

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
der Universität Tübingen**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth**

**Untersuchungen zur Zelltodinduktion durch  
Enterokokken, Streptokokken und Staphylokokken in  
Makrophagen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Evelyn Elisabeth Fritz geb. Reichardt**

**aus**

**Lindenfels**

**2013**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth  
1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. S. Gröbner  
2. Berichterstatter: Professor Dr. V. Jendrossek

Für Daniel,  
Samuel, David und Tobias

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Das Immunsystem</b> .....	1
<b>1.2 Makrophagen und ihre Rolle im Immunsystem</b> .....	2
<b>1.3. Charakterisierung und Einteilung von Staphylokokken</b> .....	3
1.3.1 Virulenzfaktoren und klinische Bedeutung von Staphylokokken .....	4
<b>1.4 Charakterisierung und Einteilung von Streptokokken</b> .....	6
1.4.1 Virulenzfaktoren und klinische Bedeutung von Streptokokken.....	7
<b>1.5 Charakterisierung und Einteilung von Enterokokken</b> .....	9
1.5.1 Virulenzfaktoren und klinische Bedeutung von Enterokokken.....	9
<b>1.6 Zelltod</b> .....	13
1.6.1 Apoptose.....	13
1.6.2 Nekrose.....	15
<b>1.7 Ziele der vorliegenden Arbeit</b> .....	16
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Zelllinie</b> .....	17
2.1.1 Ursprung muriner J774A.1-Makrophagen.....	17
2.1.2 Zellkulturmedium .....	17
2.1.3 Kultivierung von J774A.1-Makrophagen .....	17
2.1.4 Zellernte und Zellzählung .....	17
<b>2.2 Bakterienstämme und Ansatz der Bakterienkulturen</b> .....	18
2.2.1 Staphylokokken.....	19
2.2.2 Streptokokken .....	20
2.2.3 Enterokokken .....	20
2.2.4 Bestimmung der Bakteriendichte mittels Photometer .....	22
2.2.5 Infektion von Makrophagen .....	22
<b>2.3 Analyse apoptotischer und nekrotischer Zellen mittels Durchflusszytometrie</b> .....	24
2.3.1 Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials .....	24
2.3.2 Messung der Durchlässigkeit von Zellmembranen .....	24
2.3.3 Durchflusszytometrie .....	25
2.3.4 Kontrollen .....	25
<b>2.4 Mikroskopie</b> .....	26
<b>2.5 Untersuchung von Zelltodmechanismen bei Infektion mit <i>E. faecium</i></b> .....	26

2.5.1 Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration von Rifampicin mittels E-Test .....	27
<b>2.6 Verwendete Geräte .....</b>	<b>27</b>
<b>2.7 Verwendete Reagenzien .....</b>	<b>27</b>
<b>2.8 Statistik .....</b>	<b>28</b>
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Zelltodinduktion durch Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken in J774A.1-Makrophagen .....</b>	<b>29</b>
3.1.1 Kontrollen .....	29
3.1.2 Staphylokokken induzieren Zelltod in J774A.1-Makrophagen.....	31
3.1.3 Streptokokken induzieren Zelltod in J774A.1-Makrophagen .....	35
3.1.4 Enterokokken induzieren Zelltod in J774A.1-Makrophagen .....	38
<b>3.2 Mechanismen des durch <i>E. faecium</i> ausgelösten Zelltods .....</b>	<b>43</b>
<b>3.3 Mikroskopische Analyse von <i>E. faecium</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>48</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>63</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>64</b>
<b>7. Veröffentlichung.....</b>	<b>71</b>
<b>8. Danksagung.....</b>	<b>72</b>
<b>9. Lebenslauf .....</b>	<b>73</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AB = Antibiotika

Abb. = Abbildung

APC = antigen-presenting cell

ATCC = American Type Culture Collection

bzw. = beziehungsweise

CA = community-acquired

CD = cluster of differentiation

CFU = colony forming units

CytD = Cytochalasin D

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

*E.* = Enterococcus

ES = extrazelluläres Superoxid

Esp = Enterococcal Surface Protein

FACS = fluorescence activated cell sorting

FCS = fetal calf serum

FCCP = Carbonyl-Cyanide-4-trifluoro-methoxy-phenylhydrazone

GAS = Gruppe A Streptokokken

GBS = Gruppe B Streptokokken

GCS= Gruppe C Streptokokken

h = Stunde(n)

HA = hospital-acquired

KNS = koagulasenegative Staphylokokken

LB = Luria Broth

MHC = major histocompatibility complex

MIC = minimal inhibitory concentration

MOI = multiplicity of infection

OD = optische Dichte

PBS = phosphate-buffered saline

PCD = programmed cell death (programmierter Zelltod)

PI = Propidiumiodid

PMN = polymorphonuclear neutrophil (polymorphkerniger Neutrophiler)

PSM = phenollösliches Modulin

PVL = Panton Valentine Leukocidin

Rifa = Rifampicin

ROS = reactive oxygen species

*S.* = *Staphylococcus*

*S.* = *Streptococcus*

*SDSE* = *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis*

SLO = Streptolysin O

*SSSC* = *Streptococcus schleiferi subsp. coagulans*

Stauro = Staurosporin

Tab. = Tabelle

TMRE = Tetra-methyl-rhodamine-ester

u. a. = unter anderem

VRE = Vancomycin resistente Enterokokken

z. B. = zum Beispiel

zVAD-FMK = Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-Fluoromethylketon

## 1. Einleitung

### 1.1 Das Immunsystem

Für die Abwehr von bakteriellen Pathogenen in einem Organismus sind sowohl die angeborene, unspezifische, als auch die erworbene, antigenspezifische Immunität notwendig, die gemeinsam ein wirksames Abwehrsystem bilden, welches dafür sorgt, dass der Mensch trotz ständiger Exposition gegenüber einer Vielzahl von Mikroorganismen relativ selten krank wird (Janeway *et al.* 2002).

Das angeborene Immunsystem richtet sich vor allem gegen Pathogene, denen es bislang nicht begegnet war, und bildet somit eine „erste Verteidigungslinie“ gegen viele der üblichen Krankheitserreger und ist oftmals alleine in der Lage, den Ausbruch einer Krankheit zu verhindern. Für die angeborene Immunantwort sind vor allem Granulozyten und Makrophagen in ihrer Funktion als Phagozyten verantwortlich (Janeway *et al.* 2002). Letztere werden in dieser Arbeit auf ihre Neigung zum Zelltod im Rahmen eines Kontakts mit grampositiven Kokken untersucht.

Die erworbene Immunantwort spielt vor allem dann eine Rolle, wenn ein Krankheitserreger durch die angeborene Immunität nicht abgewehrt werden kann. Bei den beteiligten Abwehrzellen handelt es sich um T- und B-Lymphozyten, die durch Zellen der unspezifischen Immunität aktiviert werden. Deren spezifische Eigenschaft besteht darin, aufgrund eines Kontakts mit einem bestimmten Krankheitserreger bzw. mit einem seiner Bestandteile im Rahmen einer Impfung, Antikörper gegen genau diesen Erreger zu bilden, wodurch dieser beseitigt wird. Dieser Schutz bleibt oft lebenslang bestehen (Janeway *et al.* 2002).

Alle Abwehrzellen des Immunsystems entstehen im Knochenmark. Sie entwickeln sich aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, der pluripotenten, hämatopoetischen Stammzelle. Diese teilt sich in zwei verschiedene Vorläuferzellen: einerseits in die gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle, aus der später die B- und T-Lymphozyten des erworbenen Immunsystems entstehen, andererseits in die gemeinsame myeloide Vorläuferzelle, aus der sich unter anderem die Leukozyten entwickeln, zu denen die Granulozyten, die



dendritischen Zellen und die Monozyten zählen (Janeway *et al.* 2002). Die zuletzt genannten stellen wiederum eine Vorstufe der Makrophagen dar, die zur reifen Form differenzieren, sobald sie vom Blutkreislauf ins Körpergewebe einwandern.

## **1.2 Makrophagen und ihre Rolle im Immunsystem**

Makrophagen sind Zellen des angeborenen Immunsystems. Sie zählen gemeinsam mit den dendritischen Zellen und den neutrophilen Granulozyten zu den Fresszellen (Phagozyten). Sie sind im gesamten Körpergewebe zu finden, aber besonders dort, wo Krankheitserreger die Möglichkeit haben, in den Körper einzudringen, wie beispielsweise in der Lunge oder im Gewebe des Verdauungstrakts. In der Milz tragen sie zur Entfernung alter Erythrozyten bei, in der Leber sind sie als sogenannte Kupffer-Zellen vorhanden (Janeway *et al.* 2002).

Auf ihrer Oberfläche befinden sich eine Reihe von Rezeptoren, mithilfe derer sie Oberflächenmoleküle von Infektionserregern erkennen und diese von körpereigenen Zellen unterscheiden können. Dazu zählen beispielsweise der Makrophagen-Mannose-Rezeptor, der Scavenger-Rezeptor, mehrere Komplementrezeptoren und CD14, welcher bakterielles Lipopolysaccharid erkennt. Die Makrophagen besitzen die Fähigkeit, den an den Rezeptor gebundenen Erreger dadurch zu bekämpfen, dass sie ihn mit ihrer Membran umhüllen und in ein Vesikel aufnehmen, welches Phagosom genannt wird. Durch eine weitere Verschmelzung mit Lysosomen entsteht das sogenannte Phagolysosom. Die Lysosomen enthalten antimikrobielle Proteine, Enzyme und Peptide, welche das Pathogen zerstören. Auch andere toxische Stoffe wie Wasserstoffperoxid, Stickstoffoxid und Superoxidanionen wirken bei diesem Vorgang mit (Janeway *et al.* 2002).

Eine weitere wichtige Eigenschaft der Makrophagen stellt deren Aktivierung nach Kontakt mit einem Pathogen dar, woraufhin sie Zytokine und andere Botenstoffe freisetzen. Diese bewirken eine Entzündungsreaktion und bringen dadurch sowohl andere Abwehrzellen wie neutrophile Granulozyten als auch Plasmaproteine an den Ort des Geschehens (Janeway *et al.* 2002). Je weiter

die Wundheilung und Bakterienbekämpfung am beschädigten Gewebe fortschreitet, desto weniger werden von dort Reize für Entzündungs- oder Effektormechanismen gesendet, was zu einer Reduzierung der inflammatorischen und zytotoxischen Aktivität der Makrophagen führt (Stout und Suttles 2005).

Abgesehen von der säubernden und inflammatorischen Funktion der Makrophagen, spielen diese eine entscheidende Rolle in der Kommunikation zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. Gelingt es einem Makrophagen, einen Krankheitserreger lediglich aufzunehmen, diesen aber nicht zu zerstören, wird er ähnlich wie dendritische Zellen als antigenpräsentierende Zelle aktiv. Makrophagen besitzen an ihrer Oberfläche Klasse-II-MHC-Moleküle, mithilfe derer sie in der Lage sind, T-Helferzellen fremde Antigene zu präsentieren, welche diese nicht selbst erkennen können. Dadurch werden diese aktiviert, was den ersten und wichtigsten Schritt in der Entstehung einer adaptiven Immunantwort darstellt. T-Helferzellen sind T-Lymphozyten, die darauf spezialisiert sind, eine Immunantwort zu fördern, indem sie sowohl weitere, zum selben Antigen spezifische T-Zellen aktivieren, als auch die Differenzierung von B-Zellen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen fördern (Karp 2005).

### **1.3. Charakterisierung und Einteilung von Staphylokokken**

Staphylokokken sind grampositive Kokken, die sich in Haufen anordnen. Sie sind unbeweglich, katalasepositiv und fakultativ anaerob und können auf gewöhnlichen Nährmedien aerob und anaerob kultiviert werden. Zur Gattung *Staphylococcus* zählen über 30 Spezies und Subspezies (Kayser *et al.* 2005).

Staphylokokken sind häufig als Erreger von Infektionen in Menschen und Säugetieren zu finden. Infektionen mit *S. aureus* können schwerwiegende Krankheitsverläufe verursachen, welche besonders im Rahmen von nosokomialen Infektionen auftreten. Die Identifizierung von *S. aureus* erfolgt unter anderem durch den Nachweis der Produktion von Koagulase. Dieses bakterielle Enzym wandelt Fibrinogen in Fibrin um, wodurch ein Fibrinwall entsteht, mithilfe dessen sich die Bakterien im Gewebe gegenüber Phagozyten

abschotten. Staphylokokken, die keine Koagulase exprimieren (koagulasenegativ), sind normalerweise weniger pathogen (Vandenesch *et al.* 1994, Kayser *et al.* 2005).

Koagulasepositive Staphylokokken, die in dieser Arbeit untersucht wurden, umfassen *S. aureus*, *S. hyicus* und *S. schleiferi subsp. coagulans* (Pantůček *et al.* 1996).

Bei den koagulasenegativen Staphylokokken (KNS) handelt es sich hauptsächlich um Normalflora auf Haut- und Schleimhäuten, allerdings können sie bei entsprechender Disposition auch eine Reihe von Krankheiten auslösen. (Kayser *et al.* 2005). Hierzu wurden in dieser Arbeit *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus*, *S. gallinarum*, *S. cohnii subsp. cohnii* und *S. sciuri* untersucht.

### **1.3.1 Virulenzfaktoren und klinische Bedeutung von Staphylokokken**

Von den erwähnten Staphylokokken sind *S. aureus*, *S. epidermidis* und *S. saprophyticus* für die Humanmedizin am bedeutendsten.

*S. aureus* zeichnet sich gegenüber anderen *Staphylococcus spp.* durch besondere Virulenzfaktoren aus und gehört zu den häufigsten Erregern bakterieller Infektionen beim Menschen einschließlich nosokomialer Infektionen. Solche Infektionen gehen in den meisten Fällen von asymptomatischen Besiedlungen des Nasen-Rachenraumes aus, die bei bis zu 70% des Krankenhauspersonals und der Patienten vorkommen (Kayser *et al.* 2005).

Die durch *S. aureus* ausgelösten Infektionen können in invasive Infektionen, in reine Toxikosen sowie in Mischformen unterteilt werden. Das Spektrum reicht beispielsweise von Wund- und Gewebeinfektionen über Endokarditis bis zum septischen Schock (invasive Infektionen) und von Lebensmittelintoxikationen (Toxikosen) bis zum Toxischen-Schock-Syndrom (Mischform) (Kayser *et al.* 2005).

Abgesehen von der bereits erwähnten Koagulase sind unter anderem folgende Virulenzfaktoren für die Pathogenese von Infektionen durch *S. aureus* von Bedeutung: das Fibrinogen-bindende Protein Clumping-Factor (Moreillon *et al.* 1995), das zellwandassoziierte, antiphagozytär wirkende Protein A, die Enzyme

Hyaluronidase, Lipase und DNase, welche gemeinsam die Ausbreitung der Erreger im Gewebe fördern und verschiedene Hämolsine, die die Zellmembranen unterschiedlicher Wirtszellen schädigen (Kayser *et al.* 2005). Ein besonders zytotoxisches Hämolsin ist das  $\alpha$ -Toxin, durch welches beispielsweise Jurkat T-Zellen zerstört werden (Bantel *et al.* 2001). Etwa 50% der Stämme bilden Enterotoxine, die Lebensmittelintoxikationen auslösen. Seltener treten Stämme auf, die zusätzlich Leukocidine besitzen, welche Leukozyten zerstören, oder Exfoliatine, welche für die Bildung intradermaler Blasen verantwortlich sind. Das Toxischer-Schock-Syndrom-Toxin-1 (TSST-1) wird durch etwa 1% der Stämme gebildet (Kayser *et al.* 2005).

Die Antibiotika der Wahl für die Therapie von Staphylokokkeninfektionen sind penicillinasefeste  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, da heutzutage über 90% der Stämme eine Penicillinase bilden (Lowy 2003). 1961 wurde Methicillin als das erste halbsynthetische penicillinasefeste Penicillin eingeführt. Kurze Zeit später wurde von ersten Resistenzen gegen dieses Medikament berichtet, vor allem bei Stämmen, die auf Intensivstationen isoliert worden waren. Diese Erreger wurden als MRSA (Methicillin Resistant Staphylococcus aureus) bezeichnet (Lowy 2003). In den USA berichtete das US National Nosocomial Surveillance System für 2004 eine Rate von 61% methicillinresistenten *S. aureus* auf Intensivstationen (Drews *et al.* 2006). Sie stellen ein großes medizinisches Problem dar, da der Verlauf von Bakteriämien im Vergleich zu methicillinempfindlichen *S. aureus* mit einer erhöhten Mortalitätsrate in Zusammenhang steht (Cosgrove *et al.* 2003) und auf Reserveantibiotika zurückgegriffen werden muss, gegenüber denen bereits Resistenzen beobachtet wurden (Lowy 2003). Obwohl MRSA traditionell als Krankenhauskeim gilt (HA (hospital-acquired)-MRSA), wurde in letzter Zeit eine zunehmende Anzahl von ambulant erworbenen Infektionen mit MRSA registriert (CA (community-acquired)-MRSA), die in jungen, gesunden Patienten ohne nennenswerten Kontakt zu Einrichtungen des Gesundheitswesens auftraten. Hierbei treten vor allem Infektionen von Haut und Gewebe auf, in seltenen Fällen auch nekrotisierende Pneumonien. Diese Erreger unterschieden sich geno- und phänotypisch von HA-MRSA, z. B. in ihrer

Resistenz gegenüber bestimmten Antibiotika. Wichtigster Virulenzfaktor von CA-MRSA ist das Gen für PVL (Panton Valentine Leukocidin). PVL ist ein porenformendes Zytotoxin, welches Erythrozyten und Leukozyten zerstört und von weniger als 5% der *S. aureus*-Stämme produziert wird. Dagegen konnte PVL in über 93% der *S. aureus*-Isolate bei Furunkulosen und über 85% bei nekrotisierenden Pneumonien detektiert werden, was auf eine Schlüsselrolle von PVL in der Pathogenese dieser Krankheitsbilder hindeutet (Lina *et al.* 1999, Drews *et al.* 2006).

Da es sich bei *S. aureus* um einen fakultativ intrazellulären Erreger handelt, ist es möglich, dass er trotz adäquater Therapie innerhalb verschiedener Zellen überlebt. Nur das intrazellulär aktive Antibiotikum Rifampicin tötete diese Bakterien *in vitro* in Fibroblasten und murinen Keratinozyten zuverlässig ab (Krut *et al.* 2004).

Der koagulasenegative Erreger *S. epidermidis* besiedelt Haut- und Schleimhäute und ist besonders im Zusammenhang mit invasiven Maßnahmen oder implantierten Fremdkörpern eine der wichtigsten Ursachen nosokomialer Infektionen. Er ist in der Lage, dicke, mehrschichtige Biofilme auf Polymer-Oberflächen zu bilden (von Eiff *et al.* 2002).

Als weiterer KNS ist *S. saprophyticus* ein Erreger der akuten Harnwegsinfektion und Dysurie bei jungen Frauen und der unspezifischen Urethritis bei sexuell aktiven Männern (Kayser *et al.* 2005).

#### **1.4 Charakterisierung und Einteilung von Streptokokken**

Streptokokken sind grampositive Kokken. Sie sind rund bis oval und in gewundenen Ketten oder als Diplokokken angeordnet. Sie sind unbeweglich, nicht sporenbildend und im Gegensatz zu den Staphylokokken katalasenegativ. Die Streptokokken werden aufgrund ihres Hämolysevermögens eingeteilt (Kayser *et al.* 2005).

Bei der  $\beta$ -Hämolyse sind die Kolonien von einem klaren Hämolysehof umgeben. In diesem Bereich sind alle Erythrozyten vollständig lysiert, was durch das Vorhandensein von Streptolysin O oder S der betreffenden Stämme zustande kommt (Madigan und Martinko 2009). Die  $\alpha$ -Hämolyse beschreibt, dass die

betreffenden Kolonien auf Blutagar von einer grünen Zone umgeben sind. Dieses Phänomen entsteht durch das von Streptokokken produzierte Wasserstoffperoxid, wodurch Erythrozyten zerstört werden und das Hämoglobin zu Methämoglobin oxidiert wird, welches in das umgebende Medium austritt (Facklam 2002, Kayser *et al.* 2005). Die  $\gamma$ -Hämolyse beschreibt das Fehlen von Hämolyse.

Zu den  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken gehören *S. pyogenes*, *S. agalactiae* und *S. dysgalactiae subsp. equisimilis*. Die Zuordnung zu  $\alpha$ - oder  $\gamma$ -Hämolyse ist nicht immer eindeutig, da die Stärke der Vergrünung je nach Versuchsbedingungen variieren kann. Wird beispielsweise Sauerstoff entzogen, unterbleibt die Bildung von Wasserstoffperoxid. Die Erreger, die in diese beiden Gruppen fallen, können auch als nicht- $\beta$ -hämolisierende Stämmen zusammengefasst werden (Facklam 2002). Eine weitere Einteilung beruht auf dem Vorhandensein eines in der Zellwand lokalisierten polymerisierten Kohlenhydrats, das auch als C-Substanz bezeichnet wird und bei den meisten Streptokokken vorhanden ist (Lancefield-Antigene A-V). Die oralen Streptokokken besitzen allerdings mehrheitlich kein solches Antigen und lassen sich deshalb nicht nach diesem Schema einordnen (Kayser *et al.* 2005).

#### **1.4.1 Virulenzfaktoren und klinische Bedeutung von Streptokokken**

*S. pyogenes* (A-Streptokokken) verursacht sowohl akute, invasive Krankheiten als auch Folgekrankheiten. Dazu zählen beispielsweise Pharyngitis, Otitis media und bei Befall mit lysogenen Bakteriophagen, aufgrund dessen ein pyrogenes Streptokokkentoxin (PSE) gebildet wird, auch Scharlach oder das toxische Schocksyndrom. Eine unzureichende Behandlung eines Infektes mit *S. pyogenes* kann als schwere Folgekrankheiten eine akute Glomerulonephritis oder rheumatisches Fieber nach sich ziehen (Madigan und Martinko 2009).

Zahlreiche Virulenzfaktoren sind an der Pathogenese von A-Streptokokkenerkrankungen beteiligt: das antiphagozytär wirksame M-Protein, die erythrozytenmembranzerstörenden Hämolysine Streptolysin O (verursacht Poren) und Streptolysin S, die bindegewebeauflösende Hyaluronidase und die fibrinolytische Streptokinase. Außerdem besitzen manche Stämme durch

Prophagen kodierte Superantigene (Kayser *et al.* 2005), welche gleichzeitig an MHC (major histocompatibility complex) II von antigenpräsentierenden Zellen und T-Zell-Rezeptoren von T-Zellen binden können, was zu einer Aktivierung und massiven Proliferation der T-Zellen führt und eine hohe Ausschüttung verschiedener Zytokine bewirkt (Petersson *et al.* 2004). Diese Superantigene werden als pyrogene Streptokokkentoxine (PSE) bezeichnet und verursachen Fieber, Sepsis und das Scharlach-Exanthem bzw. –Enanthem (Kayser *et al.* 2005).

*S. dysgalactiae subsp. equisimilis* besitzt ähnliche Virulenzfaktoren wie *S. pyogenes*, u. a. das M-Protein, Streptolysin S und O und Streptokinase A (Takahashi *et al.* 2011).

Pneumokokken (*S. pneumoniae*) gelten als Haupterreger für ambulant erworbene Pneumonien, wobei es sich um Lobär- oder Bronchopneumonien handelt. Außerdem können diese Bakterien Verursacher von Otitis media, Meningitis, Sinusitis, Ulcus corneae, exazerbierter COPD und Sepsis sein. Ihr Hauptvirulenzfaktor ist die Kapsel, durch welche sie vor der Phagozytose durch Immunzellen geschützt werden. Des Weiteren spielt das membranzerstörende Pneumolysin und eine IgA1-Protease in der Pathogenese eine Rolle (Kayser *et al.* 2005).

B-Streptokokken (*S. agalactiae*) sind gefährliche Erreger für chronisch Kranke und für Neugeborene. Sie besiedeln asymptomatisch den vaginalen Bereich von bis zu 42% der schwangeren Frauen, wobei es in bis zu 72% der Fälle zu einer Übertragung auf das Neugeborene kommt, was zu einer schweren pulmonalen Entzündung, Meningitis oder Sepsis führen kann (Ulett *et al.* 2005, Kayser *et al.* 2005).

