

---

**Inflammation, Pathogen-Zell-Interaktionen und  
Stamm-Charakterisierung von  
*Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*  
als Erreger der infektiösen Endokarditis**

---

Dissertation zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

**Fakultät für Chemie  
Universität Bielefeld**

vorgelegt von  
**Melanie Weinstock**

---

Bad Oeynhausen  
Juli 2014



Diese Arbeit entstand unter der Leitung von  
**Prof. Dr. med. Cornelius Knabbe**  
am Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin  
Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen  
Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum  
in Bad Oeynhausen  
in der Zeit von Januar 2011 bis Juli 2014.

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Cornelius Knabbe
  2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hartmut Niemann
- Tag der Abgabe: 29.07.2014

## Danksagung

Viele Personen haben mich auf dem Weg zum Gelingen dieser Arbeit unterstützt, allen möchte ich für die Unterstützung danken und einige hier namentlich erwähnen.

Herrn Prof. Dr. med. Cornelius Knabbe danke ich für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für das Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hartmut Niemann (Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie) möchte ich für die Bereitschaft danken, diese Dissertation als Gutachter zu betreuen und zu beurteilen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Tanja Vollmer für die Betreuung während der gesamten Doktorarbeit. Ihre Kompetenz, Hilfs- und Diskussionsbereitschaft haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn OA PD Dr. Jens Dreier bedanke ich mich für seine wertvollen Ratschläge und seine Diskussionsbereitschaft.

Meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen Dr. Dr. Ingvild Birschmann, Christina Brandenburger, Dr. Mareike Dabisch-Ruthe, Birgit Drawe, Jessika Dumke, Marlen Ewald, Dr. Isabel Faust, Tobias Flieder, Imke Grimm, Dr. Doris Hendig, Dr. Dennis Hinse, Bärbel Kammel, Dr. Joachim Kuhn, Dr. Patricia Kuzaj, Christoph Lichtenberg, Dr. Christian Prante, Dr. Christina Roch, Anne-Kathrin Vollmer und Dr. Jan Weile danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, viele gute Ideen und die gute Arbeitsatmosphäre. Auch meiner Forschungspraktikantin Jessika Jegodka möchte ich danken. Mareike, dir gilt wirklich ein besonderer Dank für deine vielfältige und herzliche Unterstützung.

Meinen Kolleginnen Conja Dickhoff, Renate Josting, Esther Lietzau, Evelyn Menke, Kirstin Potthast und Anke Straeten-Barnbeck gilt ein besonderer Dank für die schöne und motivierende Arbeitsatmosphäre im PCR-Labor. Ich habe jeden Tag gern mit euch zusammen gearbeitet.

Auch Freunde und Familie haben mich während dieser Zeit sehr unterstützt. Ein großer Dank gilt Dörthe Albert, die mir bei der Korrektur dieser Arbeit eine große Hilfe war. Besonders möchte ich auch Jessica und Mark Dennis Kellermeier für ihre Rückendeckung in allen Lebenslagen danken. Und auch dir, Tobias, für dein Verständnis, deine Geduld und Unterstützung. Ein großer Rückhalt war für mich, während der Promotionszeit, wie auch schon vorher, immer meine liebe, große Familie. Meinen lieben Eltern, Karin und Michael Weinstock, sowie meiner Schwester Sonja Huber, möchte ich besonders danken – eure Liebe und eure Unterstützung haben diese Arbeit möglich gemacht.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> als Erreger der infektiösen Endokarditis (IE)	4
2.2	Pathophysiologische Aspekte der <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> -bedingten IE	5
2.3	Inflammatorische Parameter und zelluläre Mechanismen der Inflammation in der IE	7
2.4	Virulenzfaktoren der <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> Pathogenese	11
2.5	Einzelnukeotid-Varianten als mögliche Einfluss-Faktoren einer IE	13
2.6	Zielsetzung der Arbeit	15
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>16</b>
3.1	Charakterisierung inflammatorischer Parameter der <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> -bedingten IE	16
3.1.1	Überleben von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> in einem Vollblut-Modellsystem	17
3.1.2	IL6-Induktion durch <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> in einem Vollblut-Modellsystem	23
3.1.3	Inflammatorische Reaktion von Endothelzellen und Monozyten in der <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> -bedingten Endokarditis im Monokultur-Zellkulturmodell	27
3.1.4	Inflammatorische Reaktion von Endothel und Monozyten in der <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> -bedingten Endokarditis im Ko-Kultivierungs-Zellkulturmodell	32
3.1.5	Isolat-spezifische Induktion der Genexpression von <i>IL1B</i> , <i>IL6</i> und <i>IL8</i> bei Inokulation von Monozyten mit <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	36
3.2	Interaktion von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> mit Makrophagen und Thrombozyten	39
3.2.1	Interaktion zwischen Makrophagen und <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	39
3.2.2	Induktion der Thrombozyten-Aggregation durch <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	43
3.3	Analyse von Einzelnukeotid-Varianten in einem Endokarditis-Patienten-Kollektiv	48
3.3.1	Assoziation von Einzelnukeotid-Varianten mit einem Endokarditis-Patienten-Kollektiv	48
3.3.2	Klinisch relevante Laborparameter in Assoziation mit ENV	53
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
4.1	Individuelle <i>Host</i> -Faktoren bei der <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> -IE	57
4.2	Die Beeinflussung der IE-Pathogenese durch ENV in Genen der inflammatorischen Pathogenabwehr	58
4.3	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> -Phänotypen im pathophysiologischen Kontext der IE	61
4.3.1	Überleben in Vollblut durch <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> – ein entscheidender Faktor noch vor Etablierung der Vegetation am Endokard	62
4.3.2	Induktion inflammatorischer Parameter durch <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	65
4.3.3	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> in Kontakt mit Makrophagen und Thrombozyten und die möglichen Folgen für die Vegetationsausbildung	69
4.4	Ausblick	72

---

<b>5 Methoden</b>	<b>74</b>
5.1 Anzucht von Bakterienkulturen	74
5.2 Kryokonservierung von Bakterien	74
5.3 Bestimmung des bakteriellen Titers	74
5.3.1 Bestimmung des Bakterientiters durch Ausplattieren	74
5.3.2 Bestimmung des Bakterientiters durch <i>BactiFlow</i> Messung	74
5.4 Anzucht humaner Zelllinien	75
5.5 Kryokonservierung humaner Zelllinien	75
5.6 Passagieren humaner Zelllinien	76
5.7 Auszählung humaner Zelllinien	76
5.8 Differenzierung von THP-1-Zellen zu Makrophagen	76
5.9 Inokulation von Vollblut mit <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	77
5.9.1 Vitalitätsmessung von Leukozyten in Vollblut	77
5.10 Inokulation von humanen Zelllinien mit <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	78
5.10.1 Inokulation der Endothelzelllinie EA.hy926 mit <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	79
5.10.2 Inokulation der monozytären Zelllinie THP-1 mit <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	79
5.10.3 Inokulation von Ko-Kulturen von Monozyten und Endothel	79
5.11 Aufnahme <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> in Makrophagen und Überlebensrate	80
5.12 Lichttransmissions-basierte Bestimmung der Thrombozyten-Aggregation	81
5.12.1 Herstellung von Plättchen-reichem Plasma und Plättchen-armen Plasma	81
5.12.2 Kontrolle der Thrombozytenfunktion	81
5.12.3 Induktion der Thrombozyten-Aggregation durch <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	82
5.13 RNA-Isolation aus humanen Zelllinien	82
5.14 Bestimmung der RNA-Integrität	83
5.15 cDNA-Synthese aus humaner mRNA	83
5.16 Relative Quantifizierung von Genexpressionen mittels <i>real-time</i> PCR	84
5.17 DNA-Extraktion	86
5.17.1 DNA-Extraktion aus Herzklappengewebe	86
5.17.2 DNA-Extraktion aus Vollblut	86
5.18 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten	87
5.19 Agarose-Gelelektrophorese zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten	87
5.20 Sequenzierung von DNA-Fragmenten	88
5.21 Nachweis von Einzelnukleotid-Varianten mittels Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP)-Analyse	90
5.21.1 Patienten- und Kontrollkollektiv	90
5.21.2 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen-Analyse	91
5.22 Interleukin-6 Bestimmung	92
5.23 Bestimmung des kleinen Blutbildes	93
5.24 Bestimmung der Konzentration des C-reaktiven Proteins in humanem Serum	93
5.25 Bestimmung von Procalcitonin in humanem Serum	94

---

<b>6</b>	<b>Material</b>	<b>95</b>
6.1	Bakterienstämme	95
6.2	Humane Zelllinien	95
6.3	Medien und Reagenzien für die Zellkultur	95
6.4	Medien für die Anzucht von Bakterien	96
6.5	Chemikalien, Reagenzien und Antikörper	96
6.6	Lösungen und Puffer	97
6.7	Enzyme	98
6.8	Geräte	98
6.9	Größenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese	100
6.10	Oligonukleotide	100
6.10.1	Oligonukleotide für die relative mRNA-Quantifizierung	100
6.10.2	Oligonukleotide für die Analyse von Einzelnukleotid-Varianten	101
6.11	Testkits	101
6.12	Sonstige Materialien	102
6.13	<i>Software</i> und Datenbanken	103
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>104</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>106</b>
<b>9</b>	<b>Erklärung</b>	<b>114</b>



# 1 Zusammenfassung

Die infektiöse Endokarditis (IE) ist eine meist durch Bakterien verursachte Entzündung der Herzinnenwand, wobei diese vorwiegend das Herzklappengewebe betrifft. Die Pathogene gelangen über den Blutstrom an das Endokard, adhären an das endokardiale Endothel und bilden dort eine Vegetation aus, wodurch das Gewebe unwiderruflich geschädigt werden kann. *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wird in ca. 20 % der Streptokokkenbedingten Endokarditiden als kausatives Pathogen nachgewiesen. Die zugrunde liegenden Pathomechanismen der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-IE und die Wechselwirkungen zwischen humanen Zellen und dem Pathogen sind allerdings bislang noch weitgehend ungeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in mehreren Modellsystemen die Interaktion verschiedener *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate mit humanen Zellen im inflammatorischen Kontext der IE untersucht. In einem Vollblut-Modellsystem konnte der Vergleich von drei Probanden zeigen, dass die Wachstumskinetik von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* durch individuelle *Host*-Faktoren beeinflusst wird. Hierbei konnte ein *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolat (DSM16831) identifiziert werden, welches im Vollblut-Modellsystem im Gegensatz zu den anderen untersuchten Isolaten eine verringerte Wachstumsrate aufwies. Der Vergleich des Induktionspotentials verschiedener *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate von Interleukin-6 (IL6) im Vollblut-Modellsystem lässt ebenfalls vermuten, dass dieses Isolat die Inflammation früher induziert. Des Weiteren konnte in Zellkultur-Modellsystemen nachgewiesen werden, dass in der monozytären Zelllinie THP-1 die Genexpression der inflammatorischen Zytokine Interleukin-1 $\beta$  (*IL1B*), *IL6* und Interleukin-8 (*IL8*) durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* innerhalb von 6 h induziert wurde. Im Stammvergleich konnten zwei Isolate (010672/01 und AC1181) identifiziert werden, welche diese inflammatorischen Marker signifikant geringer induzierten, während ein Isolat (013366/01) die Genexpressionen der untersuchten Parameter stark induzierte. Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit in einem Makrophagen-Zellkultur-Modellsystem nachgewiesen, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate eine starke Varianz bezüglich der Aufnahme durch Makrophagen zeigen. Hierbei zeigte ein Isolat (AC6827) eine besonders geringe Phagozytoserate. Außerdem wurde die durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-induzierte Thrombozyten-Aggregation untersucht. Hierbei wurde eine starke interindividuelle Variabilität zwischen den Probanden deutlich, wobei trotz dessen Stamm-abhängige Phänotypen für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nachgewiesen werden konnten.

Um die individuelle *Host*-Komponente der Inflammation in der IE zu untersuchen, wurden 14 Einzelnukleotid-Varianten (ENV) auf ihre Assoziation mit einer IE Patientenkohorte hin untersucht. Für *IL6* c.471+870G>A konnte der heterozygote Genotyp im Patientenkollektiv signifikant häufiger nachgewiesen werden. Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen ENV und der Leukozytenzahl (WBC), sowie der Konzentration von Procalcitonin und dem C-reaktiven Protein bei Endokarditispatienten nachgewiesen werden. Insbesondere die Assoziation des heterozygoten Genotyps des endothelialen Selektins c.-19 GT mit signifikant erhöhten WBCs der Patienten vor einer chirurgischen Intervention zeigt einen interessanten Aspekt der möglichen Beeinflussung der Inflammation einer IE durch ENV.

## Abstract

Infective endocarditis (IE) is a multifactorial infection process and mostly bacteria account for the infection of endocardial structures. After entering the bloodstream, bacteria adhere to the heart valves. The inflammatory host response could have important influence on the establishment of the persisting vegetation. *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* is an emerging pathogen in IE and was identified in up to 20% of *streptococcal*-induced IE cases. However, virulence mechanisms and the pathophysiological aspects of *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-induced IE are still not clarified.

In this work, different model systems were established to analyze the interaction of *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* with human cells involved in host response. First, a whole blood model was used for determining the survival of different *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* isolates. In this model, an individual proband and isolate-specific kinetic of bacterial growth was shown. However, growth of one *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* isolate (DSM16831) seemed to be inhibited in comparison to other strains. Additionally, it was determined by measurement of the induction of interleukin-6 (IL6) in the whole blood model that the same isolate seemed to induce the host response earlier than the other strains. Furthermore, a monocyte cell line (THP-1) was used to compare the stimulation potential of gene expression of inflammatory genes (interleukin-1 $\beta$  (*IL1B*), *IL6* and interleukin-8 (*IL8*)) by different *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* strains. Two isolates (AC1181 and 010672/01), which induced gene expression significantly lower than other isolates, were identified. However, one isolate (013366/01) represented a strong stimulating agent regarding the induction of *IL1B*, *IL6* and *IL8* gene expression in monocytes.

Furthermore, a macrophage cell culture model showed that different *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* strains had divergent potential to be phagocytized by macrophages. One isolate (AC1181) showed significant lower rates of phagocytosis than others. As the induction of platelet aggregation by bacteria was described as a virulence factor for IE, a comparison of different isolates was performed regarding their potential to induce platelet aggregation. Four different probands were used for this assay and an individual response of platelets to different *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* isolates was revealed. Nevertheless, hints towards strain-dependent phenotypes regarding the potential to stimulate platelet aggregation were observed.

Additionally, the individual inflammatory host response in IE was examined by an association study of single nucleotide variants (SNVs) in candidate genes of the inflammatory host response. A significant higher frequency of heterozygote genotype of SNV *IL6* c.471+870G>A was detected in IE-patients. Furthermore, an association of disease-related biomarkers revealed influence of distinct SNVs to white blood cell count and the concentration of C-reactive protein and procalcitonin. For example, the heterozygote genotype of selectin E c.-19 GT was associated with higher white blood cell counts of patients group. This association leads to the assumption that SNVs could also have an influence on the inflammatory response in IE.

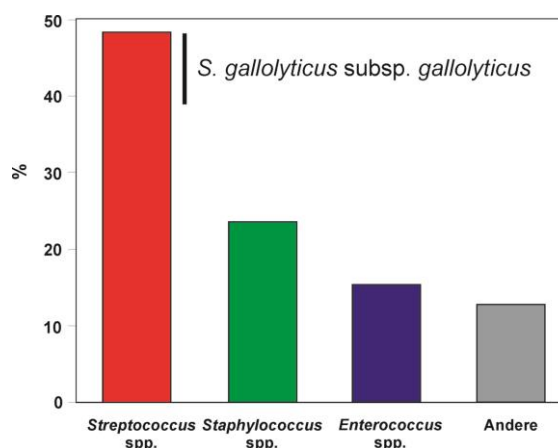
## 2 Einleitung

Die infektiöse Endokarditis (IE) ist eine mikrobiell bedingte Infektion des Endokards (Herzinnenwand), wobei meist die Herzklappen (nativ oder Herzklappenprothesen) von der Kolonisierung durch Pathogene betroffen sind (Cavassini *et al.* 2002). Die derzeitige Inzidenz wird mit drei bis neun Erkrankungen pro 100.000 Einwohner beschrieben (Hoen und Duval 2013). Unbehandelt verläuft eine IE meist letal. Das Erregerspektrum einer IE ist breit gefächert, allerdings sind meist Streptokokken, Staphylokokken und Enterokokken die ursächlichen bakteriellen Erreger der IE (Hoen und Duval 2013).

Die klinischen Manifestationen einer IE sind oft unspezifisch und erschweren so die Diagnostik. Die Hauptkriterien zur Diagnostik beinhalten mikrobiologische Untersuchungen sowie den echokardiographischen Nachweis der Vegetation (McDonald 2009). Hierbei ist der Nachweis des Erregers über Anzucht in Blut- oder Gewebekultur und anschließender Identifizierung essentiell für die Patienten, da der schnelle Einsatz einer adäquaten Antibiose entscheidend für die therapeutische Intervention der IE ist. Die Weiterentwicklung molekularbiologischer Techniken ermöglicht einen Nachweis der Erreger in Herzklappengewebe mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*), wobei die schnelle Erregeridentifizierung einen großen Vorteil gegenüber dem Nachweis in Blutkulturen und anschließender mikrobiologischen klassischen Identifizierung darstellt (Vollmer *et al.* 2010). Ebenso kann der Nachweis über PCR erbracht werden, wenn die abgenommenen Blutkulturen keinen Erregernachweis erbringen, da durch eine bereits bestehende Antibiose keine vermehrungsfähigen Bakterien mehr vorhanden sind (KNE, Kulturnegative Endokarditis). In der Laboratoriumsmedizin sind die typischen Infektions-assoziierten Parameter wie die Leukozytenzahl (WBC, *white blood cells*), die Konzentration des C-reaktiven Proteins (CRP), aber auch die Konzentration von Interleukin-6 (IL6) im Serum der IE-Patienten erhöht (Cornelissen *et al.* 2013; Wallace *et al.* 2002). Hohe CRP-Konzentrationen im Zusammenhang mit dem Nachweis von großen endokardialen Vegetationen der Patienten konnten mit einem erhöhten Risiko für embolische Ereignisse assoziiert werden (Mangoni *et al.* 2003). Weiterhin ist auch die Konzentration des Lipopolysaccharid-bindenden Proteins (LBP) im Serum der IE-Patienten erhöht, wobei eine Einschätzung des Erfolgs der therapeutischen Intervention anhand der Verlaufswerte möglich ist (Vollmer *et al.* 2009a). Auch die Procalcitonin (PCT)-Konzentration ist bei Endokarditis-Patienten erhöht, wobei dieser Laborparameter zur Verlaufskontrolle, sowie als Indikation eines Herzklappenersatzes genutzt werden kann (Kocazeybek *et al.* 2003). Die abnormale Erhöhung der PCT-Konzentration bei IE-Patienten soll die Prädiktion eines

erhöhten Schweregrades der IE ermöglichen und wird mit einer schlechten Verlaufsprognose assoziiert (Cornelissen *et al.* 2013).

Im Rahmen der molekulargenetischen Erregeridentifizierung in Herzklappengewebe im Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin des Herz- und Diabeteszentrum NRW wurde von 2001 bis 2009 durch Vollmer *et al.* das Erregerspektrum der IE näher aufgeschlüsselt (Abbildung 2.1).



**Abbildung 2.1:** Erregerspektrum (in %) der Studie zum molekulargenetischen Erregernachweis aus exzidiertem Herzklappenmaterial im Herz- und Diabeteszentrum NRW (Vollmer *et al.* 2010).

Die spezifische Identifizierung der Erreger zeigte, dass *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in ca. 20 % der durch Streptokokken-bedingten Endokarditiden als kausatives Pathogen nachgewiesen werden kann. Die pathophysiologischen Aspekte der durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-induzierten IE sind bisher allerdings noch weitgehend ungeklärt.

## 2.1 *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* als Erreger der infektiösen Endokarditis (IE)

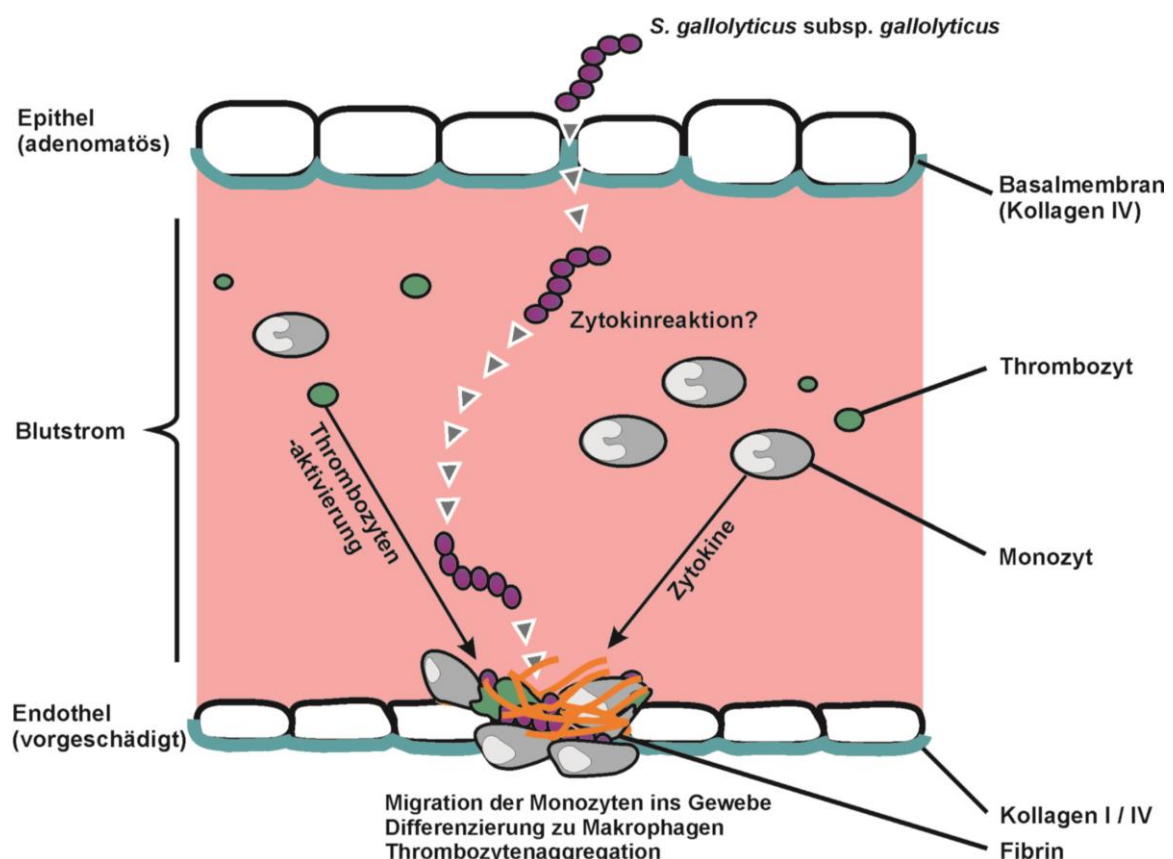
*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (ehemals *S. bovis* Biotyp I) ist ein gram-positiver Streptokokke der Lancefield Gruppe D und wird auch als Kommensale im gesunden Gastrointestinaltrakt des Menschen nachgewiesen, wobei die Angaben der Kolonisierungsrate stark variieren (Sillanpää *et al.* 2009). Das fakultative Pathogen wird aus Blut oder Fäzes isoliert und nicht nur im Menschen, sondern ebenso in der Tierwelt (Nutztiere, Beuteltiere, Vögel) nachgewiesen (Schlegel *et al.* 2003). Mögliche Transmissionswege sind allerdings bislang noch ungeklärt.

Als Pathogen wird *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nicht nur in der IE beschrieben. Ebenso kann bei anderen Säugern eine Mastitis, aber auch septische Erkrankungen auf den Erreger

zurückgeführt werden (De Herdt *et al.* 1994; Garvie und Bramley 1979). Weiterhin sind einzelne Fälle bekannt, in denen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* als kausatives Pathogen einer Infektion der Gallengänge nachgewiesen werden konnte (Corredoira *et al.* 2014). Besondere Aufmerksamkeit erhielt der Erreger durch den Nachweis einer Assoziation der durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-bedingten IE und dem Auftreten von kolorektalen malignen Veränderungen (Boleij *et al.* 2011a; Klein *et al.* 1977). Die allgemeine Prävalenz für kolorektale Karzinome in Patientenkohorten mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Infektionen erwies sich als deutlich gesteigert (Krishnan *et al.* 2014; Boleij *et al.* 2011a).

## 2.2 Pathophysiologische Aspekte der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-bedingten IE

Die Untersuchungen zur spezifischen Assoziation der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-bedingten IE und dem Auftreten von kolorektalen Karzinomen führten zu einer Hypothese, welche den pathologischen Zusammenhang der beiden Krankheiten darstellt (Abbildung 2.2) (Boleij *et al.* 2011).



**Abbildung 2.2:** Pathophysiologischer, hypothetischer Zusammenhang zwischen der durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-bedingten IE und malignen Veränderungen im humanen Kolon (modifiziert nach Boleij *et al.* 2011, Benoit *et al.* 2010 und Moreillon *et al.* 2002).

*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* adhärert im Darmlumen an das Epithel und gelangt über einen parazellulären Transport in den Blutstrom (Boleij *et al.* 2011). Die inflammatorische Reaktion im Blutstrom ist noch weitestgehend unbekannt. Die Bakterien werden über den Blutstrom an das endokardiale Endothel transportiert, wo sie adhäreren können. Es kommt zur Anlagerung von Thrombozyten, sowie zur Aktivierung inflammatorischer Parameter, welche die Migration von Makrophagen ins Gewebe fördern (Moreillon *et al.* 2002). Abdulmir *et al.* konnten bereits zeigen, dass die Kolonisierungsrate in Patienten mit kolorektalen malignen Veränderungen deutlich höher ist gegenüber der Kolonisierungsrate von Kontrollgewebe gesunder Probanden (Abdulmir *et al.* 2010). Es besteht die Hypothese, dass bestimmte Adhäsine der Bakterien eine Adhäsion und Kolonisierung des Tumorgewebes begünstigen (Abdulmir *et al.* 2011). Wichtige Aspekte sind hierbei die nachgewiesene Adhäsion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* an die Kollagene I, II und IV (Vollmer *et al.* 2010). Bei der Interaktion mit Kollagenen konnte bereits ein genomischer Pili-Locus von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* als entscheidender Virulenzfaktor identifiziert werden (Danne *et al.* 2011). Weiterhin konnten Boleij *et al.* ein *Histone-like* Protein A (*hlpA*) identifizieren, welches die Adhäsion an Heparansulfat bei der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Interaktion mit humanen Zellen vermitteln könnte (Boleij *et al.* 2009).

Der Eintritt in den Blutstrom ist eine Voraussetzung für die Etablierung einer IE am Endokard, wobei hier bereits inflammatorische Zellen in direkten Kontakt mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* kommen. Die Erkennung der Pathogene wird über Rezeptoren der Leukozyten vermittelt, welche unter dem Begriff der *pathogen recognition receptors* (PRR) zusammengefasst werden. Bei der Detektion der bakteriellen Strukturen (*pathogen associated molecular pattern*, PAMPs) sind *Toll-like* und *NOD-like* Rezeptoren beteiligt (TLR bzw. NLR). Es sind bisher zehn humane TLR sowie zwei humane NLR beschrieben (Takeuchi und Akira 2010). Über die Aktivierung der PRRs wird die pro-inflammatorische Zytokinreaktion humaner Zellen induziert (Takeuchi und Akira 2010; Mäkelä *et al.* 2009). Die im Blut zirkulierenden Bakterien gelangen an das Endokard, wo eine vorherige Schädigung der endokardialen Strukturen in hohem Ausmaß die Adhäsion der Bakterien begünstigt. Eine Vorschädigung des Endokards führt zu einer so genannten NBTE (nicht bakterielle thrombotische Endokarditis), bei welcher sich eine sterile Vegetation aus Fibrin und Thrombozyten gebildet hat, welche die Gewebeschädigung eingrenzen sollen. Das Fibrin-Thrombozyten-Netz dient allerdings, neben den durch die Schädigung exponierten Komponenten der extrazellulären Matrix (*extracellular matrix*, ECM), gleichermaßen als initialer Adhäsionspunkt für Bakterien. Für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* konnte ebenso wie für Kollagen auch die Fähigkeit zur Adhäsion an Fibrinogen nachgewiesen werden (Vollmer *et al.* 2010). Nach Adhäsion der Bakterien an die kardialen Strukturen werden

sowohl die Zytokin-Synthese der Monozyten als auch die Thrombozyten-Aktivierung (siehe Abbildung 2.2) weiter induziert. Über die Zytokinsynthese werden angrenzende Endothelzellen aktiviert und zur Expression von Adhäsionsmolekülen angeregt. Die stimulierten Adhäsionsmoleküle dienen der Adhäsion von Immunzellen, wie den Monozyten, welche nach Adhäsion ins Gewebe migrieren und nach Differenzierung zu Makrophagen den Erreger phagozytieren und abtöten. Das dichter werdende Netz aus Thrombozyten und Fibrin, welches der Gewebeschädigung entgegenwirken soll, führt allerdings gleichermaßen zu einem Schutz der Bakterien vor rekrutierten Immunzellen, da diese von der sich etablierenden Vegetation abgeschirmt werden (Moreillon *et al.* 2002). Die Vegetation kann also geschützt im Netzwerk aus Thrombozyten und Fibrin etablieren und persistieren. Unbehandelt führt dies zu einer starken Schädigung des umliegenden Klappengewebes.

### 2.3 Inflammatorische Parameter und zelluläre Mechanismen der Inflammation in der IE

Die inflammatorischen Parameter einer IE werden durch eine lokale Entzündungsreaktion beschrieben. Der in Abbildung 2.3 dargestellte Ablauf der Ausbildung einer Vegetation, welche in Konsequenz zur Destruktion des Klappengewebes führt, zeigt die Involvierung verschiedenster Zelltypen und deren Reaktion auf die bakterielle Kolonisierung (Cavassini *et al.* 2002).

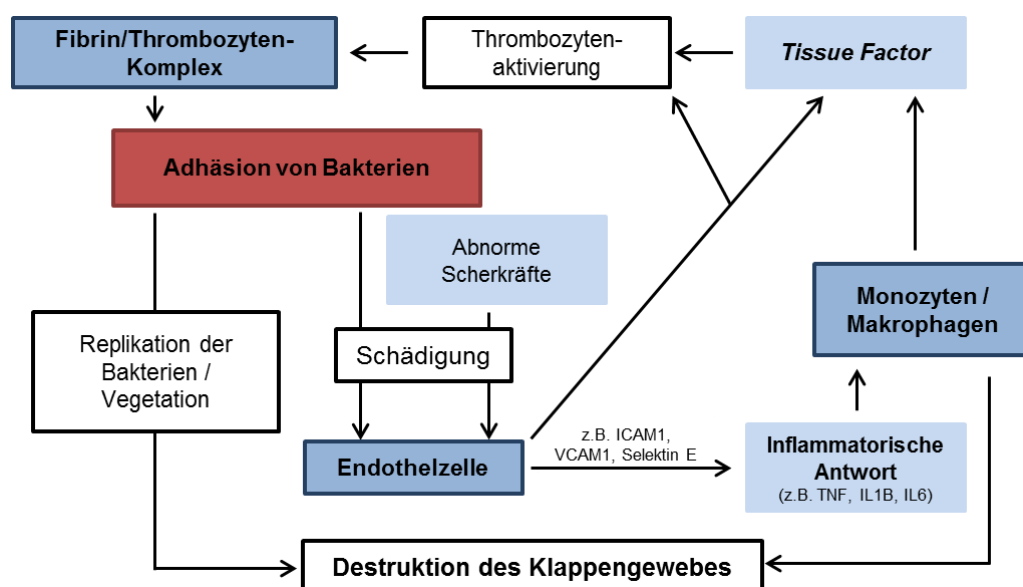


Abbildung 2.3: Etablierung einer bakteriellen Vegetation (modifiziert nach Cavassini *et al.* 2002).

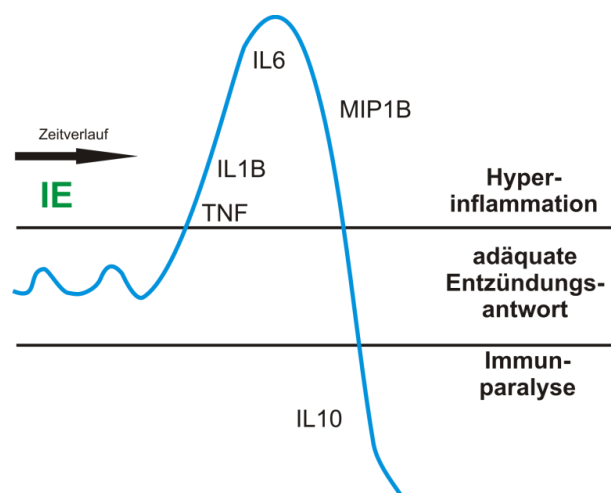
Eine Schädigung des Klappengewebes führt ihrerseits zur Expression von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen, welche zum einen über Monozyten und Gewebethromboplastin (*tissue factor*, TF) und zum anderen auch direkt zur Aktivierung der

Thrombozyten führt. Wie bereits einleitend erwähnt, etabliert sich ein Fibrin-Thrombozyten-Netzwerk, welches der Schädigung entgegenwirken soll. Über Verletzungen der Haut oder Schleimhäute gelangen Bakterien in den Blutstrom und so zum Endokard. Bei bakterieller Adhäsion wird die lokale Entzündungsreaktion weiter stimuliert.

Eine besondere Rolle spielen hierbei Adhäsionsmoleküle. Adhäsionsmoleküle ermöglichen den endothelialen Zellen die aktive Rekrutierung inflammatorischer Zellen, so dass sie an der inflammatorischen Reaktion teilnehmen können. Hierbei sind das *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM1), *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM1) und das endotheliale Selektin E (SELE) von großer Bedeutung. Die Expression der Adhäsionsmoleküle ist ihrerseits durch pro-inflammatorische Zytokine sowie oxidative Sauerstoffspezies reguliert (Cook-Mills *et al.* 2011; Haraldsen *et al.* 1996). Alle drei Adhäsionsmoleküle können in Herzklappengewebe von IE-Patienten nachgewiesen werden (Müller *et al.* 2000). Ebenso kann bei *Staphylococcus aureus* Endokarditispatienten für die löslichen Formen von VCAM1 und SELE eine deutliche Steigerung der Serumkonzentration gegenüber einem Kontrollkollektiv (Patienten mit *S. aureus*-Bakteriämie, aber keiner Endokarditis), nachgewiesen werden, so dass eine Überprüfung der Moleküle als Marker für das Risiko der Entwicklung einer akuten Endokarditis in Frage gestellt wurde (Söderquist *et al.* 1999). Es konnte in Mausmodellen gezeigt werden, dass die Defizienz von Adhäsionsmolekülen eine deutlich geschwächte Abwehr von Pathogenen nach sich zieht (Munoz *et al.* 1997). Die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel wird durch die Adhäsionsmoleküle vermittelt (Kunkel und Ley 1996).

Die pro-inflammatorischen Zytokine werden durch Detektion der Pathogene über PRRs induziert. In Abbildung 2.4 ist der hypothetische Verlauf der Inflammation aufgezeigt (Grimminger *et al.* 1997). Eine IE geht immer mit einer leichten Bakteriämie einher, wodurch der dargestellte Verlauf, adaptiert vom inflammatorischen Ablauf bei einer Sepsis, für den Zeitverlauf der mit einer IE einhergehenden Induktion inflammatorischer Parameter adaptierbar ist. Bei lokalen Infektionen sind die pro-inflammatorischen Zytokine, zu welchen der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF), die Interleukin-1-Familie (Interleukine-1 $\alpha/\beta$  - IL1A/IL1B), sowie das Interleukin-6 (IL6) gehören, die ersten ausgeschütteten Zytokine. Die pleiotrop wirkenden Moleküle werden durch bakterielle Strukturen, wie Lipoteichonsäuren (LTA), aber auch Lipopolysaccharide (LPS) induziert, wobei die IL6-Synthese erst nach Expression von TNF und IL1B nachzuweisen ist (Tsigou *et al.* 2014; Andreasen *et al.* 2008; Grimminger *et al.* 1997).





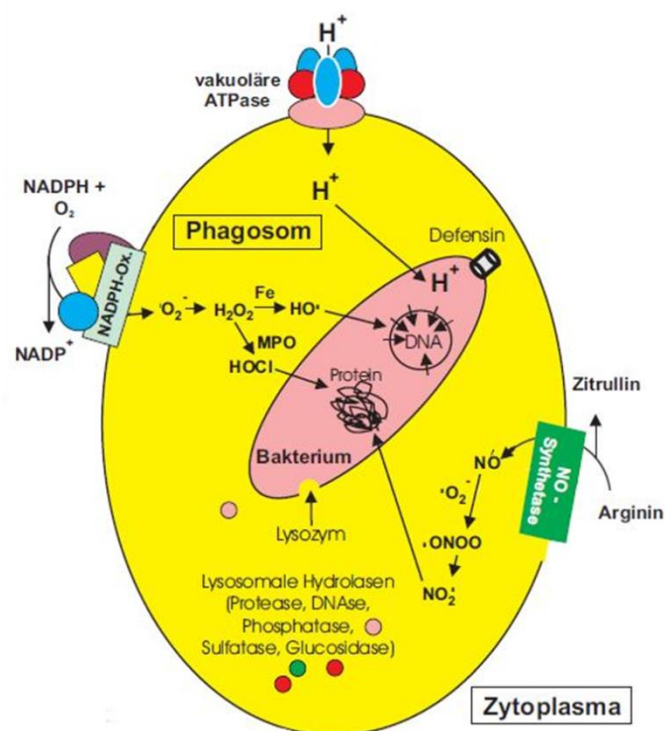
**Abbildung 2.4:** Zeitverlauf der Immunreaktion bei akuten inflammatorischen Prozessen (modifiziert nach Grimminger *et al.* 1997) IL: Interleukin; MIP1B: *Macrophage inflammatory Protein-1 $\beta$* ; TNF: Tumornekrosefaktor.

Die Aktivierung pro-inflammatorischer Zytokine hat verschiedenste Funktionen. Es wird die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen induziert, wobei diese der Rekrutierung von Leukozyten zum Infektionsherd dienen (Barton *et al.* 2008; Haraldsen *et al.* 1996). Interessanterweise konnte bereits gezeigt werden, dass das Zytokinprofil im Serum der Patienten Aussagen über den Verlauf der IE zulässt. Bustamante *et al.* konnten bei Prothesenendokarditiden mit schlechtem Verlauf deutlich höhere Konzentrationen von IL6 und IL8 nachweisen (Bustamante *et al.* 2014). Für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ist die inflammatorische Reaktion bei Eintritt in den Blutstrom, sowie dem Kontakt mit dem Endokard bislang noch nicht charakterisiert.

Weiterhin wird sowohl die Expression von Chemokinen, wie das *Macrophage inflammatory Protein-1 $\beta$*  (MIP1B), das *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP1) und Interleukin-8 (IL8), induziert, aber auch die Akut-Phase-Reaktion stimuliert, welche der systemischen Abwehr dient (Grimminger *et al.* 1997; Rahimpour *et al.* 1999). Die Induktion der Chemokine führt zur vermehrten Rekrutierung von Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten zum Infektionsherd, welche zelluläre Komponenten der Inflammation darstellen (Sprague und Khalil 2009; Maurer und Von Stebut 2004; Menten *et al.* 2002; Rollins 1996). Die Akut-Phase-Reaktion wird durch IL6 induziert und führt zu den bei der IE typischen unspezifischen Symptomen wie Fieber oder allgemeiner Schwäche. Ebenso wird die Synthese anti-inflammatorischer Zytokine induziert (z. B. IL10 und IL4), welche das Ausmaß der Inflammation begrenzen (Schulte *et al.* 2013; Grimminger *et al.* 1997).

Durch chemotaktische Gradienten werden Leukozyten zum Infektionsherd rekrutiert, wobei hier insbesondere die Phagozytose der Mikroorganismen durch Makrophagen einen entscheidenden Abwehrmechanismus darstellt. Um am Infektionsherd aktiv

Mikroorganismen zu phagozytieren, müssen die Phagozyten aus dem Blutstrom austreten und ins Gewebe migrieren. Hierbei ist die Interaktion der Leukozyten mit den Endothelzellen entscheidend. Die Phagozyten „rollen“ über aktiviertes Endothel durch Interaktion von Glykoproteinliganden und Selektinen. Durch Aktivierung wird die feste Bindung durch zelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM1, VCAM1) gewährleistet. Die Transmigration wird durch Integrine sowie *junctional adhesion molecules* (JAMs) vermittelt (Bestebroer *et al.* 2010). Makrophagen können Mikroorganismen phagozytieren und im Phagosom über Fusion mit einem Lysosom (Bildung des Phagolysosoms) über Ansäuerung, reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies, sowie verschiedene Hydrolasen abbauen (Abbildung 2.5) (Haas 2002).



**Abbildung 2.5:** Darstellung der Mechanismen, welche im Phagosom (gelb) zum Abbau des Bakterium (rosa) führen. Hierzu zählen die Ansäuerung des Milieus und die Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies. Lysozym und saure Hydrolasen dienen dem Abbau bakterieller Strukturen (aus Haas, 2002).

Neben den Makrophagen sind ebenso die Thrombozyten wichtige zelluläre Komponenten bei der Etablierung einer IE. Zum einen dient ein Thrombozyten-Fibrin-Gerinnsel bei Vorschädigung des Endokards, wie bereits beschrieben, als initialer Adhäsionspunkt für Mikroorganismen. Andererseits wird oftmals ein als „Thrombozyten-Bakterien-Paradoxon“-bezeichnetes Phänomen beschrieben, welches insbesondere bei der IE eine Rolle spielt (Widmer *et al.* 2006). Hierbei besteht die Hypothese, dass die Aggregation der Thrombozyten die Ausbildung einer IE begünstigt, wohingegen die Thrombozyten selbst eigentlich durch Zytokinausschüttung und mikrobizide Proteine anti-inflammatorische Zellen sind. Es wird beschrieben, dass nach Adhäsion der Bakterien und der weiteren Anlagerung

von Thrombozyten und Fibrin, das Netzwerk aus Zellen die Bakterien vor der zellulären Antwort schützt. Weiterhin ist für viele Mikroorganismen (z. B. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*) bekannt, dass die Thrombozyten-Aggregation durch Kontakt der Bakterien mit Thrombozyten (direkt oder indirekt über Brückenmoleküle) aktiviert wird (Yeaman 2010; Widmer *et al.* 2006; Heilmann *et al.* 2004). Die Induktion der Thrombozyten-Aggregation durch Bakterien wird dabei als möglicher Virulenzfaktor für die Etablierung einer IE gesehen (Jung *et al.* 2012; Sullam *et al.* 1996; Herzberg *et al.* 1992). Während diese Aspekte den Eindruck vermitteln, dass die Thrombozyten die Etablierung einer Vegetation fördern, so sind diese gleichermaßen anti-inflammatorisch aktiv. Es ist bekannt, dass Thrombozyten Granula enthalten, welche bei Aktivierung sekretiert werden. Neben der weiteren Ausschüttung diverser Chemokine und inflammatorischer Mediatoren, enthalten Thrombozyten auch direkt mikrobizid wirkende Substanzen (*platelet derived microbicidal proteins*, PMP) (Klinger und Jelkmann 2002). Die Sensitivität gegenüber der PMPs können Einfluss auf die Vegetationsausbildung bei einer IE zeigen (Mercier *et al.* 2000; Wu *et al.* 1994). Die Interaktion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* mit Thrombozyten ist bisher noch nicht beschrieben.

Die Interaktion bakterieller Zellen mit inflammatorischen Zellen und der daraus resultierenden Reaktion des Wirtes sind von verschiedenen bakteriellen Virulenzfaktoren beeinflusst, welche im Folgenden näher beschrieben werden.

