

Charakterisierung und Transkriptom-Analyse
der Makrophagen-vermittelten Phagozytose 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
Imke Grimm
aus Zeven

Bielefeld/Bad Oeynhausen
März 2017

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 März 2013 bis März 2017.

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Cornelius Knabbe
2. Gutachter: apl. Prof. Dr. rer. nat. Torben Lübke

Tag der Abgabe: 23.03.2017

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich bei den vielen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. med. Cornelius Knabbe danke ich für die Ermöglichung, meine Promotion am Herz- und Diabeteszentrum durchzuführen, für das interessante Thema, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und dem Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Torben Lübke danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Tanja Vollmer für die Betreuung dieser Doktorarbeit. Vielen Dank für deine Kompetenz, Geduld sowie Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Sie haben maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jens Dreier danke ich herzlich für die Betreuung und ständige Hilfsbereitschaft sowie die wertvollen Ratschlägen während der gesamten Zeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jörn Kalinowski und Timo Wolf danke ich für die Hilfe beim Scannen der Microarrays.

Meinen ehemaligen und aktuellen Kolleginnen und Kollegen Christina Brandenburger, Dr. Mareike Dabisch-Ruthe, Dr. Jessika Dumke, Dr. Isabel Faust, Bastian Fischer, Dr. Doris Hendig, Dr. Dennis Hinse, Bettina Ibold, Dr. Joachim Kuhn, Christoph Lichtenberg, Dr. Patricia Kuzaj, Janina Tiemann, Dr. Jan Weile und Dr. Melanie Weinstock danke ich für die gute Zusammenarbeit und tolle Arbeitsatmosphäre. Vielen Dank für eure vielseitige Unterstützung, die offenen Ohren, die netten Gespräche und vielen guten Ideen. Meinen Studentinnen Nina Garben und Verena Volland-Thurn danke ich für den Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit.

Den Damen des PCR-Labors Conja Dickhoff, Renate Josting, Esther Lietzau, Evelyn Menke, Kirstin Potthast, Anke Straeten-Barnbeck, Cigdem Yilmaz sowie Bärbel Kammel und Birgit Drawe danke ich für das Teilen der Arbeitsplätze und für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin möchte ich meinen Freunden danken, die mir ob nah oder fern immer zur Seite standen. Meiner Familie, meinen Eltern, Alke und Wilhelm, und Geschwistern danke ich für die bedingungslose Unterstützung jeglicher Art während meiner ganzen Studien- und Promotionszeit. Ganz besonders möchte ich mich auch bei Marius bedanken! Vielen Dank für dein Verständnis, deine immerwährende Geduld und Unterstützung.

Vielen lieben Dank, dass ihr immer für mich da seid!

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> in der infektiösen Endokarditis	4
2.2	Die Bedeutung von Makrophagen in einer infektiösen Endokarditis.....	6
2.3	Biofilmbildung in der infektiösen Endokarditis	9
3	Ziele der Arbeit	11
4	Ergebnisse	12
4.1	Phagozytose von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> mittels THP-1 Makrophagen.....	12
4.1.1	Fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> in THP-1 Makrophagen.....	14
4.1.2	Zytokin-Genexpression in THP-1 Makrophagen nach Phagozytose von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	19
4.1.3	Untersuchung des oxidativen Bursts und der Makrophagen-Lyse nach Phagozytose verschiedener <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> Stämme	21
4.2	Phagozytose von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> durch primäre Makrophagen.....	22
4.2.1	Überlebensrate verschiedener <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> Stämme in primären Makrophagen	23
4.2.2	IL-6 Sekretion primärer Makrophagen nach Inkubation mit <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	24
4.3	Transkriptomanalyse von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> nach Phagozytose durch THP-1 Makrophagen.....	25
4.3.1	Verifikation der Microarray-Analyse von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> nach Phagozytose durch THP-1 Makrophagen mittels <i>Real-time</i> PCR	31
4.4	Überleben oder Wachstum von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> in Medium mit verschiedenen bakteriziden Reagenzien.....	32
4.4.1	Überleben von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> in saurem Medium.....	32
4.4.2	Wachstum von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> in Gegenwart von Wasserstoffperoxid.....	33
4.4.3	Wachstum von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> in Lysozym-supplementiertem Medium	34
4.5	Biofilmbildung von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> nach Inkubation mit Lysozym .	37
4.5.1	Adhäsion von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> an Kollagen Typ I bei Lysozym-Zugabe	42
4.5.2	Biofilmbildung in Wasserstoffperoxid-supplementiertem Medium	42
4.6	Transkriptomanalyse der <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> Stämme BAA-2069 und UCN 34 in Gegenwart von Lysozym	43
4.6.1	Verifikation der Transkriptomanalyse nach Lysozym-Behandlung mittels <i>Real-time</i> PCR	51

4.7	Analyse der Adhäsion von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> an Kollagen Typ I.....	52
4.7.1	Transkriptomanalyse von Kollagen-adhärenenten <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> Stämmen.....	54
4.7.2	Verifikation der Transkriptomanalyse nach Kollagen-Adhäsion mittels <i>Real-time</i> PCR	58
5	Diskussion.....	60
5.1	Analyse der Interaktion von Makrophagen mit <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	61
5.1.1	Transkriptomanalyse von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> nach Phagozytose durch THP-1 Makrophagen.....	68
5.2	Biofilmbildung von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> unter verschiedenen Einflussfaktoren	71
5.2.1	Transkriptomanalyse zur Untersuchung der Reaktion von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> auf Lysozym	73
5.2.2	Transkriptomanalyse von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> nach Adhäsion an Kollagen Typ I	77
5.3	Ausblick.....	79
6	Methoden.....	80
6.1	Mikrobiologische Methoden.....	80
6.1.1	Anzucht und Kultivierung von Bakterien	80
6.1.2	Bestimmung des Bakterientiters.....	80
6.1.3	Kryokonservierung von Bakterienkulturen	80
6.1.4	Wachstum und Biofilmbildung von Bakterien in Lysozym-haltigem Medium.....	80
6.1.5	Wachstum und Biofilmbildung in Gegenwart von Wasserstoff-Peroxid.....	81
6.1.6	Überleben von Bakterien in saurem Medium	81
6.1.7	Untersuchung der Adhäsion von Bakterien an Kollagen.....	81
6.1.8	Kristallviolett-Färbung adhärenenten Bakterienstämme	82
6.1.9	Mikroskopische Analyse von Biofilmen.....	82
6.2	Zellbiologische Methoden	82
6.2.1	Kultivierung und Passagieren von THP-1 Monozyten	82
6.2.2	Kryokonservierung von THP-1 Monozyten.....	83
6.2.3	Differenzierung von THP-1 Monozyten zu Makrophagen	83
6.2.4	Zählung und Vitalitätsanalyse humaner Zellen.....	83
6.2.5	Isolierung von Monozyten aus Vollblut.....	84
6.2.6	Differenzierung von primären Monozyten zu M1 Makrophagen	85
6.2.7	Durchflusszytometrische Analyse zur Überprüfung von isolierten Zellen.....	85
6.2.8	Phagozytose Assay	86
6.2.9	Lokalisierung von phagozytierten Bakterien mittels Mikroskopie	87
6.3	Molekularbiologische Methoden.....	88

6.3.1	RNA Extraktion aus THP-1 Zellen	88
6.3.2	RNA Extraktion aus <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	89
6.3.3	RNA Quantifizierung mit dem Nanodrop 2000	89
6.3.4	Bestimmung der RNA-Integrität	90
6.3.5	cDNA-Synthese aus humaner mRNA	91
6.3.6	cDNA-Synthese aus bakterieller mRNA	91
6.3.7	DNA-Extraktion aus bakteriellen Zellen	92
6.3.8	Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse genomischer DNA sowie PCR-Produkten 93	
6.3.9	Relative quantitative <i>Real-time</i> PCR	93
6.3.10	Microarray Entwicklung	94
6.3.11	Proben-Prozessierung und Micorarray-Hybridisierung	98
6.3.12	Bestimmung der IL-6-Konzentration mittels ELISA	101
6.3.13	<i>In vitro</i> -Zytotoxizitäts-Test	101
6.3.14	DCFH-DA Assay	102
6.4	Statistische Analysen	103
7	Material	104
7.1	Bakterienstämme	104
7.2	Humane Zelllinie	104
7.3	Medien für die Anzucht von Bakterien	105
7.4	Medien für die Zellkultur	105
7.5	Chemikalien und Reagenzien	105
7.6	Lösungen und Puffer	106
7.7	Proteine und Zytokine	107
7.8	Antikörper	107
7.9	Geräte	107
7.10	Größenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese	108
7.11	Oligonukleotide	109
7.12	Kits	110
7.13	Sonstige Materialien	111
7.14	Software und Datenbanken	111
8	Referenzen	113
9	Abbildungsverzeichnis	125
10	Abkürzungen	127
11	Kongressbeiträge und Publikationen	129
12	Erklärung	131

1 Zusammenfassung

Streptococcus gallolyticus subsp. *gallolyticus* wird in 10 % der infektiösen Endokarditiden (IE) als Erreger identifiziert. Durch dieses Gram-positive Bakterium bedingte IE sind häufig mit Kolonkarzinomen assoziiert. Im diesem Zusammenhang wurde postuliert, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* an die extrazelluläre Matrix (ECM) des malignen Kolonepithels adhärert und parazellulär durch das Epithel ins Blut gelangt. Am vorgeschädigten Endokard könne es wiederum an die ECM adhären, kolonisieren und so eine IE auslösen. Dabei sind die Pathomechanismen des Erregers noch weithin ungeklärt.

Während einer IE liegen Makrophagen vermehrt im infizierten Gewebe vor. Pathogene haben daher Resistenz- und Abwehrmechanismen gegenüber der Phagozytose und der Degradation in Phagozyten entwickelt. Für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wurden bereits stammabhängige Phagozytose- und Überlebensraten in THP-1 Makrophagen ermittelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* die Zytokin-Genexpression von THP-1 Makrophagen nur marginal stimuliert und kaum zur Lyse der Makrophagen führt. Außerdem konnte ermittelt werden, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* stammunabhängig oxidativen Stress in THP-1 Makrophagen auslöst. Weiterhin wurde die Reaktion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* auf die Phagozytose durch THP-1 Makrophagen auf Transkriptom-Ebene mit Hilfe eines Microarrays ermittelt, der die Gene von vier Genomen dieser Spezies abbildet. Es wurde u. a. die Genexpression einer NADH-Oxidase erhöht, die dem oxidativen Burst entgegenwirken könnte. Außerdem lässt sich aus der Analyse schließen, dass Dlt-Proteine durch *D*-Alanylierung der Teichonsäuren zur Resistenz gegenüber antimikrobiellen Peptiden führen und sich die Bakterien im Phagozyten auf einen Nahrungsmangel sowie eine anaerobe Umgebung einstellen.

Neben der Phagozytose von THP-1 Makrophagen wurde das Wachstum bzw. Überleben von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Gegenwart von Wasserstoffperoxid, Lysozym und einem niedrigen pH-Wert untersucht. Dies sind wichtige Faktoren in der Degradation von Bakterien in Phagosomen. Es zeigte sich, dass die untersuchten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme insgesamt sehr resistent gegenüber diesen Faktoren sind. Jedoch waren die beiden Stämme DSM 16831 und LMG 17956, die schneller in THP-1 Makrophagen abgebaut wurden, im Vergleich sensitiver gegenüber Lysozym bzw. Wasserstoffperoxid.

Des Weiteren wurde beobachtet, dass manche *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme in Medium mit Lysozym eine signifikant stärkere Biofilmbildung an Polystyrol aufwiesen als ohne Lysozym. Um diese Beobachtung weiter zu untersuchen, wurde das Transkriptom zweier Stämme in Gegenwart von Lysozym ermittelt. Es zeigten sich erhöhte Expressionen der Gene des *dlt* Operons, deren Produkte zur Resistenz gegenüber der kationischen mikrobiellen Peptid-Funktion von Lysozym führen. Die Lysozym-Behandlung führte zusätzlich zu Expressionserhöhungen von Genen der Proteinbiosynthese und vom Kohlenhydrat-, Lipid- und Aminosäuremetabolismus und Genen, deren Produkte ein aerobes Wachstum ermöglichen. Der Biofilmbildung am Endokard geht die Adhäsion an Kollagen voraus. Eine Transkriptomanalyse von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nach Adhäsion an Kollagen zeigte, dass das Transkriptom stammabhängig durch die Adhäsion verändert wurde. Die Regulation der Genexpression weist darauf hin, dass der stark adhärente Stamm UCN 34 die Kohlenhydrataufnahme verändert, während im gering adhärenen Stamm DSM 16831 die Expression von Phagen- und Transposongenen reguliert werden, die auf einen lateralen Gentransfer hinweisen könnten.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* hohe Resistenzen gegen antimikrobielle Substanzen aufweist und Biofilmbildung als Schutzmechanismus gegen Lysozym nutzen kann. Dadurch geben die Ergebnisse dieser Arbeit neue Aufschlüsse über potenzielle Pathomechanismen dieses Erregers.

Abstract

Streptococcus gallolyticus subsp. *gallolyticus* is the identified causative pathogen in about 10 % of infective endocarditis (IE) cases. Notably, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-caused IE is often associated with colon carcinoma. Based on this knowledge it was postulated that *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* adheres to the extracellular matrix of malignant epithelium of the colon and translocates through a paracellular pathway through from the epithelium to the bloodstream. Furthermore, the bacterium adheres to the extracellular matrix of the damaged endocardium and induces IE. To date, the pathomechanisms have not been solved.

Macrophages play a key role in the endocardium during IE. Therefore, pathogens develop mechanisms which protect against degradation in phagosomes. It has been shown that *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* phagocytic uptake by THP-1 macrophages, and their survival within these phagocytes was strain-dependent. In this study, it was shown that *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* stimulates cytokine gene expression and lysis of macrophages just marginally with equivalent stimulation of reactive oxygen species, regardless of which strain. Whole genome microarrays were used to examine the reaction of *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* to the phagocytic uptake by THP-1 macrophages. Increased gene expression of a NADH oxidase indicates reaction towards the oxidative burst in macrophages. Furthermore, transcriptomic analysis revealed that Dlt proteins could effect resistance against cationic peptides through *D*-alanylation of teichoic acids, and that the bacterial cells change their nutrition and react to anaerobic conditions in phagosomes. Beside the phagocytosis, survival or growth of *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* was observed in medium with hydrogen peroxide, lysozyme or acid pH-value, important factors for degradation of bacteria in phagosomes. This revealed that *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* is very resistant to these factors. The strains DSM 16831 and LMG 17956, which were more rapidly killed in THP-1 macrophages, were more sensitive to lysozyme or hydrogen peroxide, respectively, than other tested strains. Furthermore, it was observed that lysozyme triggers biofilm formation of *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* on polystyrene. Therefore, the transcriptome of *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* was analyzed in the presence of lysozyme. It again revealed higher expression of genes of the *dlt* operon whose products provoke *D*-alanylation of teichoic acids. This leads to resistance to the cationic antimicrobial function of lysozyme. Additionally, an increase in the expression of genes of the protein biosynthesis, genes for aerobic growth as well as genes of carbohydrate, lipid and amino acid metabolism was observed.

Adhesion to collagen is the initial step of biofilm formation in the endocardium. The transcriptome analysis of *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* adhering to collagen compared to planktonic cells showed strain-dependent regulation of gene expression. The regulation of gene expression of the strain UCN 34 indicate a change in nutritional intake. In the low-adherent strain DSM 16831 the expression of genes associated with a transposon and phage indicate horizontal gene transfer.

The results of this study provide insights about potential pathomechanisms of *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* which show high resistance to antimicrobial compounds and biofilm formation as a survival mechanism against lysozyme.

2 Einleitung

Streptokokken treten sowohl als Kommensale des menschlichen Körpers, als auch als Erreger vieler verschiedener Erkrankungen auf, zu denen beispielsweise Karies, Endokarditis und Meningitis gehören (Mitchell, 2003). Es wurden ca. 40 Streptokokkenspezies gefunden, die in die folgenden sechs Gruppen eingeteilt werden können: *S. pyogenes*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. anginosus*, *S. mutans* und *S. bovis* (Kawamura *et al.*, 1995; Hardie und Whiley, 1997). Der *Streptococcus bovis/equinus*-Komplex gehört zu der Lancefield Gruppe D, die aus γ -hämolytischen Streptokokken besteht (Facklam, 2002). Die Gram-positiven Streptokokken der Lancefield Gruppe D kommen sowohl in Tieren als auch Menschen vor. Sie sind Kommensale, opportunistische Pathogene oder werden in der Lebensmittelfermentation eingesetzt (Jans *et al.*, 2015). Dem *S. bovis/S. equinus* Komplex werden sieben Subspezies zugeordnet: *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*, *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, *S. infantarius* subsp. *infantarius*, *S. lutetiensis*, *S. alactolyticus* und *S. equinus* (entspricht *S. bovis*; Schlegel *et al.*, 2003).

Diese Arbeit befasst sich mit der Bakterien-subspezies *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (früher *S. bovis* Biotyp I). Namensgebend für diese Subspezies ist die Fähigkeit der Hydrolyse von Gallotanninen zu Gallussäure, die weiter zu Pyrogallol decarboxyliert wird. Zudem können diese Bakterien Mannitol, Inulin und Trehalose fermentieren. Durch diese Fähigkeiten grenzt sich *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* von den anderen Subspezies des *S. bovis/S. equinus* Komplexes ab (Osawa *et al.*, 1995; Schlegel *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2014). *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Zellen sind unbewegliche, nicht-sporulierende Diplokokken, die auch in kurzen Ketten vorkommen können (O'Donovan und Brooker, 2001). Sie sind natürliche Kommensale des Gastrointestinaltraktes und wurden sowohl im Kot als auch mit Infektionen assoziiert in Beuteltieren, Säugetieren sowie Vögeln nachgewiesen (Beck *et al.*, 2008). Beispielsweise wurde *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* als Erreger von Sepsis, Endokarditis und anderen Infektionen in Tauben und Puten beziehungsweise als Mastitis-Erreger in Kühen identifiziert. Daher konnte *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* auch in Rohmilchprodukten nachgewiesen werden (Sasaki *et al.*, 2004).

Mit Hilfe von Kultivierungsexperimenten konnten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Bakterien in ca. 4 % humaner Stuhlproben gesunder Probanden in Deutschland ermittelt werden. Bei den gleichen Probanden konnte jedoch dieses Bakterium mittels *Real-time* PCR Analyse bei ca. 60 % der Stuhlproben identifiziert werden (Dumke, 2015). Zusätzlich ist *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ein fakultatives humanes Pathogen von Bakteriämien ohne lokalisierte Infektionen sowie von Cholangitis, Gelenkinfektionen und der infektiösen Endokarditis (Abdulmir *et al.*, 2011; Liddle *et al.*, 2012; Corredoira *et al.*, 2013). Das zoonotische Potential des Erregers ist

noch weitgehend ungeklärt. Es konnte jedoch ein möglicher Transmissionsweg zwischen Huhn und Mensch beschrieben werden. Im Kot von Legehennen sowie in der Blutkultur eines Patienten, der engmaschigen Kontakt zu den Hennen hatte, konnte der gleiche *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Sequenztyp nachgewiesen werden (Dumke *et al.*, 2015).

Bisher wurden die Genome von den vier *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Stämmen DSM 16831, BAA-2069, UCN 34 und ATCC 43143, sequenziert (Rusniok *et al.*, 2010; Hinse *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011; Grimm *et al.*, 2017b). Zudem liegen *Shotgun*-Sequenzen der Genome von vier weiteren Stämmen, wie zum Beispiel von TX20005 und LMG 17956, vor (Nelson *et al.*, 2010; Romero-Hernández *et al.*, 2015). Es wurde gezeigt, dass sich die aus Tieren isolierten Stämme DSM 16831 und LMG 17956 durch eine höhere Anzahl von Genen, zu denen Transposon- und Phagengene gehören, von den infektiöse Endokarditis-assoziierten Stämmen (BAA-2069, UCN 34 und ATCC 43143) unterscheiden lassen (Romero-Hernández *et al.*, 2015). Die Transkription der Gene ist jedoch noch unbekannt.

2.1 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in der infektiösen Endokarditis

S. gallolyticus subsp. *gallolyticus* ist der identifizierte Erreger in 10 % der infektiösen Endokarditiden (Murdoch *et al.*, 2009). Dabei ist die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-induzierte infektiöse Endokarditis häufig mit Darmpolypen und Kolonkarzinomen assoziiert (Darjee und Gibb, 1993; Abdulmir *et al.*, 2011; Abeni *et al.*, 2013; Lazarovitch *et al.*, 2013). Boleij *et al.* stellten eine Hypothese auf, die erklären könnte, wie *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* vom malignen Kolon zum Endokard gelangt (Abbildung 2.1). Demnach können im Kolon lokalisierte *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Zellen an die, durch Läsionen der Darmwand freigelegte, extrazelluläre Matrix adhärieren und parazellulär durch das Epithel in den Blutkreislauf gelangen. Von der daraus entstehenden Bakteriämie können einzelne bakterielle Zellen an geschädigtes Endokard adhärieren (Boleij *et al.*, 2011). Vor der infektiösen Endokarditis am nativen Endokard liegt häufig eine nicht-bakterielle, thrombotische Endokarditis (NBTE) vor. Diese entwickelt sich am geschädigten Endokard durch inflammatorische Parameter, welche die Aggregation von Plättchen und Fibrin induzieren (Werdan *et al.*, 2014). *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Zellen können so an die, durch die NBTE freigelegte, extrazelluläre Matrix adhärieren und dort eine Infektion auslösen (Boleij *et al.*, 2011).

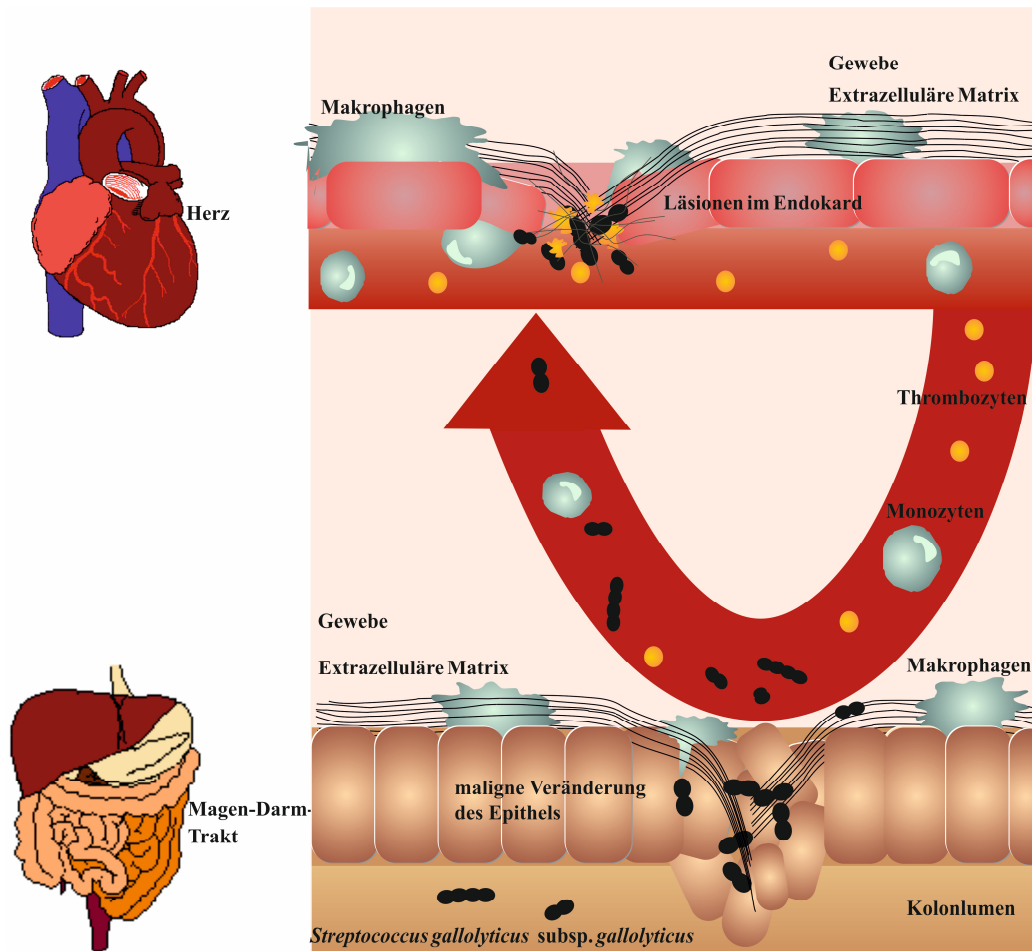


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der potenziellen Pathogenese von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

Dargestellt ist der hypothetische Zusammenhang zwischen malignen Veränderungen im humanen Kolon mit der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-verursachten infektiösen Endokarditis.

Bisher wurden einzelne Aspekte des Weges von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* durch den Wirt vom Darm bis zum Auslösen der infektiösen Endokarditis näher betrachtet. Der Darm ist mit Epithelzellen ausgekleidet. Die inflammatorische Reaktion von Epithelzellen auf Bakterien kann die Bildung von Kolonkarzinomen verursachen, weshalb die Interleukin (IL)-8 und IL-1 β Expression dieser Zellen (Caco-2) nach Stimulation mit drei verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen, untersucht wurde (Terzic *et al.*, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Vergleich zu anderen untersuchten Bakterienspezies, wie zum Beispiel *Enterococcus faecalis*, keine oder nur eine sehr geringe Expressionserhöhung in Epithelzellen auslöst. Darüber hinaus hatten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Zellen im Vergleich zu anderen Bakterienspezies nur ein geringes Adhäsion- und Invasionspotential an Epithelzellen, aber hohes Translokationspotenzial (Boleij *et al.*, 2011). Weiterhin wurde das Überleben von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Vollblut (Nachstellung einer Bakteriämie)

untersucht. Es wurde gezeigt, dass die meisten untersuchten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme innerhalb von 48 Stunden im Vollblut wachsen und nur beim Stamm DSM 16831 die Anzahl bakterieller Zellen im Blut verringert war. Zusätzlich konnte eine stammabhängige Reaktion der Blutzellen in Form von IL-6-Sekretion auf *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* beobachtet werden (Grimm *et al.*, 2017c).

Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ist die Adhäsion an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix im Darm und am Endokard. Vollmer *et al.* und Sillanpää *et al.* haben gezeigt, dass das Pathogen die höchste Adhäsionsfähigkeit an Kollagen Typ I, gefolgt von Kollagen Typ II und IV aufwies. Höhere Adhäsionsfähigkeiten wurden auch an Fibrinogen nachgewiesen und nur eine geringe Adhäsionsfähigkeit an Fibronectin und Vitronectin (Sillanpää *et al.*, 2008; Vollmer *et al.*, 2010a). Am Endokard adhäreren *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Zellen nicht nur an Komponenten der extrazellulären Matrix, sondern auch an das Endothel mit nachfolgender Persistenz und Proliferation (Werdan *et al.*, 2014). Vollmer *et al.* haben gezeigt, dass alle in der Studie untersuchten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme an Endothelzellen adhäreren können. Zudem konnte ein Invasionspotential aller untersuchten Stämme, außer beim Stamm DSM 16831, in diese humane Zellen nachgewiesen werden (Vollmer *et al.*, 2010a). Die Kolonisierung des Pathogens am Endokard führt zur Aktivierung des Immunsystems und Verstärkung der Koagulation des Blutes durch Fibrin und Plättchen. Das Bakterium wird dadurch nicht nur durch den von ihm gebildeten Biofilm vor dem Immunsystem geschützt, sondern auch von dem ihm umgebenden Thrombus (Werdan *et al.*, 2014). Daraus resultierend ist die Aktivierung der Aggregation von Blutplättchen durch Pathogene ein Virulenzfaktor dieser Bakterien in einer infektiösen Endokarditis (Jung *et al.*, 2012). Veloso *et al.* zeigten, dass im Vergleich zu *Enterococcus faecalis*, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* *in vitro* zu einer schnelleren Plättchenaggregation führte (Veloso *et al.*, 2015). Außerdem konnten stammabhängige Aggregationspotentiale sowie vom Individuum abhängige Plättchenaggregationen, die durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* induziert wurden, ermittelt werden (Grimm *et al.*, 2017c).

2.2 Die Bedeutung von Makrophagen in einer infektiösen Endokarditis

Zirkulierende Monozyten (mononukleäre Leukozyten) spielen eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem und sind die Vorläufer von dendritischen Zellen und Makrophagen. Bei einer Infektion werden Chemokine von verschiedenen Zellen des Immunsystems, aber auch vom Endothel und Epithel sekretiert. Durch diesen chemotaktischen Gradienten werden die Monozyten zum infizierten Gewebe rekrutiert, wie es etwa bei einer infektiösen Endokarditis

vorliegt. Dort adhären sie reversibel an Adhäsionsmoleküle, rollen über das Endothel und transmigrieren nach irreversibler Adhäsion in das Gewebe, wo sie zu Makrophagen differenzieren (Shi und Pamer, 2011). So bedecken Makrophagen bei einer Streptokokken-induzierten infektiösen Endokarditis ca. 4,5 % des untersuchten Bereichs einer infizierten Herzklappe, während auf nicht infizierten Herzklappen keine Makrophagen vorliegen (Benoit *et al.*, 2010).

Neben neutrophilen Granulozyten sind Makrophagen die wichtigsten Phagozyten im menschlichen Körper (Aderem und Underhill, 1999). Makrophagen bilden Phagosomen, indem sie Mikroorganismen mittels verschiedener Rezeptoren erkennen, diese mit ihrer Plasmamembran umhüllen und so in die Zelle aufnehmen (Abbildung 2.2). Anschließend werden die Phagosomen mit antimikrobiellen Verbindungen angereichert. Solche antimikrobiellen Substanzen sind etwa reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Stickoxide (NO), die mittels NADPH Oxidasen oder NO-Synthetasen synthetisiert werden. Zusätzlich wird das

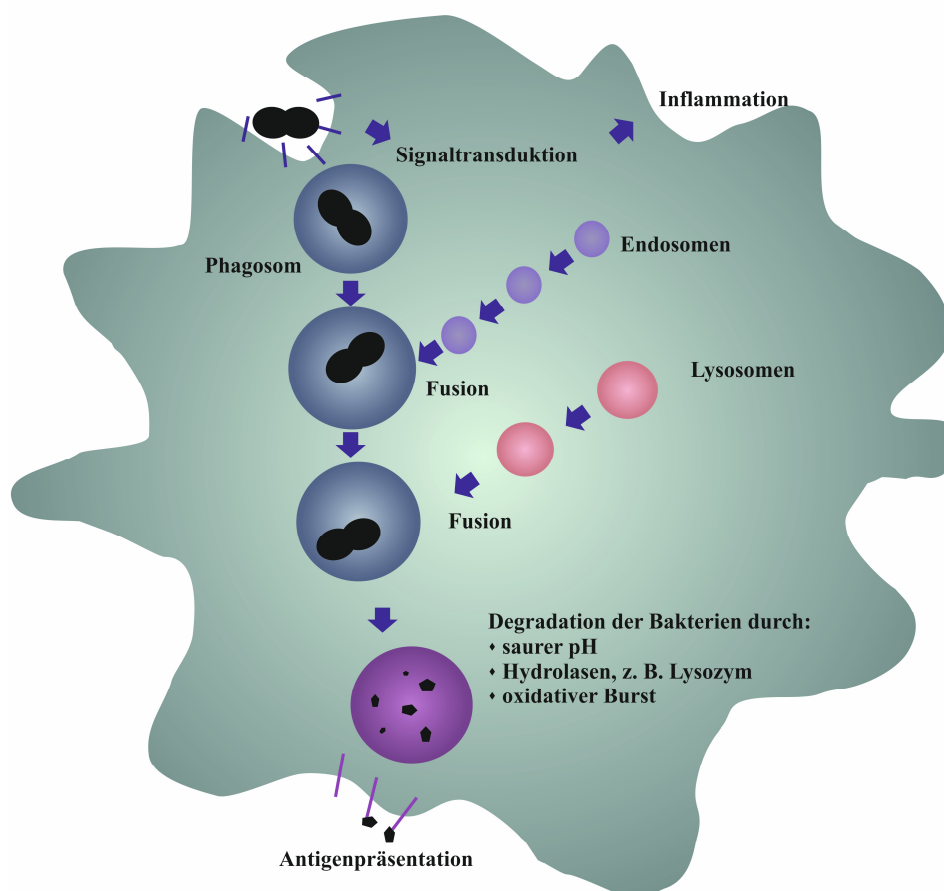


Abbildung 2.2: Phagozytose von Mikroorganismen durch Makrophagen

Die durch Rezeptoren erkannten Mikroorganismen führen zur Ausbildung des frühen Phagosoms. Eine der ersten Reaktionen des Phagozyten ist der oxidative Burst. Durch Fusion mit Endosomen und Lysosomen werden Hydrolasen aufgenommen sowie das Lumen angesäuert. Es folgt die Degradation der Mikroorganismen sowie eine inflammatorische Reaktion der Makrophagen.

Lumen mit Hilfe von ATPasen angesäuert (pH 4–5), welches das antimikrobielle Milieu unterstützt (Underhill und Ozinsky, 2002; Haas, 2007). Bei der Reifung von Phagosomen fusionieren diese mit Endosomen und Lysosomen, wodurch sie weiter angesäuert werden und Hydrolasen (Nukleasen, Lipasen, Glycosidasen, Proteasen und Cathepsin) aufnehmen (Wavre-Shapton *et al.*, 2014). Durch diese Mechanismen werden aufgenommene Mikroorganismen abgetötet, degradiert und deren Antigene präsentiert. Darüber hinaus werden Zytokine sekretiert, um weitere Immunzellen, wie die des adaptiven Immunsystems, zum Infektionsherd zu rekrutieren (Underhill und Ozinsky, 2002; Haas, 2007). Abhängig vom phagozytierten Mikroorganismus gehen die Makrophagen früher oder später in Apoptose (Baran *et al.*, 1996; Faherty und Maurelli, 2008).

Bakterien haben Mechanismen entwickelt, um die Tötung durch Phagozytose zu umgehen. *Streptococcus suis* und *Streptococcus pneumoniae* bilden zum Beispiel eine Kapsel, um nicht vom Phagozyten erkannt zu werden (Smith *et al.*, 1999; Hyams *et al.*, 2010). Um den oxidativen Burst zu überleben, haben manche *Staphylococcus aureus* Stämme eine Stress-Antwort entwickelt, die die Bakterien schützt (Dupré-Crochet *et al.*, 2013). *Streptococcus pyogenes* kann die Ansäuerung des Lumens mittels V-ATPase blockieren, während *Streptococcus agalactiae* die Ansäuerung benötigt, um die Phagozytose überleben zu können (Hertzén *et al.*, 2010; Nordenfelt *et al.*, 2012). Ein weiterer wichtiger Faktor der Reaktion von Phagozyten auf Mikroorganismen ist das Enzym Lysozym. Monozyten, neutrophile Granulozyten und Makrophagen sind diejenigen Zellen des Immunsystems, die die höchste Menge an Lysozym produzieren (Helal und Melzig, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Lysozym durch mikrobielle Stimulation sekretiert wird.

Zudem trägt Lysozym auch als Hydrolase zur Degradation von Mikroorganismen in Phagosomen bei (Helal *et al.*, 2012). Lysozym hydrolysiert die glykosidische Bindung zwischen N-Acetylmuraminsäure- und N-Acetylglucosaminresten im Peptidoglykan und ist ein kationisches mikrobielles Peptid, welches mit der negativ geladenen bakteriellen Oberfläche interagiert (Herbert *et al.*, 2007; Nawrocki *et al.*, 2014; Rajaraman *et al.*, 2014). Der Abbau von Bakterien mittels Lysozym innerhalb von Phagosomen führt außerdem zu einer erhöhten Expression von IL-1 β (Shimada *et al.*, 2010; Davis und Weiser, 2011). Manche Gram-positive Bakterien können ihr Peptidoglykan, beispielsweise durch O-Acetylierung modifizieren, um dem Abbau durch Lysozym zu entgehen und länger in Phagolysosomen zu überleben (Davis und Weiser, 2011; Guariglia-Oropeza und Helmann, 2011). Weiterhin können *Streptococcus iniae* sowie das M1-Protein von *Streptococcus pyogenes* die Signaltransduktion einer inflammatorischen Antwort in Makrophagen verändern, wodurch sie ihre Überlebenswahrscheinlichkeit nach Phagozytose erhöhen (Hertzén *et al.*, 2010; El Aamri *et al.*,

2015). Herdt *et al.* haben beobachtet, dass *Streptococcus bovis*-Stämme den Phagosomen entkommen können, sich im Zytoplasma replizieren und Makrophagen innerhalb von sieben Stunden lysieren. So konnten sie den Immunzellen von Tauben entkommen (De Herdt *et al.*, 1995). Boleij *et al.* haben gezeigt, dass der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm UCN 34 länger in THP-1 Makrophagen überleben kann als *Bacillus subtilis* und *Lactobacillus plantarum* (Boleij *et al.*, 2011). Außerdem wurde eine stammabhängige Aufnahme von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* durch THP-1 Makrophagen mit unterschiedlichen Überlebensraten der einzelnen Stämme beobachtet (Grimm *et al.*, 2017c).

2.3 Biofilmbildung in der infektiösen Endokarditis

Neben der infektiösen Endokarditis gehören auch Parodontitis, zystische Fibrose, Otitis sowie Infektionen bei Implantaten oder intravenösen Zugängen und Katheter zu den Biofilm-assoziierten Erkrankungen (Kokare *et al.*, 2009). Dabei ist die Biofilmbildung eine wichtige Fähigkeit von Pathogenen, um auf biologischen Oberflächen des Wirts (zum Beispiel auf Komponenten der extrazellulären Matrix) und nicht-biologischen Oberflächen zu überleben (Stoodley *et al.*, 2002). Sie verhindert die Degradierung von Bakterien in einer für sie lebensfeindlichen Umgebung, wie zum Beispiel der Präsenz von Antibiotika, niedrigem pH-Wert oder anderen Abwehrmechanismen des Wirts. Zudem ist die Biofilmbildung ein Mechanismus der das Überleben bei Nahrungsknappheit oder das Fortschwimmen durch Strömungen, bei zum Beispiel Blut, verhindern kann (Johnson, 2008). Die zuvor beschriebenen Parameter können die Biofilmbildung von Bakterien *in vitro* beeinflussen. Zum Beispiel führt die Präsenz von einer bestimmten Konzentration an Antibiotika bei Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien zu einer verstärkten Biofilmbildung (Kaplan, 2011). Das Bakterium *Acinetobacter oleivorans* hat zudem vermehrt Biofilm in Medium mit Wasserstoffperoxid gebildet (Jang *et al.*, 2016). Anders verhält es sich bei anderen Pathogenen, wie zum Beispiel der Spezies *Staphylococcus aureus*. Bei Zugabe von löslichem oder immobilisiertem Lysozym wurde eine Inhibition der Biofilmbildung beobachtet (Sudagidan und Yemenicioglu, 2012; Rajaraman *et al.*, 2014).

Die Biofilmbildung beginnt mit einer losen Adhäsion der Bakterien an der Oberfläche, auf die eine dauerhafte Adhäsion und Formung einer Bakteriengemeinschaft in Mikrokolonien folgt (Johnson, 2008; Kokare *et al.*, 2009). Die bakteriellen Zellen sind von einer extrazellulären polymeren Substanz aus Polysacchariden, Proteinen und Nukleinsäuren umgeben, die der Bakteriengemeinschaft Struktur verleiht (Stoodley *et al.*, 2002). Der Großteil eines Biofilms besteht jedoch aus Wasser (Vasudevan, 2014).

In einem Biofilm sind Bakterien in einer anderen Wachstumsphase als im planktonischen Zustand, in der die eng beieinander liegenden bakteriellen Zellen mittels *Quorum Sensing* kommunizieren (Suntharalingam und Cvitkovitch, 2005). Beim *Quorum Sensing* in Gram-positiven Bakterien, wie Streptokokken, werden Peptide als Signalmoleküle sekretiert. Diese werden in den meisten Fällen durch Zwei-Komponenten-Systeme erkannt, welche anschließend eine Regulation der Genexpression verursachen. Die Abbildung 2.3 stellt ein Modell der Signaltransduktion des *Quorum Sensings* von Gram-positiven Bakterien dar. Durch die räumliche Nähe der Zellen im Biofilm erreichen die Kompetenz-stimulierenden Peptide eine gewisse Konzentration, wodurch der Rezeptor ComD das ComE-Protein phosphoryliert. Daraus resultiert die Transkription des Sigmafaktors ComX. ComX induziert die Transkription verschiedener Gene, die für die Aufnahme der DNA und deren Rekombination verantwortlich sind (Li *et al.*, 2002). Dies führt zur natürlichen Transformation von Zellen, wodurch der Empfänger Gene erhält, die für eine Antibiotika-Resistenz oder einen anderen entscheidenden Virulenzfaktoren kodieren (Suntharalingam und Cvitkovitch, 2005).

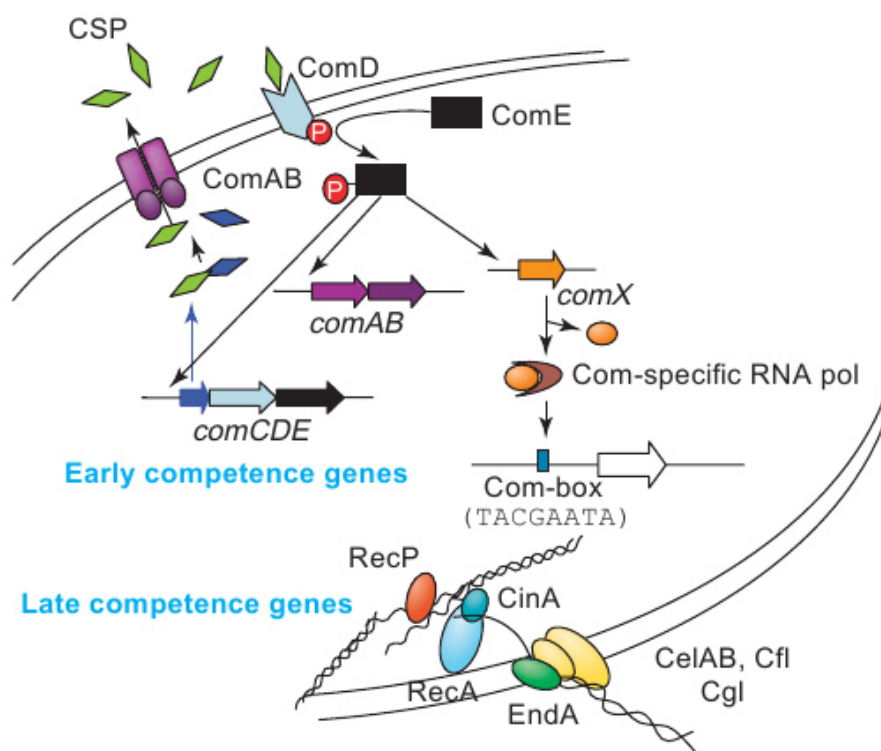


Abbildung 2.3: Model der Signaltransduktion bei Induktion genetischer Kompetenz durch ein Kompetenz-stimulierendes Peptid-System

Zu den frühen exprimierten Kompetenz-Genen gehören die der *comAB*- und *comCDE*-Operone, deren Produkte die Kompetenz-stimulierenden Peptide erkennen und das Signal über den Sigmafaktor X (*comX*) weiterleiten. Über Transkriptionsinduktion werden die späten Kompetenz-Gene exprimiert, die zur Aufnahme von DNA sowie DNA-Rekombination führen (Suntharalingam and Cvitkovitch, 2005).