Orale Streptokokken, auch Viridans-Streptokokken genannt, sind zum großen Teil  $\alpha$ -hämolisierend und nur wenige besitzen ein Gruppenantigen nach Lancefield. Sie sind Erreger der bakteriellen Endokarditis und an der Entstehung von Zahnkaries beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurden die oralen Streptokokken *S. oralis*, *S. sanguinis* und *S. sobrinus* untersucht (Kayser *et al.* 2005, Facklam 2002).

Antibiotika der Wahl bei Streptokokkeninfektionen stellen Penicilline dar. Bei

Penicillinresistenz kommen Cephalosporine, Erythromycin, Fluorchinolone oder Vancomycin als Therapieoptionen in Frage (Madigan und Martinko 2009).

### **1.5 Charakterisierung und Einteilung von Enterokokken**

Enterokokken sind grampositive Kokken. Sie sind einzeln, in kurzen Ketten oder in Paaren angeordnet, katalasenegativ und fakultativ anaerob. Manche Stämme gehören zur Normalflora von Mensch und Tier (Kayser *et al.* 2005), wo sie den Gastrointestinaltrakt, die Vagina und die Mundhöhle besiedeln (Jett *et al.* 1994). Früher wurden sie zu den Streptokokken gezählt, da sie mikroskopisch ähnlich imponieren und in ihrer Zellwand das Lancefield-Gruppenantigen D aufweisen. Allerdings unterscheiden sie sich von diesen durch eine höhere Stabilität gegenüber chemischen und physikalischen Noxen, den sogenannten Sherman-Kriterien, aufgrund derer sie auch in der Umwelt weit verbreitet sind. Aufgrund dessen bilden sie heute eine eigene Familie und Gattung (Kayser *et al.* 2005). Es sind über 20 Enterokokkenarten bekannt, von denen einige zur Herstellung von Lebensmitteln oder als Probiotika eingesetzt werden (Kayser *et al.* 2005).

#### **1.5.1 Virulenzfaktoren und klinische Bedeutung von Enterokokken**

Neben ihrem Vorkommen als Bestandteil der menschlichen Flora werden Enterokokken auch als Quelle verschiedener Infektionen beobachtet, vor allem im Krankenhaus. Sie sind häufige Erreger nosokomialer Bakteriämien und Harnwegsinfektionen (Shepard und Gilmore 2002). Weitere typische Enterokokkenerkrankungen sind Infektionen des Bauchraumes, der Gallengänge und von Verbrennungswunden und Infektionen, die von Fremdkörpern wie z. B. intravasalen Kathetern ausgehen, was schlimmstenfalls zur Sepsis und zum Tod führen kann (Jett *et al.* 1994). Außerdem gehören sie zu den häufigsten Erregern der ambulant erworbenen subakuten Endokarditis (Shepard und Gilmore 2002). Seltener sind Infektionen des zentralen Nervensystems, der Weichteile, der Lunge, der Nasennebenhöhlen, der Ohren, der Augen oder des Zahnfleisches (Jett *et al.* 1994).

Insgesamt werden in 80-90% der Fälle *E. faecalis* und in einem Großteil der restlichen Fälle *E. faecium* isoliert (Kayser *et al.* 2005). Weitere



Enterokokkenarten wie *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* und *E. hirae*, sind nur selten Ursache menschlicher Infektionen (Jett *et al.* 1994).

Wie oben erwähnt, werden Enterokokken häufig im Rahmen von nosokomialen Infektionen nachgewiesen. Da sie gleichzeitig als Bestandteil der menschlichen Flora vorkommen, kann die Unterscheidung zwischen Kolonisation bzw. Infektion im Einzelfall schwierig sein.

Zur Therapie einer Endokarditis wird normalerweise ein Aminopenicillin in Kombination mit einem Aminoglykosid verwendet. Allerdings gibt es, ähnlich wie bei *S. aureus*, eine zunehmende Anzahl an Enterokokken mit Antibiotikaresistenzen, u. a. gegen Aminopenicilline und Reserveantibiotika wie das Glykopeptid Vancomycin (Kayser *et al.* 2005). 1986 wurde in Europa über die ersten Fälle von Vancomycin-resistenten *E. faecalis* (VRE) berichtet, kurze Zeit später auch in den USA. Sie breiteten sich schnell aus und wurden mit einer steigenden Frequenz als Ursache nosokomialer Infektionen identifiziert. Heutzutage sind 14-25% aller Enterokokken, die in Nordamerika in Krankenhäusern isoliert werden, VRE. Als Hauptursache für die Entstehung dieser Resistenzen gilt in Europa der Einsatz von Avoparcin als Wachstumsbeschleuniger in der Tierhaltung. In den USA ist dieses Mittel nicht zugelassen, dort scheint die Selektion und Übertragung in Krankenhäusern und Pflegeheimen die führende Rolle zu spielen (Courvalin 2006, Mundy *et al.* 2000, DiazGranados *et al.* 2005). Sie stellen heute eine der größten Herausforderungen der Krankenhausmedizin dar, da die Therapiemöglichkeiten deutlich eingeschränkt sind und zudem bereits eine Übertragung des Vancomycin-Resistenz-Gens auf *S. aureus* beobachtet wurde. Ähnlich wie bei MRSA waren die Strategien zur Eindämmung der Ausbreitung von VRE in den letzten Jahren wenig erfolgreich (Mundy *et al.* 2000). Zudem wurde bei durch VRE verursachten Bakteriämien über eine erhöhte Mortalitätsrate im Vergleich zu Vancomycin-empfindlichen Enterokokken berichtet (DiazGranados *et al.* 2005). In der Vergangenheit war das Verhältnis der bei Infektionen isolierten Enterokokken zwischen *E. faecalis* und anderen Enterokokken etwa 10:1. In den letzten Jahren hat sich das Verhältnis im Bezug auf Bakteriämien

verringert, was auf das vermehrte Auftreten von VRE zurückgeführt wird, bei denen Stämme von *E. faecium* dominieren (Mundy *et al.* 2000).

Es wurden 6 verschiedene Arten von Glykopeptidresistenz auf geno- und phänotypischer Basis charakterisiert: VanA, B, C, D, E und G. Während es sich bei VanC um eine natürliche Resistenz von *E. gallinarum* und *E. casseliflavus-E. flavescens* gegenüber Vancomycin handelt, sind die übrigen erworbene Resistenzen (Courvalin 2006), von denen VanA im klinischen Kontext die bedeutendste Rolle spielt, gefolgt von VanB. VanA ist unter Enterokokken weit verbreitet, wobei *E. faecium* das Hauptreservoir darstellt. Die anderen Typen der Glykopeptidresistenz spielen im Krankenhaus eine untergeordnete Rolle, da sie wesentlich seltener isoliert werden und die Resistenzen schwächer ausgeprägt sind (Klare *et al.* 2003). Während VanA-typische VRE eine hohe Resistenz gegenüber Vancomycin und Teicoplanin zeigen, besteht für VanB-typische Stämme lediglich eine isolierte variable Resistenz gegenüber Vancomycin (Courvalin 2006).

Zahlreiche Virulenzfaktoren stehen unter Verdacht, mit der gesteigerten Pathogenität bestimmter Enterokokkenstämme in Verbindung zu stehen. Zu ihnen zählen Zytolysin, Gelatinase, Aggregationssubstanz, die Produktion von extrazellulärem Superoxid (ES), ein Oberflächenprotein von Enterokokken (Esp) sowie Faktoren der Antibiotikaresistenz, die bereits oben erörtert wurden (Mundy *et al.* 2000).

**Zytolysin**, aufgrund seiner hämolytischen Eigenschaften ehemals auch als Hämolysin bezeichnet (Kayaoglu und Ørstavik 2004), wurde bei bis zu 60% der *E. faecalis* Stämme detektiert, die bei Menschen während Ausbruchssituationen isoliert wurden (Mundy *et al.* 2000). Diese Stämme wirken bakteriolytisch gegen eine Reihe von grampositiven Bakterien und zeigen diagnostisch eine  $\beta$ -Hämolyse auf Agar mit Erythrozyten von Menschen oder Pferden, nicht aber auf Schafsblutagar (Mundy *et al.* 2000). Auch in einem *in vivo* Modell in Mäusen konnte eine dosisabhängige Korrelation zwischen der Toxizität und der Fähigkeit von *E. faecalis*, Zytolysin zu produzieren, beobachtet werden (Ike *et al.* 1984). Allerdings ist dieser Faktor bei klinischen Isolaten von *E. faecium* nicht zu finden (Jahangiri *et al.* 2010, Elsner *et al.* 2000).

**Aggregationssubstanz** verhilft *E. faecalis* zur Bindung an verschiedene eukaryontische Zellen *in vitro* und an Proteine der extrazellulären Matrix wie Kollagen Typ-1. Außerdem spielt sie eine entscheidende Rolle im Konjugationsprozess zwischen den beteiligten Bakterien (Kayaoglu und Ørstavik 2004).

**Gelatinase** ist eine Metalloproteinase, die von 45-68% der klinischen Isolate von *E. faecalis* produziert wird. Sie ist in der Lage, u. a. Gelatine, Kollagen und Hämoglobin zu hydrolysieren und trägt damit zur Zerstörung von Geweben bei (Kayaoglu und Ørstavik 2004).

Die Fähigkeit **extrazelluläres Superoxid (ES)** zu produzieren, wurde für die meisten *E. faecalis*- und für manche *E. faecium*-Stämme nachgewiesen, wobei dies signifikant häufiger bei invasiven als bei kolonisierenden Isolaten auftrat (Mundy *et al.* 2000). ES ist ein hochreaktives Sauerstoffradikal, das Zell- und Gewebedestruktionen in Entzündungssituationen verursacht (Kayaoglu und Ørstavik 2004). Außerdem trägt die Produktion von ES zur Lyse von Erythrozyten bei (Jett *et al.* 1994).

**Esp** (enterococcal surface protein) ist ein spezifisches Oberflächenprotein von Enterokokken, das vor allem bei menschlichen *E. faecalis*-Isolaten und bei *E. faecium*-Stämmen, die im Rahmen klinischer Ausbrüche isoliert wurden, gefunden wurde. Dies lässt vermuten, dass Esp zumindest im Fall von *E. faecium* einen Marker für epidemische Stämme darstellt (Oancea *et al.* 2004). Allerdings wird auch über virulente Klone von *E. faecium* berichtet, die kein Esp besitzen (Di Rosa *et al.* 2006). Bei beiden Stämmen konnte *in vitro* die Übertragung des *esp*-Gens mittels Konjugation beobachtet werden (Oancea *et al.* 2004). Es zeigt Ähnlichkeiten zu Bap, einem Oberflächenprotein von *S. aureus*, welches mit Biofilmbildung in Zusammenhang gebracht wird (Kristich *et al.* 2004). Auch einige Enterokokken sind in der Lage, Biofilme zu produzieren, was bei *E. faecalis* im Gegensatz zu *E. faecium* sehr häufig der Fall ist. Es wurde bei verschiedenen Genotypen beider Stämme ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Esp und der Fähigkeit, Biofilme zu entwickeln, untersucht. Dabei wurde deutlich, dass diese Eigenschaft bei *E. faecalis* unabhängig von Esp auftritt. Obwohl auch für *E.*

*faecium* Esp-negative, Biofilm-bildende Stämme beschrieben wurden, fiel auf, dass beide Faktoren gleichzeitig nur in klinischen Isolaten auftraten, was vermuten lässt, dass die Kombination von Biofilmbildung und Esp zu Vorteilen im Rahmen eines Infektionsprozesses führt (Kristich *et al.* 2004, Di Rosa *et al.* 2006).

Allerdings zeigte die Analyse mehrerer klinischer *E. faecalis*-Isolate, dass die erwähnten Virulenzgene häufiger bei besiedelnden Isolaten von Intensivstationen als bei invasiven Isolaten gefunden wurden. Somit ist die Präsenz der Virulenzgene nicht zwingend mit einer erhöhten Pathogenität verbunden (Ruiz-Garbajosa *et al.* 2006). Es scheinen also vorwiegend andere, bislang unbekannte bakterielle Faktoren bei Infektionen durch Enterokokken eine Rolle zu spielen.

So ist es bislang beispielsweise noch weitgehend ungeklärt, ob und durch welche Mechanismen Enterokokken Zelltod in eukaryontischen Zellen verursachen. Anhand der Analyse von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems konnte bereits für *E. faecalis* die Fähigkeit zur Zelltodinduktion in murinen Makrophagen, in murinen polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs) und in humanen, durch Phytohämagglutinin-aktivierten Lymphozyten gezeigt werden (Kirschnek *et al.* 2004, Miyazaki *et al.* 1993, Lee *et al.* 2004), wodurch dieser Erreger möglicherweise die Immunantwort des Wirtes umgeht. Die zytotoxischen Eigenschaften von *E. faecium* wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig untersucht.

## **1.6 Zelltod**

Das Auftreten von Zelltod ist für die Aufrechterhaltung der Gewebe-Homöostase von komplexen, multizellulären Organismen essentiell, z. B. während der Embryonalentwicklung oder bei der Bekämpfung von infizierten Zellen durch zytolytische Effektorzellen (Ziegler und Groscurth 2004). Die beiden Hauptformen des Zelltods sind Apoptose und Nekrose.

### **1.6.1 Apoptose**

Apoptose, auch programmierter Zelltod (PCD) genannt, ist ein wichtiger

physiologischer Mechanismus, bei dem ein genau abgestimmter Prozess zum Tod einer Zelle führt (Karp 2005). Es handelt sich um einen Regulationsprozess, der für die Entwicklung von multizellulären Organismen essentiell ist. Überflüssige Zellen werden nach einem genauen Plan entfernt, wodurch Organe und Gewebe geformt werden. Eine Fehlregulation der Apoptose führt neben Entwicklungsdefekten beispielsweise zu Krebs, Neurodegeneration oder Autoimmunkrankheiten (Jin und El-Deiry 2005). Außerdem kann Apoptose eine Schlüsselrolle in der Pathogenese bakterieller Infektionen und der antibakteriellen Immunität spielen (Ulett und Adderson 2006).

Es gibt zwei Signalwege, über die in menschlichen Zellen die Apoptose aktiviert wird: der intrinsische, Mitochondrien-vermittelte PCD und der extrinsische, Todesrezeptor-vermittelte PCD.

Der intrinsische Apoptosesignalweg kann durch Stressoren wie UV-Licht, Bestrahlung, Zytokine, Chemotherapie, chemisches Ungleichgewicht wie Calciumüberladung oder bakterielle Toxine ausgelöst werden. Hierbei öffnen sich über eine Todesrezeptor-unabhängige Deregulation der Mitochondrienfunktion Poren in der inneren mitochondrialen Membran, wodurch das mitochondriale Transmembranpotential  $\Delta\psi_m$  zusammenbricht. Mitochondriales Cytochrom c gelangt ins Cytoplasma und bindet an apoptotic protease activating factor (APAf-1) und gespaltene Procaspase-9, um das Apoptosom zu bilden. Dieses führt zur Spaltung und Aktivierung von Caspase-3 und letztendlich zum Zelltod (Ulett und Adderson 2006).

Bei der Aktivierung des Todesrezeptorsignalwegs durch Bindung entsprechender Liganden an Todesrezeptoren wie beispielsweise CD95 (Fas/APO-1) oder TNF-alpha-Rezeptor-1, wird eine Spaltung und Aktivierung von Procaspase-8 bewirkt. Dies resultiert wiederum in eine Spaltung von Procaspase-3 (oder Effektorcaspase-6 oder -7) und letztendlich in DNA-Fragmentierung und Zelltod (Ulett und Adderson 2006).

Es lassen sich bei der Apoptose charakteristische morphologische Merkmale beobachten. Aufgrund des Ausstroms von  $K^+$  und  $Cl^-$  schrumpft die Zelle (Barros *et al.* 2001). Es kommt zur Kondensation von Chromatin,

„Externalisierung“ des Membranlipids Phosphatidylserin, „membrane blebbing“ und Zellabbau in Apoptosekörperchen (Ulett und Adderson 2006). Makrophagen und andere Phagozyten erkennen apoptotische Zellen über Rezeptoren für Phosphatidylserin und beseitigen diese. Hierdurch wird dem Austritt des intrazellulären Materials der sterbenden Zellen vorgebeugt und die Entzündungsreaktion beschränkt (Ulett und Adderson 2006). Werden die Apoptosekörperchen nicht phagozytiert, werden sie auf eine Art und Weise abgebaut, die als sekundäre Nekrose bezeichnet wird, da die Vorgänge denen des nekrotischen Zelltods ähneln (Ziegler und Groscurth 2004).

Auf der einen Seite dient die durch pathogene Erreger ausgelöste Apoptose der Makrophagen vermutlich dazu, die Immunantwort zu umgehen. Für *Shigella flexneri* ist eine direkte Aktivierung von Caspasen beschrieben. Für *Salmonella typhimurium* wird über ähnliche Mechanismen berichtet, wobei der Zelltod der Wirtszelle in diesem Fall auch im Zusammenhang mit dem Überleben der intrazellulären Bakterien steht. Auf der anderen Seite gibt es Hinweise, dass es sich bei der Apoptose von Makrophagen im Kontext bestimmter Infektionen um eine physiologische Immunantwort des Wirts handeln könnte (Dockrell *et al.* 2001).

### **1.6.2 Nekrose**

Der Begriff Nekrose bezeichnet eine passive Form des Zelltods, die im Gegensatz zur Apoptose nicht programmiert verläuft und keinen komplexen regulatorischen Mechanismen unterliegt (Ziegler und Groscurth 2004). Nekrose folgt auf ein schweres äußerliches Trauma (z. B. Hitze oder toxische Stoffe), wodurch entweder die Plasmamembran direkt geschädigt oder die Energieproduktion der Zelle durch die Blockierung der ATP-Synthese gestört wird. Als Folge davon werden energieabhängige Ionenpumpenmechanismen beeinträchtigt, wodurch verschiedene Ionen entlang ihres Konzentrationsgradienten durch die Plasmamembran wandern und die Kontrolle des Wasserhaushalts der Zelle gestört wird. Der daraus resultierende Natriumeinstrom bedingt einen Wassereinstrom, was eine akute Zellschwellung zur Folge hat (Alison und Sarraf 1994, Barros *et al.* 2001). Die Zellmembran

wird durchlässig, wodurch Zellbestandteile nach außen gelangen, was eine massive Entzündungsreaktion nach sich zieht (Ziegler und Groscurth 2004).

### **1.7 Ziele der vorliegenden Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob und durch welche Mechanismen gram-positive Bakterien wie Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken Zelltod in Makrophagen auslösen und damit möglicherweise zur Umgehung der Immunantwort des Wirtes beitragen.

Während die zytotoxischen Eigenschaften von *S. aureus* bereits gut charakterisiert sind, gibt es für andere Staphylokokken- bzw. Streptokokkenarten bislang nur wenige Studien bezüglich ihrer Fähigkeit Zelltod zu induzieren. Auch viele Enterokokkenarten, wie beispielsweise *E. faecium*, wurden bislang nicht hinsichtlich ihrer zytotoxischen Eigenschaften untersucht.

Somit bestand eines der Ziele der vorliegenden Arbeit darin, diese grampositiven Kokken hinsichtlich ihrer Zelltod-induzierenden Fähigkeiten zu charakterisieren und miteinander zu vergleichen. Dazu wurden J774A.1-Makrophagen nach Infektion mit den entsprechenden Bakterien mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (TMRE, Propidiumiodid) angefärbt und anschließend durchflusszytometrisch hinsichtlich intakter, apoptotischer sowie spät-apoptotischer bzw. nekrotischer Eigenschaften analysiert.

Darüber hinaus sollten die bei der Zelltodinduktion durch Enterokokken, insbesondere *E. faecium*, zugrunde liegenden zellulären Mechanismen aufgeklärt werden. Dazu wurden Makrophagen mit verschiedenen Enterokokken (klinische Isolate und nicht-klinische Stämme), deren Pathogenitätsfaktoren teilweise bekannt waren, infiziert. Darüber hinaus sollte geklärt werden, welche Mechanismen des Zelltods (Apoptose, Nekrose) nach Infektion mit *E. faecium* in Makrophagen ausgelöst werden. Diesbezüglich sollte die mögliche Aktivierung von Caspasen und die mögliche Bedeutung von intrazellulären Bakterien bzw. der intrazellulären Vermehrung von *E. faecium* analysiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Zelllinie

#### 2.1.1 Ursprung muriner J774A.1-Makrophagen

Es handelt sich bei J774A.1 um eine meist adhärent wachsende Zelllinie aus dem Tumor einer weiblichen BALB/c Maus, die Lysozym und Interleukin-1 synthetisiert und Rezeptoren für Komplement C3 besitzt. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 17 Stunden (ATCC 2007).

#### 2.1.2 Zellkulturmedium

Das Zellkulturmedium wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt und bei 4°C gelagert.

Tab.1: Medium für Kultur von J774A.1-Makrophagen.

Substanz	Konzentration/ Menge	Firma
VLE-RPMI 1640 Medium		Biochrom, Berlin, Germany
fetales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert	10% (v/v)	Sigma, Taufkirchen, Germany
L-Glutamin	2 mM	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
2-Mercaptoethanol (ME)	50 µM	Sigma, Taufkirchen, Germany
Nicht-essentielle Aminosäuren	1% (v/v)	Biochrom, Berlin, Germany
Natriumpyruvat	1 mM	Biochrom, Berlin, Germany

#### 2.1.3 Kultivierung von J774A.1-Makrophagen

Die Makrophagen wurden in mittelgroßen Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) angezüchtet. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt und die Zellen zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:3 oder 1:4 gesplittet.

#### 2.1.4 Zellernte und Zellzählung

Das Medium der J774A.1-Makrophagen wurde abgesaugt, zweimal mit HANK's Salt Solution (Biochrom, Berlin, Germany) gewaschen und wieder abgesaugt.



Um die Zellen abzulösen, wurden sie mit 2 ml Accutase (PAA, Egelsbach, Germany) überschichtet. Nach 15-minütiger Inkubation im Brutschrank wurde mehrmals kräftig gegen die Flasche geschlagen und die Zellen nach Zugabe von ca. 15 ml HANK's Salt Solution mithilfe einer Pipette vom Flaschenboden abgespült. Die Suspension wurde in ein 50 ml Röhrchen pipettiert und mit Zellkultur-Medium auf 50 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden nun bei 400 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert und ein Aliquot nach Zugabe von Trypanblau-Lösung mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Anschließend wurde die Zellsuspension durch Zugabe vorgewärmten Zellkultur-Mediums auf eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^6$ /ml eingestellt.

Jeweils 500  $\mu$ l dieser Suspension (entsprechend  $5 \times 10^5$  Zellen) wurden nun pro Vertiefung in eine 48-well Zellkulturplatte (BD Falcon, Heidelberg, Germany) pipettiert.

## 2.2 Bakterienstämme und Ansatz der Bakterienkulturen

Die J774A.1-Makrophagen wurden mit Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken infiziert. Dafür wurde am Abend vor dem Versuchstag jeweils eine Bakterienkolonie in 3 – 5 ml LB-Medium (Luria Broth) angeimpft und auf einen Schüttler (200 rpm) über Nacht bei 37°C kultiviert.

LB-Medium ist eine komplexe Nährlösung zur Anzucht von Bakterien. Das Rezept wurde 1951 von Giuseppe Bertani formuliert.

Tab. 2: LB-Medium für Bakterienkulturen.

Substanz	Menge
Trypton	- 10 g/l
Hefeextrakt	- 5 g/l
NaCl	- 5 g/l
in 1 l H <sub>2</sub> O bidest. pH 7,4-7,6	

## 2.2.1 Staphylokokken

Tab. 3: Verwendete Staphylokokkenstämme.

