108	4969	t108	*
0435	t108	5191	t011	n.s.
0435	t108	5328	t034	n.s.
0435	t108	4949	t108	n.s.
0435	t108	4969	t108	n.s.
5191	t011	5328	t034	*
5191	t011	4949	t108	*
5191	t011	4969	t108	n.s.
5328	t034	4949	t108	n.s.
5328	t034	4969	t108	n.s.
4949	t108	4969	t108	n.s.

Tab. 29: Statistische Signifikanzverhältnisse der Transkriptomanalyse von *clfB* (vergl. Abb. 10 B).

zu vergleichende Isolate:				Signifikanzverhältnisse:
Isolat A		Isolat B		* ≤ p-Wert 0,05; ** ≤ p-Wert 0,01
Isolat Nummer:	<i>spa</i> Typ:	Isolat Nummer:	<i>spa</i> Typ:	
1711	t011	1714	t034	n.s.
1711	t011	2121	t108	n.s.
1711	t011	0435	t108	n.s.
1711	t011	5191	t011	n.s.
1711	t011	5328	t034	n.s.
1711	t011	4949	t108	n.s.
1711	t011	4969	t108	**
1714	t034	2121	t108	n.s.
1714	t034	0435	t108	n.s.
1714	t034	5191	t011	n.s.
1714	t034	5328	t034	n.s.
1714	t034	4949	t108	n.s.
1714	t034	4969	t108	**
2121	t108	0435	t108	n.s.
2121	t108	5191	t011	n.s.
2121	t108	5328	t034	n.s.
2121	t108	4949	t108	n.s.
2121	t108	4969	t108	n.s.
0435	t108	5191	t011	n.s.
0435	t108	5328	t034	n.s.
0435	t108	4949	t108	*
0435	t108	4969	t108	**
5191	t011	5328	t034	n.s.
5191	t011	4949	t108	*
5191	t011	4969	t108	**
5328	t034	4949	t108	n.s.
5328	t034	4969	t108	**
4949	t108	4969	t108	**

Tab. 30: Statistische Signifikanzverhältnisse der Transkriptomanalyse von *asp23* (vergl. Abb. 11 A).

zu vergleichende Isolate:				Signifikanzverhältnisse: * ≤ p-Wert 0,05; ** ≤ p-Wert 0,01
Isolat A		Isolat B		
Isolat Nummer:	<i>spa</i> Typ:	Isolat Nummer:	<i>spa</i> Typ:	
1711	t011	1714	t034	n.s.
1711	t011	2121	t108	**
1711	t011	0435	t108	**
1711	t011	5191	t011	*
1711	t011	5328	t034	n.s.
1711	t011	4949	t108	**
1711	t011	4969	t108	**
1714	t034	2121	t108	n.s.
1714	t034	0435	t108	n.s.
1714	t034	5191	t011	n.s.
1714	t034	5328	t034	n.s.
1714	t034	4949	t108	**
1714	t034	4969	t108	n.s.
2121	t108	0435	t108	*
2121	t108	5191	t011	n.s.
2121	t108	5328	t034	**
2121	t108	4949	t108	n.s.
2121	t108	4969	t108	n.s.
0435	t108	5191	t011	n.s.
0435	t108	5328	t034	n.s.
0435	t108	4949	t108	**
0435	t108	4969	t108	n.s.
5191	t011	5328	t034	n.s.
5191	t011	4949	t108	**
5191	t011	4969	t108	n.s.
5328	t034	4949	t108	**
5328	t034	4969	t108	*
4949	t108	4969	t108	*

Tab. 31: Statistische Signifikanzverhältnisse der Transkriptomanalyse von *RNAIII* (vergl. Abb. 11 B).

zu vergleichende Isolate:					Signifikanzverhältnisse: * ≤ p-Wert 0,05; ** ≤ p-Wert 0,01
Isolat A		Isolat B			
Isolat Nummer:	<i>spa</i> Typ:	Isolat Nummer:	<i>spa</i> Typ:		
1711	t011	1714	t034	n.s.	
1711	t011	2121	t108	n.s.	
1711	t011	0435	t108	n.s.	
1711	t011	5191	t011	n.s.	
1711	t011	5328	t034	n.s.	
1711	t011	4949	t108	**	
1711	t011	4969	t108	**	
1714	t034	2121	t108	n.s.	
1714	t034	0435	t108	n.s.	
1714	t034	5191	t011	n.s.	
1714	t034	5328	t034	n.s.	
1714	t034	4949	t108	**	
1714	t034	4969	t108	**	
2121	t108	0435	t108	n.s.	
2121	t108	5191	t011	n.s.	
2121	t108	5328	t034	n.s.	
2121	t108	4949	t108	**	
2121	t108	4969	t108	**	
0435	t108	5191	t011	n.s.	
0435	t108	5328	t034	n.s.	
0435	t108	4949	t108	**	
0435	t108	4969	t108	**	
5191	t011	5328	t034	n.s.	
5191	t011	4949	t108	**	
5191	t011	4969	t108	**	
5328	t034	4949	t108	**	
5328	t034	4969	t108	**	
4949	t108	4969	t108	n.s.	