3 Ziele der Arbeit

Streptococcus gallolyticus subsp. *gallolyticus* ist ein Kommensale des humanen Gastrointestinaltraktes und Erreger der infektiösen Endokarditis. Wichtige Virulenzfaktoren dieses Pathogens sind das Überleben der Immunantwort des Wirts sowie die Biofilmbildung am Endokard. Bisherige Studien haben stammabhängige Phänotypen dieses Pathogens untersucht und die Reaktion von Wirtszellen, zum Beispiel in Form einer inflammatorischen Reaktion, analysiert. Die Schwerpunkte dieser Arbeit liegen in der Analyse der Phagozytose von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* durch Makrophagen und in der Untersuchung der Biofilmbildung des Erregers. Dafür sollen Teile der potenziellen Pathomechanismen verschiedener Phänotypen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* mittels Transkriptomanalysen untersucht werden. Die Divergenzen werden zwischen fünf unterschiedlichen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen im Vergleich zu einem *Staphylococcus aureus* Stamm als Referenz ermittelt.

Im ersten Teil der Arbeit soll die Phagozytose von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* durch THP-1 Makrophagen untersucht werden. Dafür wird die Reaktion der THP-1 Makrophagen nach Phagozytose von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen in Form des oxidativen Bursts, der Lyse der Makrophagen und der Genexpression einzelner Zytokine ermittelt. Außerdem soll das Überleben der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme in Gegenwart der Komponenten Lysozym, Wasserstoffperoxid und saurem pH-Wert untersucht werden, die die Tötung und Degradierung von Bakterien in Phagosomen verursachen. Um die Reaktion zweier exemplarischer *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme auf die Phagozytose auf Transkriptom-Ebene zu erfassen, wird ein Spezies-spezifischer Microarray verwendet.

Im zweiten Teil der Arbeit soll der Einfluss von Lysozym und Wasserstoffperoxid auf die Biofilmbildung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen analysiert werden. Hierfür soll der Phänotyp der Stämme ermittelt werden und das Transkriptom exemplarischer Stämme in Lysozym-haltigem Medium sowie nach Adhäsion an Kollagen untersucht werden.

4 Ergebnisse

S. gallolyticus subsp. *gallolyticus* ist ein Pathogen der infektiösen Endokarditis. Um die Infektion auslösen zu können, muss *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* über den Blutkreislauf zum Herzen gelangen und am Endokard kolonisieren. Wichtige Virulenzmechanismen sind unter anderem das Überleben der Immunantwort sowie die Biofilmbildung am Endokard. Zum besseren Verständnis der Pathomechanismen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wird in dieser Arbeit das Überleben von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Makrophagen untersucht. Dabei werden sowohl die Reaktion der Phagozyten auf die Bakterien als auch die Reaktion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* auf Makrophagen auf Transkriptom-Ebene untersucht. Außerdem wird das Wachstums beziehungsweise Überleben von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Gegenwart einzelner phagosomaler Komponenten überprüft, die wichtige Bestandteile des Pathogenabbaus sind. Zusätzlich wird die Biofilmbildung des Bakteriums unter verschiedenen Bedingungen analysiert, weil diese eine wichtige Rolle in der Kolonisierung am Endokard spielt. Die Analysen wurden mit fünf *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen durchgeführt, deren Genom sequenziert wurde (Rusniok *et al.*, 2010; Hinse *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011; Romero-Hernández *et al.*, 2015; Grimm *et al.*, 2017b). Zudem gehören Staphylokokken, neben Streptokokken, zu den häufigsten Erregern einer infektiösen Endokarditis (Murdoch *et al.*, 2009; Vollmer *et al.*, 2010b). Deshalb wurde zum Vergleich der *S. aureus* Stamm ATCC 25923 verwendet, der auch schon in vorherigen Studien als Referenzstamm genutzt wurde (Kubica *et al.*, 2008; Treangen *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2015).

4.1 Phagozytose von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* mittels THP-1 Makrophagen

Die Phagozytoserate von fünf *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen sowie eines *S. aureus* Vergleichsstammes ist in der Abbildung 4.1 dargestellt. Die Phagozytose von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zeigt stammabhängige Unterschiede. Auch das Überleben innerhalb der Makrophagen ist stammpezifisch (Abbildung 4.2).

Das zugegebene Inokulum lag zwischen $1,4 \times 10^6$ – $2,5 \times 10^6$ Bakterien pro Kavität. Dies entsprach ungefähr einer *multiplicity of infection* (MOI) von fünf. Die Aufnahme bakterieller Zellen von den THP-1 Makrophagen mittels Phagozytose unterscheidet sich je nach Stamm. Das Verhältnis (in Prozent angegeben) von dem intrazellulär vital vorliegenden bakteriellen Titer zum hinzugegebenen Inokulum gibt die Phagozytoserate wieder. Von den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen DSM 16831 (20 %) und UCN 34 (24 %) konnten intrazellulär nach Phagozytose am wenigsten koloniebildende Einheiten nachgewiesen werden. Die Stämme BAA-2069, LMG 17956 und ATCC 43143 sowie der *S. aureus* Vergleichsstamm

ATCC 25923 wurden stärker durch Phagozytose in THP-1 Makrophagen aufgenommen (39–53 %).

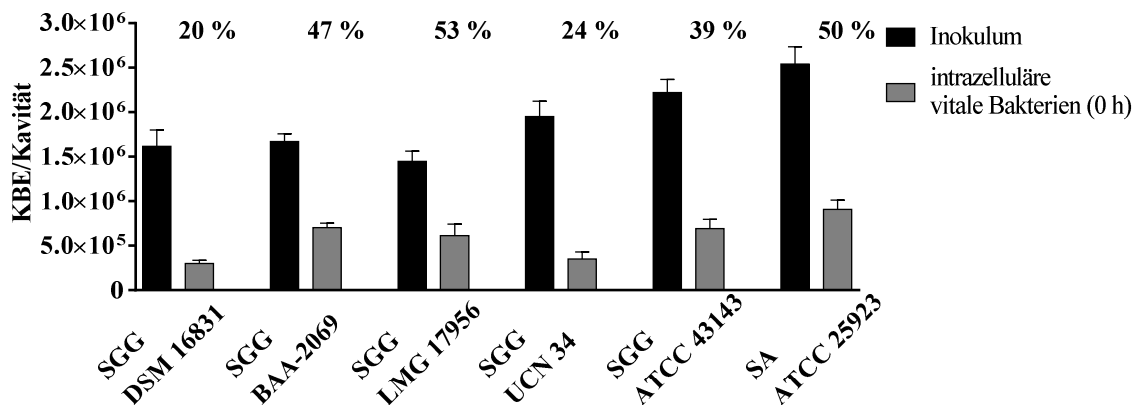
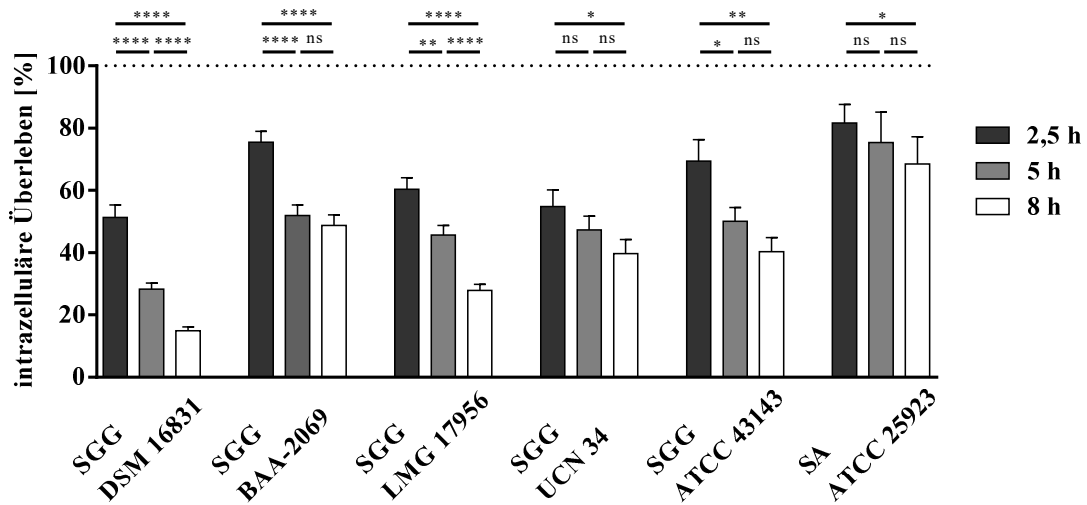


Abbildung 4.1: Phagozytoserate von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* durch THP-1 Makrophagen

In der Abbildung ist das zu den THP-1 Makrophagen hinzugegebene bakterielle Inokulum sowie der Anteil an phagozytierten Bakterien der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (SGG) Stämme DSM 16831, BAA-2069, LMG 17956, UCN 34 und ATCC 43143 im Vergleich zum *S. aureus* (SA) Stamm ATCC 25923 dargestellt. Angegeben ist der prozentuelle Anteil des Inokulums, der zum Zeitpunkt 0 h intrazellulär in den THP-1 Makrophagen ermittelt wurde. Es handelt sich jeweils um den Mittelwert mit Standardfehler (n = 4).

Die Überlebensrate von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen wurde in THP-1 Makrophagen über einen Zeitraum von 48 Stunden schon zuvor ermittelt (Grimm *et al.*, 2017c). In dieser Arbeit wurden die Mechanismen der THP-1 Makrophagen in Bezug auf die Abwehr von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* analysiert. Dafür ist es ausreichend, das Überleben der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme innerhalb von acht Stunden nach Phagozytose zu betrachten, da in diesem Zeitraum die Phagozytose bis zur Reifung der Phagosomen abgebildet wird (Abbildung 4.2). Der Stamm DSM 16831 wird innerhalb von acht Stunden stärker durch THP-1 Makrophagen abgetötet als der Stamm UCN 34, obwohl ein gleich großer Anteil beider Stämme mittels Phagozytose aufgenommen wurde. Der Stamm UCN 34 wurde innerhalb von 2,5 Stunden nicht signifikant in den THP-1 Makrophagen abgetötet, was mit dem *S. aureus* Stamm ATCC 25923 vergleichbar ist. Beim Stamm BAA-2069 sowie beim Stamm ATCC 43143 stagnierte die intrazelluläre Anzahl an bakteriellen Zellen zwischen den Zeitpunkten fünf Stunden und acht Stunden. Der Titer aller Stämme wurde jedoch kontinuierlich innerhalb von acht Stunden in den THP-1 Makrophagen verringert. Von den zwei Tierisolaten DSM 16831 und LMG 17956 wurden nach acht Stunden am wenigsten vitale bakterielle Zellen ermittelt (15–28 % vom anfänglichen intrazellulären Titer (0 h)). Von den humanen Isolaten BAA-2069, UCN 34 und ATCC 43143 lagen nach acht Stunden mindestens

noch 40 % des Anfangstiters intrazellulär vor und damit signifikant mehr als vom Stamm DSM 16831.



2,5 h:

p<0,05:

DSM 16831 vs ATCC 4313

ATCC 43143 vs SA

p<0,005:

BAA-2069 vs LMG 17956

BAA-2069 vs UCN 34

LMG 17956 vs SA

UCN 34 vs SA

p<0,0005:

DSM 16831 vs SA

p<0,0001:

DSM 16831 vs BAA-2069

5 h:

p<0,05:

LMG 17956 vs SA

UCN 34 vs SA

ATCC 43143 vs SA

p<0,0005:

DSM 16831 vs UCN 34

DSM 16831 vs ATCC 43143

p<0,0001:

DSM 16831 vs BAA-2069

DSM 16831 vs LMG 17956

DSM 16831 vs SA

8 h:

p<0,05:

LMG 17956 vs ATCC 43143

p<0,0005:

UCN 34 vs SA

ATCC 43143 vs SA

p<0,0005:

DSM 16831 vs ATCC 43143

p<0,0001:

DSM 16831 vs BAA-2069

DSM 16831 vs LMG 17956

DSM 16831 vs UCN 34

DSM 16831 vs SA

BAA-2069 vs LMG 17956

LMG 17956 vs SA

Abbildung 4.2: Überlebensrate von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in THP-1 Makrophagen

In der Abbildung ist das intrazelluläre Überleben der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (SGG) Stämme DSM 16831, BAA-2069, LMG 17956, UCN 34 und ATCC 43143 im Vergleich zum *S. aureus* (SA) Stamm ATCC 25923 nach 2,5 h, 5 h und 8 h Inkubation dargestellt. Die Anzahl der aufgenommenen Bakterien zum Zeitpunkt 0 h (Phagozytoserate) wurde als 100 % (gestrichelte Linie) definiert. Angegeben ist jeweils der Mittelwert mit Standardfehler (n = 4). Die Signifikanz kennzeichnet die Unterschiede zwischen zwei Werten (Mann Whitney U-test: *: p<0,05; **: p<0,005; ***: p<0,0005; ****: p<0,0001).

4.1.1 Fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in THP-1 Makrophagen

Die Lokalisierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nach Phagozytose von THP-1 Makrophagen wurde mikroskopisch ermittelt. Zum einen konnte damit erfasst werden, ob die Bakterien intra- oder extrazellulär vorliegen und zum anderen, ob sie nach der Phagozytose in sauren Zellorganellen, wie zum Beispiel in Phagolysosomen, lokalisiert sind. Dabei konnte zwischen vitalen und toten Zellen nicht unterschieden werden. Die Bakterien wurden vor der

Phagozytose mit FITC (grün-fluoreszierend) gelabelt, saure Organellen wurden mit Lysotracker Red DND-99 (rot-fluoreszierend) markiert (Abbildung 4.3) und extrazelluläre Bakterien wurden, zusätzlich zur FITC-Markierung, mit AlexaFluor 546 (rot-fluoreszierend) gelabelt (Abbildung 4.4).

4.1.1.1 Unterscheidung zwischen intra- und extrazellulär vorliegenden Bakterien

Es wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert, ob die phagozytierten Bakterien intra- oder extrazellulär vorliegen. Dadurch konnte untersucht werden, ob sie den Phagozyten entkommen können. Abbildung 4.3 zeigt Ausschnitte mikroskopischer Aufnahmen, die die Lokalisation der einzelnen Stämme widerspiegeln. Es konnte beobachtet werden, dass alle untersuchten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme zumeist intrazellulär vorlagen, während der *S. aureus* Stamm ATCC 25923 extrazellulär lokalisiert war (Abbildung 4.3). Dazu wurden die bakteriellen Zellen sowie die Makrophagen (Hellfeld; nicht gezeigt) ausgezählt, um neben dem Vitalitätsassay (Kapitel 4.1) auch abgetötete Bakterien in die Phagozytoserate mit einbeziehen zu können. Das Ergebnis der Auszählung ist in der Tabelle 4.1 aufgelistet. Die meisten bakteriellen Zellen pro Makrophage wurden für die Stämme BAA-2069 und LMG 17956 nachgewiesen. Dabei waren nur wenige bakterielle Zellen der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme außerhalb der THP-1 Makrophagen lokalisiert. Diese Ergebnisse sind vergleichbar zu den Ergebnissen der Phagozytoserate, die durch Ausplattieren ermittelt wurden. Die wenigsten Bakterienzellen wurden vom Stamm UCN 34 nachgewiesen. Von den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen DSM 16831, UCN 34 und ATCC 43143 konnten keine extrazellulären Bakterien ermittelt werden. Bakterielle Zellen des *S. aureus* Stammes ATCC 25923 lagen zum großen Teil extrazellulär vor.

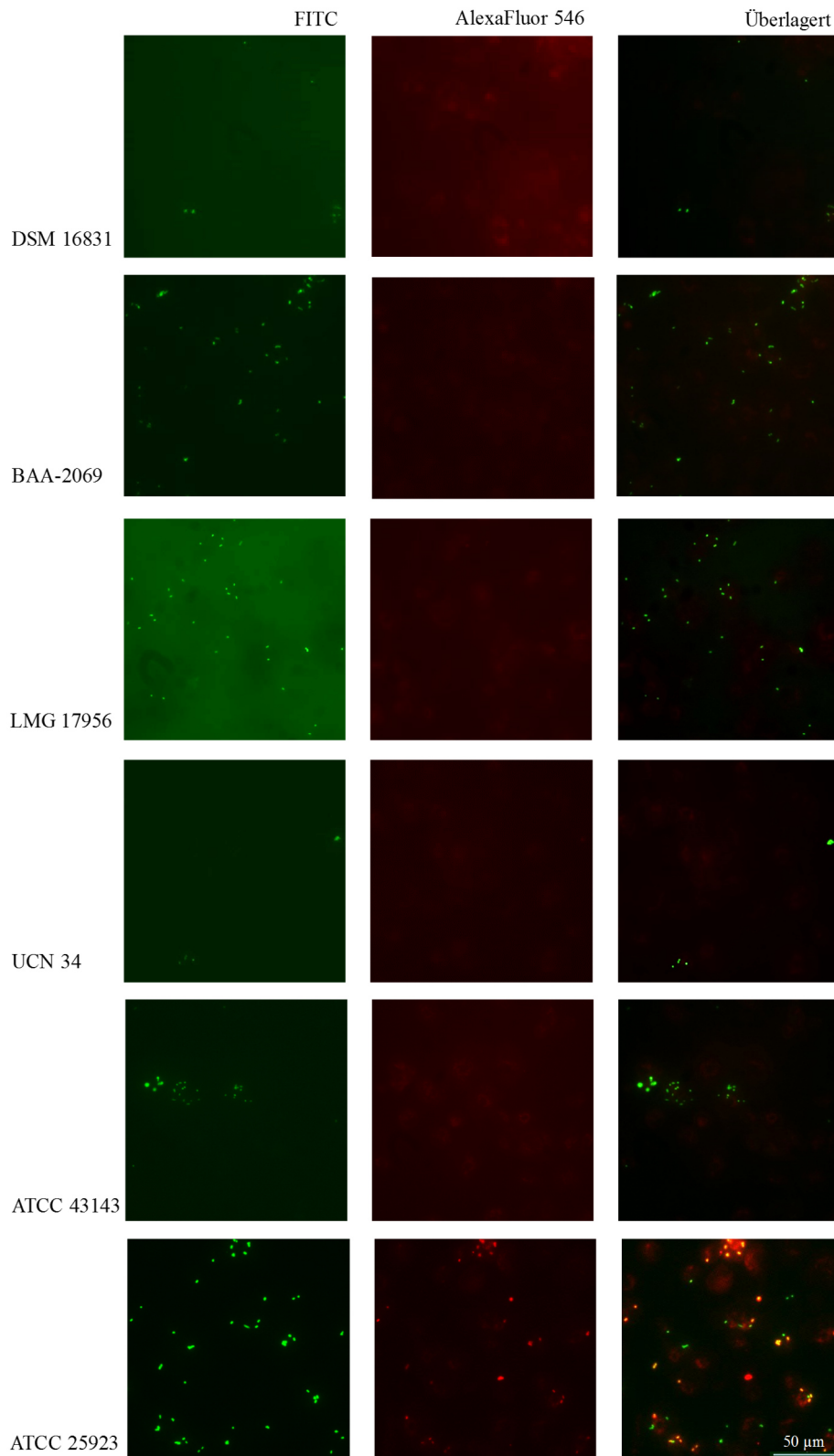


Abbildung 4.3: Fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von phagozytierten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen

Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen der mit FITC-markierten Bakterien (alle Bakterien; grün; links), der mit AlexaFluor 546-markierten extrazellulären Bakterien (rot; Mitte) und der jeweiligen beiden übereinandergelegten Bilder (rechts). Die Aufnahme erfolgte mit 400-facher Vergrößerung.

Tabelle 4.1: Verhältnis zwischen der gesamten Bakterienanzahl (lebende und tote) zu den THP-1 Makrophagen. Ausgezählt wurden die fluoreszierenden Bakterien und die Makrophagen im Hellfeld (n = 100).

Lokalisation nach 1 h	Intrazelluläre Bakterien pro Makrophage	Extrazelluläre Bakterien pro Makrophage
SGG: DSM 16831	0,7	0
SGG: BAA-2069	1,3	0,03
SGG: LMG 17956	2,5	0,004
SGG: UCN 34	0,3	0
SGG: ATCC 43143	0,7	0
SA: ATCC 259223	0,6	0,8

4.1.1.2 Lokalisation von bakteriellen Zellen in THP-1 Makrophagen

Um Mikroorganismen vollständig degradieren zu können, werden Phagolysosomen durch ATPasen angesäuert. Diese können mittels Fluoreszenzfarbstoffen, wie zum Beispiel dem LysoTracker Red DND-99, gekennzeichnet werden, da der Farbstoff an eine schwache Base gekoppelt ist und in sauren Organellen akkumuliert. Die bakteriellen Zellen emittieren aufgrund der FITC-Markierung grünes Licht, während die sauren Organellen rotfluoreszierend sind. Repräsentative Ausschnitte der mikroskopischen Analyse sind in Abbildung 4.4 dargestellt.

Es wurde beobachtet, dass bakterielle Zellen der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme zu einem wesentlich geringeren Anteil in sauren Organellen lokalisiert waren als Zellen vom *S. aureus* Stamm ATCC 25923. Die Auszählung der bakteriellen Zellen in sauren Organellen, im Vergleich zu im Zytosol lokalisierten Bakterien, bestätigte diese Beobachtung. Die Ergebnisse der Auszählung sind in der Tabelle 4.2 aufgelistet.

Tabelle 4.2: Verhältnis zwischen in sauren Organellen lokalisierten Bakterien und im Zytosol lokalisierten Bakterien. Die Bakterien wurden in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ausgezählt (n = 100).

Lokalisation nach 1 h	$\frac{\text{Anzahl in Phagolysosomen lokalisierter Bakterien}}{\text{Anzahl im Zytosol lokalisierter Bakterien}}$
SGG: DSM 16831	0,16
SGG: BAA-2069	0,12
SGG: LMG 17956	0,05
SGG: UCN 34	0,07
SGG: ATCC 43143	0,05
SA: ATCC 259223	0,53

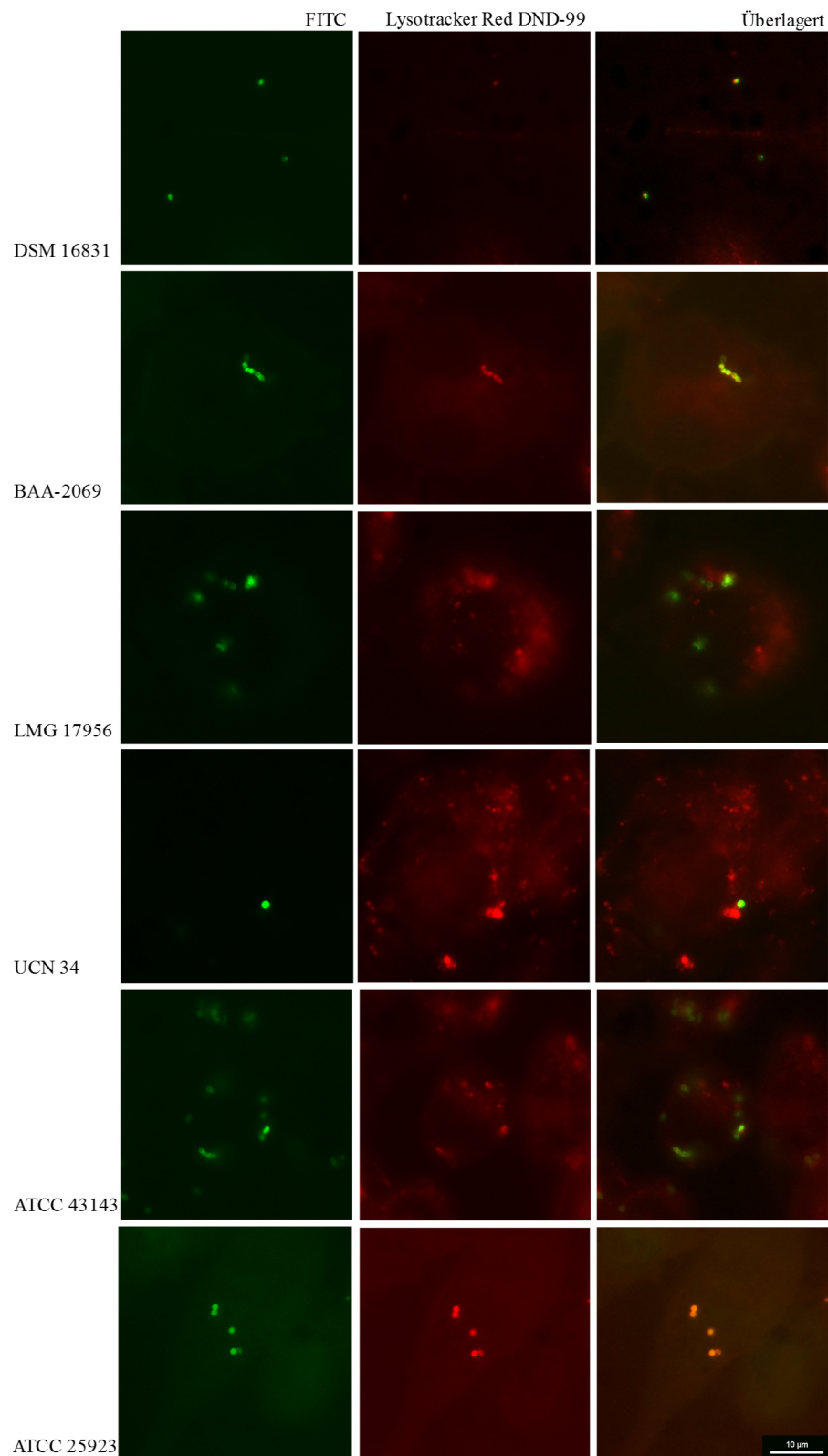
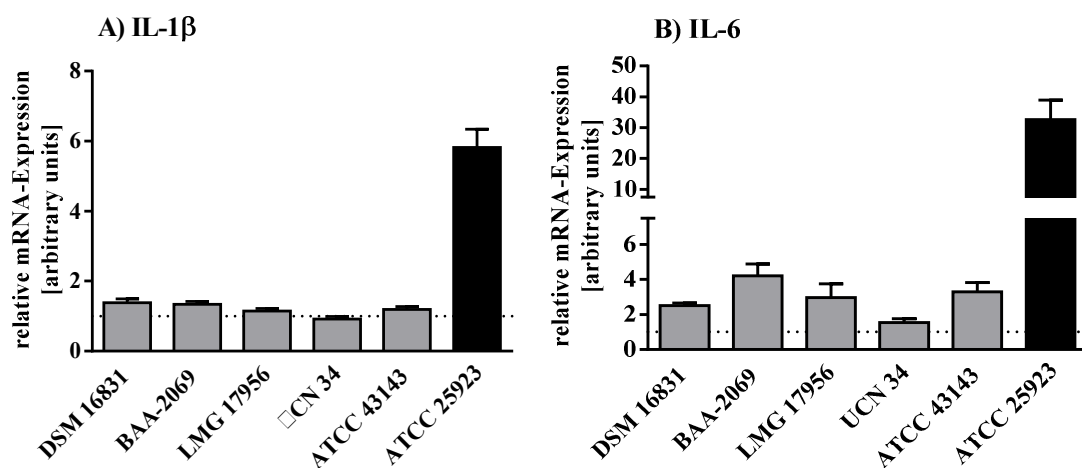


Abbildung 4.4: Fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen nach Phagozytose von THP-1 Makrophagen

Zu sehen sind Fluoreszenzaufnahmen der mit FITC-markierten Bakterien (alle Bakterien; grün; links), und der Lysotracker Red DND-99-markierten sauren Organellen (rot; Mitte). Rechts ist die Übereinanderlagerung beider Bilder dargestellt. Kolokalisation von FITC und Lysotracker Red DND-99 sind in orange-gelb abgebildet. Die Aufnahmen erfolgten mit 1.000-facher Vergrößerung.

4.1.2 Zytokin-Genexpression in THP-1 Makrophagen nach Phagozytose von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

Die Immunantwort der THP-1 Makrophagen nach Phagozytose von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen sowie dem *S. aureus* Referenzstamm wurde nach fünf Stunden Inkubation auf mRNA-Ebene untersucht. Hierfür wurde die Genexpression der Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-8 sowie des Rezeptors TLR-2 im Vergleich mit der Kontrolle ohne bakterielle Stimulation mittels *Real-time* PCR verglichen. Die Ergebnisse der *Real-time* PCR sind in der Abbildung 4.5A-B sowie in der Abbildung 4.6A-B dargestellt. Das Zytokin IL-1 β zählt zu den ersten sekretierten Zytokinen einer Immunantwort. Die Genexpression dieses Zytokins wurde nur marginal nach Phagozytose von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen erhöht (1,1–1,4-fach). Der Stamm UCN 34 konnte auch nach fünf Stunden in THP-1 Makrophagen keine Erhöhung der Genexpression von IL-1 β induzieren (0,9-fach). Im Gegensatz dazu führte die



IL-1 β Genexpression:

$p < 0.05$:

DSM 16831 vs UCN 34

BAA-2069 vs UCN 34

$p < 0.0001$:

DSM 16831 vs SA

BAA-2069 vs SA

LMG 17956 vs SA

UCN 34 vs SA

ATCC 43143 vs SA

IL-6 Genexpression:

$p < 0.005$

DSM 16831 vs UCN 34

BAA-2069 vs UCN 34

$p < 0.0001$:

DSM 16831 vs SA

BAA-2069 vs SA

LMG 17956 vs SA

UCN 34 vs SA

ATCC 43143 vs SA

Abbildung 4.5: Relative mRNA-Expression der Zytokine IL-1 β und IL-6 in THP-1 Makrophagen nach Phagozytose von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen

Dargestellt sind die Expressionen der Gene A) Interleukin 1 β (IL-1 β) und B) Interleukin 6 (IL-6) von THP-1 Makrophagen nach Stimulation mit den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen (grau) DSM 16831, BAA-2069, LMG 17956, UCN 34 und ATCC 43143 sowie dem *S. aureus* (SA) Stamm ATCC 25923 (schwarz) im Vergleich zur Kontrolle ohne Bakterien nach fünfstündiger Inkubation. Die Balken stellen den Mittelwert mit Standardfehler dar (n = 3). Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Genexpression un behandelter Zellen, die gleich eins gesetzt wurde. Die Signifikanz zwischen den einzelnen Werten wurde mit dem Mann Whitney U-test berechnet.

Inkubation von THP-1 Makrophagen mit ATCC 25923 (*S. aureus*) zu einer deutlich erhöhten Genexpression von IL-1 β (5,8-fach).

Ähnliche Muster in der Genexpression wurden auch für die Zytokine IL-6 und IL-8 beobachtet (Abbildung 4.5B und Abbildung 4.6A). Dabei wurde die Genexpression von IL-6 fünf Stunden nach Phagozytose am stärksten reguliert. Der Stamm UCN 34 (1,5-fach) verursachte die geringste Erhöhung der Genexpression von IL-8 in THP-1 Makrophagen. Eine 3–4-fache Genexpressionserhöhung wurde nach fünfstündiger Inkubation mit den Stämmen BAA-2069, LMG 17956 und ATCC 43143 ermittelt. Der *S. aureus* Stamm ATCC 25923 führte auch bei diesem Zytokin zu einer wesentlich höheren Genexpression (33-fach im Vergleich zur Negativkontrolle). Die *Real-time* PCR-Analyse des Chemokins IL-8 zeigte in etwa die gleichen Genexpressionsunterschiede wie beim Zytokin IL-1 β . Die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme führten zu einer Erhöhung der Genexpression von maximal 1,5 (Stamm ATCC 43143), während der *S. aureus* Stamm zu einer 9,4-fachen Erhöhung der Genexpression führte.

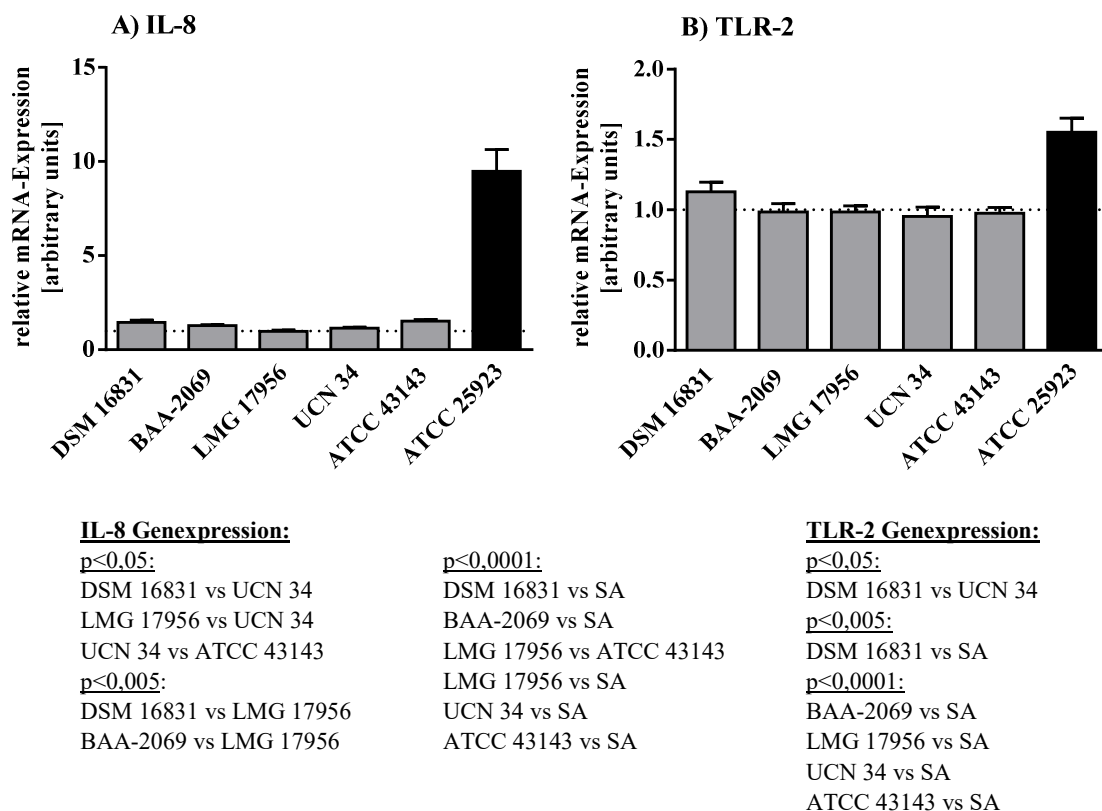


Abbildung 4.6: Relative mRNA-Expression des Chemokins IL-8 sowie des Rezeptors TLR-2 in THP-1 Makrophagen nach Phagozytose von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen

Dargestellt sind die Expressionen der Gene A) Interleukin 8 (IL-8) und B) *Toll-like*-Rezeptor 2 (TLR-2) in THP-1 Makrophagen nach Stimulation mit den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen (grau) DSM 16831, BAA-2069, LMG 17956, UCN 34 und ATCC 43143 sowie des *S. aureus* (SA) Stammes ATCC 25923 (schwarz) im Vergleich zur Expression in der Kontrolle ohne Bakterien nach fünfstündiger Inkubation. Die Balken stellen den Mittelwert mit Standardfehler dar (n = 3). Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Genexpression un behandelter Zellen, die gleich eins gesetzt wurde. Die Signifikanz zwischen den einzelnen Werten wurde mit dem Mann Whitney U-test berechnet.

Zusätzlich zu den Genexpressionen der Zytokine wurde auch die Genexpression vom *Toll-like* Rezeptor TLR-2 untersucht (Abbildung 4.6B). Dieser Rezeptor erkennt verschiedene Bestandteile von Mikroorganismen, wie beispielsweise Peptidoglykan. Die Phagozytose von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen führte jedoch zu keiner Genexpressionserhöhung des TLR-2 Rezeptors. Nur bei der Stimulation mit dem *S. aureus* Stamm ATCC 25923 konnte eine geringe Erhöhung der Genexpression (1,5-fach) festgestellt werden.

4.1.3 Untersuchung des oxidativen Bursts und der Makrophagen-Lyse nach Phagozytose verschiedener *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme

Eine der ersten Reaktionen von Makrophagen auf Pathogene ist der oxidative Burst, der durch die NADH Oxidase katalysiert wird und zu einer Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies führt. Am Ende einer Phagozytose gehen Makrophagen teilweise in Apoptose, können aber durch pathogene Erreger auch aktiv lysiert werden. Der oxidative Burst wurde mit Hilfe eines DCFH-DA Assays und die Zytotoxizität von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* mittels eines LDH Assays untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 4.7 dargestellt.

Die Abbildung 4.7A zeigt die prozentuale Anzahl lysierter THP-1 Makrophagen nach Inkubation mit verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen. Die Inkubation mit den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen DSM 16831, LMG 17956 und UCN 34 führte zu einer durchschnittlich 18 %-igen Lyse der THP-1 Makrophagen im Vergleich zur Positivkontrolle (100 %-ige Lyse der THP-1 Makrophagen). Insgesamt wurden 22–25 % der THP-1 Makrophagen durch die Stämme BAA-2069 und ATCC 43143 lysiert. Eine signifikant höhere Rate an lysierten Zellen verursachte der *S. aureus* Stamm ATCC 25923 im Vergleich zu den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen DSM 16831 und LMG 17956.

Die Stärke des oxidativen Bursts wurde durch die Fluoreszenzsignalstärke von DCF ermittelt. In der Abbildung 4.7B sind die Emissionswerte bei $\lambda = 488$ nm nach Stimulation mit verschiedenen Bakterienstämmen und H_2O_2 als Positivkontrolle dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme und auch der *S. aureus* Stamm ATCC 25923 zu ungefähr gleich starken Fluoreszenzsignalen und damit zu einer gleich starken Konzentration an intrazellulären, reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies führten. Im Vergleich zur Positivkontrolle (Zugabe von H_2O_2) stimulieren die Bakterienstämme den oxidativen Burst in THP-1 Makrophagen signifikant stärker ($p < 0,005$). Neben der Stimulation des oxidativen Bursts durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wird das Wachstum des Bakteriums in Gegenwart von H_2O_2 untersucht (siehe Kapitel 4.4.2).

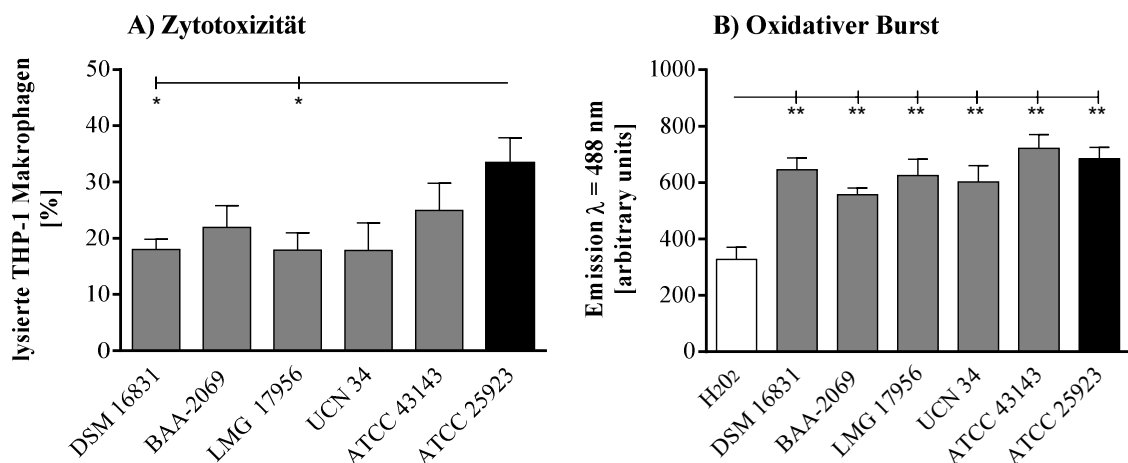


Abbildung 4.7: Anzahl der lysierten THP-1 Makrophagen und relative Konzentration reaktiver Sauerstoffradikale

A) Dargestellt ist der prozentuale Anteil von lysierten THP-1 Makrophagen nach fünfstündiger Inkubation mit den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen DSM 16831, BAA-2069, LMG 17956, UCN 34 und ATCC 43143 im Vergleich zum *S. aureus* Stamm ATCC 25923. Die Werte wurden im Verhältnis zur kompletten Lyse aller Makrophagen mittels Lysis-Puffer (100 %) gesetzt.

B) Ermittlung der Konzentration intrazellulärer reaktiver Sauerstoffradikale in THP-1 Makrophagen nach Inkubation mit verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen und einem *S. aureus* Stamm (ATCC 25923) sowie 1 mM H₂O₂ mittels des Fluoreszenzfarbstoffs DCFH-DA zum Zeitpunkt 0 h. Dargestellt ist die Emission bei $\lambda = 488$ nm. Angegeben ist der Mittelwert mit Standardfehler (n = 3). Die Signifikanzen zwischen den einzelnen Werten wurden mit dem Mann Whitney U-test berechnet (*: p<0,05; **: p<0,005).