Gattung	Art	Koagulase	Besonderheiten, Wirts-organismus, Klinik	Verwendeter Referenzstamm
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	+ (Pantůček <i>et al.</i> 1996)	Mensch; Abszesse, Furunkel, Wundinfektionen, Toxikosen (Kayser <i>et al.</i> 2005)	ATCC 25923 bzw. ATCC 29213
<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	- (Heikens <i>et al.</i> 2005)	Normaflora Mensch; Fremdkörperassoziierte Infektionen (Kayser <i>et al.</i> 2005)	ATCC 12228
<i>Staphylococcus</i>	<i>gallinarum</i>	- (Devriese <i>et al.</i> 1983)	Hühner, Fasane, Speichel gesunder Menschen; traumatische Endophthalmitis (Tibra <i>et al.</i> 2010)	ATCC 35539
<i>Staphylococcus</i>	<i>hyicus</i>	+ (Pantůček <i>et al.</i> 1996)	Schweine; Exsudative Epidermitis (Li <i>et al.</i> 2011)	ATCC 11249
<i>Staphylococcus</i>	<i>lugdunensis</i>	- (Heikens <i>et al.</i> 2005)	Mensch; Arthritis, Infektionen von Gelenkprothesen und Kathetern (Heikens <i>et al.</i> 2005)	ATCC 700328
<i>Staphylococcus</i>	<i>saprophyticus</i>	- (Heikens <i>et al.</i> 2005)	Mensch; Harnwegsinfektionen bei jungen Frauen (Kayser <i>et al.</i> 2005)	DSM 20229
<i>Staphylococcus</i>	<i>sciuri</i>	- (Heikens <i>et al.</i> 2005)	Mensch, Tiere; Endokarditis, Sepsis, Harnwegsinfektionen; exsudative Epidermitis in Schweinen (Li <i>et al.</i> 2011)	ATCC 29061
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i> Cowan	+	formt stabilen Biofilm (Becker <i>et al.</i> 2001)	DSM 20231
<i>Staphylococcus</i>	<i>cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	- (Kloos und Wolfshohl 1991)	Mensch (Kloos und Wolfshohl 1991)	ATCC 35662
<i>Staphylococcus</i>	<i>haemolyticus</i>	- (Heikens <i>et al.</i> 2005)	Mensch; Endokarditis nativer Herzklappen, Peritonitis, Wund-, Knochen- und Gelenkinfektionen (Heikens <i>et al.</i> 2005)	ATCC 29969
<i>Staphylococcus</i>	<i>schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	+ (Pantůček <i>et al.</i> 1996)	Hunde; Otitis externa (Igimi <i>et al.</i> 1990)	ATCC 49545
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i> PVL+	+ (Heikens <i>et al.</i> 2005)	besitzt Panton-Valentine-Leukocidin (PVL); Mensch; nekrotisierende Pneumonie, Abszesse, Arthritis (Genestier <i>et al.</i> 2005)	ATCC 49775
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i> MRSA	+ (Heikens <i>et al.</i> 2005)	Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i> ; Mensch (Lowy 2003)	ATCC 33592

## 2.2.2 Streptokokken

Tab. 4: Verwendete Streptokokkenstämme.

Gattung	Art	Lancefield - Gruppe (Facklam 2002)	Hämo-lyse (Facklam 2002)	Wirtsorganismus (Facklam 2002) und Klinik	Verwendeter Referenz-stamm
<i>Streptococcus</i>	<i>agalactiae</i>	B	β	Mensch, Rind; Meningitis + Sepsis bei Neugeborenen (Kayser <i>et al.</i> 2005)	ATCC 13813
<i>Streptococcus</i>	<i>pyogenes</i>	A	β	Mensch; Angina, Scharlach, Haut- und Wundinfektionen, Folgekrankheiten (Kayser <i>et al.</i> 2005)	ATCC 19615
<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>	keine	α	Diplokokken; Mensch; Pneumonie, Meningitis, Otitis media (Kayser <i>et al.</i> 2005)	ATCC 49619
<i>Streptococcus</i>	<i>dysgalactiae</i> <i>subsp.</i> <i>equisimilis</i>	A, C, G, L	β	Mensch, Tiere; Pharyngitis, Otitis media, Wundinfektionen, Toxisches Schocksyndrom (Sachse <i>et al.</i> 2002)	ATCC 9542
<i>Streptococcus</i>	<i>sanguinis</i>	H	α	Mensch; Besiedlung Mundhöhle, infektiöse Endokarditis (Xu <i>et al.</i> 2007)	ATCC 10556
<i>Streptococcus</i>	<i>sobrinus</i>	keine/(E)	keine/α	Mensch, Ratte; Karies auf glatten Oberflächen (Madigan und Martinko 2009)	ATCC 33478
<i>Streptococcus</i>	<i>oralis</i>	keine/(K)	α	Mensch; infektiöse Endokarditis (Douglas <i>et al.</i> 1993)	ATCC 35037

## 2.2.3 Enterokokken

Ein Ausbruch mit Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) am Universitätsklinikum Tübingen (UKT) zwischen April 2004 und 2005 hatte im Januar 2005 die Einführung eines Screening-Programms zur Folge, durch welches in den Monaten nach dem Ausbruch 200 besiedelte Patienten detektiert werden konnten (Borgmann *et al.* 2007). Die Patientenisolat, die während des Ausbruchs sowie im Jahr 2005 nach Ende des Ausbruchs (Nichtausbruch) isoliert worden waren, wurden genotypisiert und auf das Vorhandensein des Esp (enterococcal surface protein) -Gens hin untersucht (Sagel *et al.* 2008). Bei schwerkranken Patienten traten die Genotypen 2 und 3 (Tab. 5) gehäuft auf, was sich durch eine höhere Pathogenität der beiden Stämme oder eine leichtere Verbreitung unter diesen Bedingungen erklären lässt (Borgmann *et al.* 2007).

Tab. 5: Verwendete Enterokokkenstämme.

Gattung	Art	Einfrier- nummer bzw. Genotyp	Besonderheiten	Verwendeter Referenzstamm bzw. Patientenisolat
<i>Enterococcus</i>	<i>avium</i>	SK 93		ATCC 14025
<i>Enterococcus</i>	<i>casseliflavus</i>	SK 98		ATCC 700327
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	SK 3		ATCC 29212
<i>Enterococcus</i>	<i>saccharolyticus</i>	SK 94		ATCC 43076
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	R 32	Isolat aus Käse	ATCC 6057
<i>Enterococcus</i>	<i>hirae</i>	R 20		ATCC 8043
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	SK 128	VanB	Pat.isolat
<i>Enterococcus</i>	<i>gallinarum</i>	SK 127	VanA	Pat.isolat
<i>Enterococcus</i>	<i>gallinarum</i>	SK 129	VanC1	Pat.isolat
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	Genotyp 2-2 S 269	VanA, esp +	Pat.isolat Ausbruch 2005
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	Genotyp 3-1 VRE 34	VanA, esp +	Pat.isolat Ausbruch 2005
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	Genotyp 4-1 VRE 222	VanA, esp +	Pat.isolat Nichtausbruch 2005
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	Genotyp 5-1 S 174	VanA, esp -	Pat.isolat Nichtausbruch 2005
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	Genotyp 6-1 S 261	VanA, esp -	Pat.isolat Nichtausbruch 2005
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	Genotyp 7-1 S 212	VanA, esp +	Pat.isolat Nichtausbruch 2005
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	Genotyp 8 VRE 220	VanA, esp +	Pat.isolat Nichtausbruch 2005
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	Genotyp 10-1 S 167	VanA, esp -	Pat.isolat Nichtausbruch 2005
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	ST4014	Isolat aus Stuhl	kolonisierter UKT Patient

In Europa haben die VanA- und die VanB-typischen Resistenzen die größte klinische Relevanz, da sie mit Abstand am häufigsten auftreten. Ihr Hauptreservoir ist *E. faecium*, in seltenen Fällen sind auch *E. faecalis* und andere Enterokokkenspezies betroffen (Werner *et al.* 2008). Enterokokken mit VanA-typischer Resistenz sind hochresistent gegen Vancomycin und Teicoplanin. Die VanB-typische Resistenz steht für eine variable Resistenz gegen Vancomycin, während eine normale Empfindlichkeit gegen Teicoplanin besteht (Klare *et al.* 2003). Die VanC-typische Resistenz bezeichnet die

natürliche Resistenz von *E. gallinarum* (VanC 1), *E. casseliflavus* (VanC 2) und *E. flavescens* (VanC 3) gegenüber niedrigen Konzentrationen von Vancomycin, ohne dabei resistent gegenüber Teicoplanin zu sein (Courvalin 2006). Die übrigen erworbenen Resistenz-Typen (VanD, VanE und VanG) sind klinisch wesentlich unbedeutender, da sie lediglich vereinzelt auftreten und nur zu einem geringen Grad gegenüber Vancomycin resistent und in den meisten Fällen gegenüber Teicoplanin empfindlich sind (Klare *et al.* 2003).

#### **2.2.4 Bestimmung der Bakteriendichte mittels Photometer**

Am Versuchstag wurden die Bakterienkulturen bei 4000 g 5 min lang zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Pellets in jeweils 1 ml sterilem PBS (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) resuspendiert. Nach einer Verdünnung der Bakterien im Verhältnis 1:20 mit PBS wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm die optische Dichte (OD) der Bakteriensuspension photometrisch bestimmt (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg). Resultierend aus Verdünnungsreihen der entsprechenden Bakteriensuspensionen, nachfolgendem Ausplattieren und Bestimmung der Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten (colony forming units = CFU) wurde folgende Formel benutzt, um die Konzentration der Bakterien in der Suspension zu bestimmen:

$$OD_{600nm} \times 3 \times 10^8 = \text{Anzahl Bakterien/ml}$$

Um alle Suspensionen auf eine  $OD_{600nm}$  von 1,0 einzustellen, wurde das nach der folgenden Formel berechnete Volumen PBS vorgelegt und anschließend 50  $\mu$ l der Bakteriensuspension zupipettiert.

$$\text{Volumen PBS } [\mu\text{l}] = OD_{600nm} \times 1000 - 50$$

#### **2.2.5 Infektion von Makrophagen**

J774A.1-Makrophagen ( $5 \times 10^5$ ) wurden mit den verschiedenen Bakterienstämmen im Infektionsverhältnis (MOI = multiplicity of infection) 2:1, 20:1 und 200:1 infiziert (Abb. 1). Dafür wurden bei MOI 2 ( $1 \times 10^6$  Bakterien) 3,3

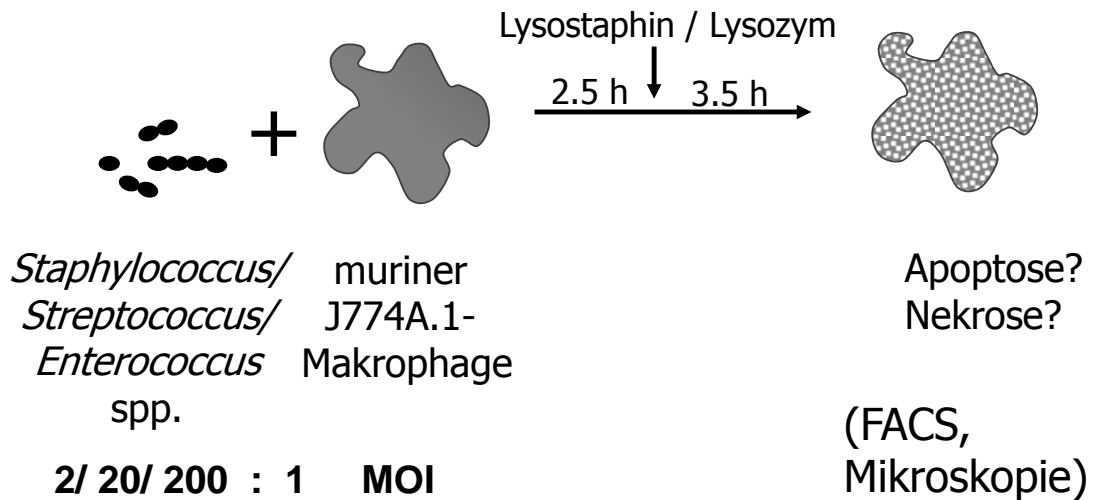
µl, bei MOI 20 ( $1 \times 10^7$  Bakterien) 33,3 µl und bei MOI 200 ( $1 \times 10^8$  Bakterien) 333 µl der Bakteriensuspension ( $OD_{600nm} = 1,0$ ) verwendet. Um das Volumen der Bakteriensuspension zu verkleinern, wurde im Fall der MOI 200 die entsprechende Menge der Bakteriensuspension (333 µl) zunächst zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet für die Infektion in 33 µl PBS resuspendiert.

Direkt im Anschluss an die Infektion wurde die Zellkulturplatte zentrifugiert, um den Kontakt der Bakterien zu den Makrophagen sicherzustellen. 2.5 h nach Infektion wurden die extrazellulären Bakterien durch Zugabe eines entsprechenden Antibiotikums abgetötet und die Makrophagen mit den Bakterien 3.5 h lang weiter inkubiert (Abb. 1). Zu diesem Zweck wurde Lysostaphin (40 µg/ml) (Sigma, Taufkirchen, Germany) für Staphylokokken und Lysozym (10 mg/ml) (aus Hühnereiweiß, Sigma) für Streptokokken und Enterokokken verwendet.

**Lysostaphin** ist eine 27-kDa Glycylglycin-Endopeptidase, die durch *Staphylococcus simulans* produziert wird. Lysostaphin spaltet spezifisch die Pentaglycin-Querverbindung des Peptidoglykans der Zellwand von *S. aureus*, wodurch es diesen hochwirksam abtötet. In höheren Konzentrationen wirkt Lysostaphin auch gegen den koagulasen negativen Erreger *S. epidermidis* (Wu *et al.* 2003, Climo *et al.* 1998).

**Lysozym** ist eine 15-kDa Glycosyl-Hydrolase, die in zahlreichen Körpersekreten von Menschen und Tieren vorhanden ist. Es wird von Monozyten, Makrophagen und Epithelzellen produziert und befindet sich in den Granula neutrophiler Granulozyten. Es spaltet die  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindung zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin von Peptidoglykan, einem spezifischen Bestandteil der Zellwand von Bakterien, und ist wirksam gegen verschiedene grampositive Erreger wie beispielsweise *Bacillus megaterium*, *Micrococcus lysodeicticus* und einige Streptokokken. Die Zellwand wird unter seiner Einwirkung durchlässig und Wasser kann in die Bakterien eindringen, wodurch diese lysiert werden (Montagne *et al.* 1998, Ganz 2004; Madigan und Martinko 2009).

Nach insgesamt 6 h wurden die Zellen hinsichtlich ihrer apoptotischen bzw. nekrotischen Eigenschaften analysiert.



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Infektionsversuche.**

Murine J774A.1-Makrophagen wurden mit verschiedenen Staphylokokken-, Streptokokken- und Enterokokkenstämmen im Infektionsverhältnis 2:1, 20:1 und 200:1 infiziert und nach 6 h mittels Durchflusszytometrie und Mikroskopie auf zytotoxische Effekte hin untersucht. Um einer Überwucherung vorzubeugen, wurde den Kokulturen aus Makrophagen und Bakterien nach 2.5 h Lysostaphin (Staphylokokken) bzw. Lysozym (Streptokokken und Enterokokken) zugegeben.

## 2.3 Analyse apoptotischer und nekrotischer Zellen mittels Durchflusszytometrie

### 2.3.1 Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials

Ein frühes Anzeichen für den apoptotischen Zelltod ist das Zusammenbrechen des inneren mitochondrialen Transmembranpotentials  $\Delta\Psi_m$ . Um das innere mitochondriale Transmembranpotential zu bestimmen, wurde den infizierten J774A.1-Makrophagen 15 min vor Versuchsende (6 h nach Infektion) der  $\Delta\Psi_m$ -spezifische Farbstoff TMRE (Tetra-methyl-rhodamine-ester, Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe) in einer Endkonzentration von 40 nM zugegeben und 15 min lang bei 37°C inkubiert.

### 2.3.2 Messung der Durchlässigkeit von Zellmembranen

Direkt nach Versuchsende wurde Propidiumiodid (PI, 50 ng/ml) (Calbiochem, Bad Soden, Germany) zugegeben, um Makrophagen mit geschädigter,

durchlässiger Zellmembran zu kennzeichnen.

### 2.3.3 Durchflusszytometrie

Die TMRE/PI-gefärbten Zellen wurden im Anschluss mithilfe des Durchflusszytometers FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) analysiert (FSC/SSC sowie FL2 (TMRE) /FL3 (PI)) und die Messungen mithilfe der Software WinMDI 2.8 (J. Trotter, The Scripps Institute, La Jolla, CA) bearbeitet und ausgewertet.

### 2.3.4 Kontrollen

#### Negativkontrollen

1. **uninfizierte Zellen mit Lysostaphin (40 µg/ml) oder Lysozym (10 mg/ml)** zum Ausschluss eines möglichen Effekts der Antibiotika auf die Zelltodrate.
2. **Silica beads** (1 µm, Kisker-Biotech, Steinfurt, Germany) wurden nach dreimaligem Waschen in PBS im Verhältnis 20:1 zu den Zellen gegeben. Diese Partikel wurden verwendet, um mögliche unspezifische, durch Phagozytose bedingte Effekte auszuschließen.

#### Positivkontrollen

1. **Zellen, die mit *S. aureus* ATCC 25923 bzw. ATCC 29213 infiziert wurden**, dienten als Positivkontrolle für apoptotische Veränderungen der Makrophagen (Baran *et al.* 2001).
2. **Staurosporin** (Stauro, 4 µM) (Sigma, Taufkirchen) ist ein von *Streptomyces staurosporeus* gewonnener Breitspektrum Proteinkinase-Inhibitor, der in Zellkulturmodellen verwendet wird, um stressinduzierte Apoptose auszulösen. Auch wenn der Mechanismus noch nicht vollends geklärt ist, konnte bei diesem Prozess eine Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und ein Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials beobachtet werden (Harkin *et al.* 1998, Feng und Kaplowitz 2001).
3. **FCCP** (Carbonyl-Cyanid-p-trifluoro-methoxy-phenylhydrazon, 100 µM) (Sigma) ist ein klassischer Entkoppler der mitochondrialen, oxidativen Phosphorylierung, die für die Energieerzeugung im eukaryontischen



Organismus eine essentielle Rolle spielt. Diese Hemmung führt zu einem raschen Zusammenbruch des inneren mitochondrialen Transmembranpotentials und einem Abfall von ATP (Kuruville *et al.* 2003). FCCP wurde 30 min vor Versuchsende zugegeben.

**4. Erhitzen auf 60°C für 10 min:** Zur Induktion des nekrotischen Zelltods wurden Zellen für 10 min bei 60°C erhitzt.

## 2.4 Mikroskopie

Zusätzlich zur durchflusszytometrischen Analyse wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der infizierten Zellkulturen nach 6 h angefertigt. Dazu wurde ein Axiovert 200 Mikroskop (20 x Objektiv) verwendet.

## 2.5 Untersuchung von Zelltodmechanismen bei Infektion mit *E. faecium*

Zur weiterführenden Analyse möglicher, zugrundeliegender Zelltodmechanismen, die durch *E. faecium* ausgelöst werden, wurden folgende Hemmstoffe bzw. Verfahren eingesetzt:

**1. zVAD-FMK** (Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-Fluoromethylketon) (zVAD, 100 µM) (Bachem, Heidelberg, Germany) ist ein Pancaspase-Inhibitor und wurde 1 h vor Infektion zu den Zellen gegeben. Damit sollte indirekt untersucht werden, ob die Aktivierung von Caspasen eine ursächliche Rolle für den durch *E. faecium* induzierten Zelltod in Makrophagen spielt.

**2. Cytochalasin D** (CytD, 2 µg/ml) (Calbiochem, Darmstadt, Germany) wurde 30 min vor Infektion zugegeben. Cytochalasin D hemmt die Polymerisierung von Aktin-Filament in Makrophagen, welche für deren Fähigkeit zur Phagozytose essenziell ist. Dieser Hemmstoff zeigte bereits in Experimenten mit verschiedenen Stämmen von *E. faecalis* eine deutliche Inhibition der Bakterienaufnahme (Baldassarri *et al.* 2004). Hiermit sollte nun indirekt geprüft werden, ob der durch *E. faecium* ausgelöste Zelltod von der Aufnahme von Bakterien abhängig ist.

**3. Rifampicin** (Rifa, 20 µg/ml) (Sigma) wurde 2.5 h nach Infektion zu den Zellen gegeben, um mögliche intrazelluläre Bakterien abzutöten und einer intrazellulären bakteriellen Replikation entgegenzuwirken. Damit sollten

zytotoxische Effekte, die von intrazellulär lokalisierten *E. faecium* ausgehen, ausgeschlossen werden.

**4. Hitze-getötete Bakterien:** Die Bakterienstämme wurden jeweils für 10 min bei 95°C erhitzt. Dadurch sollte untersucht werden, ob hitzelabile bakterielle Faktoren ursächlich für die Auslösung des Zelltods durch *E. faecium* sind.

### 2.5.1 Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration von Rifampicin mittels E-Test

Die minimale Hemmkonzentration für Rifampicin gegenüber *E. faecium* (ATCC 6057) wurde mittels eines E-Tests (Epsilometer-Test, Huang *et al.* 1992) ermittelt. Dabei wurde auf ein mit *E. faecium* beimpftes Testagar (Müller-Hinton) ein mit absteigenden Konzentrationen von Rifampicin beschichteter Teststreifen aufgebracht und nach 16 h die minimale Hemmkonzentration dort abgelesen, wo die Hemmhof-Ellipse den Teststreifen schneidet. Dieser Test wurde von Sabine Gröbner (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Tübingen) durchgeführt.

### 2.6 Verwendete Geräte

**FACSCalibur:** BD Biosciences, Heidelberg, Germany

**Photometer:** BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg

**WinMDI:** WinMDI 2.8 (J. Trotter, The Scripps Institute, La Jolla, CA)

**Mikroskop:** Axiovert 200 Mikroskop (20 x Objektiv)

### 2.7 Verwendete Reagenzien

Tab. 6: Verwendete Reagenzien.

Substanz	Endkonzentration in Zellkulturmedium	gelöst in	Firma
Lysostaphin	40 µg/ml	Ampuwa	Sigma, Taufkirchen, Germany
Lysozym	10 mg/ml	Ampuwa	Sigma, Taufkirchen, Germany
zVAD-fmk	100 µM	Ethanol	Bachem, Heidelberg, Germany
Cytochalasin D	2 µg/ml	DMSO	Sigma, Taufkirchen, Germany
TMRE	40 nM	Methanol	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Propidiumiodid	50 ng/ml	PBS	Calbiochem, Bad Soden,

Substanz	Endkonzentration in Zellkulturmedium	gelöst in	Firma
			Germany
FCCP	100 $\mu$ M	Ethanol	Sigma, Taufkirchen, Germany
Staurosporin	4 $\mu$ M	DMSO	Sigma, Taufkirchen, Germany
Rifampicin	20 $\mu$ g/ml	DMSO	Sigma, Taufkirchen, Germany
RPMI 1640 Medium			Biochrom, Berlin, Germany
Silica beads	2 x 10 <sup>7</sup> beads/ml	Aqua dest.	Kisker Biotech, Steinfurt, Germany

## 2.8 Statistik

Die Versuche wurden jeweils mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Signifikanz der Daten wurde mithilfe des Student t-Tests ermittelt. Eine Differenz von  $p < 0,05$  (\*) wurde als statistisch signifikant angesehen (\*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Zelltodinduktion durch Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken in J774A.1-Makrophagen

##### 3.1.1 Kontrollen

*S. aureus* ist in der Lage, in Monozyten, Chondrozyten, Keratinozyten, Osteoblasten, Endothelzellen und Epithelzellen programmierten Zelltod auszulösen (Ulett und Adderson 2006). Das  $\alpha$ -Toxin von *S. aureus* induziert je nach Konzentration Apoptose oder auch Nekrose in Jurkat-T-Zellen (Essmann *et al.* 2003).

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst *S. aureus* hinsichtlich seines Potentials zur Auslösung von Apoptose und Nekrose in Makrophagen untersucht werden. Dafür wurden jeweils  $5 \times 10^5$  murine Makrophagen (J774A.1) ausgesät und mit *S. aureus* ATCC 29213 bzw. ATCC 25923 in steigenden Infektionsverhältnissen (multiplicity of infection = MOI 2, 20 und 200) infiziert. Um einer Überwucherung durch die Bakterien vorzubeugen, wurde nach 2.5 h ein Antibiotikum (Lysostaphin für Staphylokokken, Lysozym in nachfolgenden Experimenten verwendet für Streptokokken und Enterokokken) zugegeben. Anschließend wurden die Ansätze für weitere 3.5 h inkubiert.