Tab. 32: Statistische Signifikanzverhältnisse der Phagozytoserate zu Beginn des Assays zur Bestimmung des intrazellulären Überlebens (vergl. Abb. 18 B)

zu vergleichende Isolate:				Signifikanzverhältnisse:
Isolat A		Isolat B		
Isolat Nummer:	<i>spa</i> Typ:	Isolat Nummer:	<i>spa</i> Typ:	* ≤ p-Wert 0,05; ** ≤ p-Wert 0,01
1711	t011	1714	t034	n.s.
1711	t011	2121	t108	n.s.
1711	t011	0435	t108	*
1711	t011	5191	t011	n.s.
1711	t011	5328	t034	n.s.
1711	t011	4949	t108	*
1711	t011	4969	t108	n.s.
1714	t034	2121	t108	n.s.
1714	t034	0435	t108	n.s.
1714	t034	5191	t011	n.s.
1714	t034	5328	t034	n.s.
1714	t034	4949	t108	*
1714	t034	4969	t108	*
2121	t108	0435	t108	**
2121	t108	5191	t011	n.s.
2121	t108	5328	t034	n.s.
2121	t108	4949	t108	**
2121	t108	4969	t108	*
0435	t108	5191	t011	*
0435	t108	5328	t034	n.s.
0435	t108	4949	t108	**
0435	t108	4969	t108	**
5191	t011	5328	t034	n.s.
5191	t011	4949	t108	*
5191	t011	4969	t108	*
5328	t034	4949	t108	**
5328	t034	4969	t108	**
4949	t108	4969	t108	n.s.

Tab. 33: Statistische Signifikanzverhältnisse des intrazellulären Überlebens nach 23 h (vergl. Abb. 18 C)

zu vergleichende Isolate:				Signifikanzverhältnisse: * ≤ p-Wert 0,05; ** ≤ p-Wert 0,01
Isolat A		Isolat B		
Isolat Nummer:	spa Typ:	Isolat Nummer:	spa Typ:	
1711	t011	1714	t034	*
1711	t011	2121	t108	*
1711	t011	0435	t108	**
1711	t011	5191	t011	n.s.
1711	t011	5328	t034	n.s.
1711	t011	4949	t108	**
1711	t011	4969	t108	**
1714	t034	2121	t108	n.s.
1714	t034	0435	t108	*
1714	t034	5191	t011	n.s.
1714	t034	5328	t034	*
1714	t034	4949	t108	n.s.
1714	t034	4969	t108	*
2121	t108	0435	t108	*
2121	t108	5191	t011	n.s.
2121	t108	5328	t034	n.s.
2121	t108	4949	t108	n.s.
2121	t108	4969	t108	*
0435	t108	5191	t011	**
0435	t108	5328	t034	**
0435	t108	4949	t108	n.s.
0435	t108	4969	t108	n.s.
5191	t011	5328	t034	n.s.
5191	t011	4949	t108	*
5191	t011	4969	t108	**
5328	t034	4949	t108	**
5328	t034	4969	t108	**
4949	t108	4969	t108	n.s.

Tab. 34: IEC assoziierte Gene des *S. aureus* CC398 Isolatsets aus Versuchsteil 4.3 (vergl. Tab. 2).

Isolat Nummer:	ϕ Saint3	sak	chp	scn	sea/sep
07-01429	+	-	+	+	-
07-01494	-				
07-02239	-				
08-02710	-				
09-00444	-				
09-03591	+	+	+	+	-
10-01386	+	+	-	-	-
10-S01355	-				
11-00530	+	+	+	+	-
11-01119	-				
11-01189	-				
11-01553	+	+	-	+	-
11-02281	+	+	-	+	-
11-02407	+	-	+	+	-
11-02801	+	+	-	+	-
11-02802	+	+	-	+	-
11-S00282	+	+	+	+	-
12-S00148	-				
13-ST00054	-				
13-ST00207	-				

“I have spent most of the day putting in a comma and the rest of the day taking it out again...”

Oscar Wilde