#### **2.4 Virulenzfaktoren der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Pathogenese**

Die Pathobiochemie der durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-induzierten IE ist bislang nur in Ansätzen aufgeklärt. Durch verschiedene Arbeiten, die insbesondere den Fokus auf die Assoziation zu kolorektalen Neoplasien legen, werden allerdings immer mehr Virulenzfaktoren beschrieben, welche ermöglichen, die Pathogenese der durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-bedingten Infektionen näher charakterisieren.

Sowohl die genetische Identifizierung einzelner Virulenzgene, aber auch die Genomsequenzierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, ermöglichten die sukzessive Identifizierung verschiedener MSCRAMMs (*microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules*), welche die Adhäsion der Bakterien an ECM-Moleküle vermitteln, sowie anderer Virulenzfaktoren, welche die Pathogenese beeinflussen (Hinse *et al.* 2011; Rusniok *et al.* 2010; Sillanpää *et al.* 2009). Die Adhäsion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen an verschiedenste Zielmoleküle, wie Kollagen I, IV, V, Fibrin und Thrombin wurde bereits durch verschiedene Arbeiten untersucht (Abdulmir *et al.* 2011; Vollmer *et al.* 2010). Es konnte im Zuge dessen nachgewiesen werden, dass verschiedene

Stämme des Erregers unterschiedliches Potential zu Adhäsion und Invasion an bzw. in Endothelzellen zeigen (Vollmer *et al.* 2010). Die unterschiedliche genetische Ausstattung der Isolate sowie die divergente Expression auf Proteinebene bedingen mit hoher Wahrscheinlichkeit diese unterschiedlichen Phänotypen.

Für die Vermittlung der Adhäsion konnte für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bereits das Vorhandensein der Virulenz-assoziierten Gene *gtf* (kodiert für eine Glykosyltransferase), *pilB* (kodiert für die große Untereinheit des Pilus-Proteins) und *fimB* (kodiert für das Lipoprotein Rezeptor Antigen I) nachgewiesen werden (Vollmer *et al.* 2010). Über diese Proteine kann die Adhäsion an Zelloberflächen vermittelt werden (Dramsi *et al.* 2006; Vacca-Smith *et al.* 1994). Interessanterweise konnte bei *Streptococcus mutans* gezeigt werden, dass ein *knock-out* der Glykosyltransferase Einfluss auf die IL6-Expression zeigt, so dass den Glykosyltransferasen ein Einfluss auf die akute Inflammation bei Ausbildung der IE am Endokard zugesprochen wird (Shun *et al.* 2005). Die entscheidende Rolle des *pilB* Genes wurde bereits bei *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* untersucht. Es konnte bei dem *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolat UCN34 eine heterogene Pili-Expression nachgewiesen werden, welche Einfluss auf das Überleben in Vollblut sowie die Phagozytoserate der Bakterien durch Makrophagen hat (Danne *et al.* 2014).

Die Sequenzierung der Isolate UCN34 und dem Isolat 013366/01 zeigt außerdem verschiedene Gene, welche die Virulenz der Isolate beeinflussen können (Hinse *et al.* 2011; Rusniok *et al.* 2010). Hierzu gehören beispielsweise verschiedene Glykosyltransferasen, verschiedene Oberflächenproteine (LPxTG-Motiv kodierende Gene) und Kapselgene. Im Herz- und Diabeteszentrum NRW steht eine große Stammsammlung an *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten zur näheren Charakterisierung Stamm-spezifischer Divergenzen der Stämme zur Verfügung. Durch Etablierung eines *Microarrays* auf Basis der Genomsequenzierungen konnte das Stammkollektiv des Herz- und Diabeteszentrum NRW genotypisch auf das Vorhandensein von Kapselgenen oder kollagenbindenden Genen hin untersucht werden. Es zeigten sich dabei genotypische Cluster, die allerdings nur begrenzt phänotypisch korreliert werden konnten (Hinse 2012).

Phänotypisch konnten ebenso bereits diverse Unterschiede zwischen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten aufgeführt werden. Im Rahmen eines Vollblut-Assays konnte gezeigt werden, dass verschiedene Isolate ein unterschiedliches Induktionspotential für die TNF-Synthese zeigen (Weinstock 2010). Divergenzen in der Induktion der Inflammation könnten die Virulenz der Isolate beeinflussen. Shun *et al.* äußerten beispielsweise erste Vermutungen über einen Zusammenhang zwischen der Expression von IL6 in der frühen Phase der Endokarditis und der Überlebensrate im Tiermodell (Shun *et al.* 2005). Da die

Orchestration der Inflammation ein fein abgestimmter Prozess ist, ist naheliegend, dass eine Veränderung einzelner inflammatorischer Parameter deutliche Auswirkungen auf die Etablierung der Vegetation mit sich bringen könnte.

Ebenso wurden bereits starke phänotypische Divergenzen bezüglich der Schleimbildung und Polysaccharid-Kapselsynthese für verschiedene *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate nachgewiesen (Wandrer 2013). Die hier nachgewiesenen Phänotypen könnten einen starken Einfluss auf die Adhärenz der Isolate an Zielzellen oder dem Schutz der Isolate vor der zellulären Inflammation zeigen (Feng *et al.* 2012; Hyams *et al.* 2010; De Velasco *et al.* 1995). Im Hinblick auf die zelluläre Inflammation konnte bereits von Boleij *et al.* gezeigt werden, dass das *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolat UCN34 nach Phagozytose im Vergleich zu anderen Bakterien (*Bacillus subtilis* und *Lactobacillus plantarum*) länger in Makrophagen nach Phagozytose überleben kann (Boleij *et al.* 2011). Ob die nachgewiesenen Unterschiede bezüglich der Kapsel- und/oder Schleimbildung bei *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten Stamm-spezifische Unterschiede bei Interaktion mit Makrophagen hervorrufen ist bislang noch unbekannt.

Die Auswirkung der Virulenzfaktoren von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Hinblick auf die Etablierung der Vegetation am Endokard sind bisher noch weitestgehend ungeklärt. Ebenso ist die Assoziation der durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-bedingten IE und kolorektalen Neoplasien sowie der bakterielle Einfluss auf die Kolon-Tumorgenese durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* noch nicht vollständig geklärt (Abdulmir *et al.* 2011).

## 2.5 Einzelnukleotid-Varianten als mögliche Einfluss-Faktoren einer IE

Die vorangegangenen Ausführungen bezüglich der inflammatorischen Parameter in der IE zeigen, dass die Virulenz eines Pathogens nicht nur durch die bakteriellen Virulenzfaktoren bedingt ist. Ebenso ist die inflammatorische Antwort, die von humaner Seite aus eine individuelle Reaktion darstellt, ein entscheidender Faktor, welcher die Suszeptibilität gegenüber bakterieller Erreger und die Etablierung einer IE beeinflussen könnte. Im Zusammenhang mit der individuellen inflammatorischen Reaktion auf Infektionen sind bereits diverse Studien bezüglich des Einflusses von Einzelnukleotid-Varianten (ENV) in Genen der inflammatorischen Antwort in Assoziation mit der Suszeptibilität gegenüber einer Sepsis und/oder der Assoziation von ENV mit dem Schweregrad bzw. der Mortalität einer Sepsis durchgeführt worden (Kothari *et al.* 2013; Tumangger und Jamil 2010; Kumpf und Schumann 2008; Qiang *et al.* 2003). ENV sind langläufig als Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) bezeichnet worden, allerdings empfiehlt die aktuelle Literatur die Vermeidung der Begriffe „Mutation“ oder „Polymorphismus“, da die Begriffe oftmals

autonome Rückschlüsse auf die Funktionalität der genetischen Varianten bedingen (Condit *et al.* 2002). ENV beschreiben genetische Varianten, welche sowohl in kodierenden oder auch in nicht-kodierenden Bereichen nachgewiesen werden. Daher sind Änderungen in der Syntheserate oder der Proteinsequenz und -funktionalität nicht automatisch durch das Vorhandensein von ENV bedingt.

Für die IE gibt es derzeit nur wenige Studien, welche einen Zusammenhang zwischen ENV und einer möglichen erhöhten Suszeptibilität gegenüber einer IE untersuchen. Bisher stand insbesondere ENV in Genen der Pathogen-Detektion durch TLRs, das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LPB) und Rezeptoren der Thrombozytenoberfläche im Zusammenhang mit einer IE im Fokus. Hierbei konnte der Proteinaustausch R753Q durch eine genetische Variation im TLR2 kodierenden Gen identifiziert werden, welcher mit einem erhöhten Risiko für eine IE assoziiert werden konnte (Bustamante *et al.* 2011). Weiterhin wurden fünf ENV im LBP-Gen untersucht. Hierbei konnte allerdings keine signifikante Assoziation zwischen den Varianten und dem Risiko für eine IE nachgewiesen werden (Vollmer *et al.* 2009). Die untersuchten Varianten in Thrombozytenrezeptoren konzentrierten sich auf ein *S. aureus* IE-Kollektiv, da bereits nachgewiesen wurde, dass *S. aureus* über die untersuchten Rezeptoren (GPIIb/IIIa und FcγRIIa) mit Thrombozyten interagiert (Fitzgerald *et al.* 2006). Eine Assoziation der ENV mit einem erhöhten Risiko für die *S. aureus* IE oder auch ein Einfluss auf die Bakterien-Thrombozyten-Interaktion konnte im Rahmen der Studie nicht nachgewiesen werden (Daga *et al.* 2011). Weiterhin ist es möglich, dass nicht ENV in Genen, die direkt die zelluläre Interaktion betreffen können, eine Assoziation mit der IE zeigen, sondern ebenso, dass ENV-bedingte Veränderungen der fein abgestimmten Signale des Zytokinnetzwerkes die Suszeptibilität gegenüber einer IE beeinflussen (Dankert *et al.* 2006; Shun *et al.* 2005). Es konnten beispielsweise bisher Haplotypen des TNF Promotors (rs1800750/rs1800629/rs361525: GGA, GAA, AGA) identifiziert werden, die in einem IE-Kollektiv deutlich häufiger gegenüber einer Kontrollkohorte nachzuweisen waren (Giannitsioti *et al.* 2013).

Für Sepsis und andere Infektionen wurden diverse Studien durchgeführt, welche Assoziationen zu ENV untersuchten (Namath *et al.* 2009; Kumpf und Schumann 2008). Für die IE konnte bereits gezeigt werden, dass ein erhöhter Schweregrad von Prothesenendokarditiden mit erhöhten IL6- und IL8-Serumkonzentrationen assoziiert werden kann (Bustamante *et al.* 2014). Eine Veränderung des Zytokinnetzwerkes durch ENV könnte somit ebenso einen Einfluss auf die Pathogenese der IE zeigen.

## 2.6 Zielsetzung der Arbeit

Die durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-induzierte IE ist pathophysiologisch nur geringfügig charakterisiert. Bisher konnten starke phänotypische Divergenzen zwischen verschiedenen Isolaten bezüglich der Adhäsion und Invasion an Endothelzellen, oder aber auch der Kapsel- und Schleimbildung detektiert werden (Vollmer *et al.* 2010; Wandrer 2013). Bislang ist aber noch unklar, in welchem Rahmen dies die pathobiochemischen Aspekte der durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-vermittelten IE beeinflusst.

Im ersten Teil dieser Arbeit soll in Vollblut sowie mit einer endothelialen und monozytären Zelllinie die inflammatorische Reaktion bei Kontakt zwischen dem Pathogen und humanen Zellen näher charakterisiert werden. Im Vollblut-Modellsystem soll die Wachstumskinetik sowie die Induktion von IL6 zwischen verschiedenen Isolaten verglichen werden. Weiterhin wird die Induktion verschiedener Interleukine (*TNF*, *IL1B*, *IL6*) und Chemokine (*MCP1*, *IL8*) auf Genexpressionsebene in Endothel und Monozyten untersucht. Es soll so aufgeklärt werden, ob bezüglich der Induktion inflammatorischer Parameter divergente Phänotypen nachweisbar sind, welche das Potential von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* eine IE am Endokard zu etablieren, beeinflussen könnten.

Im zweiten Teil der Arbeit soll der Fokus auf die zelluläre Immunabwehr gerichtet werden. Die Etablierung einer Vegetation am Endokard steht in einem Zusammenhang mit der Phagozytose und der Abtötung der Bakterien durch Makrophagen. Es soll daher ein Modellsystem etabliert werden, welches die Quantifizierung der durch Makrophagen phagozytierten Bakterien zulässt. Durch Unterschiede in der Phagozytoserate der Stämme durch Makrophagen könnte direkt die Virulenz der Isolate beeinflusst sein. Ebenso soll das System aufzeigen, wie lange *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* intrazellulär nach Phagozytose überleben kann und ob hier stamm-spezifische Divergenzen nachzuweisen sind. Es ist weiterhin bekannt, dass die Interaktion zwischen Pathogen und Thrombozyten die Vegetationsausbildung und Persistenz des Erregers im Rahmen einer IE beeinflussen. Daher soll im weiteren Verlauf der Arbeit die durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-induzierte Aggregation von Thrombozyten untersucht werden.

Im dritten Teil der Arbeit soll gezeigt werden, ob genetische Varianten in Genen der Inflammation ebenso eine Rolle bei der Etablierung einer IE spielen könnten. Daher sollen ENV in Genen der Pathogendetektion und der Inflammation (z. B. *IL1B*, *IL6*, *IL10*) in einem IE-Patientenkollektiv untersucht werden. Weiterhin soll analysiert werden, ob die ENV eventuell eine Beeinflussung von klinisch-chemischen Laborparametern zeigen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung inflammatorischer Parameter der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-bedingten IE

Für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* besteht die Hypothese, dass das Pathogen über einen parazellulären Transport über das Epithel des Kolons in den Blutstrom gelangt (Boleij *et al.* 2011). Die Zirkulation des Erregers im Blutstrom ermöglicht den Transport zum Endokard. Die erste inflammatorische Reaktion wird durch den Eintritt von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in den Blutstrom ausgelöst, wobei das Ausmaß der Induktion sowie die Folgen für die bakterielle Vitalität noch ungeklärt sind. Daher wurde ein Vollblut-Modellsystem etabliert, welches sowohl die Wachstumskinetik von Isolaten in Vollblut, als auch die Induktion der Inflammation über die IL6-Synthese abbilden soll (siehe 3.1.1 und 3.1.2).

Sobald der Erreger an das Endokard adhäriert, sind die Etablierung der Vegetation sowie die Persistenz des Erregers ausschlaggebend für das Ausmaß der IE. Es lassen sich signifikante Unterschiede bezüglich der Adhäsion und Invasion an Endothelzellen, genauso wie bei der Adhäsion verschiedener Isolate an Komponenten der ECM zwischen den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten nachweisen (Vollmer *et al.* 2010). Derzeit fehlen Modellsysteme, die der weiteren phänotypischen Charakterisierung der Isolate dienen und zur Aufklärung der pathobiochemischen Prozesse verwendet werden können. Für andere Pathogene wie *Staphylococcus aureus* konnte bereits gezeigt werden, dass die Internalisierung ins Endothel ein kritischer Faktor für die Zytokininduktion ist (Yao *et al.* 1995). Die aufgezeigten Divergenzen im Adhäsions- und Invasionsvermögen der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate könnten somit auch auf Isolat-spezifische Induktion der Zytokinexpression im kardialen Endothel hinweisen. Monozyten hingegen werden durch inflammatorische Parameter zum Infektionsherd rekrutiert und produzieren ihrerseits selbst Zytokine, welche die inflammatorische Reaktion fördern. Daher wurde in Zellkultur-Modellsystemen einer endothelialen Zelllinie sowie einer monozytären Zelllinie in Monokultur (siehe 3.1.3), sowie der beiden Zelltypen in Ko-Kultivierung (siehe 3.1.4), die Induktion inflammatorischer Gene untersucht. Es wurde anschließend ein Vergleich der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate hinsichtlich des Induktionspotentials der Genexpression der Zytokine in der monozytären Monokultur mit THP-1 Zellen durchgeführt (siehe 3.1.5).



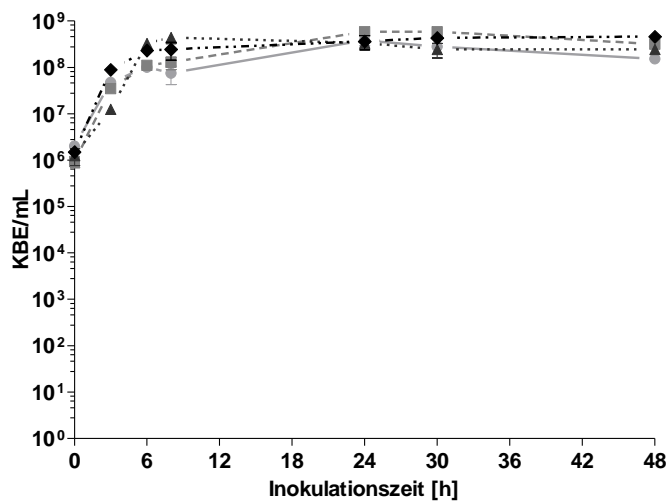
### 3.1.1 Überleben von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in einem Vollblut-Modellsystem

Durch den Transport des IE-Erregers über die Blutzirkulation ist es für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* entscheidend in Vollblut zu überleben, um an das Endokard zu gelangen und dort adhären zu können. Um zu zeigen, ob Divergenzen im Wachstumsverhalten bzw. dem Überleben in Vollblut zu erwarten sind, wurde zunächst das Wachstum von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Vollblut-Modellsystem (Inokulation des Erregers mit Vollblut (heparinisiert) in RPMI1640, siehe 5.9) untersucht. Zum Vergleich diente dabei das Wachstum in FCS-haltigem Medium (5 % FCS, analog zu 5 % Serum im Vollblut-Modellsystem). Die Ergebnisse der Wachstumsversuche sind in Abbildung 3.1 dargestellt. In der Abbildung 3.1A ist gezeigt, dass die vier *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate DSM16831, Isolat 013366/01, LMG17956 und UCN34 in RPMI1640 mit 5 % FCS-Zusatz ein Wachstum innerhalb der ersten 6 – 10 h von  $10^6$  koloniebildende Einheiten (KBE)/mL auf  $7,5 \times 10^7$  –  $4,4 \times 10^8$  KBE/mL zeigten. Im weiteren Verlauf verhielt sich der bakterielle Titer stationär.

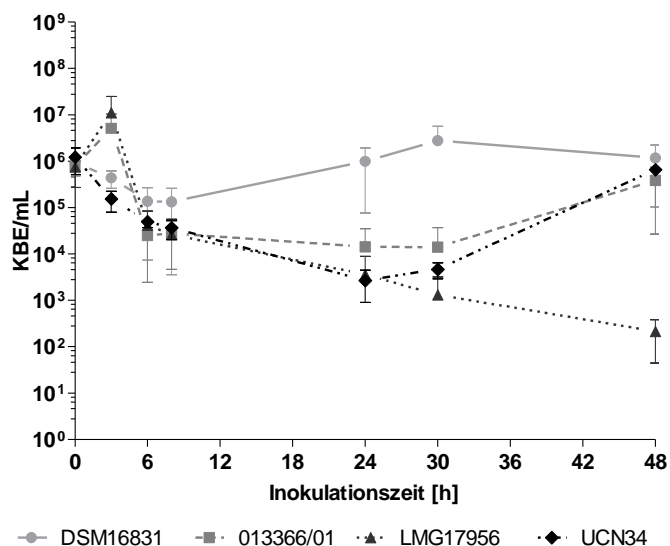
Bei Inokulation des heparinisiertem Vollbluts des Probanden A mit den Isolaten ist die Wachstumskinetik hingegen deutlich variabel (Abbildung 3.1B). Keines der Isolate zeigte eine wie in Abbildung 3.1A dargestellte Wachstumskinetik in FCS-haltigem Medium. Der bakterielle Titer des Isolats DSM16831 wurde zunächst von einem Anfangswert von  $9,4 \times 10^5$  KBE/mL auf  $1,3 \times 10^5$  KBE/mL nach 8 h reduziert, wohingegen dann wieder ein leichtes Wachstum auf  $1,1 \times 10^6$  KBE/mL nachgewiesen wurde. Der bakterielle Titer des Isolats 013366/01 wurde hingegen nach einer Verdopplung innerhalb der ersten 3 h auf  $5,1 \times 10^6$  KBE/mL sukzessive auf  $1,4 \times 10^4$  KBE/mL reduziert. Innerhalb der letzten Inokulationsphase erfolgte wieder ein Anstieg des Titers auf  $3,9 \times 10^5$  KBE/mL nach 48 h.

Das Isolat LMG17956 verhielt sich zunächst ähnlich dem Isolat 013366/01. Innerhalb der ersten 3 h wurde eine Wachstumsphase nachgewiesen (0 h:  $7,6 \times 10^5$  KBE/mL; 3 h:  $1,1 \times 10^7$  KBE/mL). Anschließend fiel der bakterielle Titer ebenfalls ab. Im Gegensatz zu dem Isolat 013366/01 trat jedoch keine erneute Wachstumsphase ein, so dass der Bakterientiter nach 48 h sukzessive auf  $2,1 \times 10^2$  KBE/mL reduziert wurde. Das Isolat UCN34 zeigte hingegen eine konstante Reduktion des Bakterientiters von  $1,2 \times 10^6$  KBE/mL auf ein Minimum von  $2,7 \times 10^3$  KBE/mL nach 24 h. Nach 24 h trat ähnlich wie bei dem Isolat 013366/01 wieder eine Wachstumsphase ein, wodurch sich nach 48 h wieder ein Titer von  $6,6 \times 10^5$  KBE/mL nachweisen lies.

A RPMI1640/FCS



B RPMI1640/Vollblut



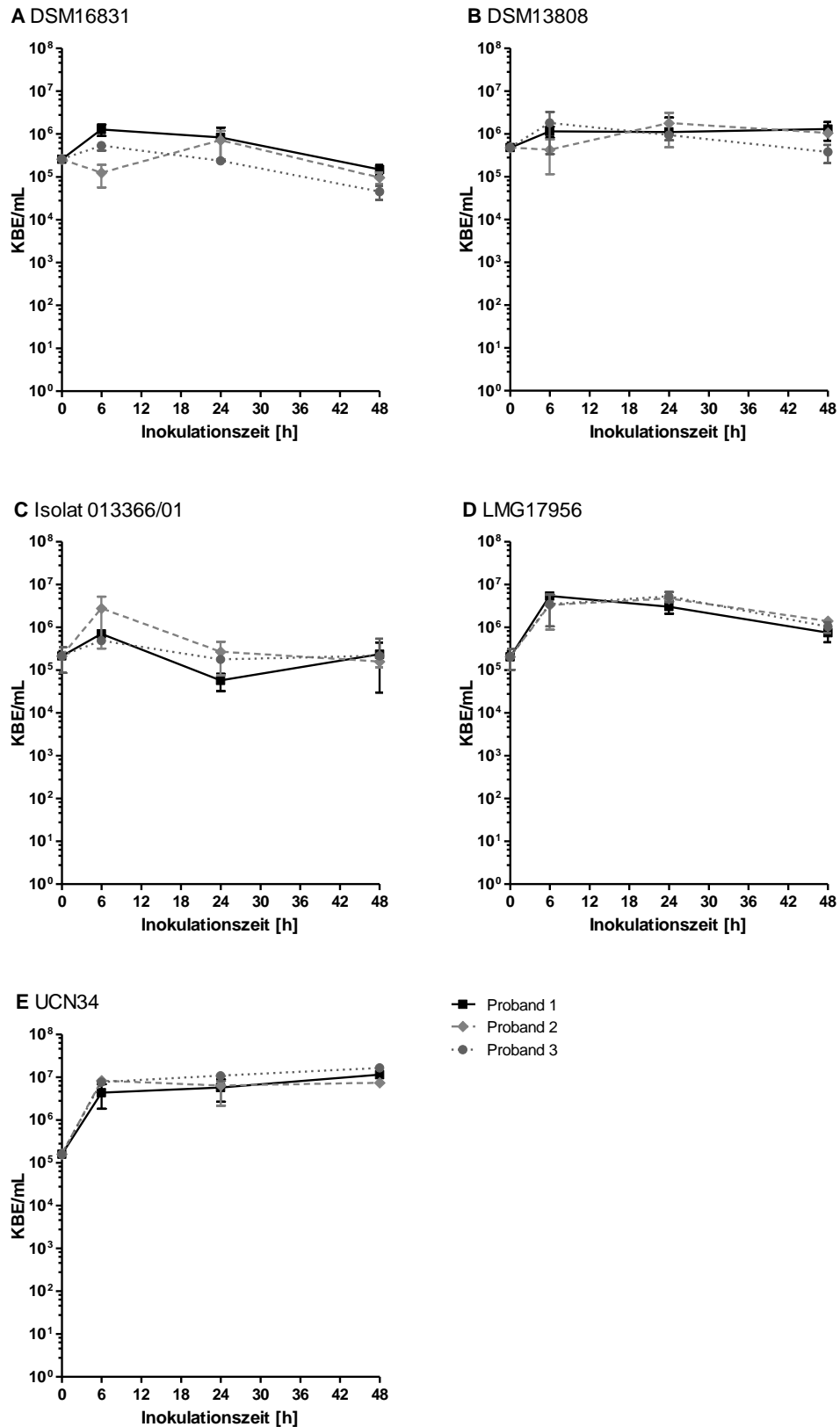
**Abbildung 3.1:** Wachstumskinetik der Stämme *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* DSM16831, Isolat 013366/01, LMG17956 und UCN34 in RPMI1640 mit 5 % FCS (A (n≥3)) und in RPMI1640 mit heparinisiertem Vollblut von Proband A (Volumenverhältnis 10:1) (B (n≥3)). Das Wachstumsverhalten wurde nach 0 h, 3 h, 6 h, 8 h, 24 h, 30 h und 48 h durch Ausplattieren einer geeigneten Verdünnung in DPBS auf TS-Agar bestimmt (Dreifachbestimmung). Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler.

Die Aufnahme der Wachstumskinetik der vier *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate zeigte Isolat-spezifische Unterschiede bezüglich des Überlebens in dem Vollblut-Modellsystem bei dem Probanden A. Zur Untersuchung Probanden-spezifischer Einflussfaktoren auf die Reduktion des Bakterientiters wurde die Wachstumskinetik von fünf Isolaten vergleichend in drei weiteren Probanden aufgezeichnet. Weiterhin wurde auf die Aufzeichnung der Wachstumskinetik in FCS-haltigem Medium verzichtet. Anstelle dessen wurde zum RPMI1640 Medium zu gleichem Anteil Plasma der Probanden zugegeben (im Weiteren als RPMI1640/Plasma bezeichnet). Dies soll zeigen, ob die Veränderungen im bakteriellen Titer

auf die Interaktion der humanen Zellen mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zurückzuführen sind. In Abbildung 3.2 sind die Ergebnisse des Vergleichs der Wachstumskinetiken von fünf Isolaten (DSM16831, DSM13808, Isolat 013366/01, LMG17956 und UCN34) in RPMI1640/Plasma von drei Probanden (Probanden 1-3) gezeigt. Hierbei waren Unterschiede in den Wachstumskinetiken zu zeigen. Das Wachstum der Isolate in RPMI1640/Plasma war geringer als das Wachstum in RPMI1640 mit 5% FCS (Vergleich Abbildung 3.1).

Das Isolat DSM16831 zeigte nur geringfügige Veränderungen des bakteriellen Titers bei Inokulation in RPMI1640/Plasma (Abbildung 3.2A). Nach einer Inkubationszeit von 6 h ist kein einheitliches Bild zu sehen, sondern die drei individuellen Ansätze zeigten entweder ein leichtes Wachstum (Proband 1:  $1,3 \times 10^6$  KBE/mL), ein stationäres Verhalten (Proband 2:  $1,3 \times 10^5$  KBE/mL) oder eine leichte Reduktion (Proband 3:  $5,4 \times 10^4$  KBE/mL) gegenüber dem Anfangstiter von  $2,6 \times 10^5$  KBE/mL. Nach 24 h und 48 h Inkubation waren die Bakterientiter in den verschiedenen Ansätzen vergleichbar. Nach 48 h lag der bakterieller Titer von DSM16831 bei den Probanden zwischen  $4,5 \times 10^4$  KBE/mL und  $1,5 \times 10^5$  KBE/mL. Das Isolat DSM13808 (Abbildung 3.2B) zeigte über die Inkubationszeit einen relativ konstant bleibenden Titer (Anfangstiter:  $5 \times 10^5$  KBE/mL), der sich nach 48 h bei den drei Probanden auf Werte von  $3,8 \times 10^5 - 1,5 \times 10^6$  KBE/mL einstellt hat. Es war somit hier maximal eine Verdopplung des Titers aufzuzeigen, allerdings kein starkes Wachstum auf  $10^8 - 10^9$  KBE/mL, wie es bei der Inokulation in mit FCS versetztem Zellkulturmedium der Fall war (Vergleich Abbildung 3.1A). Die Isolate 013366/01 (Abbildung 3.2C), LMG17956 (Abbildung 3.2D) und UCN34 (Abbildung 3.2E) zeigten alle ein Wachstum bei den drei Probanden nach 6 h. Dieses Wachstum beinhaltete meist mehr als eine log-Stufe. Für das Isolat 013366/01 konnte nach 24 h allerdings ein deutlicher Abfall der Titers nachgewiesen werden, der bis zum Ende der Inkubationszeit relativ konstant blieb (ca.  $2,5 \times 10^5$  KBE/mL). Die Isolate LMG17956 und UCN34 zeigten nahezu konstante Bakterientiter nach 6 h Inokulation.

Es konnten eher höhere Bakterientiter nach 48 h im Vergleich mit dem Isolat DSM16831 determiniert werden (DSM16831:  $4,5 \times 10^4 - 1,5 \times 10^5$  KBE/mL; LMG17956:  $7,5 \times 10^5 - 1,4 \times 10^6$  KBE/mL; UCN34:  $7,5 \times 10^6 - 1,7 \times 10^7$  KBE/mL). Die Wachstumskinetik der Isolate LMG17956 und UCN34 ähnelte somit der Wachstumskinetik in RPMI1640 mit 5 % FCS, wobei der stationäre Titer bei deutlich geringeren Konzentrationen eintrat.

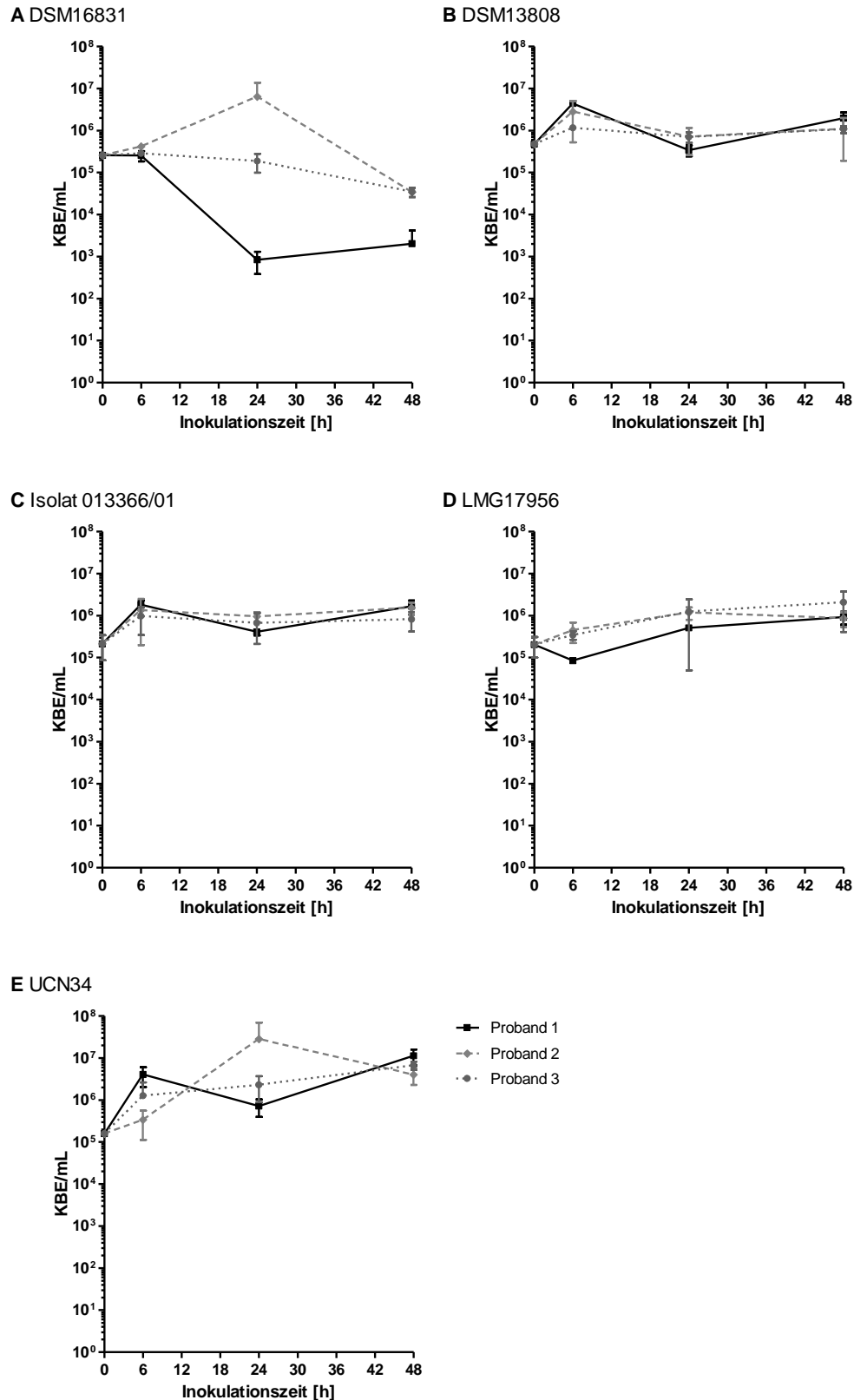


**Abbildung 3.2:** Wachstumskinetik der Stämme *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* DSM16831 (A), DSM13808 (B), Isolat 013366/01 (C), LMG17956 (D) und UCN34 (E) in RPMI1640/Plasma (Volumenverhältnis 10:1) von drei Probanden. Das Wachstumsverhalten wurde nach 0 h, 6 h, 24 h und 48 h durch Ausplattieren einer geeigneten Verdünnung in DPBS auf TS-Agar bestimmt (Dreifachbestimmung). Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung.

Bei der Inokulation des entsprechenden Vollbluts von drei Probanden waren die Wachstumsverläufe der Isolate etwas abweichend und unterschieden sich teils zwischen den Probanden (siehe Abbildung 3.3). Das Isolat DSM16831 zeigte sehr individuelle Wachstumskinetiken bei den drei verschiedenen Probanden (Abbildung 3.3A). Nach 6 h Inkubation war der bakterielle Titer bei allen drei Probanden nahe dem Anfangstiter von  $2,6 \times 10^5$  KBE/mL. Nach 24 h war bei Proband 1 der Bakterientiter hingegen stark abgefallen (850 KBE/mL), bei Proband 3 nahezu konstant geblieben ( $1,9 \times 10^5$  KBE/mL), während dieses Isolat in RPMI/Vollblut von Proband 2 ein Wachstum auf  $6,4 \times 10^6$  KBE/mL auswies. Nach 48 h konnte bei der Inokulation von DSM16831 bei den Probanden 2 und 3 im Vergleich zum 24 h-Wert verringerte Bakterientiter nachgewiesen werden. Bei Proband 1 hingegen war nach 48 h immer noch ein deutlich geringerer Titer als bei den anderen Probanden nachweisbar (Proband 1:  $2 \times 10^3$  KBE/mL; Proband 2/3:  $3,5 \times 10^5$  KBE/mL).

Das Isolat UCN34 (Abbildung 3.3E) zeigte innerhalb der ersten 6 h der Inkubation ein ähnliches Wachstum wie der Stamm DSM13808 und das Isolat 013366/01. Nach 24 h war der bakterielle Titer bei den Probanden 1 und 3 eher konstant, wohingegen bei der Inkubation des Isolates mit RPMI versetzt mit Vollblut des Probanden 2 ein Wachstum bis auf  $2,8 \times 10^7$  KBE/mL nachgewiesen wurde. Während bei den Probanden 1 und 3 ein Wachstum der Isolate innerhalb der letzten Inkubationsphase auf  $1,0 \times 10^7$  KBE/mL nachgewiesen werden konnte, fiel der bakterielle Titer innerhalb dieser Phase bei Proband 2 ab ( $4 \times 10^6$  KBE/mL).

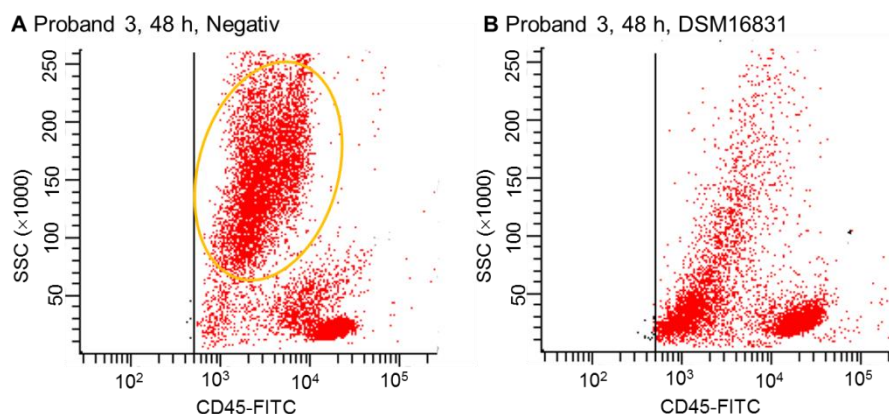
Für die anderen Isolate waren nur geringere Abweichungen zwischen den Probanden nachweisbar. Das Isolat DSM13808 (Abbildung 3.3B) zeigte nach einer kurzen Wachstumsphase des Isolats von 0 h – 6 h (ca. eine *log*-Stufe) einen Titer von  $1,0 - 2,0 \times 10^6$  KBE/mL bis 48 h. Ebenso konnte für das Isolat 013366/01 nach einem kurzen Wachstum ein stationärer Titer von  $8,3 \times 10^5$  KBE/mL –  $1,0 \times 10^6$  KBE/mL bei allen drei Probanden nachgewiesen werden (Abbildung 3.3C). Das *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolat LMG17956 zeigte bei Proband 1 innerhalb der ersten 6 h eine leichte Reduktion des bakteriellen Titers.



**Abbildung 3.3:** Wachstumskinetik der Stämme *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* DSM16831 (A), DSM13808 (B), Isolat 013366/01 (C), LMG17956 (D) und UCN34 (E) in RPMI1640/Vollblut (Volumenverhältnis 10:1) von drei Probanden. Die Wachstumskinetik wurde nach 0 h, 6 h, 24 h und 48 h durch Ausplattieren einer geeigneten Verdünnung in DPBS auf TS-Agar bestimmt (Dreifachbestimmung). Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung.

Anschließend verlief die Wachstumskurve bei allen Probanden relativ parallel, wodurch der Anfangstiter von  $2,0 \times 10^5$  KBE/mL auf einen Titer von maximal  $8,8 \times 10^5$  KBE/mL –  $2,0 \times 10^6$  KBE/mL anstieg (Abbildung 3.3D). Die starken Reduktionen der Bakterientiter, wie sie bei Proband A nachgewiesen wurden (vgl. Abbildung 3.1B), waren bei Inokulation des Vollbluts der Probanden 1-3 nicht reproduzierbar.

Des Weiteren wurde nach 48 h ein Vitalitätsassay der humanen Zellen durchgeführt, um sicherzustellen, dass noch vitale Blutzellen trotz Inokulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nachweisbar sind und die beobachteten Wachstumskinetiken nach wie vor durch Pathogen-Zell-Interaktionen beeinflusst wurden. In allen Ansätzen waren noch über 70 % der noch vorhandenen Leukozyten vital. Beispielhaft ist die FACS-Analyse von Proband 3 nach Inokulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* DSM16831 im Vergleich mit der Negativkontrolle dargestellt (Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4:** FACS Analyse von Proband 3 nach 48 h im Vollblut-Modellsystem. Vergleich der Negativkontrolle (A) und Inokulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* DSM16831 (B). Die Granulozyten (gelber Kreis bei Negativkontrolle) sind nach Inokulation mit DSM16831 deutlich reduziert.

Wie in der Abbildung gezeigt, wurde nachgewiesen, dass die Inokulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten nach 48 h eine Reduktion der Granulozyten mit sich führte, wobei dies bei den Negativkontrollen nicht zu beobachten war. Hierbei konnten keine Isolat-spezifischen oder Probanden-abhängigen Unterschiede detektiert werden.

### 3.1.2 IL6-Induktion durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in einem Vollblut-Modellsystem

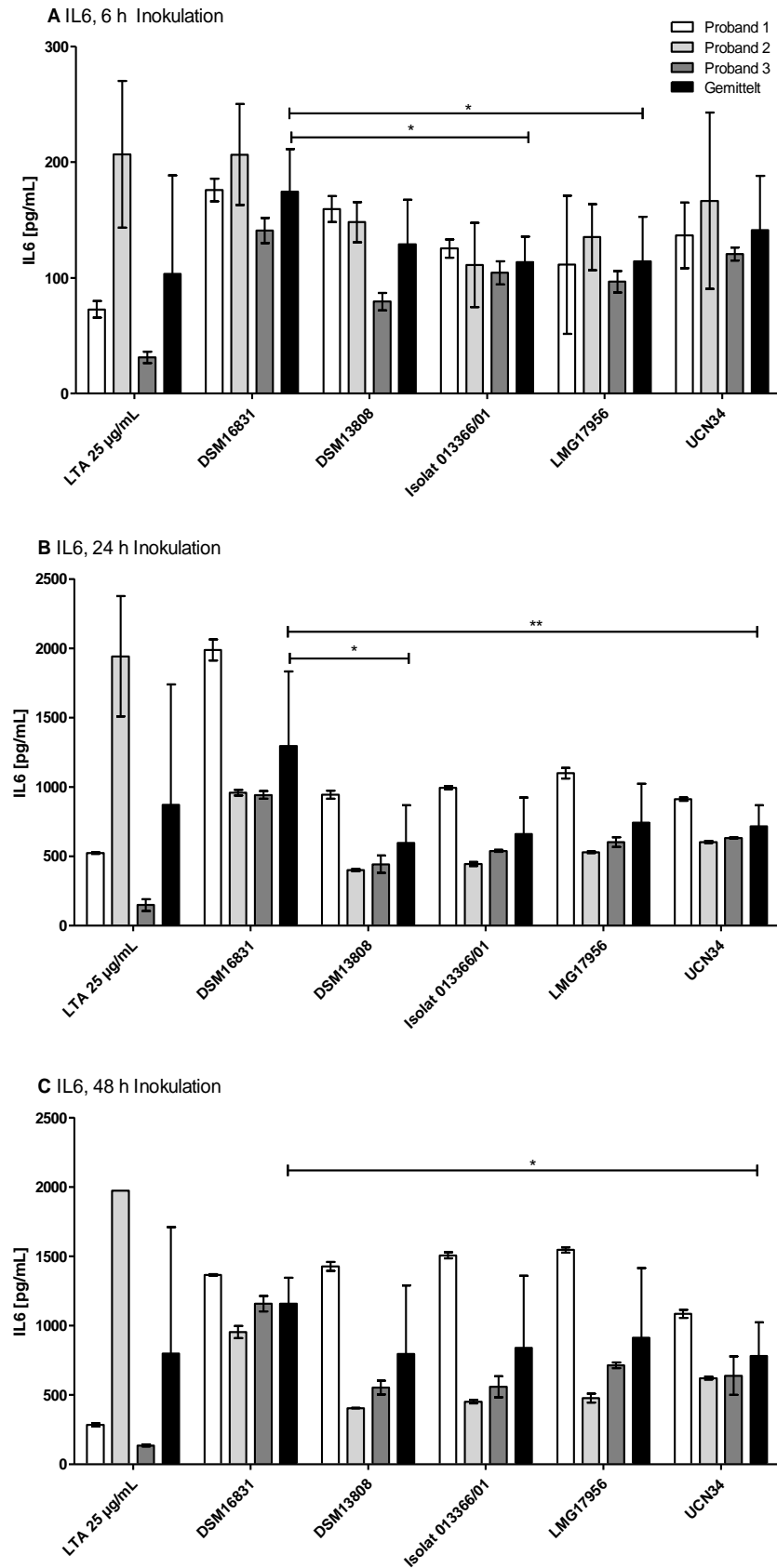
Die Inokulation von Vollblut mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* beeinflusste die Wachstumskinetik des Pathogens. Hierbei waren sowohl zwischen den Isolaten, aber auch zwischen den Probanden Unterschiede nachweisbar. Um zu eruieren, ob die Unterschiede in der Wachstumskinetik eventuell mit einer erhöhten oder erniedrigten Induktion von Zytokinen einhergehen, wurde parallel die IL6-Synthese der Zellen im Vollblut-Modellsystem nach *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Inokulation bestimmt. Als Positivkontrolle für die Stimulation

von IL6 wurde Lipoteichonsäure (LTA) zur Stimulation verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.5 dargestellt. Um zu ermitteln, ob ein Isolat (Probanden-unabhängig) generell stärker oder schwächer als andere Isolate die IL6-Synthese induziert, sind parallel die gemittelten IL6-Konzentrationen von allen drei Probanden für die Isolate aufgetragen.