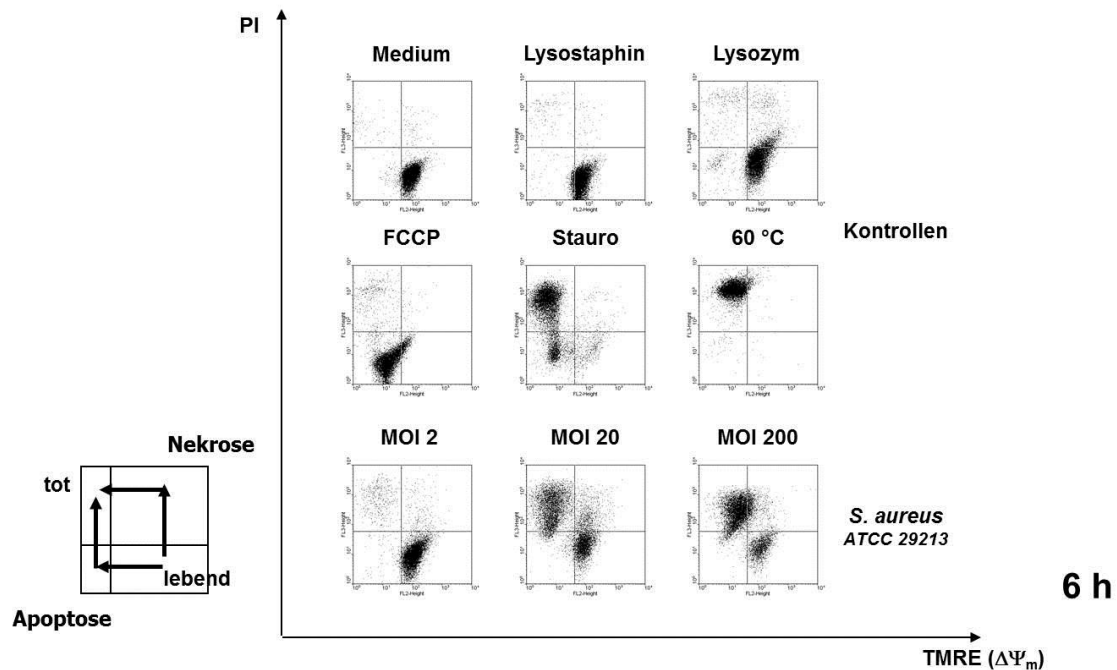
Nach Färbung der Zellen mit TMRE und Propidiumiodid (PI) wurden die Zellen 6 h nach Infektion durchflusszytometrisch analysiert, um den Anteil apoptotischer bzw. nekrotischer J774A.1 zu bestimmen. Dabei deuten PI-positive Zellen auf eine Zellmembranschädigung vereinbar mit spät-apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen. TMRE-negative Zellen mit Depolarisation des inneren mitochondrialen Transmembranpotentials  $\Delta\psi_m$  ohne Zellmembranschädigung ( $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup> Zellen) sind hingegen ein Hinweis für das Vorliegen früh-apoptotischer Zellen.

Als Negativkontrolle dienten uninfizierte J774A.1-Makrophagen in antibiotikafreiem Medium ohne bzw. nach Zugabe von Antibiotikum. Wie in Abb. 2 dargestellt, zeigten die Zellen unter alleiniger Zugabe von Lysostaphin keine erhöhte Zelltodrate (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup> Zellen) gegenüber der Mediumkontrolle (Abb. 2, erste Reihe, mittleres Bild). Auch die alleinige Zugabe von Lysozym bewirkte nur geringe Zelltodraten (unter

20%) (Abb. 2, erste Reihe, rechtes Bild).

Als Positivkontrollen dienten FCCP, Staurosporin und Zellen, die für 10 min bei 60°C erhitzt worden waren. FCCP induzierte einen Zusammenbruch des inneren mitochondrialen Transmembranpotentials bei intakter Zellmembran ( $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup> Zellen), was auf früh-apoptotische Vorgänge hindeutet (Abb. 2, zweite Reihe, linkes Bild). Staurosporin-behandelte Zellen zeigten sowohl Zeichen des früh-apoptotischen, als auch des spät-apoptotischen/nekrotischen Zelltods (überwiegend  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup>, sonst vor allem  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup> Zellen) (Abb. 2, zweite Reihe, mittleres Bild), während die Erhitzung auf 60° fast ausschließlich spät-apoptotischen/nekrotischen Zelltod auslöste ( $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup> Zellen) (Abb. 2, zweite Reihe, rechtes Bild).

Infektion von J77A.1-Makrophagen mit *S. aureus* ATCC 29213 bzw. ATCC 25923 bewirkte mit steigender MOI eine steigende Zelltodrate ( $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup>). Während sich bei MOI 2 die Zelltodrate nur unwesentlich von der Kontrolle unterschied, stieg diese bei MOI 20 auf 63,8%. Nach Infektion mit *S. aureus* MOI 200 waren nur noch 20,4% der Zellen intakt ( $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>-</sup>). Dabei zeigten sich sowohl bei MOI 20 als auch bei MOI 200 nach 6 h vor allem Zellen mit spät-apoptotischen/nekrotischen Eigenschaften ( $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup>) und nur ein sehr geringer Anteil Zellen mit  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup> oder  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup>.



**Abb. 2: Kontrollen zur Zelltodinduktion in J774A.1-Makrophagen.**

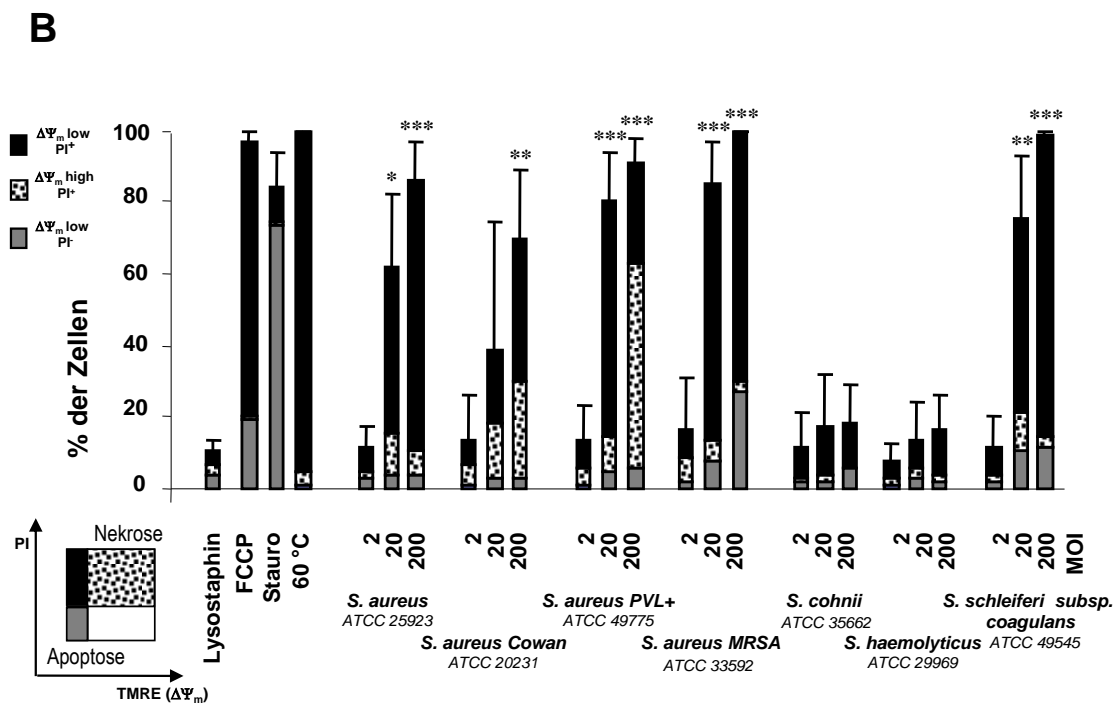
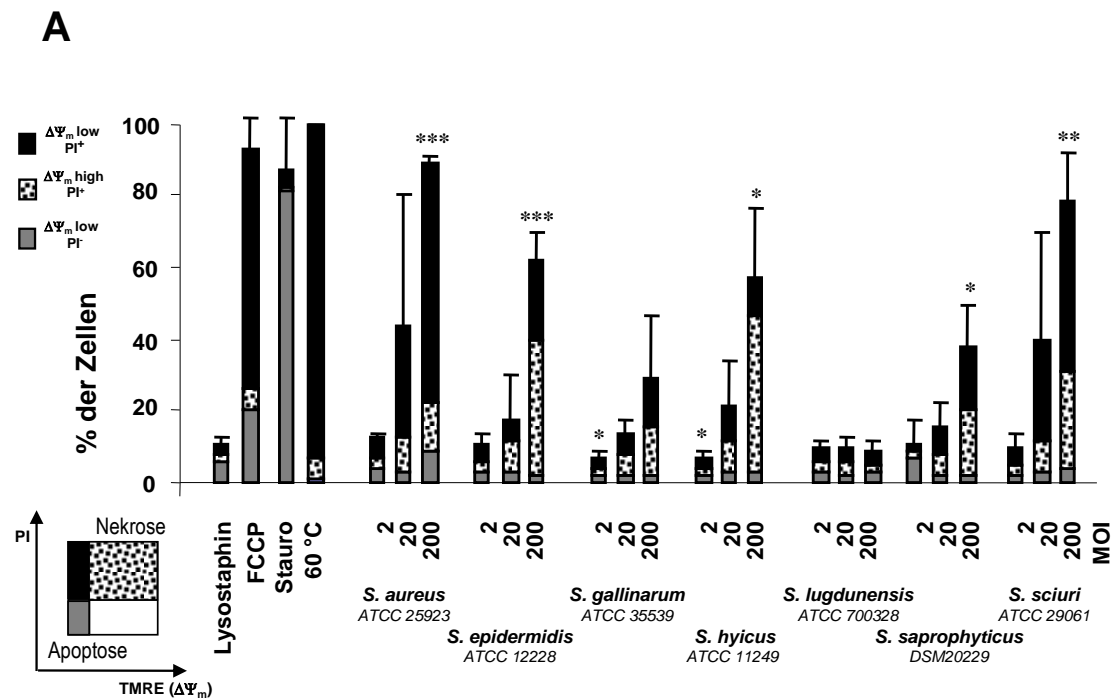
Mittels Durchflusszytometrie wurden die Makrophagen nach 6h auf ihre apoptotischen bzw. nekrotischen Eigenschaften untersucht. Als Negativkontrollen dienten Makrophagen in Medium oder in Medium mit Lysostaphin (LS, 40 µg/ml) bzw. Lysozym (LZ, 10 mg/ml), als Positivkontrollen Zellen behandelt mit FCCP (100 µM), Staurosporin (4 µM), sowie für 10 min auf 60°C erhitzte Zellen. Eine weitere Positivkontrolle stellten Makrophagen infiziert mit *S. aureus* ATCC 29213 in verschiedenen Infektionsverhältnissen (MOI 2, 20 und 200) dar. 2.5 h nach Infektion wurden die extrazellulären Bakterien durch die Zugabe von Lysostaphin (LS, 40 µg/ml) abgetötet und für weitere 3.5 h inkubiert. 6 h nach Infektion wurden die mit TMRE (40 nM) und Propidiumiodid (PI, 50 ng/ml) angefärbten Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für insgesamt 3 unabhängige Experimente.

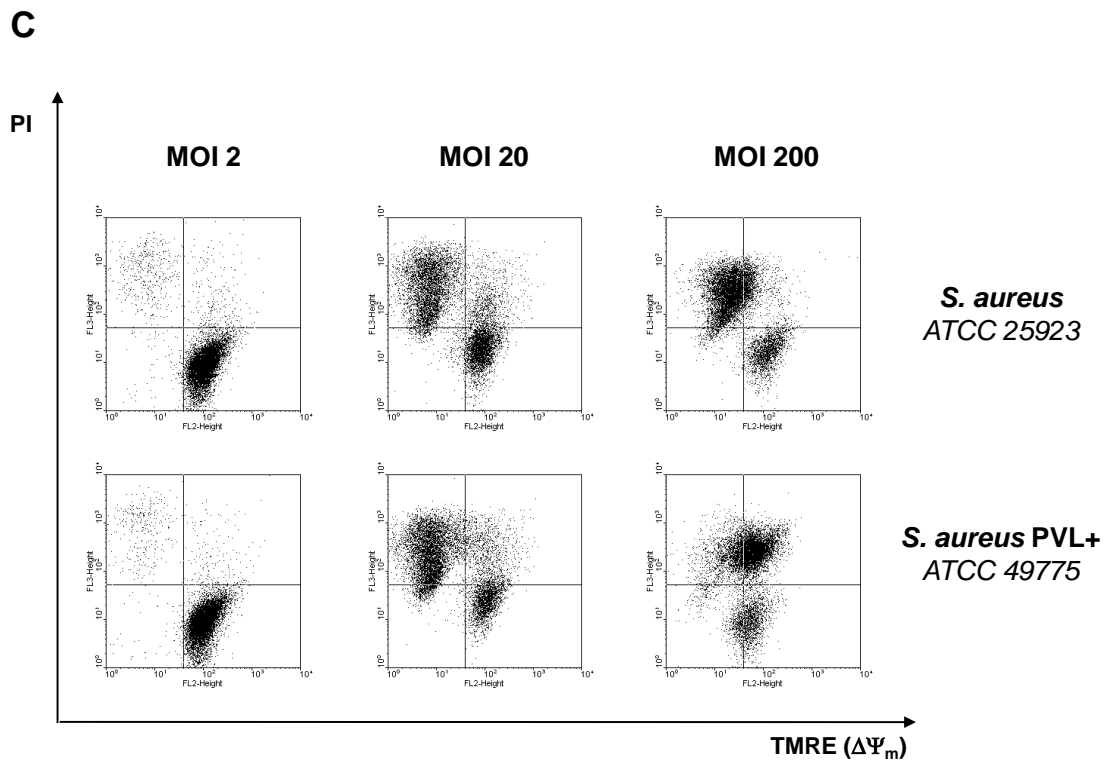
### 3.1.2 Staphylokokken induzieren Zelltod in J774A.1-Makrophagen

Über die zytotoxischen Eigenschaften von Staphylokokken ist abgesehen von *S. aureus* bislang wenig bekannt. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst eine Reihe verschiedener Staphylokokkenstämme auf deren Fähigkeit zur Zelltodinduktion in J774A.1-Makrophagen untersucht. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit *S. aureus* ATCC 25923 infiziert wurden. Lysostaphin wurde eingesetzt, um nach 2,5-stündiger Infektion extrazelluläre Bakterien abzutöten.

Die Wirksamkeit von Lysostaphin *S. aureus* ATCC 25923 abzutöten war 100% bei Inkubation von  $1 \times 10^7$  Bakterien (Äquivalent für MOI 20 für die Infektion von  $5 \times 10^5$  Zellen) für 6 h in Lysostaphin-haltigem (40 µg/ml) J774A.1-Medium. Dies wurde durch das Ausplattieren einer Verdünnungsreihe auf Agarplatten

und anschließender Auszählung der CFU (colony forming units) ermittelt.





**Abb. 3: Zelltodinduktion durch Staphylokokken in J774A.1-Makrophagen.**

J774A.1-Makrophagen wurden mit verschiedenen Staphylokokken (MOI 2, 20, 200) infiziert. 2.5 h nach Infektion wurden extrazelluläre Bakterien durch die Zugabe von Lysostaphin (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) abgetötet und für weitere 3.5 h inkubiert. 6 h nach Infektion wurden die Zellen mit TMRE (40 nM) und Propidiumiodid (PI, 50 ng/ml) angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert (vgl. Abb. 2, S. 38). Als Kontrollen wurden Lysostaphin-, FCCP- (100  $\mu\text{M}$ ) und Staurosporin- (4  $\mu\text{M}$ )-behandelte Zellen benutzt, sowie Zellen, die für 10 min auf 60  $^{\circ}\text{C}$  erhitzt worden waren. Die in (A) und (B) gezeigten Daten sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten. Die in (C) dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für insgesamt 3 Experimente. Signifikante Unterschiede zwischen den mit Staphylokokken infizierten Makrophagen und der Mediumkontrolle mit Lysostaphin wurden wie folgt dargestellt: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ .

Während uninfizierte, Lysostaphin-behandelte J774A.1-Makrophagen nach 6-stündiger Inkubation nur eine Schädigungsrate (Summe der  $\Delta\Psi_m$  low/ $\text{PI}^-$ ,  $\Delta\Psi_m$  high/ $\text{PI}^+$  und  $\Delta\Psi_m$  low/ $\text{PI}^+$  Zellen) von 11,2% (Abb. 3A) bzw. 10,7% (Abb. 3B) aufwiesen, bewirkte die Infektion mit Staphylokokken bei den meisten Arten einen deutlichen Anstieg geschädigter Zellen.

Bei MOI 2 lag die Schädigungsrate etwa auf dem Niveau uninfizierter Zellen mit maximal 12,5% (*S. aureus* ATCC 25923, Abb. 3A) bzw. 16,4% (*S. aureus* MRSA, Abb. 3B), während der überwiegende Anteil der J774A.1 intakt war ( $\Delta\Psi_m$  high/ $\text{PI}^-$ ).

Im Gegensatz dazu waren bei MOI 20 neben intakten Zellen vor allem Zellen



mit spät-apoptotischen/nekrotischen Zeichen ( $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup>) zu detektieren. Bei *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* PVL+, *S. aureus* MRSA und *S. schleiferi* subsp. *coagulans* zeigten sich bereits bei diesem Infektionsverhältnis signifikant erhöhte Zelltodraten (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup> Zellen) von 61,6% (*S. aureus* ATCC 25923, Abb. 3B) bis 85,1% (*S. aureus* MRSA, Abb. 3B). Durch Steigerung der MOI auf 200 wurde der Anteil geschädigter Zellen (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup> Zellen) bei diesen Staphylokokkenarten noch weiter erhöht (86,2% *S. aureus* ATCC 25923, 99,8% *S. aureus* MRSA, Abb. 3B).

Der zytotoxische Effekt anderer Staphylokokkenarten wie *S. epidermidis*, *S. hyicus* und *S. aureus* Cowan war bei MOI 200 nur mäßig ausgeprägt mit Zelltodraten (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup> Zellen) von 50-75%, nach Infektion mit *S. saprophyticus* bzw. *S. gallinarum* waren lediglich 25-50% der Zellen von dieser Art von Schädigung betroffen.

Nach Infektion mit *S. cohnii*, *S. haemolyticus* und *S. lugdunensis* war die Zelltodrate verglichen mit uninfizierten Zellen nur geringfügig erhöht. Dies deutet darauf hin, dass diese Staphylokokkenarten keinen Zelltod in J774A.1-Makrophagen induzieren.

Die höchsten Schädigungsraten (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup> Zellen) wurden bei *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* PVL+, *S. aureus* MRSA, *S. schleiferi* und *S. sciuri* gemessen mit über 75% geschädigten Zellen.

Die mit verschiedenen *S. aureus*-Stämmen infizierten J774A.1-Makrophagen zeigten bei MOI 200 alle Schädigungsraten von mindestens 70%.

Die unterschiedlichen Zelltodraten (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup> Zellen), die nach Infektion mit verschiedenen Staphylokokkenstämmen im Infektionsverhältnis 200:1 durchflusszytometrisch ermittelt wurden, sind in Tabelle 7 nochmals zusammenfassend dargestellt.

Tab. 7: Zelltodrate (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI $^-$ ,  $\Delta\psi_m$  high/PI $^+$  und  $\Delta\psi_m$  low/PI $^+$  Zellen) bei Staphylokokkenstämmen (MOI 200).

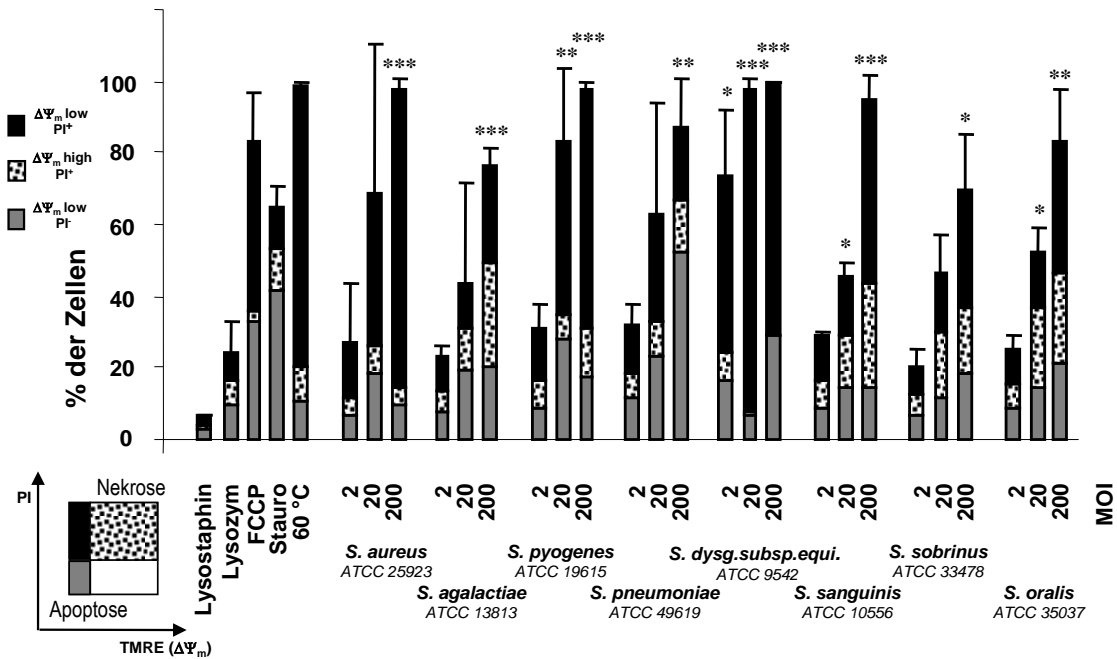
Zelltodrate	> 75%	<75%, >50%	< 50%, >25%	<25%
<b>Staphylokokkenstämmen</b>	<i>S. aureus</i> <i>S. aureus</i> PVL+ <i>S. aureus</i> MRSA <i>S. schleiferi</i> <i>S. sciuri</i>	<i>S. epidermidis</i> <i>S. hyicus</i> <i>S. aureus</i> Cowan	<i>S. saprophyticus</i> <i>S. gallinarum</i>	<i>S. lugdunensis</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. cohnii</i>

Während bei den stark zytotoxischen Stämmen wie *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* MRSA und *S. schleiferi subsp. coagulans* bei der MOI 200 der Großteil der geschädigten (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI $^-$ ,  $\Delta\psi_m$  high/PI $^+$  und  $\Delta\psi_m$  low/PI $^+$  Zellen) Makrophagen spät-apoptotische/nekrotische Zeichen zeigte ( $\Delta\psi_m$  low/PI $^+$ , Abb. 3B und 3C: obere Reihe, rechtes Bild), fiel bei den durch *S. aureus* PVL+ geschädigten Zellen auf, dass der größte Anteil (56,9% bei insgesamt 85,4% geschädigten Zellen) eine durchlässige Zellmembran bei intaktem inneren mitochondrialen Transmembranpotential ( $\Delta\psi_m$  high/PI $^+$ ) aufwies (Abb. 3B und 3C: untere Reihe, rechtes Bild). Im Gegensatz dazu zeigten nach Infektion mit *S. aureus* PVL+ (MOI 20) die meisten geschädigten Makrophagen (60,3% bei insgesamt 79,2% geschädigten Zellen) spät-apoptotische/nekrotische Zeichen ( $\Delta\psi_m$  low/PI $^+$ ) (Abb. 3C: untere Reihe, mittleres Bild). Ein ähnliches Phänomen konnte in einer schwächeren Ausprägung auch bei *S. epidermidis* und *S. hyicus* beobachtet werden (Abb. 3A).