4.2 Phagozytose von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* durch primäre Makrophagen

Die THP-1 Makrophagen Zelllinie wurde bislang zur Untersuchung stammabhängiger Phänotypen der Phagozytose verwendet. Allerdings haben nicht nur einzelne *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme einen Einfluss auf die Phagozytose, sondern auch wirtsspezifische Faktoren. Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit Monozyten aus drei verschiedenen Probanden isoliert und *ex vivo* mittels Makrophagenkolonien-stimulierender Faktoren (M-CSF) und Interferon- γ (IFN- γ) zu M1-Makrophagen differenziert.

Die Phagozytoserate (0 h) von drei verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen durch Makrophagen von drei verschiedenen freiwilligen Probanden ist in der Abbildung 4.8 dargestellt. Abhängig vom eingesetzten Bakterienstamm wurden 7–18 % des zugegebenen Inokulums (MOI = 5) von den primären Makrophagen phagozytiert (0 h; Phagozytoserate bei THP-1 Makrophagen: 20–47 %). Dabei wurde gezeigt, dass der intrazelluläre Titer in allen primären Makrophagen ungefähr gleich war. Bei den Makrophagen der Probanden 1 und 3 wurden ca. 7 % des zugegebenen Inokulums der Stämme DSM 16831 und BAA-2069 sowie 13 % des zugegebenen Inokulums des Stammes UCN 34 nachgewiesen. Im Vergleich dazu wurden im Proband 2 marginal höhere Phagozytoseraten nachgewiesen (DSM 16831: 9 %;

BAA-2069: 17 %; UCN 34: 17 %). Damit wurden die Bakterien marginal stärker durch die Makrophagen des Probanden 2 phagozytiert als durch die Makrophagen der anderen Probanden. Im Mittel war die höchste Phagozytoserate beim Stamm UCN 34 und die geringste beim Stamm DSM 16831 nachweisbar.

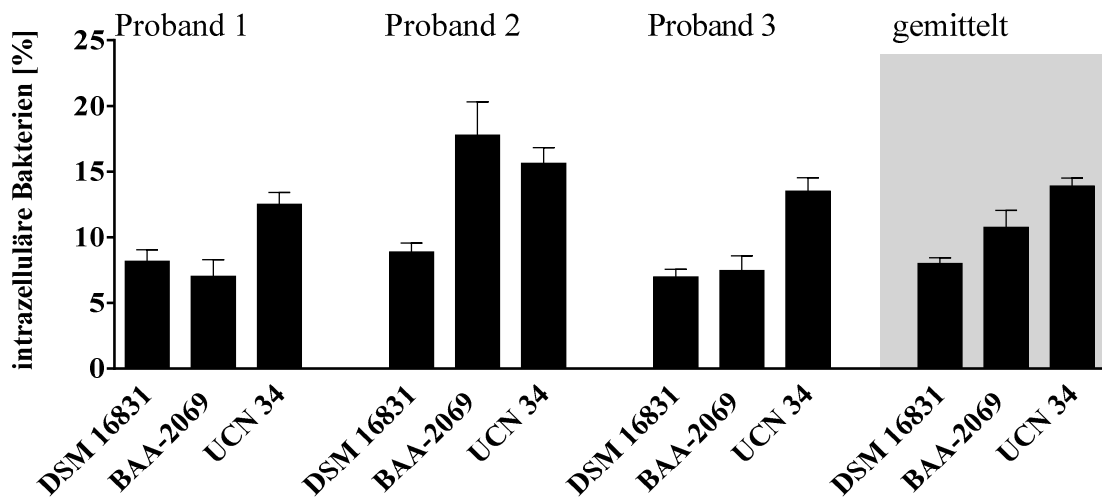


Abbildung 4.8: Prozentualer Anteil des durch primäre Makrophagen phagozytierten zugegebenen Inokulums verschiedener *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme

Abgebildet ist der Anteil an phagozytierten Bakterien der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme DSM 16831, BAA-2069 und UCN 34. Angegeben ist der prozentuelle Anteil des Inokulums, der zum Zeitpunkt 0 h intrazellulär in den primären Makrophagen von drei verschiedenen Probanden vorlag. Zudem ist die gemittelte prozentuale Anzahl phagozytierter Bakterien in den primären Makrophagen der verschiedenen Probanden (grau hinterlegt) angegeben.

4.2.1 Überlebensrate verschiedener *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme in primären Makrophagen

Zusätzlich zur Phagozytoserate wurde die Überlebensfähigkeit der drei *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme DSM 16831, BAA-2069 und UCN 34 in primären Makrophagen nach fünf Stunden und 24 Stunden untersucht (Abbildung 4.9). Nach fünfstündiger Inkubation konnten nur 0,03–0,4 % des initialen intrazellulären Titors (0 h; Kapitel 4.2) nachgewiesen werden. Dabei unterschied sich die Überlebensrate der einzelnen Stämme in den primären Makrophagen nur marginal. In Makrophagen des Probanden 1 konnte die höchste prozentuale Überlebensrate nachgewiesen werden (0,17–0,41 %), während die wenigsten vitalen Bakterien in den Makrophagen des Probanden 2 ermittelt wurden (0,03–0,18 %). Nach 24 Stunden Inkubation konnten zu einem geringeren Anteil intrazelluläre Bakterien nachgewiesen werden (0,008–0,17 %). In den Makrophagen des Probanden 2 wurden 0,025 % des Anfangstiters nachgewiesen und bis zu 0,17 % in den Makrophagen des Probanden 3.

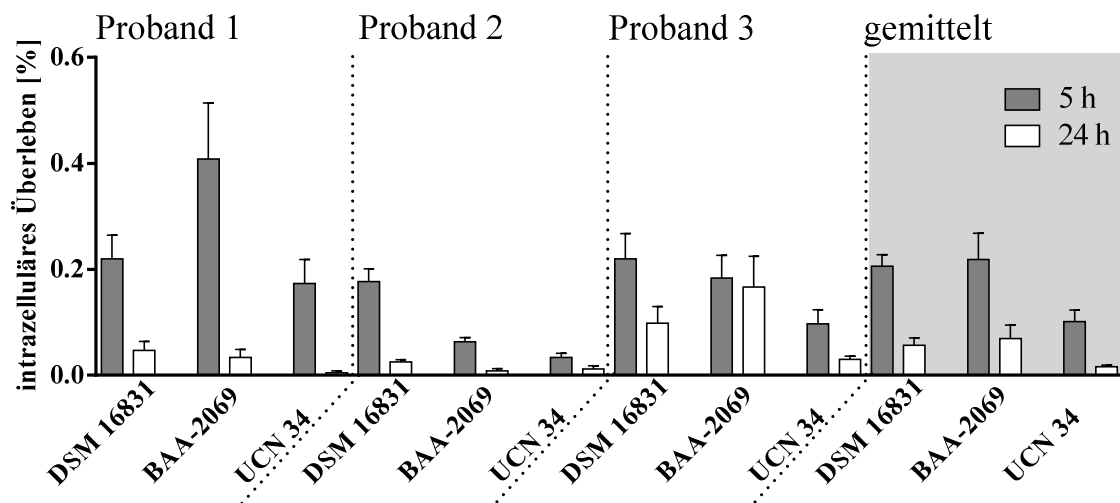


Abbildung 4.9: Überlebensrate verschiedener *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme in primären Makrophagen

In der Abbildung ist der Anteil überlebender *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme DSM 16831, BAA-2069, und UCN 34 zu den Zeitpunkten 5 h und 24 h dargestellt. Angegeben ist der prozentuelle Anteil des intrazellulären bakteriellen Titters zum Zeitpunkt 0 h (100 %) in den primären Makrophagen dreier Probanden. Außerdem ist die prozentuale intrazelluläre Bakterienanzahl in den primären Makrophagen verschiedener Probanden gemittelt dargestellt (grau hinterlegt). Angegeben ist der Mittelwert mit Standardfehler (n = 2).

4.2.2 IL-6 Sekretion primärer Makrophagen nach Inkubation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

Neben der Phagozytoserate und dem intrazellulären Überleben von den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in primären Makrophagen von drei freiwilligen Probanden wurde auch die IL-6 Konzentration im Zellkulturüberstand nach fünfstündiger und 24-stündiger Inkubation ermittelt (Abbildung 4.10). Die Konzentration von IL-6 in den Negativkontrollen ohne bakterielle Stimulation lag im Überstand der Makrophagen der Probanden 1 und 2 mit 50–80 pg/ml etwas niedriger vor als bei Makrophagen des Probanden 3 (100–120 pg/ml). Nach fünfstündiger Inkubation im Anschluss an die Phagozytose wurde im Überstand der Makrophagen vom Probanden 1 die niedrigste IL-6 Konzentration (ca. 600 pg/ml) nachgewiesen. Die höchste Konzentration von IL-6 wurde im Überstand von Makrophagen des Probanden 3 (ca. 800 pg/ml) ermittelt. Nach 24-stündiger Inkubation konnten 860–900 pg/ml IL-6 in den Überständen der Makrophagen von den Probanden 1 und 3 nachgewiesen werden. Eine etwas geringere IL-6 Konzentration (um 800 pg/ml) wurde im Überstand der Makrophagen des Probanden 2 ermittelt. Im Vergleich dazu wurde auch die IL-6 Konzentration nach Phagozytose durch THP-1 Makrophagen analysiert. Die IL-6 Konzentration im Überstand dieser Makrophagen war sehr viel niedriger im Vergleich zu denen von primären Makrophagen. Nach fünfstündiger Inkubation konnte keine Erhöhung der IL-6 Konzentration im Überstand dieser

Zellen nach Stimulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden (20–22 pg/ml). Auch nach 24-stündiger Inkubation mit allen drei Stämmen lag die IL-6 Konzentration im Überstand nur marginal höher (32–50 pg/ml) als bei der Negativkontrolle (23 pg/ml) vor.

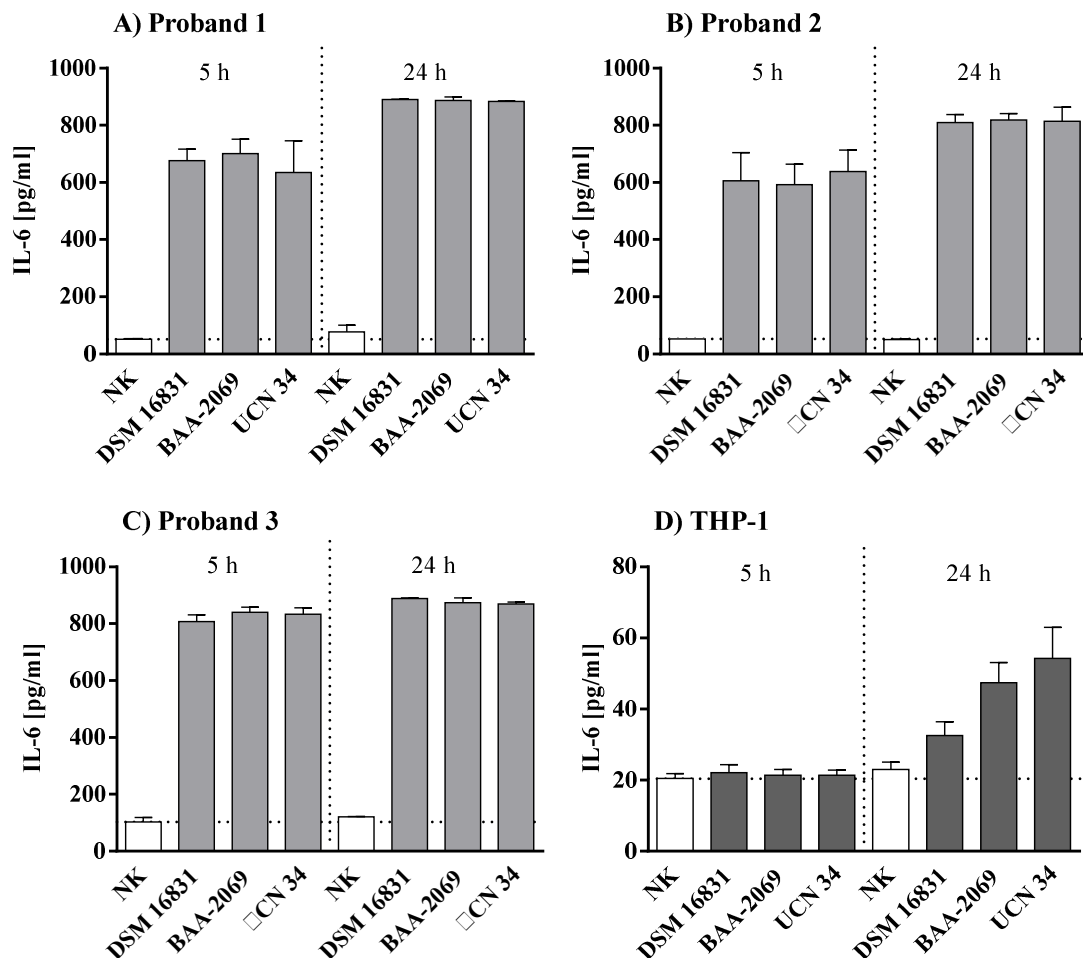


Abbildung 4.10: Interleukin-6 (IL-6)-Sekretion verschiedener Makrophagen nach Phagozytose von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen

In den Abbildungen A-D ist die Konzentration von IL-6 im Überstand verschiedener Makrophagen nach Phagozytose der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme DSM 16831, BAA-2069 und UCN 34 zu den Zeitpunkten 5 h und 24 h dargestellt. Einerseits ist die IL-6 Konzentration im Überstand von primären Makrophagen dreier Probanden (A-C) angegeben, andererseits die IL-6 Konzentration im Überstand von THP-1 Makrophagen (D). Angegeben ist der Mittelwert mit Standardfehler (n = 2). NK = Negativkontrolle.

4.3 Transkriptomanalyse von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nach Phagozytose durch THP-1 Makrophagen

Mithilfe eines Microarrays wurde die mRNA-Expression von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nach Phagozytose durch THP-1 Makrophagen ermittelt. Auf dem verwendeten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-spezifischen Microarray sind die Gene von vier *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Genomen in Form von 60-mer Oligonukleotiden repräsentiert. Für die

Transkriptomanalyse wurden die beiden *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme verwendet, die einen konstanten Titer in THP-1 Makrophagen aufwiesen (Grimm *et al.*, 2017c). Die Genexpression wurde zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Die erste Probennahme erfolgte direkt nach Zentrifugation der Kavitäten-Platte (-60 min), nachdem die bakteriellen Zellen an die Makrophagen adhäreren konnten. Der zweite Messzeitpunkt wurde nach initialer Phagozytose (0 h) durchgeführt. Die dritte Probennahme erfolgte nach fünfstündiger Inkubation, während die Bakterien in den Phagolysosomen vorlagen. Die Auswertung der Genexpression erfolgte ausschließlich im Vergleich zwischen den Werten vom -60 min- und 0 h-Zeitpunkt sowie zwischen dem -60 min- und 5 h-Zeitpunkt. Die regulierten Gene sind in den Tabellen 4.3–4.6 dargestellt. Die Auswertung des Microarrays zwischen den Proben vom 0 h- und 5 h-Zeitpunkt und dem -60 min- und 5h-Zeitpunkt ergaben tendenziell die gleichen Ergebnisse. Es wurde die Expression von gleichen, aber weniger Genen, reguliert. Daher werden nur die Ergebnisse der Auswertung zwischen den Proben vom -60min- und 5h-Zeitpunkt und vom -60 min- und 0h-Zeitpunkt tabellarisch dargestellt.

Die durch Phagozytose regulierten Genexpressionen des Stammes BAA-2069 sind in den Tabellen 4.3 und 4.4 aufgeführt. In Abbildung 4.11 ist die Anzahl der Gene, deren Expression reguliert wurde, nach Funktion sortiert dargestellt. Im Stamm BAA-2069 wurden direkt nach der Phagozytose durch THP-1 Makrophagen insgesamt sieben Gene stärker exprimiert, während die Expression eines Gens geringer war. Ein Großteil dieser Gene gehören entweder dem Kohlenhydrat-Metabolismus an, sind Bestandteile von Transportsystemen oder sind Transkriptionsfaktoren. Im Vergleich zum -60 min-Transkriptom sind die Expressionen von 63 Genen im Stamm BAA-2069 nach fünfstündiger Inkubation in Makrophagen reguliert. 36 dieser Gene wurden stärker und 27 Gene geringer exprimiert. Insbesondere Gene, die mit dem Kohlenhydrat-Metabolismus assoziiert sind, wie zum Beispiel dem Glykogen (*glg*) Operon, wurden stärker exprimiert. Gene, deren Produkte am Transport von Kohlenhydraten beteiligt sind, wie zum Beispiel Gene die dem Phosphotransferasesystem (PTS) angehören, wurden ebenfalls stärker exprimiert. Zusätzlich wurde die Expression der Gene des *dlt* Operons erhöht, dessen Produkte die *D*-Alanylierung von Teichonsäuren bewirken. Gene, deren Expression durch Phagozytose herunterreguliert wurde, kodieren für Proteine unterschiedlicher Funktion. Einige sind am Kohlenhydrat-Metabolismus (zum Beispiel Citrat-Zyklus) und an Transportprozessen von Aminosäuren beteiligt. Zusätzlich wurde das Gen *prsA1* geringer exprimiert, dessen Produkt an der Zellwandmodifikation beteiligt ist. Andere Genprodukte, deren Expressionen verringert waren, sind am RNA-Metabolismus beteiligt, wie zum Beispiel die DEAD box Helikase, deren Funktion das Entwinden von Nukleinsäuren oder Genprodukten ist.

Tabelle 4.3: Erhöhte Genexpression, bezogen auf den -60 min-Wert im Stamm BAA-2069 während der Phagozytose in THP-1 Makrophagen (n = 3; n. r. = nicht reguliert; - = nicht relevant).

BAA-2069: Erhöhte Genexpression			log2Ratio		p-Wert		n-fach	
Funktion	Gen	Produkt	0 h	5 h	0 h	5 h	0 h	5 h
Kohlenhydrat-Metabolismus	<i>lacC</i>	tagatose 6-phosphate kinase	1,07	n. r.	0,02	-	2,10	n. r.
	<i>pflB</i>	formate acetyltransferase	n. r.	1,19	-	0,04	n. r.	2,28
	<i>malM</i>	4-alpha-glucanotransferase	n. r.	1,34	-	0,004	n. r.	2,53
	<i>treA</i>	trehalose-6-phosphate hydrolase	n. r.	1,37	-	0,03	n. r.	2,58
	<i>SGGBAA2069_c06730</i>	putative CoA-substrate-specific enzyme activase	n. r.	1,51	-	0,01	n. r.	2,85
	<i>glgP</i>	starch phosphorylase	n. r.	1,55	-	0,003	n. r.	2,93
	<i>glgC</i>	glucose-1-phosphate adenylyltransferase	n. r.	1,72	-	0,02	n. r.	3,29
	<i>nagA</i>	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	n. r.	1,74	-	0,02	n. r.	3,34
	<i>glgD</i>	glucose-1-phosphate adenylyltransferase	n. r.	1,85	-	0,01	n. r.	3,61
	<i>glgB</i>	glycogen branching protein	n. r.	2,1	-	0,05	n. r.	4,29
Transportsystem	<i>malF</i>	maltodextrin transport system permease malF	n. r.	1,05	-	0,04	n. r.	2,07
	<i>atpC</i>	F0F1 ATP synthase subunit epsilon	n. r.	1,37	-	0,02	n. r.	2,58
	<i>fatA</i>	iron complex transport system ATP-binding protein	n. r.	1,61	-	0,05	n. r.	3,05
	<i>msmK</i>	Multiple sugar-binding transport ATP-binding protein	n. r.	2,13	-	0,04	n. r.	4,38
	<i>mtsC</i>	metal cation ABC transporter membrane protein	n. r.	1,92	-	0,05	n. r.	3,78
	<i>manN</i>	PTS system mannose-specific transporter subunit IID	n. r.	2,19	-	0,05	n. r.	4,56
	<i>manL</i>	PTS system mannose-specific transporter subunit IIA	n. r.	2,21	-	0,05	n. r.	4,63
	<i>adcA</i>	Zinc-binding protein adcA	n. r.	2,23	-	0,05	n. r.	4,69
	<i>manM</i>	PTS system mannose-specific transporter subunit IIC	n. r.	2,32	-	0,03	n. r.	4,99
	<i>treB</i>	PTS system trehalose-specific transporter subunit IIA	n. r.	2,59	-	0,01	n. r.	6,02
<i>SGGBAA2069_c02000</i>	PTS system galactitol-specific transporter subunit IIB	1,18	n. r.	0,01	-	2,27	n. r.	
Transkriptionsfaktor	<i>SGGBAA2069_c18600</i>	putative transcriptional regulator	1,53	1,2	0,03	0,05	2,89	2,30
	<i>SGGBAA2069_c7250</i>	LacI family transcriptional regulator	n. r.	1,52	-	0,02	n. r.	2,87
	<i>SGGBAA2069_c10720</i>	transcriptional regulator	1,03	n. r.	0,03	-	2,04	n. r.
Lipid-Biosynthese	<i>fabD</i>	malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	n. r.	1,41	-	0,02	n. r.	2,66
	<i>accD</i>	acetyl-CoA carboxylase subunit alpha	n. r.	1,77	-	0,04	n. r.	3,41
Anaerobe Toleranz	<i>nrdD</i>	anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase	n. r.	1,5	-	0,04	n. r.	2,83
	<i>adhE</i>	acetaldehyde dehydrogenase	n. r.	2,08	-	0,01	n. r.	4,23
Zellwand/-form Modifikation	<i>SGGBAA2069_c13580</i>	autolysin	n. r.	1,55	-	0,003	n. r.	2,93
	<i>lss</i>	N-acetylmuramidase/lysin	n. r.	2,25	-	0,01	n. r.	4,76
	<i>dltA</i>	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 1	n. r.	3,8	-	0,04	n. r.	13,93
	<i>dltD</i>	D-alanine extramembranal transfer protein	n. r.	3,03	-	0,04	n. r.	8,17
	<i>dltC</i>	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 2	n. r.	3,29	-	0,03	n. r.	9,78
	<i>dltB</i>	D-alanine transfer protein DltB	n. r.	3,56	-	0,03	n. r.	11,79
NTP Synthese	<i>ndk</i>	nucleoside diphosphate kinase	1	n. r.	0,03	-	2,00	n. r.
Translation	<i>rpsU</i>	30S ribosomal protein S21	1,23	n. r.	0,04	-	2,35	n. r.
Transposase	<i>SGGBAA2069_c02540</i>	transposase OrfB	1,76	n. r.	0,05	-	3,39	n. r.
Unbekannte Funktion	<i>SGGBAA2069_c21480</i>	conserved hypothetical protein	n. r.	1,21	-	0,002	n. r.	2,31
	<i>SGGBAA2069_c19440</i>	putative secreted protein	n. r.	1,22	-	0,02	n. r.	2,33

BAA-2069: Erhöhte Genexpression			log2Ratio		p-Wert		n-fach	
Funktion	Gen	Produkt	0 h	5 h	0 h	5 h	0 h	5 h
	<i>SGGBAA2069_C20110</i>	hypothetical protein	n. r.	2,3	-	0,04	n. r.	4,92
	<i>SGGBAA2069_c01150</i>	predicted membrane protein	n. r.	2,92	-	0,04	n. r.	7,57
	<i>yjbF</i>	SNARE-like family protein	n. r.	1,42	-	0,02	n. r.	2,68

Tabelle 4.4: Verringerte Genexpression, bezogen auf den -60 min-Wert, im Stamm BAA-2069 während der Phagozytose in THP-1 Makrophagen (n = 3; n. r. = nicht reguliert; - = nicht relevant).

BAA-2069: Verringerte Genexpression			log2Ratio		p-Wert		n-fach	
Funktion	Gen	Produkt	0 h	5 h	0 h	5 h	0 h	5 h
Transkriptionsfaktor	<i>SGGBAA2069_c22710</i>	MarR family transcriptional regulator	n. r.	-2,51	-	0,03	n. r.	0,18
	<i>SGGBAA2069_c18000</i>	BadM/Rrf2 family transcriptional regulator	n. r.	-1,27	-	0,03	n. r.	0,41
Transportsystem	<i>SGGBAA2069_c04070</i>	polar amino acid transport system substrate-binding protein	n. r.	-2,46	-	0,05	n. r.	0,18
	<i>SGGBAA2069_c04080</i>	amino acid ABC transporter membrane protein	n. r.	-1,83	-	0,05	n. r.	0,28
RNA Bindung	<i>deaD</i>	DEAD/DEAH box helicase	n. r.	-2,33	-	0,05	n. r.	0,20
	<i>obgE</i>	GTP-binding protein, GTP1/Obg family	n. r.	-1,76	-	0,04	n. r.	0,30
	<i>spoU</i>	RNA methyltransferase, TrmH family	n. r.	-1,16	-	0,03	n. r.	0,45
Kohlenhydrat-Metabolismus	<i>SGGBAA2069_c14130</i>	putative glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase	n. r.	-2,22	-	0,01	n. r.	0,21
	<i>SGGBAA2069_c20810</i>	carbonic anhydrase	n. r.	-1,45	-	0,03	n. r.	0,37
	<i>icd</i>	isocitrate dehydrogenase	n. r.	-1,23	-	0,03	n. r.	0,43
Zellwand/-form Modifikation	<i>prsA1</i>	Parvulin-like peptidyl-prolyl isomerase	n. r.	-1,75	-	0,03	n. r.	0,30
	<i>SGGBAA2069_c12330</i>	polysaccharide deacetylase	n. r.	-1,13	-	0,03	n. r.	0,46
	<i>mreC</i>	Rod shape-determining protein	n. r.	-1,08	-	0,03	n. r.	0,47
Aminosäure-Metabolismus	<i>hipO1</i>	aminoacylase/N-acyl-L-amino acid amidohydrolase/hippurate hydrolase	n. r.	-1,7	-	0,02	n. r.	0,31
	<i>lysA</i>	diaminopimelate decarboxylase	n. r.	-1,31	-	0,05	n. r.	0,40
Lipid-Biosynthese	<i>ysfG</i>	diacylglycerol kinase	n. r.	-1,32	-	0,03	n. r.	0,40
	<i>plsX</i>	glycerol-3-phosphate acyltransferase	n. r.	-1,27	-	0,02	n. r.	0,41
Zellteilung	<i>parB</i>	chromosome partitioning protein	n. r.	-1,17	-	0,05	n. r.	0,44
Signaltransduktion	<i>acpI</i>	protein-tyrosine phosphatase	n. r.	-1,09	-	0,04	n. r.	0,47
Elektronentransport	<i>yqiG</i>	NADH:flavin oxidoreductase	-1,28	n. r.	0,03	-	0,41	n. r.
	<i>nrdH</i>	glutaredoxin-like protein	n. r.	-1,34	-	0,04	n. r.	0,40
	<i>nrdE</i>	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	n. r.	-1,05	-	0,04	n. r.	0,48
Unbekannte Funktion	<i>SGGBAA2069_c04900</i>	ubiquitin-binding YukD-like protein	n. r.	-2,56	-	0,03	n. r.	0,17
	<i>SGGBAA2069_c04760</i>	lipoprotein	n. r.	-2,24	-	0,04	n. r.	0,21
	<i>yukB</i>	FtsK/SpoIIIE family protein	n. r.	-1,91	-	0,01	n. r.	0,27
	<i>SGGBAA2069_c17200</i>	hypothetical protein	n. r.	-1,82	-	0,05	n. r.	0,28
	<i>SGGBAA2069_c11130</i>	hypothetical protein	n. r.	-1,47	-	0,04	n. r.	0,36
	<i>SGGBAA2069_c00040</i>	hypothetical protein	n. r.	-1,39	-	0,03	n. r.	0,38

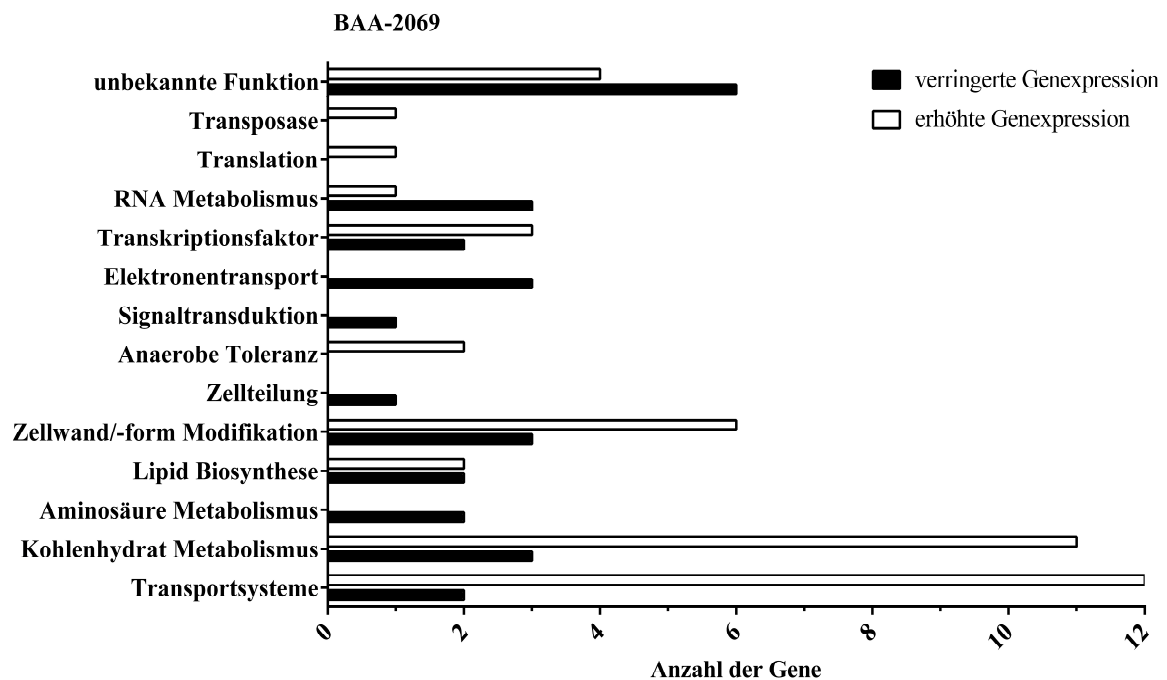


Abbildung 4.11: Regulierte Gene in der Phagozytose nach Funktionen sortiert

Dargestellt ist die nach Funktion sortierte Anzahl derjenigen Gene des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stammes BAA-2069, deren Expression, bezogen auf den -60 min-Wert, nach Phagozytose erhöht (weiß) oder verringert (schwarz) war.

In der Tabelle 4.5 und der Tabelle 4.6 sind die durch Phagozytose regulierten Genexpressionen des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stammes UCN 34 aufgelistet. Außerdem ist die Anzahl der Gene nach Funktionen sortiert in einem Balkendiagramm dargestellt (Abbildung 4.12). Direkt nach der Phagozytose durch THP-1 Makrophagen wurden die Expressionen von vier Genen im Stamm UCN 34 erhöht und von sieben Genen verringert. Erhöht wurden unter anderem die Expressionen zweier Gene, deren Produkte zum PTS Transportsystem gehören. Außerdem wurde die Expression des Gens *nox* hochreguliert, dessen Produkt die Wasserstoffperoxid (H_2O_2)-Reduktion katalysiert. Die Genexpression von *dapD* lag sowohl nach 0 h als auch nach 5 h verringert vor. Dieses Gen kodiert für ein Protein, das an der Lysin-Biosynthese beteiligt ist. Nach fünfstündiger Inkubation konnten außerdem herunterregulierte Expressionen von vier weiteren Genen detektiert werden. Die Produkte zweier dieser Gene sind am Aminosäure-Metabolismus beteiligt. Die Funktion der anderen beiden Gene, deren Expression herunterreguliert wurde, ist unbekannt. In der Abbildung 4.12 ist die Anzahl der Gene, deren Expression im Stamm UCN 34 reguliert wurden nach der Funktion der Proteine sortiert, für die sie kodieren.

Tabelle 4.5: Erhöhte Genexpression, bezogen auf den -60 min-Wert, im Stamm □CN 34 während der Phagozytose in THP-1 Makrophagen (n = 3; n. r. = nicht reguliert; - = nicht relevant).

□CN 34: Erhöhte Genexpression			log2Ratio		p-Wert		n-fach	
Funktion	Gen	Produkt	0 h	5 h	0 h	5 h	0 h	5 h
Transportsystem	<i>levA/ GALLO_0117</i>	PTS system N-acetylgalactosamine-specific transporter subunit IIA	2,2	n. r.	0,02	-	4,59	n. r.
	<i>GALLO_0118</i>	PTS system mannose-specific transporter subunit IIB	1,99	n. r.	0,02	-	3,97	n. r.
□nbekannte Funktion	<i>GALLO_2058</i>	hypothetical protein (CsbD-like protein)	1,44	n. r.	0,04	-	2,71	n. r.
Sauerstoff Toleranz	<i>nox</i>	NADH oxidase	1,4	n. r.	0,03	-	5,64	n. r.

Tabelle 4.6: Verringerte Genexpression, bezogen auf den -60 min-Wert, im Stamm □CN 34 während der Phagozytose in THP-1 Makrophagen (n = 3; n. r. = nicht reguliert; - = nicht relevant).

□CN 34: Geringere Genexpression			log2Ratio		p-Wert		n-fach	
Funktion	Gen	Produkt	0 h	5 h	0 h	5 h	0 h	5 h
Aminosäure Metabolismus	<i>dapD</i>	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-carboxylate N-succinyltransferase	-1,36	-1,97	0,02	0,03	0,39	0,26
	<i>asd</i>	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	n. r.	-1,03	-	0,01	n. r.	0,49
	<i>GALLO_0809</i>	GTP-binding protein	n. r.	-1,03	-	0,03	n. r.	0,49
	<i>ilvA</i>	threonine dehydratase	-1,54	n. r.	0,03	-	0,34	n. r.
□nbekannte Funktion	<i>GALLO_0901</i>	hypothetical protein	n. r.	-1,63	-	0,04	n. r.	0,32
	<i>GALLO_0814</i>	hypothetical protein	n. r.	-1,25	-	0,04	n. r.	0,42
	<i>GALLO_1321</i>	glutamate-rich protein GrpB	-1,39	n. r.	0,01	-	0,38	n. r.
Transportsystem	<i>GALLO_1556</i>	amino acid ABC transporter substrate-binding protein	-1,89	n. r.	0,03	-	0,27	n. r.
Zellwand/-form Modifikation	<i>GALLO_1358</i>	polyglycerol phosphate synthase	-1,76	n. r.	0,004	-	0,30	n. r.
	<i>gcaD</i>	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	-1,04	n. r.	0,01	-	0,49	n. r.
Kohlenhydrat Metabolismus	<i>drm</i>	phosphopentomutase	-1,02	n. r.	0,05	-	0,49	n. r.

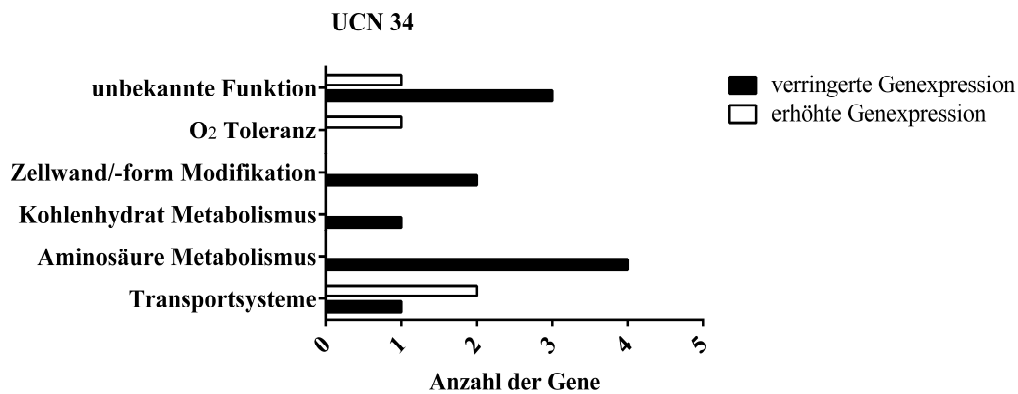


Abbildung 4.12: Regulierte Gene in der Phagozytose nach Funktionen sortiert

Dargestellt ist die nach Funktion sortierte Anzahl derjenigen Gene des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stammes UCN 34, deren Expression nach Phagozytose erhöht (weiß) oder verringert (schwarz) war.

4.3.1 Verifikation der Microarray-Analyse von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nach Phagozytose durch THP-1 Makrophagen mittels *Real-time* PCR

Um die Microarray-Analyse zu verifizieren wurde die relative quantitative *Real-time* PCR-Methode genutzt. Bei dieser wurde die Expression von 15 Kandidatengenen, die mittels Microarray-Analyse identifiziert wurden, in den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen BAA-2069 und UCN 34 zu den Zeitpunkten (0 h und 5 h) in Relation zum -60 min-Wert untersucht. Zu diesen Genen zählen solche, deren Expression durch die Phagozytose stark reguliert wurde oder deren Produkte potenzielle Virulenzfaktoren sein könnten. Die Ergebnisse sind in den Abbildung 4.13A und 4.13B dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die *Real-time* PCR-Analyse eine höhere Expression der einzelne Gene ermittelte als die Microarray-Analyse. Im Gegensatz zur Microarray-Analyse ermittelte die *Real-time* PCR-Analyse signifikante Unterschiede in der Expression von *nox* und *levA* im Stamm BAA-2069. Die Microarray-Analyse vom Stamm UCN 34 ergab weniger Gene, deren Expression nach Phagozytose reguliert wurden als im Stamm BAA-2069. Die Analyse der Genexpression vom Stamm UCN 34 mittels *Real-time* PCR ergab jedoch auch Regulationen in der Expression der Gene, die in der Microarray-Analyse des Stammes BAA-2069 ermittelt wurden. Dazu gehören Erhöhungen der Expression der Gene des *dlt* Operons (*dltA-D*), des *glg* Operons (*glgA*, *glgB*

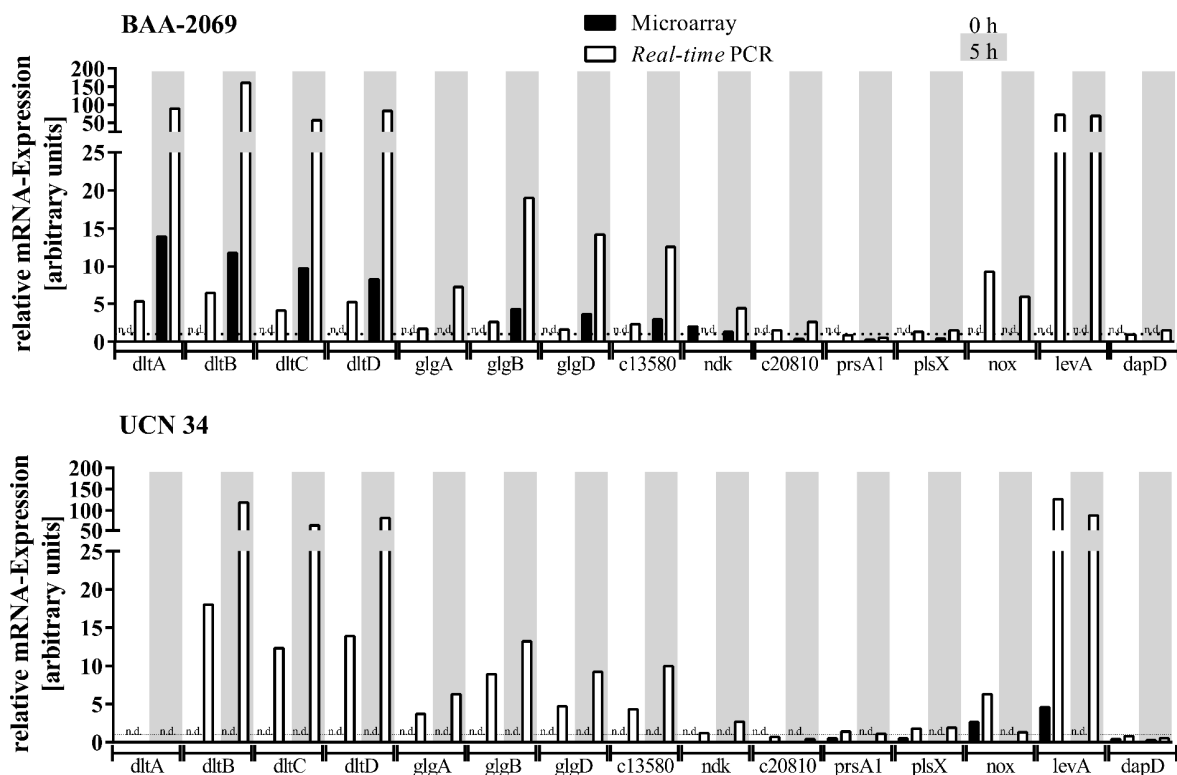


Abbildung 4.13: Verifikation der Genexpression-Änderungen mittels relativer quantitativer *Real-time* PCR, die durch die Microarray-Analyse detektiert wurden

Die relative Änderung der Genexpression von der *Real-time* PCR- (weiß) und Microarray-Analyse (schwarz) sind im Vergleich dargestellt. Die 0 h-Werte sind weiß und die 5 h-Werte grau hinterlegt. Angegeben ist der Mittelwert (Microarray-Analyse: n = 3; *Real-time* PCR: n = 6; n.d. = nicht detektiert).

und *glgD*), *ndk* sowie eine Verringerung der Expression des Gens *SGGBAA_c20810*. Die höchsten Expressionsunterschiede dieser Gene konnten nach fünf Stunden Inkubation im Vergleich zum Nullstundenwert festgestellt werden. Eine Ausnahme bildet die Genexpressionserhöhung von *nox*, die verglichen mit dem 5 h-Wert initial nach der Phagozytose am höchsten war.

4.4 Überleben oder Wachstum von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Medium mit verschiedenen bakteriziden Reagenzien

In den Phagosomen dienen verschiedene Mechanismen dazu, die phagozytierten Mikroorganismen abzutöten und zu degradieren. Eine frühe Reaktion von Phagozyten ist der oxidative Burst, also die Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies. Außerdem werden gereifte Phagosomen mittels ATPasen angesäuert. Lysozym wird sowohl von Phagozyten sekretiert als auch in Phagolysosomen genutzt, um Mikroorganismen zu degradieren. In den folgenden Versuchen wurde das Überleben beziehungsweise Wachstum verschiedener *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme in Präsenz dieser Reagenzien untersucht.