Nach 6 h Stimulation der Vollblut-Modellsysteme zeigte Proband 2 eine deutlich höhere Stimulation durch LTA als die anderen beiden Probanden (Proband 1: 73 pg/mL; Proband 2: 206 pg/mL; Proband 3: 31 pg/mL) (Abbildung 3.5A). Es konnte nachgewiesen werden, dass alle *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate IL6 im Vollblut-Modellsystem induzierten. Hinsichtlich der IL6 Induktion durch die Isolate sind nicht so starke Varianzen zwischen den Probanden nachgewiesen worden im Vergleich zu der Induktion durch LTA. Allerdings konnte bei Probanden 3 generell eine etwas geringere IL6-Konzentration nach 6 h nachgewiesen wurde, als bei den Probanden 1 und 2. Weiterhin zeigte sich, dass das Isolat DSM16831 im Vergleich zu den anderen Isolaten nach 6 h bei allen Probanden durchschnittlich die höchste IL6 Proteinkonzentration induzierte (Proband 1: 176 pg/mL; Proband 2: 206 pg/mL; Proband 3: 140 pg/mL). Die anderen Isolate DSM13808, Isolat 013366/01, LMG17956 und UCN34 stimulierten die IL6-Proteinsynthese bis auf 79 - 166 pg/mL. Durch die gemittelten Werte der IL6-Proteinkonzentration aller drei Probanden kann gezeigt werden, dass die Induktion der Proteinsynthese von IL6 signifikant höher durch das Isolat DSM16831 gegenüber der Induktion durch Isolat 013366/01 und LMG17956 ist.

Nach 24 h Inokulation von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten im Vollblut-Modellsystem waren die Unterschiede zwischen den Probanden deutlicher (Abbildung 3.5B). Bei Inokulation im Vollblut-Modellsystem des Probanden 1 ist generell eine deutlich höhere IL6 Induktion durch die Isolate nachgewiesen worden im Vergleich zu den Probanden 2 und 3. Hierbei wurde *circa* die doppelte Proteinkonzentration als bei Stimulation im Vollblut-Modellsystem mit Vollblut der Probanden 2 und 3 gezeigt (z. B.: DSM16831: Proband 1: 1986 pg/mL; Proband 2: 959 pg/mL; Proband 3: 942 pg/mL; DSM13808: Proband 1: 942 pg/mL; Proband 2: 399 pg/mL; Proband 3: 442 pg/mL). Die höchste Induktion von IL6 nach 24 h konnte bei allen drei Probanden durch die Inokulation mit dem Isolat DSM16831 induziert werden. Das Isolat DSM16831 induzierte hierbei in der Regel doppelt so hohe IL6-Proteinsynthesen wie die anderen Isolate (z. B. Proband 2: DSM16831: 959 pg/mL, DSM13808: 400 pg/mL, Isolat 013366/01: 445 pg/mL, LMG17956: 529 pg/mL, UCN34: 602 pg/mL).





**Abbildung 3.5:** IL6-Proteinexpression im Vollblut-Modellsystem (3 Probanden und gemittelte Proteinkonzentration) bei Inokulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* DSM16831, DSM13808, Isolat 013366/01, LMG17956 und UCN34 in RPMI1640/Plasma (Volumenverhältnis 10:1) nach 6 h (A), 24 h (B) und 48 h (C). Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung. \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,005$  (Mann Whitney Test).

Die gemittelten Werte bestätigen, dass das Isolat DSM16831 nach 24 h eine höhere Induktion der IL6-Proteinsynthese induzierte, wobei eine signifikant höhere IL6-Konzentration im Vergleich zu den Isolaten DSM13808 und UCN34 nachgewiesen werden konnte.

Nach 48 h war nicht in allen Ansätzen eine weitere Steigerung der IL6-Konzentration gegenüber dem 24 h Wert zu detektieren (Abbildung 3.5C). Durch die Inkubation mit LTA ist keine deutliche Erhöhung bei den Probanden 2 und 3 nachgewiesen worden, jedoch wurde bei Proband 1 eine Abnahme der IL6-Proteinkonzentration um 240 pg/mL bestimmt. Innerhalb der Inkubationszeit von 24 h bis 48 h waren Divergenzen zwischen den Probanden aufzuzeigen. Die weitere Inkubation mit dem Isolat DSM16831 führte bei Proband 1 nicht zu einer weiteren Steigerung der IL6-Konzentration (Abnahme um 620 pg/mL auf 1366 pg/mL). Alle anderen Isolate induzierten hingegen weiter die IL6-Synthese, so dass für alle Isolate vergleichbare IL6-Konzentrationen gemessen wurden.

Die Probanden 2 und 3 zeigten hingegen keine deutlichen Erhöhungen der IL6-Konzentration nach Inokulation mit den Isolaten im Vergleich zum 24 h Wert, so dass weiterhin die Induktion von IL6 durch das Isolat DSM16831 deutlich höher gegenüber der Induktion durch die anderen Isolate war. Die IL6-Konzentration durch Inokulation von DSM16831 bei Proband 1 war durch den Abfall der IL6-Konzentration bei den anderen beiden Probanden vergleichbar.

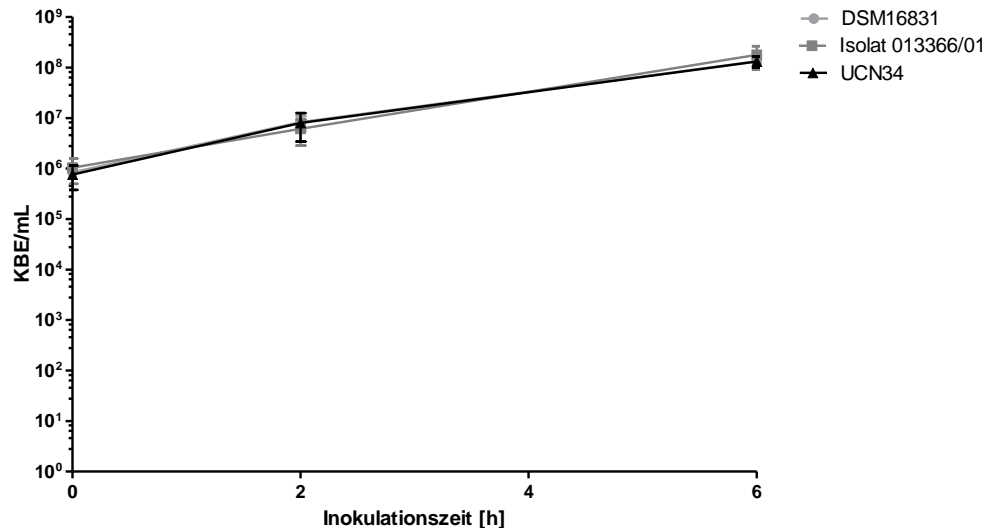
Durch die Inokulation von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Vollblut-Modellsystem können zwei Aspekte aufgezeigt werden. Erstens kann im Vergleich mit der Wachstumskinetik (siehe 3.1.1) ein Zusammenhang der höheren IL6-Induktion mit einer Abnahme des bakteriellen Titers vermutet werden, da die starke IL6-Synthese bei Proband 1 mit einer starken Reduktion des bakteriellen Titers einhergeht. Weiterhin kann für IL6 im Verlauf der Induktion eine maximale IL6-Konzentration bei Proband 1 und Stimulation durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* DSM16831 nach 24 h aufgezeigt werden, welche anschließend wieder abnimmt. Unter der Annahme, dass die Inflammation der Probanden 2 und 3 später als bei Proband 1 induziert wird, kann angenommen werden, dass bei den beiden Probanden diese maximale Konzentration erst nach Ablauf der Versuchsreihe erreicht wird. Da die anderen Isolate nach 48 h leichte Erhöhungen bei Proband 1 zeigten, kann angenommen werden, dass die Isolate DSM13808, 013366/01, LMG17956 und UCN34 später als DSM16831 die IL6-Synthese induzieren.

### 3.1.3 Inflammatorische Reaktion von Endothelzellen und Monozyten in der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-bedingten Endokarditis im Monokultur-Zellkulturmodell

Bei der Etablierung einer Vegetation am Endokard steht *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in direktem Kontakt mit den endokardialen Endothelzellen. Weiterhin werden Monozyten zum Infektionsherd rekrutiert, um die Persistenz des Pathogens zu verhindern. Hier sind insbesondere die Monozyten inflammatorisch aktiv und sekretieren Zytokine, welche die inflammatorische Reaktion fördern. Beide Zelltypen sind somit essentiell an der Induktion der inflammatorischen Reaktion auf *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* als IE-Erreger beteiligt und sind potentielle Zelllinien, welche genutzt werden können, um das Stimulationspotential von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zu untersuchen.

Eine endotheliale (EA.hy926) und eine monozytäre (THP-1) Zelllinie wurden genutzt, um die inflammatorische Reaktion beider Zelltypen nach Kontakt mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* auf Genexpressionsebene zu untersuchen. Es wurden Zellkultur-Modellsysteme etabliert, welche für die relative Quantifizierung der Genexpression der Gene *IL1B*, *IL6*, *IL8*, *MCP1* und *TNF* durch Inokulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* genutzt wurden. Die Messung der relativen Genexpression von *TNF* war aufgrund der zu geringen Kopienanzahl im Endothel nicht möglich (Weinstock 2010). Die Genexpression wurde normiert auf die zwei Referenzgene Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, welche sich durch die Berechnung der Stabilität von Referenzgenen mittels geNORM als adäquate Referenzgene erwiesen haben. Die 2 h Negativkontrollen dienten als Referenzwert.

In der Abbildung 3.6 ist der Bakterientiter der Inokulation von endothelialen Zellen mit den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten dargestellt, da unterschiedliche bakterielle Proliferationsraten einen Einfluss auf die Genexpression bedingen könnten. Es konnte gezeigt werden, dass der Bakterientiter der Isolate innerhalb der Inokulationsdauer vergleichend anstieg und somit keinen Einfluss auf die Vergleichbarkeit der Induktionen der Genexpressionen nahm.

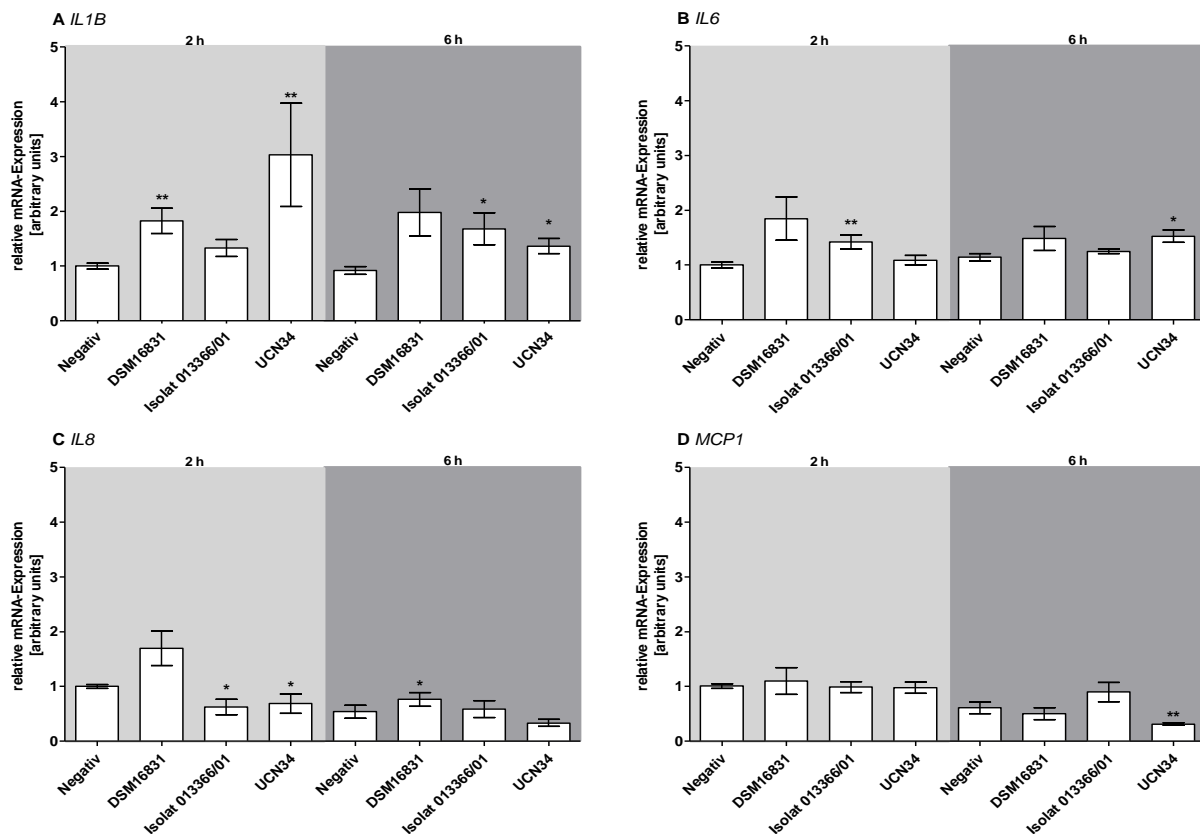


**Abbildung 3.6:** Wachstumskinetik der Isolate *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* DSM16831, Isolat 013366/01 und UCN34 bei Inokulation mit Endothelzellen. Die Wachstumskinetik wurde nach 0 h, 2 h und 6 h durch Ausplattieren einer geeigneten Verdünnung in DPBS auf TS-Agar bestimmt (Dreifachbestimmung). Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung.

Der Anfangstiter der drei Isolate lag zwischen  $7,6 \times 10^5$  KBE/mL und  $1,0 \times 10^6$  KBE/mL. Innerhalb der Inokulationszeit von 6 h wuchsen die Isolate bis auf einen Bakterientiter von  $1,3 - 1,8 \times 10^8$  KBE/mL an.

Die Genexpressionen der Zielgene *IL1B*, *IL6*, *IL8* und *MCP1* in Endothelzellen nach 2 h und 6 h Inokulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* sind in Abbildung 3.7 dargestellt. Die relative Induktion der Genexpression dieser vier Zielgene durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* war im Endothel sowohl nach 2 h als auch nach 6 h sehr gering.

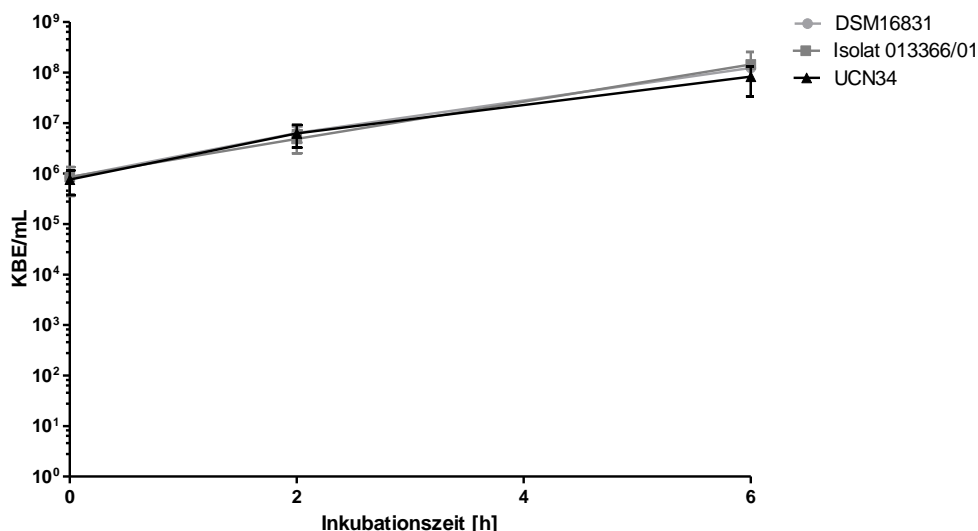
Bei Betrachtung der individuellen Genexpressionen von *IL1B* konnten nach 2 h Inokulation mit den Isolaten DSM16831 und UCN34 geringe signifikante Erhöhungen der Genexpression gezeigt werden (DSM16831: 1,8-fach; UCN34: 3,0-fach) (Abbildung 3.7A). Nach 6 h war die Genexpression durch alle Isolate nur marginal erhöht (1,3 – 2,0-fach). Die Induktion der Genexpression von *IL6* war über die gesamte Inokulationsdauer nur sehr gering. Die stärkste Induktion der Genexpression wurde nach 2 h durch das Isolat DSM16831 hervorgerufen (1,8-fach).



**Abbildung 3.7:** Relative Genexpression der Zielgene *IL1B* (A), *IL6* (B), *IL8* (C) und *MCP1* (D) in Endothelzellen bei Inokulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* DSM16831, Isolat 013366/01 und UCN34 für 2 h und 6 h. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n=4). Die Signifikanz oberhalb der Balken kennzeichnet die Berechnung der Negativkontrolle im Vergleich zu den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten. \*\*: P < 0,005; \*: P < 0,05 (Mann Whitney Test).

Ebenso wie für *IL6* wurde in den endothelialen Zellen auch für die Gene *IL8* und *MCP1* keine Induktion der Genexpression nachgewiesen (Abbildung 3.7C/D).

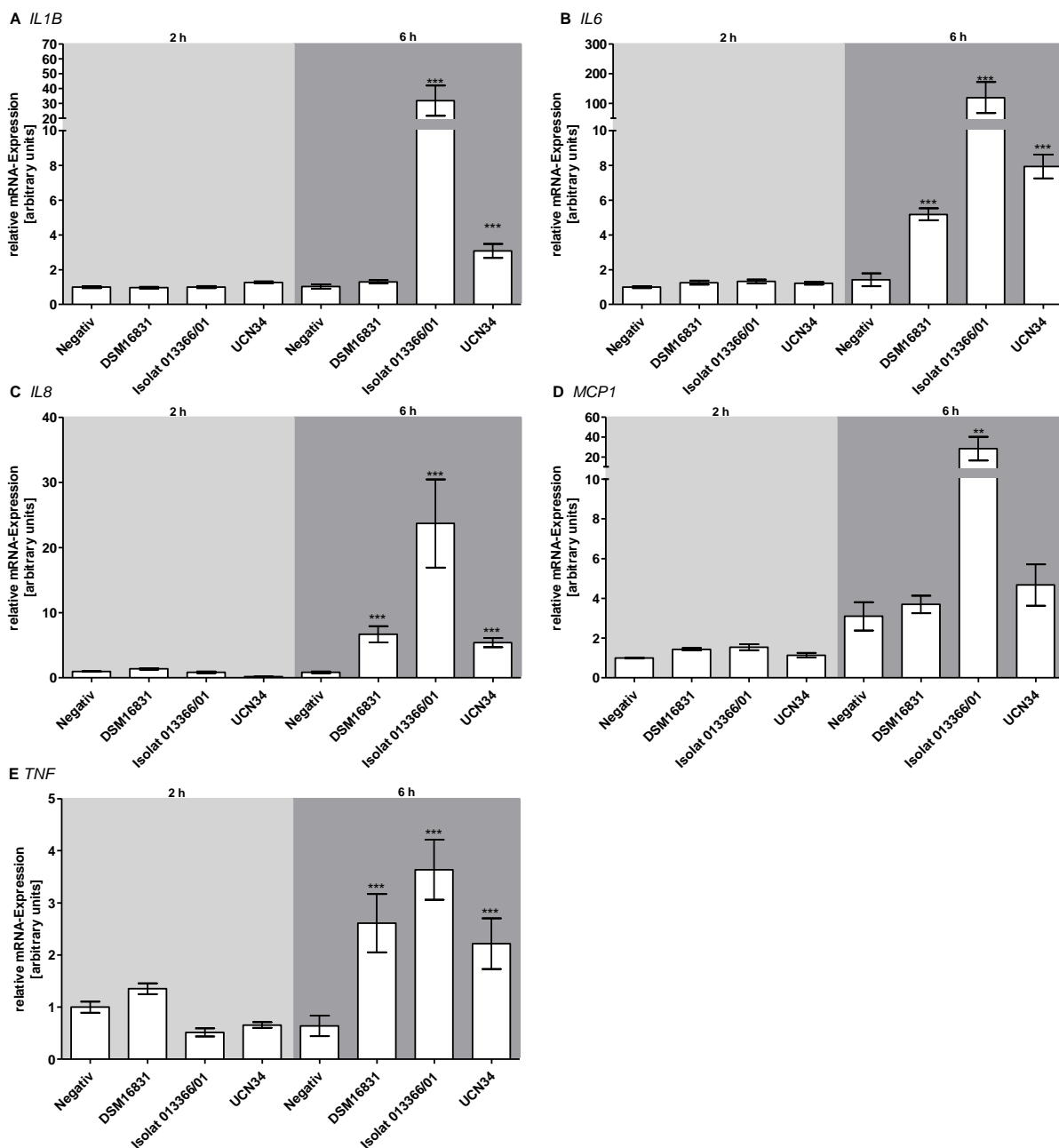
Für *MCP1* war sogar eine signifikante Reduktion durch Inokulation mit dem Isolat UCN34 nachweisbar. Die Induktion der Genexpression in der monozytären Zelllinie THP-1 wurde ebenfalls nach 2 h und 6 h bestimmt. Die Wachstumskurven der drei *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate DSM16831, Isolat 013366/01 und UCN34 verliefen analog zu dem Wachstum in Endothelzellen (Abbildung 3.8, Vergleich Abbildung 3.6) und zeigten ebenfalls ein homogenes Wachstum der Isolate während der Inokulationszeit. Der initiale Bakterientiter von  $7,6 - 8,6 \times 10^5$  KBE/mL erhöhte sich innerhalb der Inokulationszeit von 6 h auf  $8,3 \times 10^7 - 1,5 \times 10^8$  KBE/mL KBE/mL.



**Abbildung 3.8:** Wachstumskinetik der Isolate *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* DSM16831, Isolat 013366/01 und UCN34 bei Inokulation mit Monozyten. Die Wachstumskinetik wurde nach 0 h, 2 h und 6 h durch Ausplattieren einer geeigneten Verdünnung in DPBS auf TS-Agar bestimmt (Dreifachbestimmung). Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung.

Die Genexpressionen für die Gene *IL1B*, *IL6*, *IL8*, *MCP1* und *TNF* der monozytären Zelllinie THP-1 nach Inokulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* sind in Abbildung 3.9 gezeigt.

Innerhalb der ersten 2 h Inkubationszeit war vergleichbar zum Endothel noch keine starke Induktion der Genexpression nachweisbar. Alle Induktionen lagen im Bereich einer 1,3 - 1,5-fachen Erhöhung gegenüber der Negativkontrolle. Nach 6 h Inokulation wurden für alle Gene deutlich stärkere Induktionen der Genexpressionen bestimmt. Für *IL1B* (Abbildung 3.9A) wurde eine signifikante Induktion der Genexpression durch die Isolate 013366/01 (32-fach) und UCN34 (3,1-fach) detektiert. DSM16831 induzierte nach 6 h Inokulation keine Genexpression von *IL1B*. Die Genexpression des *IL6* Genes konnte durch alle *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate nach 6 h Inokulation in der monozytären Zelllinie signifikant gesteigert werden (Isolat 013366/01: 120-fach, DSM16831: 5,2-fach, UCN34: 7,2-fach) (Abbildung 3.9B).



**Abbildung 3.9:** Relative Genexpression der Zielgene *IL1B* (A), *IL6* (B), *IL8* (C), *MCP1* (D) und *TNF* (E) in Monozyten nach Inokulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* DSM16831, Isolat 013366/01 und UCN34. Die Inokulation wurde für 2 h und 6 h durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n=4). Die Signifikanz oberhalb der Balken kennzeichnet die Berechnung der Negativkontrolle im Vergleich zu den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten. \*\*\*:  $P < 0,0005$ ; \*\*:  $P < 0,005$ ; \*:  $P < 0,05$  (Mann Whitney Test).

Es kann ebenfalls gezeigt werden, dass die drei inokulierten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate die Genexpression von *IL8* nach 6 h induzierten (Abbildung 3.9C). Hierbei zeigte sich erneut das Isolat 013366/01 als das Isolat, welches am stärksten die Genexpression induzierte. Die Isolate DSM16831 und UCN34 induzierten die *IL8*-Genexpression in Monozyten nach 6 h Inokulation mit einem ähnlichen Level der Induktion (6,7-fach bzw. 5,4-fach). Für *MCP1* konnte nur für das Isolat 013366/01 ein Induktionspotential nachgewiesen werden (28,3-fach) (Abbildung 3.9D). Durch die Inokulation mit den Isolaten DSM16831 und UCN34 konnte hingegen keine Erhöhung der

Genexpression von MCP1 nachgewiesen werden. Für *TNF* konnte nur eine leichte Induktion durch die drei *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate gezeigt werden (2,1 – 3,6-fach) (Abbildung 3.9E).

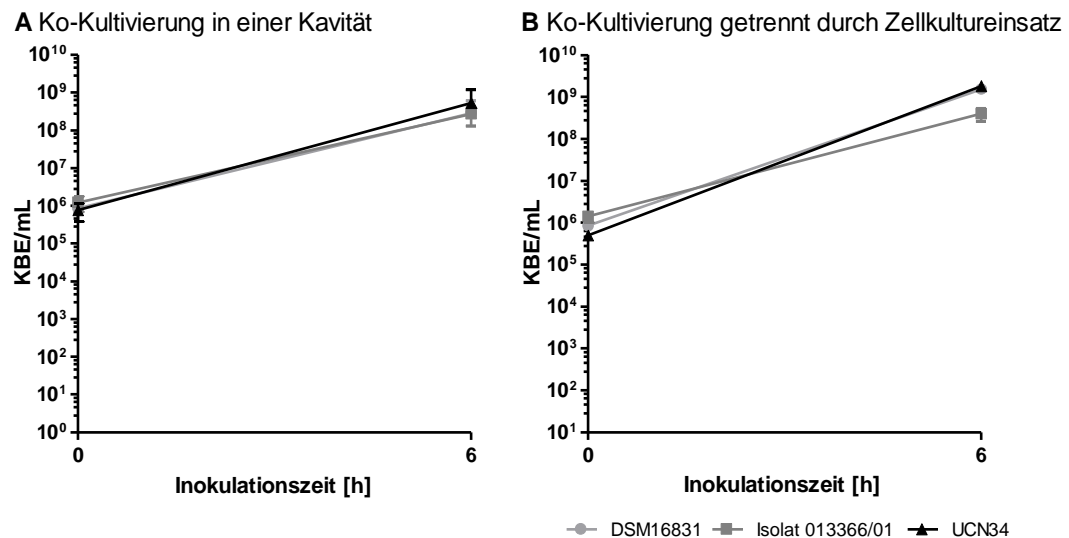
#### 3.1.4 Inflammatorische Reaktion von Endothel und Monozyten in der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-bedingten Endokarditis im Ko-Kultivierungs-Zellkulturmodell

Betrachtet man die *in vivo* Situation in der Pathogenese der IE, so agieren die beiden untersuchten Zelltypen nicht allein. Die Inflammationsreaktion ist eine orchestrierte Antwort auf Pathogene verschiedener Zelltypen, wobei hier die Interaktion zwischen Monozyten und Endothel sowohl durch Zell-Zell-Kontakte, als auch durch die Vermittlung von Signalen durch Zytokine eine zentrale Rolle spielen. Aus diesem Grund sollte durch Ko-Kultivierung der beiden Zelltypen verifiziert werden, ob die Induktion der Inflammationsreaktion durch die Interaktion der Zelltypen deutlich verstärkt oder eventuell abgeschwächt wird.

Es wurde zum einen ein Ko-Kultivierungsmodell etabliert (siehe 5.10.3), welche den Zell-Zell-Kontakt ermöglicht (Ko-Kultivierung in einer Kavität). Die Genexpression von Endothel und Monozyten konnte hierbei nicht getrennt voneinander analysiert werden. Weiterhin wurde ein Ko-Kultivierungsmodell in zwei Kompartimenten durchgeführt, wobei die Zelltypen durch einen porösen Zellkultureinsatz getrennt werden, wodurch Zell-Zell-Kontakte verhindert werden, allerdings können Signalmoleküle zwischen den Kompartimenten ausgetauscht werden. In diesem Ko-Kultivierungsmodell konnte die Genexpression von Endothel und Monozyten getrennt voneinander analysiert werden. Durch die Genexpressionsanalysen in den Monokulturen wurde für die Ko-Kultivierungen nach 6 h Inokulation die Genexpression bestimmt, wobei die Induktion der Gene *IL1B*, *IL6* und *IL8* für die weitere Charakterisierung des Induktionspotentials der Inflammationsreaktion durch die Isolate analysiert wurde.

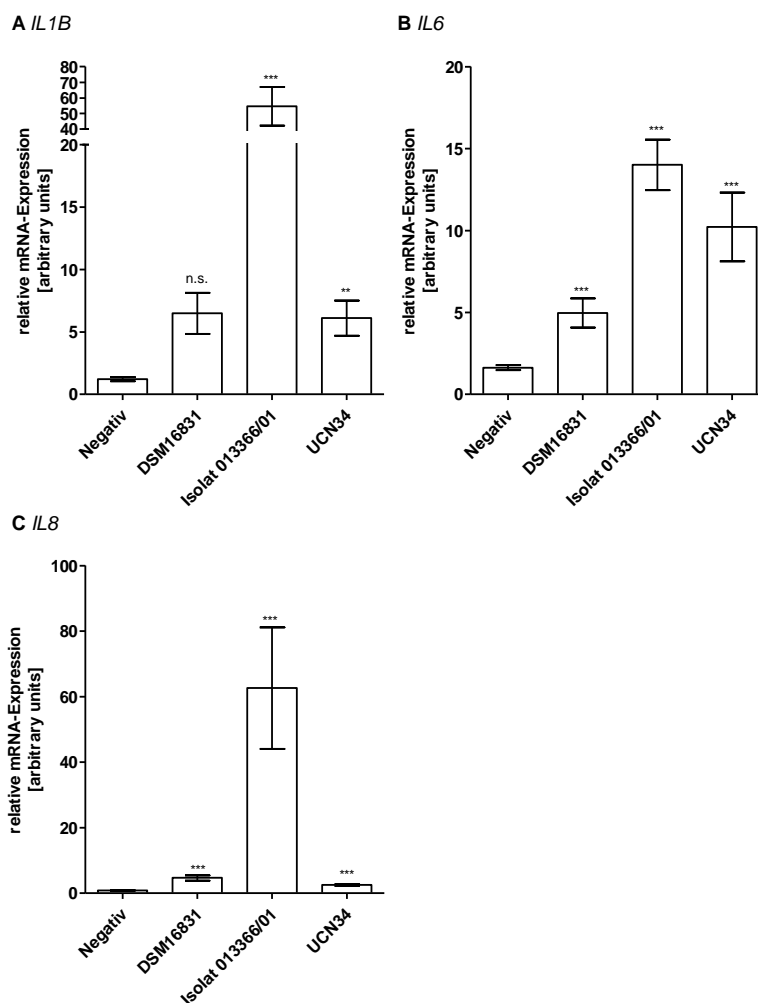
Der zugehörige Bakterientiter der Ko-Kultivierungsmodelle ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Der Anfangstiter konnte auf  $8,4 \times 10^5$  –  $1,4 \times 10^6$  KBE/mL bestimmt werden. Innerhalb der Inokulationszeit erhöhte sich der Bakterientiter auf  $4 \times 10^8$  –  $1,8 \times 10^9$  KBE/mL.





**Abbildung 3.10:** Wachstumskinetik von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* DSM16831, Isolat 013366/01 und UCN34 bei Inokulation mit Monozyten und Endothel in einem Kompartiment (A) oder zwei Kompartimenten (B). Die Wachstumskinetik wurde nach 0 h und 6 h durch Ausplattieren einer geeigneten Verdünnung in DPBS auf TS-Agar bestimmt (Dreifachbestimmung). Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung.

In Abbildung 3.11 sind die Ergebnisse der Genexpression der Ko-Kultivierung von Monozyten und Endothel nach Stimulation mit drei verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten in einer Kavität dargestellt. Die Genexpression von *IL1B* war vergleichbar mit der Genexpressionsinduktion der THP-1-Monokultur (DSM16831: 6,5 vs. 1,3; Isolat 013366/01: 54,5 vs. 31,9; UCN34: 6,1 vs. 3,9) (Abbildung 3.11A). Die Induktion durch Inokulation mit dem Isolat DSM16831 war sowohl in Monokultur als auch bei Ko-Kultivierung in einem Kompartiment nicht signifikant erhöht. Die Stimulation der Genexpression von *IL6* konnte mit allen Isolaten nachgewiesen werden (Abbildung 3.11B). Hierbei erhöhte sich die relative Genexpression um das 4,9- bis maximal 14fache im Vergleich zur relativen Genexpression der unbehandelten Ko-Kultur. Auch für das Gen *IL8* war durch alle Isolate nach 6 h Inokulation eine Induktion der Genexpression nachweisbar (Abbildung 3.11C). Die Isolate DSM16831 und UCN34 induzierten die Genexpression eher gering (relative Genexpressionswerte: 4,7 und 2,5). Die Induktion der Genexpression durch das Isolat 013366/01 (relativer Genexpressionswert: 63) war deutlich stärker.

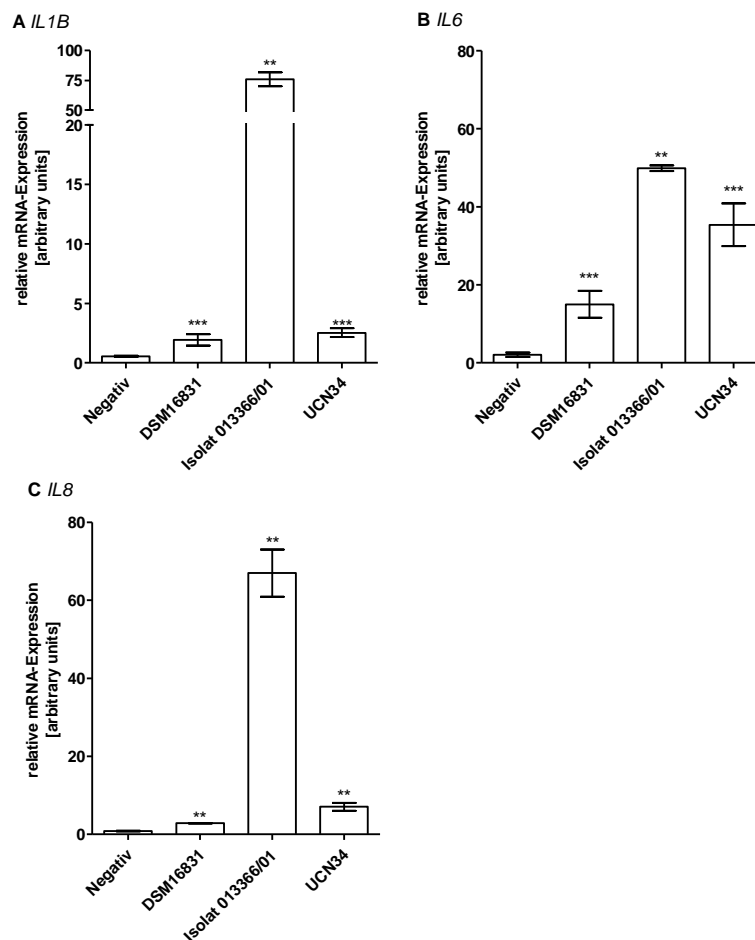


**Abbildung 3.11:** Relative Genexpression der monozytären und endothelialen Zelllinie in Ko-Kultivierung (eine Kavität) nach Inokulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten für die Zielgene *IL1B* (A), *IL6* (B) und *IL8* (C). Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n=3). Die Signifikanz oberhalb der Balken kennzeichnet die Berechnung der Negativkontrolle im Vergleich zu den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten. \*\*\*: P < 0,005; \*\*: P < 0,005; \*: P < 0,05 (Mann Whitney Test).

Bei der Ko-Kultivierung in zwei Kompartimenten wurde die Genexpression der untersuchten Parameter von Endothel und Monozyten getrennt voneinander analysiert. Hierbei zeigte das Endothel ebenso wie in der Monokultur nur marginale Veränderungen der Genexpression durch Inokulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, so dass hier nur die Veränderungen der Genexpression durch Inokulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in den THP-1 Zellen bei Ko-Kultivierung und Inokulation gezeigt sind. Die relativen Genexpressionen für die Gene *IL1B*, *IL6* und *IL8* sind in Abbildung 3.12 dargestellt.

Bei der Ko-Kultivierung der monozytären Zelllinie THP-1 mit Endothelzellen in zwei Kompartimenten und Inokulation von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* konnte nachgewiesen werden, dass die Genexpression der drei untersuchten Gene *IL1B*, *IL6* und *IL8* stimuliert wurde. Hierbei waren die Induktionen der Genexpression von *IL1B* durch Inokulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wieder vergleichbar mit der Induktion in der Monokultur (DSM16831: 1,9 vs. 1,3; Isolat 013366/01: 76,0 vs. 31,9; UCN34: 2,5 vs. 3,9)

(Abbildung 3.12A). Die relative Geneexpression von *IL6* wurde durch die Inokulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* auf das 16 – 50-fache gesteigert (Abbildung 3.12B).



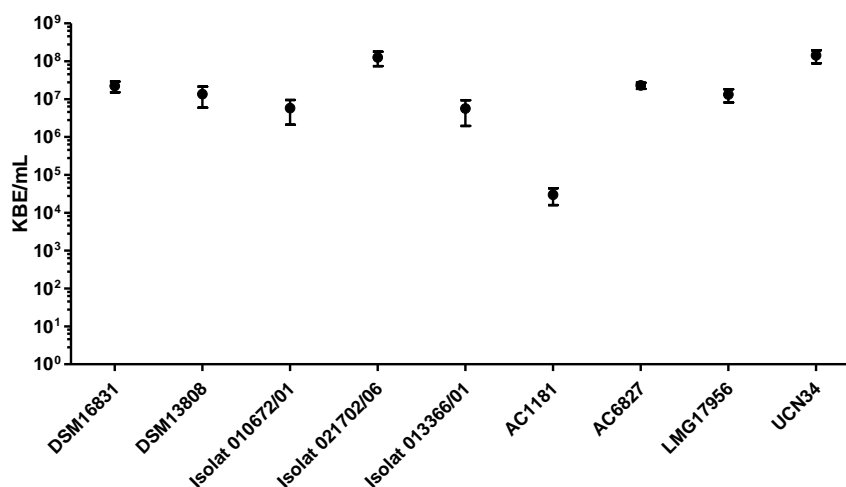
**Abbildung 3.12:** Relative Genexpression der monozytären Zelllinie bei Ko-Kultivierung mit endothelialen Zellen Inokulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten für die Zielgene *IL1B* (A), *IL6* (B) und *IL8* (C). Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n=4). Die Signifikanz oberhalb der Balken kennzeichnet die Berechnung der Negativkontrolle im Vergleich zu den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten. \*\*\*:  $P < 0,005$ ; \*\*:  $P < 0,005$ ; \*:  $P < 0,05$  (Mann Whitney Test).

Die Induktion von *IL8* in THP-1 Zellen bei Ko-Kultivierung und Inokulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wurde ebenfalls durch alle drei Isolate stimuliert, wobei die Induktionen etwas höher als in der Monokultur waren, die Trends allerdings bestätigt werden (DSM16831: 2,9 vs. 6,7; Isolat 013366/01: 67,0 vs. 23,7; UCN34: 7,1 vs. 5,4) (Abbildung 3.12C).

Die Ko-Kultivierung der Monozyten mit den Endothelzellen zeigten keine starken Einflüsse auf die Induktion der Genexpression durch die Isolate, so dass die Monokultur der THP-1-Zellen als adäquates Zellkultur-Modellsystem ausgewählt wurde, um einen Vergleich der Induktionsstärken verschiedener *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate durchzuführen.

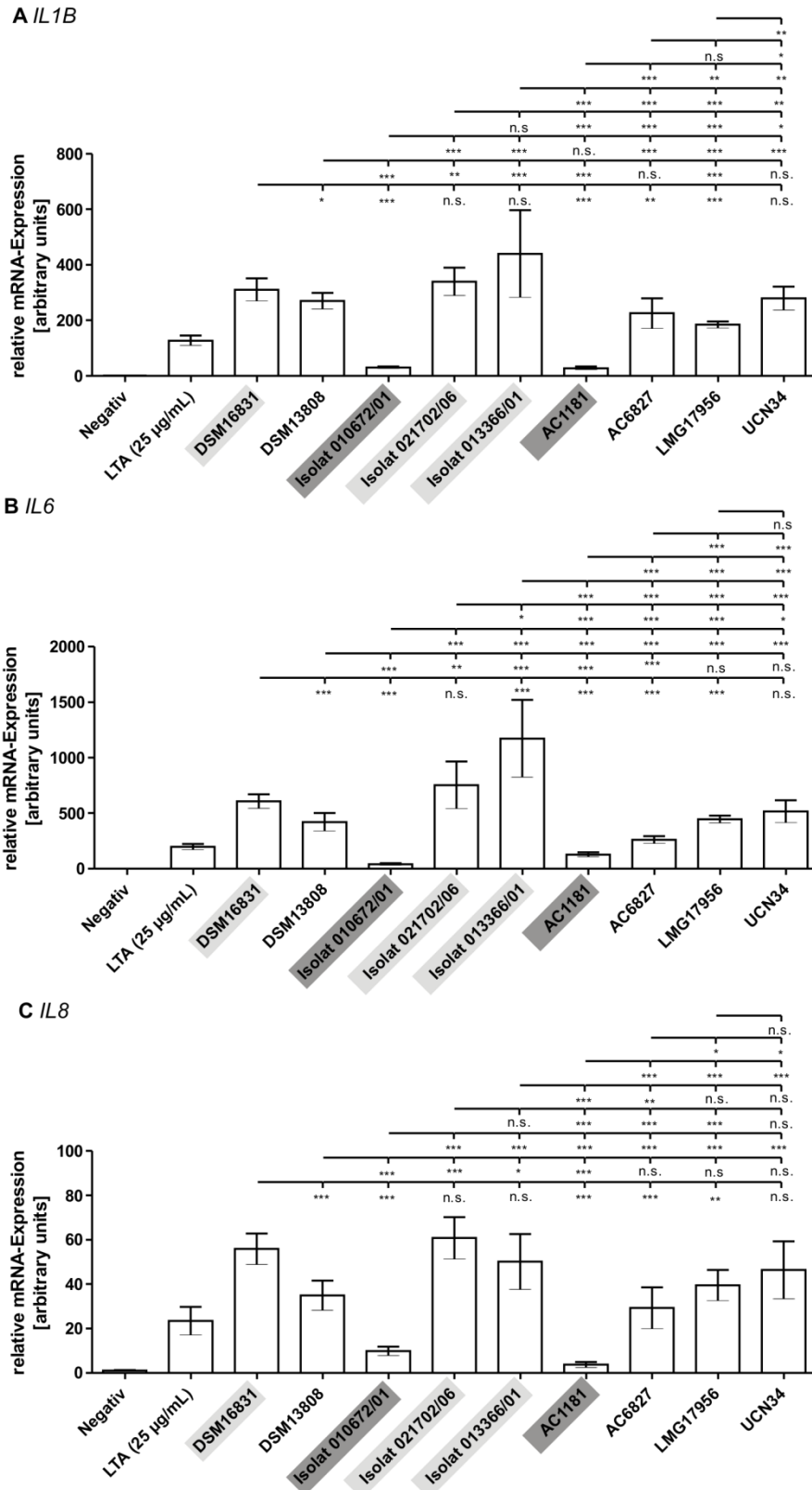
### 3.1.5 Isolat-spezifische Induktion der Genexpression von *IL1B*, *IL6* und *IL8* bei Inokulation von Monozyten mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

Unterschiede in der Induktion der Inflammation könnten starke Auswirkungen auf die Etablierung der IE durch die Isolate bedingen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Genexpression der Zytokingene *IL1B*, *IL6* und *IL8* in THP-1 Zellen nach 6 h Inokulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* signifikant stimuliert wird. Im Folgenden soll ein Stamm-spezifischer Vergleich zeigen, ob bakterielle Phänotypen, welche die Genexpressionen signifikant geringer oder stärker als andere Isolate stimulieren, nachgewiesen werden können. Hierbei wurde zusätzlich eine Positivkontrolle (Inkubation mit 25 µg/mL LTA) mitgeführt. Der Bakterientiter nach 6 h Inokulation ist in Abbildung 3.13 gezeigt. Der initiale Bakterientiter lag bei allen Isolaten zwischen  $2,4 - 7,3 \times 10^5$  KBE/mL. Nach 6 h Inokulationszeit konnte ein Wachstum der Isolate auf  $5,6 \times 10^6 - 1,4 \times 10^8$  KBE/mL nachgewiesen werden. Auffällig war hier das Isolat AC1181, dessen bakterieller Titer von  $1,3 \times 10^5$  KBE/mL während der Inokulationsdauer auf  $3 \times 10^3$  KBE/mL abfällt. Dieser deutliche Unterschied könnte einen Einfluss auf die Induktion der Genexpression bedingen.