### 3.1.3 Streptokokken induzieren Zelltod in J774A.1-Makrophagen

Für *S. agalactiae*, *S. pneumoniae* und *S. pyogenes* ist die Fähigkeit zur Zelltodinduktion in Makrophagen beschrieben (Ulett und Adderson 2006, Timmer *et al.* 2009). Für viele andere Streptokokkenstämmen ist diese Eigenschaft nicht untersucht. Deswegen wurden in der vorliegenden Arbeit Infektionsexperimente mit Makrophagen und verschiedenen Streptokokkenstämmen durchgeführt. *S. aureus* ATCC 25923 wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Während uninfizierte, Lysozym-behandelte Makrophagen nach 6-stündiger Inkubation eine Schädigungsrate (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI $^-$ ,  $\Delta\psi_m$  high/PI $^+$  und  $\Delta\psi_m$  low/PI $^+$  Zellen) von nur 23,8% aufwiesen,

bewirkte die Infektion mit Streptokokken bei einer MOI von 20 oder 200 einen deutlichen Anstieg geschädigter (d. h. apoptotischer bzw. nekrotischer) Zellen (Abb. 4).



**Abb. 4: Zelltodinduktion durch Streptokokken in J774A.1-Makrophagen.**

J774A.1-Makrophagen wurden mit verschiedenen Streptokokken-Stämmen bzw. *S. aureus* ATCC 25923 (MOI 2, 20, 200) infiziert. 2.5 h nach Infektion wurden extrazelluläre Bakterien durch die Zugabe von Lysozym (LZ, 10 mg/ml) oder Lysostaphin (LS, 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) abgetötet und für weitere 3.5 h inkubiert. 6 h nach Infektion wurden die Zellen mit TMRE (40 nM) und Propidiumiodid (PI, 50 ng/ml) angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert (vgl. Abb. 2, S. 38). Als Kontrollen wurden Lysostaphin-, Lysozym-, FCCP- (100  $\mu\text{M}$ ) und Staurosporin- (4  $\mu\text{M}$ )-behandelte Zellen benutzt, sowie Zellen, die für 10 min auf 60 °C erhitzt worden waren. Die gezeigten Daten sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede zwischen den mit *S. aureus* bzw. mit verschiedenen Streptokokken infizierten Makrophagen und der Mediumkontrolle mit Lysostaphin bzw. Lysozym wurden wie folgt dargestellt: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ .

Bei MOI 2 lag die Rate der geschädigten Zellen mit Ausnahme von *S. dysgalactiae subsp. equisimilis* (SDSE) bei allen untersuchten Stämmen etwa auf dem Kontrollniveau uninfizierter Makrophagen mit Lysozym mit maximalen Zelltodraten (Summe der  $\Delta\Psi_m^{\text{low}}/\text{PI}^-$ ,  $\Delta\Psi_m^{\text{high}}/\text{PI}^+$  und  $\Delta\Psi_m^{\text{low}}/\text{PI}^+$  Zellen) von 32,1% (*S. pneumoniae*).

Lediglich die Zelltodraten nach Infektion mit SDSE lagen mit durchschnittlich 74,0% deutlich über denen der übrigen Stämme. Der Hauptteil der geschädigten Makrophagen zeigte in diesem Fall spät-apoptotische/nekrotische ( $\Delta\Psi_m^{\text{low}}/\text{PI}^+$ ) und ein kleinerer Anteil früh-apoptotische Zeichen ( $\Delta\Psi_m^{\text{low}}/\text{PI}^-$ ).

Bei MOI 20 war bei allen Stämmen ein deutlicher Anstieg der Zelltodrate zu verzeichnen. Anders als bei den Staphylokokken waren die geschädigten Makrophagen dabei nicht überwiegend spät-apoptotisch/nekrotisch, sondern setzten sich in einem Großteil der Fälle relativ gleichmäßig aus  $\Delta\psi_m$  low/PI $^-$ ,  $\Delta\psi_m$  high/PI $^+$  und  $\Delta\psi_m$  low/PI $^+$  Zellen zusammen. Dabei lagen die Gesamtzelltodraten zwischen 43,6% (*S. agalactiae*) und 97,8% (*SDSE*). *SDSE* bildete auch hier wieder eine Ausnahme mit fast ausschließlich spät-apoptotischen/nekrotischen Zellen und bei einer weiteren Steigerung auf MOI 200 waren bei diesem Erreger mit 99,9% nahezu alle J774A.1 zerstört. Der zytotoxische Effekt von *S. pyogenes* bzw. *S. sanguinis* bei MOI 200 war ähnlich hoch ausgeprägt mit weniger als 10% intakten Zellen. *S. pneumoniae* und *S. oralis* bewirkten ebenfalls hohe Zelltodraten (> 80% geschädigte Makrophagen), während nach Infektion mit *S. agalactiae* bzw. *S. sobrinus* niedrigere Zelltodraten zu verzeichnen waren (76,8% bzw. 69,5%).

Im Vergleich zu den Staphylokokken wurden bei den Streptokokken bei allen Infektionsverhältnissen auffallend große Anteile früh-apoptotischer Zellen gemessen, bei denen lediglich ein Zusammenbruch des mitochondrialen Potentials vorlag, die Zellmembran jedoch intakt war ( $\Delta\psi_m$  low/PI $^-$ ). Bei Infektion mit *S. pneumoniae* bei MOI 200 galt dies für mehr als die Hälfte der geschädigten Makrophagen.

Eine Übersicht über die unterschiedlichen Zelltodraten, die nach Infektion mit verschiedenen Streptokokkenstämmen im Infektionsverhältnis 200:1 durchflusszytometrisch ermittelt wurden, gibt Tabelle 8.

Tab. 8: Zelltodrate (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI $^-$ ,  $\Delta\psi_m$  high/PI $^+$  und  $\Delta\psi_m$  low/PI $^+$  Zellen) bei Streptokokkenstämmen (MOI 200).

Zelltodrate	> 90%	<90%, >80%	< 80%, >70%	<70%, >60%
<b>Streptokokkenstämme</b>	<i>S. pyogenes</i> <i>S. dysg. subsp. equ.</i> <i>S. sanguinis</i>	<i>S. pneumoniae</i> <i>S. oralis</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. sobrinus</i>

Die untersuchten Streptokokken zeigten insgesamt ein relativ homogenes Bild bezüglich ihrer Fähigkeit, im Beisein von Lysozym Zelltod in Makrophagen auszulösen. Bei MOI 2 lag die Zelltodrate bei den meisten der untersuchten

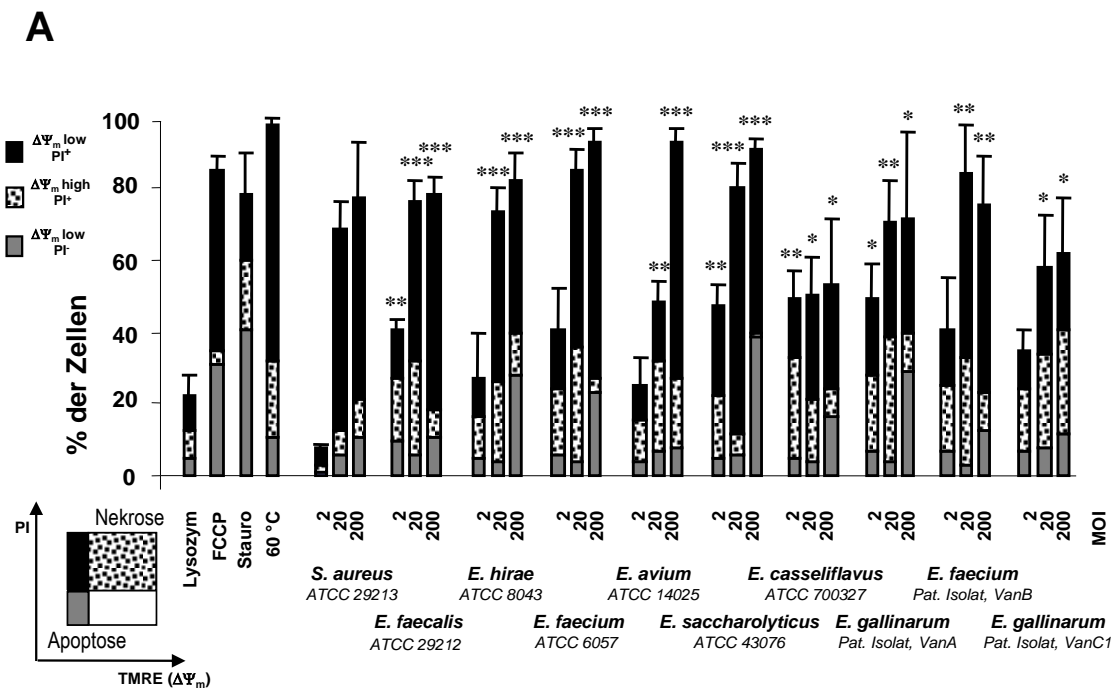
Streptokokkenarten ähnlich wie bei den Staphylokokkenarten etwa auf dem Niveau uninfizierter Zellen. Im Gegensatz zu den Staphylokokken gab es unter den untersuchten Streptokokkenstämmen bei MOI 200 jedoch keine Stämme, die im Vergleich zur Kontrolle keine erhöhte Rate an geschädigten Makrophagen zeigten.

### 3.1.4 Enterokokken induzieren Zelltod in J774A.1-Makrophagen

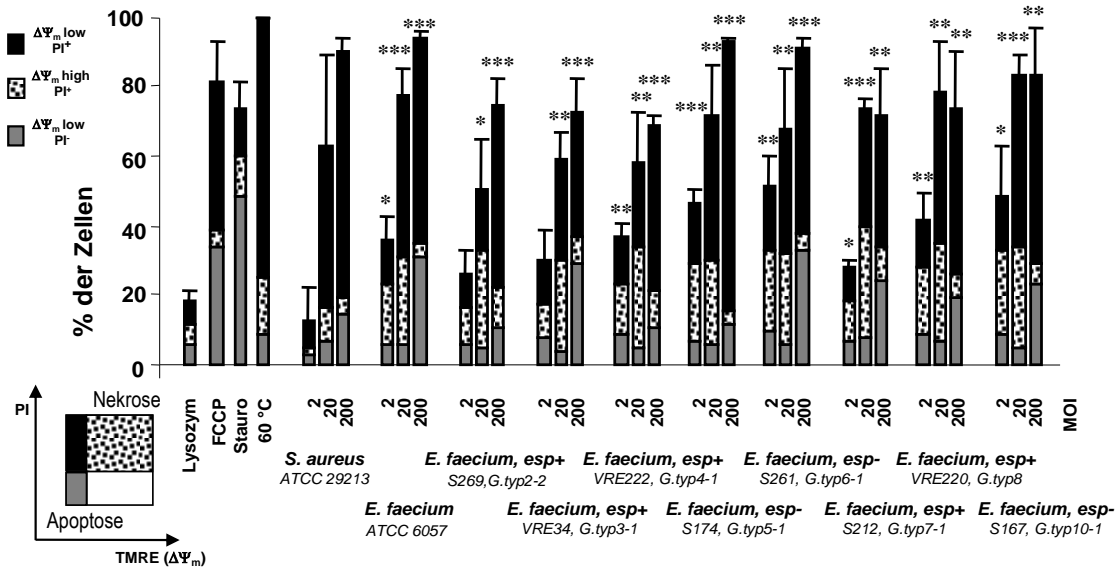
Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass in Makrophagen sowohl durch lebende *E. faecalis*-Stämme als auch nur durch den Überstand von hämolysinproduzierenden *E. faecalis* Zelltod ausgelöst werden konnte (Miyazaki *et al.* 1993, Kirschnek *et al.* 2004).

Um die zelltod-induzierenden Eigenschaften von anderen Enterokokkenstämmen und dabei speziell von *E. faecium* zu untersuchen, wurden Makrophagen zunächst mit verschiedenen Enterokokkenstämmen und danach mit einer Gruppe von unterschiedlichen *E. faecium*-Stämmen infiziert und anschließend analysiert und verglichen.

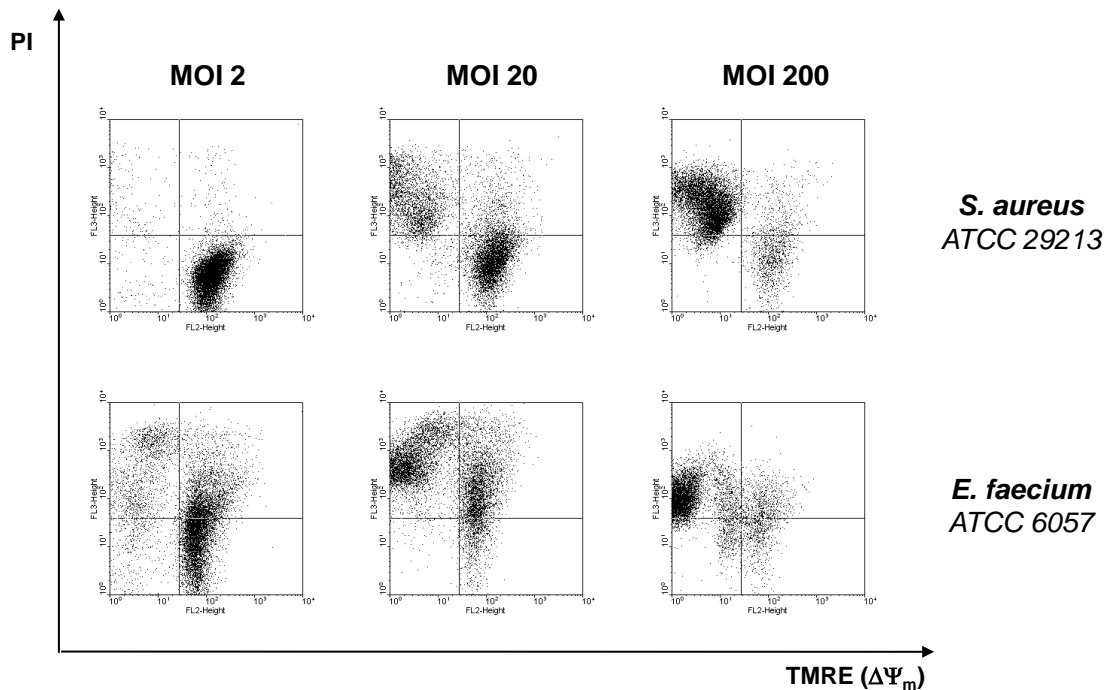
Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit *S. aureus* ATCC 29213 infiziert worden waren.



**B**



**C**



**Abb. 5: Zelltodinduktion durch Enterokokken in J774A.1-Makrophagen.**

J774A.1-Makrophagen wurden mit verschiedenen Enterokokken-Stämmen/-Isolaten bzw. *S. aureus* ATCC 29213 (MOI 2, 20, 200) infiziert. 2.5 h nach Infektion wurden extrazelluläre Bakterien durch die Zugabe von Lysozym (10 mg/ml) oder Lysostaphin (40  $\mu$ g/ml) abgetötet und für weitere 3.5 h inkubiert. 6 h nach Infektion wurden die Zellen mit TMRE (40nM) und Propidiumiodid (PI, 50 ng/ml) angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert (vgl. Abb. 2, S. 38). Als Kontrollen wurden Lysostaphin-, Lysozym-, FCCP- (100  $\mu$ M) und Staurosporin- (Stauro, 4  $\mu$ M)-behandelte Zellen benutzt, sowie Zellen, die für 10 min auf 60 °C erhitzt worden

waren. Die in (A) und (B) gezeigten Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten. Die in (C) dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für insgesamt 3 Experimente. Signifikante Unterschiede zwischen den mit Enterokokken infizierten Makrophagen und der Mediumkontrolle mit Lysozym wurden wie folgt dargestellt: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ .

Nach 2.5 h wurden extrazelluläre Enterokokken durch die Zugabe von Lysozym getötet.

Die Wirksamkeit von Lysozym *E. faecium* (ATCC 6057) abzutöten betrug 100% nach Inkubation von  $1 \times 10^7$  Bakterien (Äquivalent für MOI 20 für die Infektion von  $5 \times 10^5$  Zellen) für 2, 4 und 6 h in Lysozym-haltigem (10 mg/ml) J774A.1-Medium. Dies wurde durch das Ausplattieren einer Verdünnungsreihe auf Agarplatten und anschließender Auszählung der CFU (colony forming units) ermittelt. Diese Untersuchungen wurden von Sabine Gröbner (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Tübingen) durchgeführt.

Während uninfizierte, Lysozym-behandelte Makrophagen nach 6-stündiger Inkubation eine Zelltodrate (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup> Zellen) von 22,7% (Abb. 5A) bzw. 17,9% (Abb. 5B) aufwiesen, bewirkte die Infektion mit Enterokokken schon ab einer MOI 2 mindestens einen leichten und ab MOI 20 einen signifikanten Anstieg der geschädigten Zellen (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup> Zellen) bei allen untersuchten Stämmen.

Bereits bei der niedrigen MOI 2 konnte bei einer Mehrheit der untersuchten Enterokokkenstämme eine gesteigerte Zelltodrate (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup> Zellen) beobachtet werden. Diese lag, anders als bei der Versuchsreihe mit den Streptokokken, bei den meisten Stämmen mit 30-50% deutlich über dem Kontrollniveau von uninfizierten Zellen in Medium mit Lysozym (22,7%, Abb. 5A). Eine Ausnahme bildeten *E. hirae* und *E. avium* mit einer Zelltodrate von nur 27,0% bzw. 25,5%. Insgesamt wurden dabei überwiegend Makrophagen mit geschädigter, durchlässiger Zellmembran, aber noch intaktem inneren mitochondrialen Transmembranpotential ( $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup>) detektiert. Zusätzlich traten geschädigte Zellen mit klassischen spät-apoptotischen/nekrotischen Zeichen ( $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup>) auf, während der Anteil früh-apoptotischer Makrophagen ( $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>) nur sehr gering war.

Bei MOI 20 traten bei allen Erregern Zelltoderaten (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup> Zellen) zwischen 48,8% (*E. avium*) und 84,7% (*E. faecium* ATCC 6057) auf. Dabei zeigten die betroffenen Zellen nun mehrheitlich klassische spät-apoptotische/nekrotische Zeichen ( $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup>).

Bei Steigerung der MOI auf 200 wies *E. faecium* ATCC 6057 gemeinsam mit *E. avium* und *E. saccharolyticus* die höchsten Zelltoderaten (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup> Zellen) von über 90% auf.

Der zytotoxische Effekt von *E. hirae* war etwas niedriger ausgeprägt mit 82,6% geschädigten Zellen (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup> Zellen). Nach Infektion mit *E. faecalis*, *E. gallinarum* VanA und *E. faecium* VanB waren weniger als 80% geschädigte Makrophagen zu detektieren, nach Infektion mit *E. gallinarum* VanC nur 61,5%. *E. casseliflavus* zeigte die niedrigste Zelltoderate mit 53,5%.

Bei den meisten der untersuchten Enterokokkenstämme bzw. -isolate bildeten die spät-apoptotischen/nekrotischen Zellen ( $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup>) die größte Fraktion, gefolgt von einem 10-30%igen Anteil an Zellen mit isolierter Membranschädigung ( $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup>).

Mehrere Enterokokkenstämme bzw. -isolate (*E. hirae*, *E. faecium* ATCC 6057, *E. saccharolyticus*, *E. casseliflavus* und *E. gallinarum* VanA) fielen bei MOI 200 im Vergleich zu MOI 20 durch einen deutlich gesteigerten Anteil früh-apoptotischer Zellen ( $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>) auf.

*E. saccharolyticus* zeigte im Vergleich zu den anderen Stämmen bei MOI 20 einen geringen Anteil Makrophagen mit isolierter Membranschädigung ( $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup>), dafür aber eine auffallend hohe Rate an spät-apoptotischen/nekrotischen Zellen ( $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup>).

Die unterschiedlichen Zelltoderaten, die nach Infektion mit verschiedenen Enterokokkenstämmen im Infektionsverhältnis 200:1 durchflusszytometrisch ermittelt wurden, sind in Tabelle 9 nochmals zusammenfassend dargestellt.



Tab. 9: Zelltodrate (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI $^-$ ,  $\Delta\psi_m$  high/PI $^+$  und  $\Delta\psi_m$  low/PI $^+$  Zellen) bei Enterokokkenstämmen (MOI 200).

Zelltodrate	> 90%	<90%, >80%	< 80%, >70%	<70%, >50%
<b>Enterokokkenstämme</b>	<i>E. faecium</i> <i>E. avium</i> <i>E. saccharolyticus</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. gallinarum VanA</i> <i>E. faecium VanB</i>	<i>E. gallinarum VanC1</i> <i>E. casseliflavus</i>

Auch beim Vergleich verschiedener Stämme bzw. Isolate von *E. faecium* stellten die intakten Zellen ( $\Delta\psi_m$  high/PI $^-$ ) bei MOI 2 noch die größte Fraktion dar, jedoch konnte auch hier eine erhöhte Zelltodrate von 26,5% (*E. faecium* S269) bis 51,2% (*E. faecium* S261) gegenüber der Mediumkontrolle mit Lysozym (17,9%) gemessen werden. Die geschädigten Makrophagen mit undichter Zellmembran, aber noch intaktem mitochondrialen Transmembranpotential ( $\Delta\psi_m$  high/PI $^+$ ) überwogen dabei leicht gegenüber Zellen mit klassischen spät-apoptotischen/nekrotischen Zeichen ( $\Delta\psi_m$  low/PI $^+$ ). Bei MOI 20 stieg die Fraktion der geschädigten Zellen auf mindestens 50,7% (*E. faecium* S269), bei *E. faecium* S167 waren hier bereits 83,7% der Makrophagen zerstört, wobei diese zum großen Teil etwa ausgeglichen hohe Anteile von  $\Delta\psi_m$  high/PI $^+$  und  $\Delta\psi_m$  low/PI $^+$  Eigenschaften zeigten.

Im Gegensatz dazu überwogen bei MOI 200 deutlich die Zellen mit spät-apoptotischen/nekrotischen Eigenschaften ( $\Delta\psi_m$  low/PI $^+$ ). Außerdem war bei allen Stämmen ein relativer hoher Anteil an Zellen mit intakter Zellmembran aber depolarisiertem inneren mitochondrialen Transmembranpotential ( $\Delta\psi_m$  low/PI $^-$ ) zu verzeichnen, was auf früh-apoptotische Vorgänge hindeutet. Die insgesamt höchsten Zelltodraten (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI $^-$ ,  $\Delta\psi_m$  high/PI $^+$  und  $\Delta\psi_m$  low/PI $^+$  Zellen) zeigten *E. faecium* ATCC 6057 und die beiden Esp-negativen Stämme *E. faecium* S174 und *E. faecium* S261 mit über 90% zerstörten Zellen, gefolgt von dem ebenfalls Esp-negativen *E. faecium* S167 (>80%). Bei allen Esp-positiven Stämmen (*E. faecium* S269, VRE34, S212, S220 und VRE222) waren weniger als 80% der Makrophagen geschädigt. Auffallend war außerdem, dass die beiden *E. faecium*-Stämme, die während des Ausbruchs am Universitätsklinikum Tübingen im Rahmen von schwierigen Verläufen am häufigsten detektiert worden waren (*E. faecium* VRE34 (*Genotyp*

2-2) und *E. faecium* S269 (Genotyp 3-1)) zusammen mit *E. faecium* VRE222 (Genotyp 4-1), *E. faecium* S212 (Genotyp 7-1) und *E. faecium* VRE 220 (Genotyp 8) die niedrigsten Zelltodraten zeigten. Eine Übersicht über die Zelltodraten dieser Versuche im Infektionsverhältnis 200:1 gibt Tabelle 10.

Tab. 10: Zelltodrate (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup> Zellen) bei verschiedenen Stämmen von *E. faecium* (MOI 200).