4.4.1 Überleben von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in saurem Medium

Ein wichtiger Mechanismus in Phagozyten zur Tötung von Mikroorganismen ist die Ansäuerung von Phagolysosomen mittels ATPasen. Der finale pH-Wert in diesen Organellen liegt zwischen vier und fünf. Aufgrund dessen wurde der prozentuale Anteil vitaler Zellen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Medium mit einem pH von vier im Vergleich zum Überleben in Medium mit neutralem pH-Wert nach fünfstündiger Inkubation ermittelt (Abbildung 4.14). Es konnte gezeigt werden, dass im sauren Medium nur 22–31 % vitale *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Zellen im Vergleich zum neutralen Medium nachweisbar sind. Die höchste Überlebensrate zeigten die Zellen des Stammes BAA-2069, während die Bakterien des Stammes UCN 34 die geringste Überlebensrate zeigten. Im Vergleich zum *S. aureus* Referenzstamm ATCC 25923 überlebten alle untersuchten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme die fünfstündige Inkubation im sauren Medium signifikant besser.

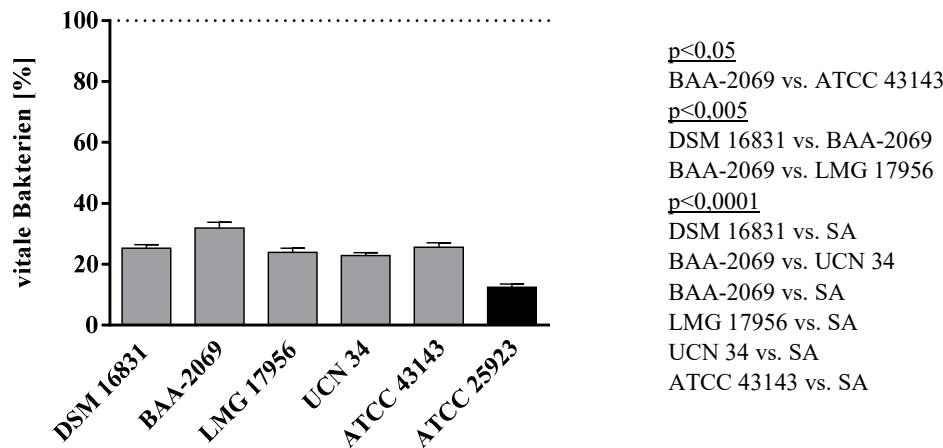


Abbildung 4.14: Überleben von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen in saurem Milieu

Dargestellt ist das prozentuale Überleben der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme DSM 16831, BAA-2069, LMG 17956, UCN 34 und ATCC 43143 (grau) sowie des *S. aureus* Stammes ATCC 25923 (schwarz) in BHI mit pH 4 im Verhältnis zum Überleben in BHI mit pH 7 (100 %; gestrichelte Linie) nach fünf Stunden Inkubation. Die Balken präsentieren den Mittelwert mit Standardfehler (n = 3). Die Signifikanzen zwischen den einzelnen Werten wurden mit dem Mann Whitney U-test berechnet.

4.4.2 Wachstum von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Gegenwart von Wasserstoffperoxid

Der oxidative Burst gehört zur ersten Reaktion von Phagozyten auf Mikroorganismen. Deshalb wurde das Wachstum von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in H₂O₂-ergänzt Medium untersucht. Es konnten Einschränkungen im Wachstum von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ab einer Konzentration von 10 mM H₂O₂ ermittelt werden (Abbildung 4.15). Ab einer Konzentration von 20 mM H₂O₂ wurden keine vitalen Bakterien mehr im Medium detektiert (nicht gezeigt). Die Ergebnisse der Wachstumsanalyse nach fünf Stunden Inkubation, sind in der Abbildung 4.15A (10 mM H₂O₂) und der Abbildung 4.15B (15 mM H₂O₂) dargestellt. Es wurden nur marginale Unterschiede im Überleben zwischen den einzelnen Stämmen in Medium mit 10 mM H₂O₂ festgestellt (Abbildung 4.15A). Im Vergleich zur Kontrolle ohne H₂O₂-Zugabe (100 %), stammten die Proben mit den wenigsten vitalen Zellen von den Stämmen BAA-2069 und ATCC 43143 (beide 87 %) sowie vom *S. aureus* Stamm (90 %). Die gleiche Anzahl vitaler Bakterien wie in der Kontrolle wurde für die Stämme DSM 16831 (99 %) und UCN 34 (102 %) in Gegenwart von 10 mM H₂O₂ detektiert. Größere stammabhängige Unterschiede gab es im Wachstum der verschiedenen untersuchten Stämme in BHI-Medium mit 15 mM H₂O₂. Am stärksten wuchsen in diesem Medium die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme UCN 34 und ATCC 43143. Im Vergleich zu den anderen untersuchten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen war das Wachstum des Stammes LMG 17956 in Medium mit 15 mM H₂O₂ am stärksten eingeschränkt. Das Wachstum vom

S. aureus Stamm ATCC 25923 war im Vergleich zu allen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen signifikant inhibiert. In anderen Studien wurde bereits nachgewiesen, dass Biofilmbildung den Bakterien als Schutz vor H₂O₂ dient (Jang *et al.*, 2016). Der Einfluss von H₂O₂ im Bezug auf die Biofilmbildung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wurde ebenfalls analysiert und das Ergebnis ist im Kapitel 4.5.2 dargestellt.

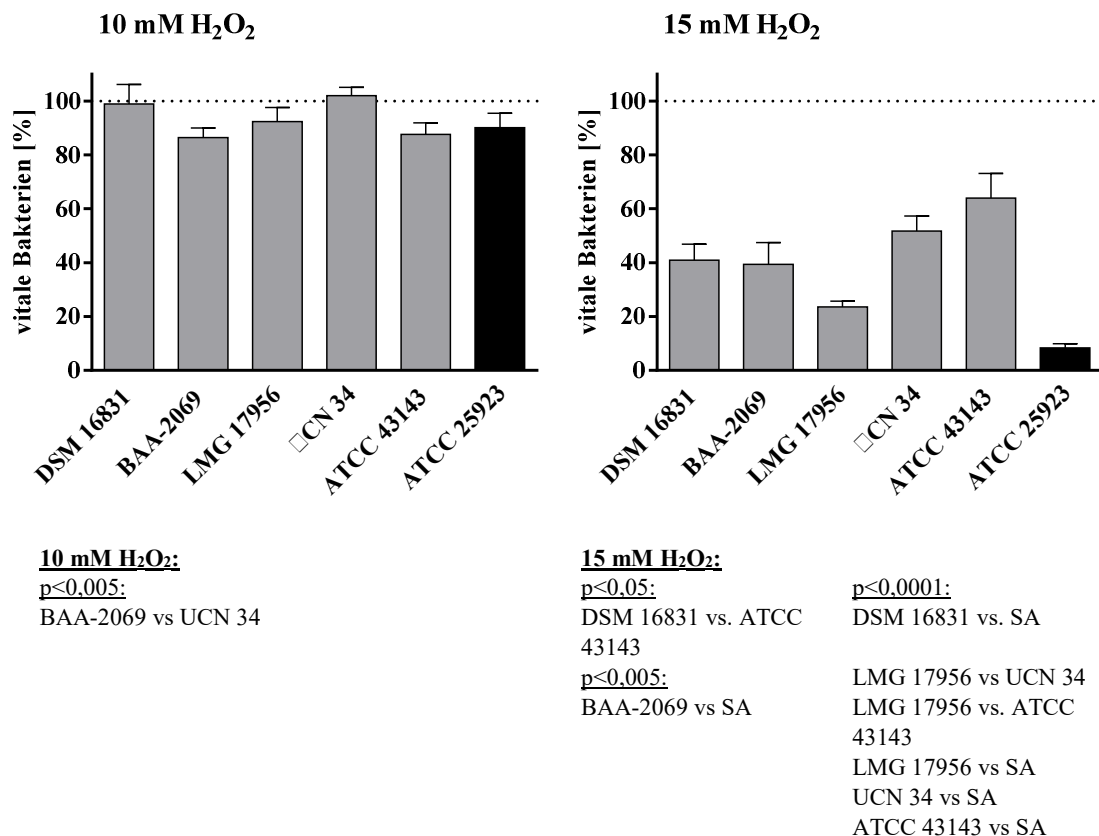


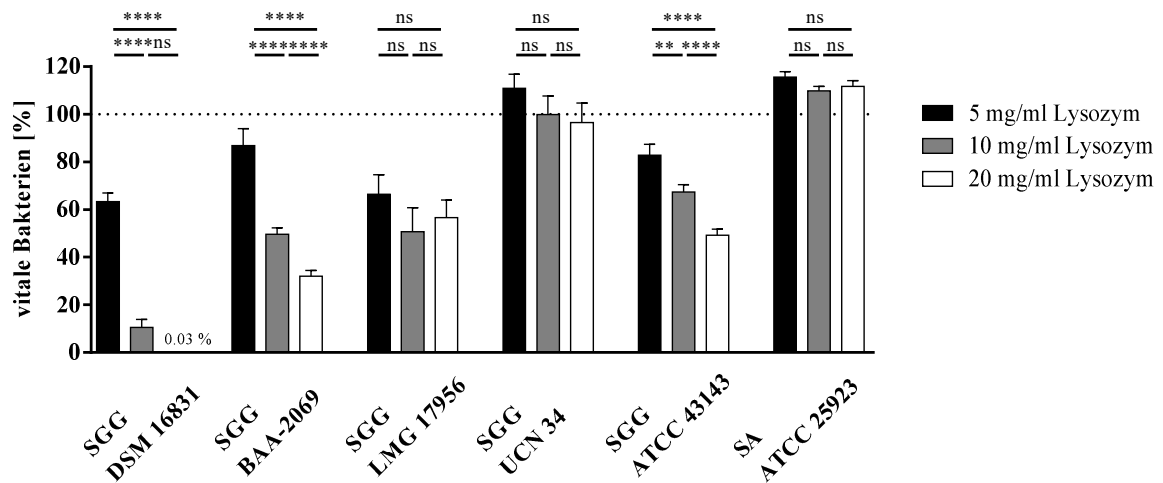
Abbildung 4.15: Prozentualer Anteil vitaler *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme nach fünfstündiger Inkubation in BHI Medium mit verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen

Dargestellt ist das prozentuale Wachstum der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme DSM 16831, BAA-2069, LMG 17956, UCN 34 und ATCC 43143 (grau) sowie des *S. aureus* (SA) Stammes ATCC 25923 (schwarz) in Gegenwart von A) 10 mM H₂O₂ und B) 15 mM H₂O₂ im Verhältnis zum Wachstum in BHI ohne die Zugabe von H₂O₂ (100 %; gestrichelte Linie). Angegeben ist der Mittelwert mit Standardfehler (n = 3). Die Signifikanz zwischen den einzelnen Werten wurde mit dem Mann Whitney U-test berechnet.

4.4.3 Wachstum von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Lysozym-supplementiertem Medium

Lysozym hydrolysiert die β-1,4-glykosidische Bindung zwischen N-Acetylmuraminsäure- und N-Acetylglucosaminresten im Peptidoglykan der Zellwand von Bakterien. Es dient Phagozyten zur extrazellulären Degradation von Mikroorganismen sowie zur Abtötung von Mikroorganismen innerhalb der Phagolysosomen (Shimada *et al.*, 2010). Die Lysozym-

Resistenz ist ein wichtiger Virulenzfaktor für Pathogene und wurde in dieser Arbeit bei fünf verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen im Vergleich zum *S. aureus* Stamm ATCC 25923 untersucht. Die Ergebnisse nach fünfstündigem Wachstum von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen in Medium mit verschiedenen Lysozymkonzentrationen im Vergleich zum Wachstum ohne Lysozym (100 %) sind in Abbildung 4.16 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Wachstumsfähigkeit in Gegenwart von Lysozym stammabhängig war. Mit 5 mg/ml Lysozym im BHI Medium wuchsen folgende Stämme marginal weniger als in der Kontrolle ohne Lysozym: DSM 16831 (63 %), BAA-2069 (87 %), LMG 17956 (66 %) und ATCC 43143 (83 %). Das Wachstum des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stammes UCN 34 sowie des Referenzstammes *S. aureus* ATCC 25923 wurden durch 5 mg/ml Lysozym nicht inhibiert. In BHI Medium mit 10 mg/ml Lysozym konnte eine mittlere Einschränkung des Wachstums von ca. 50 % bei den Stämmen BAA-2069 und LMG 17956 beobachtet werden. In diesem Medium wurde das Wachstum des Stammes ATCC 43143 auf ca. 67 % Wachstum im Vergleich zur Kontrolle verringert. Wesentlich stärker wurde das Wachstum von DSM 16831 bei 10 mg/ml Lysozym inhibiert. Es konnten im Vergleich zur Kontrolle ohne Lysozym nur 11 % vitale Zellen detektiert werden. Das Wachstum vom *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm UCN 34 sowie das Wachstum vom *S. aureus* Stamm ATCC 25923 wurde durch 10 mg/ml Lysozym im Medium ebenfalls nicht inhibiert. Auch die Zugabe von 20 mg/ml Lysozym im Medium inhibierte das Wachstum dieser beiden Stämme nicht. Vom Stamm DSM 16831 wurden jedoch nur 0,03 % vitale Bakterien in Medium mit 20 mg/ml Lysozym in BHI Medium im Vergleich zur Kontrolle ohne Lysozym ermittelt. Das Wachstum von den Stämmen LMG 17956 und ATCC 43143 wurde auf ca. 50 % reduziert und etwas weniger vitale Bakterien (ca. 32 %) wurden vom Stamm BAA-2069 nachgewiesen. Der Stamm UCN 34 wuchs signifikant besser in Lysozym-ergänzttem Medium als die anderen untersuchten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme (20 mg/ml Lysozym: $p < 0,005$). Im Gegensatz dazu wuchs der Stamm DSM 16831 signifikant schlechter in Medium mit Lysozym-Zugabe (20 mg/ml Lysozym: $p < 0,0001$). Das Wachstum des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stammes LMG 17956 wurde in allen mit Lysozym versetzten Medien, unabhängig von der Konzentration, etwa gleich stark inhibiert.

**5 mg/ml Lysozym:**

p<0,05:

DSM 16831 vs BAA-2069
 BAA-2069 vs LMG 17956
 LMG 17956 vs ATCC 43143

p<0,005:

DSM 16831 vs ATCC 43143
 BAA-2069 vs UCN 34

p<0,0005:

BAA-2069 vs SA
 LMG 17956 vs UCN 34
 LMG 17956 vs SA
 UCN 34 vs ATCC 43143

p<0,0001:

DSM 16831 vs UCN 34
 DSM 16831 vs SA
 ATCC 43143 vs SA

10 mg/ml Lysozym:

p<0,05:

DSM 16831 vs BAA-2069

p<0,005:

LMG 17956 vs UCN 34
 UCN 34 vs ATCC 43143

p<0,0005:

BAA-2069 vs ATCC 43143

p<0,0001:

DSM 16831 vs LMG 17956
 DSM 16831 vs UCN 34
 DSM 16831 vs ATCC 43143
 DSM 16831 vs SA
 BAA-2069 vs UCN 34
 BAA-2069 vs SA
 LMG 17956 vs SA
 ATCC 43143 vs SA

20 mg/ml Lysozym:

p<0,05:

BAA-2069 vs LMG 17956

p<0,0005:

LMG 17956 vs UCN 34

p<0,0001:

DSM 16831 vs BAA-2069
 DSM 16831 vs LMG 17956
 DSM 16831 vs UCN 34
 DSM 16831 vs ATCC 43143
 DSM 16831 vs SA
 BAA-2069 vs UCN 34
 BAA-2069 vs ATCC 43143
 BAA-2069 vs SA
 LMG 17956 vs SA
 UCN 34 vs ATCC 43143
 ATCC 43143 vs SA

Abbildung 4.16: Wachstum von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen in Medium mit verschiedenen Lysozymkonzentrationen

Dargestellt ist der prozentuale Anteil vitaler Bakterien der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (SGG) Stämme DSM 16831, BAA-2069, LMG 17956, UCN 34 und ATCC 43143 sowie des *S. aureus* (SA) Stammes ATCC 25923 in Medium mit 5 mg/ml Lysozym (schwarz), 10 mg/ml Lysozym (grau) und 20 mg/ml Lysozym (weiß) im Verhältnis zur Kontrolle ohne Lysozym-Zugabe (100 %; gestrichelte Linie) nach fünfstündigem Wachstum. Angegeben ist der Mittelwert mit Standardfehler (n = 3). Die Signifikanz zwischen den einzelnen Werten wurden mit dem Mann Whitney U-test berechnet (*: p<0,05; **: p<0,005; ***: p<0,0005; ****: p<0,0001).

Eine vorherige Studie hat gezeigt, dass Lysozym eine Unterscheidung zwischen bovinen und humanen Isolaten möglich macht, weil die Isolate unterschiedlich sensitiv sind (Kurtovic *et al.*, 2003). Aufgrund dessen wurden von 20 weiteren *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten die Lysozym-Resistenz untersucht (Abbildung 4.17). Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wachstum humaner Isolate und dem Wachstum tierischer Isolate in Gegenwart von Lysozym festgestellt werden.

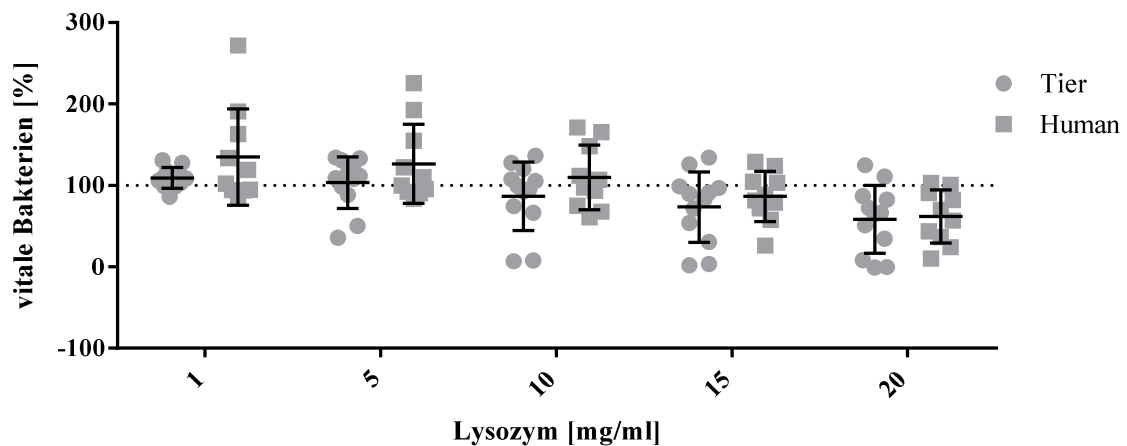


Abbildung 4.17: Anteil vitaler tierischer oder humaner *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate nach fünfständiger Inkubation in BHI mit verschiedenen Lysozymkonzentrationen

Dargestellt ist der prozentuale Anteil vitaler Bakterien verschiedener *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate, die entweder aus Tieren oder Menschen isoliert wurden, nach fünfständigem Wachstum. Das Wachstum wurde in Medium mit 1 mg/ml Lysozym, 5 mg/ml Lysozym, 10 mg/ml Lysozym, 15 mg/ml Lysozym und 20 mg/ml Lysozym im Verhältnis zur Kontrolle ohne Lysozym-Zugabe (100 %; gestrichelte Linie). Angegeben ist der Mittelwert mit Standardfehler (n = 3).

Bei der Untersuchung der Lysozym-Resistenz von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wurde beobachtet, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Lysozym-supplementiertem Medium verstärkt Biofilm bildet. Dies wird im folgenden Kapitel näher analysiert.

4.5 Biofilmbildung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nach Inkubation mit Lysozym

Die Beobachtung, dass die Lysozym-Behandlung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zur verstärkten Biofilmbildung führt, wurde näher an einem Polystyrol-Modell untersucht. Polystyrol dient in verschiedenen Studien als Adhäsionsgrundfläche zur Analyse von Biofilmen (Vollmer *et al.*, 2010a; Svensson *et al.*, 2014; Berlanga *et al.*, 2015). Die Adhäsion der Bakterien an Polystyrol wurde quantifiziert, indem die Zellwand der adhärenen Bakterien mit Kristallviolett gefärbt und anschließend die Absorption gemessen wurde. Die Adhäsion wurde nach fünf- und 16-stündiger Inkubation in BHI mit und ohne Lysozym ermittelt (Abbildung 4.18).

Nach fünfständiger Inkubation führte die Lysozym-Behandlung bei drei *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen zu einer signifikanten Veränderung in der Biofilmbildung (Abbildung 4.18A). Die Biofilmbildung des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stammes DSM 16831 war nach Lysozym-Behandlung sowohl mit 10 mg/ml als auch 20 mg/ml, im Vergleich zur Kontrolle ohne Lysozym, vermindert. Im Gegensatz dazu war die Biofilmbildung von den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen BAA-2069 bei 20 mg/ml Lysozym und LMG 17956 bei 10 mg/ml Lysozym signifikant verstärkt. Die Biofilmbildung der Stämme

UCN 34 und ATCC 43143 war bei Lysozym-Zugabe nach fünfstündiger Inkubation tendenziell verringert und die Biofilmbildung des *S. aureus* Stammes ATCC 25923 war im BHI Medium mit 20 mg/ml Lysozym tendenziell erhöht.

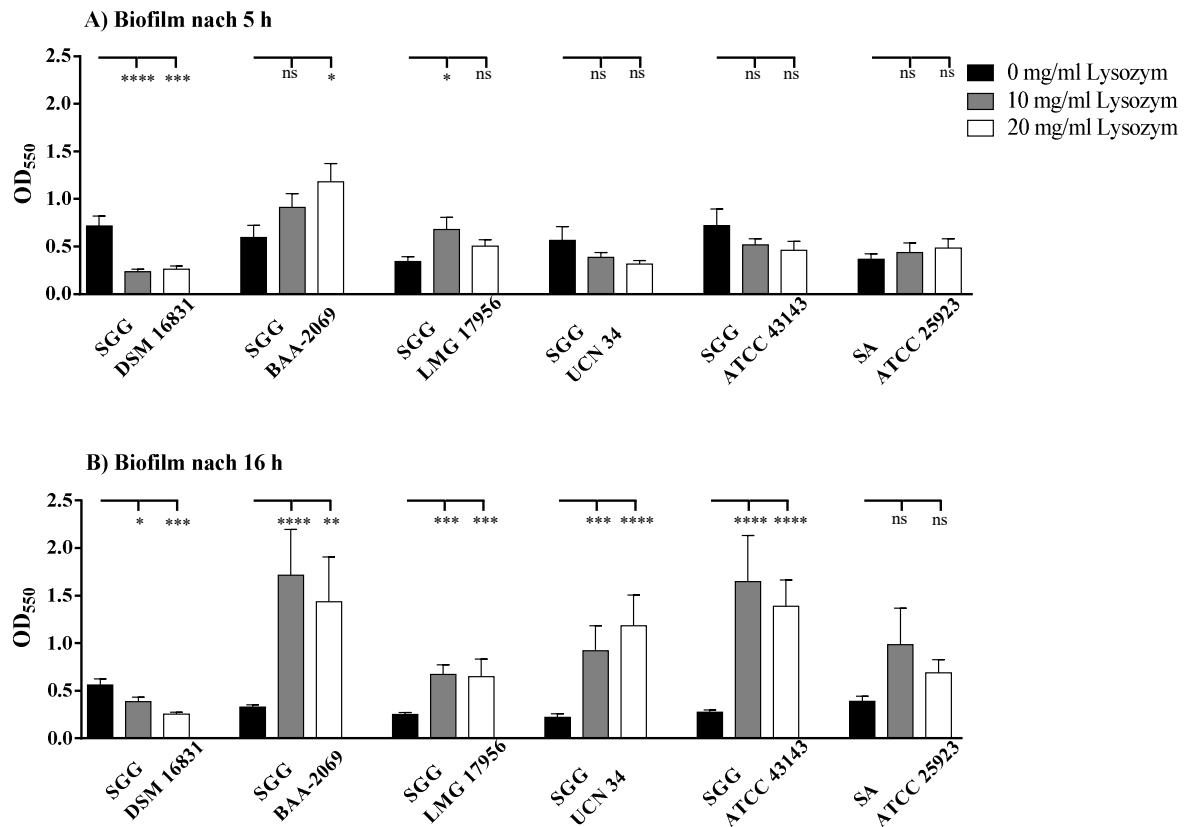


Abbildung 4.18: Biofilmbildung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Lysozym-supplementiertem Medium

Dargestellt ist die Absorption der Biofilme von den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen DSM 16831, BAA-2069, LMG 17956, UCN 34 und ATCC 43143 im Vergleich zum *S. aureus* Stamm ATCC 25923 in BHI (schwarz), in BHI mit 10 mg/ml Lysozym (grau) und 20 mg/ml Lysozym (weiß) nach fünf Stunden (A) und 16-stündiger Inkubation (B) bei $\lambda = 550$ nm nach Kristallviolett-Färbung. Angegeben ist der Mittelwert mit Standardfehler (n = 3). Die Signifikanz zwischen den Werten der Kontrollen (ohne Lysozym) und behandelten Proben (mit Lysozym) wurden mit dem Mann Whitney U-test berechnet. (ns = nicht signifikant; *: p<0,05; **: p<0,005; ***: p<0,0005; ****: p<0,0001).

Nach 16 Stunden Inkubation der Bakterien mit Lysozym war die Biofilmbildung insgesamt stärker bei den Stämmen BAA-2069, LMG 17956, UCN 34 und ATCC 43143 (Abbildung 4.18B). Der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm DSM 16831 bildete, wie auch nach fünfstündiger Inkubation, einen signifikant verringerten Biofilm an Polystyrol. Die Lysozym-Behandlung bewirkte jedoch bei den anderen vier untersuchten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen (BAA-2069, LMG 17956, UCN 34 und ATCC 43143) eine signifikant verstärkte Bildung des Biofilms im Vergleich zur Kontrolle ohne Lysozym. Die größten

Unterschiede in der Biofilmbildung zwischen der Kontrolle und den Lysozym-behandelten Proben war bei den Stämmen BAA-2069 und ATCC 43143 zu beobachten. Auch beim *S. aureus* Referenzstamm ATCC 25923 wurde nach 16 Stunden eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante, Erhöhung der Biofilmbildung nach Lysozym-Behandlung beobachtet.

Die Vitalität der Bakterien im Biofilm wurde zusätzlich durch Ermittlung der koloniebildenden Einheiten bestimmt. Hierfür wurde der Biofilm mittels des Detergenz Saponin aufgebrochen, resuspendiert und ausplattiert. In der Abbildung 4.19A und 4.19B sind die prozentualen Anteile an vitalen bakteriellen Zellen im Vergleich zur Kontrolle ohne Lysozym dargestellt. Nach fünf Stunden wurden mehr vitale Zellen der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme BAA-2069 und LMG 17956 im Vergleich zur Kontrolle ermittelt. Dies wurde auch durch die Analyse mittels Kristallviolett verifiziert. Weniger oder gleich viele vitale Zellen wie in der Kontrolle konnten von den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen UCN 34 und ATCC 43143 sowie von dem *S. aureus* Stamm ATCC 25923 ermittelt werden. Nach 16 Stunden Inkubation wurden insgesamt weniger vitale Zellen nachgewiesen (Abbildung 4.19B). Die Vitalität der

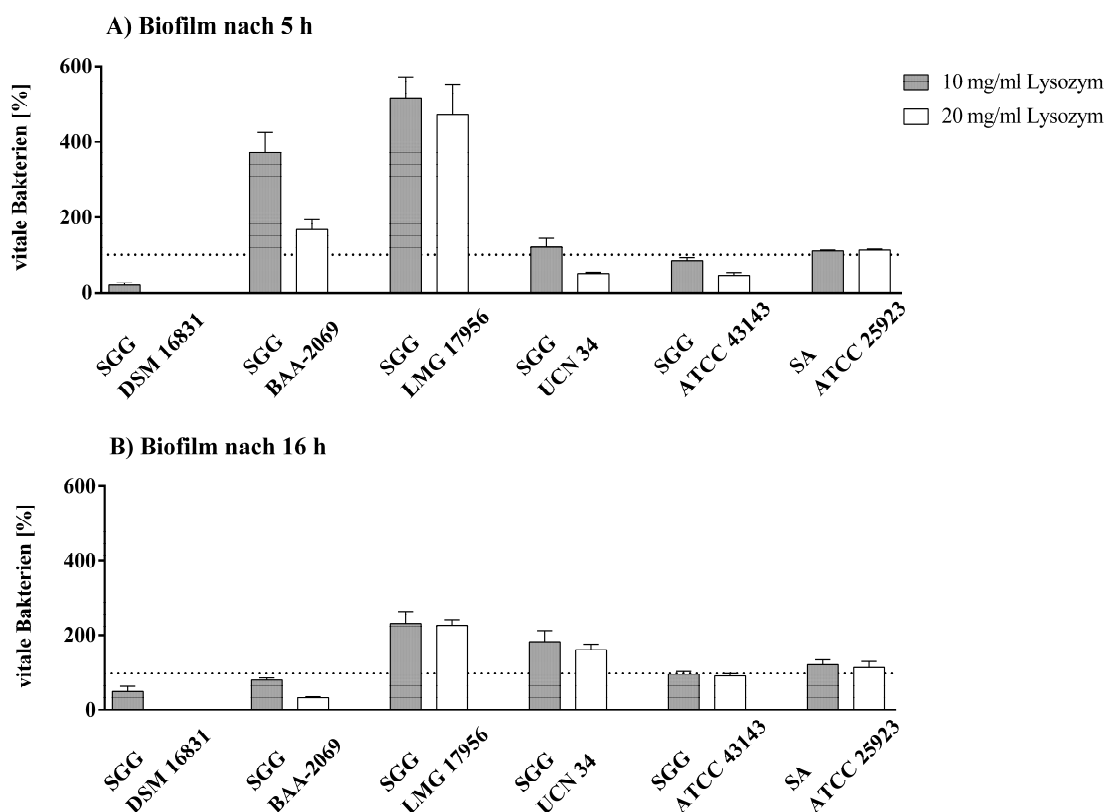


Abbildung 4.19: Bakterieller Titer im Biofilm von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Lysozym-supplementiertem Medium

Dargestellt ist der prozentuale Anteil vitaler Bakterien der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme DSM 16831, BAA-2069, LMG 17956, UCN 34 und ATCC 43143 im Vergleich zum *S. aureus* Stamm ATCC 25923 in BHI mit 10 mg/ml Lysozym (grau) und 20 mg/ml Lysozym (weiß) zur Kontrolle ohne Lysozym (100 %; gestrichelte Linie) nach fünf Stunden (A) und 16-stündiger Inkubation (B). Angegeben ist der Mittelwert mit Standardfehler (n = 3).

S. gallolyticus subsp. *gallolyticus* Stämme DSM 16831 und BAA-2069 war geringer als in der Kontrolle ohne Lysozym. Eine erhöhte Anzahl vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrolle wurde nur in den Biofilmen der Stämme LMG 17956 und UCN 34 nachgewiesen. Die Anzahl vitaler Zellen in Biofilmen mit und ohne Lysozym glich der beim *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm ATCC 43143 und dem *S. aureus* Stamm ATCC 25923.

Um zu überprüfen, ob tatsächlich intakte bakterielle Zellen und nicht nur durch Lysozymdegradation vorhandene Zelldebris adhärent am Polystyrol vorliegen, wurden die adhären Zellen nach 16-stündiger Inkubation fluoreszenzmikroskopisch mittels DAPI-Färbung untersucht (Abbildung 4.20). Am Mikroskop konnten kokkenförmige Strukturen ausgemacht werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die Bakterienzellen im Biofilm intakt waren. In der 400-fachen Vergrößerung (Abbildung 4.20) konnten vom *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm DSM 16831 ohne Lysozym-Behandlung Mikrokolonien detektiert werden (erste Reihe). Nach Lysozym-Behandlung waren jedoch nur noch vereinzelt adhären Bakterien dieses Stammes an Polystyrol zu beobachten. Anders verhielt es sich bei den anderen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen. Der Stamm BAA-2069 bildete auch ohne Lysozym viele Mikrokolonien. Diese traten jedoch verstärkt nach Lysozym-Zugabe auf. In Medium ohne Lysozym waren nur vereinzelte adhären Zellen des Stammes LMG 17956 zu erkennen. In Medium mit Lysozym bildete dieser jedoch Mikrokolonien am Polystyrol. Die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme UCN 34 und ATCC 43143 bildeten ohne Lysozym vereinzelte Mikrokolonien. Mit Lysozym waren Mikrokolonien auf der ganzen Fläche des Polystyrols zu erkennen. Im Vergleich dazu bildete der *S. aureus* Stamm ATCC 25923 nur geringfügig mehr Mikrokolonien bei Lysozym-Behandlung.

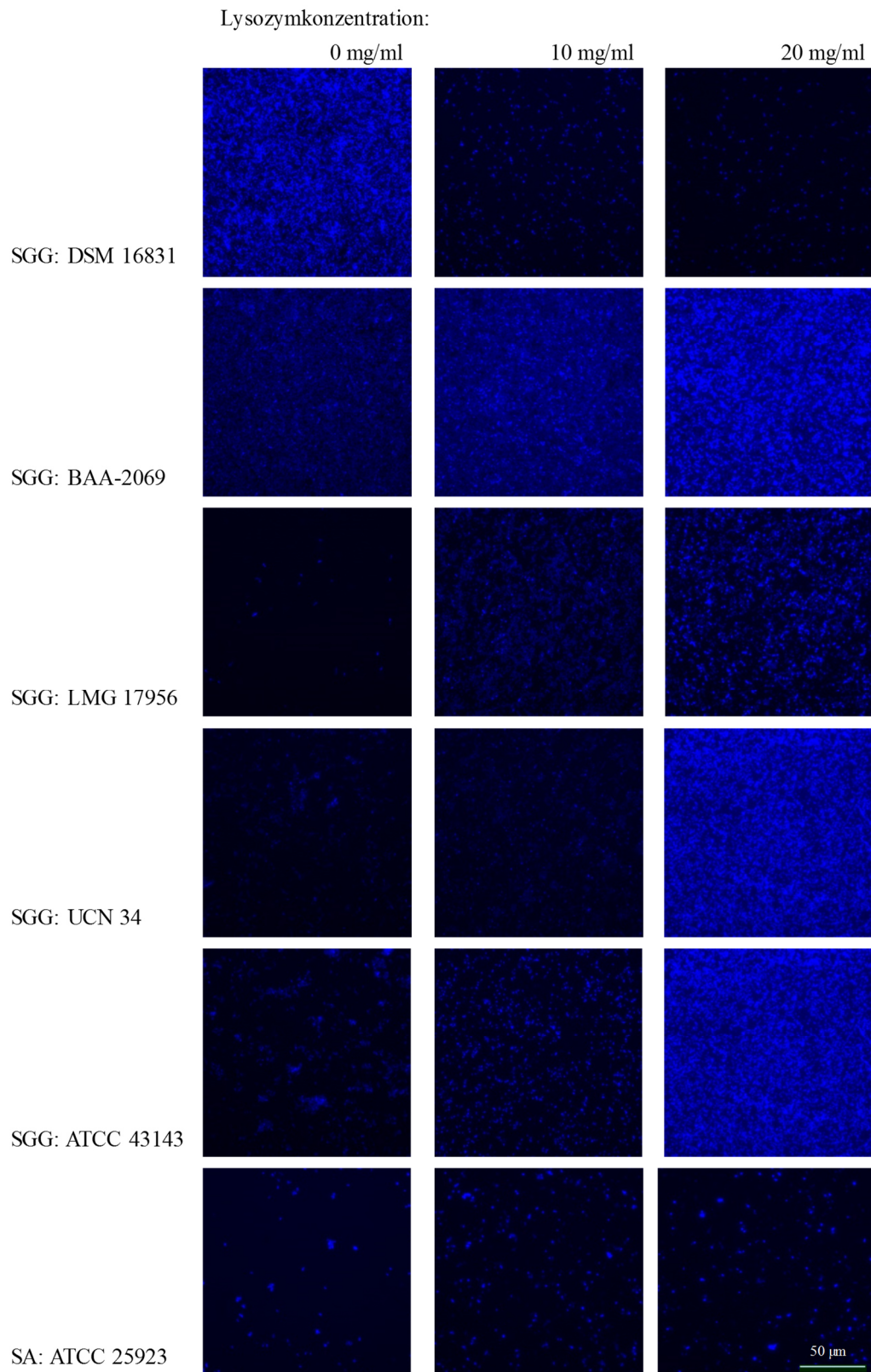


Abbildung 4.20: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der an Polystyrol adhärenenten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme nach Inkubation in BHI ohne Lysozym, mit 10 mg/ml Lysozym oder mit 20 mg/ml Lysozym

Gezeigt ist die Adhäsion der mit DAPI-markierten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (SGG) Stämme DSM 16831, BAA-2069, LMG 17956, UCN 34 und ATCC 43143 sowie des *S. aureus* (SA) Stammes ATCC 25923, an Polystyrol nach 16 Stunden Inkubation in BHI ohne Lysozym (links), mit 10 mg/ml Lysozym (Mitte) oder 20 mg/ml Lysozym (rechts).

4.5.1 Adhäsion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* an Kollagen Typ I bei Lysozym-Zugabe

Die Kollagen-Adhäsion am Endokard ist ein initialer Schritt in der Kolonisierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Deshalb wurde die Biofilmbildung in Gegenwart von Lysozym nicht nur am Polystyrol-Modell, sondern auch an Kollagen Typ I untersucht. Außerdem wurde die Kollagenadhäsion mittels Transkriptom-Analyse im Kapitel 4.7 untersucht. In der Abbildung 4.21 ist die Adhäsion der einzelnen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme an immobilisiertes BSA sowie Kollagen Typ I ohne und mit Lysozym-Zugabe dargestellt. Nach fünf Stunden Inkubation konnten keine signifikanten Unterschiede in der BSA- oder Kollagen-Adhäsion der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme festgestellt werden. Eine Ausnahme bildete der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm BAA-2069. Bei diesem konnte signifikant eine stärkere Adhäsion an BSA und Kollagen Typ I in BHI mit Lysozym im Vergleich zur Inkubation ohne Lysozym festgestellt werden (Abbildung 4.21).

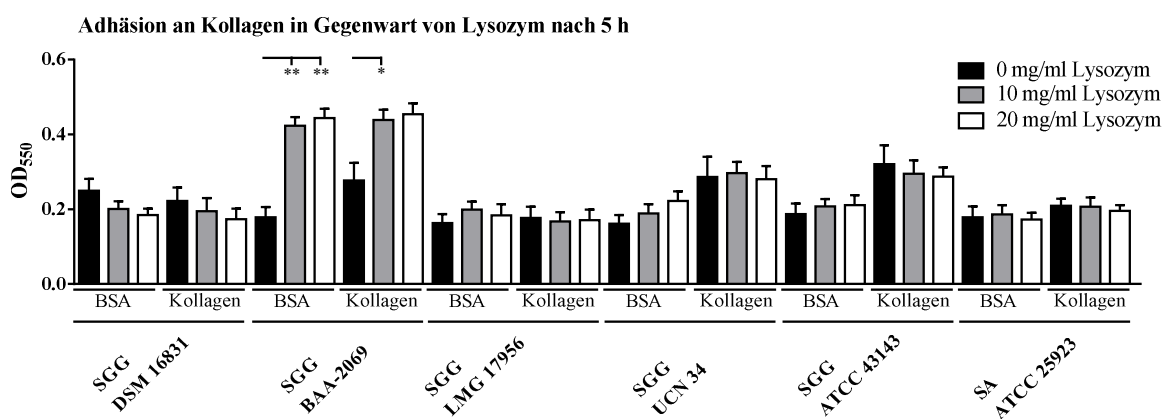


Abbildung 4.21: Adhäsion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* an Kollagen Typ I in Gegenwart von Lysozym nach fünfstündiger Inkubation

Dargestellt ist die Absorption der an Kollagen Typ I und BSA adhärenen Kristallviolett-gefärbten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme DSM 16831, BAA-2069, LMG 17956, UCN 34 und ATCC 43143 im Vergleich zum *S. aureus* Stamm ATCC 25923 in BHI (schwarz), in BHI mit 10 mg/ml Lysozym (grau) oder 20 mg/ml Lysozym (weiß) nach fünf Stunden Inkubation bei $\lambda = 550$ nm. Angegeben ist der Mittelwert mit Standardfehler ($n = 3$). Die Signifikanz zwischen den Werten der Kontrollen (ohne Lysozym) und behandelten Proben (mit Lysozym) wurden mit dem Mann Whitney U-test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$).

4.5.2 Biofilmbildung in Wasserstoffperoxid-supplementiertem Medium

Die Biofilmbildung dient den Bakterien als Schutz vor äußeren schädlichen Einflüssen. Aufgrund dessen wurde neben der Biofilmbildung bei Lysozym-Zugabe ins Medium auch die Biofilmbildung bei verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen in BHI-Medium ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.22 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass H_2O_2 die Biofilmbildung der zwei *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme DSM 16831 und

BAA-2069 bei einer Konzentration von 15 mM H₂O₂ signifikant reduziert. Die Adhäsion an Polystyrol der Stämme UCN 34 und ATCC 43143 ist bei dieser H₂O₂-Konzentration in BHI-Medium tendenziell höher als in BHI-Medium ohne H₂O₂. Der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm LMG 17956 und der *S. aureus* Stamm ATCC 25923 zeigten bei allen H₂O₂-Konzentrationen die gleiche Adhäsionsfähigkeit an Polystyrol.