**Abbildung 3.13:** Bakterieller Titer nach 6 h Inokulation der monozytären Zelllinie von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung.

Für die Gene *IL1B*, *IL6* und *IL8* ließen sich nach 6 h Inokulation der THP-1 Zellen mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* starke Induktionen der Genexpression nachweisen (Abbildung 3.14). Die drei Isolate, welche die Induktion des Gens am stärksten stimulierten sind durch hellgraue Hintergründe hervorgehoben. Analog kennzeichnen dunkelgraue Hintergründe die Isolate, welche die Induktion des jeweiligen Gens im Vergleich der Isolate am geringfügigsten stimulieren.



**Abbildung 3.11:** Relative Genexpression der monozytären Zelllinie THP-1 nach Inokulation mit neun verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten für die Zielgene *IL1B* (A), *IL6* (B) und *IL8* (C). Hellgrauer Hintergrund kennzeichnet die jeweiligen Stämme, welche am stärksten die jeweilige Genexpression induzieren. Dunkelgrauer Hintergrund kennzeichnet die geringsten Genexpressionswerte. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (n=3). Die Signifikanz des Vergleichs der Isolate untereinander sind oberhalb der Balken durch die Linienführung angegeben. \*\*\*:  $P < 0,0005$ ; \*\*:  $P < 0,005$ ; \*:  $P < 0,05$ ; n.s.: nicht signifikant (Mann Whitney Test).

Die Induktion der Genexpression von *IL1B* (Abbildung 3.14A) zeigte, dass die Isolate 010672/01 und AC1181 signifikant geringer die *IL1B*-Genexpression stimulierten, als die anderen untersuchten Isolate. Das Isolat 010672/01 führte nur zu einer Induktion um das 30,5-fache gegenüber dem Basalgenexpression, das Isolat AC1181 nur zu einer Erhöhung um den Faktor 27,7. Die anderen Isolate induzierten deutlich höhere Genexpressionen. Die stärkste Induktion der *IL1B*-Genexpression wurde durch die Isolate DSM16831, 021702/06 und 013366/01 induziert (relative Genexpressionswerte: 310 – 440).

Für *IL6* konnte ebenfalls stammabhängige Induktionen der Genexpression nachgewiesen werden (Abbildung 3.14B). Die Isolate 021702/06, 013366/01 und DSM16831 stimulierten die *IL6*-Genexpression nach 6 h Inokulation der THP-1 Zellen am stärksten. Auffällig war dabei, dass das Isolat 013366/01 deutlich höhere Genexpressionswerte als die anderen Isolate induzierte, wodurch mit einem relativen Genexpressionswert von 1172 eine fast doppelt so hohe Induktion wie für die Isolate DSM16831 und 021702/06 gemessen wurde (relative Genexpressionswerte: 608 und 753). Vergleichsweise gering wurde die *IL6*-Genexpression durch die Isolate 010672/01 (relative Genexpression: 41,6), AC1181 (relative Genexpression: 128) und AC6827 (relative Genexpression: 260) stimuliert. Die Inokulation der THP-1 Zellen mit den anderen vier *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten induzierte die Genexpression von *IL6* auf relative Genexpressionswerte von 420 bis 608.

Ein ähnliches Induktionsverhalten konnte für die Stimulation der *IL8*-Genexpression nachgewiesen werden (Abbildung 3.14C). Die Isolate 010672/01 (relative Genexpression: 9,9) und AC1181 (relative Genexpression: 3,8) induzierten nur in einem geringen Ausmaß die *IL8*-Genexpression. Die deutlichste Erhöhung der *IL8*-Genexpression wurde durch Inokulation mit den Isolaten DSM16831, 021702/06 und 013366/01 hervorgerufen (50 - 60-fache Erhöhung der Genexpression).

Der Vergleich der Genexpressionen für die Gene *IL1B*, *IL6* und *IL8* zeigte deutlich, dass die Isolate AC1181 und 010672/01 geringer die Genexpression dieser inflammatorischen Zytokingene induzierten, als die anderen untersuchten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate. Die Isolate DSM16831, 021702/06 und 013366/01 induzierten alle drei analysierten Genexpressionen am höchsten, so dass die Isolate phänotypisch unterschieden werden können.

### 3.2 Interaktion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* mit Makrophagen und Thrombozyten

Bei der Infektion eines Organismus, sind nicht nur Signalmoleküle, wie die vorherig untersuchten Zytokine, entscheidende Faktoren bei der Abwehr von Pathogenen. Ebenso spielen zelluläre Interaktionen eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen. Bei der Ausbildung der Vegetation am Endokard im Rahmen einer IE werden durch Zytokine Monozyten zum Infektionsherd rekrutiert. Monozyten fördern die Inflammation durch Synthese weiterer Zytokine, wobei die Migration der Zellen in das Gewebe, Differenzierung zu Makrophagen und phagozytotischer Abbau der Pathogene eine ebenso entscheidende Rolle bei der Abwehr bakterieller Infektionen darstellt.

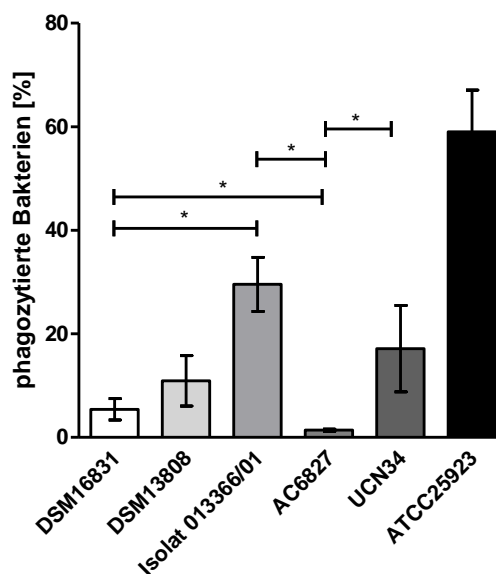
Unter diesem Fokus wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Makrophagen-Zellkulturmodell etabliert, welches sowohl die Rate der Phagozytose in einem festen Zeitrahmen als auch den Vergleich des Abbaus verschiedener *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate in den Phagosomen erlaubt (siehe 3.2.1).

Ebenso wie Monozyten sind Thrombozyten im Rahmen der Etablierung einer IE bei Vegetationsausbildung an der Pathogenabwehr beteiligt. Noch vor Adhäsion von Bakterien werden Thrombozyten bei Vorschädigung des Endokards rekrutiert, um den Gewebeschaden zu begrenzen. Das Fibrin-Thrombozyten-Netzwerk bildet allerdings seinerseits einen prominenten Adhäsionspunkt für Pathogene. Nach Adhäsion von Pathogenen werden neben den Monozyten ebenfalls weitere Thrombozyten rekrutiert. Durch die weitere Auflagerung von Fibrin und Thrombozyten können Pathogene, geschützt vor anderen Zellen der Immunantwort, eine Vegetation etablieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Streptokokken fähig sind, die Anlagerung von Thrombozyten selbst zu induzieren (Tilley und Kerrigan 2013). Für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ist bisher noch nicht bekannt, in welchem Ausmaß das Pathogen die Thrombozyten-Aggregation induzieren kann und ob eventuelle Stamm-spezifische Unterschiede nachzuweisen sind. Aufgrund dessen wurde dieser Aspekt ebenfalls für verschiedene Isolate des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stammkollektivs untersucht (siehe 3.2.2).

#### 3.2.1 Interaktion zwischen Makrophagen und *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

Zur Untersuchung der Phagozytose von verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten wurden THP-1 Zellen mittels Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) innerhalb von drei Tagen zu Makrophagen differenziert. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wurde auf die Zellen zentrifugiert und nach 30 min der Überstand abgenommen. Durch selektive Lyse der humanen Zellen mittels Saponin konnten die intrazellulären Bakterien quantifiziert werden.

Das Verhältnis zwischen phagozytierten Bakterien und dem zugegebenen Inokulum wird als Phagozytoserate innerhalb von 30 min in Abbildung 3.15 dargestellt. Zum Vergleich wurde bei diesem Versuch ein *Staphylococcus aureus* Isolat (ATCC25923) verwendet, welches die Einordnung der Phagozytoserate von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* gegenüber einem bereits gut charakterisiertem IE-Pathogen ermöglicht.

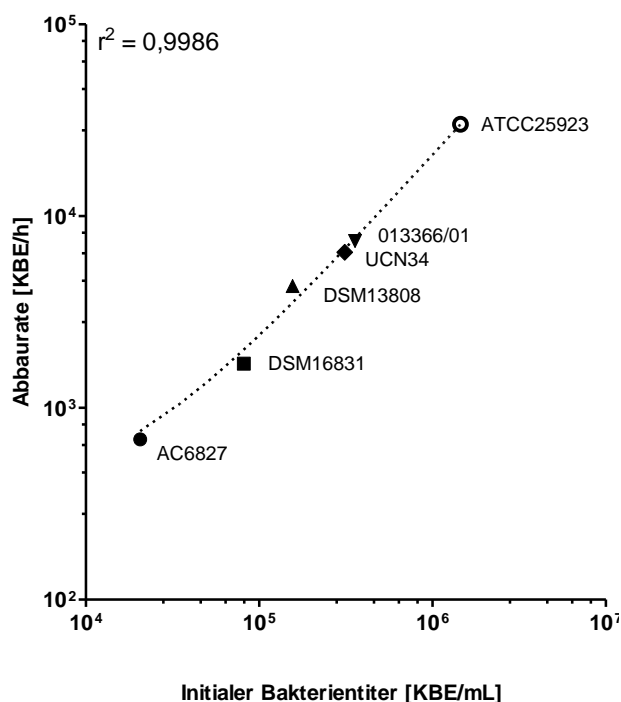


**Abbildung 3.15:** Phagozytoserate der Stämme *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* DSM16831, DSM13808, Isolat 013366/01, AC6827 und UCN34 (n=4) im Vergleich mit *S. aureus* ATCC25923 (n=2). Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler. \* P < 0,05 (Mann Whitney Test).

Der Vergleich zum *S. aureus* Isolat ATCC25923 zeigte zunächst, dass die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate zu einem geringeren Anteil phagozytiert wurden. Der Vergleich der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate untereinander demonstrierte Isolat-spezifische Unterschiede. Das Isolat AC6827 wurde zu einem signifikant geringeren Anteil phagozytiert als die Isolate DSM16831, 013366/01 und UCN34 (1,4 % vs. 5,4 – 29,6 %). Das Isolat DSM16831 wurde mit einer Phagozytoserate von 5,4 % des zugegebenen Inokulums ebenfalls zu einem signifikant geringeren Anteil phagozytiert als das Isolat 013366/01, für welches mit 29,6 % die höchste Phagozytoserate nachgewiesen wurde.

Nach Phagozytose der Bakterien werden diese in den Phagosomen der Makrophagen verdaut. Um diesen Vorgang zeitlich verfolgen zu können, wurden die Makrophagen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation lysiert und die intrazellulären Bakterien quantifiziert. Bei Interpretation des bakteriellen Abbaus ist es möglich, dass durch die unterschiedlichen Anfangstiter, welche mit der unterschiedlichen Phagozytoserate einhergehen, die Abbaurrate beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurde kontrolliert, ob eine Korrelation zwischen der initialen bakteriellen Beladung der Makrophagen und der Abbaurrate (KBE/h) über den gesamten Messzeitraum besteht (Abbildung 3.16).



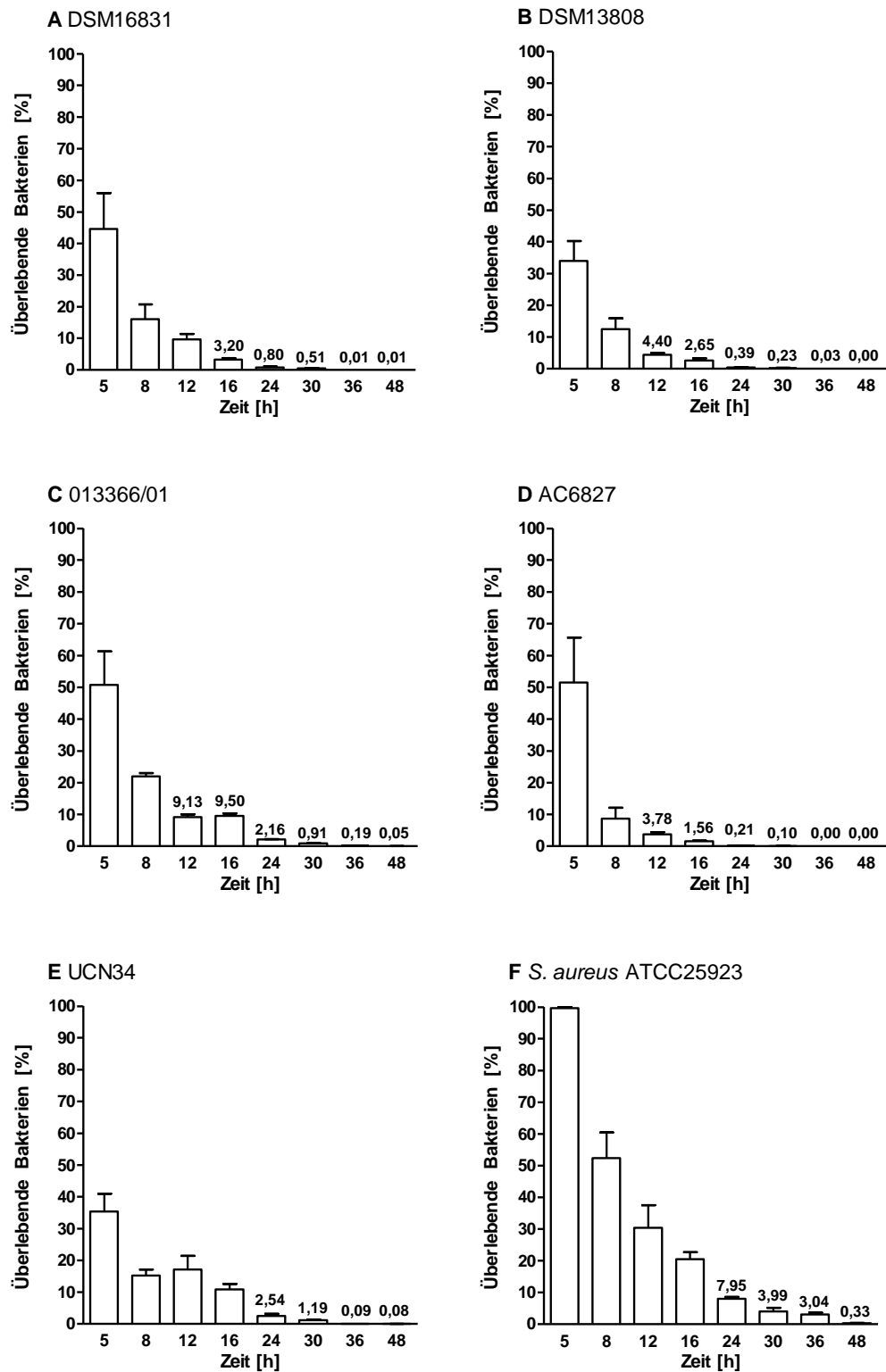


**Abbildung 3.16:** Korrelation über die lineare Regression der Abbaurrate der verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate DSM16831, DSM13808, 013366/01, AC1181 und UCN34, sowie *S. aureus* ATCC25923 und des initial aufgenommenen Inokulums der Isolate über den Versuchszeitraum.

Die Korrelation zeigt, dass die Abbaurrate der Bakterien in direktem Zusammenhang mit dem initial aufgenommenen Bakterientiter in die Makrophagen stand, so dass der Zeitpunkt der Abtötung der Bakterien nicht auf Stamm-spezifische Unterschiede zurückzuführen ist, sondern auf den initialen Bakterientiter. Daher wird der Fokus im folgenden Abschnitt auf Divergenzen bei der Kinetik des Überlebens gelegt. In Abbildung 3.17 dargestellt, wie viele Bakterien (ausgedrückt als prozentualer Anteil der initial aufgenommenen Bakterien) in Abhängigkeit von der Zeit in den Makrophagen überlebten. Die Quantifizierung der intrazellulär überlebenden Bakterien nach Phagozytose in Makrophagen zeigte einen sukzessiven Abbau der Isolate in Abhängigkeit von der Zeit.

Für *S. aureus* ATCC25923 (Abbildung 3.17F) konnte nach 5 h weiterhin der initiale intrazelluläre Bakterientiter nachgewiesen werden, wohingegen die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate bereits stark abgetötet wurden (Überlebende Bakterien nach 5 h: 34 - 52 %).

Die Quantifizierung des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolats DSM16831 (Abbildung 3.17A) zeigte, dass nach 12 h bereits nur noch 10 % der aufgenommenen Bakterien überlebten. Im weiteren Verlauf wurden die Bakterien sukzessive abgebaut bis nach 24 h bereits nur noch 0,8 % der initial phagozytierten Bakterien überlebten. Nach 48 h waren weiterhin 0,01 % des initialen Bakterienanzahl nachweisbar.



**Abbildung 3.17:** Prozentualer Anteil der nach Phagozytose intrazellulär überlebender *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate DSM16831 (A), DSM13808 (B), Isolat 013366/01 (C), AC6827 (D) und UCN34 (E) (n=4) im Vergleich mit *S. aureus* ATCC25923 (F) (n=2). Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler.

Das Isolat DSM13808 war bereits nach 8 h nahezu bis auf 10 % der initial aufgenommenen Bakterien abgebaut (Abbildung 3.17B). Der Abbau führte nach 24 h dazu, dass weniger als 1 % der aufgenommenen Bakterien überleben und bei Inkubationsende (48 h) keine vitalen Bakterien nachweisbar waren.

Nach 12 h waren vom Isolat 013366/01, ebenso wie bei dem Isolat DSM16831, noch 9,13 % der initial aufgenommenen Bakterien intrazellulär nachweisbar (Abbildung 3.17C). Im Gegensatz zum Isolat DSM16831, deren intrazellulärer Titer bis 16 h auf 3,2 % reduziert wurde, konnte für das Isolat 013366/01 zwischen 12 h und 16 h nach Phagozytose keine weitere Reduktion der intrazellulären Bakterien nachgewiesen werden (16 h: 9,51 %). Im weiteren Verlauf wurde auch dieses Isolat sukzessive abgebaut. Ein Nachweis von weniger als 1 % erfolgte jedoch erst nach 30 h. Nach 48 h waren noch 0,05 % der initial phagozytierten Bakterien des Isolats 013366/01 zu detektieren.

Für das Isolat AC6827 wurde bereits nach 8 h auf noch 8 % der initial aufgenommenen Zellzahl abgebaut (Abbildung 3.17D). Bereits nach 30 h konnten intrazellulär keine überlebenden Bakterien mehr nachgewiesen werden. Das *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolat UCN34 zeigte ebenfalls wie das Isolat 013366/01 im Zeitraum von 8 – 16 h nach Phagozytose keine weitere Reduktion des intrazellulären Bakterientiters (Abbildung 3.16E). Der intrazelluläre Titer wurde zwischen 17 und 10 % des initial aufgenommenen Inokulums nicht weiter reduziert. Erst nach 16 h konnte ein weiterer Abbau der intrazellulären Bakterien nachgewiesen werden. Nach 48 h waren noch 0,08 % der zu Beginn aufgenommenen Bakterien nachweisbar.

Da die Abbaurate innerhalb der Makrophagen direkt mit der initialen intrazellulären Bakterienkonzentration korreliert werden konnte, ist der Zeitpunkt, zu welchem die Stämme nicht mehr nachweisbar waren, keine Möglichkeit, um Isolat-spezifische Unterschiede zu determinieren. Allerdings können Auffälligkeiten im Abbau der Isolate 013366/01 und UCN34 nachgewiesen werden, für die intrazellulär ein konstanter bakterieller Titer von 8 - 12 h bzw. 8 - 16 h bestimmt wurde.

### 3.2.2 Induktion der Thrombozyten-Aggregation durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

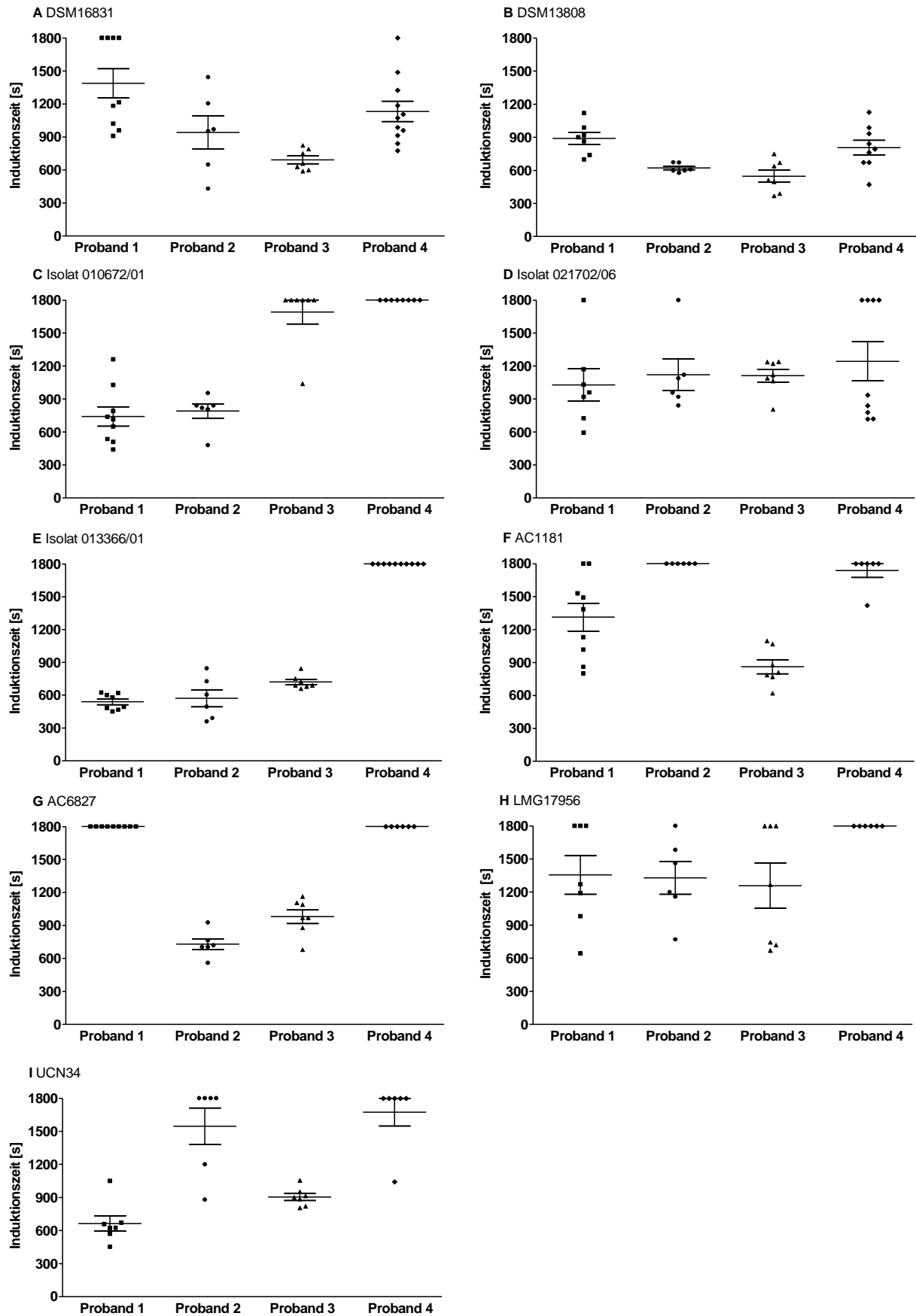
Die Induktion der Thrombozyten-Aggregation, sowie die Auswirkung der Thrombozyten-Aggregation auf die Vegetationsausbildung im Rahmen einer IE, ist bereits für viele andere Streptokokken beschrieben worden (Cox *et al.* 2011). Für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wurde bisher noch nicht untersucht, ob auch dieser Streptokokke durch Kontakt mit Thrombozyten deren Aggregation induziert. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Induktion der Thrombozyten-Aggregation durch verschiedene *S. gallolyticus* subsp.

*gallolyticus* Isolate untersucht. Es wurde Plasma von vier verschiedenen Probanden verwendet, um mögliche individuelle *Host*-Faktoren in die Bewertung der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-induzierten Thrombozyten-Aggregation einzubeziehen.

Die Abbildung 3.18 zeigt die Zeit bis die Induktion der Thrombozyten-Aggregation durch einen Anstieg der Lichttransmission in der Aggregometrie nachweisbar ist. Die normale Thrombozytenfunktion der vier Probanden wurde untersucht, wobei keiner der Probanden hier pathologische Auffälligkeiten zeigte. Um mögliche intervariable Induktionen darzustellen, wurden für die Bewertung der Thrombozyten-Aggregation jeweils zwei Übernachtskulturen der neun *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate an zwei unterschiedlichen Versuchstagen zum Vergleich einbezogen. Alle Ansätze, welche nicht zu einer Induktion der Thrombozyten-Aggregation geführt haben, wurden zur Darstellung mit 1800 s bewertet.

In Abbildung 3.18A ist Induktion der Thrombozyten-Aggregationen durch das *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolat DSM16831 dargestellt. Bei allen vier Probanden konnte das Isolat eine Aggregation der Thrombozyten induzieren, wobei individuell die Induktionszeit allerdings eine hohe Varianz aufwies. Bei Proband 1 konnte für die Induktion der Thrombozyten-Aggregation mittels Isolat DSM16831 keine einheitliche Induktionszeit bestimmt werden, da vier der neun Messungen nicht zu einer Induktion der Aggregation führten. Die Thrombozyten des Probanden 3 zeigten hingegen eine Induktion der Thrombozyten-Aggregation bereits nach 590 – 825 s. Durchschnittlich etwas kürzere Induktionsphasen zeigten die Probanden 2 und 4, wobei hier ebenfalls eine hohe Variabilität bestimmt wurde.

Für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolat DSM13808 (Abbildung 3.18B) konnte ein einheitlicher Phänotyp bestimmt werden. Die Inokulation der Thrombozyten aller Probanden mit dem Isolat DSM13808 zeigte eine deutliche Induktion der Aggregation. Bei Proband 2 und 4 wurde die Aggregation etwas eher induziert, als bei den anderen Probanden (Proband 1: 700 – 1120 s; Proband 2: 579 – 673 s; Proband 3: 370 – 825 s, Proband 4: 473 – 1129 s). Das *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolat 010672/01 (Abbildung 3.18C) zeigte ebenfalls deutlich, wie stark individuelle Divergenzen bei der Thrombozyten-Aggregation durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* die Induktionszeit beeinflussen. Während bei den Probanden 1 und 2 eine Induktion der Thrombozyten-Aggregation nachweisbar war (Mittelwerte: Proband 1 - 740 s, Proband 2 – 791 s), konnte dasselbe Isolat bei den Probanden 3 und 4 keine Thrombozyten-Aggregation induzieren.



**Abbildung 3.18:** Induktionsphase der Thrombozyten-Aggregation (4 Probanden im Vergleich) in Sekunden bei Induktion durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* DSM16831 (A), DSM13808 (B), Isolat 010672/01 (C), Isolat 021702/06 (D), Isolat 013366/01 (E), AC1181 (F), AC6827 (G), LMG17956 (H) und UCN34 (I).

Auch das Isolat 021702/06 (Abbildung 3.18D) induzierte die Thrombozyten-Aggregation bei allen vier Probanden. Es ist auffällig, dass die Induktion mit dem Isolat 021702/06 durchschnittlich länger war, als beispielsweise die Induktionszeit der Thrombozyten-Aggregation bei Inokulation mit DSM13808. Es wurden vergleichsweise hohe Varianzen der Induktion der Thrombozyten-Aggregation mit dem Isolat 021702/06 nachgewiesen.

Das Isolat 013366/01 (Abbildung 3.18E) zeigte für die ersten drei Probanden eine deutliche Induktion der Thrombozyten-Aggregation (Mittelwerte: Proband 1 - 539 s, Proband 2 – 570 s, Proband 3 – 719 s), wohingegen bei Proband 4 bei allen Messungen keine Thrombozyten-Aggregation induziert wurde. Das *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolat AC1181 (Abbildung 3.18F) zeigte ein variableres Bild der Induktion der Thrombozyten-Aggregation. Bei den Probanden 2 und 4 konnte die Thrombozyten-Aggregation nicht induziert werden. Für Proband 1 wurden verhältnismäßig lange Induktionszeiten bestimmt, wobei bei zwei von neun Ansätzen keine Induktion der Thrombozyten-Aggregation gemessen werden konnte. Bei Proband 3 konnte hingegen ein eindeutiger Aggregations-induzierender Phänotyp mit einer durchschnittlichen Induktionszeit von 861 s bestimmt werden. Das Isolat AC6827 zeigte ebenfalls einen ambivalenten Phänotyp: Bei den Thrombozyten der Probanden 1 und 4 konnte in keinem Fall eine Aggregation durch dieses Isolat induziert werden (Abbildung 3.18G). Bei den Probanden 2 und 3 war allerdings deutlich die Induktion der Thrombozyten-Aggregation nach durchschnittlich 730 s und 980 s nachweisbar.

Die Thrombozyten-Aggregationen durch Inokulation der Thrombozyten mit dem Isolat LMG17956 zeigten einen eher schwach induzierender Phänotyp (Abbildung 3.18H). Bei allen Probanden konnte in mehreren Fällen das Isolat nicht die Aggregation der Thrombozyten induzieren. Dennoch wurden bei den Probanden 1, 2 und 3 Einzelmessungen aufgezeichnet worden, bei welchen dieses *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolat eine Aggregation induzieren konnte. Bei Proband 4 hingegen war in keinem Fall eine Thrombozyten-Aggregation nachweisbar.

In Abbildung 3.18I sind die Aggregationen der Thrombozyten der vier Probanden bei Inokulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* UCN34 gezeigt. Mit den Thrombozyten der Probanden 1 und 3 wurde ein deutlicher Aggregations-induzierender Phänotyp gezeigt (Mittelwerte: Proband 1 – 664 s, Proband 3 – 904 s). Bei den Probanden 2 und 4 konnte allerdings bei keiner Messung eine Thrombozyten-Aggregation durch das Isolat UCN34 nachgewiesen werden.

Zusammengefasst kann gezeigt werden, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ebenso wie andere Streptokokken die Aggregation von Thrombozyten induziert. Sehr auffällig sind hier allerdings die starken interindividuellen Varianzen zwischen den einzelnen Probanden, wodurch für die Isolate kein Phänotyp nachgewiesen werden kann, welcher nicht mit Thrombozyten interagiert. Es ist auffällig, dass im Vergleich der Probanden, die Thrombozyten-Aggregation bei Proband 4 durch deutlich weniger *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten induziert wird. Das Isolat DSM13808 zeigte im Vergleich mit den anderen Isolaten bei allen vier Probanden eine sehr frühe Induktion der Thrombozyten-Aggregation.

### 3.3 Analyse von Einzelnukleotid-Varianten in einem Endokarditis-Patienten-Kollektiv

Die inflammatorische Reaktion auf *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zeigten in den Zellmodellen mit Vollblut ebenso wie mit Thrombozyten gesunder Probanden einen starken Einfluss des jeweiligen Probanden. Es ist möglich, dass *Host*-spezifische Divergenzen in der Inflammation durch ENV hervorgerufen werden. Bei einer IE ist die Orchestration der Inflammation sowohl bei der Zirkulation der Pathogene im Blutstrom als auch bei der Etablierung der Vegetation am Endokard ein entscheidender Faktor. Im Fall der IE spielen verschiedenste Komponenten der Pathogen-Erkennung, der Rekrutierung inflammatorischer Zellen, sowie des Zytokinnetzwerkes, als auch anti-inflammatorische Signale, eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund wurden in einem IE-Patienten Kollektiv 14 ENV mittels RFLP im Hinblick auf die Allel- und Genotyp-Frequenz analysiert (siehe 3.3.1). Es ist ebenso möglich, dass die ENV nicht nur die Suszeptibilität gegenüber einer IE erhöhen, sondern auch einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf zeigen. Um einschätzen zu können, ob ENV mit einem veränderten klinischen Bild der IE assoziiert sein könnten, wurden die klinisch relevanten Laborparameter WBC, CRP und PCT hinsichtlich einer Assoziation mit den ENV untersucht (siehe 3.3.2).

#### 3.3.1 Assoziation von Einzelnukleotid-Varianten mit einem Endokarditis-Patienten-Kollektiv

Die Analyse der Allel- und Genotypen der ENV wurde durch eine RFLP-Analyse (siehe 5.21) untersucht. Es wurde der Allel- bzw. Genotyp von 180 Kontrollpersonen mit Endokarditispatienten verglichen. Als Material für die RFLP-Analyse wurde DNA-Extrakt aus Herzklappengewebe verwendet. Aufgrund verschiedener Größe der Gewebestücke für die Extraktion, war somit ebenso der Gehalt an DNA der Patienten variabel. Durch den retrospektiven Studiencharakter konnte kein zusätzliches Material gesichert werden, wodurch nicht für alle Patienten ausreichend Material für jeden ENV zur Verfügung stand. Daher wurde für jedes Gen ein konstantes Patientenkollektiv untersucht, wobei sich die Kollektive untereinander in der Patientenanzahl unterscheiden.

Die Untersuchung von ENV im *TNF* Gen wurde bereits im Rahmen einer vorangegangenen Diplomarbeit untersucht, da sie in der weiteren Auswertung (Pathogen-abhängige Assoziationen und die Assoziation mit pathologisch relevanten Laborparametern) neu aufgearbeitet wurden, werden sie bei der Beschreibung der Assoziationsstudie mit einbezogen (Weinstock 2010). In der Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse der Verteilung der Geno- und Alleltypen für die insgesamt 14 untersuchten ENV aufgeführt. Für *IL1B* wurden drei ENV untersucht.



**Tabelle 3.1:** Genotyp- und Allelfrequenzen der IE-Patientenkohorte im Vergleich mit eine Kontrollkohorte. (P<sub>x</sub>:  $\chi^2$  test; P<sub>F</sub>: Fisher's exact test; P<sub>c</sub>: korrespondierender P-Wert nach Bonferroni-Korrektur).

Variation	Kohorte	Genotyp Frequenz [n(%)]				Allel Frequenz [n(%)]			
		TT	TC	CC	P <sub>x</sub> (P <sub>c</sub> )	T	C	Odds ratio (95 % CI)	P <sub>F</sub> (P <sub>c</sub> )
<b>IL1B</b> c.-118C>T	IE Patienten	46 (44,2)	51 (49,1)	7 (6,7)	0,934	143 (68,7)	65 (31,3)	0,9429	0,778
	Kontrollen	86 (46,5)	87 (47,0)	12 (6,5)	(1,000)	259 (70,0)	111 (30,0)	(0,6525 – 1,362)	(1,00)
<b>IL1B</b> c.302-64G>A	IE Patienten	44 (42,3)	54 (51,9)	6 (5,7)	0,124	142 (68,3)	66 (31,7)	0,7814	0,204
	Kontrollen	72 (38,9)	88 (47,6)	25 (13,5)	(0,372)	232 (62,7)	138 (37,3)	(0,5451 – 1,120)	(0,612)
<b>IL1B</b> c.315C>T	IE Patienten	45 (43,3)	51 (49,0)	8 (7,7)	0,043	141 (67,8)	67 (32,2)	1,3370	0,149
	Kontrollen	105 (56,8)	63 (34,1)	17 (9,1)	(0,129)	273 (73,8)	97 (26,2)	(0,9220 – 1,940)	(0,447)
<b>TLR4</b> c.776A>G	IE Patienten	127 (85,8)	21 (14,2)	0 (0,0)	0,248	275 (92,9)	21 (7,1)	1,411	0,326
	Kontrollen	167 (90,3)	17 (9,2)	1 (0,5)	(0,496)	351 (94,9)	19 (5,1)	(0,7435 to 2,677)	(0,652)
<b>TLR4</b> c.1076C>T	IE Patienten	127 (85,8)	21 (14,2)	0 (0,0)	0,274	275 (92,9)	21 (7,1)	1,411	0,290
	Kontrollen	166 (89,7)	19 (10,3)	0 (0,0)	(0,548)	351 (94,9)	19 (5,1)	(0,7435 – 2,677)	(0,580)
<b>SELE</b> c.-19G>T	IE Patienten	120 (80,5)	29 (19,5)	0 (0,0)	0,415	269 (90,3)	29 (9,7)	0,7593	0,272
	Kontrollen	140 (75,7)	44 (23,8)	1 (0,5)	(0,415)	324 (87,6)	46 (12,4)	(0,4642 – 1,242)	(0,272)
<b>ICAM1</b> c.1405A>G	IE Patienten	47 (30,9)	77 (50,7)	28 (18,4)	0,519	171 (56,2)	133 (43,8)	0,9582	0,815
	Kontrollen	54 (29,2)	104 (56,2)	27 (14,6)	(0,519)	212 (57,3)	158 (42,7)	(0,7054 – 1,302)	(0,815)
<b>TNF</b> c.-418G>A	IE Patienten	97 (92,4)	9 (7,6)	1 (0,9)	0,335	203 (94,9)	11 (5,1)	1,378	0,525
	Kontrollen	171 (92,4)	14 (7,6)	0 (0,0)	(1,000)	356 (96,2)	14 (3,8)	(0,6139 – 3,093)	(1,000)
<b>TNF</b> c.-488G>A	IE Patienten	75 (70,1)	27 (25,2)	5 (4,7)	0,416	177 (82,6)	37 (17,4)	0,7826	0,282
	Kontrollen	116 (62,7)	60 (32,4)	9 (4,9)	(1,000)	292 (78,9)	78 (21,1)	(0,5072 – 1,207)	(0,846)
<b>TNF</b> c.-1043C>A	IE Patienten	81 (75,7)	23 (21,5)	3 (2,8)	0,458	185 (86,4)	29 (13,6)	0,9036	0,344
	Kontrollen	128 (69,6)	52 (27,7)	5 (2,7)	(1,000)	307 (83,4)	61 (16,6)	(0,5697 – 1,433)	(1,000)
<b>IL10</b> c.-627C>A	IE Patienten	78 (59,1)	44 (33,3)	10 (7,6)	0,425	200 (75,8)	64 (24,2)	1,004	1,000
	Kontrollen	104 (56,2)	72 (38,9)	9 (4,9)	(0,425)	280 (77,7)	90 (24,3)	(0,6949 – 1,452)	(1,000)
<b>IL6</b> c.471+870G>A	IE Patienten	12 (10,1)	82 (68,9)	25 (21,0)	<0,0001	106 (44,5)	132 (55,5)	1,020	0,933
	Kontrollen	41 (22,2)	81 (43,8)	63 (34,0)	(<0,0003)	163 (44,1)	207 (55,9)	(0,7347 – 1,416)	(1,000)
<b>IL6</b> c.-661A>G	IE Patienten	31 (26,1)	68 (57,1)	20 (16,8)	0,113	130 (54,6)	108 (45,4)	1,142	0,4506
	Kontrollen	65 (35,3)	83 (45,1)	36 (19,6)	(0,339)	213 (57,9)	155 (42,1)	(0,8219 – 1,586)	(1,000)
<b>IL6</b> c.-237C>G	IE Patienten	31 (26,0)	64 (53,8)	24 (20,2)	0,078	126 (52,9)	112 (47,1)	1,333	0,093
	Kontrollen	71 (38,4)	80 (43,2)	34 (18,4)	(0,234)	222 (60,0)	148 (40,0)	(0,9597 – 1,852)	(0,279)

Der ENV c.315C>T und die Intron-Variante c.302-64G>A zeigten auffällige Häufungen in der Allelverteilung. Die ancestralen Allele C bzw. G konnte in den Kontrollen deutlich häufiger nachgewiesen werden, als in den IE Patienten (*IL1B* c.315C>T: Patienten C-Allel - 67,8 %, Kontrollen C-Allel - 73,8 %; *IL1B* c.302-64G>A: Patienten G-Allel - 68,3 %, Kontrollen G-Allel - 62,7 %). Ein signifikanter Unterschied konnte hier allerdings nicht nachgewiesen werden. Die Genotypenverteilung des ENV *IL1B* c.315C>T zeigte allerdings, dass der Genotyp CC in den Patienten zu einem deutlich geringeren Anteil vorkommt (43,3 % vs. 56,8 %), wohingegen der heterozygote Genotyp CT in der Patientenkohorte auffällig häufiger detektiert wurde (49,0 % vs. 34,1 %). Die Signifikanz von  $P = 0,043$  bleibt nach Bonferroni-Korrektur ( $P_c$ ) allerdings nicht bestehen ( $P_c = 0,129$ ).

Für *TLR4* sind keine Auffälligkeiten für die Allel- und Genotypen-Verteilung nachgewiesen worden. Die seltener vorkommenden Allelvarianten sind nur zu einem sehr geringen Anteil detektiert worden (7,1 % in der Patienten-Kohorte gegenüber 5,1 % in der Kontroll-Kohorte). Der Genotyp wies ebenfalls keine Unterschiede auf. Für die *SELE* Promotor-Variante c.-19G>T und die *IL10* Promotor-Variante (*IL10* c.-627C>A) sind ebenfalls keine Unterschiede zwischen Patienten- und Kontroll-Kollektiv nachgewiesen worden.

Die *TNF* Varianten zeigten in der Allelfrequenz keine deutlichen Unterschiede. Der Genotyp des ancestralen Allels G bzw. C der Varianten c.-488G>A und c.-1043C<A ist allerdings deutlich häufiger in der Patienten-Kohorte detektiert worden (c.-488GG Patienten: 70,1 % vs. c.-488GG Kontrollen: 62,7 %; c.-1043CC Patienten: 75,7 % vs. c.-1043CC Kontrollen: 69,9 %). Dies geht bei beiden Varianten mit einer verringerten Frequenz des heterozygoten Genotyps einher. Eine statistische Signifikanz kann jedoch nicht gezeigt werden.