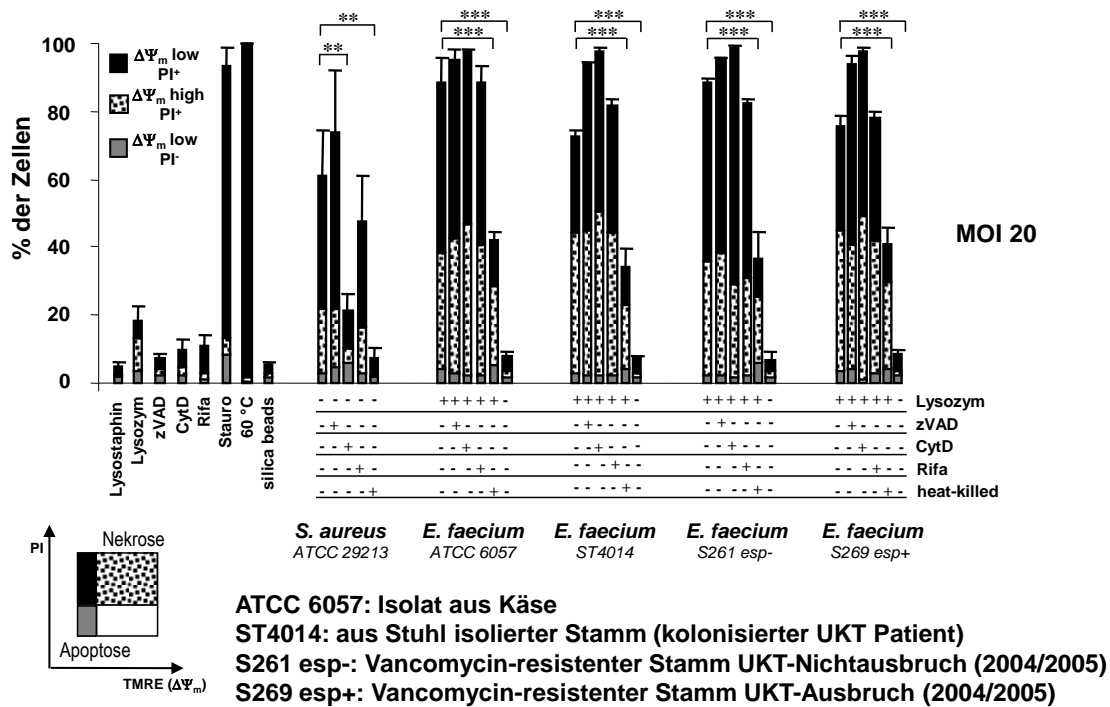
Zelltodrate	>90%	<90%, >80%	<80%, >70%	<70%, >60%
<b><i>E. faecium</i>- Stamm/ Isolat</b>	ATCC 6057 Genotyp 5-1 (S174), esp- Genotyp 6-1 (S261), esp-	Genotyp 10-1 (S167), esp-	Genotyp 2-2 (S269), esp+ Genotyp 3-1 (VRE34), esp+ Genotyp 7-1 (S212), esp+ Genotyp 8 (VRE220), esp+	Genotyp 4-1 (VRE222), esp+

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass Enterokokken im Beisein von Lysozym unabhängig von ihrer Spezies Zelltod zu einem ähnlichen Ausmaß induzierten. Ein erhöhter Anteil geschädigter Makrophagen war schon bei einer niedrigen MOI 2 zu beobachten und nahm mit steigendem Infektionsverhältnis zu. Dabei überwog bei niedriger MOI der Anteil Makrophagen mit undichter Zellmembran, aber intaktem inneren mitochondrialen Transmembranpotential, was auf eine Zerstörung der Zellmembran und eine direkte Interaktion der Enterokokken mit der Zellmembranen hindeutet. Dies steht im Gegensatz zu den mit *S. aureus* infizierten Zellen, welche schon bei MOI 2 überwiegend die klassischen spät-apoptotischen/nekrotischen Zeichen zeigten (Abb. 5C).

### 3.2 Mechanismen des durch *E. faecium* ausgelösten Zelltods

*S. aureus* bewirkt sowohl über caspasenabhängige als auch caspasenunabhängige Wege Zelltod (Essmann *et al.* 2003). Für *E. faecium* sind bislang keine Mechanismen beschrieben.

Um zu untersuchen, ob die Aktivierung von Caspasen auch bei der Zelltodinduktion durch *E. faecium* eine Rolle spielt, wurden die J774A.1-Makrophagen 1 h mit dem Pancaspaseninhibitor zVAD-fmk vorinkubiert, um eine Caspasenaktivierung nach Infektion mit *S. aureus* und ausgewählten Stämmen von *E. faecium* zu verhindern.



**Abb. 6: Vorinkubation von J774A.1-Makrophagen mit verschiedenen Hemmstoffen vor Infektion mit *E. faecium*.**

J774A.1-Makrophagen wurden mit zVAD-fmk (zVAD, 100 µM) oder Cytochalasin D (CytD, 2 µg/ml) eine Stunde lang inkubiert und dann mit verschiedenen Stämmen von *E. faecium* oder *S. aureus* ATCC 29213 (MOI 20) infiziert. 2.5 h nach Infektion wurden die Bakterien durch Zugabe von Lysozym (LZ, 10 mg/ml), Rifampicin (Rifa, 20 µg/ml) oder Lysostaphin (LS, 40 µg/ml, bei allen Versuchen mit *S. aureus*) abgetötet bzw. nicht abgetötet und für weitere 3.5 h inkubiert. 6 h nach Infektion wurden die Zellen mit TMRE und Propidiumiodid (PI) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert (vgl. Abb. 2, S. 38). Als Kontrollen dienten uninfizierte Zellen, sowie Zellen, die mit Lysozym (LZ), Lysostaphin (LS), zVAD-fmk, Cytochalasin D, Rifampicin und Staurosporin (Stauro, 4 µM) behandelt worden waren, außerdem für 10 min bei 60°C erhitzte Zellen und Zellen, die mit silica-beads (1 µm, MOI 20) inkubiert worden waren. Bei den gezeigten Daten handelt es sich um Mittelwerte +/- Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Bedingungen wurden wie folgt dargestellt: \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,005.

Wie in Abb. 6 gezeigt, bewirkte die Vorinkubation der Makrophagen mit zVAD-fmk keine Inhibition der Zelltodinduktion durch *S. aureus* bzw. durch *E. faecium*. Dies deutet darauf hin, dass der durch Caspasen aktivierte klassische apoptotische Zelltod in Makrophagen weder bei *E. faecium* noch bei *S. aureus* eine Rolle spielte.

Die Ansätze der mit *S. aureus* ATCC 29213 infizierten Makrophagen, bei denen durch die Präinkubation der Zellen mit Cytochalasin D die Bakterienaufnahme gehemmt wurde, reduzierte die Zelltodrate (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup> Zellen) von 60,6% auf 21,3%. Auch die Zellen, die 2.5

h nach Infektion mit *S. aureus* mit dem intrazellulär aktiven Rifampicin behandelt wurden, um die intrazelluläre Replikation zu hemmen, zeigten einen verringerten Prozentsatz geschädigter Zellen (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup> Zellen) von 60,6% auf 47,7%.

Im Gegensatz dazu konnte die Zelltodrate (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup> Zellen) bei den *E. faecium*-Stämmen durch Zugabe von Cytochalasin D im Beisein von Lysozym nicht gesenkt werden. Auch der Zusatz von Rifampicin reduzierte die Anzahl geschädigter Zellen (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup> Zellen) nicht, obwohl es in einer Konzentration eingesetzt wurde, die dem 10-fachen der minimalen Hemmkonzentration entspricht. Demzufolge ist davon auszugehen, dass weder die Bakterienaufnahme noch die intrazelluläre Replikation von *E. faecium* zur Zelltodinduktion durch diesen Erreger beiträgt.

Allerdings nahm der Prozentsatz toter Zellen (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup> Zellen) bei allen vier *E. faecium*- Stämmen um ca. die Hälfte ab, wenn die Makrophagen im Beisein von Lysozym mit hitze-getöteten Enterokokken infiziert wurden. Bei *E. faecium* ATCC 6057 reduzierten sich die geschädigten Zellen (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup> Zellen) beispielsweise von 88,0% auf 41,8%.

Zellen, die mit den ausgewählten Stämmen von *E. faecium* infiziert worden waren, bei denen nach 2.5 h jedoch kein Lysozym zugegeben wurde, wiesen nach 6-stündiger Infektion sehr geringe Zelltodraten (< 8,3%, *E. faecium* S269, Abb.6) auf. Diese entsprachen ungefähr den Zelltodraten (Summe der  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup> Zellen) uninfizierter Makrophagen (5,0%), weshalb davon auszugehen ist, dass *E. faecium* in Abwesenheit von Lysozym keinen Zelltod auslöst.

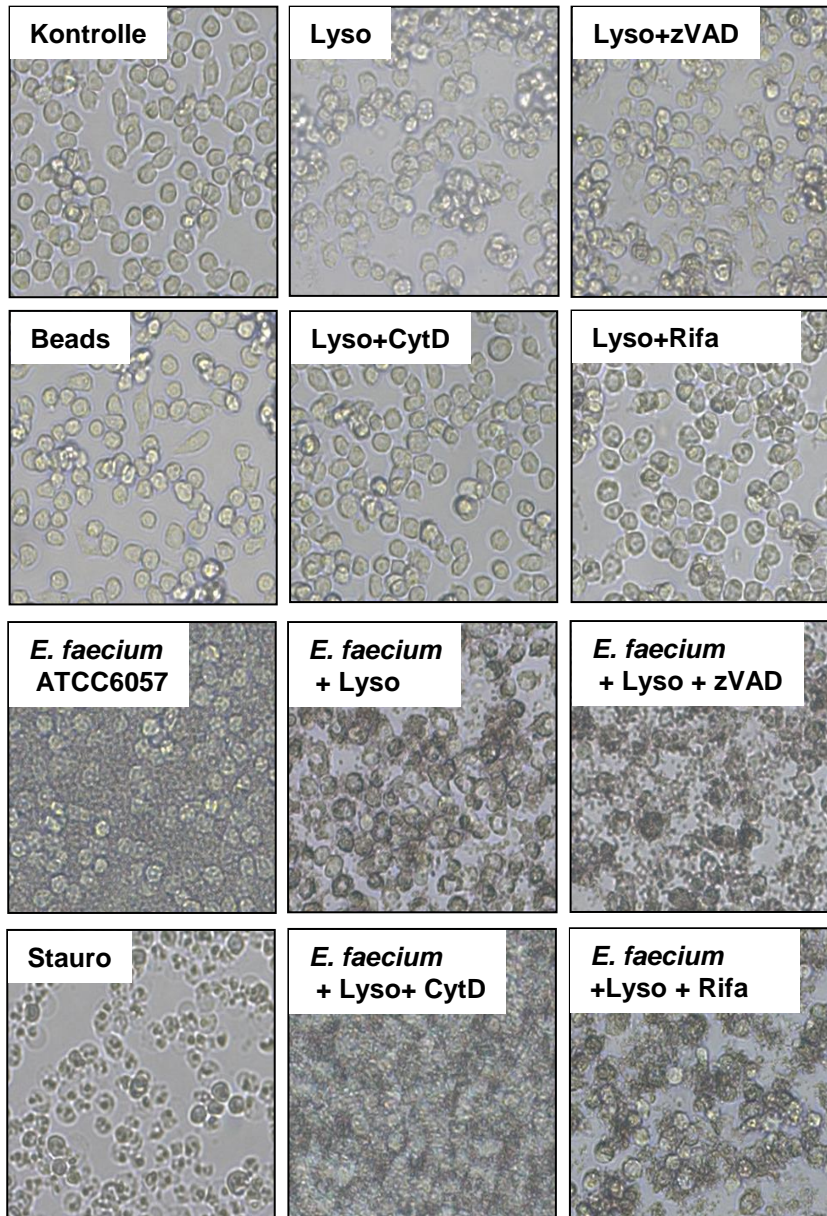
### 3.3 Mikroskopische Analyse von *E. faecium*

Die lichtmikroskopische Analyse der mit *E. faecium* infizierten Zellen (Abb. 7) bestätigte die unter Kapitel 3.2 präsentierten Ergebnisse.

Dabei zeigten Makrophagen, denen nach 2.5 h lediglich Lysozym zugegeben wurde, im Vergleich zu uninfizierten Zellen keine veränderte Morphologie (Abb.

7, erste Reihe, linkes und mittleres Bild). Auch bei den übrigen Kontrollen konnte weder bei einer Behandlung mit Lysozym und zVAD-fmk, Lysozym und Cytochalasin D oder Lysozym und Rifampicin, noch bei der Inkubation mit Silica-beads eine Veränderung der Makrophagenstruktur beobachtet werden (Abb. 7, erste Reihe, rechtes Bild und zweite Reihe).

Auch Zellen, die mit *E. faecium* ATCC 6057 infiziert und anschließend nicht mit Lysozym behandelt wurden, erschienen lichtmikroskopisch intakt. Aufgrund der fehlenden Abtötung von Bakterien war die Zellkultur hierbei jedoch nach einer Inkubationszeit von 6 h mit Bakterien überwuchert (Abb. 7, dritte Reihe, linkes Bild). Wurden die Zellen mit Staurosporin behandelt, verursachte dies typische apoptotische Veränderungen wie Zellschrumpfung und Kondensation des Zellkerns (Abb. 7, vierte Reihe, linkes Bild). Im Gegensatz dazu wiesen die Makrophagen, die mit Enterokokken infiziert worden waren und bei denen nach 2.5 h die Zugabe von Lysozym erfolgte, deutliche Zeichen einer Zellschädigung auf. So waren die Zellgrenzen der J774A.1 nicht mehr eindeutig abgrenzbar. Darüber hinaus waren die Zellen groß bzw. geschwollen (Abb. 7, dritte und vierte Reihe, jeweils mittleres und rechtes Bild).



MOI 20

**Abb. 7: Lichtmikroskopische Analyse von J774A.1-Makrophagen, die mit *E. faecium* infiziert wurden.**

J774A.1-Makrophagen wurden mit zVAD-fmk (zVAD, 100  $\mu$ M) oder Cytochalasin D (CytD, 2  $\mu$ g/ml) eine Stunde lang inkubiert und dann mit *E. faecium* ATCC 6057 (MOI 20) infiziert. 2.5 h nach Infektion wurden die Bakterien durch Zugabe von Lysozym (LZ, 10 mg/ml) und Rifampicin (Rifa, 20  $\mu$ g/ml) abgetötet bzw. nicht abgetötet und für weitere 3.5 h inkubiert. 6 h nach Infektion wurden die Zellen mit einem Axiovert 200 Mikroskop (20 x Objektiv) analysiert. Als Kontrollen dienten uninfizierte Zellen, sowie Zellen, die mit Lysozym (LZ) oder einer Kombination aus Lysozym und zVAD-fmk, Lysozym und Cytochalasin D oder Lysozym und Rifampicin behandelt worden waren, sowie Zellen, die mit Staurosporin (Stauro, 4  $\mu$ M) oder Silica-beads (1  $\mu$ m, MOI 20) inkubiert worden waren.

#### 4. Diskussion

Bei der Abwehr bakterieller Infektionen stellt die Phagozytose von Bakterien durch polymorphkernige Granulozyten bzw. antigenpräsentierende Zellen wie dendritische Zellen oder Makrophagen eine erste Abwehrreaktion des Immunsystems dar. Bakterien können diese Abwehrreaktion umgehen, indem sie Zelltod in Phagozyten auslösen. So induziert beispielsweise *S. aureus* apoptotischen Zelltod in humanen Monozyten (Baran *et al.* 2001) und *S. pyogenes* apoptotischen Zelltod in murinen Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (Timmer *et al.* 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass auch verschiedene andere, bislang nicht untersuchte Staphylokokken-, Streptokokken- und Enterokokkenstämme in der Lage sind, Zelltod in Makrophagen auszulösen.

Mithilfe durchflusszytometrischer Untersuchungen wurde dabei für die jeweiligen Bakterienarten analysiert, inwieweit diese Zelltodinduktion auf einer Verletzung der Zellmembran bzw. auf einer Schädigung der Mitochondrienmembran beruht. Ein Zusammenbruch des inneren mitochondrialen Transmembranpotentials ohne Einstrom von Propidiumiodid (PI) in die Zelle ( $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>) deutete dabei auf Zellen in der frühen Apoptose hin. Umgekehrt wies die Anreicherung von PI in der Zelle ohne Abfall des mitochondrialen Potentials ( $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup>) auf eine Schädigung der Wirtszellmembran und somit auf nekrotischen Zelltod hin. Eine Kombination aus der Depolarisierung des transmitochondrialen Potentials und dem Einstrom von PI ( $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup>) konnte sowohl Zellen im Zustand später Apoptose als auch nekrotische Zellen darstellen. Im Folgenden werden Zellen als „geschädigt“ bezeichnet, wenn sie entweder eine isolierte Zellmembranschädigung oder einen isolierten Zusammenbruch des inneren mitochondrialen Transmembranpotentials oder aber eine Kombination aus beidem aufweisen.

Für *S. aureus* ist beschrieben, dass diese Bakterien in verschiedenen Zelltypen apoptotischen Zelltod auslösen können. In Monozyten wurde die Aktivierung des extrinsischen Signalwegs beschrieben (Baran *et al.* 2001), während das  $\alpha$ -Toxin von *S. aureus* in Jurkat T-Zellen Apoptose über den intrinsischen

Signalweg induzierte (Bantel *et al.* 2001). Für Jurkat T-Zellen wurde zudem beschrieben, dass konzentrationsabhängig entweder apoptotischer und nekrotischer bzw. nur nekrotischer Zelltod ausgelöst wird (Essmann *et al.* 2003). In der vorliegenden Arbeit ergaben sich beim Vergleich von *S. aureus* mit anderen Staphylokokkenspezies große Unterschiede zwischen den jeweiligen Zelltodraten. Während bei einigen koagulasepositiven Stämmen (*S. aureus* MRSA, *S. aureus* PVL+ und *S. schleiferi subsp. coagulans*) bei einem Infektionsverhältnis von 200:1 mehr als 90% der Zellen beschädigt waren (Summe aus  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup>), unterschied sich die Schädigungsrate von *S. haemolyticus*, *S. cohnii* und *S. lugdunensis* nicht wesentlich von der uninfizierter Zellen. Dies deutet darauf hin, dass die zuletzt genannten Stämme nur minimalen oder gar keinen Zelltod in Makrophagen auslösen. Alle drei Erreger gehören zu den koagulasenegativen Staphylokokken und besiedeln die menschliche Haut. Als opportunistische Erreger werden sie allerdings auch gelegentlich im Rahmen von Infektionen als Ursache isoliert, insbesondere wenn eine Immunsuppression vorliegt (Oren und Merzbach 1990, Herchline und Ayers 1991). Die geringe Pathogenität scheint sich in den Ergebnissen dieser Arbeit wiederzuspiegeln. Bei den koagulasepositiven Staphylokokken fiel auf, dass alle getesteten *S. aureus*-Stämme sowie *S. sciuri* und *S. schleiferi subsp. coagulans* (SSSC) mindestens 70% der Makrophagen schädigten und damit ein hohes zytotoxisches Potential aufwiesen. SSSC wird hauptsächlich bei Infektionen von Hunden isoliert und produziert neben Koagulase auch  $\beta$ -Hämolyysin (Igimi *et al.* 1990). Es gibt Hinweise, dass das porenformende  $\beta$ -Hämolyysin von *S. agalactiae* neben anderen Faktoren ursächlich für die Zelltodinduktion in Makrophagen ist (Fettucciari *et al.* 2000). Die hohe Zelltodrate der Makrophagen nach Infektion mit SSSC könnte also durch die Produktion von  $\beta$ -Hämolyysin durch diesen Erreger erklärt werden. Beim Vergleich von *S. aureus* ATCC 25923 und einem Stamm von *S. aureus*, der Panton-Valentine Leukocidin (PVL) exprimiert, war keine signifikant erhöhte Zelltodrate durch den PVL-positiven Stamm in Makrophagen zu verzeichnen, obwohl solche Stämme schwere klinische Verläufe in sonst gesunden jungen Menschen verursachen können (Genestier



*et al.* 2005). Während bei einer Infektion mit *S. aureus* PVL+ bei einer MOI 20 vor allem geschädigte Zellen mit spät-apoptotischen Eigenschaften ( $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup>) detektiert wurden, überwogen bei MOI 200 nekrotische Makrophagen mit intaktem mitochondrialen Transmembranpotential ( $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup>). Dies entspricht einer vorangegangenen Studie an PMNs, die mit rekombinantem PVL inkubiert wurden (Genestier *et al.* 2005). In dieser Studie zeigten die PMNs bei niedrigeren PVL-Konzentrationen nach 6 h apoptotischen Zelltod, der auf den mitochondrienvermittelten Signalweg zurückgeführt werden konnte. Bei hohen Konzentrationen wurden bereits nach einer Stunde ausschließlich nekrotische Zellen detektiert. Die Autoren spekulieren, dass das porenbildende Toxin PVL bei niedrigerer Konzentration nur vereinzelte Poren in der Zellmembran des Leukozyten bildet, durch welche PVL in die Zelle eintreten und an der Mitochondrienmembran seine apoptotische Wirkung entfalten kann. Eine hohe Konzentration von PVL verursacht wahrscheinlich eine unspezifische Zerstörung der Lipiddoppelschicht, was zur Bildung größerer Poren führt. Dadurch kommt es zu osmotischer Lyse und einer Veränderung des Calciumhaushalts, was in nekrotischem Zelltod endet. Außerdem werden durch den Verlust von ATP apoptotische Prozesse aufgehalten (Genestier *et al.* 2005).

Auch bei *S. epidermidis* und *S. hyicus* konnte bei MOI 200 ein hoher Anteil an Zellen mit isolierter Zellmembranschädigung ( $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup>) beobachtet werden (37,4% bei insgesamt 62,2% geschädigten Zellen (*S. epidermidis*) und 43,1% bei insgesamt 56,8% geschädigten Zellen (*S. hyicus*)), in geringerer Ausprägung auch bei einigen anderen Stämmen wie beispielsweise *S. sciuri* (27,0% bei insgesamt 78,2% geschädigten Zellen). Obwohl es sich bei dem verwendeten *S. epidermidis* ATCC 12228 um einen Stamm handelt, der weder biofilmbildend noch infektionsassoziiert ist, sondern lediglich zum Nachweis von Antibiotikaresten in Lebensmitteln verwendet wird (Zhang *et al.* 2003), wurden bei MOI 200 durchschnittlich 62,2% geschädigte Zellen (Summe aus  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup>) detektiert. Für diesen opportunistischen Erreger ist abgesehen von den phenollöslichen Modulinen (PSM) wenig über zytolytische Virulenzfaktoren bekannt, mithilfe derer sie Zellen des

Immunsystems bekämpfen können (Cheung *et al.* 2010). Die Ursache der Membranschädigung der Makrophagen könnte möglicherweise in dem von diesem und einigen anderen *S. epidermidis*-Stämmen produzierten phenollöslichen Modulin  $\delta$  (PSM $\delta$ ) liegen, dessen zytotoxisches Potential vergleichbar mit PSM $\alpha$ 3 von *S. aureus* ist, welches für dessen starke zytolytische Fähigkeiten hauptverantwortlich ist (Cheung *et al.* 2010). Beide Erreger sind in der Lage, neutrophile Granulozyten durch eine Membranschädigung zu lysieren (Cheung *et al.* 2010). Im Rahmen der Studie von Cheung *et al.* (2010) betrug das Verhältnis der Produktion von PSM $\delta$  durch *S. epidermidis* zu der Produktion von PSM $\alpha$ 3 durch *S. aureus* bei einer Vergleichsmessung etwa 1:5, was mit der Zahl der insgesamt lysierten neutrophilen Granulozyten korrelierte. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb *S. epidermidis* eine wesentlich geringere klinische Bedeutung hat als *S. aureus* (Cheung *et al.* 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde nach Infektion mit *S. aureus* im Vergleich zu *S. epidermidis* ein viel geringerer Anteil an Makrophagen detektiert, welche eine isolierte Membranschädigung zeigten (14,0%  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> Zellen bei insgesamt 88,6% geschädigten Zellen (*S. aureus*), 37,4%  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> Zellen bei insgesamt 62,2% geschädigten Zellen (*S. epidermidis*)). Dies liegt wahrscheinlich an der Kombination der verschiedenen zusätzlichen leukozytenschädlichen Virulenzfaktoren von *S. aureus*, welche zeitgleich ihre Wirkung entfalten, wie beispielsweise das apoptose- bzw. nekroseinduzierende Hämolyisin  $\alpha$ -Toxin, welches sowohl in Jurkat T-Zellen (Essmann *et al.* 2003) und humanen mononukleären Zellen (Haslinger *et al.* 2003) Zelltod induziert.