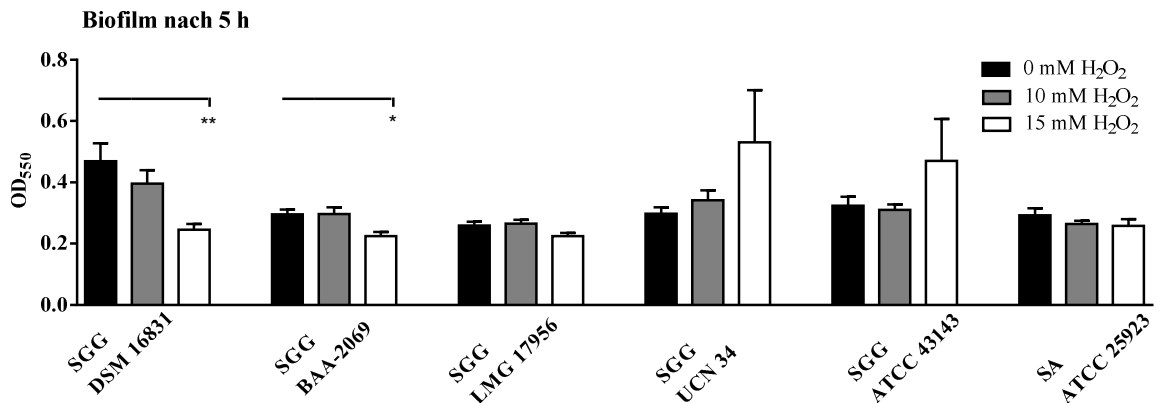


Abbildung 4.22: Biofilmbildung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Gegenwart von H₂O₂

Dargestellt ist die ermittelte Absorption bei $\lambda = 550$ nm nach Biofilmbildung der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme DSM 16831, BAA-2069, LMG 17956, UCN 34 und ATCC 43143 im Vergleich zum *S. aureus* Stamm ATCC 25923 in BHI (schwarz), in BHI mit 10 mM H₂O₂ (grau) und 15 mM H₂O₂ (weiß). Die bakteriellen Zellen wurden mittels Kristallviolett angefärbt. Angegeben ist der Mittelwert mit Standardfehler (n = 3). Die Signifikanz zwischen den Werten der Kontrollen (ohne H₂O₂) und behandelten Proben (mit H₂O₂) wurden mit dem Mann Whitney U-test berechnet (*: p<0,05; **: p<0,005).

4.6 Transkriptomanalyse der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme BAA-2069 und UCN 34 in Gegenwart von Lysozym

Für die Transkriptom-Analyse von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wurden zwei Stämme ausgewählt, die im Zusammenhang mit Lysozym unterschiedliche Phänotypen aufwiesen. Wie im Kapitel 4.5 gezeigt wurde, wies der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm BAA-2069 nach fünfstündiger Inkubation in Medium mit Lysozym eine stärkere Adhäsion an Polystyrol, an Kollagen Typ I und BSA auf als in Medium ohne Lysozym. Der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm UCN 34 war stark Lysozym-resistent und konnte bei einer Konzentration von 20 mg/ml Lysozym ohne Inhibition wachsen (Kapitel 4.4.3). Deshalb wurden die Genexpressionen dieser beiden Stämme in Medium mit Lysozym näher untersucht. Hierfür wurden Microarray-Analysen nach fünfstündiger Inkubation in BHI-Medium mit 10 mg/ml Lysozym im Vergleich zur Kontrolle ohne Lysozym durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.7 und in Tabelle 4.8 dargestellt. Zwecks besserer Übersicht wurden die regulierten Gene nach Funktion ihrer Produkte sortiert, in einem Balkendiagramm aufgetragen und in den Abbildung 4.23A und 4.22B dargestellt.

Tabelle 4.7: Tabellarische Darstellung der Expression verschiedener Gene der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme BAA-2069 und □CN 34 nach fünfstündiger Inkubation in BHI Medium mit Lysozym im Vergleich zur Kontrolle (n = 3; n. r. = nicht reguliert; n. p. = im jeweiligen Genom nicht vorhanden; - = nicht relevant).

BAA-2069 und □CN 34: Erhöhte Genexpression			BAA-2069			□CN 34			
Funktion	Gen	Produkt	log2 Ratio	p-Wert	n-fach	log2 Ratio	p-Wert	n-fach	
Antibiotikum-Resistenz	<i>SGGBAA2069_c00120</i>	putative beta-lactamase	1,02	0,01	2,03	n. r.	-	n. r.	
	<i>SGGBAA2069_c03220</i>	multiple antibiotic resistance protein marR	2,13	0,03	4,39	n. p.	-	n. p.	
Aminosäure-Metabolismus	<i>argG</i>	argininosuccinate synthase	n. r.	-	n. r.	1,59	0,02	3,01	
	<i>asnA</i>	asparagine synthetase AsnA	1,06	0,01	2,09	n. r.	-	n. r.	
	<i>citA</i>	citrate synthase	n. p.	-	n. p.	1,20	0,05	2,29	
	<i>GALLO_0143</i>	acetyltransferase	n. r.	-	n. r.	1,09	0,02	2,13	
	<i>GALLO_1269</i>	GNAT family acetyltransferase	n. p.	-	n. p.	1,34	0,01	2,52	
	<i>GALLO_1848</i>	putative glutamine amidotransferase	n. p.	-	n. p.	2,28	0,01	4,87	
	<i>gdh</i>	glutamate dehydrogenase	1,61	0,02	3,06	2,78	0,01	6,85	
	<i>hipO1</i>	aminoacylase/N-acyl-L-amino acid amidohydrolase/hippurate hydrolase	n. r.	-	n. r.	1,57	0,00	2,98	
	<i>nifS</i>	cysteine desulfurase/ aminotransferase	1,28	0,01	2,42	1,35	0,02	2,55	
	<i>panE</i>	2-dehydropantoate 2-reductase	n. r.	-	n. r.	1,46	0,04	2,76	
	<i>SGGBAA2069_c18080</i>	putative glutamine amidotransferase	1,99	0,01	3,97	n. r.	-	n. r.	
	<i>sufS</i>	cysteine desulfurase / selenocysteine lyase	n. r.	-	n. r.	1,17	0,00	2,24	
	Kohlenhydrat-Metabolismus	<i>gpmA</i>	phosphoglyceromutase	n. r.	-	n. r.	1,33	0,01	2,51
		<i>icd</i>	isocitrate dehydrogenase	n. r.	-	n. r.	1,07	0,02	2,10
		<i>pfkA</i>	6-phosphofruktokinase	n. r.	-	n. r.	1,48	0,03	2,78
<i>pgi</i>		glucose-6-phosphate isomerase	n. r.	-	n. r.	1,01	0,02	2,01	
<i>pyk</i>		pyruvate kinase	n. r.	-	n. r.	1,14	0,04	2,21	
DNA-Bindung/Reparatur	<i>GALLO_0671</i>	phosphoglycolate phosphatase	n. r.	-	n. r.	1,33	0,00	2,52	
	<i>GALLO_0742</i>	DHH family phosphatase protein	n. r.	-	n. r.	1,27	0,01	2,41	
	<i>ogt</i>	6-O-methylguanine DNA methyltransferase	1,02	0,04	2,02	1,70	0,01	3,26	
	<i>parC</i>	topoisomerase IV subunit A	n. r.	-	n. r.	1,18	0,04	2,27	
	<i>pell1</i>	pectate lyase L	2,04	0,03	4,10	1,29	0,04	2,45	
	<i>polC</i>	DNA polymerase III	n. r.	-	n. r.	1,22	0,04	2,33	
	<i>recO</i>	DNA repair protein recO	1,10	0,02	2,15	n. r.	-	n. r.	
	<i>rggA</i>	putative transcriptional activator Rgg/GadR/MutR	n. p.	-	n. p.	1,54	0,03	2,91	
	<i>ssbA</i>	single-stranded DNA-binding protein	n. p.	-	n. p.	2,52	0,02	5,74	
	<i>ssbB</i>	single-strand DNA-binding protein	2,36	0,02	5,12	n. r.	-	n. r.	
Fettsäuren-Metabolismus	<i>topA</i>	DNA topoisomerase I	n. r.	-	n. r.	1,86	0,04	3,64	
	<i>accA</i>	acetyl-CoA carboxylase subunit alpha	n. r.	-	n. r.	1,74	0,00	3,34	
	<i>accB</i>	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein subunit	n. r.	-	n. r.	2,25	0,01	4,76	
	<i>accC</i>	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase subunit	n. r.	-	n. r.	1,74	0,02	3,35	
	<i>accD</i>	acetyl-CoA carboxylase subunit beta	n. r.	-	n. r.	1,53	0,04	2,89	
	<i>fabD</i>	malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	n. r.	-	n. r.	2,12	0,02	4,36	
	<i>fabF</i>	3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase II	n. r.	-	n. r.	1,98	0,00	3,94	
	<i>fabG</i>	3-ketoacyl-ACP reductase	n. r.	-	n. r.	2,31	0,01	4,95	

BAA-2069 und □CN 34: Erhöhte Genexpression			BAA-2069			□CN 34		
Funktion	Gen	Produkt	log2 Ratio	p-Wert	n-fach	log2 Ratio	p-Wert	n-fach
	<i>fabH</i>	3-oxoacyl-ACP synthase	1,75	0,02	3,36	2,27	0,00	4,82
	<i>fabK</i>	enoyl-(acyl-carrier-protein) reductase II	1,45	0,05	2,74	2,27	0,00	4,81
	<i>fabZ</i>	(3R)-hydroxymyristoyl-ACP dehydratase	n. r.	-	n. r.	1,95	0,00	3,87
	<i>GALLO_0333</i>	enoyl-CoA hydratase	n. r.	-	n. r.	2,46	0,01	5,50
	<i>GALLO_0975</i>	glycerol-3-phosphate acyltransferase PlsY	n. p.	-	n. p.	1,06	0,02	2,08
	<i>phaB</i>	enoyl-CoA hydratase	2,28	0,03	4,85	2,17	0,00	4,50
GMP Biosynthese	<i>guaB</i>	inosine 5'-monophosphate dehydrogenase	n. r.	-	n. r.	1,42	0,02	2,67
H₂O₂ Toleranz	<i>ahpC</i>	alkyl hydroperoxide reductase	1,17	0,02	2,25	1,90	0,01	3,74
	<i>ahpF</i>	alkyl hydroperoxide reductase subunit F	1,07	0,04	2,10	1,89	0,04	3,70
	<i>naoX</i>	NADH oxidase	1,05	0,03	2,07	n. p.	-	n. p.
Immunität	<i>mccF</i>	microcin immunity protein MccF	1,67	0,03	3,18	2,22	0,00	4,65
	<i>cinA</i>	competence damage-inducible protein A	1,34	0,05	2,53	2,00	0,02	4,00
Metabolismus	<i>phnA</i>	phosphonoacetate hydrolase	n. r.	-	n. r.	1,38	0,05	2,60
Metallbindung	<i>GALLO_0832</i>	metal dependent phosphohydrolase	n. p.	-	n. p.	1,59	0,02	3,00
Nukleotid-Biosynthese	<i>prsyn</i>	ribose-phosphate pyrophosphokinase	n. r.	-	n. r.	1,19	0,02	2,28
	<i>add</i>	adenosine deaminase	n. r.	-	n. r.	1,08	0,04	2,12
Oxireduktase	<i>gapN</i>	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	n. r.	-	n. r.	1,91	0,02	3,76
Phagen-Protein	<i>int5</i>	site-specific recombinase, phage integrase family	n. r.	-	n. r.	1,10	0,03	2,15
Porphyrin Synthese	<i>GALLO_1275</i>	uroporphyrinogen decarboxylase	n. p.	-	n. p.	1,97	0,01	3,92
Protease	<i>clpP</i>	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	n. r.	-	n. r.	1,08	0,03	2,11
	<i>GALLO_0849</i>	Zn-dependent protease	n. p.	-	n. p.	2,02	0,05	4,05
	<i>GALLO_2250</i>	insulinase, M16 family peptidase	n. r.	-	n. r.	1,02	0,04	2,02
	<i>pepB</i>	oligoendopeptidase F	n. r.	-	n. r.	1,31	0,03	2,48
	<i>pepO</i>	putative endopeptidase	n. r.	-	n. r.	1,29	0,02	2,44
Protein Sekretion /Synthese	<i>alaS</i>	alanyl-tRNA ligase	n. r.	-	n. r.	1,29	0,03	2,45
	<i>asnA</i>	asparagine synthetase AsnA	n. r.	-	n. r.	1,70	0,03	3,26
	<i>cysS</i>	cysteinyl-tRNA synthetase	n. r.	-	n. r.	1,49	0,01	2,80
	<i>GALLO_1298</i>	queuosine biosynthesis protein	n. r.	-	n. r.	2,21	0,05	4,63
	<i>GALLO_1812</i>	RNA methyltransferase	n. p.	-	n. p.	1,86	0,00	3,64
	<i>gatA</i>	aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit A	n. r.	-	n. r.	1,31	0,01	2,47
	<i>ileS</i>	isoleucyl-tRNA ligase	n. r.	-	n. r.	1,24	0,02	2,36
	<i>infA</i>	translation initiation factor IF-1	2,00	0,03	4,01	1,69	0,00	3,23
	<i>leuS</i>	leucyl-tRNA synthetase	n. r.	-	n. r.	1,07	0,02	2,09
	<i>prsA1</i>	foldase protein PrsA	1,84	0,01	3,58	2,12	0,04	4,35
	<i>thrS</i>	threonyl-tRNA ligase	n. r.	-	n. r.	1,37	0,00	2,59
	<i>tig</i>	trigger factor	1,11	0,01	2,16	n. r.	-	n. r.
	<i>trmF</i>	tRNA uridine 5-carboxy-methylaminomethyl modification enzyme	n. r.	-	n. r.	1,12	0,02	2,18
	<i>mnmA</i>	tRNA-specific 2-thiouridylase MnmA	1,21	0,01	2,31	1,54	0,02	2,91
	<i>tyrS</i>	tyrosyl-tRNA synthetase	n. r.	-	n. r.	1,26	0,03	2,40
	<i>yqaB</i>	acetyltransferase	n. r.	-	n. r.	1,27	0,02	2,41
Redox Metabolismus	<i>gor</i>	glutathione reductase	n. r.	-	n. r.	1,57	0,02	2,97

BAA-2069 und □CN 34: Erhöhte Genexpression			BAA-2069			□CN 34		
Funktion	Gen	Produkt	log2 Ratio	p-Wert	n-fach	log2 Ratio	p-Wert	n-fach
Arsenat Resistenz	<i>GALLO_1741</i>	arsenate reductase family protein	n. r.	-	n. r.	1,14	0,01	2,21
Ribosom	<i>prfC</i>	peptide chain release factor 3	1,32	0,01	2,49	1,48	0,02	2,78
	<i>rplA</i>	50S ribosomal protein L1	1,89	0,02	3,70	2,37	0,02	5,18
	<i>rplC</i>	50S ribosomal protein L3	1,88	0,01	3,68	2,13	0,04	4,38
	<i>rplD</i>	50S ribosomal protein L4	1,47	0,03	2,78	1,97	0,01	3,91
	<i>rplE</i>	50S ribosomal protein L5	1,05	0,04	2,07	n. r.	-	n. r.
	<i>rplF</i>	50S ribosomal protein L6	1,03	0,04	2,04	1,36	0,03	2,56
	<i>rplJ</i>	50S ribosomal protein L10	1,81	0,03	3,51	2,39	0,00	5,24
	<i>rplK</i>	50S ribosomal protein L11	2,35	0,01	5,10	2,62	0,05	6,15
	<i>rplL</i>	50S ribosomal protein L7/L12	1,65	0,01	3,14	n. r.	-	n. r.
	<i>rplM</i>	50S ribosomal protein L13	n. r.	-	n. r.	1,39	0,03	2,62
	<i>rplN</i>	50S ribosomal protein L14	1,12	0,03	2,17	n. r.	-	n. r.
	<i>rplO</i>	50S ribosomal protein L15	1,53	0,03	2,89	1,63	0,04	3,09
	<i>rplP</i>	50S ribosomal protein L16	1,22	0,05	2,33	1,59	0,04	3,02
	<i>rplQ</i>	50S ribosomal protein L17	n. r.	-	n. r.	1,48	0,02	2,80
	<i>rplU</i>	50S ribosomal protein L21	1,28	0,02	2,42	1,75	0,00	3,36
	<i>rplV</i>	50S ribosomal protein L22	1,48	0,03	2,78	1,53	0,01	2,88
	<i>rplW</i>	50S ribosomal protein L23	1,46	0,02	2,75	1,69	0,00	3,22
	<i>rplX</i>	50S ribosomal protein L24	n. r.	-	n. r.	1,48	0,01	2,79
	<i>rpmC</i>	50S ribosomal protein L29	1,34	0,04	2,53	1,43	0,00	2,69
	<i>rpmD</i>	50S ribosomal protein L30	1,51	0,01	2,84	n. r.	-	n. r.
	<i>rpmJ</i>	50S ribosomal protein L36	n. r.	-	n. r.	1,52	0,02	2,88
	<i>rpmQ</i>	50S ribosomal protein L30	n. r.	-	n. r.	1,28	0,03	2,43
	<i>rpsB</i>	30S ribosomal protein S2	1,61	0,04	3,06	2,30	0,00	4,92
	<i>rpsC</i>	30S ribosomal protein S3	n. r.	-	n. r.	1,58	0,03	3,00
	<i>rpsD</i>	30S ribosomal protein S4	n. r.	-	n. r.	1,26	0,02	2,39
	<i>rpsE</i>	30S ribosomal protein S5	1,19	0,04	2,28	1,43	0,02	2,69
	<i>rpsF</i>	30S ribosomal protein S6	1,97	0,01	3,93	2,39	0,01	5,26
	<i>rpsG</i>	30S ribosomal protein S7	1,23	0,01	2,35	1,26	0,00	2,40
	<i>rpsH</i>	30S ribosomal protein S8	n. r.	-	n. r.	1,12	0,00	2,18
	<i>rpsI</i>	30S ribosomal protein S9	n. r.	-	n. r.	1,17	0,02	2,25
	<i>rpsJ</i>	30S ribosomal protein S10	1,95	0,03	3,86	2,00	0,04	4,01
	<i>rpsK</i>	30S ribosomal protein S11	n. r.	-	n. r.	1,51	0,02	2,85
	<i>rpsM</i>	30S ribosomal protein S13	n. r.	-	n. r.	1,78	0,05	3,45
	<i>rpsQ</i>	30S ribosomal protein S17	1,13	0,04	2,19	1,54	0,00	2,91
	<i>rpsR</i>	30S ribosomal protein S18	2,79	0,01	6,93	n. r.	-	n. r.
	<i>rpsS</i>	30S ribosomal protein S19	n. r.	-	n. r.	1,72	0,02	3,28
RNA Biogenese	<i>cysS</i>	cysteinyl-tRNA synthetase	1,11	0,01	2,16	n. r.	-	n. r.
	<i>SGGBAA2069_c02420</i>	hypothetical protein/putative ribonuclease III family protein	1,16	0,01	2,23	n. r.	-	n. r.
	<i>tilS</i>	tRNA(Ile)-lysidine synthetase	1,48	0,04	2,79	n. r.	-	n. r.
Stickstoff Balance	<i>gnlB</i>	nitrogen regulatory protein PII	1,85	0,01	3,62	n. p.	-	n. p.
	<i>GALLO_1945</i>	nitroreductase	n. p.	-	n. p.	1,50	0,01	2,83
	<i>yqaB</i>	acetyltransferase	n. r.	-	n. r.	1,47	0,01	2,77
Transkription	<i>GALLO_0107</i>	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	n. r.	-	n. r.	1,64	0,02	3,11

BAA-2069 und □CN 34: Erhöhte Genexpression			BAA-2069			□CN 34		
Funktion	Gen	Produkt	log2 Ratio	p-Wert	n-fach	log2 Ratio	p-Wert	n-fach
	<i>rpoA</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	n. r.	-	n. r.	1,78	0,04	3,44
	<i>tsf</i>	elongation factor Ts	n. r.	-	n. r.	1,74	0,04	3,34
Thiamin Biosynthese	<i>pdxK</i>	phosphomethylpyrimidine kinase	n. r.	-	n. r.	1,41	0,01	2,66
Transporter	<i>atmB</i>	ABC transporter ATP-binding protein	1,66	0,01	3,17	2,08	0,03	4,24
	<i>atpA</i>	F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit alpha	n. r.	-	n. r.	1,52	0,04	2,88
	<i>atpB</i>	F0F1 ATP synthase subunit A	1,40	0,03	2,64	2,40	0,02	5,26
	<i>atpE</i>	F0F1 ATP synthase subunit C	n. r.	-	n. r.	1,80	0,01	3,49
	<i>atpF</i>	F0F1 ATP synthase subunit B	1,47	0,01	2,76	2,27	0,01	4,82
	<i>atpH</i>	F0F1 ATP synthase subunit delta	n. r.	-	n. r.	2,10	0,00	4,27
	<i>cysA</i>	sulfate/thiosulfate import ATP-binding protein <i>cysA</i>	n. r.	-	n. r.	1,06	0,05	2,09
	<i>fhuC</i>	iron complex transport system ATP-binding protein	n. r.	-	n. r.	2,99	0,01	7,92
	<i>fhuD</i>	iron (Fe ³⁺) ABC transporter binding protein	n. r.	-	n. r.	2,93	0,02	7,63
	<i>GALLO_0402</i>	ABC transporter ATP-binding protein	n. r.	-	n. r.	1,42	0,03	2,68
	<i>GALLO_0414</i>	polar amino acid transport system substrate-binding protein	n. p.	-	n. p.	3,68	0,01	12,84
	<i>GALLO_0415</i>	amino acid ABC transporter membrane protein	n. p.	-	n. p.	2,07	0,00	4,19
	<i>GALLO_0902</i>	N-acetyltransferase GCN5	n. r.	-	n. r.	2,05	0,01	4,14
	<i>GALLO_1167</i>	cobalt/nickel transport system ATP-binding protein	n. r.	-	n. r.	1,25	0,04	2,38
	<i>GALLO_1168</i>	cobalt/nickel transport system permease protein	n. p.	-	n. p.	1,23	0,02	2,34
	<i>GALLO_1269</i>	N-acetyltransferase GCN5	n. p.	-	n. p.	1,23	0,00	2,35
	<i>GALLO_1301</i>	ABC transporter ATP-binding protein	n. p.	-	n. p.	1,48	0,03	2,79
	<i>GALLO_1745</i>	GNAT family acetyltransferase	n. p.	-	n. p.	1,09	0,02	2,12
	<i>GALLO_1845</i>	polar amino acid transport system substrate-binding protein	n. p.	-	n. p.	2,83	0,04	7,12
	<i>GALLO_1847</i>	amino acid ABC transporter substrate-binding protein	n. p.	-	n. p.	1,51	0,00	2,84
	<i>proB</i>	ABC transporter permease	n. r.	-	n. r.	1,48	0,01	2,79
	<i>ptsB</i>	phosphate import ATP-binding protein <i>ptsB</i>	n. p.	-	n. p.	1,12	0,02	2,17
	<i>sufD</i>	iron-sulfur ABC transporter	n. r.	-	n. r.	1,40	0,03	2,65
	<i>yjgC</i>	amino acid ABC transporter substrate binding protein	n. r.	-	n. r.	1,39	0,00	2,62
	<i>ytmK</i>	amino acid ABC transporter permease	1,00	0,01	2,01	1,66	0,04	3,16
	<i>rpsJ</i>	polar amino acid transport system substrate-binding protein	1,94	0,05	3,83	n. r.	-	n. r.
	<i>SGGBAA2069_c04070</i>	polar amino acid transport system substrate-binding protein	2,64	0,00	6,22	n. p.	-	n. p.
	<i>SGGBAA2069_c04080</i>	amino acid ABC transporter membrane protein	1,58	0,01	2,99	n. p.	-	n. p.
	<i>SGGBAA2069_c04090</i>	polar amino acid transport system ATP-binding protein	1,52	0,04	2,86	n. p.	-	n. p.
	<i>SGGBAA2069_c18050</i>	polar amino acid transport system substrate-binding protein	2,19	0,00	4,57	n. r.	-	n. r.
□nbekannte Funktion	<i>GALLO_0309</i>	hypothetical protein	n. r.	-	n. r.	1,18	0,01	2,26
	<i>GALLO_0353</i>	membrane protein	n. r.	-	n. r.	2,77	0,02	6,84
	<i>GALLO_0481</i>	hypothetical protein	n. p.	-	n. p.	1,01	0,05	2,02
	<i>GALLO_0527</i>	hypothetical protein	n. p.	-	n. p.	1,20	0,01	2,30
	<i>GALLO_0624</i>	hypothetical protein	n. p.	-	n. p.	2,70	0,02	6,48
	<i>GALLO_0742</i>	phosphoesterase	n. r.	-	n. r.	1,17	0,01	2,25
	<i>GALLO_0855</i>	hypothetical protein	n. r.	-	n. r.	1,14	0,03	2,20

BAA-2069 und □CN 34: Erhöhte Genexpression			BAA-2069			□CN 34		
Funktion	Gen	Produkt	log2 Ratio	p-Wert	n-fach	log2 Ratio	p-Wert	n-fach
	<i>GALLO_0975</i>	hypothetical protein	n. p.	-	n. p.	1,25	0,04	2,37
	<i>GALLO_1073</i>	hypothetical protein	n. p.	-	n. p.	1,16	0,01	2,23
	<i>GALLO_1171</i>	ATP-binding protein	n. r.	-	n. r.	1,59	0,01	3,00
	<i>GALLO_1176</i>	hypothetical protein	n. r.	-	n. r.	1,02	0,03	2,03
	<i>GALLO_1275</i>	hypothetical protein	n. p.	-	n. p.	1,84	0,02	3,59
	<i>GALLO_1342</i>	hypothetical protein	n. p.	-	n. p.	1,63	0,00	3,10
	<i>GALLO_1559</i>	membrane protein	n. r.	-	n. r.	1,26	0,03	2,40
	<i>GALLO_1637</i>	hypothetical protein	n. r.	-	n. r.	1,67	0,01	3,17
	<i>GALLO_1877</i>	aminotransferase AlaT	n. p.	-	n. p.	1,03	0,05	2,04
	<i>GALLO_2085</i>	hypothetical protein	n. r.	-	n. r.	2,38	0,02	5,19
	<i>GALLO_2086</i>	hypothetical protein	n. r.	-	n. r.	1,31	0,03	2,48
	<i>SGGBAA2069_c02390 /GALLO_0224</i>	hypothetical protein	1,24	0,04	2,36	1,42	0,04	2,67
	<i>SGGBAA2069_c06260</i>	hypothetical protein	1,80	0,01	3,49	n. r.	-	n. r.
	<i>SGGBAA2069_c07890</i>	hypothetical protein	1,99	0,01	3,96	n. r.	-	n. r.
	<i>SGGBAA2069_c12660</i>	hypothetical protein	1,71	0,02	3,28	n. p.	-	n. p.
	<i>SGGBAA2069_c13310</i>	hypothetical protein	1,36	0,04	2,57	n. p.	-	n. p.
Zellwand-/teilung	<i>dltA</i>	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 1	1,18	0,02	2,27	n. r.	-	n. r.
	<i>dltB</i>	D-alanine transfer protein DltB	2,16	0,01	4,46	3,25	0,02	9,48
	<i>dltC</i>	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 2	1,98	0,02	3,94	3,16	0,04	8,93
	<i>dltD</i>	D-alanine extramembranal transfer protein	2,77	0,01	6,83	3,51	0,02	11,36
	<i>ftsH</i>	cell division protein FtsH	1,14	0,05	2,20	1,59	0,01	3,01
	<i>lss</i>	N-acetylmuramidase/lysin	n. r.	-	n. r.	2,00	0,03	4,01
	<i>murB</i>	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase	n. r.	-	n. r.	1,31	0,01	2,47
	<i>rmlA</i>	glucose-1-phosphate thymidyltransferase	n. r.	-	n. r.	1,18	0,05	2,27
	<i>rmlC</i>	dTDP-4-dehydrohamnose 3,5-epimerase	n. r.	-	n. r.	1,22	0,03	2,33

Tabelle 4.8: Tabellarische Darstellung der Expression verschiedener Gene der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme BAA-2069 und □CN 34 nach fünfstündiger Inkubation in BHI Medium mit Lysozym verringert war (n = 3; n. r. = nicht reguliert; n. p. = im jeweiligen Genom nicht vorhanden; - = nicht relevant).

BAA-2069 und □CN 34: Verringerte Genexpression			BAA-2069			□CN 34		
Funktion	Gen	Produkt	log2 Ratio	p-Wert	n-fach	log2 Ratio	p-Wert	n-fach
Säure Toleranz	<i>satD</i>	putative secretion and acid tolerance protein SatD	n. r.	-	n. r.	-1,08	0,02	0,47
Antibiotika Resistenz	<i>norN</i>	multidrug resistance protein mdtK	n. r.	-	n. r.	-1,03	0,05	0,49
	<i>GALLO_0083</i>	penicillin binding protein 1B	n. r.	-	n. r.	-1,05	0,02	0,48
Kohlenhydrat Metabolismus	<i>bglA</i>	beta-glucosidase	n. r.	-	n. r.	-1,44	0,03	0,37
Kompetenz	<i>cglA</i>	putative competence protein	n. r.	-	n. r.	-1,39	0,04	0,38
	<i>comEA</i>	exogenous DNA-binding protein	n. r.	-	n. r.	-1,22	0,01	0,43
	<i>GALLO_0088</i>	putative competence protein, ABC transporter	n. r.	-	n. r.	-1,02	0,02	0,49
DNA-Bindung/-Reparatur	<i>GALLO_1840</i>	Rrf2 family transcriptional regulators	n. p.	-	n. p.	-1,76	0,00	0,30
	<i>GALLO_0923</i>	LysR family transcriptional regulator	n. p.	-	n. p.	-1,45	0,04	0,37
	<i>rggB</i>	transcriptional regulator	n. p.	-	n. p.	-1,43	0,03	0,37

BAA-2069 und □CN 34: Verringerte Genexpression			BAA-2069			□CN 34		
Funktion	Gen	Produkt	log2 Ratio	p-Wert	n-fach	log2 Ratio	p-Wert	n-fach
	<i>GALLO_1079</i>	AraC family transcriptional regulator	n. r.	-	n. r.	-1,56	0,03	0,34
H₂O₂ Toleranz	<i>dpr</i>	peroxide resistance protein Dpr	n. r.	-	n. r.	-1,07	0,04	0,48
Protease	<i>GALLO_1986</i>	putative O-sialoglycoprotein endopeptidase	n. p.	-	n. p.	-1,00	0,04	0,50
Protein Synthese	<i>miaA</i>	tRNA delta(2)-isopentenylpyrophosphate transferase	n. r.	-	n. r.	-1,32	0,02	0,40
	<i>GALLO_0368</i>	ribosome maturation protein RimP	n. r.	-	n. r.	-1,38	0,04	0,38
Ribosom	<i>thiE</i>	thiamine-phosphate pyrophosphorylase	n. r.	-	n. r.	-1,09	0,05	0,47
Thiamin Biosynthese	<i>frwB</i>	PTS system fructose-specific transporter subunit IIB	n. r.	-	n. r.	-1,52	0,05	0,35
Transporter	<i>GALLO_1155</i>	zinc transporter, ZIP family	n. p.	-	n. p.	-1,01	0,02	0,49
	<i>GALLO_2102</i>	CHY zinc finger family protein	n. r.	-	n. r.	-1,46	0,03	0,36
□nbekannte Funktion	<i>GALLO_1644</i>	hypothetical protein	n. r.	-	n. r.	-1,37	0,03	0,39
	<i>GALLO_2018</i>	hypothetical protein	n. r.	-	n. r.	-1,25	0,05	0,42
	<i>GALLO_1799</i>	hypothetical protein	n. r.	-	n. r.	-1,22	0,04	0,43
	<i>GALLO_0091</i>	hypothetical protein	n. r.	-	n. r.	-1,22	0,04	0,43
	<i>GALLO_0141</i>	hypothetical protein	n. r.	-	n. r.	-1,20	0,03	0,44
	<i>GALLO_0915</i>	hypothetical protein	n. p.	-	n. p.	-1,13	0,03	0,46
	<i>GALLO_1780</i>	hypothetical protein	n. p.	-	n. p.	-1,12	0,01	0,46
	<i>GALLO_0718</i>	hypothetical protein	n. p.	-	n. p.	-1,07	0,02	0,48
	<i>GALLO_1493</i>	hypothetical protein	n. r.	-	n. r.	-1,06	0,04	0,48
	<i>GALLO_1207</i>	short chain dehydrogenase	n. r.	-	n. r.	-1,04	0,02	0,49
	<i>GALLO_1447</i>	hypothetical protein	n. r.	-	n. r.	-1,02	0,04	0,49

Mit Hilfe der Transkriptomanalyse konnten insgesamt 67 Gene im Stamm BAA-2069 ermittelt werden, deren Expression durch die Zugabe von Lysozym erhöht war. Im Gegensatz dazu konnten keine Gene ermittelt werden, deren Expression durch Lysozym verringert wurde. Im *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm UCN 34 führte Lysozym zu einer erhöhten Expression von insgesamt 165 Genen, während die Expression von 30 Genen verringert war. Dabei war auffällig, dass die Expression vieler Gene, die für Proteine der Ribosomen kodieren, durch die Lysozym-Behandlung hochreguliert wurden (BAA-2069: 23 Ribosomen-kodierende Gene; UCN 34: 32 Ribosomen-kodierende Gene). Zusätzlich wurden viele Gene stärker exprimiert, die für Proteine kodieren, die an der Proteinbiosynthese, -faltung und -sekretion beteiligt sind (BAA-2069: 7 Gene; UCN 34: 18 Gene). In beiden Stämmen bewirkte Lysozym eine Erhöhung der Expression von Genen, die für Transportsysteme kodieren – wie zum Beispiel der ATP-Synthase im Stamm UCN 34. Außerdem wurden Gene verschiedener Metallionentransporter, wie zum Beispiel des Eisen/Schwefel ABC Transporters, exprimiert. Zudem wurden Gene stärker in Gegenwart von Lysozym exprimiert, deren Produkte verschiedenen metabolischen Wegen zugeordnet werden konnten. Dazu gehörten Gene, die für Proteine des Aminosäure-, Kohlenhydrat- und Fettsäuremetabolismus kodieren. Lysozym

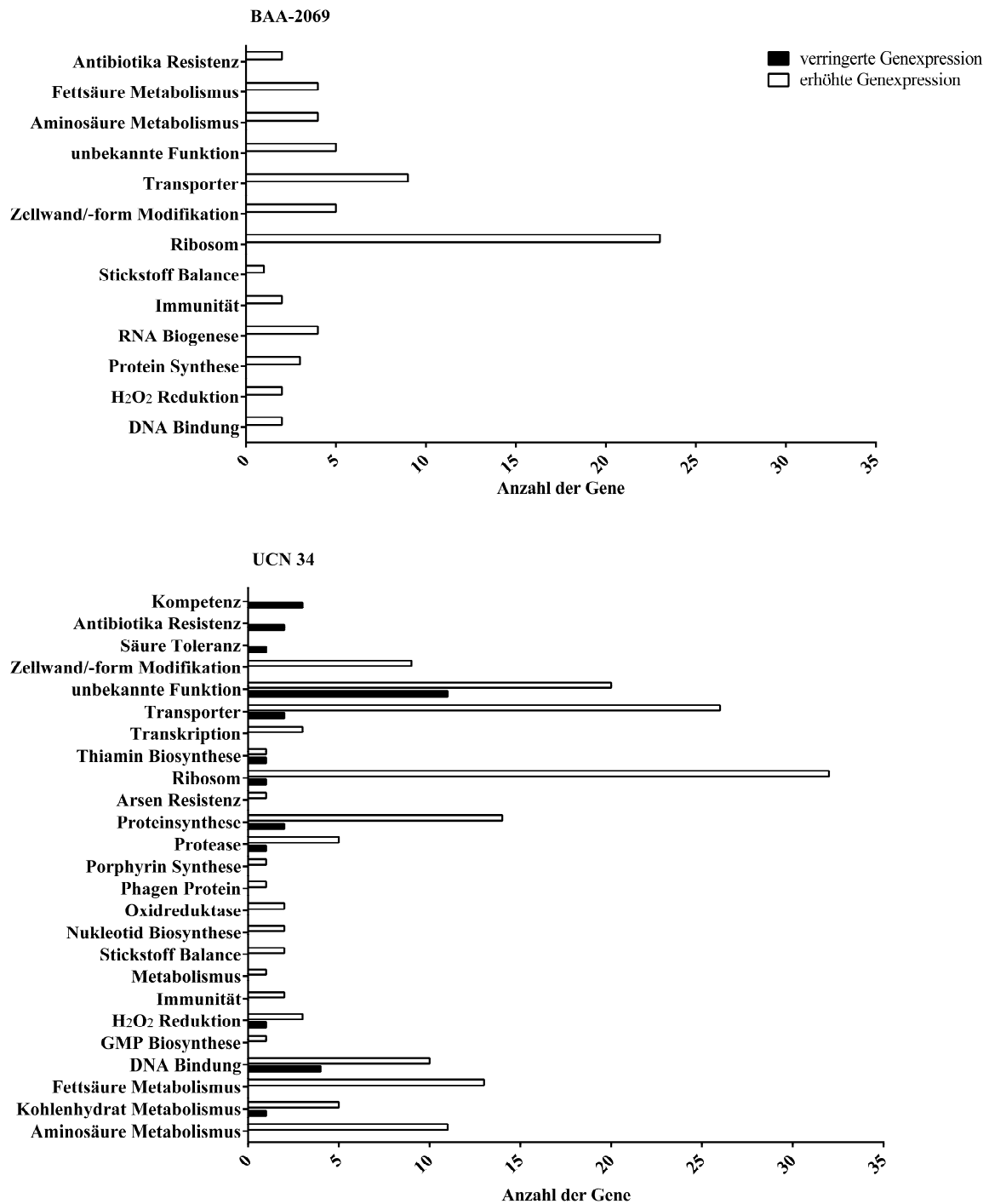


Abbildung 4.23: Anzahl der Gene, deren Expression durch Lysozym in den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen BAA-2069 und UCN 34 reguliert waren

Die Anzahl der Gene, dessen Expression erhöht (weiß) war und dessen Expression verringert (schwarz) in den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen BAA-2069 (oben) und UCN 34 (unten) war, sind nach Funktionen sortiert dargestellt. Untersucht wurde die Genregulation nach fünfständiger Inkubation mit Lysozym im Vergleich zur Inkubation ohne Lysozym.

bewirkte darüber hinaus eine Regulation der Expression von Genen, deren Produkte mit Antibiotika-Resistenzen assoziiert sind. Im *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm BAA-2069 wurde die Expression von zwei Antibiotika-Resistenz-assoziierten Genen (*SGGBAA2069_c00120*; *SGGBAA2069_c03220*) hochreguliert und im Stamm UCN 34 wurde

die Expression von zwei Antibiotika-Resistenz-assoziierten Genen (*norN*; *GALLO_0083*) herunterreguliert. Die Expression von Genen, deren Proteine mit einer Toleranz gegenüber H₂O₂ assoziiert werden (*ahpC*, *ahpF* und *naoX*), war in beiden Stämmen erhöht. Eine Ausnahme bildete dabei das Gen *dpr*, dessen Expression in Folge der Inkubation mit Lysozym verringert wurde. Des Weiteren wurden diejenigen Gene des *dlt* Operons stärker exprimiert, die die D-Alanylierung von Teichonsäuren bewirken. Auch Gene, die an der Zellteilung beteiligt sind, wurden stärker exprimiert. Daneben wurden Genexpressionen durch Lysozym reguliert, die der Immunität der Bakterien sowie der Kompetenz zugeordnet werden konnten. Die Genexpression der Gene *cinA* und *mccF* wurde in beiden untersuchten Stämmen erhöht, während die Genexpression der Gene *comEA*, *cglA* und *GALLO_0088* in UCN 34 herunterreguliert wurde. Viele Gene deren Expression reguliert waren, können derzeit noch keiner Funktion zugeordnet werden.

4.6.1 Verifikation der Transkriptomanalyse nach Lysozym-Behandlung mittels *Real-time* PCR

Die relative quantitative *Real-time* PCR wurde dazu genutzt, um die Microarray-Daten bei Lysozym-Zugabe (Tabelle 4.7 und Tabelle 4.8) zu verifizieren. Hierfür wurde die Expression von 13 Kandidatengenen, deren Expressionen laut Microarray-Analyse durch das Lysozym reguliert waren, untersucht. Diese Gene wurden schon zuvor mit Virulenzmechanismen oder *Quorum Sensing* assoziiert (Abbildung 4.24). Insgesamt wurden die Microarray-Daten bestätigt. Die Genexpressionsrate bei Bakterien in BHI mit 10 mg/ml Lysozym im Vergleich zur Kontrolle ohne Lysozym fiel mittels *Real-time* PCR nicht so hoch aus, wie in der Microarray-Analyse ermittelt wurde. So wurde zum Beispiel in der *Real-time* PCR eine zweifache Genexpressionserhöhung des Gens *dltD* im Vergleich zur Kontrolle berechnet, während die Microarray-Analyse eine Regulation der Expression um den Faktor sieben ermittelte. Außerdem konnte die Expressionserhöhung des Gens *gnlB* im Stamm BAA-2069 nicht mittels *Real-time* PCR verifiziert werden. Jedoch konnte im Stamm UCN 34 eine leichte Erhöhung der Expression dieses Gens ermittelt werden, die der Tendenz der mittels Microarray-Analyse ermittelten Expression entsprach. Anders verhielt es sich bei der Expression von *norN*. Die Expression dieses Gens im Stamm UCN 34 wurde laut Microarray-Analyse durch das Lysozym herunterreguliert. Mittels *Real-time* PCR wurde jedoch eine Hochregulierung der Expression dieses Gens im Stamm UCN 34 detektiert. Im *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm BAA-2069 wurde die Expression des Gens marginal herunterreguliert.