Die genetischen Varianten im *IL6* Gen und Promotor zeigten keine Unterschiede bezüglich der Allel-Frequenzen zwischen dem Kontroll- und Patientenkollektiv. Im Gegensatz dazu wurden die homozygoten Genotypen der Intronvariante *IL6* c.471+870G>A im Patientenkollektiv deutlich seltener detektiert als im Kontrollkollektiv (*IL6* c.471+870 GG: 10,1 % vs. 22,2 %; *IL6* c.471+870 AA: 21,0 % vs. 34 %), wohingegen der heterozygote Genotyp GA mit 68,9 % signifikant häufiger im Patientenkollektiv vorkam (Kontrollkollektiv GA-Genotyp: 43,8 %;  $P_c < 0,0003$ ). Für die beiden anderen *IL6* Promotor-Varianten zeigte sich ein ähnliches Bild, so dass der heterozygote Genotyp gehäuft in der Kontrollkohorte nachgewiesen wurde (*IL6* c.-661 GA: 57,1 % vs. 45,1 %; *IL6* c.-237 GC: 53,8 % vs. 43,2%). Die gezeigten Differenzen für *IL6* c.-661 und c.-237 sind jedoch nicht signifikant.

Die Endokarditis-Patientenkollektive wurden außerdem in Pathogen-Subgruppen unterteilt. Hierbei wurden Subgruppen der häufigsten Erreger (Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken) gebildet. Alle anderen (Kultur-negative Endokarditiden, mehr als ein Erreger,

gram-negative Erreger, Pilze) wurden in der Gruppe „Andere“ zusammengefasst. Die Allelfrequenzen innerhalb der Subgruppen im Vergleich mit der Patientenkohorte bestimmt. Eine statistische Signifikanz von beobachteten Unterschieden konnte nicht gezeigt werden, da die Kollektive in ihrer Größe durch die Unterteilung niedrige Fallzahlen aufweisen. Allerdings konnten Unterschiede beobachtet werden, welche eventuell durch Ausweitung der Kollektive signifikante Differenzen zeigen könnten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Erwähnte Unterschiede sind in der Tabelle zur Verbesserung der Übersicht grau hinterlegt.

Bei der ENV *IL6* c.-273C>G zeigte die Subgruppe der Staphylokokken hinsichtlich der Allelfrequenz des C-Allels eine deutliche Steigerung gegenüber der Kontrollkohorte (48,9 % vs. 40,0 %). Die Steptokokken-Subgruppe wies bei keinem der ENV eine auffällig hohe oder niedrige Allelfrequenz auf. Die Gruppe der Enterokokken zeigte bei *TNF* c.-488G>A deutlich höhere Frequenzen des ancestralen Allels G im Vergleich mit der Kontrollkohorte (86,7 % vs. 78,9 %). Für die Varianten *IL6* c.-237 C und *IL1B* c.315 T konnte hingegen in dieser Subgruppe eine deutlich höhere Frequenz nachgewiesen werden (52,2 % vs. 40,0 % und 39,3 vs. 26,2 %). In der Gruppe, welche die anderen kausativen Pathogene zusammenfasst, konnte für die ENV *IL1B* c.302-64G>A, *IL6* c.-237C>G und *TNF* c.-1043C>A deutliche Unterschiede in der Allelverteilung im Vergleich mit der Kontrollkohorte detektiert werden. Die anzentralen Allele der *IL1B* c.302-64G>A und *TNF* c.-1043C>A Varianten waren dabei deutlich häufiger im Vergleich mit dem Kontrollkollektiv nachgewiesen worden (71,4 % vs. 62,7 % und 86,7 % und 78,9 %). Das ancestrale Allel der Variante *IL6* c.-237C>G wurde im Vergleich mit der Kontrollkohorte hingegen in dieser Subgruppe „Andere“ zu einem deutlich geringeren Anteil nachgewiesen (47,8 % vs. 60,0 %).

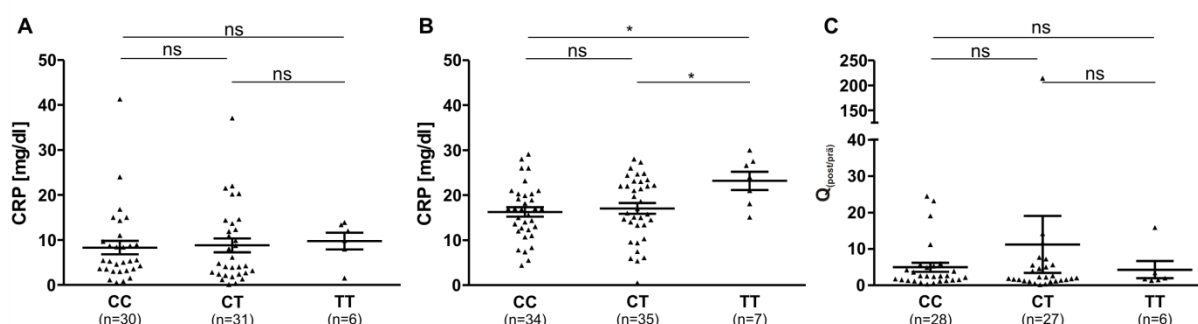
**Tabelle 3.2:** Allelfrequenzen der IE-Patientenkohorte im Vergleich mit eine Kontrollkohorte bei Subgruppierung nach kausativen Pathogen (P: Fisher's exact test; P<sub>c</sub>: korrespondierender P-Wert nach Bonferroni-Korrektur).

Subgruppe	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.	Andere	Kontrollen	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.	Andere	Kontrollen
Variation	<b>IL1B c.-118C&gt;T</b>					<b>TNF c.-418G&gt;A</b>				
Allel [n(%)]	T 52 (65,0)	42 (72,4)	20 (71,4)	29 (69,1)	259 (70,0)	G 82 (97,6)	58 (96,7)	27 (90,0)	36 (90,0)	356 (96,2)
	C 28 (35,0)	16 (27,6)	8 (28,6)	13 (30,9)	111 (30,0)	A 2 (2,4)	2 (3,3)	3 (10,0)	4 (10,0)	14 (3,8)
	P (P <sub>c</sub> ) 0,423 (1,000)	0,759 (1,000)	1,000 (1,000)	0,861 (1,000)		P (P <sub>c</sub> ) 0,747 (1,000)	1,000 (1,000)	0,127 (0,381)	0,087 (0,261)	
Variation	<b>IL1B c.302-64G&gt;A</b>					<b>TNF c.-488G&gt;A</b>				
Allel [n(%)]	G 53 (66,2)	40 (69,0)	19 (67,9)	30 (71,4)	232 (62,7)	G 72 (85,7)	48 (80,0)	26 (86,7)	31 (77,5)	292 (78,9)
	A 27 (33,8)	18 (31,0)	9 (32,1)	12 (28,6)	138 (37,3)	A 12 (14,3)	12 (20,0)	4 (13,3)	9 (22,5)	78 (21,1)
	P (P <sub>c</sub> ) 0,610 (1,000)	0,383 (1,000)	0,687 (1,000)	0,312 (0,936)		P (P <sub>c</sub> ) 0,175 (0,525)	1,000 (1,000)	0,479 (1,000)	0,839 (1,000)	
Variation	<b>IL1B c.315C&gt;T</b>					<b>TNF c.-1043C&gt;A</b>				
Allel [n(%)]	C 55 (68,8)	40 (69,0)	17 (60,7)	29 (69,1)	273 (73,8)	C 73 (89,3)	49 (81,7)	26 (86,7)	37 (92,5)	307 (83,4)
	T 25 (31,2)	18 (31,0)	11 (39,3)	13 (30,9)	97 (26,2)	A 11 (10,7)	11 (18,3)	4 (13,3)	3 (7,5)	61 (16,6)
	P (P <sub>c</sub> ) 0,405 (1,000)	0,430 (1,000)	0,184 (0,552)	0,581 (1,000)		P (P <sub>c</sub> ) 0,510 (1,000)	0,712 (1,000)	0,800 (1,000)	0,171 (0,513)	
Variation	<b>IL6 c.471+870G&gt;A</b>					<b>TLR4 c.776A&gt;G</b>				
Allel [n(%)]	G 41 (46,5)	28 (42,4)	17 (44,7)	20 (43,5)	163 (44,1)	A 98 (92,4)	81 (92,1)	38 (90,5)	58 (96,7)	351 (94,9)
	A 47 (53,5)	38 (57,6)	21 (55,3)	26 (56,5)	207 (55,9)	G 8 (7,6)	7 (7,9)	4 (9,5)	2 (3,3)	19 (5,1)
	P (P <sub>c</sub> ) 0,721 (1,000)	0,893 (1,000)	1,000 (1,000)	1,000 (1,000)		P (P <sub>c</sub> ) 0,345 (0,690)	0,308 (0,616)	0,276 (0,552)	0,752 (1,000)	
Variation	<b>IL6 c.-661A&gt;G</b>					<b>TLR4 c.1076C&gt;T</b>				
Allel [n(%)]	G 47 (53,4)	38 (57,6)	22 (57,9)	23 (50,0)	213 (57,9)	C 98 (92,5)	81 (92,1)	38 (90,5)	58 (96,7)	351 (94,9)
	A 41 (46,6)	28 (42,4)	16 (42,1)	23 (50,0)	155 (42,1)	T 8 (7,5)	7 (7,9)	4 (9,5)	2 (3,3)	19 (5,1)
	P (P <sub>c</sub> ) 0,473 (1,000)	1,000 (1,000)	1,000 (1,000)	0,345 (1,000)		P (P <sub>c</sub> ) 0,345 (0,690)	0,308 (0,616)	0,276 (0,552)	0,752 (1,000)	
Variation	<b>IL6 c.-237C&gt;G</b>					<b>SELE c.-19G&gt;T</b>				
Allel [n(%)]	G 45 (51,1)	37 (56,1)	22 (57,9)	22 (47,8)	222 (60,0)	G 93 (89,4)	76 (90,5)	43 (89,6)	57 (91,9)	324 (87,6)
	C 43 (48,9)	29 (43,9)	16 (42,1)	24 (52,2)	148 (40,0)	T 11 (10,6)	8 (9,5)	5 (10,4)	5 (8,1)	46 (12,4)
	P (P <sub>c</sub> ) 0,149 (0,447)	0,587 (1,000)	0,823 (1,000)	0,152 (0,456)		P (P <sub>c</sub> ) 0,733 (0,733)	0,576 (0,576)	0,817 (0,817)	0,399 (0,399)	
Variation	<b>ICAM1 c.1405A&gt;G</b>					<b>IL10 c.-627C&gt;A</b>				
Allel [n(%)]	A 61 (56,5)	47 (54,6)	25 (54,3)	38 (59,4)	212 (57,3)	C 78 (74,5)	57 (71,3)	29 (76,3)	36 (81,8)	280 (77,7)
	G 47 (43,5)	39 (45,4)	21 (45,7)	26 (40,6)	158 (42,7)	A 24 (23,5)	23 (28,7)	9 (23,7)	8 (18,2)	90 (24,3)
	P (P <sub>c</sub> ) 0,912 (0,912)	0,717 (0,717)	0,753 (0,753)	0,786 (0,786)		P (P <sub>c</sub> ) 1,000 (1,000)	0,398 (0,398)	1,000 (1,000)	0,455 (0,455)	

### 3.3.2 Klinisch relevante Laborparameter in Assoziation mit ENV

Um eine mögliche Auswirkung einzelner ENV auf die IE analysieren zu können, wurden pathophysiologisch relevante Laborparameter hinsichtlich einer Erhöhung bzw. Erniedrigung in Assoziation mit den ENV untersucht. Hierbei wurden die Konzentration des C-reaktiven Proteins (CRP), die Leukozytenzahl (WBC) und die Procalcitonin (PCT)-Konzentration einbezogen. Da die chirurgische Intervention auf alle drei Parameter starke Auswirkungen hat, wurden drei verschiedene Zustände untersucht. Es wurde ein Wert einbezogen, welcher den Laborstatus des Patienten vor chirurgischer Intervention (max. zwei Tage vor chirurgischem Eingriff) widerspiegeln soll. Eine Veränderung dieses Parameters in Abhängigkeit von ENV könnte auf eine veränderte Inflammation in Reaktion auf das Pathogen zurückzuführen sein. Weiterhin wurde ein Wert max. zwei Tage nach dem chirurgischen Eingriff genutzt, um einen potentiellen Einfluss der ENV auf die Reaktion des Patienten auf die chirurgische Intervention zu analysieren. Zusätzlich wurde ein Quotient  $Q_{(post/prä)}$  gebildet, um einen potentiellen Einfluss der ENV auf die individuelle Inflammationsreaktion bedingt durch die therapeutische Intervention zu erfassen. Grafisch dargestellt sind die signifikanten Assoziationen zwischen den ENV und den klinisch relevanten Laborparametern.

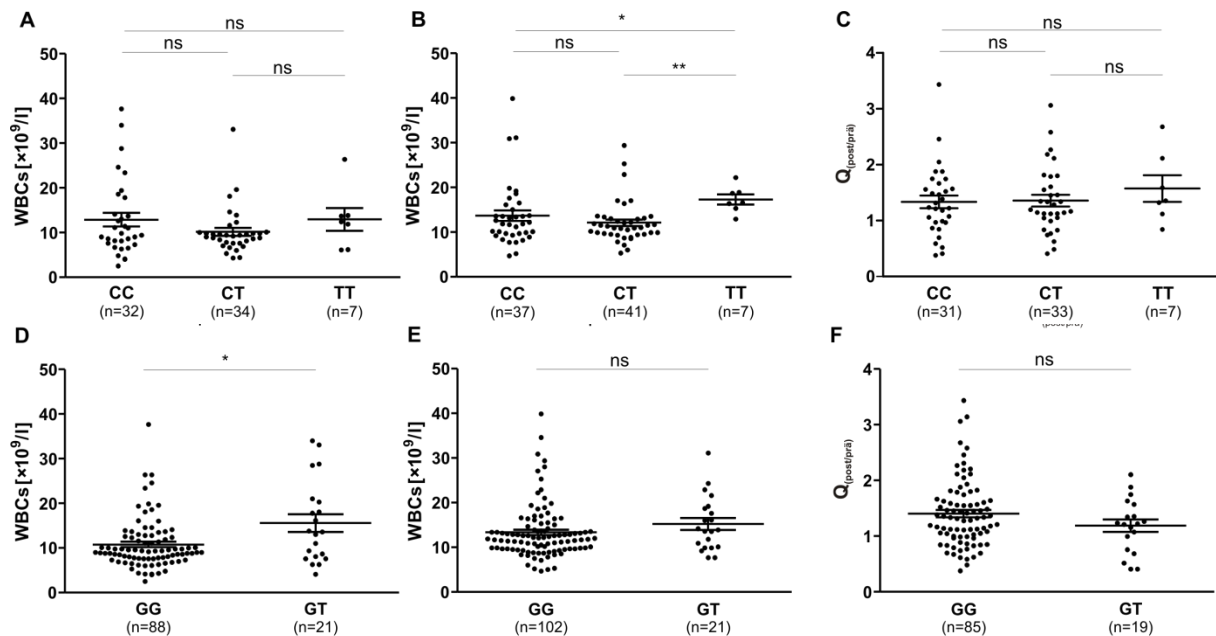
Für die Variante *IL1B* c.315C>T konnte eine signifikante Assoziation des Genotyps TT mit erhöhten CRP-Konzentrationen nach der chirurgischen Intervention festgestellt werden (CC: 16,29 mg/dL; CT: 17,06 mg/dL; TT: 23,19 mg/dL) (Abbildung 3.19B). Die Konzentrationen vor der chirurgischen Intervention sowie der gebildete Faktor unterschieden sich zwischen den einzelnen Genotypen nicht.



**Abbildung 3.19:** Auftragung der prä- (A) und postoperativen (B) CRP-Konzentrationen im Serum von Endokarditispatienten, sowie der Faktor der individuellen  $Q_{(post/prä)}$  Erhöhung (C) in Assoziation mit den Genotypen *IL1B* c.315C>T. \*:  $P < 0,05$ ; ns: nicht signifikant.

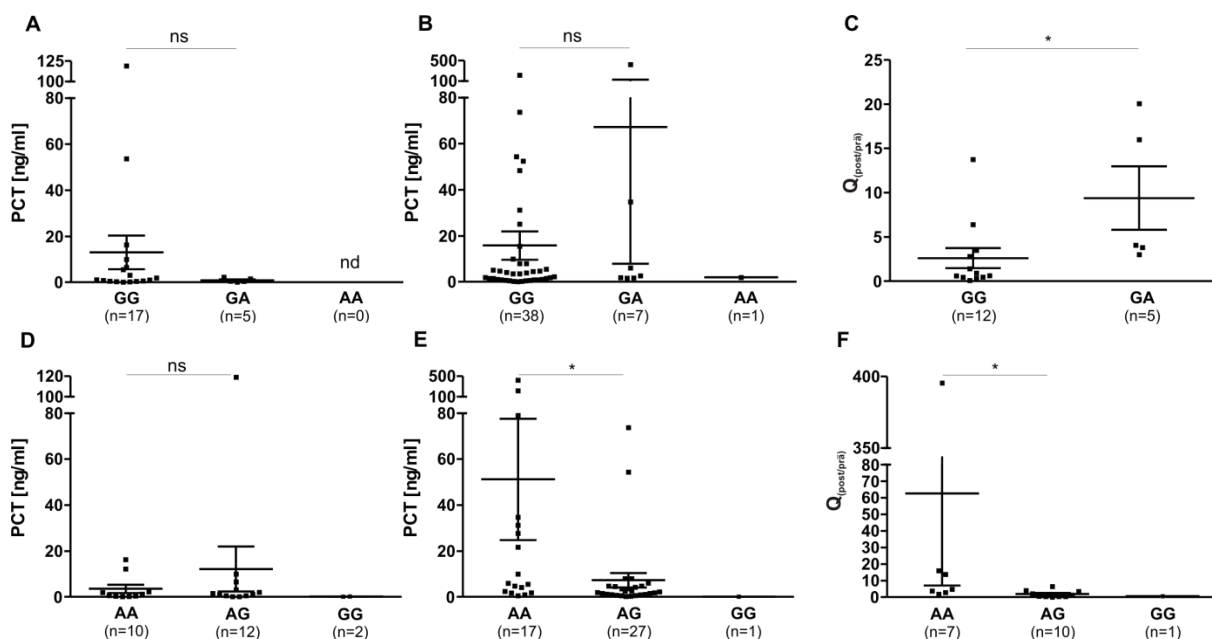
Gleichermaßen konnte der Genotyp TT der *IL1B* Variante c.315C>T mit deutlich höheren Leukozytenzahlen nach der chirurgischen Intervention assoziiert werden (CC:  $13,67 \times 10^9/L$  mg/dL; CT:  $12,09 \times 10^9/L$  mg/dL; TT:  $17,29 \times 10^9/L$ ) (Abbildung 3.20B). Für die *SELE* Variante c.-19G>T (Abbildung 3.20D-E) konnten signifikant erhöhte WBC Zellzahlen vor der

chirurgischen Intervention bei Patienten mit heterozygoten Genotyp GT im Vergleich zu Patienten mit dem Genotyp GG nachgewiesen werden (GG:  $10,78 \times 10^9/L$ , GT:  $15,59 \times 10^9/L$ ). Der Genotyp TT konnte im Kollektiv nicht nachgewiesen werden. Die anderen erfassten Parameter unterschieden sich in Abhängigkeit der Genotypen der *SELE* Variante c.-19G>T der Patienten nicht signifikant.



**Abbildung 3.20:** Auftragung der prä- (A) und postoperativen (B) WBC-Level in Vollblut der Endokarditispatienten, sowie der Faktor der individuellen  $Q_{(post/prä)}$  Erhöhung (C) in Assoziation mit den Genotypen *IL1B* c.315C>T, sowie prä- (D) und postoperativen (E) WBC-Level in Vollblut der Endokarditispatienten, sowie der Faktor der individuellen  $Q_{(post/prä)}$  Erhöhung (F) in Assoziation mit den Genotypen *SELE* c.-19G>T \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $P < 0,005$ , ns: nicht signifikant.

Für PCT konnten keine signifikant höhere oder niedrigere Werte der Patienten vor der therapeutischen Intervention mit den untersuchten ENV assoziiert werden. Die Varianten *TNF* c.-418G>A und *IL1B* c.302-64G>A zeigten allerdings bei der individuellen Erhöhung durch die therapeutische Intervention, ausgedrückt durch den Faktor  $Q_{(post/prä)}$ , signifikante Assoziationen (Abbildung 3.21). Der heterozygote Genotyp GA der *TNF*-Variante c.-418 zeigt erhöhte Werte bezüglich des Faktors  $Q_{(post/prä)}$  (GG: 2,62, GA: 9,39) (Abbildung 3.21C). Für den heterozygoten Genotyp AG der *IL1B* Variante c.302-64G>A kann hingegen eine Verringerung des gebildeten Faktors (AA: 62,6, AG: 1,9), sowie niedrigere PCT-Konzentrationen nach der chirurgischen Intervention bei Patienten mit heterozygotem Genotyp nachgewiesen werden (Abbildung 3.21E).

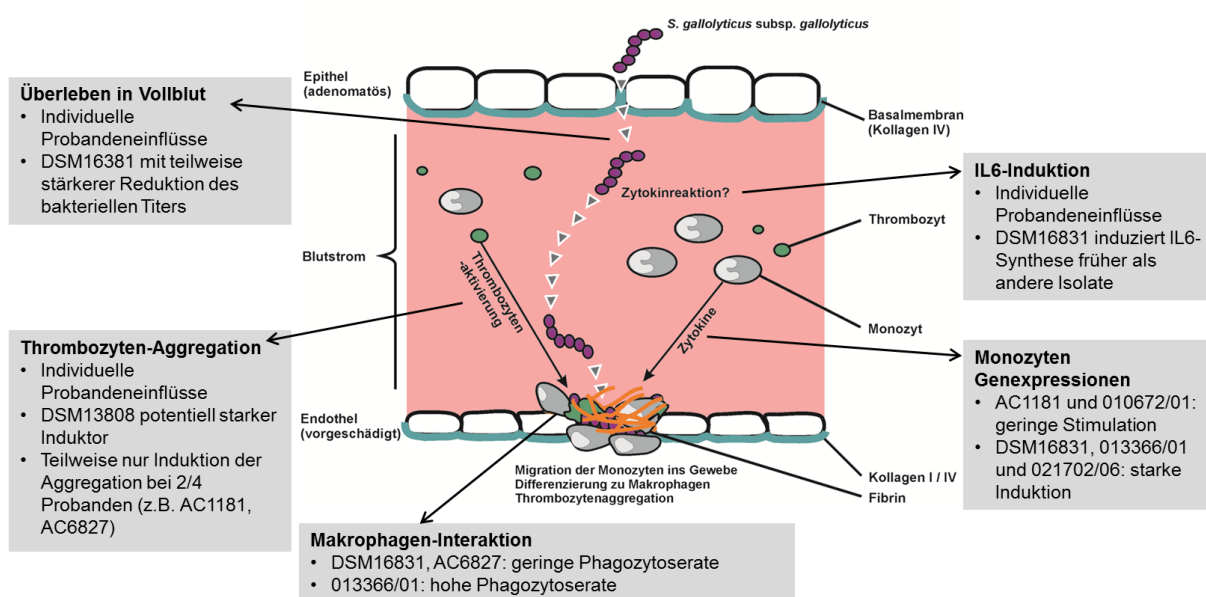


**Abbildung 3.21:** Auftragung der prä- (A) und postoperativen (B) PCT Konzentrationen im Plasma der Endokarditispatienten, sowie der Faktor der individuellen  $Q_{(prä/post)}$  Erhöhung (C) in Assoziation mit den Genotypen *TNFc*-418G>A, sowie prä- (D) und postoperativen (E) PCT Konzentrationen im Plasma der Endokarditispatienten, sowie der Faktor der individuellen  $Q_{(post/prä)}$  Erhöhung (F) in Assoziation mit den Genotypen *IL1B* c.302-64G>A. \*  $P < 0,05$ ; ns – nicht signifikant.

Zusammengefasst kann gezeigt werden, dass der heterozygote Genotyp der Intron-Variante *IL6* c.471+870G>A signifikant häufiger im Endokarditis-Patientenkollektiv nachgewiesen werden konnte. Ebenso konnten Hinweise auf Veränderungen in der Reaktion auf den Erreger bzw. auf den chirurgischen Eingriff durch eine Assoziation der ENV mit auffälligen Abweichungen der untersuchten Laborparameter aufgezeigt werden.

## 4 Diskussion

*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ist ein IE-Erreger, dessen pathophysiologischer Kontext bisher nur geringfügig aufgeklärt ist. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate im Hinblick auf das Induktionspotential inflammatorischer Parameter, sowie ihrer Interaktion mit Makrophagen und Thrombozyten hin untersucht. Innerhalb dessen wurden verschiedene phänotypische Aspekte aufgedeckt, welche in der Abbildung 4.1 zusammengefasst in das einleitend erläuterte hypothetische Modell der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-induzierten IE eingefügt wurden.



**Abbildung 4.1:** Pathophysiologisches Modell der Etablierung einer *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-bedingten IE (modifiziert nach Boleij *et al.* 2011, Benoit *et al.* 2010 und Moreillon *et al.* 2002). In grau hinterlegten Feldern sind die auffälligen Phänotypen, welche im Rahmen dieser Arbeit determiniert wurden, zusammengefasst.

Neben den Phänotypen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten, wurde im Rahmen des Vollblut-Modellsystems sowie der Thrombozyten-Aggregation eine individuelle *Host*-Komponente der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Interaktion mit humanen Zellen aufgezeigt (siehe 4.1). Solche individuellen *Host*-Faktoren könnten zum Teil durch ENV beeinflusst werden, welche nachfolgend im Zusammenhang mit der IE diskutiert werden (siehe 4.2).

Trotz der Probanden-spezifischen Einflussfaktoren konnten in den verschiedenen Modellsystemen unterschiedliche Phänotypen ermittelt werden. Die Divergenzen in der Interaktion mit humanen Zellen lassen sich potentiell auf Virulenzfaktoren zurückführen und könnten möglicherweise die Pathogenität der Isolate beeinflussen (siehe 4.3).



#### 4.1 Individuelle *Host*-Faktoren bei der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-IE

Bei der Etablierung der Modellsysteme für die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-bedingte IE konnte mehrfach der Einfluss von *Host*-Faktoren auf pathophysiologische Prozesse der Infektion bestätigt werden. Zusammengefasst konnte nachgewiesen werden, dass das Wachstum in Vollblut, sowie die IL6-Induktion in Vollblut, ebenso wie die Induktion der Thrombozyten-Aggregation durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, durch individuelle Faktoren stark beeinflusst wird.

Das Überleben von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Vollblut stellte insbesondere bezüglich des Isolats DSM16831 zwischen den Probanden starke Unterschiede dar. Während bei Proband 1 nach 6 h Inokulation eine deutliche Reduktion des bakteriellen Titers nachweisbar war, konnte dies bei den anderen Probanden nicht gezeigt werden. Erst nach 24 h wurden bei diesen Probanden die bakteriellen Titer reduziert. Bei Proband A wurde eine Reduktion der bakteriellen Titer aller Stämme nachgewiesen, welche sich nicht durch andere Probanden reproduzieren lies. Bei der IL6-Induktion konnte nachgewiesen werden, dass, obwohl der Proband 2 auf die LTA-Stimulation grundsätzlich eine deutlich höhere Induktion der IL6-Synthese gegenüber den beiden anderen Probanden zeigte, Proband 1 auf *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* anscheinend zeitlich früher reagiert als die anderen beiden Probanden. Ebenso war die IL6-Induktion durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bei Proband 1 zu dem jeweiligen Zeitpunkt deutlich höher als bei den anderen Probanden.

Ein möglicher Einflussfaktor auf den Bakterientiter ist die Phagozytose im Vollblut-Modellsystem (Fernandes *et al.* 2010). Unterschiede in der Wachstumskinetik zwischen den Probanden könnten Rückschlüsse über die Phagozytose-Effizienz, welche eventuell zwischen den Probanden variiert, zulassen. Die Aktivierung der Zellen durch Pathogene und die damit zusammenhängende Phagozytose induziert die IL6-Synthese (Janeway *et al.* 2001). Da in dem Vollblut-Modellsystem ein Zusammenhang zwischen der Reduktion des Bakterientiters und der IL6-Konzentration zu erkennen ist, könnte die parallele Induktion der IL6-Synthese die Hypothese der gesteigerten Phagozytose somit bekräftigen.

Ein weiterer Aspekt, welcher die Wachstumskinetik zwischen den Probanden beeinflussen könnte ist die Auswirkung des Vollblut-Modells auf die bakterielle Transkription. Es konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden, dass in einem Vollblut-Modellsystem nicht nur die humanen Zellen auf das Pathogen reagieren, sondern es eine beidseitige Wechselwirkung gibt, wobei auch die bakterielle Transkription verändert wird (Mereghetti *et al.* 2008; Malke und Ferretti 2007). Da noch vollkommen ungeklärt ist, welche Faktoren dabei direkte Auswirkungen auf den bakteriellen Metabolismus zeigen, ist es somit möglich, dass die individuelle Zusammensetzung des Blutes der Probanden ebenso individuelle

Veränderungen des bakteriellen Transkriptoms bedingen, wodurch die Isolate als Konsequenz unterschiedliche Wachstumskinetiken zeigen.

In der Thrombozyten-Aggregation konnten sehr individuelle Reaktionen der Thrombozyten der verschiedenen Probanden auf die Isolate nachgewiesen werden. Hierbei ist insbesondere auffällig, dass die Induktion der Thrombozyten-Aggregation des Probanden 4 im Vergleich durch weniger *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate induziert wurde. Die individuelle Komponente der Pathogen-induzierten Thrombozyten-Aggregation wurde ebenfalls bereits für *Streptococcus sanguinis* beschrieben, wobei die Ursachen dieser Beobachtung noch vollkommen ungeklärt sind (McNicol *et al.* 2011). Da die Etablierung einer IE durch Aggregations-induzierende Pathogene begünstigt werden kann, ist es somit möglich, dass die Suszeptibilität gegenüber einer IE des Probanden 4 im Vergleich zu den anderen Probanden aus noch unbekanntem Gründen verringert ist (Herzberg *et al.* 1992). Es lassen sich trotz dieser individuellen Reaktionen der Probanden Divergenzen zwischen den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten aufzeigen, welche in 4.3.3 näher erläutert werden.

Durch die Zell-Modellsysteme wird verdeutlicht, dass die IE ein multifaktorieller Prozess ist, dessen Morbidität nicht allein durch das Pathogen bestimmt wird, sondern dass ebenso *Host*-spezifische Varianzen, auch bezüglich der inflammatorischen Reaktion auf das Pathogen, den Krankheitsverlauf beeinflussen.

#### **4.2 Die Beeinflussung der IE-Pathogenese durch ENV in Genen der inflammatorischen Pathogenabwehr**

Für verschiedene bakteriell bedingte Infektionen wurde der Einfluss von ENV in potentiellen Kandidatengen der Inflammation bereits umfassend untersucht (Kumpf und Schumann 2008; Namath *et al.* 2009; Tumangger und Jamil 2010). Für die IE hingegen sind bislang nur wenige ENV in den Kandidatengen *TLR2*, *LBP* sowie ENV in Genen thrombozytärer Rezeptoren untersucht worden (Bustamante *et al.* 2011; Daga *et al.* 2011; Vollmer *et al.* 2009). Weiterhin wurde eine Assoziation der *TNF* Variante c.-418G>A mit einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber einer IE beschrieben (Giannitsioti *et al.* 2013).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in verschiedenen Genen der inflammatorischen Pathogen-Detektion und -Abwehr eine ENV-Assoziationsstudie durchgeführt. Dabei konnte erstmalig gezeigt werden, dass der heterozygote Genotyp der Variante *IL6* c.471+870G>A signifikant häufiger in einem IE-Patientenkollektiv nachweisbar ist. Diese *IL6* Variante liegt innerhalb des vierten Introns des *IL6* Gens und eine Methylierungsstelle wird durch den Basenaustausch verändert (Khankhanian *et al.* 2013). Allerdings kann noch keinerlei Aussage darüber getroffen werden, ob und welchen Einfluss dies auf die Proteinexpression

hat. Es konnte bisher eine Assoziation der Variante mit der Typ-2 Reaktion bei Lepra-Erkrankung nachgewiesen werden, wohingegen veränderte IL6-Plasmalevel in Abhängigkeit der Genotypen nicht beobachtet wurden (Sousa *et al.* 2012). Es ist eventuell möglich, dass ein gekoppelter Haplotyp hinter der Assoziation mit der IE steckt, welcher innerhalb dieser Studie nicht erfasst wurde.

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass der heterozygote Genotyp ebenfalls bei den beiden ENV *IL6* c.-237C>G und c.-661A>G im IE-Kollektiv deutlich häufiger detektiert wurde, wobei hier allerdings keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Für *IL6* c.-237C>G wurde bereits beschrieben, dass die *ex vivo* LPS-Stimulation von IL6 durch das Vorhandensein des seltenen Allels C signifikant erhöht ist (Tischendorf *et al.* 2007). Ob diese Beobachtung mit einer erhöhten Serumkonzentration von IL6 bei IE-Patienten führen könnte, bleibt derzeit offen. Allerdings konnte die *IL6* Variante bereits mit einer Erhöhung des Blutdrucks assoziiert werden, wobei der *in vivo* Effekt schwer einschätzbar ist (Humphries *et al.* 2001). Es ist möglich, dass ein abnormaler Blutdruck Gewebeschädigungen am Endokard fördert, welche wiederum als Adhäsionspunkt für Bakterien in der IE fungieren. *IL6* c.-237C>G konnte hingegen mit einer erhöhten Mortalität bei Patienten mit schwerer Sepsis assoziiert werden (Sabelnikovs *et al.* 2012).

Für die untersuchten *IL1B* ENV c.315C>T und c.302-64G>A konnten insbesondere bezüglich der Laborparameter signifikante Unterschiede in Assoziation zu Genotypen nachgewiesen werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass nach der chirurgischen Intervention signifikant höhere CRP-Konzentrationen und WBC Zellzahlen in Assoziation mit dem Genotyp *IL1B* c.315 TT detektiert werden können. Ebenso konnte für den Genotyp c.302-64 GA gezeigt werden, dass die faktorielle Erhöhung von PCT im Zuge des operativen Eingriffs bei den Patienten im Vergleich zum homozygoten Genotyp GG verringert ist. Diese Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass die beiden Varianten Einfluss auf den postoperativen Verlauf der Patienten nehmen könnten. Für *IL1B* c.315C>T wurde bereits gezeigt, dass gesunde Probanden mit Genotyp TT eine niedrigere CRP-Konzentration im Serum aufweisen als Probanden mit den Genotypen CT oder CC (Eklund *et al.* 2003). Ein Einfluss von *IL1B* Varianten auf die CRP-Konzentration bei verschiedenen Erkrankungen wurde bereits diskutiert, wobei die direkte Beeinflussung der IL1B-Konzentration im Serum, welche die CRP-Erhöhung bedingen könnte, ebenfalls noch diskutiert wird (Enquobahrie *et al.* 2009; Kimura *et al.* 2004; Pociot 1992). Die erhöhten Entzündungsmarker CRP und WBCs nach chirurgischer Intervention könnten auf einen Einfluss der ENV auf den Verlauf der Erkrankung hinweisen, insbesondere vor dem Hintergrund, dass abnormal hohe Werte für CRP und WBC mit einer erhöhten Mortalität von IE-Patienten assoziiert werden konnten (Cornelissen *et al.* 2013).

Die *IL1B* Varianten c.302-64G>A und c.315C>T zeigten ebenfalls Unterschiede bei der Analyse der Pathogen-Subgruppen. Die Intronvariante wurde sehr häufig in der Subgruppe „Andere“ nachgewiesen. Das C-Allel der Variante c.315C>T ist hingegen sehr selten in der Enterokokken-Subgruppe nachgewiesen worden. Einflüsse der *IL1B* Varianten auf die verschiedenen Subgruppen sind somit möglich, allerdings durch die derzeitige Datenlage noch nicht erwiesen. Da die Gruppe „Andere“ sehr heterogen ist und seltene Erreger zusammengefasst, könnte die Ausweitung und selektive Betrachtung dieser Subgruppe signifikante Assoziationen nachweisen.

Die untersuchten *TNF*-Promotor-Varianten zeigten sich nicht mit der IE-Patientenkohorte assoziiert. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die erhöhte individuelle Steigerung im Rahmen des chirurgischen Eingriffes von PCT innerhalb der Patientenkohorte mit dem heterozygoten Genotyp der *TNF* Variante c-418B>A assoziiert werden konnte. Dies spricht für eine stärkere Reaktion der Patienten im Verlauf der Operation, allerdings konnte noch nicht nachgewiesen werden, dass der PCT-Wert einen Einfluss auf den postoperativen Verlauf hat, so dass hier eine Beeinflussung der Variante auf den Krankheitsverlauf noch ungeklärt ist. Für *TNF* c.-418G>A konnte von Giannitsioti *et al.* eine Assoziation zu einem IE-Patientenkollektiv nachgewiesen werden, die im Rahmen der hier durchgeführten Studie nicht bestätigt werden konnte (Giannitsioti *et al.* 2013). Diese *TNF*-Variante konnte ebenfalls bereits mit einem erhöhten Risiko für die Ausbildung einer schweren Sepsis assoziiert werden, allerdings werden auch hier divergente Studienergebnisse beschrieben (Kumpf und Schumann 2008).

Besonders interessant ist die Variante *SELE* c.-19G>T. Patienten, für die der Genotyp GT nachgewiesen wurde, zeigten vor der chirurgischen Intervention signifikant höhere WBCs als Patienten mit dem Genotyp GG. Da abnormal hohe WBCs mit einer erhöhten Mortalität assoziiert werden konnten, ist es möglich, dass die Variante *SELE* c.-19G>T eine Assoziation zu einem möglicherweise erhöhten Schweregrad der IE darstellt (Cornelissen *et al.* 2013). Diese Assoziation kann direkt auf die Pathogeninteraktion zurückgeführt werden, da die Zellzahl noch vor der chirurgischen Intervention im Vergleich erhöht war. Die *SELE* ENV konnte bereits mit einem erhöhten Risiko für die Koronare Herzerkrankung assoziiert werden (Wang *et al.* 2013). Die funktionelle Rolle, insbesondere im Zusammenhang mit IE, ist allerdings noch völlig ungeklärt.

Die hier durchgeführte Studie zeigt allerdings auch einige Limitationen. Durch die begrenzte Verfügbarkeit des biologischen Materials der Patienten konnte nicht für alle Gene die gleiche IE-Patientenkohorte verwendet werden. Allerdings wurde, um innerhalb eines Genes die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, jedes Gen mit einer eigenen Kohorte untersucht, was

nicht zu einer Beeinflussung der Ergebnisse führen sollte, da starke Assoziationen unabhängig vom Kollektiv detektiert werden sollten. Außerdem beinhaltet die Studie nur IE-Fälle, bei welchen eine therapeutische Intervention nötig war, was in ca. 50 % aller IE-Patienten notwendig ist (Habib *et al.* 2009). Ein Kollektiv welches Patienten mit unkomplizierten Krankheitsverläufen einschließt, wäre interessant. Das hier erstellte Kollektiv stellt allerdings eine homogene Patientengruppe dar, die prinzipiell bezüglich des Krankheitsstatus vergleichbar ist.

Zusammenfassend kann eine Assoziation der IE-Patienten mit der ENV *IL6* c.471+870G>A nachgewiesen werden. Die Pathogen-Subgruppen zeigen interessante Aspekte auf, die allerdings auf Grund der kleinen Kohorten derzeit noch keinerlei Signifikanz zulassen. Eine Ausweitung der spezifischen Subgruppen könnte verifizieren, ob die hier gezeigten Divergenzen der Allelverteilung wirklich einen Einfluss auf die Pathogen-abhängige Pathogenese zeigen. Ebenso interessant stellt sich der Zusammenhang zwischen den ENV und der Assoziation mit den klinisch-chemischen Laborparametern dar, welcher im Hinblick auf die Aufklärung der Auswirkung *in vivo* im Rahmen einer prospektiven Studie verfolgt werden sollte.

#### **4.3 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Phänotypen im pathophysiologischen Kontext der IE**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Phänotypen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* determiniert, welche pathophysiologisch Divergenzen der Virulenz der Isolate bedingen können. Hinsichtlich der Ursachen für diese divergenten Phänotypen sind die Charakteristika der Isolate, welche durch vorangegangene Arbeiten identifiziert wurden, in diesem Zusammenhang von Bedeutung. Daher sind in Tabelle 4.1 die Ergebnisse der Untersuchungen zu den in dieser Arbeit untersuchten Isolaten zusammengefasst. Das Adhäsion- und Invasionsvermögen an Endothelzellen könnte Divergenzen, bezüglich des Potentials der Isolate am Endokard eine Vegetation zu etablieren, bedingen. Ebenso ist die Adhäsion an Kollagene wichtiger Faktor bei der Adhäsion an humane Zellen (Moschioni *et al.*, 2010). Das *gtf* Gen (kodierte für eine Glykosyltransferase) und das *fimB* Gen (Fibrinogen-bindende Protein B) vermitteln die Adhäsion an Zielgewebe (Dargere *et al.*, 2003; Vacca-Smith *et al.* 1994). Für das Virulenzgen *pilB*, welches für das Pilusprotein B kodiert, konnte bereits bei *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* eine zentrale Rolle im Zusammenhang mit dem Überleben in Vollblut und der Phagozytoserate gezeigt werden (Danne *et al.* 2014; Dramsi *et al.* 2006;). Kapsel- und Schleimbildung dienen Pathogenen hingegen als Schutz vor phagozytotischer Aufnahme durch inflammatorisch aktive Zellen (Smith *et al.* 1999).

**Tabelle 4.1:** Phänotypische Charakteristika und Nachweis der Gene *gtf*, *pilB*, *fimB* für die Isolate DSM16831, DSM13808, 010672/01, 021702/06, 013366/01, AC1181, AC6827, LMG17956 und UCN34 (<sup>1</sup>Vollmer *et al.* 2010; <sup>2</sup>Hinse, 2012; <sup>3</sup>Wandrer, 2013). n.b.: nicht bestimmt.

Isolat	Adhäsion <sup>1</sup> (Endothel)	Invasion <sup>1</sup> (Endothel)	<i>gtf/pilB/ fimB</i> <sup>1</sup>	Adhäsion Kollagen I/II/IV <sup>2</sup>	Kapsel <sup>3</sup>	Schleim- bildung <sup>3</sup>
DSM16831	gering	keine Invasion	+/-/+	(+)/(+)/(+)	++++	0
DSM13808	mittel	hoch	+/+/+	(+)/(+)/(+)	(+)	+++
Isolat 010672/01	mittel	mittel	+/+/+	++/+/++	(+)	++++
Isolat 021702/06	hoch	mittel	+/+/+	++/+/++	n.b.	n.b.
Isolat 013366/01	hoch	mittel	+/+/+	++/+/++	++	0
AC1181	mittel	gering	-/-/+	+++/+++/+++	n.b.	n.b.
AC6827	gering	gering	+/-/+	+/+/+	n.b.	n.b.
LMG17956	n.b.	n.b.	+/n.b./+	n.b.	+	+
UCN34	n.b.	n.b.	+/+/+	n.b.	+	++

#### 4.3.1 Überleben in Vollblut durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* – ein entscheidender Faktor noch vor Etablierung der Vegetation am Endokard

*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wird über die Blutzirkulation zum Endokard transportiert. Es ist somit essentiell für den pathophysiologischen Kontext, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in der Zirkulation überlebt und nicht bereits durch beispielsweise Phagozytose eliminiert wird. Im Vollblut-Modellsystem kann nachgewiesen werden, dass das Wachstum der Isolate RPMI1640/Plasma gegenüber dem Wachstum in FCS-haltigen Medium eingeschränkt ist. Der verringerte Bakterientiter bei Eintritt in die stationäre Phase könnte zum einen auf die veränderte Nährstoffsituation zurückzuführen sein. Die Nährstoffzusammensetzung von FCS und humanem Plasma ist jedoch relativ vergleichbar. Der inhibitorische Effekt auf das bakterielle Wachstum ist somit zum anderen eventuell auf noch unbekannte Plasmafaktoren zurückzuführen. Die Inokulation von Vollblut mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zeigte hingegen, dass während das Isolat 013366/01 eine vergleichbare Wachstumskinetik wie in RPMI1640/Plasma zeigte, der bakterielle Titer des Isolats DSM16831 in Proband 1 bereits nach 6 h deutlich reduziert wird. Auch in den anderen beiden Probanden kann für dieses Isolat eine Reduktion des Bakterientiters nach 24 h nachgewiesen werden, wenn auch diese nicht so ausgeprägt ist, wie bei Proband 1.