Für *S. hyicus*, über den vor allem im Rahmen von exsudativer Epidermitis in Schweinen berichtet wird, ist abgesehen von den von manchen Stämmen gebildeten verschiedenen exfoliativen Toxinen ExhA, ExhB, ExhC und ExhD wenig über Virulenzfaktoren bekannt (Li *et al.* 2011). Im Fall einer exsudativen Epidermitis in jungen Schweinen wurde auch ein *S. sciuri*-Stamm als Erreger isoliert, welcher ExhC produzierte. Rekombinantes ExhC dieses Isolates löste in Versuchen mit verschiedenen Zelllinien und murinen peritonealen Makrophagen nekrotischen Zelltod aus und gleicht ExhC von *S. hyicus* (Li *et al.*

2011). Möglicherweise entfaltet dieses bei *S. hyicus* gefundene exfoliative Toxin eine ähnliche Wirkung wie ExhC von *S. sciuri* und erklärt den großen Anteil an geschädigten Makrophagen mit nekrotischen Eigenschaften ( $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup>). Allerdings wurde nicht untersucht, ob der in dieser Arbeit verwendete *S. hyicus* ATCC 11249 ExhC bildet.

*S. aureus* ist als häufigster Wundinfektionserreger die wichtigste humanpathogene Staphylokokkenart. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass Zelltodinduktion in Makrophagen hierbei eine Rolle spielen könnte, da alle verwendeten *S. aureus*-Stämme bzw. Isolate hohe Zelltodraten in Makrophagen bewirkten. Das verwendete *S. aureus* MRSA-Isolat zeigte gemeinsam mit dem koagulasepositiven *S. schleiferi subsp. coagulans* die höchsten Zelltodraten. Es ist allerdings sehr unwahrscheinlich, dass das Enzym Koagulase einen Einfluss auf die Zelltodrate in diesem Versuchsaufbau hat, da in Zellkultur kein Fibrin zur Verfügung steht. Bei dem medizinisch relevanten Erreger *S. saprophyticus*, der Urogenitalinfektionen verursacht, wurden bei den J774A.1-Makrophagen vergleichsweise niedrige Zelltodraten gemessen, die der klinischen Bedeutung von *S. saprophyticus* nicht entsprechen. Von daher gründet seine Pathogenität wohl eher auf einem anderen Mechanismus als der Zerstörung von Makrophagen durch Apoptose oder Nekrose.

Streptokokken sind in der Lage in einer Reihe von Zelltypen Apoptose auszulösen. Für *S. pyogenes* ist beschrieben, dass dieser Erreger in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten Apoptose induziert, wobei das porenformende Zytolysin Streptolysin O (SLO) eine Schlüsselrolle spielt (Timmer *et al.* 2009).

In der vorliegenden Arbeit bewirkte schon eine Infektion mit der niedrigen MOI 2 im Fall von *S. dysgalactiae subsp. equisimilis* (SDSE) stark erhöhte Zelltodraten von mehr als 70% (Summe aus  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup>). Diese Bakterien sind lediglich für 5 - 8% der Streptokokkeninfektionen im Menschen verantwortlich, während *S. pyogenes* bei etwa 90% der Fälle die Ursache darstellt. SDSE wurde unter anderem im Rahmen von Mittelohrentzündungen, Wundinfektionen und eitriger Pharyngitis (Sachse *et al.*

2002), sowie bei Sepsis ohne bekannten Fokus, septischer Arthritis, Zellulitis, Pneumonie, infektiöser Endokarditis, Meningitis und in Fällen des toxischen Schocksyndroms als Infektionsquelle isoliert. Meistens waren Menschen im Alter von über 50 Jahren betroffen, während bei den jüngeren Patienten Infektionen mit *S. pyogenes* und *S. agalactiae* dominierten (Takahashi *et al.* 2011). Über seine Fähigkeit, in Immunzellen Zelltod auszulösen, gibt es bis jetzt keine Untersuchungen, aber die klinischen Verläufe sind oftmals sehr aggressiv. Interessanterweise wurde in einer japanischen Studie festgestellt, dass Patienten, die bei Aufnahme mit einer Infektion von *SDSE* eine niedrige Leukozytenzahl oder Thrombozytopenie zeigten, eine besonders schlechte Prognose hatten (Takahashi *et al.* 2011). Diese klinischen Ergebnisse im Zusammenhang mit der in dieser Studie gemessenen hohen Empfindlichkeit der J774A.1-Makrophagen gegenüber einer vergleichsweise geringen Konzentration von Erregern, könnten darauf hinweisen, dass Zelltodinduktion in Makrophagen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von *SDSE*-Infektionen spielt. Diese Bakterien ähneln in ihrer Virulenz *S. pyogenes* und besitzen neben zahlreichen Virulenzfaktoren wie dem M-Protein oder Streptokinase A auch das oben für *S. pyogenes* beschriebene SLO (Takahashi *et al.* 2011), welches für die starke Leukozytenschädigung verantwortlich sein könnte.

Nach Infektionen mit verschiedenen Streptokokkenarten (*S. pyogenes*, *SDSE*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *S. oralis*) bei MOI 200 überwog der Anteil spät-apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen. Bei *S. agalactiae* wurden ausgeglichene Anteile an Makrophagen mit  $\Delta\psi_m$  low/ $PI^-$ ,  $\Delta\psi_m$  high/ $PI^+$  und  $\Delta\psi_m$  low/ $PI^+$  gemessen und lediglich *S. pneumoniae* zeigte überwiegend Zellen mit früh-apoptotischen Eigenschaften ( $\Delta\psi_m$  low/ $PI^-$ ). Dazu passt, dass in einer Studie mit humanen Makrophagen 20 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* deutliche Zeichen für Apoptose beobachtet wurden (Dockrell *et al.* 2001). Dafür könnte das porenformende Pneumolysin verantwortlich sein, für welches beschrieben wurde, dass es zur Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran infizierter Zellen führt und durch die Translokation von Cytochrom c ins Cytoplasma Apoptose induziert (Ulett und Adderson 2006).

Neben *S. pneumoniae* sind bei den Streptokokken hauptsächlich die  $\beta$ -

hämolyisierenden Stämme Auslöser für ambulant erworbene Infektionen. Von diesen werden vor allem Gruppe A *S. pyogenes* (GAS), Gruppe B *S. agalactiae* (GBS) und neuerdings auch Gruppe C *S. dysgalactiae subsp. equisimilis* (GCS) als klinisch relevante Erreger angesehen (Takahashi *et al.* 2011). Während auch in dieser Arbeit bei MOI 200 die höchsten Zelltodraten (Summe aus  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup> Zellen) bei *S. pyogenes* (97,4%, Abb. 2) und *SDSE* (99,8%, Abb. 2) gemessen wurden, gehörte *S. agalactiae* zu den Erregern mit niedrigerer Schädigungsrate (76,8%, Abb. 2). Für *S. agalactiae* ist beschrieben, dass diese Bakterien Apoptose in murinen Makrophagen auslösen (Ulett *et al.* 2005). Bei einer MOI 100 dominierten dabei Prozesse des intrinsischen Signalwegs, wie das Austreten von Cytochrom c aus den Mitochondrien und die Aktivierung von Caspase 9 (Ulett *et al.* 2005). Diese Veränderungen wurden allerdings erst 24 h nach Infektion beobachtet (Ulett *et al.* 2005), während in der vorliegenden Arbeit für die Messungen ein Zeitpunkt bereits 6 h nach Infektion gewählt wurde. Wie schon bei *Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans* erwähnt, wird vermutet, dass das porenformende  $\beta$ -Hämolyisin von GBS dabei eine bedeutende Rolle spielt. Da aber auch GBS, welche kein  $\beta$ -Hämolyisin produzieren, programmierten Zelltod in Makrophagen auslösen können (Ulett und Adderson 2006), weist dies auf zusätzliche leukozytenschädliche Virulenzfaktoren hin.

Im Gegensatz zu den Staphylokokken zeigten die Streptokokken abgesehen von *SDSE* ein sehr homogenes Bild bezogen auf die Zelltodraten, die abhängig von der MOI anstiegen. Alle Erreger verursachten bei MOI 200 mehr als 60% geschädigte Makrophagen (Summe aus  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup>), ein Großteil der Stämme sogar über 80%. Dies weist darauf hin, dass entweder jeder untersuchte Stamm eigene spezielle Virulenzfaktoren besitzt, welche Zelltod in Makrophagen induzieren können, oder aber, dass ein gemeinsamer, bislang unbekannter Faktor aller Streptokokken für die Schädigung der Zellen verantwortlich ist. Aufgrund der Vielzahl der bereits erwähnten bekannten Virulenzfaktoren und der in der vorliegenden Arbeit teilweise beobachteten Unterschiede in der Art der Zellschädigung zwischen den verschiedenen Stämmen, weisen die Ergebnisse dieser Arbeit eher auf

ersteres hin.

*E. faecalis* gehört zur natürlichen Darmflora, kann aber auch Auslöser schwerwiegender Infektionen sein, wobei vor allem immunsupprimierte Patienten gefährdet sind. Dieser Erreger wird in etwa 90% der Enterokokkeninfektionen isoliert, wobei zahlreiche Virulenzfaktoren bekannt sind, die seine Pathogenität ausmachen (Kayaoglu und Ørstavik 2004). Es konnte eine essentielle Rolle von Makrophagen bei der Bekämpfung von *E. faecalis* nach oraler Infektion und von *E. faecium* in einem Maus-Peritonitis-Modell nachgewiesen werden (Tsuda *et al.* 2008, Leendertse *et al.* 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass alle getesteten Enterokokkenspezies (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. saccharolyticus*, *E. hirae* und *E. gallinarum*) Zelltod in J774A.1-Makrophagen induzieren können. Die durch verschiedene Enterokokkenspezies ausgelösten Zelltodraten (Summe aus  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup>) waren ähnlich wie bei den Streptokokken relativ homogen. Im Vergleich zu den Staphylokokken war bei MOI 200 grundsätzlich bei mehr als der Hälfte der Zellen entweder ein Zusammenbruch des inneren mitochondrialen Transmembranpotentials oder eine durchlässige Zellmembran bzw. beides zu detektieren. Schon die niedrige MOI 2 bewirkte mit Ausnahme von *E. avium* und *E. hirae* deutlich erhöhte Zelltodraten. Bei MOI 20 überwogen bei einer Mehrzahl der Stämme Makrophagen mit intaktem inneren mitochondrialen Transmembranpotential, aber durchlässiger Zellmembran ( $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup>). Da dies unabhängig von der Spezies der Fall war, könnte dies darauf hindeuten, dass die Zellmembranschädigung nicht von speziellen spezies-spezifischen Virulenzfaktoren abhängig ist. Zytolysin, Gelatinase und Aggregationssubstanz sind Faktoren, über deren Vorhandensein beispielsweise vor allem im Zusammenhang mit *E. faecalis* berichtet wird (Kayaoglu und Ørstavik 2004, Elsner *et al.* 2000), die aber in Publikationen über andere Enterokokkenstämme nicht erwähnt oder beispielsweise bei klinischen Isolaten von *E. faecium* und *E. faecium*-Isolaten von Tierdünger nicht gefunden wurden (Jahangiri *et al.* 2010). Es ist wahrscheinlicher, dass die Zelltodinduktion in Makrophagen auf einem

gemeinsamen Faktor beruht, den alle Enterokokkenspezies besitzen. Es könnte sich dabei beispielsweise um die Produktion von extrazellulären ROS (reactive oxygen species) handeln, die unter dem Einfluss von Lysozym vermehrt freigesetzt werden. Darauf deuten die Ergebnisse eines weiterführenden Projekts aus der Arbeitsgruppe von Sabine Gröbner hin (Höring *et al.* 2012).

Für *E. faecalis* ist beschrieben, dass diese Bakterien in RAW264.7-Makrophagen nekrotischen Zelltod auslösen (Kirschnek *et al.* 2004). So wurden 6 h nach Infektion mit *E. faecalis* 35% eosinpositive Zellen detektiert (Kirschnek *et al.* 2004). Während bei dieser Studie keine Antibiotika eingesetzt wurden, war in der vorliegenden Arbeit die Zugabe von Lysozym essenziell für die Zelltodinduktion in J774A.1-Makrophagen durch *E. faecium*. Ohne Lysozym sank die Zelltodrate (Summe aus  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup>) auf Werte vergleichbar mit denen uninfizierter Zellen (Abb. 6). Die Ursache dafür, dass *E. faecalis* im Gegensatz zu *E. faecium* ohne Zugabe von Lysozym Zelltod auslösen kann (Kirschnek *et al.* 2004), könnte an den bereits erwähnten Virulenzfaktoren von *E. faecalis* liegen, die bei anderen Enterokokkenarten nicht vorkommen. Es könnte sich dabei beispielsweise um Zytolysin handeln, da vorhergehende Studien gezeigt haben, dass der Kulturüberstand von Hämolysin- bzw. Zytolysin-produzierenden *E. faecalis*-Stämmen Zelltod in murinen Makrophagen auslöst (Miyazaki *et al.* 1993).

Das Vorhandensein von Genen, die für Antibiotikaresistenzen kodieren, resultierte nicht in eine generelle Erhöhung der Zelltodraten in Makrophagen. In der ersten Versuchsreihe zeigten die Vancomycin-resistenten Stämme *E. gallinarum* VanA, *E. gallinarum* VanC1 und *E. faecium* VanB sogar eine leicht unterdurchschnittliche Zahl an geschädigten Zellen im Vergleich zu den Vancomycin-sensiblen Stämmen. Die Studienlage bezüglich des Mortalitätsrisikos beim Vergleich der Verläufe von Bakteriämien, die durch resistente bzw. nicht-resistente Enterokokken verursacht wurden, ist nicht eindeutig. Auf der einen Seite gibt es Studien, die einen schwereren Verlauf bei VRE im Vergleich zu nicht-VRE beschreiben, während andere kein gesteigertes Mortalitätsrisiko feststellen konnten, welches lediglich auf die

Vancomycinresistenz zurückzuführen war (Mundy *et al.* 2000). Der Unterschied des Mortalitätsrisikos könnte statt auf eine erhöhte Virulenz auf das schwierigere Therapiemanagement bei ohnehin oftmals schon alten und multimorbiden Patienten zurückzuführen sein, wie Lowy (2003) bezüglich der schwierigeren Verläufe bei Infektionen mit methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) gegenüber Infektionen mit methicillin-sensiblen *S. aureus* (MSSA) in Betracht zieht.

Bestimmte Arten von Antibiotikaresistenz gehen mit einem Verlust an sonstiger bakterieller Fitness einher, was sogar ein vermindertes Wachstum oder eine geringere Invasivität bewirken kann (Schulz zur Wiesch *et al.* 2009). So wurde im Fall eines *E. faecium* mit neu erworbener VanA-Resistenz im Vergleich zu seinem resistenzlosen Mutterstamm ein leichter Verlust an bakterieller Fitness beobachtet (Johnsen *et al.* 2002).

Auch bei der Untersuchung des Einflusses von Esp (enterococcal surface protein) auf die Zelltodinduktion in Makrophagen mithilfe verschiedener Esp-defizienter Isolate von *E. faecium* konnten keine signifikanten Unterschiede zu Esp-produzierenden Isolaten beobachtet werden. Obwohl es eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Esp und epidemisch auftretenden Stämmen von *E. faecium* zu geben scheint (Oancea *et al.* 2004), bewirkten bei MOI 200 die Stämme, bei denen kein Esp nachzuweisen war, die höchste Zahl geschädigter Makrophagen (Summe aus  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup>). Daraus lässt sich ableiten, dass die Produktion von Esp keinen Einfluss auf die zytotoxischen Eigenschaften von *E. faecium* gegenüber J774A.1 hat.

Für *S. aureus* ist beschrieben, dass diese Bakterien in Jurkat-T-Zellen sowohl über caspasenabhängige als auch caspasenunabhängige Signalwege Zelltod auslösen (Essmann *et al.* 2003). Als Ursache wurde das Hämolysin  $\alpha$ -Toxin identifiziert (Essmann *et al.* 2003), das unabhängig von der bakteriellen Invasion in der Lage ist, Zelltod in T-Zellen zu induzieren (Bantel *et al.* 2001). Im Gegensatz dazu sind für die Apoptoseinduktion durch *S. aureus* in Endothelzellen sowohl die bakterielle Invasion als auch metabolisch aktive



intrazelluläre *S. aureus* notwendig (Haslinger-Löffler *et al.* 2005). Auch für die Apoptoseinduktion in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten durch *S. pyogenes* ist die Internalisierung des Erregers durch die Phagozyten nötig (Timmer *et al.* 2009), während dies für den programmierten Zelltod von Makrophagen durch *S. agalactiae* keine Voraussetzung ist (Fettucciari *et al.* 2000).

Um die Mechanismen zu untersuchen, welche für die Zelltodinduktion durch *E. faecium* verantwortlich sein könnten, wurden in der vorliegenden Arbeit die Zelltodraten (Summe aus  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>-</sup>,  $\Delta\psi_m$  high/PI<sup>+</sup> und  $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup>) von J774A.1-Makrophagen unter dem Einfluss verschiedener Hemmstoffe verglichen. Vorinkubation von J774A.1-Makrophagen mit dem Pancaspaseninhibitor zVAD.fmk vor der Infektion mit *E. faecium* bewirkte keinen Abfall der Zelltodrate (Abb. 6). Dies weist darauf hin, dass *E. faecium* Zelltod in Makrophagen unabhängig von Caspasenaktivierung auslöst. Diese Ergebnisse wurden durch ein weiterführendes Projekt aus der Arbeitsgruppe von Sabine Gröbner bestätigt, bei dem keine Aktivierung von Caspase 3 nach Infektion mit *E. faecium* beobachtet wurde (Gröbner *et al.* 2010). Obwohl für *S. aureus* beschrieben wurde, dass dieser in Monozyten Apoptose über den extrinsischen Signalweg verbunden mit Caspasenaktivierung auslöst (Baran *et al.* 2001), konnte in dieser Arbeit keine Hemmung des *S. aureus*-induzierten Zelltods in Makrophagen durch zVAD.fmk beobachtet werden (Abb. 6).

Die durch *S. aureus* ausgelöste Zelltodrate konnte durch Zugabe von Cytochalasin D und Rifampicin deutlich gesenkt werden, was der oben erwähnten Studie von Haslinger-Löffler *et al.* (2005) entspricht, in der gezeigt wurde, dass der durch *S. aureus* ausgelöste Zelltod in Endothelzellen abhängig von Bakterienaufnahme und intrazellulärer Replikation ist. Dazu passen auch Versuche an murinen Keratinozyten und Fibroblasten, bei denen gezeigt werden konnte, dass von einer ganzen Reihe Antibiotika, die zum Teil routinemäßig gegen Staphylokokken eingesetzt werden, allein Rifampicin intrazellulären *S. aureus* effektiv abtötete (Krut *et al.* 2004). Im Gegensatz dazu hatte die Vorinkubation mit Cytochalasin D bzw. Rifampicin keinen Einfluss auf das Überleben der Makrophagen nach Infektion mit *E. faecium* (Abb. 6).

Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass der Zelltodinduktion durch *E. faecium* andere Mechanismen zugrunde liegen.

Die vorliegende Studie hat gezeigt, dass die Gegenwart von Lysozym für die Induktion von Nekrose durch *E. faecium* in J774A.1-Makrophagen unverzichtbar ist.

Lysozym ist in vielen menschlichen Zellen und Geweben vorhanden. Außerdem findet es sich in löslicher Form in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie Speichel, Magensaft, Galle, Tränen, Samenflüssigkeit, Muttermilch, Serum, Nabelschnurblut, Urin und Liquor (Montagne *et al.* 1998). Es wirkt bakterizid, weil es in der Lage ist, die  $\beta$ -glykosidische Bindung zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglukosamin des Peptidoglykans der bakteriellen Zellwand zu spalten. Außerdem scheint Lysozym die bakterielle Zellmembran durch nicht-enzymatische Mechanismen beschädigen zu können, wobei seine kationischen und hydrophoben Eigenschaften eine Rolle spielen (Hébert *et al.* 2007). Lysozym wird von verschiedenen Zelltypen wie beispielsweise Monozyten, Makrophagen und Kolon-Epithelzellen gebildet. Im Rahmen von Infektionen wurden im Blut erhöhte Lysozymkonzentrationen gemessen, was auf eine Proliferation der Phagozyten hinweist (Bera *et al.* 2005). Eventuell trägt das im Intestinaltrakt vorhandene und von den genannten Zellen produzierte Lysozym auch zu einer möglichen durch Enterokokken ausgelösten Zelltodinduktion *in vivo* bei.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass Lysozym durch die Hydrolyse von Peptidoglykanen einen (Zellwand-) Bestandteil von *E. faecium* freisetzt, der die Ursache der Zelltodinduktion in Makrophagen darstellt. Es könnte sich dabei um Zellwandbestandteile von *E. faecium* wie Lipoteichonsäuren oder Proteine handeln. Experimente mit hitzegetöteten *E. faecium* deuten eher auf Proteine von Enterokokken als Ursache für die Zelltodinduktion hin, da sich der Prozentsatz geschädigter Zellen auf etwa die Hälfte verringerte, wenn Makrophagen mit hitzegetöteten Bakterien statt mit lebenden Bakterien inkubiert worden waren.

Weitere Studien sind nötig, um das Protein zu identifizieren, welches für die Zelltodinduktion durch Enterokokken verantwortlich ist. Das Oberflächenprotein Esp von *E. faecium* spielt dabei keine Rolle, da nach der Infektion von Makrophagen mit einem Esp-defizienten *E. faecium*-Isolat keine erniedrigte Zelltodrate beobachtet werden konnte (siehe Abb. 3B und 6).

Die Zelltodinduktion von Makrophagen wird in der Literatur oftmals im Zusammenhang mit dem Aufeinandertreffen der Abwehrzellen mit Bakterien erwähnt. Einerseits dient ein früher Zelltod der Phagozyten den Erregern dazu, diejenigen Zellen zu umgehen, die schon kurze Zeit nach der Invasion versuchen würden ihre Ausbreitung zu verhindern. Auf der anderen Seite kann die Zerstörung der Makrophagen aber auch einen Vorteil für den Wirt ergeben. Im Fall von intrazellulär überlebenden Erregern wie Listerien und Legionellen würde ohne den Selbstmord der Zelle eine Überlebensnische für die Eindringlinge bestehen bleiben (Navarre und Zychlinsky 2000). Während in der vorliegenden Arbeit bei der Infektion mit Enterokokken vor allem Zellmembranschädigungen von Makrophagen vereinbar mit nekrotischem Zelltod beobachtet wurden, wird in der Literatur hauptsächlich über apoptotischen Zelltod ausgelöst durch grampositive Erreger wie *S. aureus* (Bantel *et al.* 2001), *S. agalactiae* (Fettucciari *et al.* 2000) oder *S. pneumoniae* (Dockrell *et al.* 2001) berichtet. In der vorliegenden Arbeit konnten bei der Infektion durch Staphylokokken und Streptokokken allerdings nur wenige Makrophagen detektiert werden, bei denen lediglich ein Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials, aber keine Beschädigung der Zellmembran vorhanden war ( $\Delta\psi_m$  low/PI<sup>+</sup>), was auf das Vorliegen früh-apoptotischen Zelltods hinweist. Eine Ursache dafür könnte der unterschiedliche Versuchsaufbau sein, da es entscheidend von der Infektionsdauer, der Infektionsdosis sowie von der Zielzelle abhängt, ob ein bakterieller Erreger eher apoptotischen oder nekrotischen Zelltod auslöst. So wurden beispielsweise für *S. aureus* bei Untersuchungen bezüglich der zelltodinduzierenden Eigenschaften von  $\alpha$ -Toxin (Essmann *et al.* 2003) beide Zelltodformen abhängig von der Konzentration des jeweiligen Toxins beschrieben. Während bei einer hohen Infektionsdosis nekrotischer Zelltod

beobachtet wurde, konnten bei niedriger Dosis sowohl apoptotische als auch nekrotische Zellen detektiert werden (Essmann *et al.* 2003). Auch für das porenbildende Toxin PVL ist beschrieben, dass es in hoher Konzentration nekrotischen Zelltod in humanen PMNs bewirkte, während eine geringere Dosis in Apoptose resultierte (Genestier *et al.* 2005). In einer Studie von Kirschnek *et al.* (2004) wurde das zytotoxische Potential eines *E. coli*-Laborstamms und klinischer Isolate einiger anderer Bakterienarten (*E. faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*) gegenüber murinen Makrophagen untersucht. Nach 6 h verursachten alle getesteten Spezies Zeichen nekrotischen Zelltods (Messung anhand der Eosin-Aufnahme nach 6 h). Alle Isolate induzierten nach 20 h zudem Apoptose, was anhand der Zellkernmorphologie unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt wurde.