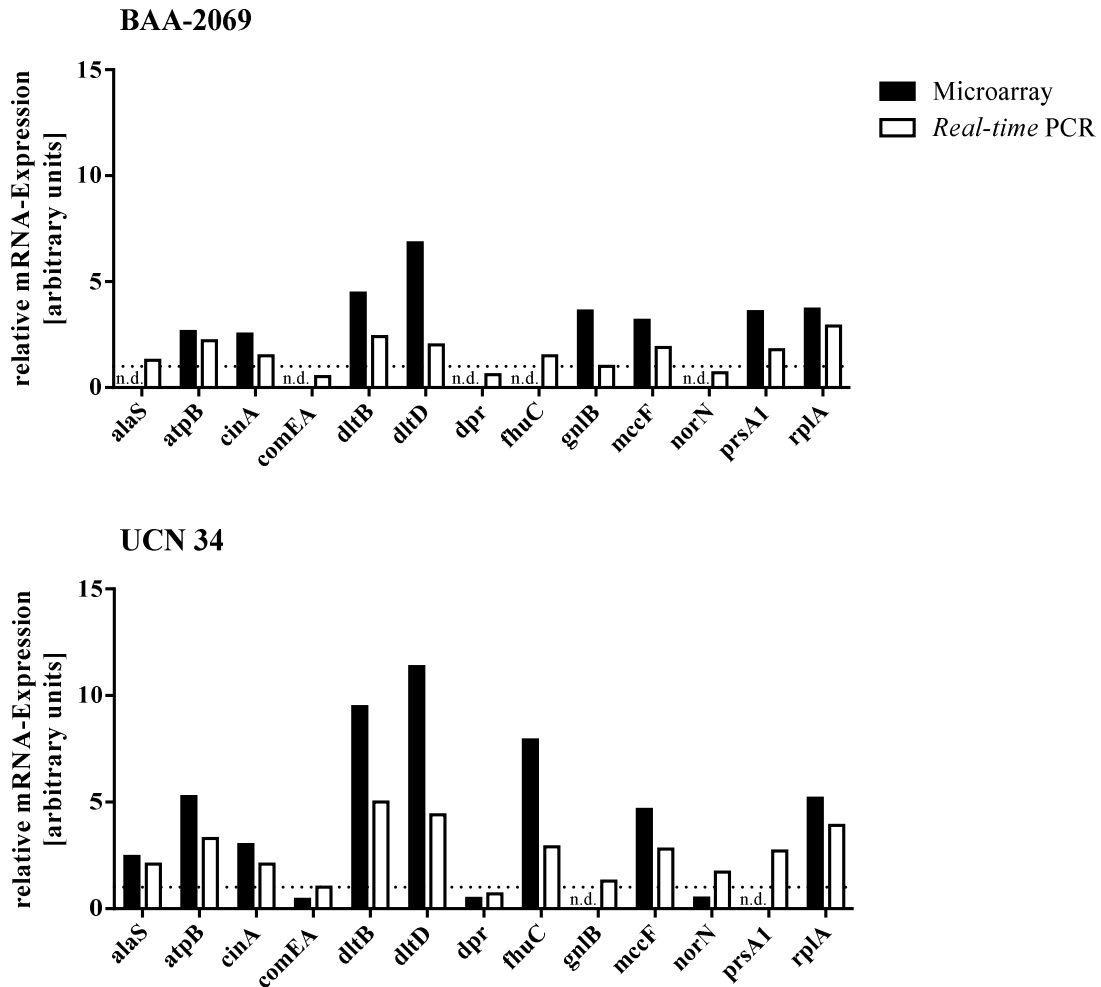


Abbildung 4.24: Verifizierung der durch Microarray-Analyse ermittelten Regulationen der Genexpressionen nach fünfstündiger Inkubation mit Lysozym mittels *Real-time* PCR

Dargestellt sind die relativen Änderungen der Expression von 13 Kandidatengenen fünf Stunden nach Zugabe von Lysozym im Vergleich zur Kontrolle ohne Lysozym. Die mit *Real-time* PCR ermittelte Genexpressionsregulation ist in weiß, die mit Microarray-Analyse ermittelte Genexpressionsregulation ist in schwarz abgebildet. Angegeben ist der jeweils berechnete Mittelwert (Microarray-Analyse: n = 3; *Real-time* PCR: n = 6; n.d. = nicht detektiert).

4.7 Analyse der Adhäsion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* an Kollagen Typ I

Die Adhäsion an Kollagen ist ein wichtiger Virulenzfaktor für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, da es an Kollagen im pathologisch veränderten Kolon adhärert, um parazellulär durch das Epithel zu gelangen und damit in den Blutkreislauf einzutreten. Zudem ist die Adhäsion an der extrazellulären Matrix des vorgeschädigten Herzens, von der ein Großteil aus Kollagen besteht, ausschlaggebend für die bakterielle Kolonisierung sowie der Vegetationsausbildung in der infektiösen Endokarditis. Im Kapitel 4.5.1 wurde bereits der Einfluss von Lysozym auf die Kollagen-Adhäsion untersucht. In diesem Kapitel wird analysiert, inwiefern die Kollagen-Adhäsion das Transkriptom von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* beeinflusst. Bereits in mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die

Adhäsionsfähigkeit von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* an Kollagen stammabhängig ist (Vollmer *et al.*, 2010a). Außerdem wurde exemplarisch die Adhäsion an Kollagen Typ I der fünf *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme DSM 16831, BAA-2069, LMG 17956, UCN 34 und ATCC 43143 im Vergleich zum *S. aureus* Stamm ATCC 25923 ermittelt (Abbildung 4.25). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in dieser Arbeit die Kollagen-Adhäsion mittels Transkriptomanalyse zweier *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme untersucht.

Für die Bestimmung der Adhäsion der Bakterien an Kollagen wurde die Kristallviolett-Färbung genutzt. Die dargestellten OD₅₅₀-Werte wurden aus der Absorption von an Kollagen gebundener Bakterien abzüglich der Absorption von an BSA gebundener Bakterien berechnet ($OD_{550} = OD_{550} \text{ Kollagenadhäsion} - OD_{550} \text{ BSA-Adhäsion}$). Es konnte gezeigt werden, dass der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm UCN 34 nach zweistündiger Inkubation in BHI am stärksten an Kollagen Typ I adhärert. Mittlere Adhäsionsfähigkeiten wurden im Vergleich zu den anderen Stämmen wurde für die Stämme BAA-2069 und ATCC 43143 ermittelt. Geringe oder keine Adhäsionsfähigkeiten konnten bei den Stämmen DSM 16831 und LMG 17956 sowie dem *S. aureus* Referenzstamm ATCC 25923 nachgewiesen werden.

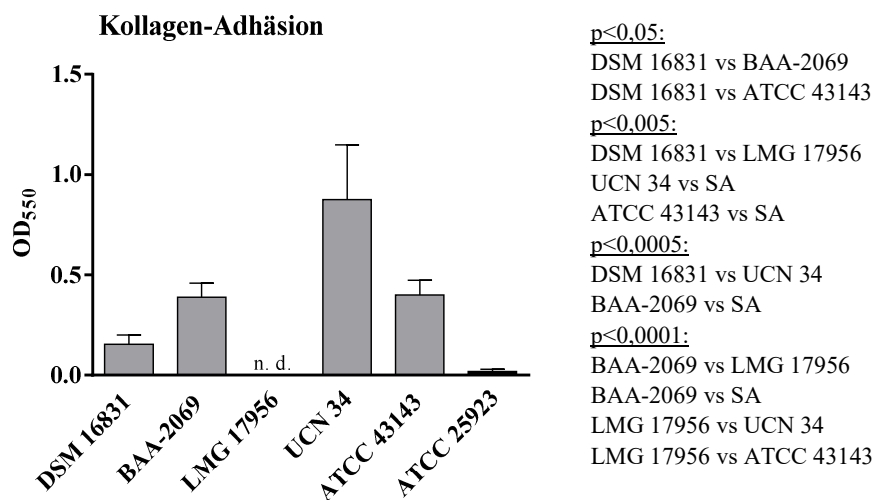


Abbildung 4.25: Adhäsion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen an Kollagen Typ I

Adhäsion Kristallviolett-gefärbter *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme DSM 16831, BAA-2069, LMG 17956, UCN 34 und ATCC 43143 sowie des *S. aureus* (SA) Stammes ATCC 25923 an Kollagen Typ I nach zweistündiger Inkubation in BHI. Dargestellt ist der Mittelwert der Absorption bei $\lambda = 550$ nm mit Standardfehler (n = 3). Berechnet wurde dieser Wert aus der OD₅₅₀ (Kollagen-Adhäsion) abzüglich der OD₅₅₀ (BSA-Adhäsion). Die Signifikanzen wurden mit dem Mann Whitney U-test berechnet (n. d. = nicht detektiert).

Die Ergebnisse der Kristallviolett-Färbung konnten durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden (Abbildung 4.26). Nur vereinzelte adhärente bakterielle Zellen konnten bei den Stämmen DSM 16831 und LMG 17956 detektiert werden. Mikrokolonien konnten nach Adhäsion an Kollagen Typ I bei den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen

BAA-2069, UCN 34 und ATCC 43143 beobachtet werden. Im Vergleich zur Kristallviolett-Färbung konnten bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse mehr adhärenente bakterielle Zellen des *S. aureus* Referenzstammes ATCC 25923 detektiert werden.

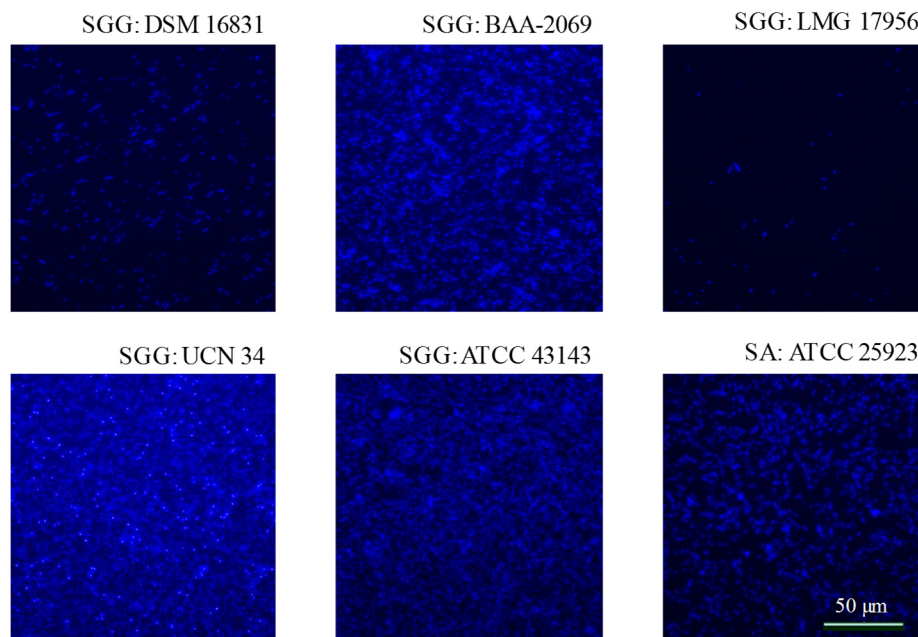


Abbildung 4.26: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen nach Adhäsion an Kollagen Typ I

Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von DAPI-markierten an Kollagen Typ I adhärenenten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (SGG) Stämmen DSM 16831, BAA-2069, LMG 17956, UCN 34 und ATCC 43143 sowie des *S. aureus* (SA) Stammes ATCC 25923.

4.7.1 Transkriptomanalyse von Kollagen-adhärenenten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen

Für die Transkriptomanalyse von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wurden zwei Stämme ausgewählt, die sich in ihrer Adhäsionsfähigkeit an Kollagen Typ I unterschieden. Der Stamm DSM 16831 adhärte nur marginal an Kollagen Typ I, während der Stamm UCN 34 stark an Kollagen Typ I adhärte. Die Analyse verglich das Transkriptom zwischen der Kontrolle (planktonische Zellen in BHI-Medium) mit dem Transkriptom der an Kollagen-adhärenenten Bakterien in BHI-Medium. Die Probennahme erfolgte nach zweistündiger Inkubation.

Durch die Adhäsion an Kollagen wurde die Expression von 40 Genen im *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm DSM 16831 hochreguliert (Tabelle 4.9). 20 dieser Gene konnten nur hypothetischen Proteinen zugeordnet werden, jedoch konnten diese zwei spezifischen Regionen im Genom von DSM 16831 zugeordnet werden. Zum einen einer Region, die Gene enthält, die für Phagen-Proteine kodieren und zum anderen eine Region, die einem *integrative and conjugative element* (ICE) zugeordnet werden konnte. Bei einer genomweiten *in silico* Analyse mittels PHAST wurden drei phagenassoziierte Regionen in DSM 16831 ermittelt

(Zhou *et al.*, 2011). Die durch Kollagen-Adhäsion auffälligen Gene konnten einer von drei Phagen-Regionen zugeordnet werden. Diese Phagenregion ist vollständig und besteht aus Genen, die für *attachment-site*, Integrase, t-RNA, Terminasen, *Head*- und *Tail*-Proteine sowie Proteasen kodieren. Die Sequenz dieser Phagen-Region weist hohe Ähnlichkeiten mit der des *Streptococcus* Phagen P9 (NC_009819) auf. Doch obwohl die Phagensequenz vollständig ist, konnten keine Phagen bei einem Plaquetest mit Kollagen-adhären Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die ICE-Sequenz, deren Expression einzelner Gene durch Kollagen-Adhäsion reguliert wurde, konnte mit Hilfe einer *in silico*-Analyse mittels ICEberg dem ICESp1116 von *Streptococcus pyogenes* zugeordnet werden (Bi *et al.*, 2012). Darüber hinaus wurde die Expression von Genen reguliert, die zum Beispiel für die Relaxase oder das traG-Protein kodieren und wichtig für die Transformation sind. Es konnten jedoch keine Resistenzgene in dieser ICE-Sequenz gefunden werden.

Tabelle 4.9: Gene vom *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm DSM 16831, deren Expression nach Kollagenadhäsion erhöht war (n = 3).

DSM 16831: Erhöhte Genexpression					
Funktion	Gen	Produkt	log2 Ratio	p-Wert	n-fach
Phagen Protein	SGGDSM16831_02550	phage head protein	1,10	0,02	2,15
	SGGDSM16831_02555	phage protein	1,43	0,02	2,69
	SGGDSM16831_02560	phage protein	1,36	0,02	2,58
	SGGDSM16831_02565	phage protein	1,03	0,02	2,05
	SGGDSM16831_02570	phage protein	1,26	0,01	2,40
	SGGDSM16831_02575	phage protein	1,12	0,05	2,17
	SGGDSM16831_02580	phage protein	1,02	0,03	2,03
	SGGDSM16831_02585	phage protein	1,11	0,02	2,16
	SGGDSM16831_02595	phage protein	1,28	0,02	2,43
	SGGDSM16831_02600	phage protein	1,16	0,04	2,23
	SGGDSM16831_02605	phage protein	1,08	0,01	2,12
	SGGDSM16831_02610	phage protein	1,14	0,03	2,20
	SGGDSM16831_02615	phage protein	1,28	0,03	2,42
	SGGDSM16831_02620	hypothetical protein	1,38	0,03	2,61
	SGGDSM16831_02630	hypothetical protein	1,23	0,02	2,34
Transposon Protein	SGGDSM16831_07290	relaxase	1,11	0,01	2,16
	SGGDSM16831_07295	mobilisation protein	1,35	0,00	2,55
	SGGDSM16831_07305	hypothetical protein	1,10	0,00	2,14
	SGGDSM16831_07320	putative transcriptional regulator	1,42	0,03	2,68
	SGGDSM16831_07335	conjugative transposon protein	1,71	0,02	3,27
	SGGDSM16831_07340	hypothetical protein	1,35	0,04	2,55
	SGGDSM16831_07355	hypothetical protein	1,67	0,03	3,19
	SGGDSM16831_07360	hypothetical protein	1,85	0,01	3,59
	SGGDSM16831_07365	hypothetical protein	1,29	0,02	2,45
	SGGDSM16831_07370	hypothetical protein	1,47	0,03	2,77

DSM 16831: Erhöhte Genexpression					
Funktion	Gen	Produkt	log2 Ratio	p-Wert	n-fach
	<i>SGGDSM16831_07375</i>	hypothetical protein	1,61	0,03	3,05
	<i>SGGDSM16831_07380</i>	hypothetical protein	1,61	0,01	3,05
	<i>SGGDSM16831_07390</i>	hypothetical protein	1,38	0,02	2,60
	<i>SGGDSM16831_07400</i>	hypothetical protein	1,30	0,03	2,47
	<i>SGGDSM16831_07410</i>	hypothetical protein	1,25	0,01	2,38
	<i>SGGDSM16831_07435</i>	extracellular protein	1,53	0,04	2,89
	<i>SGGDSM16831_07440</i>	hypothetical protein	1,93	0,03	3,81
	<i>SGGDSM16831_07445</i>	hypothetical protein	1,45	0,03	2,73
	<i>SGGDSM16831_07450</i>	hypothetical protein	1,33	0,03	2,52
	<i>SGGDSM16831_07455</i>	hypothetical protein	1,05	0,04	2,08
	<i>SGGDSM16831_07460</i>	hypothetical protein	1,05	0,01	2,08
	<i>SGGDSM16831_07470</i>	hypothetical protein	1,12	0,03	2,17
	<i>SGGDSM16831_07475</i>	hypothetical protein	1,18	0,00	2,27
	<i>ssb</i>	ssDNA-binding protein	1,43	0,03	2,69
	<i>traG</i>	TraG protein	1,19	0,02	2,28

Die Kollagenadhäsion führte im *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm UCN 34 zur Regulation anderer Gene als im Stamm DSM 16831. Die Expression von 26 Genen wurde hochreguliert, während die Expression von 31 Genen herunterreguliert wurde (Tabelle 4.10 und Tabelle 4.11). Die Expression von Genen des Aminosäuremetabolismus, zum Beispiel in der Isoleucin-Valin-Biosynthese (*ilvC* und *ilvH*), und Genen von Transportern des PTS Transportsystems sowie des unspezifischen Transports erhöhte sich durch die Bindung an Kollagen Typ I. Expressionen von Genen, deren Produkte zum Kohlenhydrat- und Lipidmetabolismus gehören und zum Beispiel an der Glykolyse (*GALLO_0137*) und dem Pentosephosphatweg (*dra*) beteiligt sind, wurden verringert. Außerdem sind die Expressionen eines Kompetenzgens (*GALLO_2014*) und Produkte der Stressantwort verringert. Die Expression von Genen von Transkriptionsfaktoren wurden sowohl hoch- als auch herunterreguliert. Vielen Genen konnte jedoch bislang kein Produkt beziehungsweise eine resultierende Funktion zugeordnet werden.

Tabelle 4.10: Gene vom *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm □CN 34, deren Expression nach Kollagenadhäsion erhöht war (n = 3).

□CN 34: Erhöhte Genexpression:					
Funktion	Gen	Protein	log2 Ratio	p-Wert	-fach
Aminosäuremetabolismus	<i>ilvC</i>	ketol-acid reductoisomerase	1,01	0,00	2,01
	<i>ilvH</i>	acetolactate synthase (small subunit)	1,04	0,05	2,05
	<i>GALLO_0983</i>	putative LrgA protein family	1,07	0,04	2,10
DNA Bindung	<i>GALLO_2218</i>	putative FtsK/SpoIIIE family protein	1,01	0,03	2,01
Nukleotid Bindung	<i>folC</i>	putative folyl-polyglutamate synthetase	1,16	0,04	2,23

□CN 34: Erhöhte Genexpression:					
Funktion	Gen	Protein	log2 Ratio	p-Wert	-fach
	<i>GALLO_0337</i>	putative dioxygenases related to 2-nitropropane dioxygenase	1,20	0,03	2,29
Protease	<i>GALLO_0591</i>	putative peptidase	1,58	0,04	3,00
Transkriptionsfaktor	<i>GALLO_2176</i>	putative transcriptional regulator; repressor of the trehalose operon	1,07	0,05	2,10
	<i>GALLO_1670</i>	putative transcriptional regulator, Cro/CI family	1,20	0,04	2,30
Transporter	<i>GALLO_0120</i>	putative PTS system, mannose-specific IID component	1,05	0,05	2,07
	<i>GALLO_2110</i>	putative permeases	1,06	0,02	2,08
	<i>GALLO_2083</i>	putative major facilitator superfamily transport protein	1,12	0,04	2,17
	<i>GALLO_0891</i>	putative major facilitator superfamily protein	1,18	0,04	2,26
	<i>GALLO_1734</i>	major Facilitator Superfamily protein	1,23	0,03	2,34
	<i>GALLO_2083</i>	putative major facilitator superfamily transport protein	1,25	0,04	2,38
	<i>nrgA</i>	ammonium transporter	1,40	0,01	2,64
	<i>GALLO_1593</i>	putative MATE family multidrug efflux pumps	1,03	0,04	2,04
tRNA Modifikation	<i>igt</i>	queuine tRNA-ribosyltransferase	1,22	0,05	2,33
□nbekannte Funktion	<i>GALLO_2204</i>	putative lipase	1,02	0,05	2,03
	-	nicht-kodierende Sequenz	1,05	0,04	2,08
	<i>GALLO_0703</i>	hypothetical protein	1,10	0,04	2,15
	<i>GALLO_0875</i>	conserved hypothetical integral membrane protein	1,12	0,05	2,17
	<i>GALLO_1423</i>	conserved hypothetical protein	1,14	0,04	2,20
	<i>GALLO_0720</i>	conserved hypothetical protein	1,14	0,05	2,21
	<i>GALLO_1659</i>	conserved hypothetical secreted protein	1,35	0,03	2,55
	<i>GALLO_0890</i>	conserved hypothetical secreted protein	1,36	0,03	2,57

Tabelle 4.11: Gene vom *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm □CN 34, deren Expression nach Kollagenadhäsion verringert war (n = 3).

□CN 34: Verringerte Genexpression					
Funktion	Gen	Produkt	log2 Ratio	p-Wert	n-fach
Kohlenhydrat Metabolismus	<i>GALLO_0137</i>	putative aldose 1-epimerase	-1,76	0,02	0,30
	<i>dra</i>	deoxyribose-phosphate aldolase	-1,69	0,02	0,31
	<i>GALLO_1022</i>	beta-glucosidase	-1,35	0,01	0,39
	<i>GALLO_0178</i>	galactose-6-phosphate isomerase, LacB subunit	-1,15	0,03	0,45
Zellwand	<i>GALLO_0019</i>	putative glucan-binding protein	-1,11	0,04	0,46
Kompetenz	<i>GALLO_2014</i>	putative histidine kinase of the competence regulon, ComD	-1,30	0,03	0,41
DNA Reparatur	<i>uvrC</i>	excinuclease ABC subunit C	-1,21	0,04	0,43
Lipid Metabolismus	<i>GALLO_1120</i>	putative phosphopantothienylcysteine Synthetase chain A	-1,41	0,03	0,38
	<i>dhaL</i>	dihydroxyacetone kinase domain-containing protein	-1,55	0,00	0,34
Metabolismus	<i>GALLO_1521</i>	putative phosphoglycerate mutase-like protein	-1,23	0,01	0,43
Proteinsynthese	<i>GALLO_1205</i>	maltose O-acetyltransferase	-1,25	0,03	0,42
RNA Metabolismus	<i>GALLO_1075</i>	putative addiction module toxin, Txe/YoeB family	-1,06	0,04	0,48
Stress Antwort	<i>GALLO_1031</i>	putative iron-sulfur cluster assembly/repair protein	-1,08	0,04	0,47
Toxin Biosynthese	<i>GALLO_1942</i>	CvpA family protein	-1,28	0,03	0,41
Transkriptionsfaktor	<i>GALLO_1908</i>	putative transcriptional regulator	-1,46	0,01	0,36
	<i>GALLO_0176</i>	lactose phosphotransferase system repressor	-1,28	0,03	0,41

□CN 34: Verringerte Genexpression					
Funktion	Gen	Produkt	log2 Ratio	p-Wert	n-fach
	<i>GALLO_1027</i>	putative transcription regulator	-1,02	0,05	0,49
Transporter	<i>GALLO_0156</i>	putative PTS system, cellobiose-specific IIC component	-1,10	0,01	0,47
	<i>GALLO_1170</i>	putative ABC transporter, ATP-binding protein	-1,06	0,00	0,48
Transposase	<i>tmp</i>	transposase for insertion sequence-like element IS1216	-1,31	0,02	0,40
Zweikomponenten-System	<i>GALLO_0045</i>	two-component sensor histidine kinase	-1,21	0,01	0,43
□nbekannte Funktion	-	nicht-kodierende Sequenz	-1,78	0,04	0,29
	-	nicht-kodierende Sequenz	-1,68	0,02	0,31
	-	nicht-kodierende Sequenz	-1,63	0,03	0,32
	<i>GALLO_1710</i>	putative lipoprotein	-1,62	0,01	0,33
	<i>GALLO_0980</i>	hypothetical protein	-1,52	0,05	0,35
	-	nicht-kodierende Sequenz	-1,52	0,03	0,35
	-	nicht-kodierende Sequenz	-1,40	0,04	0,38
	-	nicht-kodierende Sequenz	-1,30	0,02	0,41
	<i>GALLO_0535</i>	conserved hypothetical secreted protein	-1,14	0,01	0,45
	<i>GALLO_1199</i>	hypothetical protein	-1,05	0,04	0,48

4.7.2 Verifikation der Transkriptomanalyse nach Kollagen-Adhäsion mittels *Real-time* PCR

Bei der *Real-time* PCR zur Verifikation der Transkriptom-Studie der Kollagen-Adhäsion zweier *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme wurden nur die Genexpressionsraten für den jeweiligen Stamm überprüft. Die Gene, deren Expression in der Microarray-Analyse reguliert vorgefunden wurden, waren meistens einzig im jeweiligen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm nachweisbar. Die Microarray-Analyse ergab nur, im Vergleich zu den anderen Transkriptom-Analysen, wenige Gene, deren Expression durch die Kollagen-Adhäsion reguliert wurde. Aufgrund dessen wurden die Expression von nur zwei Kandidatengenen pro

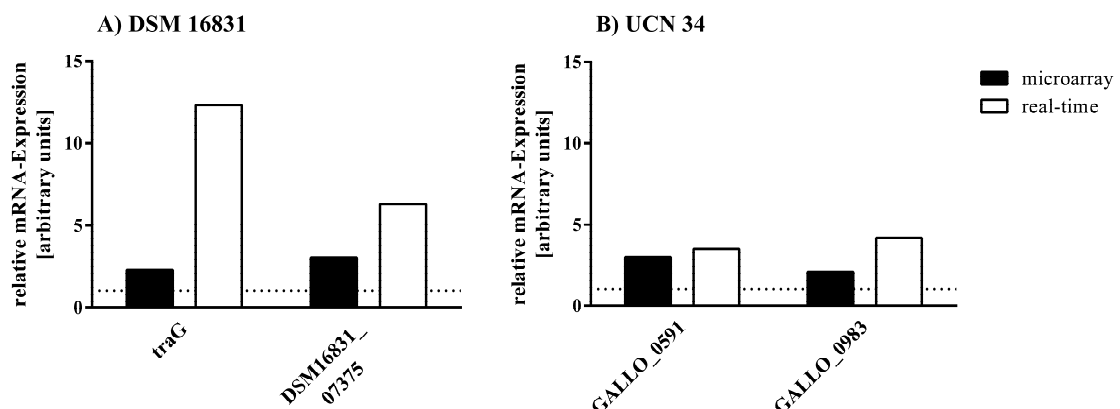


Abbildung 4.27: Verifizierung der durch Microarray-Analyse ermittelten Genexpressions-Regulation nach Adhäsion an Kollagen mittels *Real-time* PCR

Abgebildet ist die relative Änderung der Genexpression von der *Real-time* PCR- (weiß) und Microarray-Analyse (schwarz) sind im Vergleich dargestellt. Angegeben ist der berechnete Mittelwert (Microarray-Analyse: n = 3; *Real-time* PCR: n = 9).

Stamm untersucht (Abbildung 4.27). Für den Stamm DSM 16831 wurden mittels *Real-time* PCR größere Genexpressionsunterschiede bei den Genen *traG* (Microarray: 2,3-fach; *Real-time* PCR: 12,3-fach) und *DSM16831_07375* (Microarray: 3,05-fach; *Real-time* PCR: 6,3-fach) im Vergleich zur Kontrolle festgestellt als bei der Microarray-Analyse. Für die Gene *GALLO_0591* und *GALLO_0983* wurden sowohl bei der Microarray-Analyse als auch bei der *Real-time* PCR ungefähr gleich starke Erhöhungen der Genexpression berechnet.

5 Diskussion

S. gallolyticus subsp. *gallolyticus* wird in 10 % der Fälle von infektiösen Endokarditiden als Erreger identifiziert (Murdoch *et al.*, 2009). Bisher sind die Pathomechanismen dieses Erregers im Hinblick auf das Auslösen der infektiösen Endokarditis jedoch nur unvollständig charakterisiert.

Bei Analysen von Phänotypen verschiedener *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme wurde festgestellt, dass diese ein unterschiedliches Adhäsions- und Invasionspotential bei Endothelzellen aufweisen, wobei alle Stämme außer DSM 16831 in diese Zellen invadieren können (Vollmer *et al.*, 2010a). Es wurde außerdem nachgewiesen, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* sich *in vitro* in Vollblut replizieren kann. Eine Ausnahme bildete erneut der Stamm DSM 16831, der in Vollblut eines Probanden zum Teil abgetötet wurde, und zu einer früheren inflammatorischen Reaktion als andere Stämme in Vollblut führte (Grimm *et al.*, 2017c). Zusätzlich zu den Untersuchungen verschiedener Phänotypen wurden die Genome mehrerer *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme sequenziert und ein Subspezies-spezifisches MLST-Schema entwickelt, um mögliche Transmissionsrouten sowie die Epidemiologie untersuchen zu können (Rusniok *et al.*, 2010; Hinse *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011; Dumke *et al.*, 2014; Romero-Hernández *et al.*, 2015; Grimm *et al.*, 2017b). Auf Proteinebene wurden die Wirkung der Pilus-Proteine Pil1 und Pil3 im *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm UCN 34 mittels *Knockout*- und *Overexpression*-Mutanten untersucht. Beide Pilus-Proteine gelten als mögliche Virulenzfaktoren. Dabei wurde gezeigt, dass Pil1 an der Kollagenbindung, Biofilmbildung sowie allgemein an der Virulenz des Bakteriums beteiligt ist. Pil3 ist ein wichtiger Faktor bei der Adhäsion an die Kolonschleimhaut der Maus ist (Danne *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2015). Diese Arbeit bietet mit der Untersuchung des gesamten Transkriptom von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* einen neuen Aspekt zur Aufklärung potenzieller Pathomechanismen in einer infektiösen Endokarditis.

Für die Transkriptomanalyse wurden Phänotypen von fünf verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen untersucht. Die Genome der fünf *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme sind vollständig sequenziert (DSM 16831, BAA-2069, UCN 34 und ATCC 43143) oder liegen als *Shotgun*-Sequenz vor (LMG 17956). Außerdem konnten frühere Studien zeigen, dass sie *in vitro* unterschiedliche virulente Phänotypen aufweisen. In dieser Arbeit wurden die Phänotypen dieser Stämme hinsichtlich ihrer Phagozytose, den Phagozytose-assoziierten Faktoren (Kapitel 4.1, 4.2 und 4.4) sowie der Biofilmbildung unter verschiedenen Bedingungen (Kapitel 4.5 und 3.7) ermittelt. Zusätzlich zur Bestimmung des Phänotyps wurde das Transkriptom ausgewählter *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme mit Hilfe eines Microarrays analysiert (siehe Kapitel 4.5, 4.6 und 4.7.1).

5.1 Analyse der Interaktion von Makrophagen mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

Für die Kolonisierung am Endokard muss *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* die humanen Immunmechanismen umgehen beziehungsweise überleben. Wichtige Phagozyten, insbesondere bei Infektion des Endokards, sind Makrophagen (Benoit *et al.*, 2010). Boleij *et al.* zeigten, dass der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm UCN 34 länger in THP-1 Makrophagen überleben kann als *Bacillus subtilis* und *Lactobacillus plantarum* (Boleij *et al.*, 2011). In dieser Arbeit und einer vorherigen Studie konnte eine stammabhängige Aufnahme von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* sowie ein stammabhängiges Überleben in Makrophagen nachgewiesen werden. Dabei zeigten die Stämme BAA-2069 und UCN 34 einen gleichbleibenden intrazellulären Titer über ein paar Stunden in der vorherigen Studie (Grimm *et al.*, 2017c). Ziel der Arbeit war die weitere Charakterisierung der beobachteten Phänotypen, um mögliche Ursachen der stammabhängigen Unterschiede zu ermitteln (Abbildung 5.1).

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass die untersuchten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme sowohl in THP-1 Makrophagen als auch in primären Makrophagen über 24 Stunden überleben können, was das Auslösen einer Infektion im Wirt bevorteilt (Grimm *et al.*, 2017c). Dabei verursacht die Phagozytose von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* geringere Zytokingenexpressionen und Lyse der Makrophagen als *S. aureus*. Es wurden hohe Resistenzen gegenüber, aber auch stammabhängiges Überleben beziehungsweise Wachstum von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Gegenwart von Lysozym, Wasserstoffperoxid und niedrigem pH-Wert nachgewiesen. Die Ergebnisse dieser Versuche konnten auch zum Teil mit dem Überleben in THP-1 Makrophagen korreliert werden, da die Stämme DSM 16831 und LMG 17956 schneller in THP-1 Makrophagen abgebaut wurden. Der Stamm DSM 16831 war am Lysozym-sensitivsten und das Wachstum von LMG 17956 wurde durch Wasserstoffperoxid am stärksten inhibiert.

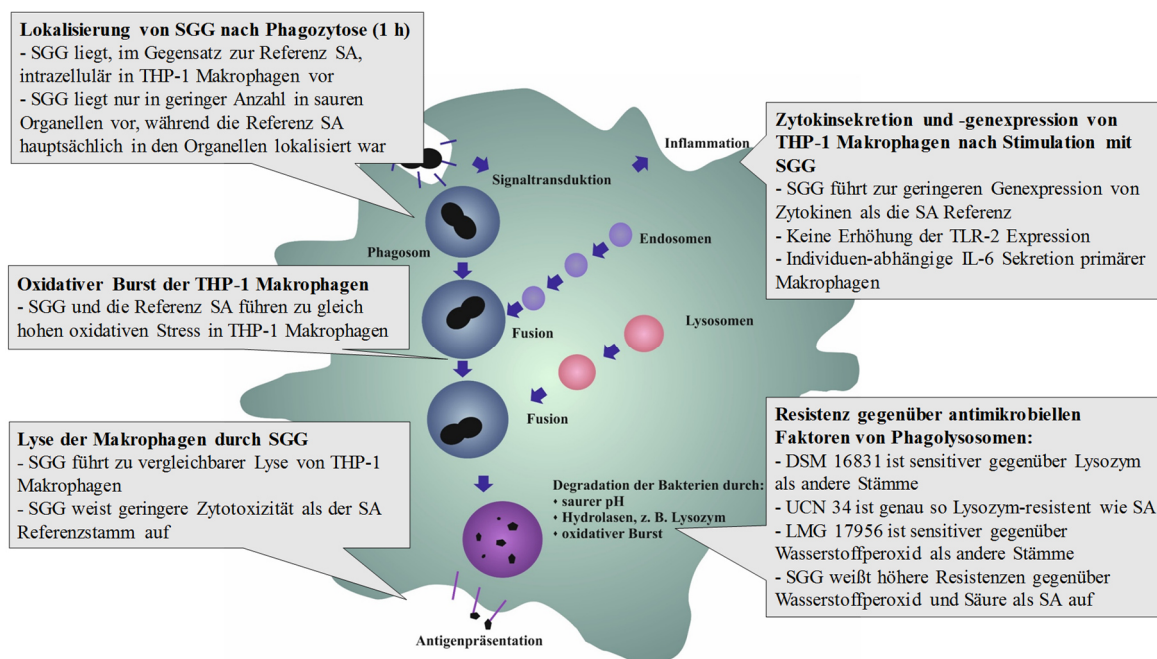


Abbildung 5.1: Ergebnisse dieser Arbeit im Zusammenhang mit der Phagozytose von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

Schematische Darstellung der Phagozytose von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* durch Makrophagen. In grau hinterlegt sind Ergebnisse der Analyse der Phagozytose, die in dieser Arbeit ermittelt wurden. SGG = *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*; SA = *S. aureus*

In dieser Arbeit wurde zunächst die Phagozytoserate und die Überlebensrate von fünf *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen im Vergleich zu einem *S. aureus* Stamm untersucht. Zusätzlich ließen sich die Ergebnisse, die durch Ausplattieren erzielt wurden, mittels fluoreszenzmikroskopischer Analysen erweitern. Es zeigte sich, dass die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme DSM 16831 und UCN 34 zu ungefähr gleicher Anzahl phagozytiert wurden und 2,5 Stunden nach Phagozytose ungefähr gleich viele vitale Bakterien nachweisbar waren. Neben der Analyse der intrazellulären Anzahl vitaler Bakterien durch koloniebildende Einheiten (KBE) kann auch die mikroskopische Analyse in die Phagozytoserate mit einfließen, da sie sowohl lebende als auch tote Zellen erfasst. Beim Vergleich der Methoden zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen der mikroskopisch- und der durch KBE-ermittelten Phagozytoserate des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stammes DSM 16831. So konnten mikroskopisch mehr Zellen vom Stamm DSM 16831 als vom Stamm UCN 34 ermittelt werden, während die Ermittlung der KBE ungefähr gleich viele vitale Zellen der beiden Stämme ergab. Dies deutet darauf hin, dass mehr bakterielle Zellen vom Stamm DSM 16831 mittels Phagozytose aufgenommen werden. Diese könnten so schnell in den Phagozyten abgetötet werden, dass sie zwar nicht mehr mittels Ausplattieren (vitale Zellen), aber noch mikroskopisch (vitale und tote Zellen) erfasst werden können. Anders verhielt es sich bei den *S. gallolyticus*

subsp. *gallolyticus* Stämmen BAA-2069 und LMG 17956 sowie dem *S. aureus* Stamm ATCC 25923. Hier konnten sowohl durch Ermittlung der KBE als auch mikroskopisch die meisten bakteriellen in etwa gleich viele und, verglichen mit den übrigen Stämmen, die meisten Zellen ermittelt werden. Das heißt die Abtötung in den Phagosomen erfolgt langsamer als beim Stamm DSM 16831. Ein bekannter, die Phagozytoserate beeinflussender Faktor, ist das Pilus-Protein Pili. Danne *et al.* konnten zeigen, dass *pilI*-KO-Mutanten wesentlich geringer von THP-1 Makrophagen phagozytiert werden (Danne *et al.*, 2014). Basierend auf diesen Ergebnissen müssten die Stämme DSM 16831 und LMG 17956, die kein *pilI*-Gen aufweisen, am geringsten phagozytiert werden. Es wurde jedoch ermittelt, dass die Stämme LMG 17956 und BAA-2069, von denen nur der Stamm BAA-2069 das *pilI*-Gen enthält, vergleichsweise stark phagozytiert wurden. Dementsprechend muss die Erkennung und Phagozytose des Erregers multifaktoriell und nicht nur von Pili abhängig sein.

Das Überleben der fünf untersuchten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme in THP-1 Makrophagen innerhalb von acht Stunden unterschied sich zwischen den untersuchten tierischen und menschlichen Isolaten. Die Stämme DSM 16831 und LMG 17956 wurden schneller abgetötet als die Stämme BAA-2069, UCN 34 und ATCC 43143 sowie der *S. aureus* Stamm ATCC 25923. Daher wurden die beobachteten Phagozytose-assoziierten Unterschiede der fünf untersuchten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme in dieser Arbeit in Bezug auf einzelne Aspekte der Phagozytose mittels THP-1 Makrophagen näher untersucht (Abbildung 5.1).

Eine erste Reaktion von Phagozyten auf Mikroorganismen ist der oxidative Burst (Slauch, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass in THP-1 Makrophagen, unabhängig vom Stamm gleich viele intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies gebildet wurden. Es wurde schon zuvor von Dupré-Crochet *et al.* ermittelt, dass der physiologische Wert von H_2O_2 in Phagosomen $30 \mu M$ beträgt (Dupré-Crochet *et al.*, 2013). Dadurch, dass in Medium mit einer hyperphysiologischen Konzentration von $10 mM H_2O_2$ alle untersuchten Stämme fast ohne Inhibition wachsen konnten, müssten diese auch in Phagosomen in Bezug auf den oxidativen Burst überleben können. Die Transkriptomanalyse mittels Microarray ermittelte weiterhin, dass die Expression von *nox* wahrscheinlich zur Reduktion von H_2O_2 in den Bakterien beiträgt und damit ein Überleben ermöglicht. Zusätzlich wurde in *Streptococcus sanguinis* gezeigt, dass *nox* ein möglicher Virulenzfaktor in der Endokarditis sein könnte. Es wurde nachgewiesen, dass *nox*-KO-Mutanten sensitiver gegenüber oxidativem sowie saurem Stress waren als der Wildtyp und dass die Virulenz dieses Erregers in einem IE-Modell in Kaninchen durch den *Knockout* geschwächt war (Ge *et al.*, 2016).

Mittels mikroskopischer Analyse konnte schon für verschiedene Bakterien gezeigt werden, dass sie Phagosomen lysieren können (Radtke *et al.*, 2011; Smith und May, 2013). *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ist nach der Phagozytose intrazellulär in THP-1 Makrophagen lokalisiert, jedoch konnten von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* weniger Zellen innerhalb von sauren Organellen lokalisiert werden als vom *S. aureus* Stamm ATCC 25923. Ein möglicher Grund könnte sein, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* die Ansäuerung von Phagosomen, wie auch *Streptococcus pyogenes*, verhindern kann (Nordenfelt *et al.*, 2012). Desweiteren könnte es sein, dass THP-1 Makrophagen nicht so schnell auf *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* reagieren wie auf *S. aureus*, und sich dies auf die Ansäuerung der Phagosomen auswirkt. Diese Erklärung würde mit der geringen Genexpression von Zytokinen in THP-1 Makrophagen nach Stimulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* sowie *S. aureus* übereinstimmen. In diesem Zusammenhang wird die Hypothese aufgestellt, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zu einer geringeren Stimulation der THP-1 Makrophagen führt. Dies geschieht nicht nur in Bezug auf die Genexpression von Zytokinen, sondern auch in Bezug auf die Ansäuerung von Phagosomen mittels V-ATPasen. Eine dritte Möglichkeit für die Erklärung der geringeren Zellzahl von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in sauren Organellen wäre, dass die untersuchten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme aus den Phagosomen entkommen und so im Zytosol persistieren können. Um neue Erkenntnisse zur Lokalisation der Bakterien und der Phagosomen beziehungsweise Phagolysosomen zu bekommen, könnten in zukünftigen Arbeiten Antikörper gegen Gram-positive Bakterien oder gegen LAMP-1 (*Lysosomal-associated membrane protein 1*) verwendet werden (Bellaire *et al.*, 2005). Gegen eine Replikation von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Zytosol von Makrophagen spricht, dass die Bakterien im Laufe der untersuchten acht Stunden Inkubation kontinuierlich abgetötet wurden.