In der Literatur wurde für Streptokokken der Gruppe A und B bisher ebenfalls Wachstumskinetiken in Vollblut aufgenommen, wobei hier deutlich kürze Zeiträume untersucht wurden. Für die Streptokokken der Gruppe B (*S. agalactiae*) konnte kein Wachstum innerhalb von 90 min nachgewiesen werden, wohingegen hier anzumerken ist, dass ein deutlich höherer initialer Titer von  $3 \times 10^8$  KBE/mL starken Einfluss auf die Kinetik zeigen könnte (Mereghetti *et al.* 2008). Für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ist dieser Titer der Maximaltiter nach Eintritt in die stationäre Wachstumsphase bei Wachstum unter optimalen Bedingungen, so dass dieser Bakterienkonzentration ungünstig für die Aufnahme einer Wachstumskinetik ist. Eine Inokulation von Vollblut mit Gruppe A Streptokokken mit im hier etablierten Vollblut-Modellsystem vergleichbaren  $10^5$  KBE/mL zeigte hingegen innerhalb von 4 h bereits ein Wachstum um 2 – 3 log-Stufen (Liu *et al.* 2006). Ein vergleichbares Wachstum konnte in dem hier durchgeführten Versuch lediglich nach 24 h Inokulation des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolats UCN34 mit Vollblut des Probanden 2 nachgewiesen werden. In dem Vollblut-Modellsystem konnte für das Isolat DSM16831 abgeschwächte Wachstumskinetik gegenüber dem Isolat UCN34 gezeigt werden.

Die Reduktion des Bakterientiters des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* DSM16831 könnte durch die Phagozytose des Erregers von inflammatorisch aktiven Zellen bedingt sein. Nach 48 h wurde im Vollblut-Modellsystem eine deutliche Reduktion der Granulozyten durch die Inokulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nachgewiesen. In Vollblut kann die Phagozytose durch neutrophile Granulozyten inokulierter Mikroorganismen dargestellt werden, so dass dieser Mechanismus der Pathogenabwehr eine potentielle Erklärung für die Schwankungen im bakteriellen Titer im Vollblut-Modellsystem ist (Fernandes *et al.* 2010). Für *S. aureus* konnte bei Inokulation in Vollblut innerhalb von 60 min die phagozytotische Aufnahme durch Leukozyten (hauptsächlich neutrophile Granulozyten) nachgewiesen werden, wobei innerhalb der weiteren Inokulationszeit von 60 min die neutrophilen Granulozyten lysiert wurden und wieder freie Bakterien detektiert werden konnten (Malachowa *et al.* 2011). Es ist somit möglich, dass in diesem Modellsystem eine Phagozytose von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und die damit einhergehende Apoptose der neutrophilen Granulozyten einen Einfluss auf den bakteriellen Titer zeigt. Um dies zu bestätigen, könnte eine FACS-Analyse zu den früheren Zeitpunkten mit einer absoluten Quantifizierung der Blutzellen, Aufschluss geben. Ebenso könnte eine FITC-Markierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im FACS zu frühen Zeitpunkten der Inokulation aufklären, ob *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* DSM16831 früher und in einem höheren Ausmaß als andere Isolate phagozytiert und abgetötet wird, so wie es die Ergebnisse dieser Untersuchung vermuten lassen. Die absolute Quantifizierung der Granulozyten im FACS zu

früheren Zeitpunkten der Inokulation könnte ebenso Isolat-spezifische Unterschiede aufzeigen, welche nach 48 h nicht nachweisbar waren.

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Phagozytose im Vollblut-Modellsystem, welcher zu unterschiedlichen Reduktionen im bakteriellen Titer führen könnte, ist die Kapselsynthese der Isolate. Für *Streptococcus pneumoniae* konnte nachgewiesen werden, dass die Kapsel deutlich zum Schutz vor Phagozytose beiträgt (Hyams *et al.* 2010). Nach der Hypothese, dass der bakterielle Titer durch die Phagozytose durch neutrophile Granulozyten beeinflusst wird, ist es somit möglich, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Kapselproduktion der einzelnen Isolate und dem Bakterientiter im Vollblut-Modellsystem besteht. Während das Isolat DSM16831 eine starke Kapsel produziert, war hingegen für das Isolat DSM13808 nach Nachweis von kapsulären Polysacchariden nur sehr schwach (Wandrer 2013). Für das Isolat DSM13808 konnte während der gesamten Inokulationszeit keine starke Reduktion des bakteriellen Titers, welche auf Phagozytose zurückzuführen wäre, nachgewiesen werden. Weiterhin gab es durch die Aufnahme der Wachstumskinetik keinen Hinweis darauf, dass das Isolat DSM16381 durch die starke Kapselproduktion, verzögert oder vermindert phagozytiert wird. Eine direkte Korrelation der Kapselsynthese von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und der Phagozytose/Abtötung im Vollblut-Modellsystem ist somit nicht möglich.

Ein potentieller Einflussfaktor, welcher den Bakterientiter durch Ausplattieren beeinflussen könnte und eine Reduktion des bakteriellen Titers zur Folge hätte, ist die Aggregation von Bakterien untereinander und mit Blutzellen (Malachowa *et al.* 2011). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dies auch bei der Inokulation von Vollblut mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* den Bakterientiter verändert, allerdings spricht gegen diese Hypothese die Probanden-abhängigkeit des bakteriellen Titers. Würden starke Bakterienaggregate zur Reduktion des Titers im System führen, so wären sie gleichermaßen in allen Probanden zu erkennen.

Das Überleben von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Vollblut wurde bereits mit der Pili-Expression des Pathogens in Verbindung gesetzt (Danne *et al.* 2014). Das *pilB* Gen konnte in dem Isolat DSM16831 nicht nachgewiesen werden (Vollmer *et al.* 2010). Dies könnte ein Grund dafür sein, dass im Vergleich das Isolat DSM16831 nach 48 h einen vergleichsweise eher geringen Bakterientiter aufwies, was bei der Inokulation aller Probanden gezeigt werden konnte. Auch für andere Streptokokken konnte im Mausmodell bereits gezeigt werden, dass *pilB*-Mutanten essentiell geringere Bakterientiter *in vivo* etablieren können, als Wildtyp-Stämme (Maisey *et al.* 2008). Danne *et al.* zeigten keine stamm-spezifischen Unterschiede, sondern, dass innerhalb einer Kultur des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolats UCN34 verschiedene Subpopulationen nachweisbar sind, welche sich in der Expression des Pil1



Pilus unterschieden (Danne *et al.* 2014). Die Heterogenität der Proteinexpression des Pili wurde in unserem Kollektiv noch nicht untersucht. Unterschiede in der Pilus-Expression auf der bakteriellen Oberfläche könnten allerdings demnach eine Möglichkeit sein, welche Unterschiede im Überleben in Vollblut bedingen. Danne *et al.* vermuten, dass durch einen Phasenvarianzmechanismus die Heterogenität der Expression hervorgerufen wird, wobei der bakterielle Nutzen darin besteht, dass bei sich ändernden Umweltbedingungen, wie bei dem Durchtritt über das Epithel in den Blutkreislauf, eine bestimmte Subpopulation schnell angepasst ist (Danne *et al.* 2014). Interessanterweise kann für das Isolat UCN34 in dem Vollblut-Modellsystem nach 48 h ein höherer Bakterientiter (Probanden-unabhängig) bestimmt werden, als für die anderen Isolate. Ob dies durch den von Danne *et al.* charakterisiertem Phasenvarianzmechanismus ermöglicht wird, und wie eine Divergenz dessen zu anderen Isolaten herzustellen ist, sollte weiter verfolgt werden.

Zusammengefasst ist *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* fähig im Vollblut-Modellsystem zu überleben, was einen wichtigen Faktor in der IE-Pathophysiologie darstellt. Das Isolat DSM16831 zeigt eine abgeschwächte Wachstumskinetik gegenüber anderen Isolaten, was durch die nähere Analyse der Phagozytose näher charakterisiert werden sollte. Das *pilB*-Gen stellt ein Virulenzgen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* dar, welches hier entscheidende Einflüsse auf die Pathophysiologie der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-induzierten IE haben könnte.

#### 4.3.2 Induktion inflammatorischer Parameter durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

Sowohl bei dem Transport in der Zirkulation, als auch bei der Etablierung der Vegetation am Endokard, ist die Erkennung der Pathogene und der damit induzierten Zytokin-Produktion ein entscheidender Faktor. Im Vollblut-Modellsystem konnte bereits gezeigt werden, dass das *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolat DSM16831 eine deutlich frühere IL6-Synthese induziert, als die anderen untersuchten Isolate. Eine Verlaufskurve der IL6-Induktion mit einem Maximum, welches dann wieder abfällt, wie sie im Vollblut-Modellsystem für das Isolat DSM16831 bei dem Probanden 1 bestimmt wurde, konnte bereits beschrieben werden (Chia *et al.* 2002). Bei dem Probanden 1 war das Maximum der Induktion durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* DSM16831 nach 24 h erreicht und fiel anschließend wieder ab. Die anderen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate haben erst nach 48 h das Maximum der IL6-Induktion erreicht. Es stellt sich somit die Frage, welche Strukturen dafür verantwortlich sein könnten, dass in Vollblut das Isolat DSM16831 früher die IL6-Synthese induziert als andere Isolate.

Interessanterweise geht die IL6-Induktion mit der Reduktion des bakteriellen Titers einher, wodurch nahelegt, dass hier eventuell ein pathophysiologisch relevanter Zusammenhang

besteht. Eventuell ist diese Beobachtung in Zusammenhang mit der Phagozytose durch neutrophile Granulozyten zu sehen. Es ist bekannt, dass nach der Phagozytose, neutrophile Granulozyten in die Apoptose übergehen (Kobayashi *et al.* 2005). Es konnte weiterhin bereits bewiesen werden, dass die Apoptose durch mehrere Zytokine, darunter auch IL6, verzögert wird (Colotta *et al.* 1992). Eine derartige Verzögerung der Apoptose der neutrophilen Granulozyten wird insbesondere in der frühen Phase der Inflammation als notwendig angesehen, um die Infektion zu bekämpfen (Kobayashi *et al.* 2005). In diesem Kontext könnte somit die Abnahme des bakteriellen Titers des Isolats DSM16831 über IL6 zu verlängerter Überlebenszeit der Neutrophilen führen. Die hierdurch bedingte längere Aktivität der phagozytotisch aktiven Zellen, könnte dann in einem stärkeren Ausmaß die Bakterien phagozytieren.

Ob die frühe IL6-Induktion *in vivo* pathophysiologisch einen Vorteil- oder einen Nachteil für das Isolat darstellt, lässt sich derzeit nicht genau einschätzen. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass das Fehlen von IL6 in der frühen Phase der IE eine erhöhte Mortalität im Mausmodell bedingt (Shun *et al.* 2005). Dies könnte darauf hinweisen, dass die anderen untersuchten Isolate einen Vorteil bei der Etablierung einer Vegetation durch die spätere IL6-Induktion haben. Damit übereinstimmend ist die stärkere Reduktion des bakteriellen Titers des Isolats DSM16831, was ebenfalls pathophysiologisch einen Nachteil für dieses *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolat darstellt.

Es ist derzeit noch unbekannt, welche bakteriellen Strukturen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* direkt für die Induktion inflammatorischer Parameter verantwortlich sind. Für *Streptococcus mutans* konnte bereits *in vitro* gezeigt werden, dass die IL6-Induktion in T-Zellen durch Glykosyltransferasen des Streptokokken induziert wird, wobei in Übereinstimmung *in vivo* eine  $\Delta$ *gtf*-Mutante signifikant geringer als der Wildtyp die IL6-Induktion stimulierte (Chia *et al.* 2002). In *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* konnten für die untersuchten Stämme das Vorhandensein verschiedener Glykosyltransferasegene mittels der DNA-*Microarray*-Technologie nachgewiesen werden (Hinse 2012) (Tabelle 4.2). Es können keine Glykosyltransferasen exklusiv in dem Isolat DSM16831 identifiziert werden, so dass bisher kein Zusammenhang zwischen der IL6-Induktion und dem Vorhandensein bestimmter Glykosyltransferasen dargestellt werden kann.

**Tabelle 4.2:** Genetischer Nachweis der Glykosyltransferasen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* DSM16831, DSM13808, Isolat 010672/01, Isolat 021702/06, Isolat 013366/01, AC1181, AC6827, LMG17956 und UCN34 durch den „GalloChip“ (Hinse, 2012). Gennamen basieren auf der Referenzsequenz von Isolat 013366/01 (ATCC BAA-2069: NCBI Reference Sequence: NC\_015215.1). Rot: Gen nicht nachweisbar, Grün: Gen nicht vorhanden, Gelb: divergente Ergebnisse.

Name	Gen	Genbeschreibung	DSM16831	DSM13808	Isolat 010672/01	Isolat 021702/06	013366/01	AC1181	AC6827	LMG17956	UCN34
c01850_s	<i>rafA</i>	Alpha-galactosidase	Rot	Rot	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Rot	Grün
c02130_s	<i>gtfA</i>	Sucrose glucosyltransferase	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
c03560_s		Cellulose synthase (UDP-forming) putative glycosyltransferases	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
c06860_s		Glycosyltransferase I	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Rot	Grün
c08850_s	<i>pcaC</i>	Carboxymuconolactone decarboxylase gallat decarboxylase	Grün	Grün	Grün	Rot	Grün	Grün	Grün	Rot	Grün
c10400_s	<i>gtfB</i>	Dextranucrase	Grün	Grün	Grün	Rot	Grün	Rot	Grün	Grün	Grün
c10420_s	<i>gtfB1</i>	Glucosyltransferase-I	Grün	Grün	Grün	Rot	Grün	Rot	Grün	Grün	Grün
c11030_s	<i>Alg5</i>	Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
c11870_s		Glucosyltransferase-I	Grün	Rot	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
c13610_s		Glucosyltransferase	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
c14010_s	<i>rgpE</i>	Putative Glycosyltransferase	Rot	Rot	Gelb	Rot	Rot	Grün	Rot	Grün	Gelb
c14040_s		Rhamnosyltransferase	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Rot	Grün
c18750_s		Acyltransferase	Rot	Rot	Grün	Rot	Grün	Grün	Grün	Rot	Rot
c19740_s		Glycosyltransferase family 2	Grün	Gelb	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Rot	Grün
c20320_s	<i>gbpC</i>	Putative glucan-binding protein C	Rot	Rot	Grün	Rot	Grün	Rot	Rot	Rot	Rot

Es ist natürlich möglich, dass die Kombination der exprimierten Glykosyltransferasen, bzw. das Fehlen bestimmter Glykosyltransferasen auch die durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* induzierte IL6-Synthese beeinflusst, allerdings kann hierzu auf Grund der derzeitigen Datenlage noch keine Aussage getroffen werden. Für *Streptococcus mutans* konnte nachgewiesen werden, dass die *gtfB* und *gtfC* Expression Wachstumsphasen-abhängig ist (Stipp *et al.* 2008). Eine derartige Varianz der Expression der in Tabelle 4.2 aufgeführten Gene ist somit ebenfalls als mögliche Ursache für die Divergenz in der IL6-Induktion möglich. Die Determinierung der Rolle der Glykosyltransferasen bei *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in der IL6-Induktion im Vollblut-Modellsystem wäre durch den spezifischen *knock-out* einzelner Gene möglich.

Für das *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolat DSM16831 konnte eine deutlich stärkere Kapselsynthese nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 4.1), als für die anderen Stämme. Auch dies könnte einen Einfluss auf die IL6-Synthese in Vollblut zeigen. Für *S. aureus* und ebenso für *S. pneumoniae* konnte bereits gezeigt werden, dass in Monozyten bzw. Vollblut die

IL6-Synthese durch extrahierte Polysaccharide der bakteriellen Kapsel stimuliert werden (Jagger *et al.* 2002; Soell *et al.* 1995). Ein Unterschied in der genotypischen Ausstattung bezüglich der Kapselgene konnte für die Isolate nicht nachgewiesen werden (Wandrer 2013). Es ist möglich, dass nicht nur der quantitative Nachweise der Kapsel, sondern ebenso Zusammensetzung der Polysaccharidkapsel, in diesem Zusammenhang einen Einfluss zeigen. Folglich könnte eine Bestimmung der Polysaccharide bzw. die dadurch erfolgende Unterscheidung von Serotypen innerhalb des Kollektivs eine Möglichkeit sein, um die dargestellten Beobachtungen näher zu erklären. Die Analyse der bakteriellen Polysaccharide wäre über NMR-Spektroskopie möglich (Calix *et al.* 2012; Szymanski *et al.* 2003; Beynon *et al.* 1997).

Für eine Stamm-Charakterisierung im Zellkultur-Modell wurde die monozytäre THP-1 Zelllinie verwendet. Das Ko-Kultivierungsmodell zeigte keinen Mehrwert für die relative Quantifizierung der Induktion der Genexpressionen der betreffenden Zytokine, da weder verstärkte noch verminderte Induktion der untersuchten Gene durch Inokulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nachgewiesen wurden. Daher wird die monozytäre THP-1 Monokultur als ein adäquates Modell für den Vergleich des Induktionspotentials verschiedener Isolate angesehen. Im THP-1 Zellkulturmodell konnten Isolat-bedingte Divergenzen in der Induktion der Inflammation durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate nachgewiesen werden.

Im Isolat-Vergleich der THP-1 Monokultur kann nachgewiesen werden, dass die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate 010672/01 und AC1181 die Genexpression der Gene *IL1B*, *IL6* und *IL8* vergleichsweise gering stimulierten. Die Isolate 013366/01, 021702/06 und DSM16831 hingegen stellten innerhalb der ersten 6 h die stärksten Stimulantien für die entsprechenden Zytokingene im Isolat-Vergleich dar. Aufgrund des starken Wachstums der Isolate in Zellkulturmedium konnte hier nur ein begrenzter Zeitraum von 6 h untersucht werden. Daher sind die Ergebnisse mit der Induktion im Vollblut-Modellsystem nicht vergleichbar und werden separat beurteilt. Das Isolat AC1181 zeigte innerhalb der Inokulationszeit einen Abfall des Bakterientiters, was einen Einfluss auf die Induktion auf die Zytokingenexpression zeigen könnte, wodurch dieses nur bedingt mit anderen Isolaten vergleichbar ist. Für das Isolat 010672/01 hingegen konnte ein vergleichbarer Bakterientiter zu den anderen Isolaten nachgewiesen werden. Auffällig ist hierbei, dass für das Isolat 010672/01 eine starke Schleimbildung detektiert wurde (Wandrer 2013). Ebenso konnte eine verstärkte Biofilmbildung im Vergleich mit anderen Isolaten durch Vollmer *et al.* dargestellt werden (Vollmer *et al.* 2010). Beide Faktoren wären somit potentielle Virulenzcharakteristika, welche die Induktion der Zytokin-Genexpression beeinflussen könnten. Aufgrund der derzeitigen Datenlage kann allerdings noch kein

spezifischen Gen oder phänotypisches Charakteristikum direkt mit der starken oder schwachen Zytokin-Induktion assoziiert werden.

Die Untersuchungen zur Induktion der inflammatorischen Parameter zeigen, dass die IE ein multifaktorieller Prozess ist, bei welchem sowohl Virulenzfaktoren der Pathogene als auch *Host*-Faktoren das Ausmaß der IE bestimmen. Die hier etablierten Modelle zeigen, dass sich die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate im inflammatorischen Kontext phänotypisch unterscheiden lassen. Die möglichen Ursachen dafür, wie beispielsweise die Pili-Expression oder auch genetische Prädispositionen der Isolate, sollten in Zukunft näher charakterisiert werden.

#### 4.3.3 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Kontakt mit Makrophagen und Thrombozyten und die möglichen Folgen für die Vegetationsausbildung

Sowohl Makrophagen als auch Thrombozyten nehmen bei der Etablierung einer Vegetation am Endokard eine entscheidende Rolle ein, so dass die Interaktion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* mit diesen beiden Zelltypen starke Auswirkungen auf die Persistenz des Pathogens am Endokard haben könnte. Die Untersuchung der Makrophagen-Interaktion zeigte starke phänotypische Divergenzen der untersuchten Isolate bezüglich der Phagozytoserate. Für alle *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate wurde eine vergleichsweise geringe Phagozytoserate gegenüber dem *S. aureus* Isolat ATCC25923 bestimmt. Hierbei fällt insbesondere das *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolat AC6827 auf, welches zu einem deutlich geringeren Anteil phagozytiert wird, als die anderen Isolate. Auch für das Isolat DSM16831 konnte eine vergleichsweise geringe Phagozytoserate bestimmt werden. Von den untersuchten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen kann für das Isolat 013366/01 die höchste Aufnahmerate durch die Makrophagen bestimmt werden.

Die Unterschiede in der Phagozytoserate der untersuchten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate könnten wiederum in einer unterschiedlichen Kapselsynthese begründet sein. Für *Streptococcus suis* konnte bereits beschrieben werden, dass Kapsel-Deletionsmutanten im Gegensatz zum Wildtyp durch alveolare Makrophagen phagozytiert werden, wobei dies im *in vivo* Modell gleichzeitig deutlich die Mortalität und Morbidität der Infektion verringerte (Smith *et al.* 1999). Für das Isolat DSM16831 wurde die stärkste Kapselpolysaccharid-Synthese bestimmt, wohingegen für das Isolat DSM13808 der Nachweis nur sehr schwach war (Wandrer 2013). Da allerdings keine starke Divergenz zwischen diesen Isolaten bezüglich der Phagozytoserate nachgewiesen werden konnte, ist die Kapselsynthese vermutlich nicht der dominante Faktor zur Aufnahme durch Makrophagen. Weiterhin konnte für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bereits gezeigt werden, dass die Pili-Expression Einfluss auf die Phagozytoserate nimmt (Danne *et al.* 2014). Im Vergleich mit Tabelle 4.1

kann gezeigt werden, dass für die beiden gering phagozytierten Isolate DSM16831 und AC1181 kein *pilB*-Gen nachgewiesen werden konnte, weshalb dies potentiell einen starken Einfluss auf die Phagozytoserate zeigen könnte und die Prominenz dieser Struktur bei der inflammatorischen Abwehr vermuten lässt. Für das Isolat DSM13808 konnte allerdings das *pilB* Gen nachgewiesen werden, wobei hier kein signifikanter Unterschied zu DSM16831 in der Phagozytoserate zu bestimmen war. Wie auch bei den *gff*-Genen durch Stipp *et al.* gezeigt wurde kann die Expression des Gens variieren, wodurch dies einen Einfluss auf die Phagozytose haben könnte (Stipp *et al.* 2008). Die Rolle der *pilB*-Expression sollte in zukünftigen Arbeiten näher charakterisiert werden, da viele Aspekte auf eine Prominenz dieses Proteins in der Pathobiochemie der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-induzierten IE hindeuten.

Da die Abbaurate in direkter Korrelation zur initialen Beladung der Makrophagen korreliert werden konnte, sind für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* keine phänotypischen Divergenzen bezüglich der Abbaurate *per se* nachweisbar. Jedoch stimmten die hier dargestellten Daten mit Boleij *et al.* überein, so dass die Isolate noch nach 24 h nachweisbar waren und *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* somit verhältnismäßig lange in Makrophagen überleben kann (Boleij *et al.* 2011). Es kann derzeit nicht davon ausgegangen werden, dass die Kapselsynthese bei *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zu Isolat-spezifischen Divergenzen in der Abbaurate in Makrophagen führt. Für *Streptococcus suis* konnte durch Deletionsmutanten ein Einfluss der Kapsel auf die phagozytotische Abbaurate nachgewiesen werden (Smith *et al.* 1999; Feng *et al.* 2012). Welchen Einfluss auf die Abbaurate in Makrophagen eine Deletion der Kapsel bei *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* hat, könnte in zukünftigen Arbeiten mithilfe des etablierten Makrophagen-Modells gezeigt werden.

Wenn man einzelne Zeitbereiche betrachtet, so sind die Isolate UCN34 und 013366/01 durch einen Zeitraum aufgefallen, in denen ein konstanter intrazellulärer Titer nachgewiesen wurde, wohingegen die anderen Isolate in dieser Zeit sukzessive weiter abgebaut wurden. Bereits 1995 beschrieben de Herdt *et al.* einen *S. bovis* Typ I Stamm, welcher nach Phagozytose aus den Phagosomen freigesetzt wurde und sich anschließend in dem Makrophagen weiter vermehren konnte (De Herdt *et al.* 1995). Der hier gezeigte konstante intrazelluläre Bakterientiter könnte auf ein intrazelluläres „Steady state“-Gleichgewicht für die Isolate UCN34 und 013366/01 hinweisen, welche ebenso wie von de Herdt *et al.* beschrieben, nach Freisetzung aus den Phagosomen zur Replikation im Zytoplasma fähig sind.

Die zweite zelluläre Interaktion, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, war die Interaktion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* mit humanen Thrombozyten. Die Isolat- und

Donor-Abhängigkeit der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-induzierten Thrombozyten-Aggregation könnte starke Auswirkungen auf die Etablierung der IE *in vivo* zeigen. Im Rahmen der Messung der Induktion der Thrombozyten-Aggregation durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* konnte kein Isolat bestimmt werden, welches in keinem der Probanden die Thrombozyten-Aggregation induzieren konnte. Die Isolate 010672/01, AC1181 und AC6827 fielen auf, da bei zwei der vier Probanden keine Aggregation induziert wurde. Das Isolat DSM13808 hingegen induzierte bei allen vier Probanden vergleichsweise sehr früh die Thrombozyten-Aggregation. Es wurde schon für Streptokokken und Staphylokokken gezeigt, dass die Fähigkeit zur Thrombozyten-Aktivierung der Isolate mit einer erhöhten Virulenz einhergeht (Herzberg *et al.* 1992; Veloso *et al.* 2012). Hierdurch könnten durch die analysierten Unterschiede im Induktionspotential der Isolate für die Thrombozyten-Aggregation Hinweise auf unterschiedliche Pathogenitäten gegeben werden.

Interessanterweise konnte für *Streptococcus mutans* bereits ein Zusammenhang zwischen Glykosyltransferasen und der Induktion der Thrombozyten-Aggregation hergestellt werden, welcher aufzeigt, dass *gtf*-Defektmutanten ein verringertes Potential zur Induktion der Thrombozyten-Aggregation zeigen (Taniguchi *et al.* 2010). Im Abgleich mit dem Nachweis der Glykosyltransferasen konnte allerdings keine Glykosyltransferase identifiziert werden, welche in den Isolaten 010672/01, AC1181 und AC6872 fehlt und daher eventuell einen direkten Einfluss auf die teilweise ausfallende Induktion der Thrombozyten-Aggregation zeigt (vgl. Tabelle 4.2). Ebenso konnte kein Glykosyltransferase-Gen identifiziert werden, welches exklusiv in dem Isolat DSM13808 nachgewiesen wurde und somit mit der frühen Induktion der Thrombozyten-Aggregation bei allen vier Probanden in Verbindung gebracht werden könnte.

Die Thrombozyten-Pathogen-Interaktion beruht nach bisherigen Studien auf verschiedensten Mechanismen, welche zur Aktivierung der Thrombozyten führt. Die Bindung der Pathogene kann dabei direkt oder indirekt über Brückenmoleküle wie Fibrinogen, Fibronectin, IgG oder den von-Willebrand-Faktor erfolgen (Sullam *et al.* 1988; Cox *et al.* 2011). Um die Interaktion zwischen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und Thrombozyten näher zu charakterisieren müssen zusätzliche Untersuchungen durchgeführt werden. Hierbei können verschiedene Aspekte untersucht werden. Es sollte aufgeklärt werden, welche Strukturen bei der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-induzierten Thrombozyten-Aggregation eine prominente Rolle einnehmen. Da für andere Streptokokken, ebenso wie für *S. aureus*, die Induktion der Thrombozyten-Aggregation durch Pathogen-Rezeptor-Interaktionen über FcRIIIa oder GPIIb nachgewiesen wurde, sollten auch diese als mögliche Rezeptoren zur Wechselwirkung mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Betracht gezogen werden (Cox *et al.* 2011).

Ein anderer wichtiger Punkt ist die Resistenz der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate gegenüber thrombozytären antimikrobiellen Peptiden. Die Resistenz gegenüber den thrombozytären antimikrobiellen Peptiden von verschiedenen Streptokokken und *S. aureus* konnte bereits einen Einfluss auf die Ausbildung einer Vegetation zeigen, so dass diese Aspekt auch bei der durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-induzierten IE näher charakterisiert werden sollte (Weidenmaier *et al.* 2005; Dankert *et al.* 1995; Wu *et al.* 1994).

#### 4.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bezüglich der Interaktion mit humanen Zellen im inflammatorischen Kontext der IE divergente Phänotypen determiniert werden können. Hierbei wurde gezeigt, dass sowohl die Induktion der Inflammation, als auch die Interaktion mit Makrophagen und Thrombozyten variieren, allerdings lässt die derzeitige Datenlage noch keine Rückschlüsse auf die bisher nachgewiesenen Virulenzgene oder andere phänotypische Eigenschaften, wie z.B. die Kapselsynthese oder eine Pilusbeteiligung, zu. Weiterführende Studien sollen die bakteriellen Strukturen, welche für diese Divergenzen verantwortlich sind, identifizieren. Zu diesem Zweck sollten *knock-out* Mutanten hergestellt werden, welche die in diesem Zusammenhang relevanten Gene der Glykosyltransferasen, Pili oder Kapselsynthese betreffen. Die in dieser Arbeit etablierten Modellsysteme stellen die Grundlage zur Charakterisierung dieser *knock-out* Mutanten, so dass der Pathomechanismus der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-induzierten IE weiter charakterisiert werden kann. Da nicht nur das Vorhandensein der Virulenzgene, sondern ebenso deren Expression im pathophysiologischen Kontext eine entscheidende Rolle bezüglich der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Pathogenese darstellen kann, ist auch die Aufklärung des bakteriellen Transkriptoms ein interessanter Aspekt für zukünftige Arbeiten. Zu diesem Zweck könnte eine Chip-basierte Expressionsstudie für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* etabliert werden. Für andere Pathogene werden bereits Chip-Expressionsstudien genutzt, um die Virulenzgenexpression näher zu charakterisieren. Durch die zur Verfügung stehenden Genom-Sequenzen für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* kann diese Technologie ebenfalls genutzt werden, um in den hier etablierten Modellsystemen zu zeigen, welche Strukturen bei der Interaktion mit spezifischen Zelltypen auf bakterieller Ebene induziert werden.

In einem Teil dieser Arbeit wurde die Probanden-abhängige Induktion der Thrombozyten-Aggregation durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* gezeigt. Während für andere Spezies die Interaktion zwischen Pathogen und Thrombozyten schon charakterisiert wurde, ist bislang noch ungeklärt, über welche Rezeptoren die Interaktion zwischen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und Thrombozyten vermittelt wird. Hierbei können Inhibitoren der



Thrombozyten-Aggregation genutzt werden, um die durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* induzierten Signalwege näher einzugrenzen. Weiterhin ist die Sensitivität bzw. Resistenz von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* gegenüber antimikrobiellen thrombozytären Proteinen bislang noch nicht geklärt. Da diese auch einen Einfluss auf die Pathogenität der Isolate zeigen könnten, sollte dieser Aspekt in weiteren Arbeiten für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate charakterisiert werden. Die Relevanz der Aggregation durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* *in vivo* ist bislang ebenfalls noch nicht aufgeklärt. Aus diesem Grund könnte eine prospektive Studie angelegt werden, welche weitere Blutkultur-Isolate des Erregers einbezieht, die Thrombozyten-Aggregation durch das entsprechende *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolat *in vitro* untersucht und eine Korrelation zu klinisch relevanten Parametern, wie beispielsweise der Vegetationsgröße, untersucht.

Im letzten Teil der Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Intron-Variante *IL6* c.471+870G>A im heterozygoten Genotyp signifikant häufiger im Patienten-Kollektiv nachgewiesen werden kann. Es ist allerdings derzeit noch nicht bekannt, ob eine direkte Assoziation der Genotypen zu geänderten *IL6*-Induktionen bei IE-Patienten besteht, was in weiterführenden Studien untersucht werden sollte.

## 5 Methoden

### 5.1 Anzucht von Bakterienkulturen

Die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate werden aus Kryokulturen (siehe 5.2) mit einer sterilen Impföse auf BHI (*Brain Heart Infusion*)-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Zur Anzucht bakterieller Flüssigkulturen wird eine Einzelkolonie von BHI-Agarplatten in BHI-Flüssigmedium überführt und bei 37 °C über Nacht bei 220 rpm im Inkubator kultiviert. Die Anzucht und Kryokonservierung von *Staphylococcus aureus* erfolgt analog zu der Anzucht der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate.

### 5.2 Kryokonservierung von Bakterien

Zur Kryokonservierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wird eine Einzelkolonie des entsprechenden Stammes mit Hilfe einer sterilen Impföse in kommerziell erhältliche Kryoröhrchen (Viabank, Abtek Biologicals) überführt. Durch Vortexen erfolgt eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien im Kryomedium. Anschließend wird überflüssiges Kryomedium abgesaugt, während ein leichter Flüssigkeitsfilm um die im Kryogefäß enthaltenen Impfperlen zurückbleibt. Die Kryokulturen werden bei -80 °C gelagert.

### 5.3 Bestimmung des bakteriellen Titers

#### 5.3.1 Bestimmung des Bakterientiters durch Ausplattieren

Die Bestimmung des Bakterientiters erfolgt durch serielle Verdünnung der entsprechenden Suspension in *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (DPBS) (1:10). Es werden 100 µL einer geeigneten Verdünnung auf TS (*Tryptone Soya*)-Agarplatten in Dreifachbestimmung ausplattiert. Nach 24 – 48 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C werden die Bakterienkolonien ausgezählt und der bakterielle Titer der Ausgangslösung berechnet.

#### 5.3.2 Bestimmung des Bakterientiters durch *BactiFlow* Messung

Das *BactiFlow* der Firma Biomèriux Industry ermöglicht eine schnelle Bestimmung der Bakterienanzahl in einer Suspension. Im Rahmen dieser Arbeit wird die *BactiFlow* Messung genutzt, um vor Aggregation humaner Thrombozyten (siehe 5.12.3) die Bakteriensuspension auf eine Konzentration von  $4 \times 10^9$  Koloniebildende Einheiten (KBE)/mL einzustellen.

Das Messprinzip beruht auf der Anfärbung vitaler Bakterien mit einem Vitalitätsfarbstoff in einer Suspension mit anschließender durchflusszytometrischen Quantifizierung der

Bakterien. Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll erfolgt in Anlehnung an die Sterilitätsprüfung von Thrombozytenkonzentraten bei der Qualitätskontrolle von Blutprodukten (Vollmer *et al.* 2011). Bakteriensuspensionen werden auf ca.  $10^3 - 10^4$  Bakterien/mL für die Messung verdünnt. Es wird 1 mL der Verdünnung mit 6 mL ChemSol A7 Puffer gemischt, potentiell enthaltene Zelldebris werden über eine Zentrifiltration entfernt (ChemFilter25, Zentrifugation 8 min,  $2000 \times g$ ). Der Überstand wird anschließend dekantiert und das Bakterienpellet in 3 mL Färbelösung (Chemsol B24:Chem Chrome V23 100:1) resuspendiert. Es folgt eine Inkubation für 12 min bei 30 °C, in welcher der Fluoreszenzfarbstoff in vitalen Bakterien durch bakterielle Esterasen gespalten wird. Anschließend wird die Probe auf 4 °C abgekühlt, um einen weiteren Stoffumsatz zu verhindern. Alle Proben werden innerhalb von 1 h gemessen. Vor jeder Messung werden 140 µL CS26A und eine Spatelspitze CSR-Pulver zu der Probe gegeben. Dabei enthält das CS26A Partikel als interne Qualitätskontrolle. Das CSR Pulver reduziert freies Fluoreszin. Nach 1 min Inkubation werden 600 µL zur Detektion des Bakterientiters im *BactiFlow* eingesetzt. Die Messung erfolgt mittels eines blauen Argon-Ionen-Laser (488 nm) und zwei Fluoreszenzfiltern (540 nm, 590 nm).

#### 5.4 Anzucht humaner Zelllinien

Zur Anzucht kryokonservierter adhärenter humaner Zellen wird ein Kryoröhrchen der entsprechenden Zelllinie bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und auf zwei Zellkulturschalen in 10 mL entsprechendem Medium aufgeteilt. Nach 24 h wird das Medium gewechselt um verbleibende Reste des DMSO (Dimethylsulfoxid) aus dem Medium zu entfernen. Anschließend wird das Medium alle 2-3 Tage gewechselt.

Die Suspensionszelllinie THP-1 wird nach Auftauen des Kryoröhrchens in 10 mL entsprechendes Medium gegeben und bei  $1100 \times g$  für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet in 20 mL frischem Medium resuspendiert. Das Medium wird ebenfalls alle zwei bis drei Tage gewechselt. Die THP-1 Zelllinie wird unterhalb einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/mL angezogen, da eine Zellkonzentration oberhalb von  $1 \times 10^6$  Zellen/mL zur Differenzierung der Monozyten führt.

#### 5.5 Kryokonservierung humaner Zelllinien

Die Kryokonservierung von Zelllinien erfolgt in Kryoröhrchen, wobei die einzufrierende Zellsuspension mit DMSO (5 % Endkonzentration bei der Zelllinie THP-1; 10 % Endkonzentration bei EA.hy926) versetzt wird. Um ein langsames Gefrieren der Zellen zu gewährleisten, werden die Kryoröhrchen zunächst in vorgekühlten Aluminiumblöcken bei -

80 °C für 24 h aufbewahrt. Anschließend werden die Kryoröhrchen langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 5.6 Passagieren humaner Zelllinien

Die Endothelzelllinie EA.hy926 wird passagiert, bevor nach Ausbildung eines konfluenten Monolayers eine zelldichte-abhängige Proliferationshemmung eintritt. Zu diesem Zweck wird der Monolayer mit DPBS gewaschen und anschließend mit 3 mL Trypsinlösung (1 ×) für 5 min inkubiert. Die Zellablösung durch Trypsinierung wird durch Zugabe gleichen Volumens Medium mit 10% FCS gestoppt. Die Zellsuspension wird pelletiert (1100 × g, 5 min), das Zellpellet in entsprechendem Zellkulturmedium resuspendiert und auf neue Zellkulturschalen verteilt.

Die Suspensionszelllinie THP-1 wird zum Passagieren pelletiert (1100 × g, 5 min) und anschließend in entsprechendem Volumen (Zellzahl < 5 × 10<sup>5</sup> Zellen/mL) in Suspensionszellkulturflaschen resuspendiert.

### 5.7 Auszählung humaner Zelllinien

Die Zellzahl in einer Suspension wird mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wird ein Aliquot in 0,2 %iger Trypanblau-Lösung verdünnt, wodurch lebende und tote Zellen unterschieden werden können. Der Farbstoff kann nur bei toten Zellen in das Cytoplasma eindringen, wodurch diese blau gefärbt werden. Die Zellzahl in der Suspension kann durch folgende Formel bestimmt werden:

Formel 5.1: 
$$\text{Gesamtzellzahl} = Z \times V_f \times V \times 10^4$$

$$Z = \text{ausgezählte Zellen} / \text{Großquadrat}$$

$$V_f = \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$V = \text{Volumen der Zellsuspension}$$

### 5.8 Differenzierung von THP-1-Zellen zu Makrophagen

Die Differenzierung der THP-1-Zelllinie in Makrophagen erfolgt mittels Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA). Es werden 5 × 10<sup>5</sup> Zellen/mL pro Kavität in 24well-Zellkulturschalen ausgesät und mit 50 ng/mL PMA innerhalb von drei Tagen zu Makrophagen differenziert. Nach zwei Tagen erfolgt ein Mediumwechsel.

## 5.9 Inokulation von Vollblut mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

Die Inokulation von Vollblut in RPMI1640 mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* dient zum einen der Bestimmung der bakteriellen Abtötung oder des bakteriellen Wachstums im Vollblut sowie einem Vergleich des Induktionspotentials der IL6-Synthese durch verschiedene *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate.

Zur *ex vivo* Inokulation von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* mit Vollblut wird eine Übernachtskultur des zu untersuchenden Isolats mit DPBS gewaschen und anschließend bis zu einem Titer von  $1 - 10 \times 10^5$  in RPMI1640 verdünnt. Es wird Vollblut (S-Monovette Lithium-Heparin-Gel, 7,5 mL, Kabe; Volumenverhältnis 1 zu 10) pro Individuum zum Bakterienisolat hinzugefügt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in 6well Zellkulturschalen inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wird eine Probe von 2 mL entnommen, die zur Bestimmung des bakteriellen Titers (siehe 5.3.1), der Vitalität der Blutzellen (siehe 5.9.1) und der Bestimmung der IL6-Konzentration genutzt werden (siehe 5.22).

### 5.9.1 Vitalitätsmessung von Leukozyten in Vollblut

Um die Vitalität von Leukozyten in Vollblut nachzuweisen, wurde ein *Fluorescenz-activated cell sorting* (FACS)-Assay etabliert. Es wird Vollblut 1:10 in RPMI1640 (Gibco) verdünnt. 100 µL der Verdünnung werden mit 10 µL CD45-FITC (Beckman Coulter) und 20 µL BD Viaprobe (7-AAD) (BD Bioscience) für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden 2 mL Pharmlyse (BD Bioscience) zugegeben, wodurch die Erythrozyten innerhalb von 10 min (Raumtemperatur, dunkel) lysiert werden. Anschließend wird die Probe im FACS-Canto II der Firma BD Bioscience analysiert.

Über die CD45-FITC Markierung werden die für die membranständige Tyrosinphosphatase positive Leukozyten detektiert. Mittels der 7-AAD Färbung kann die Vitalität der detektierten Zellen bestimmt werden, da der Fluoreszenzfarbstoff nicht in vitale Zellen eindringen kann. Verlieren die Zellen an Vitalität dringt der Farbstoff in die Zellen ein und bindet selektiv an GC-Regionen der DNA. Nach Bindung kann der Farbstoff im PerCP/PerCp-Cy5.5-Kanal im FACS detektiert werden.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden folgende Parameter eingestellt:

Spannungsparameter:

FSC:	247
SSC:	410
FITC:	400
PerCP-Cy5.5:	550

Schwellenwerte:

FSC:	5.000
FITC:	500

Kompensation:

PerCP-Cy5.5 - % FITC:	2.76
FITC - % PerCP-Cy5.5:	0.00

### **5.10 Inokulation von humanen Zelllinien mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus***

Um die inflammatorische Reaktion humaner Zellen auf *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* darzustellen, wurden verschiedene Zellkulturmodellsysteme etabliert. Es wurden Endothelzellen (EA.hy926), Monozyten (THP-1) sowie zwei verschiedene Ko-Kultivierungen von Endothelzellen und Monozyten genutzt, um die inflammatorische Reaktion auf *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* auf Genexpressionsebene nach RNA-Isolierung (siehe 5.13) und cDNA-Synthese (siehe 5.15) darzustellen. Als Medium für die Inokulation von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in den verschiedenen Zellkulturmodellen wird RPMI1640 (Gibco) mit 10 % FCS ohne Antibiotika/Antimykotika (AB/AM) verwendet. Es werden gewaschene und im RPMI1640 mit 10 % FCS verdünnte stationäre Übernachtskulturen als Inokulum verwendet.

Nach der nachfolgend beschriebenen Inokulation der verschiedenen Zelllinien wird jeweils nach angegebener Inkubationszeit ein Aliquot des Überstands abgenommen, um den bakteriellen Titer (siehe 5.3.1) zu bestimmen. Der zentrifugierte Überstand (10.000 rpm, 5 min, Eppendorf Tischzentrifuge) wird aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die adhärennten Zelllinien werden direkt nach Abnahme des Überstandes in den Kavitäten lysiert. Die Suspensionszelllinie THP-1 wird nach Pelletieren durch Zentrifugation (10.000 rpm, 5 min, Eppendorf Tischzentrifuge) im Lysepuffer des RNA-Isolierungskits aufgenommen.