Zusammenfassend ist aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit davon auszugehen, dass die Zugabe von Lysozym für die Zelltodinduktion durch Enterokokken essentiell ist. Der Zelltod-auslösende Faktor von *E. faecium* scheint ein löslicher oder nicht-löslicher Bestandteil der Zellwand von Enterokokken zu sein, der nur in Gegenwart von Lysozym freigesetzt wird und zumindest teilweise hitzeempfindlich zu sein scheint.

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden in einem weiterführenden Versuch der Arbeitsgruppe von Sabine Gröbner lebendige Enterokokken zunächst eine Stunde lang mit den Glykosidasen Lysozym oder Mutanolysin inkubiert und anschließend entweder mit Proteinkinase K oder Phospholipase C behandelt, ehe die Erreger zur Infektion von J774A.1-Makrophagen verwendet wurden. Da die Zelltodrate der Makrophagen signifikant gesenkt wurde, wenn Lysozym- bzw. Mutanolysin-vorbehandelte *E. faecium* mit Proteinkinase K inkubiert wurden, handelt es sich wohl tatsächlich um ein (Oberflächen-) Protein von *E. faecium*, das zur Zelltodinduktion beiträgt (Gröbner *et al.* 2010).

Auffällig war bei der Zelltodinduktion durch Enterokokken die frühe Schädigung der Zellmembran von Makrophagen, was möglicherweise ein Hinweis dafür ist, dass der zytotoxische Faktor von Enterokokken indirekt oder direkt mit der Wirtszellmembran interagiert. Da der Zelltod auch durch Caspasenhemmung

nicht verhindert werden konnte, weisen die Untersuchungen dieser Arbeit darauf hin, dass Enterokokken nekrotischen Zelltod bewirken. Dass es sich bei dem durch *E. faecium* ausgelösten Zelltod tatsächlich um nekrotischen Zelltod handelt, haben weiterführende Untersuchungen (Caspasen-Westernblots, LDH-release assays sowie elektronenmikroskopische Analysen) gezeigt (Gröbner *et al.* 2010).

## 5. Zusammenfassung

Makrophagen bilden als Phagozyten die vorderste Front des angeborenen Immunsystems. So können sie Bakterien aufnehmen und inaktivieren, bevor diese ihre Pathogenität entfalten. Grampositive Bakterien, wie beispielsweise *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes*, sind in der Lage, programmierten Zelltod in Makrophagen auszulösen und hierdurch die Immunantwort des Wirts zu umgehen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass darüber hinaus auch zahlreiche andere Staphylokokken- und Streptokokkenspezies zytotoxisch auf J774A.1-Makrophagen wirken, was zur Pathogenität dieser Bakterien beitragen könnte.

Enterokokken sind ein wichtiger Bestandteil der menschlichen Darmflora. Sie gewinnen allerdings zunehmend Aufmerksamkeit als Auslöser lebensbedrohlicher Infektionen, vor allem bei immunsupprimierten Patienten. In der vorliegenden Arbeit wurden J774A.1-Makrophagen mit verschiedenen Enterokokkenspezies und einer Reihe von *E. faecium*-Stämmen infiziert, welche sich hinsichtlich ihrer Antibiotikaresistenz und dem Vorhandensein des Oberflächenproteins Esp unterschieden. Dabei stellte sich heraus, dass Enterokokken unabhängig von der Spezies in der Lage sind, in Makrophagen nekrotischen Zelltod auszulösen. Weiterführende Untersuchungen mit *E. faecium* zeigten, dass Lysozym für den durch *E. faecium* ausgelösten Zelltod essenziell ist, wobei der Zelltod weder durch Caspasenhemmung mit zVAD-fmk, Aufnahmehemmung durch Cytochalasin D oder intrazelluläre Abtötung der Enterokokken mit Rifampicin verhindert werden konnte. Das Vorhandensein des bakteriellen Oberflächenproteins Esp oder bestimmter Antibiotikaresistenzen erhöhte die Zelltodraten nicht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es einen gemeinsamen, bislang unbekanntem zytotoxischen Faktor von Enterokokken gibt, der im Beisein von Lysozym freigesetzt wird. Weiterführende Arbeiten, die auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit aufbauen, deuten darauf hin, dass es sich dabei um zytotoxisch wirksame, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) handeln könnte, die unter dem Einfluss von Lysozym aus Enterokokken freigesetzt werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- Alison, M.R., and Sarraf, C.E. (1994) Liver cell death: patterns and mechanisms. *Gut*. **35**:577-81.
- ATCC (2007) Product Information Sheet for ATCC TIB-67.
- Baldassarri, L., Bertuccini, L., Ammendolia, M.G., Cocconcelli, P., Arciola C.R., Montanaro, L., Creti, R., and Orefici, G. (2004) Receptor-mediated endocytosis of biofilm-forming *Enterococcus faecalis* by rat peritoneal macrophages. *Indian J Med Res*. **119** Suppl:131-5.
- Bantel, H., Sinha, B., Domschke, W., Peters, G., Schulze-Osthoff, K., and Janicke, R.U. (2001)  $\alpha$ -Toxin is a mediator of *Staphylococcus aureus*-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling. *J Cell Biol*. **155**:637–48.
- Baran, J., Weglarczyk, K., Mysiak, M., Guzik, K., Ernst, M., Flad, H.D., and Pryjma, J. (2001) Fas (CD95)-Fas ligand interactions are responsible for monocyte apoptosis occurring as a result of phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. **69**:1287-97.
- Barros, L.F., Hermosilla, T., and Castro, J. (2001) Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. **130**:401-9.
- Becker, P., Hufnagle, W., Peters, G., and Herrmann, M. (2001) Detection of differential gene expression in biofilm-forming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus* using micro-representational-difference analysis. *Appl Environ Microbiol*. **67**:2958-65.
- Bera, A., Herbert, S., Jakob, A., Vollmer, W., and Götz, F. (2005) Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*. **55**:778-87.
- Borgmann, S., Schulte, B., Wolz, C., Gruber, H., Werner, G., Goerke, C., Klare, I., Beyser, K., Heeg, P., and Autenrieth, I.B. (2007) Discrimination between epidemic and non-epidemic glycopeptide-resistant *E. faecium* in a post-outbreak situation. *J Hosp Infect*. **67**:49-55.
- Cheung, G.Y., Rigby, K., Wang, R., Queck, S.Y., Braughton, K.R., Whitney, A.R., Teintze, M., DeLeo, F.R., and Otto, M. (2010) *Staphylococcus epidermidis* strategies to avoid killing by human neutrophils. *PLoS Pathog*. **6**:e1001133.
- Climo, M.W., Patron, R.L., Goldstein, B.P., and Archer, G.L. (1998) Treatment of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* aortic valve endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*. **42**:1355-60.
- Cosgrove, S.E., Sakoulas, G., Perencevich, E.N., Schwaber, M.J., Karchmer, A.W., and Carmeli, Y. (2003) Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. **36**:53-9.
- Courvalin, P. (2006) Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis*. **42** (Suppl. 1):S25-34.
- Devriese, L.A., Poutrel, B., Kilpper-Bälz, R., and Schleifer, K.H. (1983) *Staphylococcus gallinarum* and *Staphylococcus caprae*, two new species

- from animals. *Int J Syst Bacteriol.* **33**:480–86.
- DiazGranados, C.A., Zimmer, S.M., Klein, M., and Jernigan, J.A.** (2005) Comparison of mortality associated with vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bloodstream infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* **41**:327–33.
- Di Rosa, R., Creti, R., Venditti, M., D'Amelio, R., Arciola, C.R., Montanaro, L., and Baldassarri, L.** (2006) Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett.* **256**:145-50.
- Dockrell, D.H., Lee, M., Lynch, D.H., and Read, R.C.** (2001) Immune-mediated phagocytosis and killing of *Streptococcus pneumoniae* are associated with direct and bystander macrophage apoptosis. *J Infect Dis.* **184**:713-22.
- Douglas, C.W., Heath, J., Hampton, K.K., and Preston, F.E.** (1993) Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. *J Med Microbiol.* **39**:179-82.
- Drews, T.D., Temte, J.L., and Fox, B.C.** (2006) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: review of an emerging public health concern. *WMJ.* **105**:52-7.
- Elsner, H.A., Sobottka, I., Mack, D., Claussen, M., Laufs, R., and Wirth, R.** (2000) Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **19**:39-42.
- Essmann, F., Bantel, H., Totzke, G., Engels, I.H., Sinha, B., Schulze-Osthoff, K., and Janicke, R.U.** (2003) *Staphylococcus aureus* alpha-toxin-induced cell death: predominant necrosis despite apoptotic caspase activation. *Cell Death Differ.* **10**:1260–72.
- Facklam, R.** (2002) What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev.* **15**:613-30
- Feng, G., and Kaplowitz, N.** (2001) Mechanism of staurosporine-induced apoptosis in murine hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **282**:G825-34.
- Fettucciari, K., Rosati, E., Scaringi, L., Cornacchione, P., Migliorati, G., Sabatini, R., Fettriconi, I., Rossi, R., and Marconi, P.** (2000) Group B Streptococcus induces apoptosis in macrophages. *J Immunol.* **165**:3923-33.
- Ganz, T.** (2004) Antimicrobial polypeptides. *J Leukoc Biol.* **75**:34-8.
- Genestier, A.L., Michallet, M.C., Prevost, G., Bellot, G., Chalabreysse, L., Peyrol, S., Thivolet, F., Etienne, J., Lina, G., Vallette, F.M., Vandenesch, F., and Genestier, L.** (2005) *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest.* **115**:3117-27.
- Gröbner, S., Fritz, E., Schoch, F., Schaller, M., Berger, A.C., Bitzer, M., and Autenrieth, I.B.** (2010) Lysozyme activates *Enterococcus faecium* to induce necrotic cell death in macrophages. *Cell Mol Life Sci.* **67**:3331-44.
- Harkin, S.T., Cohen, G.M., and Gescher, A.** (1998) Modulation of apoptosis in rat thymocytes by analogs of staurosporine: lack of direct association



- with inhibition of protein kinase C. *Mol Pharmacol.* **54**:663-70.
- Haslinger, B., Strangfeld, K., Peters, G., Schulze-Osthoff, K., and Sinha, B.** (2003) *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cells: role of endogenous tumour necrosis factor-alpha and the mitochondrial death pathway. *Cell Microbiol.* **5**:729-41.
- Haslinger-Löffler, B., Kahl, B.C., Grundmeier, M., Strangfeld, K., Wagner, B., Fischer, U., Cheung, A.L., Peters, G., Schulze-Osthoff, K., and Sinha, B.** (2005) Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells. *Cell Microbiol.* **7**:1087-97.
- Hébert, L., Courtin, P., Torelli, R., Sanguinetti, M., Chapot-Chartier, M.P., Auffray, Y., and Benachour, A.** (2007) *Enterococcus faecalis* constitutes an unusual bacterial model in lysozyme resistance. *Infect Immun.* **75**:5390-8.
- Heikens, E., Fler, A., Paauw, A., Florijn, A., and Fluit, A.C.** (2005) Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* **43**:2286-90.
- Herchline, T.E., and Ayers, L.W.** (1991) Occurrence of *Staphylococcus lugdunensis* in consecutive clinical cultures and relationship of isolation to infection. *J Clin Microbiol.* **29**:419-21.
- Huang, M.B., Baker, C.N., Banerjee, S., and Tenover, F.C.** (1992) Accuracy of the E test for determining antimicrobial susceptibilities of staphylococci, enterococci, *Campylobacter jejuni*, and gram-negative bacteria resistant to antimicrobial agents. *J Clin Microbiol.* **30**:3243-8.
- Höring, S., Schütz, M., Autenrieth, I.B., and Gröbner, S.** (2012) Lysozyme facilitates adherence of *Enterococcus faecium* to host cells and induction of necrotic cell death. *Microbes Infect.* **14**:554-62.
- Igimi, S., Takahashi, E., and Mitsuoka, T.** (1990) *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. *nov.*, isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. *Int J Syst Bacteriol.* **40**:409-11.
- Ike, Y., Hashimoto, H., and Clewell, D.B.** (1984) Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies *zymogenes* contributes to virulence in mice. *Infect Immun.* **45**:528-30.
- Jahangiri, S., Talebi, M., Eslami, G., and Pourshafie, M.R.** (2010) Prevalence of virulence factors and antibiotic resistance in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from sewage and clinical samples in Iran. *Indian J Med Microbiol.* **28**:337-41.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.** (2002) *Immunologie (5. Auflage)*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin.
- Jett, B.D., Huycke, M.M., and Gilmore, M.S.** (1994) Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev.* **7**:462-78.
- Jin, Z., and El-Deiry, W.S.** (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* **4**:139-63.
- Johnsen, P.J., Simonsen, G.S., Olsvik, O., Midtvedt, T., and Sundsfjord, A.** (2002) Stability, persistence, and evolution of plasmid-encoded VanA

- glycopeptide resistance in enterococci in the absence of antibiotic selection in vitro and in gnotobiotic mice. *Microb Drug Resist.* **8**:161-70.
- Karp, G.** (2005) *Molekulare Zellbiologie*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- Kayaoglu, G., and Ørstavik, D.** (2004) Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* **15**:308-20.
- Kayser, F.H., Böttger, E.C., Zinkernagel, R.M., Haller, O., Eckert, J., and Deplazes, P.** (2005) *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie* (11. Auflage), Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- Kirschnek, S., Scheffel, J., Heinzmann, U., and Hacker, G.** (2004) Necrosis-like cell death induced by bacteria in mouse macrophages. *Eur J Immunol.* **34**:1461-71.
- Klare, I., Konstabel, C., Badstübner, D., Werner, G., and Witte, W.** (2003) Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol.* **88**:269–90.
- Kloos, W.E., and Wolfshohl, J.F.** (1991) *Staphylococcus cohnii* subspecies: *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* subsp. nov. and *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticum* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* **41**:284-9.
- Kristich, C.J., Li, Y.H., Cvitkovitch, D.G., and Dunny, G.M.** (2004) Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol.* **186**:154-63.
- Krut, O., Sommer, H., and Krönke, M.** (2004) Antibiotic-induced persistence of cytotoxic *Staphylococcus aureus* in non-phagocytic cells. *J Antimicrob Chemother.* **53**:167-73.
- Kuruvilla, S., Qualls, Jr., C.W., Tyler, R.D., Witherspoon, S.M., Benavides G.R., Yoon, L.W., Dold, K., Brown, R.H., Sangiah, S., and Morgan K.T.** (2003) Effects of minimally toxic levels of carbonyl cyanide P-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), elucidated through differential gene expression with biochemical and morphological correlations. *Toxicol Sci.* **73**:348-61.
- Lee W., Lim, S., Son, H.H., and Bae, K.S.** (2004) Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes. *J Endod.* **30**:209-12.
- Leendertse, M., Willems, R.J., Giebelen, I.A., Roelofs, J.J., van Rooijen, N., Bonten, M.J., and van der Poll, T.** (2009) Peritoneal macrophages are important for the early containment of *Enterococcus faecium* peritonitis in mice. *Innate Immun.* **15**:3-12.
- Li, H., Wang, Y., Ding, L., and Zheng, S.J.** (2011) *Staphylococcus sciuri* exfoliative toxin C (ExhC) is a necrosis-inducer for mammalian cells. *PLoS One* **6**:e23145.
- Lina, G., Piémont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M.O., Gauduchon, V., Vandenesch, F., and Etienne, J.** (1999) Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis.* **29**:1128-32.
- Lowy, F.D.** (2003) Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest.* **111**:1265-73.
- Madigan, M.T., and Martinko, J.M.** (2009) *Brock Mikrobiologie* (11. aktualisierte Auflage), Pearson Studium (Pearson Education Deutschland)

- GmbH, München).
- Miyazaki, S., Ohno, A., Kobayashi, I., Uji, T., Yamaguchi, K., and Goto, S.** (1993) Cytotoxic effect of hemolytic culture supernatant from *Enterococcus faecalis* on mouse polymorphonuclear neutrophils and macrophages. *Microbiol Immunol.* **37**:265-70.
- Montagne, P., Cuillière, M.L., Molé, C., Béné, M.C., and Faure, G.** (1998) Microparticle-enhanced nephelometric immunoassay of lysozyme in milk and other human body fluids. *Clin Chem.* **44**:1610-15.
- Moreillon, P., Entenza, J.M., Francioli, P., McDevitt, D., Foster, T.J., François, P., and Vaudaux, P.** (1995) Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect Immun.* **63**:4738-43.
- Mundy, L.M., Sahm, D.F., and Gilmore, M.** (2000) Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* **13**:513-22.
- Navarre, W.W., and Zychlinsky, A.** (2000) Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies. *Cell Microbiol.* **2**:265-73.
- Oancea, C., Klare, I., Witte, W., and Werner, G.** (2004) Conjugative transfer of the virulence gene, *esp*, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother.* **54**:232-5.
- Oren, I., and Merzbach, D.** (1990) Clinical and epidemiological significance of species identification of coagulase-negative staphylococci in a microbiological laboratory. *Isr J Med Sci.* **26**:125-8.
- Pantůček, R., Götz, F., Doskar, J., and Rosypal, S.** (1996) Genomic variability of *Staphylococcus aureus* and the other coagulase-positive Staphylococcus species estimated by macrorestriction analysis using pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Syst Bacteriol.* **46**:216-22.
- Petersson, K., Forsberg, G., and Walse, B.** (2004) Interplay Between Superantigens and Immunoreceptors. *Scand J Immunol.* **59**:345-55.
- Ruiz-Garbajosa, P., Canton, R., Pintado, V., Coque, T.M., Willems, R., Baquero, F., and del Campo, R.** (2006) Genetic and phenotypic differences among *Enterococcus faecalis* clones from intestinal colonization and invasive disease. *Clin Microbiol Infect.* **2**:1193-98.
- Sachse, S., Seidel, P., Gerlach, D., Günther, E., Rödel, J., Straube, E., and Schmidt, K.H.** (2002) Superantigen-like gene(s) in human pathogenic *Streptococcus dysgalactiae*, subsp. *equisimilis*: genomic localisation of the gene encoding streptococcal pyrogenic exotoxin G (speG(dys)). *FEMS Immunol Med Microbiol.* **34**:159-67.
- Sagel, U., Schulte, B., Heeg, P., and Borgmann, S.** (2008) Vancomycin-resistant enterococci outbreak, Germany, and calculation of outbreak start. *Emerg Infect Dis.* **14**:317-9.
- Schulz zur Wiesch, P., Engelstädter, J., and Bonhoeffer, S.** (2009) Compensation of fitness costs and reversibility of antibiotic resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**:2085-95.
- Shepard, B.D., and Gilmore, M.S.** (2002) Differential expression of virulence-related genes in *Enterococcus faecalis* in response to biological cues in serum and urine. *Infect Immun.* **70**:4344-52.

- Stout, R.D., and Suttles, J.** (2005) Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation of macrophage function by age-associated microenvironmental changes. *Immunol Rev.* **205**:60-71.
- Takahashi, T., Ubukata, K., and Watanabe, H.** (2011) Invasive infection caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*: characteristics of strains and clinical features. *J Infect Chemother.* **17**:1-10.
- Tibra, N.K., Jalali, S., Reddy, A.K., Narayanan, R., and Agarwal, R.** (2010) Traumatic endophthalmitis caused by *Staphylococcus gallinarum*. *J Med Microbiol.* **59**:365-6.
- Timmer, A.M., Timmer, J.C., Pence, M.A., Hsu, L.C., Ghochani, M., Frey, T.G., Karin, M., Salvesen, G.S., and Nizet, V.** (2009) Streptolysin O promotes group A *Streptococcus* immune evasion by accelerated macrophage apoptosis. *J Biol Chem.* **284**:862-71.
- Tsuda, Y., Shigematsu, K., Kobayashi, M., Herndon, D.N., and Suzuki, F.** (2008) Role of polymorphonuclear neutrophils on infectious complications stemming from *Enterococcus faecalis* oral infection in thermally injured mice. *J Immunol.* **180**:4133-38.
- Ulett, G.C., Maclean, K.H., Nekkallapu, S., Cleveland, J.L., and Adderson, E.E.** (2005) Mechanisms of group B streptococcal-induced apoptosis of murine macrophages. *J Immunol.* **175**:2555-62.
- Ulett, G.C., and Adderson, E.E.** (2006) Regulation of Apoptosis by Gram-Positive Bacteria: Mechanistic Diversity and Consequences for Immunity. *Curr Immunol Rev.* **2**:119-41.
- Vandenesch, F., Lebeau, C., Bes, M., Lina, G., Lina, B., Greenland, T., Benito, Y., Brun, Y., Fleurette, J., and Etienne, J.** (1994) Clotting activity in *Staphylococcus schleiferi* subspecies from human patients. *J Clin Microbiol.* **32**:388-92.
- von Eiff, C., Peters, G., and Heilmann, C.** (2002) Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis.* **2**:677-85.
- Werner, G., Coque, T.M., Hammerum, A.M., Hope, R., Hryniewicz, W., Johnson, A., Klare, I., Kristinsson, K.G., Leclercq, R., Lester, C.H., Lillie, M., Novais, C., Olsson-Liljequist, B., Peixe, L.V., Sadowy, E., Simonsen, G.S., Top, J., Vuopio-Varkila, J., Willems, R.J., Witte, W., and Woodford, N.** (2008) Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill.* **13**.
- Wu, J.A., Kusuma, C., Mond, J.J., and Kokai-Kun, J.F.** (2003) Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**:3407-14.
- Xu, P., Alves, J.M., Kitten, T., Brown, A., Chen, Z., Ozaki, L.S., Manque, P., Ge, X., Serrano, M.G., Puiu, D., Hendricks, S., Wang, Y., Chaplin, M.D., Akan, D., Paik, S., Peterson, D.L., Macrina, F.L., and Buck, G.A.** (2007) Genome of the Opportunistic Pathogen *Streptococcus sanguinis*. *J Bacteriol.* **189**:3166-75.
- Zhang, Y.Q., Ren, S.X., Li, H.L., Wang, Y.X., Fu, G., Yang, J., Qin, Z.Q., Miao, Y.G., Wang, W.Y., Chen, R.S., Shen, Y., Chen, Z., Yuan, Z.H., Zhao, G.P., Qu, D., Danchin, A., and Wen, Y.M.** (2003) Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol Microbiol.* **49**:1577-93.

**Ziegler, U., and Groscurth, P.** (2004) Morphological features of cell death.  
*News Physiol Sci.* **19**:124-8.

## 7. Veröffentlichung

**Gröbner, S., Fritz, E., Schoch, F., Schaller, M., Berger, A.C., Bitzer, M., and Autenrieth, I.B.** (2010) Lysozyme activates *Enterococcus faecium* to induce necrotic cell death in macrophages. *Cell Mol Life Sci.* **67**:3331-44.

## 8. Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. med. Sabine Gröbner für die hervorragende Betreuung, ihre Geduld und die freundlichen und ermutigenden Worte über Jahre hinweg bedanken, ohne die ich längst aufgegeben hätte.

Herrn Prof. Dr. I. B. Autenrieth möchte ich für die Überlassung des Themas und für die exzellenten Arbeitsbedingungen am Institut für Medizinische Mikrobiologie danken.

Bei Frau Daniela Gunst möchte ich mich herzlich für ihre Geduld und Hilfestellung in der Einarbeitungsphase bedanken.

Ferner danke ich allen nichtgenannten Institutsmitgliedern für ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft.

Ich danke meinen Eltern, Schwiegereltern und meiner Großmutter für die finanzielle Unterstützung und ihren unermüdlichen Einsatz als Babysitter.

Und insbesondere danke ich meinem Ehemann Daniel Fritz, der mich über den gesamten Zeitraum dieser Arbeit immer wieder ermutigt und mir den Rücken freigehalten hat und ohne dessen tatkräftige Unterstützung und Verzicht auf Freizeit die Fertigstellung dieser Arbeit unmöglich gewesen wäre.