Im sauren Medium konnten stammespezifische Unterschiede im Überleben von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* festgestellt werden. Es wurde gezeigt, dass die untersuchten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme signifikant besser bei saurem pH-Wert überleben können als der *S. aureus* Stamm ATCC 25923. In der Transkriptom-Analyse konnte jedoch nur ein Gen ausgemacht werden, das mit der Reaktion auf einen sauren pH in den Phagolysosomen assoziiert ist. Dabei handelt es sich um das Gen *atpC*, das für die Epsilonuntereinheit einer ATP-Synthase kodiert, die an der Resistenz gegen Säuren beteiligt ist (Cotter und Hill, 2003). ATP-Synthasen könnten also in *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zur Stress-Regulation bei hohen Protonen-Konzentrationen führen.

Neben einem sauren pH-Wert und reaktiven Sauerstoffspezies bewirken Hydrolasen die Degradation von Bakterien nach der Phagozytose. Eine wichtige Hydrolase ist Lysozym, das nach Stimulation durch Mikroorganismen sekretiert wird oder in den Phagolysosomen

akkumuliert (Shimada *et al.*, 2010; Helal *et al.*, 2012). Das Wachstum von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Medium mit Lysozym war stark stammabhängig, wobei nur der Stamm UCN 34 so resistent wie der *S. aureus* Stamm ATCC 25923 war. Für die nahe verwandte Bakterienspezies *Streptococcus bovis* wurde postuliert, dass Lysozym dazu genutzt werden kann zwischen humanen und bovinen Isolaten unterscheiden zu können, da bovine Isolate im Vergleich zu humanen Isolaten Lysozym-sensitiv sind (Kurtovic *et al.*, 2003). Dies konnte für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nicht nachgewiesen werden, da die Lysozym-Resistenz für das Kalbsisolat LMG 17956 und den humanen Endokarditisisolaten BAA-2069 und ATCC 43143 vergleichbar war. Auch beim Vergleich von insgesamt 20 tierischen und humanen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Resistenz zwischen den aus humanen und tierischen Wirten stammenden Isolaten festgestellt werden. Für andere Lysozym-resistente Bakterienspezies wurden Gene, wie zum Beispiel *oatA*, gefunden, deren Produkt die O-Acetyl Transferase OatA das Peptidoglykan in der Zellwand modifiziert, wodurch eine Hydrolyse verhindert wird (Herbert *et al.*, 2007; Veiga *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2011; Schreur *et al.*, 2012). Zudem wurden solche Gene häufig mit einer verlängerten Lebensdauer in Phagozyten sowie einer generellen Virulenz der Bakterien assoziiert. In der *in silico* Analyse konnte jedoch kein Gen in den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Genomen ermittelt werden, das die Lysozym-Resistenz mittels Peptidoglykan-Modifikationen erklären würde (Rusniok *et al.*, 2010; Davis und Weiser, 2011; Hinse *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011; Romero-Hernández *et al.*, 2015).

Ein weiterer Faktor, der durch Lysozym bewirkt wird, ist die Zellwanddegradation innerhalb von Phagosomen, die die IL-1 β -Sekretion der Phagozyten stimuliert (Shimada *et al.*, 2010). Die untersuchten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme waren hoch resistent gegenüber Lysozym und müssten dadurch weniger durch Lysozym in Phagosomen degradiert werden. Dies könnte die geringe Zytokin-Genexpressions-Erhöhung der THP-1 Makrophagen nach Phagozytose von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* erklären. Das würde auch erklären, warum der Lysozym-sensitivere Stamm DSM 16831 zu einer früheren beziehungsweise stärkeren inflammatorischen Antwort (Zytokinexpression) in Vollblut oder Monozyten sowie im geringen Maße in Makrophagen als andere untersuchten Stämme führte (Grimm *et al.*, 2017c). Eine weitere Ursache für die geringe Zytokingenexpression in THP-1 Makrophagen könnte die Veränderung von proinflammatorischen Signalkaskaden sein. Für *Streptococcus pyogenes* wurde gezeigt, dass dieses Bakterium die NF κ B-Signalkaskade der Zytokinexpression inhibieren kann (Hertzén *et al.*, 2010). Jedoch ist auffällig, dass der *S. aureus* Stamm, der die höchste Lysozym-Resistenz aufweist, die höchste Zytokin-Genexpression stimuliert. Es könnte sein, dass *S. aureus* aufgrund der Lyse von Makrophagen zu einer erhöhten

Zytokingenexpression im Vergleich zu *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* führt. Zusätzlich zu den Zytokingenexpressionen wurde auch die Genexpression des TLR-2-Rezeptors analysiert. TLR-2 – in Dimeren mit TLR-1 und TLR-6 vorkommend – ist ein Rezeptor, der sowohl auf der Zelloberfläche als auch in Phagosomen lokalisiert ist. Der Rezeptor erkennt verschiedene mikrobielle Komponenten, wie zum Beispiel Lipoteichonsäuren und Peptidoglykan, die insbesondere zur Identifizierung von Gram-positiven Bakterien wichtig sind (Lien *et al.*, 1999; Underhill *et al.*, 1999; Takeda und Akira, 2005). Für andere Bakterien wurde gezeigt, dass diese die TLR-2-Expression in Immunzellen stimulieren (Wang *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2014). Nach Inkubation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* konnte aber keine Genexpressionserhöhung dieses Rezeptors in THP-1 Makrophagen detektiert werden und auch der *S. aureus* Stamm ATCC 25923 führte nach Phagozytose nur zu einer sehr geringen Expressionserhöhung dieses Gens. Dies könnte darauf hinweisen, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* eventuell durch seine unbekannte Oberflächenstruktur schlechter von den Rezeptoren erkannt wird, weshalb es über den NF- κ B-Signalweg auch zu einer geringeren Genexpressionserhöhung der Zytokine führt.

Die untersuchten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme wurden intrazellulär aufgefunden, während *S. aureus*-Zellen zu fast gleichen Teilen intra- und extrazellulär lokalisiert waren. Es wurde schon zuvor gezeigt, dass der *S. aureus* Stamm ATCC 25923-Stamm zunächst tagelang in den Phagosomen persistiert und dann diese sowie die Makrophage lysiert (Kubica *et al.*, 2008). Diese Beobachtung wird auch vom Ergebnis des LDH-Assays unterstützt. Hier konnte jedoch schon nach fünf Stunden nachgewiesen werden, dass die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme DSM 16831 und LMG 17956 zu einer signifikant geringeren Lyse der THP-1 Makrophagen führen als der *S. aureus* Stamm ATCC 25923.

Die verwendete THP-1 Zelllinie wurde ursprünglich einem Jungen mit akuter Monozytenleukämie entnommen (Tsuchiya *et al.*, 1980). PMA-differenzierte Makrophagen dieser Zelllinie wurden bereits in vielen Studien für die *in vitro*-Untersuchung der Phagozytose verschiedener Pathogene genutzt (Mouithys-Mickalad *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2009; Srisuwan *et al.*, 2014; Masoudian *et al.*, 2015). Obwohl die THP-1 Makrophagen große Ähnlichkeiten zu Monozyten-gereiften Makrophagen haben, unterscheiden sie sich doch in manchen Eigenschaften (Kohro *et al.*, 2004; Daigneault *et al.*, 2010). In dieser Arbeit wurde in einem zweiten Modell die Differenzierung der Blutmonozyten zu M1-Makrophagen gewählt, da diese für die Tötung von Pathogenen sowie die Inflammation verantwortlich sind (Martinez und Gordon, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass die primären M1-Makrophagen die drei untersuchten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme effektiver als THP-1 Makrophagen abtöteten. Trotzdem wurden nach 24-stündiger Inkubation immer noch vitale bakterielle Zellen

aller drei Stämmen nachgewiesen, ohne jedoch stammabhängige Unterschiede bezüglich der Überlebensrate festzustellen.

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Ergebnisse von drei verschiedenen Probanden sowie drei verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen aus verschiedenen Assays (Weinstock, 2014).

	Assay	Proband 1	Proband 2	Proband 3
DSM16831	Überleben in Blut	--	0	0
	IL-6 Konz. Blut (48 h)	+++	++	++
	Phagozytoserate	0	0	+
	IL-6 Konz. Makrophagen (5 h)	++	++	+++
BAA-2069	Überleben in Blut	+	+	+
	IL-6 Konz. Blut (48 h)	+	0	0
	Phagozytoserate	0	++	++
	IL-6 Konz. Makrophagen (5 h)	++	++	+++
UCN34	Überleben in Blut	++	++	++
	IL-6 Konz. Blut (48 h)	+	0	0
	Phagozytoserate	0	0	+
	IL-6 Konz. Makrophagen (5 h)	++	++	+++

Die Ergebnisse der Analysen sind wie folgt skaliert: ---; --; -; 0; +; ++; +++. Dabei steht --- für geringes Überleben im Blut, geringe IL-6 Konzentration; keine Plättchen-Aggregation und geringe Phagozytoserate. Im Gegensatz dazu steht +++ für Wachstum von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Blut, sehr hohen IL-6 Konzentration, schnelle Plättchen Aggregation und hohe Aufnahme der bakteriellen Zellen durch Phagozytose. 0 steht für eine mittelmäßige Reaktion der Zellen.

Im Gegensatz zu stammabhängigen Unterschieden in der Überlebensrate in THP-1 Makrophagen, wurden marginale Unterschiede zwischen den primären Makrophagen der einzelnen Spender in Bezug auf die Phagozytoserate und IL-6 Sekretion erfasst (Tabelle 5.1). Die Zellen der gleichen Probanden wurden bereits zuvor für die Untersuchung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in einer vorherigen Studie in einem Vollblut-Assay genutzt (Weinstock, 2014). Auffällig sind die Makrophagen des Probanden 3. Bei den Monozytengereiften Makrophagen dieses Probanden wurde fünf Stunden nach Phagozytose eine höhere IL-6 Konzentration nachgewiesen als bei den Makrophagen der anderen Probanden. Dieser Phänotyp könnte auf genetische Prädispositionen hindeuten, die zum Beispiel auf Einzelnukleotidvarianten zurückzuführen sind. Zuvor wiesen bereits verschiedene Studien Einzelnukleotidvarianten nach, die einen Einfluss auf die Sekretion von IL-6 haben (Bennermo *et al.*, 2004; Tischendorf *et al.*, 2007). In anderen Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass Einzelnukleotidvarianten mit dem Phagozytosevermögen von Makrophagen verschiedener Individuen korrelierten. Zum Beispiel wurden in den Genen vom Rezeptor P2RX (P2-Purinorezeptoren) oder vom Adhäsionsmolekül ITGAM (Integrin α -M) Varianten ermittelt, die die Phagozytose beeinflussen (Rhodes *et al.*, 2012; Gu *et al.*, 2013). In dieser Arbeit wurden jedoch nur geringfügige Unterschiede im Aufnahmevermögen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* durch Makrophagen verschiedener Probanden festgestellt (Tabelle 5.1).

Eine weitere Beobachtung in dieser Arbeit waren die Unterschiede in der Phagozytoserate von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* durch THP-1 Makrophagen beziehungsweise Monozyten-gereiften Makrophagen. So wurden zum Zeitpunkt 0 h mehr bakterielle Zellen in THP-1 Makrophagen als in Monozyten-gereiften Makrophagen nachgewiesen. Daneben wurde eine höhere IL-6 Konzentration im Überstand von Monozyten-gereiften Makrophagen als im Überstand von THP-1 Zellen nachgewiesen. Eine mögliche Ursache könnten die unterschiedliche Herkunft sowie Differenzierung der THP-1-Zellen zu Monozyten-gereiften Makrophagen sein. Monozyten gehen *in vitro* ohne Stimulationen durch *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) oder *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) in die Apoptose. Im Gegensatz dazu können sich die Monozyten der leukämischen Zelllinie THP-1 ohne Stimulus unbegrenzt teilen (Kohro *et al.*, 2004). Aufgrund dessen wurden die primären Monozyten und THP-1 Zellen unterschiedlich differenziert. PMA inhibiert die Proliferation von THP-1 Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus (Traore *et al.*, 2005). Zusätzlich aktiviert es die Protein Kinase C und damit die MAP Kinase Signaltransduktion, die wiederum zu einer höheren Phagozytose von Mikroorganismen und Zytokinen führen kann (Richter *et al.*, 2016). Im Gegensatz dazu werden die primären Monozyten mit M-CSF und zusätzlich mit Interferon- γ (IFN- γ) differenziert. Diese Stimulierung führt zur Differenzierung zu proinflammatorischen M1 Makrophagen, die unter anderem darauf spezialisiert sind Pathogene abzutöten (Martinez und Gordon, 2014). Die Stimulierung der primären Monozyten mittels der Zytokine M-CSF und IFN- γ aktivierte die Inflammation der Zellen schon bevor die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Zellen hinzugegeben wurden. Dadurch könnten die höheren IL-6 Konzentrationen von primären Monozyten im Vergleich zu THP-1 Makrophagen erklärt werden.

5.1.1 Transkriptomanalyse von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nach Phagozytose durch THP-1 Makrophagen

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine Transkriptomanalyse über das gesamte Genom von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* durchgeführt. Dadurch konnten wichtige Faktoren in der Pathogenese von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ermittelt werden.

Für die Kolonisierung am Endokard, muss *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* die Immunantwort des Wirts überleben, bei der Makrophagen am Endokard eine wichtige Rolle spielen (Benoit *et al.*, 2010). Weiterhin sekretieren diese Makrophagen Lysozym, das die Adhäsion und Kolonisierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* am Endokard fördern kann. Aufgrund dessen wurden sowohl das Transkriptom nach Phagozytose, in Gegenwart von Lysozym (Kapitel 5.2.1) als auch nach Adhäsion an Kollagen Typ I (Kapitel 5.2.2) untersucht.

Bei den Transkriptomanalysen ist zu beachten, dass es immer nur einen bestimmten Zeitpunkt sowohl der Kontrollen als auch der veränderten Bedingungen widerspiegelt. Dabei kann sich das Transkriptom von Bakterien innerhalb von wenigen Minuten verändern (Zeller *et al.*, 2005). Deshalb muss bedacht werden, dass zu anderen Zeitpunkten auch andere Genexpressions-Unterschiede festgestellt werden könnten, die die jetzigen Ergebnisse komplementieren könnten oder Hinweise auf weitere Signalwege sowie Virulenzfaktoren geben.

Die Transkriptomanalyse von den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen BAA-2069 und UCN 34 erfolgte zu drei Zeitpunkten. Das Transkriptom nach Adhäsion der Bakterien an THP-1 Makrophagen (-60 min) wurde mit dem Transkriptom direkt nach Phagozytose (0 h) und fünf Stunden nach Phagozytose (5 h) verglichen. Die Microarray-Analyse führte zu der Annahme, dass die Genexpressions-Regulation der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme BAA-2069 und UCN 34 nach der Phagozytose durch THP-1 Makrophagen unterschiedlich sind, da wesentlich weniger Genexpressionsregulationen im Stamm UCN 34 ermittelt wurden. Dagegen spricht die Verifizierung dieser Ergebnisse durch die relative quantitative *Real-time* PCR. Diese zeigte im Stamm UCN 34 die gleiche Genexpressionsregulation der gleichen Gene, wie sie im Stamm BAA-2069, wie zum Beispiel bei den Genen des *dlt* Operons, ermittelt wurden. Auch in anderen Studien wurden Unterschiede in den Ergebnissen zwischen der Microarray-Analyse und der *Real-Time* PCR ermittelt (Song *et al.*, 2009; Gómez-Sagasti *et al.*, 2014). Diese Unterschiede könnten auf die weniger sensitive Methode des Microarrays zurückzuführen sein. Zusätzlich mussten methodenbedingt unterschiedliche Berechnungen angewandt werden, um die Unterschiede in den Genexpressionen zu ermitteln. Wegen der wahrscheinlichen Übereinstimmung der Transkriptome beider Stämme nach Phagozytose wird im Folgenden nicht zwischen den beiden Stämmen unterschieden.

Es zeigte sich, dass am Anfang der Phagozytose die Expression des Gens *nox* erhöht wurde. Dies kodiert für ein ROS-metabolisierendes Enzym (NADH-Oxidase), die Sauerstoffradikale zu Wasser katalysiert. Dadurch können die Katalase-negativen Streptokokken dem oxidativen Burst der Makrophagen entgegenwirken. Weiterhin gilt die NADH-Oxidase auch als Virulenzfaktor in verschiedenen Streptokokken (Gibson *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2001; Baker *et al.*, 2014). Neben der Expression von *nox* wurden auch Gene, wie zum Beispiel *levA*, die für Proteine des PTS-Systems kodieren, zum 0 h-Zeitpunkt stärker exprimiert. Diese Transportsysteme werden synthetisiert, wenn die bevorzugte Kohlenhydrat-Quelle des Bakteriums nicht mehr vorhanden ist (Deutscher *et al.*, 2006). Die Regulation der Expression dieser Gene kann durch die Phagozytose aus nährstoffreichem Medium in Phagosomen erklärt werden. Eine Erhöhung der Expression dieser Gene wurde nicht nur am Anfang der Phagozytose (0 h), sondern auch fünf Stunden nach der Phagozytose ermittelt.

Nach fünfstündiger Inkubation liegen die Bakterien in gereiften Phagolysosomen vor (Underhill und Goodridge, 2012). Zu diesem Zeitpunkt wurde, neben der Genexpressionsregulation von PTS-Transportsystem-Genen, hauptsächlich die Expression von Genen reguliert, die am Kohlenhydrat-Metabolismus, an der Zellwand-Synthese und an der Zellformgebung beteiligt sind. Die Veränderungen im Kohlenhydrat-Metabolismus zeigen sich zum Beispiel dadurch, dass die Gene des *glg* Operons verstärkt exprimiert wurden. Die Produkte dieses Operons bewirken die Glykogen-Synthese. Die Expression dieser Proteine ist abhängig vom Angebot an Kohlenhydraten und der Wachstumsphase, in der sich die Zelle gerade befindet. Zudem sind die Proteine entscheidend für die Anpassung an neue Umweltbedingungen (Goh und Klaenhammer, 2013). Die Glykogen-Synthese ermöglicht zum Beispiel das Überleben unter wachstumslimitierenden Bedingungen (Goh und Klaenhammer, 2014). Die kombinierte Regulation des *glg* Operons mit der Aufnahme von Zuckern über PTS Transportsysteme wurde bereits zuvor in *Escherichia coli* während der stationären Wachstumsphase nachgewiesen (Seok *et al.*, 2001). Die Regulation beider Mechanismen, die Expression weiterer Gene des Kohlenhydrat-Metabolismus und des LacI Transkriptions-Regulators (*SGGBAA2069_c7250*) weisen auf Nahrungsmangel von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in den Phagosomen hin. Der LacI Transkriptionsfaktor (erhöht exprimiert) sowie der Transkriptionsfaktor der MarR Familie (*SGGBAA2069_c227110*; geringer exprimiert) wirken auf die Regulation des Maltose Operons. Zu diesem Operon gehören die Gene *malM* und *malF*, deren Expression nach Phagozytose erhöht waren. Die Produkte dieser Gene gehören einem Maltose-Transportsystem an (Nieto *et al.*, 1997). Die Regulation der Expression des *glg* Operons sowie der PTS Transportsysteme könnte auch auf die Überführung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* von einer aeroben zu einer anaeroben Umgebung (vom Medium zum Phagosom) zurückzuführen sein. Unterschiedliche Wachstumsbedingungen (aerob im Vergleich zu anaerob) führten in *Streptococcus intermedius* ebenfalls zu einer stärkeren Genexpression dieser Proteine (Fei *et al.*, 2016).

Weiterhin ist die höhere Expression des Gens *SGGBAA2069_c13580* interessant, da dieses Gen in *in silico* Analysen hohe Ähnlichkeiten mit dem Gen *atla* von *Streptococcus mutans* aufwies. Das Produkt dieses Gens, ein Autolysin, ist an der Zellteilung beteiligt (Mesnage *et al.*, 2014). In *S. mutans* ist dieses Protein an der Fibronectin-Bindung, am bakteriellen Überleben in Blut und an der Phagozytose-Resistenz beteiligt. Deshalb postulierten Jung *et al.*, dass Atla ein wichtiger Virulenzfaktor in der infektiösen Endokarditis sei (Jung *et al.*, 2009). Die Transkriptom-Studie deutet daraufhin, dass dieses Autolysin in *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ebenfalls zum Überleben in Phagozyten beitragen und damit ein wichtiger

Virulenzfaktor sein könnte. Aufgrund dessen wäre es für zukünftige Studien sehr interessant, die Funktion des Autolysins in *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zu ermitteln.

Eine weitere Wirkung hatte die Phagozytose auf die Expression der Gene des *dlt*-Operons (*dltA-D*), deren Expression stark erhöht wurde. Die Produkte dieses Operons katalysieren die Veresterung von Lipo- und Wandteichonsäuren mit *D*-Alanin. Dadurch werden die negativen Ladungen von Phosphatgruppen in der Zellwand zum Teil neutralisiert (Gross *et al.*, 2001). Die *D*-Alanylierung der Teichonsäuren moduliert die Aktivität von Autolysin, erhält die Kation-Homöostase des Bakteriums und bestimmt die elektromechanischen Eigenschaften der Zellwand (Neuhaus und Baddiley, 2003). Die Proteine des *dlt* Operons sind ebenfalls wichtige Virulenzfaktoren in Pathogenen. Durch die Veresterung können Bakterien besser an verschiedene humane Zellen und Oberflächen adhären sowie humane Zellen invadieren. Außerdem führt die *D*-Alanylierung zu einer gesteigerten Überlebenswahrscheinlichkeit verschiedener Bakterien in Ratten und Mäusen und bei niedrigem pH-Wert. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die *D*-Alanylierung zur Biofilmbildung beiträgt (Gross *et al.*, 2001; Abachin *et al.*, 2002; Lieberman und Frankel, 2002; Poyart *et al.*, 2003). In Bezug auf die Phagozytose spielt die Resistenz durch *D*-Alanylierung gegen kationische antimikrobielle Peptide, wozu auch Lysozym gehört, eine wichtige Rolle (Collins *et al.*, 2002; Reichmann *et al.*, 2013). Es wurde gezeigt, dass *Streptococcus agalactiae*-Mutanten ohne *D*-alanylierte Teichonsäure wesentlich schneller abgetötet werden als der Wildtyp-Stamm, was zur Virulenz des Wildtyps beiträgt (Poyart *et al.*, 2003). Aufgrund der starken Regulation des *dlt* Operons in *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nach Phagozytose könnten die Produkte dieses Operons ebenfalls als wichtige Virulenzfaktoren in dieser Bakterienspezies fungieren und zum Überleben im Wirt beitragen.

5.2 Biofilmbildung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* unter verschiedenen Einflussfaktoren

Die infektiöse Endokarditis ist eine Biofilm-assoziierte Erkrankung, die in fünf Stadien einzuteilen ist:

- a) Verletzung des Endothels
- b) Bildung eines sterilen Thrombus an der Läsion
- c) Adhäsion von Bakterien am Thrombus
- d) Bildung von Mikrokolonien durch Bakterien
- e) Reifung der Biofilm-Vegetation und Embolisierung durch Abtrennung eines Teils des Biofilms (Parsek und Singh 2003)

Biofilme schützen Bakterien vor Antibiotika sowie dem Immunsystem des Wirts (Prakash *et al.*, 2003; Fux *et al.*, 2005). Zusätzlich haben Pathogene verschiedene Mechanismen entwickelt, die die Biofilmbildung in Gegenwart dieser Faktoren erhöhen (Mohamed und Huang, 2007; Jang *et al.*, 2016). In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine Bakterienspezies in Medium mit Lysozym vermehrt einen Biofilm an Polystyrol bildet. Diese Reaktion konnte nach fünf Stunden für die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme BAA-2069 und LMG 17956 und nach 16 Stunden zusätzlich für die Stämme UCN 34 und ATCC 43143 nachgewiesen werden. Nur die Biofilmbildung des Lysozym-sensitiven Stammes DSM 16831 wird durch Lysozym inhibiert. Bereits in vorherigen Studien konnte für verschiedene Pathogene gezeigt werden, dass Lysozym (immobilisiert oder in Lösung) die Biofilmbildung inhibiert, jedoch nicht, dass Lysozym auch zur Stimulation der Biofilmbildung führen kann (Sudagidan und Yemenicioglu, 2012; Rajaraman *et al.*, 2014). Die mittels Kristalviolett und KBE ermittelten Ergebnisse zur Biofilmbildung in Makrophagen scheinen nicht zu korrelieren. So war die Anzahl vitaler Bakterien des Stammes BAA-2069 in Gegenwart von Lysozym nach 16 Stunden Inkubation gering, obwohl die Kristallviolett-Färbung und die mikroskopische Analyse auf eine verstärkte Biofilmbildung durch Lysozym hinwies. Sjollema *et al.*, konnten anhand von verschiedenen Bakterienspezies zeigen, dass der prozentuale Anteil vitaler Bakterien sinkt, wenn die Gesamtanzahl an bakterieller Zellen im Biofilm steigt (Sjollema *et al.*, 2011). Eine geringe Anzahl an vitalen Bakterien im Biofilm nach Lysozym-Behandlung weist also darauf hin, dass der Biofilm verstärkt vorliegt, beziehungsweise dass sich der Biofilm des Stammes BAA-2069 durch die Anwesenheit von Lysozym schneller entwickelt hat als ohne Zugabe von Lysozym.

Zudem konnte eine tendenziell höhere Biofilmbildung in den Stämmen UCN 34 und ATCC 43143 nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid ermittelt werden, während die Biofilmbildung der Stämme DSM 16831 und BAA-2069 durch Wasserstoffperoxid eingeschränkt wurde. Im Gegensatz dazu entwickelten die Stämme BAA-2069 und LMG 17956 schneller einen Biofilm in Gegenwart von Lysozym. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* die Biofilmbildung aktiv als stammabhängigen Schutzmechanismus vor dem humanen Immunsystem nutzen kann.

Ein wichtiger Schritt in der Pathogenese von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ist die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix, die durch Schädigung des Endothels oder des Epithels exponiert vorliegt (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Kollagen Typ IV ist ein Hauptbestandteil der Lamina der Kolon-Schleimhaut. Kollagen Typ I ist ebenfalls sowohl am Kolon als auch am geschädigten Endokard vorzufinden (Galbavý *et al.*, 2002; Boleij und Tjalsma, 2013). Es konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass die Adhäsionsfähigkeit von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* an

Kollagen stammabhängig ist, wobei die Adhäsionsfähigkeit an Kollagen Typ I am stärksten ist (Sillanpää *et al.*, 2008; Vollmer *et al.*, 2010a; Grimm *et al.*, 2017a). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm BAA-2069 durch Lysozym vermehrt an Kollagen Typ I adhärierte. Im Vergleich zu den anderen Stämmen könnte BAA-2069 hierdurch einen Vorteil besitzen, um eine Infektion im Wirtsorganismus auszulösen. Die Sekretion von Lysozym durch Phagozyten im Blut und Endokard könnte *in vivo* eine schnellere Adhäsion und Mikrokolonie-Bildung an freiliegender extrazellulärer Matrix verursachen (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Benoit *et al.*, 2010; Helal *et al.*, 2012). Dadurch könnte dieser Stamm leichter am Endokard kolonisieren und wäre vor dem Immunsystem geschützt.

5.2.1 Transkriptomanalyse zur Untersuchung der Reaktion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* auf Lysozym

Es konnte gezeigt werden, dass neben anderen antimikrobiellen Faktoren auch Lysozym die Biofilmbildung von Bakterien stimulieren kann. Aufgrund dessen wurden die Transkriptome von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Medium mit Lysozym und von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Medium ohne Lysozym analysiert und miteinander verglichen. Dadurch konnten Gene ermittelt werden, die möglicherweise zur Lysozym-Resistenz in *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* beitragen sowie eine schnellere Biofilmbildung induzieren. Für die Transkriptomanalyse wurden die Stämme BAA-2069 und UCN 34 ausgewählt. Der Stamm BAA-2069 ist deshalb interessant, weil dieser schneller als alle anderen untersuchten Stämme Mikrokolonien bildete, wenn Lysozym präsent war. Der Stamm UCN 34 ist hingegen genauso Lysozym-resistent wie der *S. aureus* Vergleichsstamm ATCC 25923, obwohl keine Peptidoglykanmodifikationen in *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bekannt sind, die diesen Phänotyp verursachen könnten. Für den *S. aureus* Stamm ATCC 25923 konnte in anderen Studien bereits nachgewiesen werden, dass das Produkt des Gens *oatA* die hohe Lysozym-Resistenz verursacht (Herbert *et al.*, 2007).

Die Microarray-Analyse ergab Regulationen vieler verschiedener Gene. Dabei wurden insbesondere Gene der Transkription und Translation, also der Proteinbiosynthese, stärker exprimiert, wenn Lysozym präsent war. In *Streptococcus pyogenes* wurde ebenfalls eine Regulation solcher Genexpressionen beobachtet. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden, im Vergleich zum Anfang der stationären Wachstumsphase, Gene der Proteinbiosynthese erhöht exprimiert (Chaussee *et al.*, 2008). Durch die Muramidase Lysozym könnte das Wachstum von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* inhibiert werden, indem die Zellen zum Teil lysiert werden. Daher könnte es sein, dass sich der Großteil bakterieller Zellen in Gegenwart von Lysozym eher in einer früheren Wachstumsphase beziehungsweise länger in

der exponentiellen Phase befindet als in der stationären Phase. In dieser Arbeit konnte mittels Microarray-Analyse eine Induktion durch Lysozym von Expressionen vieler Gene, die für Ribosomeneinheiten kodieren, sowohl in BAA-2069 als auch in UCN 34 ermittelt werden. Dies spricht ebenfalls für frühe Wachstumsphasen von den Stämmen BAA-2069 und UCN 34 in Präsenz von Lysozym vergleichend zur Wachstumsphase ohne Lysozym (stationäre Phase). Daraus lässt sich schließen, dass die höhere Resistenz von UCN 34 gegen Lysozym die Lyse von Zellen dieses Stammes nicht gänzlich verhindern kann. Eine Erhöhung der Expression von Ribosom-assoziierten Genen wurde auch in *Pseudomonas aeruginosa* und *S. aureus* in Biofilmen beobachtet (Whiteley *et al.*, 2001; Resch *et al.*, 2005). Dies könnte eine weitere Erklärung für die Expressionsänderung von Proteinbiosynthese-assoziierten Genen sein: die Translation verändert sich, da die bakteriellen Zellen vom planktonischen in den adhärenen Zustand wechseln.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass sich die Zellen in Medium mit Lysozym und ohne Lysozym in unterschiedlichen Wachstumsphasen befinden, sind Expressionsunterschiede der Gene, deren Produkte am Aminosäure-, Kohlenhydrat- und Fettsäure-Metabolismus beteiligt sind. Eine Veränderung dieser Metabolismen wurde in verschiedenen Bakterienspezies unter verschiedenen Bedingungen festgestellt und kann daher auf eine generelle Umstellung der Wachstumsbedingungen zurückgeführt werden (Song *et al.*, 2008; Sitkiewicz und Musser, 2009; Malachowa *et al.*, 2011; Hanses *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Fei *et al.*, 2016).

Neben den Genen, deren Produkte zu Kohlenhydrat-, Lipid- und Aminosäure-Metabolismen sowie zur Proteinbiosynthese gehören, konnten Regulationen von Genexpressionen ermittelt werden, die auf eine Stressregulation in Gegenwart von Lysozym hinweisen. Dazu gehören Gene, deren Produkte an DNA-Reparaturen beteiligt sind, wie zum Beispiel *recO*, *GALLO_0671* und *ogt*. Über *recO* ist bereits bekannt, dass es in *Lactococcus lactis* zu Resistenzen gegenüber verschiedenen antimikrobiellen Bedingungen, wie niedrigem pH oder reaktiven Sauerstoffspezies, beiträgt (Wu *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2015). In *Salmonella enterica* zeigte sich, dass die Inaktivierung von *ogt* zusammen mit anderen DNA-Reparatur-assoziierten Genen einen Einfluss auf die Fitness und Virulenz dieser Spezies hat (Alvarez *et al.*, 2010). Die in dieser Arbeit nachgewiesene Expressionsregulation von *ogt* deutet daraufhin, dass diese DNA-Reparatur-Proteine in *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* an der Resistenz gegen Lysozym beteiligt sind. Des Weiteren wurden in beiden untersuchten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen die Genexpressionen von Untereinheiten der Alkylhydroperoxid-Reduktase (*ahpC* und *ahpF*) in Gegenwart von Lysozym erhöht. Im Stamm BAA-2069 erhöhte sich zusätzlich die Expression des Gens *naoX*, das für die NADH-Oxidase NaoX kodiert. Die Produkte dieser drei Gene dienen normalerweise der Toleranz gegenüber Sauerstoffspezies.

Dabei nutzen beide Enzyme das Coenzym NADH, das unter anderem durch die Glykolyse generiert werden kann, wie es in *S. intermedius* gezeigt wurde. Dies könnte die Expressionserhöhung der Gene *pgi* (Glucose-6-phosphat-Isomerase) oder *pfkA* (Phosphofruktokinase) erklären, deren Produkte an der Glykolyse beteiligt sind (Higuchi *et al.*, 2000; Liew *et al.*, 2015; Fei *et al.*, 2016).

Das Gen *ahpC* kodiert für die Alkyl Hydroperoxid Reduktase, ein Häm-bindendes Enzym, das die Reduktion von organischen Peroxiden in deren jeweiligen Alkohol katalysiert (Lechardeur *et al.*, 2010). AhpC dient damit der Stressregulation von reaktiven Sauerstoffspezies (Kajfasz *et al.*, 2015). Ein *Knock-out* von *ahpC* in *Bacillus subtilis* führte dazu, dass die KO-Mutante andere Wachstumseigenschaften als der Wildtyp aufwies. Außerdem wurde im *Bacillus subtilis* Wildtyp die Expression dieses Gens in Biofilmen verringert (Zwick *et al.*, 2016). Zudem wurde gezeigt, dass *ahpC*-KO-Mutanten von *Campylobacter jejuni* eine erhöhte Biofilmbildung aufweisen, weil sie durch den *Knockout* wahrscheinlich sensitiver gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies sind und auf einen anderen Schutzmechanismus angewiesen sind (Oh und Jeon, 2014). Dieses Ergebnis widerspricht den Beobachtungen dieser Arbeit, da eine erhöhte *ahpC*-Genexpression in Gegenwart von Lysozym und verstärkter Biofilmbildung ermittelt wurde. Insgesamt ist auffällig, dass Sauerstoff-Toleranz-assoziierte Gene in Gegenwart von Lysozym stärker exprimiert wurden als ohne Lysozym. Die Sauerstoff-Zufuhr war jedoch unter beiden Bedingungen gleich. Dies könnte darauf hindeuten, dass Lysozym die gleiche Stressantwort induziert wie reaktive Sauerstoffspezies, wodurch beide antimikrobiellen Substanzen über die gleichen Signalwege zu einer schnelleren Biofilmbildung führen könnten. Die erhöhte *ahpC*-Genexpression könnte auch zur Erhöhung der Expression der Gene *fhuC*, *fhuD* sowie *sufD* führen, die für Eisentransporter kodieren. Es ist bekannt, dass AhpC Häm und damit Eisen bindet (Lechardeur *et al.*, 2010). Darüber hinaus wurde auch bei anderen Stressfaktoren eine erhöhte Genexpression von Eisentransportern ermittelt. Eine solche Genexpressionserhöhung lag beispielsweise vor, nachdem *Enterococcus faecalis* und *Streptococcus thermophilus* mit einem Hitzeschock oder mit Wasserstoffperoxid stimuliert wurden (Li *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2015).

Expressionsunterschiede der Gene des Microcin Immunitätsproteins *mccF* und des Kompetenz-induzierten Proteins *cinA* sowie der Gene der Kompetenzproteine *cglA* und dem exogenen DNA-bindenden Protein *comEA* durch Stimulation mit Lysozym deuten auf eine direkte Regulation der Kompetenz und Immunität von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* durch Lysozym hin. MccF führt zur Resistenz gegenüber dem Microcin C, einem kleinen Bakteriocin (Tikhonov *et al.*, 2010). CinA bindet an DNA und ist wahrscheinlich an der homologen Rekombination während einer genetischen Transformation beteiligt (Mair *et al.*, 2012;

Karupiah *et al.*, 2014). ComEA bindet an einzelsträngige DNA, damit diese in die Zelle aufgenommen werden kann (Johnston *et al.*, 2014). Kompetenz-Entwicklung ist ein essentieller Faktor im Quorum-Sensing in Biofilmen von Streptokokken (Suntharalingam und Cvitkovitch, 2005). Dabei gehört ComEA zu den frühen Kompetenz-Proteinen, das die *comX*-Expression regulieren, welches wiederum die *cinA*-Expression reguliert. Deshalb zählt CinA zu den späten Kompetenz-Proteinen (Suntharalingam und Cvitkovitch, 2005). Dass die Expression des *comEA*-Gens nach fünf Stunden Inkubation mit Lysozym herunterreguliert wurde, während die *cinA*-Genexpression erhöht wurde, lässt darauf schließen, dass sich die Zellen in der späten Phase der natürlichen Transformation befinden. Die natürliche Transformation ist ein wichtiger Prozess im *Quorum Sensing* eines Biofilms (Fontaine *et al.*, 2015). Die Kompetenz-Proteine weisen außerdem darauf hin, dass bereits eine Bakteriengemeinschaft, zum Beispiel in Form eines Biofilms, vorliegen muss.

Wie auch die Phagozytose erhöht die Gegenwart von Lysozym ebenfalls die Expression der Gene des *dlt* Operons. Dabei ist es bekannt, dass es verschiedene Mechanismen gibt, die zur Resistenz gegen die Hydrolase-Funktion von Lysozym führen. In Gram-negativen Bakterien wird die Lysozym-Resistenz häufig durch Lysozym-Inhibitoren und in Gram-positiven Bakterien durch Modifikation des Peptidoglykans verwirklicht (Davis und Weiser, 2011; Callewaert *et al.*, 2012). Dabei wird die Peptidoglykan-Modifikation meistens durch O-Acetylierung der N-Acetylmuraminsäure mittels Adr oder OatA oder durch die N-Deacetylierung des N-Acetylglucosamins mittels PgdA verursacht (Crisóstomo *et al.*, 2006; Hébert *et al.*, 2007; Veiga *et al.*, 2007; Fittipaldi *et al.*, 2008). Keines dieser – sowie weiterer – Gene, die von Davis und Weiser als Peptidoglykan-Modifikations-assoziierte Gene zusammengefasst wurden, wurden mittels BLAST Analyse in den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Genomen nachgewiesen (Davis und Weiser, 2011). Nash *et al.* postulierten, dass die Hydrolase-Funktion von Lysozym nicht relevant für die antimikrobielle *in vivo*-Aktivität sei, sondern eventuell eher die kationische antimikrobielle Peptid-Funktion dieser Muramidase (Nash *et al.*, 2006). Es wurde schon zuvor bei verschiedenen Bakterienspezies gezeigt, dass die *D*-Alanyl-Veresterung von Teichonsäuren durch Dlt-Proteine zur Inhibition der antimikrobiellen Peptid-Funktion des Lysozyms sowie zu Antibiotika-Resistenzen gegen zum Beispiel Vancomycin führen (Herbert *et al.*, 2007; Guariglia-Oropeza und Helmann, 2011; McBride und Sonenshein, 2011). Daher lässt sich darauf schließen, dass auch in den untersuchten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen die Lysozym-Resistenz durch *D*-Alanylierung von Teichonsäuren verursacht werden könnte. Stammabhängige Unterschiede können jedoch nicht allein durch die Anwesenheit des *dlt* Operons erklärt werden, da auch im Genom des Lysozym-sensitiven *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stammes DSM 16831 die

Gene des *dlt* Operons vollständig vorhanden sind (Grimm *et al.*, 2017b). Deshalb muss es weitere Faktoren geben, die die Lysozym-Resistenz verursachen. Ein Beispiel wären unterschiedliche Oberflächenstrukturen einzelner Stämme, die nicht mittels der Transkriptomanalyse erfasst werden können.

Zwischen den Transkriptomen der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme BAA-2069 und UCN 34 wurden kaum Unterschiede ermittelt, obwohl sich die Phänotypen dieser Stämme hinsichtlich der Lysozym-Resistenz und Biofilmbildung in Medium mit Lysozym unterscheiden. Es könnte sein, dass der Stamm BAA-2069 aufgrund der höheren Sensitivität gegenüber Lysozym schneller einen schützenden Biofilm aufbaut als der Stamm UCN 34, der auch in Gegenwart von Lysozym ungehindert wachsen kann (Johnson, 2008). Mittels Microarray-Analyse wurde ermittelt, dass Lysozym die Genexpression von Proteasen nur im Stamm UCN 34 erhöhte. Es gibt Hinweise darauf, dass auch Peptidasen zur Lysozym-Resistenz beitragen könnten (Vanderkelen *et al.*, 2011). Das kann jedoch beim Stamm UCN 34 nicht ursächlich sein, da die Proteasen, deren Genexpressionen reguliert sind, laut LocateP-Analyse im Zytoplasma vorliegen und nicht sekretiert werden (Zhou *et al.*, 2008). Somit können sie das Lysozym im Medium nicht proteolytisch abbauen.

5.2.2 Transkriptomanalyse von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nach Adhäsion an Kollagen Typ I

Bei einer infektiösen Endokarditis gilt die Kollagenadhäsion als initialer Schritt zur Kolonisierung der Pathogene am Endokard. Aufgrund dessen wurde das Transkriptom zweier *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme analysiert, die unterschiedliche Adhäsionsfähigkeiten an Kollagen Typ I aufwiesen. Es wurde gezeigt, dass die Stämme DSM 16831 und UCN 34, wenn man das Transkriptom zwischen planktonischen und adhären Zellen nach zweistündiger Inkubation miteinander vergleicht, die Expression unterschiedlicher Gengruppen regulieren. Im Stamm UCN 34 wurden Teile des Kohlenhydrat-Metabolismus herunterreguliert und die Expression von Transportern für die Nahrungsaufnahme erhöht. Die Umstellung der Nahrungsaufnahme kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass der Stamm UCN 34 nach Adhäsion in einem Biofilm vorliegt. Metabolischer Synergismus ist ein wichtiger Bestandteil für das Zusammenleben in einer bakteriellen Gemeinschaft wie dem Biofilm (Nobbs *et al.*, 2009). Auffällig ist, dass die Expression des Kompetenz-Gens *comD*, einem Rezeptor für Kompetenz-stimulierende Peptide, verringert wird, obwohl die Zellen in einem Biofilm lokalisiert sind. Eine mögliche Begründung ähnelt der Erklärung bei der Transkriptomanalyse nach Lysozym-Behandlung (Kapitel 5.2.1). ComD gehört zu den frühen Kompetenz-Proteinen, deren Expression zu diesem

späten Zeitpunkt bereits wieder herunterreguliert wird (Suntharalingam und Cvitkovitch, 2005). Um diese Vermutung zu bestätigen, könnte das *Quorum Sensing* in *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* mittels Kompetenz-stimulierender Peptide näher untersucht werden (Morrison *et al.*, 2013).