### 5.10.1 Inokulation der Endothelzelllinie EA.hy926 mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

Die Endothelzelllinie EA.hy926 wird auf 6well Zellkulturplatten ausgesät (500.000 Zellen/2 mL RPMI1640) und über 48 h bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen werden am Versuchstag mit DPBS gewaschen. Anschließend werden 2 mL Bakteriensuspension in RPMI1640/10 % FCS ohne Antibiotika/Antimycotika bzw. 2 mL RPMI1640/10 % FCS ohne Antibiotika/Antimycotika als Negativkontrolle zugegeben.

### 5.10.2 Inokulation der monozytären Zelllinie THP-1 mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

Die Zelllinie THP-1 wird am Versuchstag zweimal gewaschen und in antibiotikafreiem Medium resuspendiert. Die Zellzahl wird auf  $2 \times 10^6$  Zellen/mL eingestellt. Es wird 1 mL Zellsuspension mit 1 mL Bakteriensuspension gemischt und in 6well-Zellkulturschalen inokuliert.

### 5.10.3 Inokulation von Ko-Kulturen von Monozyten und Endothel

Zur Ko-Kultivierung von Monozyten und Endothel wird das Endothel analog zur Monokultur auf 6well-Zellkulturschalen ausgesät. Am Versuchstag werden die Monozyten nach zweimaligem Waschen in antibiotikafreiem Medium resuspendiert.

Im ersten Ko-Kulturmodell werden die Monozyten (1 mL) direkt in die Kavitäten der 6-well Zellkulturplatte gegeben (EA.hy926:  $1 \times 10^6$  Zellen bei ausgebildetem Monolayer, THP-1:  $2 \times 10^6$  Zellen), so dass die Zelltypen direkt miteinander interagieren können. Es wird ein Inokulum von 1 mL Bakteriensuspension zugegeben. Bei der Negativkontrolle wird 1 mL RPMI1640 zugegeben. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wird der Überstand abgenommen und für 5 min bei  $10.000 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand des Zellpellets wird abgenommen und bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Es wird zunächst das Monozyten-Zellpellet in 600  $\mu\text{L}$  RA1-Puffer aufgenommen. Dieses Lysat wird dann genutzt, um den Monolayer ebenfalls zu lysieren, so dass die Lysate der beiden Zelllinien vereinigt werden. Die Lagerung erfolgt bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Die RNA von Monozyten und Endothel ist in diesem Versuchsansatz somit nicht getrennt.

Das zweite Ko-Kulturmodell wurde etabliert, um die inflammatorische Reaktion auf Genexpressionsebene von Endothel und Monozyten getrennt darstellen zu können. Die Monozyten werden hier nicht direkt auf die Endothelzellen gegeben, sondern in ein Zellkultureinsatz, wobei mit einem Porendurchmesser von  $0,4 \mu\text{m}$  den direkten Zell-Zellkontakt verhindert wird, ein Stoffaustausch zwischen den beiden Zelltypen jedoch stattfinden kann. In dem unteren Kompartiment wird 1 mL antibiotikafreies Medium mit 1 mL Bakteriensuspension versetzt. In den Zellkultur-Einsatz werden 500  $\mu\text{L}$  Zellsuspension mit

500 µL Bakteriensuspension vermischt. Nach den angegebenen Inkubationszeiten werden die Zelltypen getrennt voneinander lysiert und die RNA entsprechend getrennt isoliert.

### **5.11 Aufnahme *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Makrophagen und Überlebensrate**

Zur Quantifizierung der Aufnahme von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, sowie der Abbaurate der Bakterien nach Aufnahme in die Phagozyten werden THP-1 Zellen in DMEM und 10 % FCS mit 1 × Antibiotika/Antimycotika innerhalb von drei Tagen zu Makrophagen mittels PMA differenziert (siehe 5.8). Es werden Übernachtskulturen der entsprechenden *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate sowie ein *S. aureus* Isolat über Nacht in Flüssigmedium kultiviert und 1:1000 in DMEM mit 10 % FCS (ohne Antibiotikum) verdünnt.

Das antibiotikahaltige Medium auf den Makrophagen wird abgenommen und potentielle Reste von Antibiotikum durch dreimaliges Waschen der adhärenen Zellen mit PBS entfernt. Anschließend wird 1 mL der verdünnten Übernachtskultur auf die Makrophagen gegeben und die 12well-Platte bei 400 × g zentrifugiert. Es folgt eine Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 30 min innerhalb derer die Makrophagen die Bakterien phagozytieren.

Die Bakteriensuspension wird abgenommen, die Zellen werden erneut dreimalig mit PBS gewaschen um adhärenente Bakterien zu entfernen und DMEM mit 1 × AB/AM mit zusätzlichen 200 µg/mL Gentamycin auf die Zellen gegeben. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten (0 h, 5 h, 8 h, 16 h, 24 h, 30 h, 36 h und 48 h) wird der Überstand abgenommen und die Makrophagen durch Zugabe einer Saponinlösung (1 %) lysiert. Das Lysat wird in einer geeigneten Verdünnung ausplattiert und die intrazelluläre Bakterienkonzentration bestimmt. Der abgenommene Überstand wird ebenfalls ausplattiert um eventuelles extrazelluläres Wachstum von Bakterien zu erfassen.

Die Aufnahmerate der Isolate durch die Makrophagen kann bestimmt werden, indem die Anzahl der Bakterien in den Makrophagen bei Beginn der Inkubation mit antibiotikahaltigem Medium ins Verhältnis zum zugegebenen Inokulum der Phagozytose für 30 min gesetzt wird. Der Abbau der Bakterien in den Makrophagen kann durch den Abfall des bakteriellen Titers im Verlauf der Versuchsreihe quantifiziert werden.



## 5.12 Lichttransmissions-basierte Bestimmung der Thrombozyten-Aggregation

Die Aggregation von Thrombozyten wurde mittels der Aggregation nach Born in Apact4SPlus Aggregometern durchgeführt (Born 1962). Die Aggregationsmessung beruht darauf, dass Plättchen-reiches Plasma (PRP) eine starke Trübung aufweist und somit undurchlässig für Licht ist. Bei einer Thrombozyten-Aggregation bilden sich Aggregate, welche zu einer deutlich verstärkten Lichttransmission führen. Die Lichttransmission wird bei Messung durch die Apact4SPlus Aggregometer kontinuierlich verfolgt.

### 5.12.1 Herstellung von Plättchen-reichem Plasma und Plättchen-armen Plasma

Zur Herstellung von PRP und Plättchen-armen Plasma (PPP) wird Vollblut in 8,4 mL PFA-Röhrchen (Citrat-gepufferte PHC Röhrchen, 129 mmol, pH 5.5) mittels einer Kanüle von Sanogcan V20 (20 Gauge) langsam abgenommen. Dabei wird der Stauschlauch gelöst. Sowohl die langsame Abnahme, als auch das Lösen des Stauschlauches dient der Prävention vorzeitiger Thrombozytenaktivierung.

Das PRP wird durch Zentrifugation für 15 min bei  $250 \times g$  mit voller Beschleunigung ohne Bremse hergestellt. Das PRP wird mit einer abgeschnittenen 1000  $\mu$ L Spitze vorsichtig in ein Falcon-Röhrchen übertragen.

Anschließend werden die PFA-Röhrchen für 5 min bei  $2770 \times g$  mit voller Beschleunigung und Bremse erneut zentrifugiert. Der Überstand (PPP) wird abgenommen und ebenfalls in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt.

### 5.12.2 Kontrolle der Thrombozytenfunktion

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Probanden zur Aggregation von Thrombozyten durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wurden zunächst hinsichtlich ihrer Thrombozytenfunktion untersucht, um auszuschließen, dass Erkrankungen, die die Thrombozytenfunktion direkt beeinflussen, die Aggregation beeinflussen.

Zur Thrombozytenfunktions-Analyse werden 200  $\mu$ L PPP des jeweiligen Probanden als 100 % Lichtdurchtritt im ApactS4 eingestellt. Es werden in die Messküvetten (Apact f. 4004 1.0  $\times$  4mm; DiaSys Greiner) 180  $\mu$ L PRP mit einer abgeschnittenen Spitze pipettiert und als 0 % Aggregation im Gerät genormt.

Nach 120 s Inkubation bei 37 °C unter Rühren durch einen Magnetrührer in den Küvetten wird ein Agonist (20  $\mu$ L der entsprechenden Konzentration) zur Probe gegeben und die Aggregation durch die zugehörige Software für 900 s aufgezeichnet. Es wurden folgende Agonisten zur Induktion der Thrombozyten-Aggregation eingesetzt:

- ADP: 4,0  $\mu$ M
- Arachidonsäure: 10,0  $\mu$ M
- Epinephrin: 0,5 mg/mL
- Kollagen: 5,0  $\mu$ g/mL
- Ristocetin: 1,0 mg/mL
- A23187: 5,0  $\mu$ M,
- PAF-C16: 1,0  $\mu$ M
- PMA: 100 nM
- TRAP: 20  $\mu$ M
- U46619: 4 mM

### 5.12.3 Induktion der Thrombozyten-Aggregation durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

Um die Thrombozyten-Aggregation durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zu induzieren wird 180  $\mu$ L PRP (eingestellt auf  $200 \times 10^6$  Plättchen/mL in PBS) in die Messküvetten pipettiert. Es werden Übernachtskulturen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zweimalig in DPBS gewaschen und anschließend nach *BactiFlow*-Bestimmung des bakteriellen Titers auf eine Suspension mit  $4 \times 10^9$  KBE/mL eingestellt. Der PRP 0 % - Wert wird direkt nach Zugabe von 20  $\mu$ L der Bakteriensuspension gemessen, da die Suspension eine zusätzliche Trübung der Probe hervorruft. Die Thrombozyten-Aggregation wird für 1800 s bei 37 °C gemessen. Parallel zu jeder Messung wurde eine Negativkontrolle (20  $\mu$ L DPBS) und eine Positivkontrolle (Agonisten der Routineuntersuchung (siehe 5.12.2)) bei 37 °C gemessen.

### **5.13 RNA-Isolation aus humanen Zelllinien**

Um Genexpressionen über eine *real-time* PCR (siehe 5.16) relativ quantifizieren zu können, muss die Gesamt-RNA aus entsprechenden Zellen isoliert werden. Die isolierte RNA wird dann für die Synthese von *complementary* DNA (cDNA) genutzt (siehe 5.15), welche bei der *real-time* PCR als Template eingesetzt werden kann.

Es wurde das NucleoSpin RNA II-Kit der Firma Machery-Nagel zur Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zellen entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet. Die Zelllyse erfolgt durch Zugabe von 600  $\mu$ L RA1 Puffer. Grobe Zellreste werden aus dem Lysat entfernt, indem das Lysat auf den NucleoSpin Filter gegeben und für 1 min bei 11000  $\times$  g zentrifugiert wird.

Das gefilterte Lysat wird mit gleichem Volumen 70 %igem Ethanol vermischt und auf die NucleoSpin RNA II *Column* gegeben und für 30 s bei 11000  $\times$  g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen, da die zu isolierende RNA an die Säule gebunden ist. Nach Entsalzung der Säule (350  $\mu$ L *Membrane Desalting Buffer*, 11000  $\times$  g, 1 min) erfolgt der Verdau von DNA auf der Säule durch rDNase (10  $\mu$ L rekonstituierte rDNase in 90  $\mu$ L Reaktionspuffer) für 15 min. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von RA2 (200  $\mu$ L) gestoppt. Der Durchfluss

nach Zentrifugation (30 s, 11000  $\times$  g) wird verworfen und die Säule wird anschließend zweimal gewaschen (Puffer RA3).

Es werden 25  $\mu$ L RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und in ein neues Reaktionsgefäß gestellt. Es folgt eine Zentrifugation für 1 min bei 11000  $\times$  g. Die Gesamt-RNA des Zelllysates befindet sich im Eluat, welches bei -80 °C gelagert wird.

#### 5.14 Bestimmung der RNA-Integrität

Die Integrität der RNA wird mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit der Firma Agilent bestimmt, um sicherzustellen, dass die Qualität der isolierten RNA nicht durch Degradation ubiquitärer RNasen beeinflusst wird. Die Bestimmung der RNA-Integrität wird nach Herstellerangaben durchgeführt. Der RNA 6000 Nano Chip wird vorbereitet, indem die RNA Gel Matrix mit 1  $\mu$ L RNA Dye Konzentrat vermischt und in den Chip über die zugehörige Spritzenstation eingefüllt wird. Weiterhin werden 5  $\mu$ L Marker in Proben- und *Ladder*-Kavitäten gegeben. 1  $\mu$ L des RNA-Größenmarker, welcher zum Größenabgleich bei der Kapillargelelektrophorese dient, werden in die Kavität des Größenmarkers pipettiert.

Es werden 1  $\mu$ L der RNA in die Probenkavitäten des RNA 6000 Nano Chips pipettiert und direkt am Agilent Bioanalyser 2100 gemessen. Die RNA-Integritätsnummer (RIN-Wert) liegt bei vollständig intakter RNA bei 10 und bei komplett degradierter RNA bei 1.

#### 5.15 cDNA-Synthese aus humaner mRNA

Die wie in 5.11 beschrieben isolierte RNA wird zur cDNA (*complementary DNA*)-Synthese verwendet. Es wird das SuperScript II Reverse Transcriptase Kit der Firma Invitrogen verwendet. Das Kit nutzt eine Reverse Transkriptase, welche eine Punktmutation im aktiven Zentrum der RNase H enthält, so dass dessen Aktivität reduziert ist. Es wird ein zur RNA komplementärer DNA-Strang synthetisiert. Hybride aus RNA und DNA werden durch die verbliebene RNase H Aktivität abgebaut.

Es werden 2  $\mu$ g mit folgendem Standardansatz umgeschrieben:

RNA (2 $\mu$ g Gesamt-RNA)	x $\mu$ L
dNTP-Mix (25 mM)	2 $\mu$ L
Oligo(dT)-Primer (7 pmol)	2 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	add 24 $\mu$ L

Es folgt eine Inkubation für 5 min bei 65 °C. Der Ansatz wird direkt auf Eis abgekühlt und 8,0  $\mu$ l 5 x First-Strand Buffer und 4,0  $\mu$ L Dithiothreitol (DTT; 0,1 M) zugegeben. Es folgt eine

Inkubation für 2 min bei 42 °C. Anschließend werden 2 µL SuperScript II Reverse Transcriptase zugegeben. Es folgt eine Inkubation bei 25 °C für 5 min. Die cDNA-Synthese erfolgt im Anschluss für 50 min bei 42 °C. Die reverse Transkriptase wird inaktiviert durch anschließende Erhöhung der Temperatur auf 70 °C für 15 min. Die cDNA wird bei -20 °C gelagert.

### 5.16 Relative Quantifizierung von Genexpressionen mittels *real-time* PCR

Bei der *real-time* PCR wird mithilfe eines zugegebenen Farbstoffes die Amplifikation von DNA in einem PCR-Ansatz in Echtzeit detektiert. Im Rahmen dieser Arbeit wird der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green I* verwendet, welcher sequenzunspezifisch in die kleine Furche von doppelsträngiger-DNA bindet. Nach Bindung erhöht sich die Fluoreszenz (Detektion bei  $\lambda = 520$  nm) von *SYBR Green I* nach Anregung ( $\lambda = 480$  nm) um den Faktor 1000. Durch diese Eigenschaft stehen die Fluoreszenzintensität und die dsDNA-Konzentration in direkter Proportionalität zueinander. Es wird die Zyklusanzahl der PCR bestimmt, bei welcher die Fluoreszenz des PCR-Ansatzes die Hintergrundfluoreszenz übersteigt und die Amplifikation in die exponentielle Phase übergeht. Die Zyklusanzahl wird als  $C_q$ -Wert (*quantification Cycle*) bezeichnet. Die Höhe des  $C_q$ -Wertes ist umgekehrt proportional zu der Kopienzahl eines Zielmoleküls.

Die Spezifität der relativen Quantifizierung mit *SYBR Green I* wird durch Intron-überspannende Primer und eine Schmelzkurvenanalytik gewährleistet. Für die *real-time* PCR wird der Mastercycler ep Realplex (Eppendorf AG, Hamburg) verwendet. Zum Ansatz der PCR wird das Platinum *SYBR Green qPCR Super-Mix-UDG* Kit der Firma Invitrogen verwendet.

Der PCR-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

SYBR Green Master Mix	5,00 µL
Forward-Primer (20 µM)	0,25 µL
Reverse-Primer (20 µM)	0,25 µL
Template (cDNA 1:5)	2,50 µL
H <sub>2</sub> O bidest.	add 10,00 µl

Der PCR Ansatz wird in weiße 96well-Platten pipettiert, wobei drei technische Replikate pro biologische Probe angesetzt werden. Das Temperaturprofil der PCR für die Gene *IL1B*, *IL6*, *IL8* und *MCP1* ist Tabelle 5.1 zu entnehmen:

**Tabelle 5.1:** PCR-Temperaturprofil zur relativen Quantifizierung von Genexpressionen

UNG-Verdau	Denaturierung	45 x			Schmelzkurve <sup>1</sup>			
		Denaturierung	Annealing	Elongation <sup>1</sup>				
50 °C	95 °C	95 °C	T <sub>AN</sub>	72 °C	60 °C	60 – 95°C	95 °C	30 °C
120 s	120 s	10 s	15 s	20 s	15 s	15 min	15 s	10 s

<sup>1</sup> Fluoreszenzmessung; T<sub>AN</sub>: Annealing-Temperatur des jeweiligen Primerpaares (6.10.1)

Das Temperaturprofil der PCR für die Detektion von TNF ist Tabelle 5.2 zu entnehmen:

**Tabelle 5.2:** PCR-Temperaturprofil zur relativen Quantifizierung der Genexpression von *TNF*

UNG-Verdau	Denaturierung	45 x		Schmelzkurve <sup>1</sup>			
		Denaturierung	Annealing und Elongation <sup>1</sup>				
50 °C	95 °C	95 °C	65 °C	60 °C	60 – 95°C	95 °C	30 °C
120 s	120 s	10 s	20 s	15 s	15 min	15 s	10 s

<sup>1</sup> Fluoreszenzmessung

Die Auswertung der *real-time* PCR erfolgt mittels effizienzkorrigierter relativer Quantifizierung über Referenzgene. Referenzgene sind Gene, die sich durch eine stabile, gleichbleibende Genexpression auszeichnen. Die Stabilität von sechs verschiedenen Referenzgenen wurde über die Software geNORM überprüft. Es wurden die Referenzgene *HPRT* (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) und *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) für die Genexpressionsanalysen ausgewählt. Über die relative Genexpression der Referenzgene wird ein Normalisierungsfaktor für die relativen Genexpressionen der Zielgene bestimmt, welcher der Berechnung der  $\Delta\Delta C_p$ -Werte dient und so zur relativen Quantifizierung der mRNA-Expression genutzt wird (Vandesompele *et al.* 2002). Die Effizienzkorrektur beruht darauf, dass theoretisch die cDNA-Menge pro Zyklus verdoppelt werden sollte, was allerdings real nicht immer eintritt. Somit wird für jedes Primerpaar über eine Verdünnungsserie von cDNA die reale Effizienz bestimmt. Es wird die relativ eingesetzte Menge cDNA in einer log-Funktion gegen die Zyklenanzahl aufgetragen und ihrem jeweiligen  $C_q$ -Wert zugeordnet, wobei die Steigung  $n$  dieser Funktion von der Amplifikationseffizienzen  $E$  des Primerpaares abhängig ist (Bustin *et al.* 2009). Die Formel 5-2 dient der Berechnung der Effizienz:

$$\text{Formel 5-2: } E = 10^{(-1/n)}$$

## 5.17 DNA-Extraktion

### 5.17.1 DNA-Extraktion aus Herzklappengewebe

Die DNA-Extraktion aus Herzklappengewebe wird nach dem Gewebeprotokoll des QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) durchgeführt. Es werden 25 mg Gewebe in einem Reaktionsgefäß mit 20 µL Proteinase K und 180 µL ATL-Puffer (auf 56 °C temperiert) vermischt und über Nacht bei 800 rpm und 56 °C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µL AL-Puffer erfolgt eine erneute Inkubation für 10 min bei 70 °C. Zu dem Lysat werden 200 µL Ethanol (96 %) pipettiert und die Probe auf die QIAamp Säule überführt. Es folgt eine Zentrifugation für 1 min 6000 × g. Die Säule wird zweimal gewaschen (1. Waschschrift: Zugabe von 500 µL AW1, 1 min, 6000 × g; 2. Waschschrift: Zugabe von 500 µL AW2, 1 min, 20.000 × g). Die Säule wird in ein neues Auffanggefäß gesetzt und für 3 min bei 20.000 × g getrocknet. Es werden 50 µL Elutionspuffer (AE-Puffer) mittig auf die Säule pipettiert. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die DNA mit einer Zentrifugation bei 6000 × g für 1 min eluiert. Das Eluat wird bei -20 °C gelagert.

### 5.17.2 DNA-Extraktion aus Vollblut

Die DNA-Extraktion aus Vollblut erfolgt nach Protokoll des Herstellers mit dem *NucliSENS easyMAG* der Firma Biomérieux. Die automatisierte DNA-Extraktion basiert auf magnetischen Silika-Beads, an welche die DNA unter chaotropen Bedingungen gebunden wird. Es werden 500 µL EDTA-Vollblut zur Extraktion eingesetzt. Das Elutionsvolumen beträgt 55 µL.

### 5.18 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR im *Gradient Cycler TGradient 96* (Biometra GmbH, Göttingen) mit anschließender hydrolytischen Spaltung der PCR-Produkte (siehe 5.21.2) zur Detektion von Einzelnukleotid-Varianten genutzt. Der Standardansatz für eine PCR setzt sich wie folgt zusammen:

10 x PCR-Puffer A (siehe 6.6)	2,50 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,50 µL
Forward-Primer (20 µM)	0,25 µL
Reverse-Primer (20 µM)	0,25 µL
dNTPs (5 mM)	1,00 µL
Template	2,50 µL
<i>HotMaster Taq</i> - Polymerase	0,15 µL
H <sub>2</sub> O bidest.	add 25,0 µL

Das PCR-Programm ist Tabelle 5.3 zu entnehmen.

**Tabelle 5.3:** PCR-Temperaturprofil zur Amplifikation von DNA-Fragmenten im *TGradient Thermal Cycler*

Denaturierung	40 x			Terminale Elongation
	Denaturierung	Annealing	Elongation	
95 °C	95 °C	T <sub>AN</sub>	72 °C	72 °C
120 s	60 s	60 s	120 s	15 min

T<sub>AN</sub>: Annealing-Temperatur des jeweiligen Primerpaares (6.10.2)

### 5.19 Agarose-Gelelektrophorese zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Agarose-Gelelektrophorese nutzt die Eigenschaft von DNA-Fragmenten in einem elektrischen Feld in Abhängigkeit ihrer Eigenladung und Größe in Richtung der Anode zu wandern. Das Agarosegel wird durch Erhitzen von Agarose in entsprechendem Puffer hergestellt. Die verwendete Agarosekonzentration ist abhängig von den Fragmentgrößen, die aufgetrennt werden sollen. Der Zusatz von Ethidiumbromid zum Agarose-Gel dient der Anfärbung der DNA-Fragmente im Gel. Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und fluoresziert bei Anregung durch UV-Licht.

Im Rahmen dieser Arbeit wird 0,5 x TBE-Puffer zum Ansetzen der Agarose-Gele verwendet (1,5 - 3,5 % Agarose). Nach Auflösen der Agarose im Puffer wird 5 µL Ethidiumbromid (1 mg/mL) auf 100 mL Agaroselösung gegeben. Die noch flüssige Matrix wird in Gelkammern gegossen und ein Kamm eingehängt, wodurch die Geltaschen geformt werden. Die Gele werden in Elektrophoresekammern gelegt und mit 0,5 x TBE Puffer überschichtet. Die Proben (PCR-Produkt: 5 µL; Restriktionsansätze: 20 µL) werden mit Probenauftragspuffer der Firma Fermentas versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Die Auftrennung erfolgt bei 100 V (120 V) über 0,7 h (0,8 h). Je höher die Agarosekonzentration, desto höher wurde die angelegte Spannung angesetzt, sowie die Zeit zur Auftrennung verlängert. Als DNA-Standards dienen je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente der pUC-Mix Marker 8 (Fermentas GmbH) oder der pUC-Mix Marker 19 (Fermentas GmbH). Die DNA-Fragmente werden mittels UV-Transilluminator detektiert (Extinktion  $\lambda = 302$  nm; Emission  $\lambda = 590$  nm).

## 5.20 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten dient der Überprüfung von PCR-Produkten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sequenzierung nach Sanger (Sanger, Nicklen and Coulson 1977) durchgeführt, welche darauf beruht, dass ein PCR Produkt mit einem spezifischen Primer und einem Gemisch aus dNTPs und Didesoxynukleotid-Derivaten (ddNTPs) amplifiziert wird. Wird bei der Elongation ein ddNTP anstatt eines dNTP eingebaut führt dies zum Kettenabbruch, da aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe am 3'-C-Atom der Didesoxyribose der Strang nicht verlängert werden kann. Die ddNTPs sind entsprechend ihres Nukleotids unterschiedlich fluoreszenzmarkiert. Bei Auftrennung der zufällig abgebrochenen DNA-Stücke und Detektion der jeweiligen Base am Ende des Fragments kann so die Sequenz aufgezeichnet werden. Bevor PCR-Produkte für die Sequenzierreaktion genutzt werden können, müssen Primer, dNTPs und Polymerase der vorangegangenen PCR entfernt werden. Nach der Sequenzierreaktion wird der Sequenzieransatz ebenfalls aufgereinigt, um Hintergrundsignale zu minimieren.

Aufgereinigte Sequenzieransätze werden im Kapillarsequenzierer ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) elektrophoretisch gemäß ihrer Fragmentlänge über eine mit einer Gelmatrix gefüllten Kapillare aufgetrennt (Injektion des Reaktionsansatzes bei 6 kV; Elektrophoretische Auftrennung: 42 min, 15 kV, 50 °C). Die Fragmente werden fluorimetrisch detektiert und ein Fluoreszenzkurvendiagramm der zugehörigen Basenfolge erstellt.



Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten wird nach Angaben des Herstellers mit dem MSB Spin PCRapace Kit der Firma Invitac durchgeführt. Die Aufreinigung des Ansatzes erfolgt über eine Silikamatrix, welche die Amplifikate unter chaotropen Bedingungen bindet.

Zur Aufreinigung wird der PCR-Ansatz mit 5 x Bindepuffer gemischt und auf die Säule gegeben. Es folgt eine Zentrifugation bei 8.000 x g für 1 min, der Durchfluss wird verworfen und die Zentrifugation wiederholt. Die Säule wird anschließend in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gesetzt. Je nach PCR-Produkt Menge im Ansatz werden 35 - 50 µL Elutionspuffer mittig auf die Säule pipettiert. Es folgt 1 min Inkubation bei Raumtemperatur und eine Zentrifugation für 1 min bei 6.000 x g, wobei das Eluat das aufgereinigte PCR-Produkt enthält. Das Eluat wird bei 4 °C gelagert.

Sequenzierung von aufgereinigten PCR-Produkten

Das *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) wird für die Sequenzierreaktion nach folgendem Standardansatz verwendet:

BigDye v1.1 Prämix	4,0 µL
BigDye Sequenzierpuffer (5 x)	2,0 µL
Primer (2 µM)	1,5 µL
H <sub>2</sub> O	7,5 µL
PCR-Produkt (aufgereinigt)	5,0 µL

Es wird folgendes Temperaturprofil für die Sequenzierung verwendet:

Tabelle 5.4: Temperaturprofil der Sequenzierreaktion

Denaturierung	30 x		
	Denaturierung	Annealing	Elongation
95 °C	95 °C	55 °C	60 °C
120 s	10 s	5 s	240 s

Aufreinigung des Sequenzieransatzes

Der Sequenzieransatz wird mithilfe einer Sephadex G50 Gelfiltration nach dem Größenausschluss-Prinzip aufgereinigt. Es werden 800 µL Sephadex G50 in 1 x TE-Puffer im Säulengefäß für 3 min bei 1.000 x g zentrifugiert. Die Säule wird in ein neues Reaktionsgefäß gestellt und der Sequenzieransatz mittig auf die Säule pipettiert. Es folgt

eine Zentrifugation für 4 min bei 1.000 × g. Der aufgereinigte Sequenzieransatz wird 1:1 mit H<sub>2</sub>O *bideest.* verdünnt und kann anschließend mit dem Sequenzer analysiert werden.

## 5.21 Nachweis von Einzelnukleotid-Varianten mittels Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP)-Analyse

Als Einzelnukleotid-Varianten (ENV) werden natürlich vorkommende Variationen einzelner Basenpaare im Genom bezeichnet. Um ENV mit Hilfe einer Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP)-Analyse zu detektieren wird das Vorhandensein oder die Abwesenheit einer Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease bei Vorkommen der Variation genutzt. Es wird so ein PCR-Produkt, welches die Sequenzvariation überspannt, hergestellt. Dieses PCR-Produkt wird anschließend hydrolytisch gespalten, wobei das Spaltmuster abhängig vom Vorhandensein des ENV ist. Wenn die ENV nicht zu einer Veränderung innerhalb einer Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease führen, kann dies durch Veränderungen in der Sequenz des PCR-Produktes durch gezielten Basenaustausch bei der PCR-Amplifikation hervorgerufen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 11 ENV in den Genen, die für Interleukin-1β (*IL1B*), Interleukin-6 (*IL6*), Interleukin-10 (*IL10*), Toll-like Rezeptor 4 (*TLR4*), endotheliales Selektin (*SELE*) und dem intrazellulären Adhäsionsmolekül-1 (*ICAM1*) kodieren, untersucht. Bei der Auswertung bezüglich der Assoziation mit den Parametern C-reaktives Protein (CRP), Leukozyten (WBC) und Procalcitonin (PCT) wurden zusätzlich drei ENV im Promotor von Tumornekrose Faktor-α (*TNF*) einbezogen, die im Rahmen einer Diplomarbeit bereits in einem Endokarditis-Kollektiv analysiert wurden (Weinstock 2010).

### 5.21.1 Patienten- und Kontrollkollektiv

Da Rückstellproben von Patientenmaterial zur Untersuchung der ENV herangezogen wurden, konnten nicht alle ENV mit dem gleichen Kollektiv untersucht werden, da das DNA-Material begrenzt war. Aus diesem Grund ist für jedes Gen ein spezifisches Kollektiv untersucht worden. In der Tabelle 5.5 sind die Charakteristika der Kontrollkohorte, sowie der jeweiligen Patientenkohorten aufgeführt.

Tabelle 5.5: Charakteristika der Kontrollkohorte, sowie der IE-Patientenkollektive

<b>Kontrollen</b>				
	<b>n</b>	<b>Alter (Mittelwert)</b>	<b>±SD</b>	<b>Bereich</b>
<b>Männlich</b>	130	54,2	10,7	15 – 67
<b>Weiblich</b>	55	55,5	11,3	27 – 68
<b>IE Patienten <i>IL1B</i></b>				
	<b>n</b>	<b>Alter (Mittelwert)</b>	<b>±SD</b>	<b>Bereich</b>
<b>Männlich</b>	75	58,8	14,9	15 – 81
<b>Weiblich</b>	29	63,3	14,1	28 – 84
<b>IE Patienten <i>TLR</i></b>				
	<b>n</b>	<b>Alter (Mittelwert)</b>	<b>±SD</b>	<b>Bereich</b>
<b>Männlich</b>	104	58,0	14,7	28 – 84
<b>Weiblich</b>	44	63,7	14,8	14 – 81
<b>IE Patienten <i>SELE</i></b>				
	<b>n</b>	<b>Alter (Mittelwert)</b>	<b>±SD</b>	<b>Bereich</b>
<b>Männlich</b>	105	58,0	14,7	14 – 81
<b>Weiblich</b>	44	64,9	14,4	28 – 84
<b>IE Patienten <i>ICAM1</i></b>				
	<b>n</b>	<b>Alter (Mittelwert)</b>	<b>±SD</b>	<b>Bereich</b>
<b>Männlich</b>	106	59,3	15,2	14 – 81
<b>Weiblich</b>	46	59,2	15,0	14 – 84
<b>IE Patienten <i>TNF</i></b>				
	<b>n</b>	<b>Alter (Mittelwert)</b>	<b>±SD</b>	<b>Bereich</b>
<b>Männlich</b>	74	60,3	12,1	16 – 78
<b>Weiblich</b>	35	62,7	15,4	28 – 84
<b>IE Patienten <i>IL10</i></b>				
	<b>n</b>	<b>Alter (Mittelwert)</b>	<b>±SD</b>	<b>Bereich</b>
<b>Männlich</b>	90	57,8	14,1	14 – 81
<b>Weiblich</b>	42	62,6	14,6	28 – 84
<b>IE Patienten <i>IL6</i></b>				
	<b>n</b>	<b>Alter (Mittelwert)</b>	<b>±SD</b>	<b>Bereich</b>
<b>Männlich</b>	83	58,5	14,3	14 – 78
<b>Weiblich</b>	36	65,3	14,3	28 – 84

### 5.21.2 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen-Analyse

Die verwendeten Primer und Bedingungen zur Amplifikation der jeweiligen DNA-Fragmente sind Tabelle 6.4 zu entnehmen. Nach Amplifikation der DNA-Fragmente wurde die PCR mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 5.19) überprüft und anschließend die RFLP-Analyse über hydrolytische Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen durchgeführt.

Die verwendeten Enzyme, Enzymeinheiten und Reaktionsprodukte sind in Tabelle 5.6 aufgeführt. Puffer und Zusätze wurden entsprechend der Angabe des Herstellers angewendet.

**Tabelle 5.6:** PCR-Produktgrößen, verwendete Restriktionsendonukleasen und Restriktionsprodukte zur RFLP-Analyse von ENV

Gen/rs-Nummer (RefSeq)	Produkt	Enzym (U/Reaktion)	Allel zur Restriktion	Restriktions- produkte
<i>IL1B</i> rs1143627 (NM_000576.2:c.-118C>T)	173 bp	<i>AluI</i> (5,0)	T	98 bp 75 bp
<i>IL1B</i> rs1143633 (NM_000576.2:c.302-64G>A)	250 bp	<i>AcI</i> (3,0)	G	192 bp 58 bp
<i>IL1B</i> rs1143634 (NM_000576.2:c.315C>T)	250 bp	<i>TaqI</i> (2,0)	C	136 bp 114 bp
<i>TLR4</i> rs4986790 (NM_003266.3:c.776A>G)	249 bp	<i>NcoI</i> (2,0)	G	223 bp 26 bp
<i>TLR4</i> rs4986791 (NM_003266.3:c.1076C>T)	407 bp	<i>HinfI</i> (2,0)	T	378 bp 29 bp
<i>SELE</i> rs1805193 (NM_000450.2:c.-19G>T)	188 bp	<i>MseI</i> (1,0)	T	137 bp 51 bp
<i>ICAM</i> rs5498 (NM_000201.2:c.1405A>G)	272 bp	<i>BstUI</i> (2,0)	G	169 bp 103 bp
<i>IL10</i> rs1800872 (NM_000572.2:c.-627A>C)	250 bp	<i>RsaI</i> (2,0)	A	165 bp 85 bp
<i>IL6</i> rs2069845 (NM_000600.3:c.471+870G>A)	184 bp	<i>MspI</i> (1,5)	G	96 bp 88 bp
<i>IL6</i> rs1800797 (NM_000600.3:c.-661A>G)	535 bp	<i>FokI</i> (1,0)	A	464 bp 71 bp
<i>IL6</i> rs1800795 (NM_000600.3:c.-237C>G)	535 bp	<i>LweI</i> (4,0)	G	474 bp 61 bp

Die hydrolytische Spaltung wird über Nacht nach Herstellerangaben inkubiert und anschließend über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und ausgewertet.

## 5.22 Interleukin-6 Bestimmung

Die Konzentration von humanem Interleukin-6 (IL6) wird mit einem quantitativen *Enzyme-linked immunosorbent Assay* (ELISA) der Firma Thermo Scientific bestimmt. Der ELISA wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Der ELISA beruht auf der Bindung von biotinylierten Antikörpern an IL6. Die Biotinylierung ermöglicht die Bindung von Streptavidin-markierter Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*). Wird das chromogene Substrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) zugegeben, färbt sich die Lösung bei Reaktion mit der Peroxidase blau (Absorptionsmaximum bei 650 nm). Durch Zugabe

einer Schwefelsäurelösung wird die Reaktion abgestoppt und ein Farbwechsel auf gelb (Absorptionsmaximum 450 nm) induziert.

Es werden 50 µL biotinyliertes Antikörper Reagenz in die Kavitäten der ELISA-Platte vorgelegt. Anschließend werden 50 µL Standard (0 pg/mL; 10,24 pg/mL; 25,6 pg/mL; 160 pg/mL; 400 pg/mL) und 50 µL Probe in zwei technischen Replikaten zu dem Antikörper Reagenz zugegeben. Es folgt eine Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur. Die Platte wird dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Es werden 100 µL Streptavidin-HRP-Lösung (12 mL Streptavidin-HRP-Verdünnungspuffer + 30 µL Streptavidin-HRP Konzentrat) in die Kavitäten gegeben. Anschließend wird die Platte 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Streptavidin-HRP Lösung wird abgenommen und die Platte erneut dreimal gewaschen. Anschließend wird die TMB-Substratlösung (100 µL) zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation im Dunkeln (30 min, Raumtemperatur) werden 100 µL Stop-Lösung zugegeben.

Es wird die Absorption der Proben bei 450 nm und 550 nm gemessen. Zur optischen Korrektur werden die 550 nm Absorptionswerte von denen der 450 nm-Werte subtrahiert. Mit Hilfe des Standards wird eine Standardkurve bestimmt und die IL6-Konzentration in den Proben berechnet.

### **5.23 Bestimmung des kleinen Blutbildes**

Um Zellzahlen von WBC oder Thrombozyten in Vollblut oder Plasma zu bestimmen, wurde das Sysmex K-1000 (Sysmex Deutschland GmbH) genutzt. Das Hämatologie-Analysegerät beruht auf einer Messung nach dem elektrischen Widerstandsprinzip. Es wird EDTA antikoaguliertes Blut für die WBC Messung in Vollblut verwendet. Die Thromozytenzahl für die Thrombozyten-Aggregation (siehe 5.12) werden nach Herstellung von Plättchen-reichem Plasma gemessen.

### **5.24 Bestimmung der Konzentration des C-reaktiven Proteins in humanem Serum**

Die Konzentration von CRP (C-reaktives Protein) wurde mithilfe des ultrasensitiven Latex *Immunoassays* CRP Vario am Architect ci8200 (Abbott Diagnostics) nach Herstellerangaben bestimmt. Das *Immunoassay* beruht auf der Agglutination von anti-humanen-CRP-beschichteten Latexpartikeln und dem CRP in der Probe, was eine Absorptionsänderung (572 nm) der Mischung zu Folge hat. Die Quantifizierung erfolgt im Abgleich mit einer Standardkurve. Als Probenmaterial wurde Serum der Patienten verwendet (Zentrifugation Serum Monovette Sarstedt 4000 × g, 10 min).

### **5.25 Bestimmung von Procalcitonin in humanem Serum**

Procalcitonin wurde am LIAISON Analyzer (DiaSorin) über ein immunoluminometrisches Assay bestimmt (Liaison Brahms PCT, Diasorin). Das Assay ermöglicht die relative Quantifizierung über einen Magnetpartikel gekoppelten Sandwich-ELISA. Der Test wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Probenmaterial wurde Serum der Patienten verwendet (Zentrifugation Serum Monovette Sarstedt  $4000 \times g$ , 10 min).

## 6 Material

### 6.1 Bakterienstämme

Tabelle 6.1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme

Spezies	Stamm	Isolationsquelle	Herkunft
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	DSM16831	Fäkalien Koala	DSMZ
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	DSM13808	Faulschlamm	DSMZ
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Isolat 010672/01	human, Endokarditispatient	HDZ, Bad Oeynhausen
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Isolat 021702/06	human, Endokarditispatient	HDZ, Bad Oeynhausen
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Isolat 013366/01	human, Endokarditispatient	HDZ, Bad Oeynhausen
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	AC1181	human	RWTH Aachen
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	AC6827	human	RWTH Aachen
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG17956	Kalb	Niederlande
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	UCN34	human, Endokarditispatient	Calvados, France
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Nicht bekannt	ATCC

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen; RWTH Aachen: Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen; LMG: Laboratorium für Mikrobiologie, Universität Gent; ATCC: American Type Culture Collection; HDZ: Herz- und Diabeteszentrum NRW

### 6.2 Humane Zelllinien

Tabelle 6.2: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Referenz
EA.hy926	Human, Endothel	(Edgell <i>et al.</i> 1983)
THP-1	Human, monozytäre Zelllinie	(Tsuchiya <i>et al.</i> 1980)

### 6.3 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

RPMI1640	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
DMEM (high Glucose)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe

Trypsin-EDTA-Lösung (10 ×)	GE Healthcare, München
Antibiotika/Antimykotika-Lösung (10×)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Gentamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach

#### 6.4 Medien für die Anzucht von Bakterien

<i>Brain Heart Infusion Broth</i> (Oxoid)	37 g Medium, H <sub>2</sub> O <i>bidest. add.</i> 1000 mL, autoklavieren und bei 4 °C lagern
<i>Brain Heart Infusion Agar</i> (Oxoid)	47 g Medium, H <sub>2</sub> O <i>bidest. add.</i> 1000 mL, autoklavieren, in Petrischlaen gießen und bei 4 °C lagern
<i>Tryptone Soya Agar</i> (Oxoid)	40 g Medium, H <sub>2</sub> O <i>bidest. add.</i> 1000 mL, autoklavieren, in Petrischalen gießen und bei 4 °C lagern

#### 6.5 Chemikalien, Reagenzien und Antikörper

A23187 (Calcimycin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Adenosindiphosphat	Greiner, Solingen
Agarose	Roth, Karlsruhe
Arachidonsäure	Greiner, Solingen
BD Viaprobe	BD Biosciences, San José, USA
BD Pharmlyse	BD Biosciences, San José, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
CD-14-FITC	Beckman Coulter, Brea, USA
ChemChrome V23	Biomérieux GmbH, Nürtingen
ChemSol B24	Biomérieux GmbH, Nürtingen
CSR-Pulver	Biomérieux GmbH, Nürtingen
CS26A	Biomérieux GmbH, Nürtingen
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, San Diego, USA
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot
Epinephrin-Reagenz	Greiner, Solingen



Ethanol 99 %	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kollagen	Greiner, Solingen
Lipopolysachharid (L4516; <i>E. coli</i> )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lipoteichonsäure (L2515; <i>S. aureus</i> )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Oligo dT-Primer	Biomers, Ulm
Oligonukleotide	Biomers, Ulm
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Platelet-activation factor</i> (PAF)	Cayman Chemical, Michigan, USA
Rinderserum (BSA)	Fermentas, St. Leon-Rot
Ristocitin	Greiner, Solinge
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sephadex G50	Amersham, Braunschweig
Standard G	Biomérieux GmbH, Nürtingen
<i>Thrombin receptor agonist peptide</i> (TRAP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
U46619	Cayman Chemical, Michigan, USA
Wasser (Rotisolv, HPLC-Gradient-Grade)	Roth, Karlsruhe
Wasser (Aqua B. Braun)	Braun, Melsungen

## 6.6 Lösungen und Puffer

<i>Cellpack</i>	Sysmex Europe GmbH, Norderstedt
<i>Cellclean</i>	Sysmex Europe GmbH, Norderstedt
Chemsol S	Biomérieux GmbH, Nürtingen
Chemsol A7	Biomérieux GmbH, Nürtingen

<i>Cleaning 5</i>	Biomérieux GmbH, Nürtingen
<i>FACS Clean</i>	BD Biosciences, San José, USA
<i>FACS Flow</i>	BD Biosciences, San José, USA
<i>Phosphate buffered saline (PBS)-Puffer (10 ×)</i>	80,0 g NaCl 2,0 g KCl 7,6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O 2,0 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <i>add.</i> 1 L bidest. H <sub>2</sub> O
<i>Puffer A (10 ×)</i>	800 mM Tris-HCl, pH 9,45 200 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,2 % Tween-20
<i>TBE-Puffer</i>	Invitrogen San Diego, USA

## 6.7 Enzyme

<i>Acil</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Alul</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>BstUI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>FokI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Hinfl</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>HotMaster Taq DNA-Polymerase</i>	5Prime GmbH, Hamburg
<i>Lwel</i>	Thermo Scientific, Schwerte
<i>MseI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>MspI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>NcoI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>RsaI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Taq<sup>d</sup>I</i>	New England Biolabs, Frankfurt

## 6.8 Geräte

ABI Prim 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
Analysewaage	Sartorius AG, Göttingen

---

Apact4S Plus	DiaSys Greiner, Frickenhausen
ARCHITECT <i>ci8200</i>	Abbott Laboratories, Chicogo, USA
Autoklav	Tecnorma, Fernwald
BactiFlow	Biomérieux GmbH, Nürtingen
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies
Brutschrank	Memmert GmbH&Co.KG, Schwabach
CAS-1200	LTF Labortechnik, Wasserburg
CB 210 CO <sub>2</sub> -Brutschrank	Binder, Tuttlingen
Fireboy plus	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
FACS Canto II	BD Biosciences, San José, USA
Fireboy plus	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Fusion-SL 3500 <i>Bio-Imaging System</i>	PeqLab Biotechnologies, Erlangen
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gradient Cyclcler TGradient 96	Biometra GmbH, Göttingen
Landgraf Thermocycler Various	Laborsysteme GmbH, Langenhagen
Inkubator Unimax 1000 mit Schüttler 1010	Heidolph, Schwabach
Kolbenhubpipetten, verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg
Landgraf <i>Thermocycler Various</i>	Laborsysteme GmbH, Langenhagen
LIAISON Analyzer	Diasorin Deutschland, Dietzenbach
Luminex 2000	Biomérieux GmbH, Nürtingen
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Mikrowelle	AEG, Dormagen
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop 2000	Thermo Scientific, Waltham, USA
NucliSENS easyMag	Biomérieux GmbH, Nürtingen
Personal Cyclcer	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter 766	Knick, Berlin
Realplex Mastercycler epGradient S	Eppendorf, Hamburg
Sicherheitswerkbank	Wesco, Wettingen, Schweiz

Stickstofftank 500 series	MVE, Cleveland, USA
Sysmex K-1000	Sysmex Europe GmbH, Norderstedt
Tecan infinite m200pro	Tecan, Männedorf, Schweiz
Vortex Genie 2	Bender & Hobein GmbH, Bruchsal
Zentrifuge 5417C, 5424	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge G-10, Rotor 11160	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zentrifuge Rotanta 460S, 380R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen

## 6.9 Größenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Längenstandards wurden von der Fermentas GmbH, St. Leon-Rot bezogen. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurde der pUC 19 DNA/Mspl (HpaII) Marker 23 oder der pUC Mix Marker 8 als Längenstandard verwendet.

## 6.10 Oligonukleotide

### 6.10.1 Oligonukleotide für die relative mRNA-Quantifizierung

**Tabelle 6.2:** Oligonukleotide (Biomers, Ulm) zur relativen mRNA-Genexpressionsanalyse mit der Effizienz E und der Annealingtemperatur  $T_{AN}$ .

Gen	Primer <i>Forward</i> (5'...3') Primer <i>Reverse</i> (5'...3')	E	$T_{AN}$ [°C]
Interleukin-1 $\beta$ ( <i>IL1B</i> )	ACAGATGAAGTGCTCCTTCCA GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT	2,00	58
Interleukin-6 ( <i>IL6</i> )	ACAGCCACTCACCTCTTCAG GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC	1,95	58
Interleukin-8 ( <i>IL8</i> )	GAACTGAGAGTGATTGAGAGTGGA CTCTTCAAAACTTCTCCACAACC	1,99	58
<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP1)</i>	TCGCGAGCTATAGAAGAATC AATCCTGAACCCACTTCT	1,83	58
Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ( <i>TNF</i> )	CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG ATGGGCTACAGGCTTGCTCACT	1,98	65
Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase ( <i>HPRT</i> )	GCTGACCTGCTGGATTAC TGCGACCTTGACCATCTT	1,95	58
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase ( <i>GAPDH</i> )	AGGTCGGAGTCAACGGAT TCCTGGAAGATGGTGATG	1,98	58

## 6.10.2 Oligonukleotide für die Analyse von Einzelnukleotid-Varianten

**Tabelle 6.3:** Oligonukleotide zur Detektion von ENV mit *Annealing*temperaturen ( $T_{AN}$ ) und Produktgrößen [bp]

Gen / rs-number (RefSeq)	Primer <i>Forward</i> (5'...3') Primer <i>Reverse</i> (5'...3')	$T_{AN}$ [°C]	Produkt- größe
<i>IL1B</i> rs1143627 (NM_000576.2:c.-118C>T)	GCTTCCACCAATACTCTTTTCCCCTT CCCAGAGCAGCCTGTTGTGCC	59	173 bp <sup>2</sup>
<i>IL1B</i> rs1143633 (NM_000576.2:c.302-64G>A)	GTTGTCATCAGACTTTGACC TTCAGTTCATATGGACCAGA	58	250 bp <sup>2</sup>
<i>IL1B</i> rs1143634 (NM_000576.2:c.315C>T)	GTTGTCATCAGACTTTGACC TTCAGTTCATATGGACCAGA	58	250 bp <sup>2</sup>
<i>TLR4</i> rs4986790 (NM_003266.3:c.776A>G)	GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC	55	249 bp <sup>2</sup>
<i>TLR4</i> rs4986791 (NM_003266.3:c.1076C>T)	GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGAGAA ACCTGAAGACTGGAGAGTGAGTTAAATGCT	65	407 bp <sup>2</sup>
<i>SELE</i> rs1805193 (NM_000450.2:c.-19G>T)	ATTTTGTGTTTTATCTCCCCAG CCCCAGACAAGCAAGGAT	52	188 bp <sup>1</sup>
<i>ICAM</i> rs5498 (NM_000201.2:c.1405A>G)	ATTCCCAGCAGACTCCAA GGAGGATACAACAGGCGG	60	272 bp <sup>2</sup>
<i>IL10</i> rs1800872 (NM_000572.2:c.-627A>C)	AGCTGAAGAGGTGGAAAC CCAACCTGGGATGAATAC	54	250 bp <sup>2</sup>
<i>IL6</i> rs2069845 (NM_000600.3:c.471+870G>A)	TCCAGGACCACACTTGGA GGGTTCTTCAGTGGCCTCTA	54	184 bp <sup>2</sup>
<i>IL6</i> rs1800797 (NM_000600.3:c.-661A>G)	AAAAAGGAGTCACACTCCAC GGGCTGATTGGAAACCTTATTAAGA	62	535 bp <sup>2</sup>
<i>IL6</i> rs1800795 (NM_000600.3:c.-237C>G)	AAAAAGGAGTCACACTCCAC GGGCTGATTGGAAACCTTATTAAGA	62	535 bp <sup>2</sup>

<sup>1</sup> PCR-Reaktion mit 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; <sup>2</sup> PCR-Reaktion mit 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>;

### 6.11 Testkits

Agilent RNA 6000 Nano Kit

Agilent Technologies, Waldbronn

*Big Dye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit*

Applied Biosystems, Darmstadt

*Human IL6 ELISA Kit*

Thermo Scientific, Wilmington,  
USA

Latex Immunoassays CRP Vario

Abbott Diagnostics, Illinois, USA

Liaison Brahms PCT	Diasorin Deutschland, Dietzenbach
MSB Spin PCRapace Kit	Invitek GmbH, Berlin
NucleoSpin RNA II	Machery-Nagel, Düren
<i>Platinum SYBR Green qPCR Super-Mix UDG</i>	Invitrogen, San Diego, USA
QiaAmp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
<i>Superscript II Reverse Transcriptase Kit</i>	Invitrogen, San Diego, USA
<b>6.12 Sonstige Materialien</b>	
96er PCR-Platten	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Citrat Monovetten	Kabe Labortechnik, Nürnberg
EDTA Monovetten	Kabe Labortechnik, Nürnberg
Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5 mL/2,0 mL)	Eppendorf, Hamburg
Glasgefäße	Schott, Mainz
<i>Handheld Magnetic Separator Block</i>	Merck Millipore, Darmstadt
<i>Heat-sealing Folie</i>	Eppendorf, Hamburg
Klebefolie für 96er PCR-Platten	Eppendorf, Hamburg
Kontaktspitzen 200 µL, 50 µL	P. Sudmann, Leopoldshöhe
Kryoröhrchen Viabank	Abtek Biologicals, Liverpool, England
Kryostaten-Röhrchen	Roth, Karlsruhe
Küvetten Apact 4004 (1 × 4 mm)	DiaSys Greiner, Frickenhausen
Neubauerzählkammer	Fleischhacker, Meckenheim
Parafilm	Fleischhacker, Meckenheim
PCR Reaktionsgefäße 200 µL	Sarstedt, Nürnberg
Petrischalen	Sarstedt, Heidelberg
PFA Monovetten	Kabe Labortechnik, Nürnberg
Pipettenspitzen variabler Größe (Filtertips)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Suspensionszellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen

---

ThinCert 6-well Zellkultureinsätze	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen	Greiner, Solinge
Zentrifugenröhrchen	Falcon, Heidelberg

### 6.13 Software und Datenbanken

ABI Prism 310 Collection	Applied Biosystems, Darmstadt
<i>Clone Manager</i> Professionel 9.0	Scientific & Educational Software, USA
Fusion 15.18	Viber, Eberhardzell
geNORM	<a href="http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/">http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/</a>
GraphPad Prism 4.0	GraphPad Software Inc., USA
Haploview	Broad Institute, Cambridge, USA
Nanodrop 2000/2000c	Thermo Scientific, Wilmington, USA
NEB Cutter 2.0	<a href="http://tools.neb.com/NEBCutter2/index.php">http://tools.neb.com/NEBCutter2/index.php</a>
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Realplex 1.5	Eppendorf, Hamburg

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotikum
AM	Antimykotikum
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
ca.	<i>Circa</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
C <sub>q</sub>	<i>quantification Cycle</i>
CRP	C-reaktives Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dest.	destilliert
E	Effizienz
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENV	Einzelnukelotid-Variation
<i>et al.</i>	und Andere
FCS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
ICAM1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IE	infektiöse Endokarditis
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>
KBE	Koloniebildende Einheiten
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
MCP1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MIP1B	<i>Macrophage inflammatory protein-1β</i>
MSCRAMM	<i>microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules</i>
NBTE	nicht bakterielle thrombotische Endokarditis
NLR	<i>Nod-like receptor</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>



PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCT	Procalcitonin
PMP	<i>platelet derived microbicidal proteins</i>
PRR	<i>Pathogen recognition receptor</i>
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
SELE	endotheliales Selektin
TF	<i>Tissue Factor</i> , Gewebefaktor
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
rpm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VCAM1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
WBC	Leukozyten, <i>white blood cells</i>
z. B.	zum Beispiel

## 8 Literaturverzeichnis

- Abdulmir, AS, RR Hafidh, and FA Bakar. "The Association of *Streptococcus Bovis/galloyticus* with Colorectal Tumors: The Nature and the Underlying Mechanisms of Its Etiological Role." *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 30, 1 (2011): 11–11.
- Abdulmir, AS, RR Hafidh, and FA Bakar. "Molecular Detection, Quantification, and Isolation of *Streptococcus Galloyticus* Bacteria Colonizing Colorectal Tumors: Inflammation-Driven Potential of Carcinogenesis via IL-1, COX-2, and IL-8." *Molecular Cancer* 9 (2010): 249–249.
- Andreasen, AS, KS Krabbe, R Krogh-Madsen, S Taudorf, BK Pedersen, and K Moller. "Human Endotoxemia as a Model of Systemic Inflammation." *Current Medicinal Chemistry* 15, 17 (2008): 1697–1705.
- Barton, GM, and others. "A Calculated Response: Control of Inflammation by the Innate Immune System." *The Journal of Clinical Investigation* 118, 2 (2008): 413–20.
- Bestebroer, J, CJC De Haas, and JAG Van Strijp. "How Microorganisms Avoid Phagocyte Attraction." *FEMS Microbiology Reviews* 34, 3 (2010): 395–414.
- Beynon, LM, JC Richards, and MB Perry. "Identification of the Common Antigenic Determinant Shared by *Streptococcus Pneumoniae* Serotypes 35A and 20 Capsular Polysaccharides—structural Analysis of the *Streptococcus Pneumoniae* Serotype 35A Capsular Polysaccharide." *European Journal of Biochemistry* 250, 1 (1997): 163–67.
- Boleij, A, CMJ Muijtens, SI Bukhari, N Cayet, P Glaser, PWM Hermans, DW Swinkels, A Bolhuis, and H Tjalsma. "Novel Clues on the Specific Association of *Streptococcus Galloyticus* Subsp *Galloyticus* with Colorectal Cancer." *Journal of Infectious Diseases* 203, 8 (2011): 1101–9.
- Boleij, A, M MHJ van Gelder, DW Swinkels, and H Tjalsma. "Clinical Importance of *Streptococcus Galloyticus* Infection among Colorectal Cancer Patients: Systematic Review and Meta-Analysis." *Clinical Infectious Diseases* 53, 9 (2011a): 870–78.
- Boleij, A, RMJ Schaeps, S de Kleijn, PW Hermans, P Glaser, V Pancholi, DW Swinkels, and H Tjalsma. "Surface-Exposed Histone-like Protein a Modulates Adherence of *Streptococcus Galloyticus* to Colon Adenocarcinoma Cells." *Infection and Immunity* 77, 12 (2009): 5519–27.
- Born, GV. "Aggregation of Blood Platelets by Adenosine Diphosphate and Its Reversal." *Nature* 194 (1962): 927–29.
- Bustamante, J, A Arévalo, E Tamayo, C Sarria, EM Aguilar-Blanco, M Heredia, R Almansa, Lucia Rico, V Iglesias, and JF Bermejo-Martin. "Cytokine Profiles Linked to Fatal Outcome in Infective Prosthetic Valve Endocarditis." *APMIS* 122, 6 (2014): 526–29.
- Bustamante, J, E Tamayo, S Flórez, J Telleria, E Bustamante, J López, JA San Román, and FJ Álvarez. "Toll-like Receptor 2 R753Q Polymorphisms Are Associated with an Increased Risk of Infective Endocarditis." *Revista Española de Cardiología (English Edition)* 64, 11 (2011): 1056–59.
- Bustin, SA, V Benes, JA Garson, J Hellemans, J Huggett, M Kubista, R Mueller, et al. "The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments." *Clinical Chemistry* 55, 4 (2009): 611–22.
- Calix, JJ, RJ Porambo, AM Brady, TR Larson, J Yother, C Abeygunwardana, and MH Nahm. "Biochemical, Genetic, and Serological Characterization of Two Capsule Subtypes among *Streptococcus Pneumoniae* Serotype 20 Strains Discovery of a new pneumococcal serotype." *Journal of Biological Chemistry* 287, 33 (2012): 27885–94.
- Cavassini, M, P Eggimann, and P Francioli. "Die Infektiöse Endokarditis." In *Schweiz Med Forum*, 32:33, 2002.

- Chia, J-S, H-T Lien, P-R Hsueh, P-M Chen, A Sun, and J-Y Chen. "Induction of Cytokines by Glucosyltransferases of *Streptococcus Mutans*." *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9, 4 (2002): 892–97.
- Colotta, F, F Re, N Polentarutti, S Sozzani, and A Mantovani. "Modulation of Granulocyte Survival and Programmed Cell Death by Cytokines and Bacterial Products." *Blood* 80, 8 (1992): 2012–20.
- Condit, CM, PJ Achter, I Lauer, and E Sefcovic. "The Changing Meanings of 'mutation:' a Contextualized Study of Public Discourse." *Human Mutation* 19, 1 (2002): 69–75.
- Cook-Mills, JM, ME Marchese, and H Abdala-Valencia. "Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Signaling during Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants." *Antioxidants & Redox Signaling* 15, 6 (2011): 1607–38.
- Cornelissen, CG, DA Frechen, K Schreiner, N Marx, and S Krüger. "Inflammatory Parameters and Prediction of Prognosis in Infective Endocarditis," 2013. doi:BMC Infectious Diseases.
- Corredoira, J, MP Alonso, F Garcia-Garrote, MJ Garcia-Pais, A Coira, R Rabuñal, A Gonzalez-Ramirez, et al. "Streptococcus Bovis Group and Biliary Tract Infections: An Analysis of 51 Cases." *Clinical Microbiology and Infection* 20, 5 (2014): 405–9.
- Cox, D, SW Kerrigan, and SP Watson. "Platelets and the Innate Immune System: Mechanisms of Bacterial-Induced Platelet Activation." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 9, 6 (2011): 1097–1107.
- Daga, S, JG Shepherd, JGS Callaghan, RKY Hung, DK Dawson, GJ Padfield, SY Hey, RA Cartwright, DE Newby, and JR Fitzgerald. "Platelet Receptor Polymorphisms Do Not Influence *Staphylococcus Aureus*-Platelet Interactions or Infective Endocarditis." *Microbes and Infection* 13, 3 (2011): 216–25.
- Dankert, J, J Van der Werff, SA Zaat, W Joldersma, D Klein, and J Hess. "Involvement of Bactericidal Factors from Thrombin-Stimulated Platelets in Clearance of Adherent Viridans Streptococci in Experimental Infective Endocarditis." *Infection and Immunity* 63, 2 (1995): 663–71.
- Dankert, J, J van der Werff, W Joldersma, and SAJ Zaat. "Interleukin 1 $\alpha$  Increases the Susceptibility of Rabbits to Experimental Viridans Streptococcal Endocarditis." *Infection and Immunity* 74, 2 (2006): 947–52.
- Danne, C, S Dubrac, P Trieu-Cuot, and S Dramsi. "Single Cell Stochastic Regulation of Pilus Phase Variation by an Attenuation-like Mechanism." *PLoS Pathogens* 10, 1 (2014): e1003860.
- Danne, C, JM Entenza, A Mallet, R Briandet, M Débarbouillé, F Nato, P Glaser, et al. "Molecular Characterization of a *Streptococcus Gallolyticus* Genomic Island Encoding a Pilus Involved in Endocarditis." *Journal of Infectious Diseases* 204, 12 (2011): 1960–70.
- De Herdt, P, F Haesebrouck, G Charlier, R Ducatelle, LA Devriese, and G Vandebossche. "Intracellular Survival and Multiplication of Virulent and Less Virulent Strains Of *Streptococcus Bovis* in Pigeon Macrophages." *Veterinary Microbiology* 45, 2 (1995): 157–69.
- De Herdt, P, F Haesebrouck, LA Devriese, and R Ducatelle. "Prevalence of *Streptococcus Bovis* in Racing Pigeons." *Veterinary Quarterly* 16, 2 (1994): 71–74.
- De Velasco, EA, AF Verheul, J Verhoef, and H Snippe. "*Streptococcus Pneumoniae*: Virulence Factors, Pathogenesis, and Vaccines." *Microbiological Reviews* 59, 4 (1995): 591–603.
- Dramsi, S, E Caliot, I Bonne, S Guadagnini, M-C Prévost, M Kojadinovic, L Lalioui, C Poyart, and P Trieu-Cuot. "Assembly and Role of Pili in Group B Streptococci." *Molecular Microbiology* 60, 6 (2006): 1401–13.
- Dargere S, Entenza JM, Verdon R. "FimB, a member of the Lral adhesin family, mediates adherence of endocarditis-causing *Streptococcus bovis* I (*S. gallolyticus*) to fibrinogen." *Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother* 43 (2003):14-17, abstract B823.

- Edgell, CJ, CC McDonald, and JB Graham. "Permanent Cell Line Expressing Human Factor VIII-Related Antigen Established by Hybridization." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80, 12 (1983): 3734–37.
- Eklund, C, F Jahan, T Pessi, T Lehtimäki, and M Hurme. "Interleukin 1B Gene Polymorphism Is Associated with Baseline C-Reactive Protein Levels in Healthy Individuals." *European Cytokine Network* 14, 3 (2003): 168–71.
- Enquobahrie, DA, K Rice, OD Williams, MA Williams, MD Gross, CE Lewis, SM Schwartz, and DS Siscovick. "IL1B Genetic Variation and Plasma C-Reactive Protein Level among Young Adults: The CARDIA Study." *Atherosclerosis* 202, 2 (2009): 513–20.
- Feng, Y, M Cao, J Shi, H Zhang, D Hu, J Zhu, X Zhang, et al. "Attenuation of *Streptococcus Suis* Virulence by the Alteration of Bacterial Surface Architecture." *Scientific Reports* 2 (2012).
- Fernandes, ML, ME Mendes, MKC Brunialti, and R Salomão. "Human Monocytes Tolerant to LPS Retain the Ability to Phagocytose Bacteria and Generate Reactive Oxygen Species." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 43, 9 (2010): 860–68.
- Fitzgerald, JR, TJ Foster, and D Cox. "The Interaction of Bacterial Pathogens with Platelets." *Nature Reviews Microbiology* 4, 6 (2006): 445–57.
- Garvie, EI, and AJ Bramley. "*Streptococcus Bovis*—an Approach to Its Classification and Its Importance as a Cause of Bovine Mastitis." *Journal of Applied Bacteriology* 46, 3 (1979): 557–66.
- Giannitsioti, E, G Damoraki, C Rokkas, T Tsaganos, A Fragou, S Kannelaki, S Athanasia, and EJ Giamarellos-Bourboulis. "Impact of Haplotypes of TNF in the Natural Course of Infective Endocarditis." *Clinical Microbiology and Infection*, 2013.
- Grimminger, F, K Mayer, and W Seeger. "Gibt es eine gesicherte Immuntherapie bei Der Sepsis?" *Der Internist* 38, 6 (1997): 541–52.
- Haas A. "Wenn Fresszellen Verdauungsstörungen haben – ungewöhnliche Phagosomenbiogenese in Makrophagen." *BioSpektrum* (2002); 243–247.
- Habib G, Hoen B, Tornos P, Thuny F, Prendergast B, et al. "Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and the International Society of Chemotherapy (ISC) for Infection and Cancer." *Eur Heart J* 30 (2009): 2369-2413.
- Haraldsen, G, D Kvale, B Lien, IN Farstad, and P Brandtzaeg. "Cytokine-Regulated Expression of E-Selectin, Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Human Microvascular Endothelial Cells." *The Journal of Immunology* 156, 7 (1996): 2558–65.
- Heilmann, C, S Niemann, B Sinha, M Hermann, BE Kehrel, and G Peters. "*Staphylococcus Aureus* Fibronectin-Binding Protein (FnBP)—Mediated Adherence to Platelets, and Aggregation of Platelets Induced by FnBPA but Not by FnBPB." *Journal of Infectious Diseases* 190, 2 (2004): 321–29.
- Herzberg, MC, GD MacFarlane, KE Gong, NN Armstrong, AR Witt, PR Erickson, and MW Meyer. "The Platelet Interactivity Phenotype of *Streptococcus Sanguis* Influences the Course of Experimental Endocarditis." *Infection and Immunity* 60, 11 (1992): 4809–18.
- Hinse, D. "Molekulargenetische Charakterisierung von *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*: Vergleichende Genomanalyse und Evaluation von Stammtypisierungsmethoden," (2012) *Dissertation Universität Bielefeld*.

- Hinse, D, T Vollmer, C Rückert, J Blom, J Kalinowski, C Knabbe, and J Dreier. "Complete Genome and Comparative Analysis of *Streptococcus Gallolyticus* Subsp. *Gallolyticus*, an Emerging Pathogen of infective Endocarditis." *BMC Genomics* 12, 1 (2011): 400.
- Hoehn, B, and X Duval. "Infective Endocarditis." *N Engl J Med* 368 (2013): 1425–33.
- Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, Hawe E, Miller GJ. "The interleukin-6 -174 G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men." *European Heart Journal* 22 (2001): 2243-2252.
- Hyams, C, E Camberlein, JM Cohen, K Bax, and JS Brown. "The *Streptococcus Pneumoniae* Capsule Inhibits Complement Activity and Neutrophil Phagocytosis by Multiple Mechanisms." *Infection and Immunity* 78, 2 (2010): 704–15.
- Jagger, MP, Z Huo, and PG Riches. "Inflammatory Cytokine (Interleukin 6 and Tumour Necrosis Factor Alpha) Release in a Human Whole Blood System in Response to *Streptococcus Pneumoniae* Serotype 14 and Its Capsular Polysaccharide." *Clinical & Experimental Immunology* 130, 3 (2002): 467–74.
- Janeway, CA, Travers P, Walport M, Shlomichik MJ. "Immunobiology 5 The immune system in health and disease" *Garland Science* (2001)
- Jung, C-J, C-Y Yeh, C-T Shun, R-B Hsu, H-W Cheng, C-S Lin, and J-S Chia. "Platelets Enhance Biofilm Formation and Resistance of Endocarditis-Inducing Streptococci on the Injured Heart Valve." *Journal of Infectious Diseases* 205, 7 (2012): 1066–75.
- Khankhanian, P, SE Baranzini, BA Johnson, L Madireddy, D Nickles, LA Croen, and YW Wu. "Sequencing of the IL6 Gene in a Case-Control Study of Cerebral Palsy in Children." *BMC Medical Genetics* 14, 1 (2013): 126.
- Kimura, R, T Nishioka, A Soemantri, and T Ishida. "Cis-Acting Effect of the IL1B C- 31T Polymorphism on IL-1beta mRNA Expression." *Genes and Immunity* 5, 7 (2004): 572–75.
- Klein, Robert S, Rose A Recco, Michela T Catalano, Stephen C Edberg, Joan I Casey, and Neal H Steigbigel. "Association of *Streptococcus Bovis* with Carcinoma of the Colon." *New England Journal of Medicine* 297, 15 (1977): 800–802.
- Klinger, MHF, and W Jelkmann. "Review: Role of Blood Platelets in Infection and Inflammation." *Journal of Interferon & Cytokine Research* 22, 9 (2002): 913–22.
- Kobayashi, SD, JM Voyich, C Burlak, and FR DeLeo. "Neutrophils in the Innate Immune Response." *Archivum Immunologiae et therapiae experimentalis english edition* 53, 6 (2005): 505.
- Kocazeybek, B, S Küçükoglu, YE Öner. "Procalcitonin and C-reactive protein in infective endocarditis: correlation with etiology and prognosis." *Chemotherapie* 49, 1-2 (2003): 76-84.
- Kothari, N, J Bogra, H Abbas, M Kohli, A Malik, D Kothari, S Srivastava, and PK Singh. "Tumor Necrosis Factor Gene Polymorphism Results in High TNF Level in Sepsis and Septic Shock." *Cytokine* 61, 2 (2013): 676–81.
- Krishnan, S, G Eslick, and others. "Streptococcus Bovis Infection And Colorectal Neoplasia: A Meta-Analysis." *Colorectal Disease*, 2014.
- Kumpf, O, and RR Schumann. "Genetic Influence on Bloodstream Infections and Sepsis." *International Journal of Antimicrobial Agents* 32 (2008): S44–S50.
- Kunkel, EJ, and K Ley. "Distinct Phenotype of E-Selectin-Deficient Mice E-Selectin Is Required for Slow Leukocyte Rolling In Vivo." *Circulation Research* 79, 6 (1996): 1196–1204.

- Liu, M, TS Hanks, J Zhang, MJ McClure, DW Siemsen, JL Elser, MT Quinn, and B Lei. "Defects in Ex Vivo and in Vivo Growth and Sensitivity to Osmotic Stress of Group A *Streptococcus* Caused by Interruption of Response Regulator Gene *vicR*." *Microbiology* 152, 4 (2006): 967–78.
- Maisey, HC, D Quach, ME Hensler, GY Liu, RL Gallo, V Nizet, and KS Doran. "A Group B Streptococcal Pilus Protein Promotes Phagocyte Resistance and Systemic Virulence." *The FASEB Journal* 22, 6 (2008): 1715–24.
- Mäkelä, SM, M Strengell, TE Pietilä, P Österlund, and I Julkunen. "Multiple Signaling Pathways Contribute to Synergistic TLR Ligand-Dependent Cytokine Gene Expression in Human Monocyte-Derived Macrophages and Dendritic Cells." *Journal of Leukocyte Biology* 85, 4 (2009): 664–72.
- Malachowa, N, AR Whitney, SD Kobayashi, DE Sturdevant, AD Kennedy, KR Braughton, DW Shabb, et al. "Global Changes in *Staphylococcus Aureus* Gene Expression in Human Blood." *PloS One* 6, 4 (2011): e18617.
- Malke, H, and JJ Ferretti. "CodY-Affected Transcriptional Gene Expression of *Streptococcus Pyogenes* during Growth in Human Blood." *Journal of Medical Microbiology* 56, 6 (2007): 707–14.
- Mangoni, ED, LE Adinolfi, M-F Tripodi, A Andreana, M Gambardella, E Ragone, DF Precone, R Utili, and G Ruggiero. "Risk Factors for 'major' Embolic Events in Hospitalized Patients with Infective Endocarditis." *American Heart Journal* 146, 2 (2003): 311–16.
- Maurer, M, and E Von Stebut. "Macrophage Inflammatory Protein-1." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 10 (2004): 1882–86.
- McDonald, JR. "Acute Infective Endocarditis." *Infectious Disease Clinics of North America* 23, 3 (2009): 643–64.
- McNicol, A, A Agpalza, ECG Jackson, H Hamzeh-Cognasse, O Garraud, and F Cognasse. "*Streptococcus Sanguinis*-Induced Cytokine Release from Platelets." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 9, 10 (2011): 2038–49.
- Menten, P, A Wuyts, and J Van Damme. "Macrophage Inflammatory Protein-1." *Cytokine & Growth Factor Reviews* 13, 6 (2002): 455–81.
- Mercier, R-C, MJ Rybak, AS Bayer, and MR Yeaman. "Influence of Platelets and Platelet Microbicidal Protein Susceptibility on the Fate of *Staphylococcus aureus* in an In Vitro Model of Infective Endocarditis." *Infection and Immunity* 68, 8 (2000): 4699–4705.
- Mereghetti, L, I Sitkiewicz, NM Green, and JM Musser. "Extensive Adaptive Changes Occur in the Transcriptome of *Streptococcus Agalactiae* (group B *Streptococcus*) in Response to Incubation with Human Blood." *PLoS One* 3, 9 (2008): e3143.
- Moschioni, M, Pansegrau W, Barocchi MA. "Adhesion determinants of the Streptococcus species". *Microb Biotechnol.* 3(4) (2010):370-388.
- Müller, AM, C Cronen, LI Kupferwasser, H Oelert, K-M Müller, and CJ Kirkpatrick. "Expression of Endothelial Cell Adhesion Molecules on Heart Valves: Up-Regulation in Degeneration as Well as Acute Endocarditis." *The Journal of Pathology* 191, 1 (2000): 54–60.
- Munoz, FM, EP Hawkins, DC Bullard, AL Beaudet, and SL Kaplan. "Host Defense against Systemic Infection with *Streptococcus Pneumoniae* Is Impaired in E-, P-, and E-/P-Selectin-Deficient Mice." *Journal of Clinical Investigation* 100, 8 (1997): 2099.
- Namath, A, AJ Patterson, and others. "Genetic Polymorphisms in Sepsis." *Critical Care Clinics* 25, 4 (2009): 835.
- Nurden, AT, X Pillois, and DA Wilcox. "Glanzmann Thrombasthenia: State of the Art and Future Directions." In *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 39:642, 2013.

- Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. "A TaqI Polymorphism in the Human Interleukin-1 Beta (IL-1 Beta) Gene Correlates with IL-1 Beta Secretion in Vitro." *Eur J Clin Invest* 22(1992): 396–402.
- Qiang, S, F Xiangming, C Qixing, and F Stuber. "IL-10 Polymorphism Is Associated with Increased Incidence of Severe Sepsis." *Chinese Medical Journal* 116, 11 (2003).
- Rahimpour, R, G Mitchell, MH Khandaker, C Kong, B Singh, L Xu, A Ochi, et al. "Bacterial Superantigens Induce down-Modulation of CC Chemokine Responsiveness in Human Monocytes via an Alternative Chemokine Ligand-Independent Mechanism." *The Journal of Immunology* 162, 4 (1999): 2299–2307.
- Rollins, BJ. "Monocyte Chemoattractant Protein 1: A Potential Regulator of Monocyte Recruitment in Inflammatory Disease." *Molecular Medicine Today* 2, 5 (1996): 198–204.
- Rusniok, C, E Couvé, V Da Cunha, R El Gana, N Zidane, C Bouchier, C Poyart, R Leclercq, P Trieu-Cuot, and P Glaser. "Genome Sequence of *Streptococcus Gallolyticus*: Insights into Its Adaptation to the Bovine Rumen and Its Ability to Cause Endocarditis." *Journal of Bacteriology* 192, 8 (2010): 2266–76.
- Sabelnikovs, O, L Nikitina-Zake, A Krumina, Z Jaunberga, J Klovins, L Viksna, LJ Bjertnaes, L Kovalchuka, I Vanags. "Associations between TNF-A, IL-6 and IL-10 Promoter Polymorphisms and Mortality in Severe Sepsis," 2012.
- Sanger, F, S Nicklen, and AR Coulson. "DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, 12 (1977): 5463–67.
- Schlegel, L, F Grimont, E Ageron, PAD Grimont, and A Bouvet. "Reappraisal of the Taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus Equinus* Complex and Related Species: Description of *Streptococcus Gallolyticus* Subsp. *Gallolyticus* Subsp. Nov., *S. Gallolyticus* Subsp. *Macedonicus* Subsp. Nov. and *S. Gallolyticus* Subsp. *Pasteurianus* Subsp. Nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 3 (2003): 631–45.
- Schneider, DJ. "Anti-Platelet Therapy: Glycoprotein IIb-IIIa Antagonists." *British Journal of Clinical Pharmacology* 72, 4 (2011): 672–82.
- Schulte, W, J Bernhagen, and R Bucala. "Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets—an Updated View." *Mediators of Inflammation* 2013 (2013).
- Shun, C-T, S-Y Lu, C-Y Yeh, C-P Chiang, J-S Chia, and J-Y Chen. "Glucosyltransferases of Viridans Streptococci Are Modulins of Interleukin-6 Induction in Infective Endocarditis." *Infection and Immunity* 73, 6 (2005): 3261–70.
- Sillanpää, J, SR Nallapareddy, X Qin, KV Singh, DM Muzny, CL Kovar, LV Nazareth, et al. "A Collagen-Binding Adhesin, Acb, and Ten Other Putative MSCRAMM and Pilus Family Proteins of *Streptococcus Gallolyticus* Subsp. *Gallolyticus* (*Streptococcus Bovis* Group, Biotype I)." *Journal of Bacteriology* 191, 21 (2009): 6643–53.
- Silva, LMG, CG Baums, T Rehm, HJ Wisselink, R Goethe, and P Valentin-Weigand. "Virulence-Associated Gene Profiling Of *Streptococcus Suis* Isolates by PCR." *Veterinary Microbiology* 115, 1 (2006): 117–27.
- Smith, HE, M Damman, J van der Velde, F Wagenaar, HJ Wisselink, N Stockhofe-Zurwieden, and MA Smits. "Identification and Characterization of Thecps Locus of *Streptococcus Suis* Serotype 2: The Capsule Protects against Phagocytosis and Is an Important Virulence Factor." *Infection and Immunity* 67, 4 (1999): 1750–56.
- Soell, M, M Diab, G Haan-Archipoff, A Beretz, C Herbelin, B Poutrel, and J-P Klein. "Capsular Polysaccharide Types 5 and 8 of *Staphylococcus Aureus* Bind Specifically to Human Epithelial (KB) Cells, Endothelial Cells, and Monocytes and Induce Release of Cytokines." *Infection and Immunity* 63, 4 (1995): 1380–86.

- Sousa, ALM, VM Fava, LH Sampaio, CMT Martelli, MB Costa, MT Mira, and MMA Stefani. "Genetic and Immunological Evidence Implicates Interleukin 6 as a Susceptibility Gene for Leprosy Type 2 Reaction." *Journal of Infectious Diseases* 205, 9 (2012): 1417–24.
- Sprague, AH, and RA Khalil. "Inflammatory Cytokines in Vascular Dysfunction and Vascular Disease." *Biochemical Pharmacology* 78, 6 (2009): 539–52.
- Stipp RN, Goncalves RB, Hofling JF, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Transcriptional analysis of *gtfB*, *gtfC*, and *gpbB* and their putative response regulators in several isolates of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 23,6 (2008):466-73.
- Sullam, PM, AS Bayer, WM Foss, and AL Cheung. "Diminished Platelet Binding in Vitro by *Staphylococcus Aureus* Is Associated with Reduced Virulence in a Rabbit Model of Infective Endocarditis." *Infection and Immunity* 64, 12 (1996): 4915–21.
- Sullam, PM, GA Jarvis, and FH Valone. "Role of Immunoglobulin G in Platelet Aggregation by Viridans Group Streptococci." *Infection and Immunity* 56, 11 (1988): 2907–11.
- Szymanski, CM, FSt Michael, HC Jarrell, J Li, M Gilbert, S Larocque, E Vinogradov, and J-R Brisson. "Detection of Conserved N-Linked Glycans and Phase-Variable Lipooligosaccharides and Capsules from *Campylobacter* Cells by Mass Spectrometry and High Resolution Magic Angle Spinning NMR Spectroscopy." *Journal of Biological Chemistry* 278, 27 (2003): 24509–20.
- Söderquist, B, KG Sundqvist, and T Vikerfors. "Adhesion Molecules (E-Selectin, Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)) in Sera from Patients with *Staphylococcus Aureus* Bacteraemia with or without Endocarditis." *Clinical and Experimental Immunology* 118, 3 (1999): 408.
- Takeuchi, O, and S Akira. "Pattern Recognition Receptors and Inflammation." *Cell* 140, 6 (2010): 805–20.
- Taniguchi, N, K Nakano, R Nomura, S Naka, A Kojima, M Matsumoto, and T Ooshima. "Defect of Glucosyltransferases Reduces Platelet Aggregation Activity Of *Streptococcus Mutans*: Analysis of Clinical Strains Isolated from Oral Cavities." *Archives of Oral Biology* 55, 6 (2010): 410–16.
- Tilley, D, and SW Kerrigan. "Platelet-Bacterial Interactions in the Pathogenesis of Infective Endocarditis—Part I: The Streptococcus," 2013.
- Tischendorf, JJW, E Yagmur, D Scholten, D Vidacek, A Koch, R Winograd, AM Gressner, C Trautwein, HE Wasmuth, and F Lammert. "The Interleukin-6 (IL6)-174 G/C Promoter Genotype Is Associated with the Presence of Septic Shock and the Ex Vivo Secretion of IL6." *International Journal of Immunogenetics* 34, 6 (2007): 413–18.
- Tsigou, E, A Stavros, M Pavlos, G Stavros, T Athanassios, and B George. "The Immune Response after Stimulation with Wall Components of Gram-Positive Bacteria and Fungi." *Immunology Letters* 159, 1 (2014): 23–29.
- Tsuchiya, S, M Yamabe, Y Yamaguchi, Y Kobayashi, T Konno, and K Tada. "Establishment and Characterization of a Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line (THP-1)." *International Journal of Cancer* 26, 2 (1980): 171–76.
- Tumangger, H, and KF Jamil. "Contribution of Genes Polymorphism to Susceptibility and Outcome of Sepsis." *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 11, 2 (2010): 97–103.
- Vacca-Smith, AM, CA Jones, MJ Levine, and MW Stinson. "Glucosyltransferase Mediates Adhesion of *Streptococcus Gordonii* to Human Endothelial Cells in Vitro." *Infection and Immunity* 62, 6 (1994): 2187–94.
- Vandesompele, J, K De Preter, F Pattyn, B Poppe, N Van Roy, A De Paepe, and F Speleman. "Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes." *Genome Biology* 3, 7 (2002): research0034.



- Veloso, TR, A Chaouch, T Roger, M Giddey, J Vouillamoz, P Majcherczyk, Y-A Que, V Rousson, P Moreillon, and J M Entenza. "Use of a Human-like Low-Grade Bacteremia Model of Experimental Endocarditis to Study the Role of *Staphylococcus Aureus* Adhesins and Platelet Aggregation in Early Endocarditis." *Infection and Immunity*, 2012, IAI-01030.
- Vollmer, T, J Engemann, K Kleesiek, and J Dreier. "Bacterial Screening by Flow Cytometry Offers Potential for Extension of Platelet Storage: Results of 14 Months of Active Surveillance." *Transfusion Medicine* 21, 3 (2011): 175–82.
- Vollmer, T, D Hinse, K Kleesiek, and J Dreier. "Interactions between Endocarditis-Derived *Streptococcus Gallolyticus* Subsp. *Gallolyticus* Isolates and Human Endothelial Cells." *BMC Microbiology* 10, 1 (2010): 78.
- Vollmer, T, C Piper, D Horstkotte, R Körfer, K Kleesiek, and J Dreier. "23S rDNA Real-Time Polymerase Chain Reaction of Heart Valves: A Decisive Tool in the Diagnosis of Infective Endocarditis." *European Heart Journal* 31, 9 (2010): 1105–13.
- Vollmer, T, K Kleesiek, and J Dreier. "Lipopolysaccharide-Binding Protein (LBP) Gene Polymorphisms: Rapid Genotyping by Real-Time PCR and Association with Infective Endocarditis." *Clinical Biochemistry* 42, 13 (2009): 1413–19.
- Vollmer, T, C Piper, K Kleesiek, J Dreier. "Lipopolysaccharide-binding protein: a new biomarker for infective endocarditis?" *Clinical chemistry* 55; 2 (2009a): 295-304.
- Wallace, SM, BI Walton, RK Kharbanda, R Hardy, AP Wilson, and RH Swanton. "Mortality from Infective Endocarditis: Clinical Predictors of Outcome." *Heart* 88, 1 (2002): 53–60.
- Wandrer, F. "Untersuchung Der Fitness Und Tenazität von *Streptococcus Gallolyticus* subsp. *Gallolyticus* Stämmen" (2013) *Masterarbeit Universität Bielefeld*.
- Wang, X, J Zhang, X Du, M Song, C Jia, and H Liu. "Association of A561C and G98T Polymorphisms in E-Selectin Gene with Coronary Artery Disease: A Meta-Analysis." *PloS One* 8, 11 (2013): e79301.
- Weidenmaier, C, A Peschel, VAJ Kempf, N Lucindo, MR Yeaman, and AS Bayer. "DitABCD-and MprF-Mediated Cell Envelope Modifications of *Staphylococcus Aureus* Confer Resistance to Platelet Microbicidal Proteins and Contribute to Virulence in a Rabbit Endocarditis Model." *Infection and Immunity* 73, 12 (2005): 8033–38.
- Weinstock, M. "*Streptococcus Gallolyticus* Subsp. *Gallolyticus* Vermittelte Zytokinexpression in Modellsystemen Für Die Infektiöse Endokarditis" (2010) *Diplomarbeit Universität Osnabrück*.
- Widmer, E, Y Que, JM Entenza, P Moreillon, and others. "New Concepts in the Pathophysiology of Infective Endocarditis." *Current Infectious Disease Reports* 8, 4 (2006): 271.
- Wu, T, MR Yeaman, and AS Bayer. "In Vitro Resistance to Platelet Microbicidal Protein Correlates with Endocarditis Source among Bacteremic Staphylococcal and Streptococcal Isolates." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38, 4 (1994): 729–32.
- Yao, L, V Bengualid, FD Lowy, JJ Gibbons, VB Hatcher, and JW Berman. "Internalization of *Staphylococcus Aureus* by Endothelial Cells Induces Cytokine Gene Expression." *Infection and Immunity* 63, 5 (1995): 1835–39.
- Yeaman, MR. "Platelets in Defense against Bacterial Pathogens." *Cellular and Molecular Life Sciences* 67, 4 (2010): 525–44.

## 9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, Melanie Weinstock, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst wurde. Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Wörtliche und sinngemäße Zitate wurden durch entsprechende Quellenangaben kenntlich gemacht.

Bad Oeynhausen, den

---

Melanie Weinstock