Die Adhäsion des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stammes DSM 16831 bewirkte eine Erhöhung der Expression von Genen aus insgesamt zwei Regionen des Genoms. Die eine Region enthält Transposon-assoziierte Gene, die zum Beispiel für Relaxase, traG Gen (DNA Transfer), Mobilisierungsproteine und DNA-binde Proteine kodieren. BLAST-Analysen ergaben, dass es sich um ein integratives und konjugatives Element (ICE) handelt, das dem Sp1116 von *Streptococcus pyogenes* ähnelt. In dieser Bakterienspezies wurde eine Erythromycin-Resistenz nachgewiesen, die mit diesem ICE übertragen wird (Brenciani *et al.*, 2012, 2014). Im Stamm DSM 16831 konnten jedoch keine Resistenz-Gene in der ICE-Region ermittelt werden.

Die andere Region im Genom vom Stamm DSM 16831, in der die Genexpressionen nach Adhäsion an Kollagen Typ I reguliert wurden, konnte der Streptokokken-assoziierten Bakteriophage P9 zugordnet werden (Zhou *et al.*, 2011). Diese phagenassoziierte Region ist die einzige im Genom von DSM 16831, die komplett vorliegt und somit zur Phagenreplikation führen könnte (Zhou *et al.*, 2011). In einem Plaquetest (Daten nicht gezeigt) konnte jedoch keine Lyse von bakteriellen Zellen nachgewiesen werden. Es könnte sein, dass der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm DSM 16831 unempfindlich gegenüber des P9 Phagens ist. Eine solche Unempfindlichkeit gegenüber der P9 Phage wurde auch schon für *Streptococcus zooepifemicus* gezeigt, einer Spezies, die im Gegensatz zu *Streptococcus equi* nicht von diesem Phagen lysiert wird (Tiwari und Timoney, 2009). Die Regulation der Expression der Gene dieser beiden Regionen könnte auf lateralen Gentransfer im Stamm DSM 16831, adhärent gebunden an Kollagen Typ I, hinweisen. Dies ist ein wichtiger Aspekt in einer bakteriellen Biofilm-Gemeinschaft (Nobbs *et al.*, 2009). *Pseudomonas aeruginosa* erhöht in Folge einer Biofilmbildung oder durch Veränderung von Umweltbedingungen ebenfalls die Expressionen von Transposon- und Phagengenen (Whiteley *et al.*, 2001; Balasubramanian und Mathee, 2009). Laut Nobbs *et al.* kann von der Kollagen-Adhäsion auf eine späte Phase der Biofilm-Entwicklung geschlossen werden, in der bereits eine bakterielle Gemeinschaft existiert, die veränderte Parameter bezüglich Nahrungsaufnahme und DNA-Austausch aufweist (Nobbs *et al.*, 2009).

5.3 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Phänotypen und Transkriptome von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ermittelt, die Hinweise auf mögliche Virulenzfaktoren dieses Bakteriums geben. Um weitere mögliche Virulenzfaktoren zu ermitteln, sollten zukünftige Studien Transkriptomanalysen unter differenten Interaktionsbedingungen beinhalten. So könnten Faktoren untersucht werden, die an der Adhäsion und Invasion humaner Zellen beteiligt sind, beispielsweise bei Endothel- und Epithelzellen.

Die ermittelten Virulenzfaktoren dieser Arbeit, wie etwa die Dlt-Proteine könnten mittels Deletion-Mutationen einzelner Gene weiter evaluiert werden, indem KO-Zellen mit dem jeweiligen Wildtyp verglichen werden. Eine Möglichkeit zur Transformation von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wäre die Konjugation über *Streptococcus agalactiae* (Danne *et al.*, 2013). Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse dieser Arbeit haben allerdings gezeigt, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* unter bestimmten Bedingungen natürlich kompetent sein könnte. Deshalb könnte die Transformation bakterieller Zellen mittels Kompetenz-stimulierender Peptide eine bessere Möglichkeit sein, um kompetente *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Zellen herzustellen und diese genetisch zu verändern (Morrison *et al.*, 2013).

In der Transkriptomanalyse zur Untersuchung der Lysozym-Resistenz der beiden *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme BAA-2069 und UCN 34 konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Genexpression ermittelt werden, obwohl beide Stämme einen unterschiedlichen Phänotyp aufweisen. Möglicherweise könnten Untersuchungen von Oberflächenstrukturen einzelner Stämme Aufschluss über die zugrundeliegenden Virulenzfaktoren geben. Hierfür könnten zum einen Oberflächenproteine mittels *Shaving*-Methode durch unterschiedliche Proteasen von der Oberfläche abgespalten und anschließend massenspektrometrisch identifiziert werden (Tjalsma *et al.*, 2008). Zum anderen könnte eine elektronenmikroskopische Ermittlung der Kapselgröße einzelner Stämme zu neuen Erkenntnissen über die Virulenz der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme führen. Kapseln, die die Bakterien umschließen, haben einen Einfluss auf die Virulenz von Bakterien (Marshall und Gunn, 2015).

Neben der Untersuchung der Eigenschaften von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, die die Wirt-Pathogen-Interaktion bestimmen, könnten auch Individuen-abhängige Reaktionen des Wirts auf den Erreger den Verlauf einer Infektion determinieren. Hierfür könnte die Studie zur Untersuchung der Phagozytose durch primäre Makrophagen erweitert werden, bei der die Einzelnukleotid-Varianten einzelner Individuen ermittelt werden. So könnte etwa eine Genotyp-Phänotyp Korrelation genetische Prädispositionen ermitteln, die die Phagozytose und das Überleben einzelner *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme beeinflussen.

6 Methoden

6.1 **Mikrobiologische Methoden**

6.1.1 Anzucht und Kultivierung von Bakterien

Die Bakterien verschiedener Stämme werden mit einer Impfpferle aus dem Kryobankröhrchen (Mast Group) entnommen und mit einer sterilen Impföse auf BHI-Agarplatten im Dreiösenausstrich vereinzelt. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C über Nacht im Inkubator. Für Übernachtkulturen werden 5 ml BHI-Medium mit einer Einzelkultur, die mit einer Impföse entnommen wurde, inokuliert und über Nacht bei 37 °C bei 200 rpm auf einem Schüttler (Heidolph) inkubiert. Für Kulturen in der exponentiellen Phase werden 5-7 ml BHI-Medium mit 100 µl Übernachtkultur inokuliert und für 2,5 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

6.1.2 Bestimmung des Bakterientiters

Die Bestimmung des Bakterientiters (koloniebildende Einheiten = KBE) erfolgt durch serielle Verdünnung von Bakteriensuspensionen in *Dulbeccos Phosphate Buffered Saline* (DPBS). 100 µl der geeigneten Verdünnung werden auf Trypton Soja (TS)-Agarplatten in Dreifachbestimmung ausplattiert. Die Ermittlung der KBE/ml erfolgt nach 24–48 h Inkubation bei 37 °C. Die Bakterienkolonien werden am aCoLyte ausgezählt und der bakterielle Titer der Ausgangslösung pro Milliliter berechnet.

6.1.3 Kryokonservierung von Bakterienkulturen

Bakterienkulturen werden inklusive Impfpferlen bei -80 °C in Kryobankröhrchen gelagert. Dafür wird eine Einzelkolonie von einer BHI-Agarplatte mit einer Impföse entnommen und im Kryomedium suspendiert. Anschließend wird der Überstand des Kryomediums mit einer Pasteurpipette abgenommen. Die Bakterien liegen dann adhärent an den Impfpferlen vor.

6.1.4 Wachstum und Biofilmbildung von Bakterien in Lysozym-haltigem Medium

Die Lysozym-Resistenz verschiedener Bakterienstämme werden in BHI-Medium mit unterschiedlichen Lysozymkonzentrationen getestet. Die Bakterien werden in 24-Kavitäten-Platten kultiviert. Dafür werden 980 µl BHI Medium mit Lysozym aus Hühnereiweiß (0, 5, 10 oder 20 mg/ml; Sigma) versetzt und mit 20 µl Bakterienkultur aus der exponentiellen Phase inokuliert. Die Kulturen werden bei 37 °C und 70 rpm in einem Schüttler (Heidolph) inkubiert. Nach 5 h Inkubation wird das Wachstum photometrisch mit optischer Dichte bei $\lambda = 600$ nm und durch Ausplattieren der Bakteriensuspension bestimmt (6.1.2).

Die Biofilmbildung verschiedener Bakterienstämme wird nach 5 h oder 16 h Inkubation in Lysozym-ergänzttem Medium ermittelt. Dafür wird zu den jeweiligen Zeitpunkten der Überstand abgenommen und die adhärennten bakteriellen Zellen zweimalig mit DPBS gewaschen. Zum einen werden die vitalen adhärennten Bakterien anschließend durch Ausplattieren bestimmt (6.1.2), indem der Biofilm mit 1 %-igem Saponin aufgebrochen und mit der Pipettenspitze vom Kavitätäsboden gelöst wird. Zum anderen werden adhärennten Bakterien mit Kristallviolett angefärbt und die Biofilmbildung photometrisch ($\lambda = 550 \text{ nm}$) bestimmt (6.1.8).

6.1.5 Wachstum und Biofilmbildung in Gegenwart von Wasserstoff-Peroxid

Das Wachstum von verschiedenen Bakterien-Stämmen in Gegenwart von Wasserstoff-Peroxid (H_2O_2) wird photometrisch oder durch Ausplattieren bestimmt. Dafür werden 980 μl BHI-Medium mit 0, 5, 10, 15 oder 20 mM H_2O_2 mit 20 μl Bakterienkultur aus der exponentiellen Phase inokuliert. Photometrisch wird die optische Dichte ($\lambda = 600 \text{ nm}$) zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Zusätzlich wird nach 5 h Inkubation die Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) pro Milliliter durch Ausplattieren bestimmt (6.1.2). Die Analyse der Biofilmbildung in Gegenwart von H_2O_2 erfolgt wie in 6.1.8 beschrieben.

6.1.6 Überleben von Bakterien in saurem Medium

Das Überleben verschiedener Bakterienstämme bei einem saurem pH-Wert im Vergleich zu neutralem pH-Wert wird in BHI-Medium untersucht. Dafür wird das BHI-Medium mit Salzsäure (HCl) auf einen pH-Wert von 4,0 oder 7,0 eingestellt und anschließend sterilfiltriert. 5 ml Bakterienkulturen werden zentrifugiert (5.000 rpm für 5 min bei RT) und mit DPBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird das Sediment in BHI pH 7 oder in BHI pH 4 resuspendiert und die Zellen für 5 Stunden bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Anschließend werden die KBEs pro Milliliter durch Ausplattieren ermittelt (6.1.2).

6.1.7 Untersuchung der Adhäsion von Bakterien an Kollagen

Zur Überprüfung der Adhäsion verschiedener Bakterienstämme an Kollagen wird 2 ml 0,1 mg/ml humanes Kollagen Typ I aus der Plazenta (Sigma) oder bovines Serum Albumin (BSA) in 6 Kavitäten-Platten gegeben und über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Der Überstand wird danach mit Pasteurpipetten abgenommen und 2 ml Block-Lösung (DPBS, 1 % BSA und 0,05 % Tween-20) in die Kavität gegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei 4 °C wird die Block-Lösung abgenommen und die Kavitäten zweimalig mit DPBS gewaschen. Anschließend werden 2 ml Bakterienkultur aus der exponentiellen Phase in die Kavitäten gegeben und für

2 Stunden bei 37°C und 70 rpm inkubiert. Die adhärenen bakteriellen Zellen werden entweder mit TE-Puffer und Lyse-Puffer (*NucleoSpin RNA II-Kit*) für die RNA Extraktion (6.3.1) lysiert oder mit Kristallviolett angefärbt (6.1.8).

6.1.8 Kristallviolett-Färbung adhärenter Bakterienstämme

Kristallviolett ist ein Farbstoff, der sich in die Zellwand von Bakterien einlagert. Die Färbung mit Kristallviolett wird zur Quantifizierung adhärenter bakterieller Zellen an Polystyrol, BSA oder Kollagen genutzt. Dafür werden die Kavitäten mit den adhärenen Bakterien zweimal mit DPBS gewaschen und die Bakterien im Anschluss bei 60 °C für 20 min abgetötet und die Kavitäten getrocknet. Anschließend wird 1 %-iges Kristallviolett (100 µl in 96-Kavitäten-Platten; 1 ml in 24-Kavitäten-Platten; 2 ml in 6-Kavitäten-Platten) in die Kavitäten gegeben. Die Färbung der Zellen erfolgt für 30 min bei RT. Überschüssiges Kristallviolett wird mit einer Pasteurpipette abgenommen und durch fünfmaliges Waschen mit DPBS entfernt. Das Kristallviolett wird dann mittels Zugabe von 70 %-igem Ethanol (250 µl in 96-Kavitäten-Platten; 1 ml in 24-Kavitäten-Platten; 2 ml in 6-Kavitäten-Platten) und 10-minütiger Inkubation bei RT und 70 rpm gelöst. Die relative Quantifizierung adhärenter Bakterien erfolgt am Tecan Infinite M200pro Plattenleser, indem die Absorption bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen wird.

6.1.9 Mikroskopische Analyse von Biofilmen

Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an T/A-reiche Regionen in der DNA interkaliert. Um adhärenente Zellen mikroskopisch zu analysieren, werden diese zunächst zweimal mit DPBS gewaschen. Anschließend wird die bakterielle DNA mit DAPI markiert. Adhärenente bakterielle Zellen werden mit einer 1:1.000-verdünntem DAPI-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird überschüssiges DAPI durch zweimaliges Waschen mit DPBS entfernt und die Zellen mit 4 %-iger Formaldehyd-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Die mikroskopische Analyse erfolgt mit dem Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse TE2000 und 400-facher Vergrößerung.

6.2 **Zellbiologische Methoden**

6.2.1 Kultivierung und Passagieren von THP-1 Monozyten

Zur Kultivierung von THP-1 Zellen werden Kryokulturen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in 10 ml Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 (Gibco) mit 10 % fötalem Kälberserum (FBS; Südafrika; PAN) und 1-facher Penicillin/Streptomycin/AmphotericinB-Konzentration (AB; PAN) (RPMI+FBS+AB) gegeben. Die Zellen werden bei 1100 rpm für

5 min zentrifugiert. Das Zellsediment wird in 20 ml neuem RPMI+FBS+AB resuspendiert und in eine Suspensions-Zellkulturflasche (Greiner BioOne) gegeben. Die Kultivierung erfolgt bei 37 °C bei einer Atmosphäre mit 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂). Für ein ideales Wachstum der Suspensionszelllinie wird eine Konzentration von $1-5 \times 10^5$ Zellen/ml verwendet. Außerdem muss das Medium alle 2–3 Tage gewechselt werden beziehungsweise durch Zugabe von neuem Medium gestreckt werden. Für den Wechsel des Mediums beziehungsweise Passagieren der Zellen, werden diese sedimentiert (1100 rpm; 5 min, bei RT) und in einem entsprechenden Volumen in einer Zellkulturflasche resuspendiert.

6.2.2 Kryokonservierung von THP-1 Monozyten

Zur langfristigen Lagerung von THP-1 Zellen erfolgt eine Kryokonservierung. 50 ml Suspensionskultur wird zentrifugiert (1100 rpm für 5 min, bei RT) und das Sediment in 10 ml RPMI+FBS+AB mit 5 % DMSO gelöst. Die Zellsuspension wird auf zehn vorgekühlte Kryoröhrchen aufgeteilt. Diese werden in ebenfalls vorgekühlten Aluminiumblöcken in einer Styroporbox bei -80 °C gelagert. Nach 1–2 Tagen werden die Kryokulturen in flüssigen Stickstoff überführt.

6.2.3 Differenzierung von THP-1 Monozyten zu Makrophagen

Die Differenzierung der monozytären Zelllinie THP-1 zu Makrophagen erfolgt innerhalb von drei Tagen mittels 50 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) in RPMI+FBS+AB. Die Anzahl der eingesetzten Zellen hängt von der Fläche des Kavitätenbodens ab. Für Mikroskopie-Analysen werden $1,5 \times 10^6$ THP-1 in 2 ml Medium inklusive PMA in, mit Deckgläsern bestückten, 6-Kavitäten-Zellkulturplatten pro Kavität ausgesät. Die gleiche Anzahl an Zellen werden in 2 ml/Kavität in 12-Kavitäten-Platten ausgesät, 5×10^5 Zellen/Kavität in 1 ml in 24-Kavitäten-Platten und $1,3 \times 10^5$ Zellen/Kavität in 100 µl in 96-Kavitäten-Platten. Die Zellen werden für zwei Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ kultiviert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen. Nach Zugabe von frischem Antibiotika-freiem Medium ohne PMA werden die Zellen für einen weiteren Tag kultiviert.

6.2.4 Zählung und Vitalitätsanalyse humaner Zellen

Adhärente Zellen müssen vor der Auszählung mit Trypsin in Suspension gebracht werden. Dafür werden diese einmal mit DPBS gewaschen, bevor 1-fache Trypsin/EDTA-Lösung hinzugegeben wird. Das enzymatische Lösen der Zellen findet bei 37 °C statt und die Reaktion mit Medium inklusive FBS abgestoppt. Zur Auszählung der humanen Zellen werden diese 1:1 mit 0,2 %-iger Trypan-Blau-Lösung versetzt, um eine Unterscheidung zwischen vitalen und

toten (blauen) Zellen zu ermöglichen. Trypanblau dringt in tote Zellen ein, wodurch diese dunkelblau gefärbt sind. Anschließend werden diese entweder in JuLI Br Zählkammern überführt, mittels des JuLI Br Live Cell Analyzers gezählt und mit Hilfe der JuLI Br Zellzählersoftware ausgewertet oder mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer manuell ausgezählt. Dafür werden die angefärbten Zellen in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Anzahl der vitalen Zellen in vier Großquadraten ermittelt. Die Anzahl der Zellen pro Milliliter kann anschließend mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Zellen/ml} = \frac{Z \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4}{4}$$

Z = Gesamtanzahl der Zellen in den vier Großquadraten

6.2.5 Isolierung von Monozyten aus Vollblut

Freiwilligen Probanden wird Vollblut abgenommen und in einem Transferbeutel von Fresenius Kabi gelagert. Dieser enthält Citronensäure-Monohydrat, Natriumcitrat-Dihydrat, Glucose-Monohydrat und Natrium-Dihydrogenphosphat-Dihydrat zur Antikoagulation des Blutes. Zur Isolierung der Monozyten aus dem Vollblut wird dieses zunächst 1:1 mit DPBS+AB (RT) verdünnt. Dann wird 30 ml Vollblut/DPBS-Gemisch vorsichtig auf 15 ml Bicoll (Merck) gegeben und anschließend für 30 min, $800 \times g$ bei RT ohne Bremse zentrifugiert, um einen Dichtegradienten zu erhalten. Nach der Zentrifugation befinden sich die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs), die mithilfe einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen werden, zwischen dem Biocoll und dem Blutplasma. Die PBMCs werden anschließend zwei Mal mit kaltem DPBS+AB (4 °C) gewaschen. Dafür werden die Zellen für jeweils 10 min mit $300 \times g$ bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend erfolgt die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (6.2.4).

Die darauffolgende Isolation der Monozyten aus den PBMCs erfolgt mit dem *Pan monocyte isolation Kit* (Miltenyi Biotec). Dieses Kit erlaubt die Isolierung von klassischen Monozyten, intermediären Monozyten und nicht-klassischen Monozyten. Dabei werden die Monozyten negativ selektiert, indem alle nicht-monozytären Zellen (T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, dendritische Zellen, basophile Granulozyten und Erythrozyten) mit Biotin-konjugierten Antikörpern markiert werden. An diese Antikörper können wiederum magnetische Anti-Biotin Microbeads binden. Die nachfolgenden Schritte erfolgen alle gekühlt bei 4 °C oder auf Eis. Die PBMCs werden ein weiteres Mal für 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt und 10^7 Zellen in je 30 µl MACS-Puffer (DPBS, 0,5 mM EDTA, 0,5 % BSA) gelöst. Pro 10^7 Zellen werden je 10 µl FcR Blocking Reagenz und 10 µl Biotin-Antikörper-Cocktail gegeben, gut gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend

werden noch einmal 30 µl MACS-Puffer pro 10^7 Zellen sowie 20 µl Anti-Biotin Microbeads hinzugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wird eine MACS Säule (Größe MS) in einen MACS Separator (Magnet) gehängt und 500 µl MACS-Puffer auf die Säule gegeben. Wenn der MACS Puffer durchgetropft ist, werden 500 µl Zellsuspension auf die Säule gegeben (höchstens 10^8 Zellen pro Säule) und jeweils wieder 500 µl Zellsuspension hinzugegeben bis das gesamte Volumen durch die Säule gelaufen ist. Das Eluat wird anschließend noch einmal auf die Säule gegeben. Abschließend wird die Säule mit 500 µl MACS Puffer abschließend gewaschen. Danach liegen die isolierten Monozyten im Eluat vor. Die Säule kann vom Magneten genommen werden, um die mit Antikörpern markierten Zellen mit 500 µl MACS Puffer von der Säule zu entfernen und als Kontrolle in der Durchflusszytometrie (6.2.7) einsetzen zu können. Die Monozyten werden weiter zu M1 Makrophagen differenziert (6.2.6).

6.2.6 Differenzierung von primären Monozyten zu M1 Makrophagen

Die aus Vollblut isolierten Monozyten werden ausgezählt, in RPMI+FBS+AB mit 50 ng/ml *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) resuspendiert und in 12-Kavitäten-Platten mit $1,5 \times 10^6$ Zellen/Kavität in 2 ml ausgesät. Hierin werden die Zellen kultiviert, wobei alle 2–3 Tage 500 µl RPMI+FBS+AB und 100 ng/ml M-CSF hinzugegeben werden. Außerdem wird das Medium ab dem dritten Tag der Kultivierung mit 50 ng/ml Interferon- γ (IFN- γ) versetzt, um M1 Makrophagen zu erhalten. Am Tag sieben wird auf ein Zytokin-freies Medium (RPMI+FBS+AB) gewechselt. Die Zellen werden noch einen Tag in diesem Medium inkubiert, um dann für das Phagozytose-Assay (6.2.8) eingesetzt zu werden.

6.2.7 Durchflusszytometrische Analyse zur Überprüfung von isolierten Zellen

Durchflusszytometrische Messungen werden dazu genutzt, um die Reinheit der isolierten Monozyten zu analysieren sowie die Differenzierung zu Makrophagen zu überprüfen. Makrophagen werden dafür mittels Trypsin in Lösung gebracht (6.2.4). Dafür werden 100 µl Zellsuspension mit je 5 µl von drei verschiedenen Fluoreszenz-markierten Antikörper versetzt. Um die Fluoreszenzsignale kompensieren zu können, werden Proben auch mit je zwei verschiedenen Fluoreszenz-markierten Antikörpern sowie ohne Antikörper inkubiert. Die Inkubation erfolgt für 30 min bei 4 °C. Anschließend werden die Zellsuspensionen zentrifugiert ($800 \times g$, 10 min, 4 °C) und in 4 %-iger Formaldehyd-Lösung für 30 min bei 4 °C fixiert. Die Proben werden erneut zentrifugiert und das Zellsediment in MACS-Puffer resuspendiert. Wenn Antigene intrazellulär vorliegen, wird das *Inside staining kit* (Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben verwendet. Dafür werden die Zellen als erstes mit den anderen beiden Antikörpern, wie zuvor beschrieben, markiert. Im Anschluss werden die Zellen mit MACS

Puffer gewaschen. Die markierten Zellen werden dann mit Inside Fix für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach erneutem Waschen werden die Zellen mittels *Inside Perm* permeabilisiert und für 10 min bei RT mit 5 µl desjenigen Antikörpers inkubiert, dessen Antigen intrazellulär vorliegt. Die Markierung schließt mit erneutem Waschen und Resuspension in MACS Puffer ab.

Monozytensuspensionen ab einer Reinheit von 80 % wurden für Phagozytose-Versuche verwendet. Außerdem wurde nach achttägiger Differenzierung von Monozyten überprüft, ob Makrophagen vorlagen.

Die Analyse erfolgt am FACS-Canto II der Firma BD Bioscience mit folgenden Parametern:

Kanal	Abkürzung	Spannung
Forward Scatter	FSC	214
Side Scatter	SSC	450
Fluorescein isothiocyanate	FITC	450
Phycoerythrin	PE	400
Allophycocyanin	APC	400
Kanal	Abkürzung	Schwellenwert
Forward Scatter	FSC	5000
Zu kompensierende Kanäle		Kompensation [%]
PE – FITC		6,74
APC – FITC		4,30
FITC – PE		9,33
APC – PE		0,24
FITC – APC		1,44
PE – APC		0,21

6.2.8 Phagozytose Assay

Der Phagozytose-Assay wird dazu genutzt, um die intrazellulär in Makrophagen vorliegenden Bakterien zu quantifizieren. Dazu werden bakterielle Übernachtskulturen seriell soweit in antibiotika-freiem RPMI+FBS verdünnt, bis eine Multiplizität der Infektion (MOI) von ungefähr fünf erreicht ist. Von den Makrophagen wird das Medium abgenommen und entweder 2 ml oder 100 µl verdünnte Bakterienkulturen oder Medium ohne Bakterien als Negativkontrolle zugegeben. Anschließend werden die Kavitäten-Platten bei 400 × g für 5 min zentrifugiert, um zu gewährleisten, dass die Bakterien an die Makrophagen adhären. Nachfolgend werden die Zellen mit Bakteriensuspensionen für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ in der Atmosphäre inkubiert, wodurch die Aufnahme von Bakterien durch die Makrophagen mittels Phagozytose erfolgen kann. Die Bakteriensuspension wird abgenommen und extrazelluläre Bakterien durch zweimaliges Waschen mit DPBS entfernt. Zusätzlich werden die extrazellulären Bakterien innerhalb einer 20-minütigen Inkubation in RPMI+FBS+AB mit zusätzlich 200 µg/ml Gentamycin abgetötet. Nach verschiedenen Zeitpunkten wird der Überstand (0 h, 2,5 h und 5 h) abgenommen und zur Kontrolle ausplattiert. Außerdem werden

Antibiotika-Rückstände durch zweimaliges Waschen mit DPBS entfernt. Dann werden die Makrophagen entweder a) mit RA1-Lysis-Puffer zur RNA-Extraktion lysiert (6.3.1), b) mit 1 %-igem Saponin versetzt, um die intrazellulären Bakterien durch Ausplattieren quantifizieren zu können oder c) die Makrophagen und Bakterien fluoreszenzmikroskopisch untersucht (6.2.9). Die Phagozytoserate (0 h) wird bestimmt, indem die ermittelte intrazelluläre Bakterienanzahl ins Verhältnis zum hinzugegebenen Inokulum gesetzt wird. Der zeitliche Verlauf des Abbaus der Bakterien innerhalb der Makrophagen wird durch Ausplattieren ermittelt und in Prozent zur Phagozytoserate (100 %) angegeben.

6.2.9 Lokalisierung von phagozytierten Bakterien mittels Mikroskopie

Die Lokalisierung von Bakterien nach der Phagozytose erfolgt fluoreszenzmikroskopisch. Dafür werden bakterielle Übernachtskulturen zentrifugiert ($5000 \times g$, 5 min) und das Sediment in 5 ml DPBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird das Zellsediment in DPBS mit 0,1 mg/ml FITC aufgenommen. Nach einer halbstündigen Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wird die Bakterienkultur dreimal mit DPBS gewaschen.

Für die Unterscheidung zwischen intra- und extrazellulär vorliegenden Bakterien wird nach dem letzten Waschschrift das Sediment in 1 ml DPBS mit 0,5 mg/ml sulfo-NHS-LC-biotin resuspendiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation erfolgt ein dreimaliges Waschen der Bakterienkulturen mit DPBS (Zentrifugation: $5000 \times g$, 5 min). Anschließend werden die markierten Bakterien in RPMI+FBS gelöst und der Phagozytose-Assay, wie in 6.2.8 beschrieben, in 6 Kavitäten Platten mit Deckgläschen durchgeführt. Nach 1 h wird der Überstand abgenommen und mit 4 %-iger Formaldehyd-Lösung für 15 min fixiert. Die Kavitäten werden dreimal mit DPBS gewaschen und unspezifische Bindestellen für 5 min mit Block-Lösung blockiert. Die Block-Lösung wird abgenommen. Es folgt eine 45-minütige Inkubation mit Streptavidin-AlexaFluor 546 (1:200-verdünnt in Block-Lösung). Das Streptavidin bindet kovalent an Biotin und dringt nicht in die bakteriellen Zellen ein. Alexa Fluor 546 markiert so die extrazellulär vorliegenden Bakterien. Die Zellen werden abschließend noch dreimal gewaschen und in Roti-Mount FLuorCare (Roth) eingebettet.

Um zu überprüfen, ob die Bakterien in sauren Organellen vorliegen, wird *LysoTracker Red DND-99* von ThermoFisher genutzt. Dieses Fluorophor ist gekoppelt an eine schwache Base und akkumuliert aufgrund dessen in sauren Organellen. Bakterien werden, wie zuvor beschrieben, mit FITC markiert. Die Medien, die während des Phagozytose-Assays in den 6-Kavitäten Platten genutzt werden (sowohl RPMI+FBS als auch RPMI+FBS+AB), werden mit 75 nM *LysoTracker Red DND-99* versetzt. Der Phagozytose-Assay (6.2.8) wird durchgeführt und nach 1 h abgestoppt, indem die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen werden. Die Fixierung

der Zellen erfolgt mit 4 %-iger Formaldehyd-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur und die Zellen werden nach dreimaligem Waschen mit DPBS in Roti-Mount FLuorCare (Roth) eingebettet.

Die Deckgläschen werden aus den Kavitäten genommen und auf Objektträger gegeben. Die mikroskopische Analyse erfolgt am Nikon Eclipse TE2000-S (400-fache und 1000-fache Vergrößerung). Für das 100er Objektiv (1000-fache Vergrößerung) wird Immersionsöl 518N von Zeiss auf das Deckgläschen gegeben. Alle FITC-markierten Bakterien werden bei $\lambda = 465\text{--}495\text{ nm}$ detektiert, extrazelluläre Bakterien sowie saure Zellorganellen bei $\lambda = 510\text{--}560\text{ nm}$. Die Aufnahme der Bilder erfolgt durch die Nikon's Digital Sight DS-U3-Kamera und die direkte Auswertung der Bilder mit Hilfe der Software Nikon's NIS-Elements. Die Bilder werden mit ImageJ verarbeitet.

6.3 Molekularbiologische Methoden

6.3.1 RNA Extraktion aus THP-1 Zellen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus THP-1 Zellen wird das *NucleoSpin RNA II-Kit* der Firma Machery-Nagel verwendet. Die Durchführung erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers. Die Zellen werden durch Zugabe von 600 μl des Lyse Puffers RA1 lysiert. Anschließend kann das Lysat bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Zur RNA-Extraktion wird das Zelllysate auf einen NucleoSpin Filter gegeben und für 1 min bei $11.000 \times g$ zentrifugiert. Im Anschluss wird das Lysat mit 600 μl 70 %-igem Ethanol versetzt, auf die NucleoSpin RNA II Säule gegeben und für 30 s bei $11.000 \times g$ zentrifugiert, wodurch die RNA an die Säule bindet. Anschließend werden 350 μl MDB (*Membrane Desalting Buffer*) auf die Säule gegeben und diese bei $11.000 \times g$ zentrifugiert, um Salze von der Säule zu entfernen. Im folgenden Schritt wird die DNA auf der Silica-Säule durch rDNase verdaut. Dafür wird 10 μl rekombinant-hergestellte rDNase in 90 μl Reaktionspuffer auf die Säule gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Enzymreaktion wird die Säule gewaschen und getrocknet. Der erste Waschschritt erfolgt mit 200 μl des Puffers RA2 und anschließender Zentrifugation (30 s, $11.000 \times g$). Beim zweiten Waschschritt wird 600 μl RA3 Puffer auf die Säule gegeben und nachfolgend zentrifugiert ($11.000 \times g$ für 30 s). Im Anschluss wird die Säule mit 250 μl RA3 Puffer gewaschen und bei $11000 \times g$ für 2 min zentrifugiert. Es werden 30 μl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben, für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und die RNA mittels eines Zentrifugationsschrittes ($11000 \times g$, 1 min) von der Säule eluiert. Das Eluat wird bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

6.3.2 RNA Extraktion aus *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

Zur Extraktion bakterieller RNA wird das *PeqGold Bacterial RNA Kit* verwendet. Bakterien werden in 100 μl *TE Puffer* und 450 μl *RNA Lysis Puffer T* resuspendiert und in ein Lysing Matrix B-Röhrchen (MP Biomedicals) gegeben. Die bakteriellen Zellen werden durch 3-minütiges Vortexen mit dem Vortex-Genie 2000 (Scientific industries) und 0,1 mm-großen Glaskugeln aufgeschlossen. Die Suspension wird 10 Minuten im Puffer inkubiert, der Überstand von den Glaskugeln abgenommen (ca. 350 μl), auf die *DNA Removing Column* gegeben und dann für 2 min bei $10.000 \times g$ zentrifugiert. Die Säule wird verworfen, zum Eluat wird das gleiche Volumen an 70 %-igem Ethanol gegeben und durch Pipettieren gemischt. Das Gemisch wird auf eine *PerfectBind RNA Column* gegeben und für eine Minute bei $10.000 \times g$ zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und die Säule mit 500 μl *RNA Wash Buffer I* gewaschen. Nach Zentrifugation ($10.000 \times g$, 1 min) wird der Durchfluss verworfen und die DNA mittels DNase I verdaut. Dafür wird 75 μl *DNase I Reaktionsmix* (6,5 μl Wasser, 7,5 μl *DNase I-Puffer* und 1,5 μl DNase I) direkt auf die Säule gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 400 μl *RNA Wash Buffer I* auf die Säule gegeben, für 5 min bei RT inkubiert und für 5 min bei $10.000 \times g$ zentrifugiert. Der Durchfluss wird wieder verworfen, 650 μl *RNA Wash Buffer II* auf die Säule pipettiert und für 1 min bei $10.000 \times g$ zentrifugiert. Dieser Schritt wird wiederholt und die Säule durch erneutes zentrifugieren bei $10.000 \times g$ für 2 min vollständig getrocknet. Danach wird die RNA nach 10-minütiger Inkubation bei RT mit 30 μl RNase-freiem Wasser und anschließender Zentrifugation (2 min bei $7.000 \times g$) von der Säule eluiert. Die isolierte RNA wird bei -80°C gelagert.

6.3.3 RNA Quantifizierung mit dem Nanodrop 2000

Die Gesamt-RNA-Konzentration der Nukleinsäure-Proben wird mit dem Spektrophotometer Nanodrop 2000 (PeqLab) quantifiziert. Es werden ca. 1,5 μl der zu untersuchenden Probe eingesetzt, um die Absorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ zu bestimmen. Die Absorption ist direkt proportional zur Konzentration, so dass unter Einbezug des Multiplikationsfaktors für RNA (Faktor 40) die Konzentration der RNA in der Probe berechnet werden kann. Die Berechnung erfolgt durch die Software Nanodrop 2000/2000c mit der Nukleotid-Funktion (RNA oder DNA) (Version 1.4.1). Die Reinheit der Probe wird durch das Verhältnis OD260/280 (ideale Werte: 1,8–2) und OD260/230 (ideale Werte: < 2) angegeben. Damit wird eine mögliche Kontamination der Probe durch Proteine, Salze und Lösungsmittel erfasst. Außerdem wird der Wert über eine Hintergrundkorrektur bei 340 nm normalisiert.

6.3.4 Bestimmung der RNA-Integrität

Mittels des *RNA 6000 Pico Kits* (Agilent) wird die RNA Integritäts Nummer (RIN) und damit die Qualität der RNA bestimmt. Im ersten Schritt wird die RNA Gelmatrix filtriert, indem diese auf den Filter gegeben wird und bei $1.500 \times g$ für 10 min zentrifugiert wird. In $65 \mu\text{l}$ des gefilterten Gels werden $1 \mu\text{l}$ RNA Dye Konzentrat gegeben (Gel-Dye Mix), gut gemischt und für 10 min bei $13.000 \times g$ zentrifugiert. Von dem Gel-Dye Mix werden dann $9 \mu\text{l}$ revers in die erste Kavität des *RNA 6000 Pico Chips* pipettiert. Der Gel-Dye Mix wird mit Hilfe einer Spritze für 30 s in die Kapillare des Chips gedrückt. Zwei weitere Kavitäten des Chips werden mit $9 \mu\text{l}$ Gel-Dye Mix befüllt, eine weitere mit $9 \mu\text{l}$ *RNA Conditioning Solution*. In alle Kavitäten für die Proben und den Längenstandard werden zunächst $5 \mu\text{l}$ RNA-Marker pipettiert. Dann werden $1 \mu\text{l}$ Längenstandard in die Kavität des Größenstandards gegeben und je $1 \mu\text{l}$ RNA-Probe (zuvor 1:100 in RNase-freiem Wasser verdünnt) in die anderen Kavitäten. Der Chip wird anschließend im IKA Vortexer für 1 min bei 2.400 rpm gevortext. Nachfolgend kann der Chip in den Bioanalyser 2100 (Agilent) gelegt werden. Es erfolgt eine kapillarelektrophoretische Auftrennung der RNA. Der RIN-Wert wird dabei mit Hilfe der 2100 Expert Software berechnet. Für die Berechnung wird das Verhältnis der 23S und 16S rRNA ausgerechnet sowie die 5S rRNA-Bande mit einberechnet. Im Idealfall sollte die 23S-Bande doppelt so groß sein wie die 16S-Bande (RIN=10). Es wird ein Elektropherogramm sowie ein Pseudo-Gelbild für jede Probe und dem Längenstandard erstellt (Abbildung 6.1) Bei allen RNA-Proben, die für Microarray-Analysen genutzt werden, wird der RIN-Wert bestimmt. Dazu gehören die RNA-Proben, die mittels des *PeqGold Bacterial RNA Kit* aus Bakterien in Lysozym-haltigem Medium (6.1.4), aus Kollagen-adhärenenten Bakterien (6.1.7) oder aus phagozytierten Bakterien (6.2.8) extrahiert wurden. Die Bestimmung des RIN-Wertes erfolgt für humane RNA, extrahiert mit dem *NucleoSpin RNA II-Kit* (Phagozytose-Assay, 6.2.8) für die *Real-time* PCR (6.3.9) nur stichprobenartig.

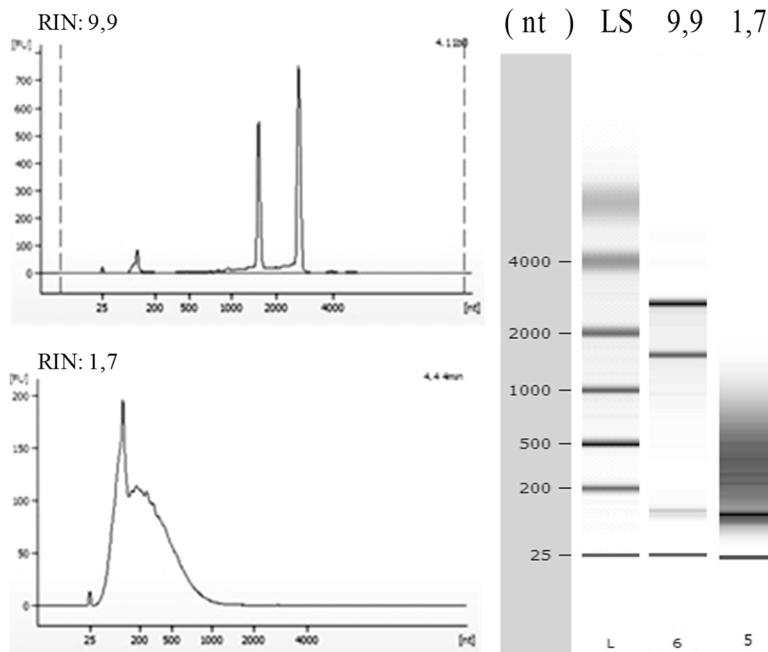


Abbildung 6.1: Auswertung des Bioanalyzers 2100

Auswertung zweier bakterieller RNA-Proben. Die eine Probe enthält intakte RNA mit einem RIN-Wert von 9,9, die andere Probe ist stark degradiert und hat einen RIN-Wert von 1,7. Links sind die dazugehörigen Pseudo-Gelbilder, rechts die Elektropherogramme zu sehen. LS = Längensstandard; nt = Nucleotid

6.3.5 cDNA-Synthese aus humaner mRNA

Die cDNA (*complementary DNA*)-Synthese erfolgt durch eine reverse Transkriptase (*SuperScript II Reverse Transcriptase*, Invitrogen), die RNA in cDNA transkribiert. Dafür werden 2 µg RNA mit RNase-freiem Wasser in einem Gesamtvolumen von 20 µl verdünnt. Die verdünnte RNA wird mit 2 µl dNTP-Mix (25 mM) und 2 µl Oligo-(dT)-Primer (7 pM) versetzt. Diese Proben werden für 5 min bei 65 °C inkubiert. Nachfolgend werden 8 µl FS-Puffer (5 x First-Strand Buffer) und 4 µl Dithiothreitol (DTT)-Lösung (0,1 M) hinzugefügt. Nach einer Inkubation bei 42 °C für 2 min wird 2 µl reverse Transkriptase (400 Einheiten) hinzugegeben. Im Thermocycler (Biometra) folgt die Transkription der RNA zu cDNA bei folgendem Temperaturprofil: Inkubation für 5 min bei 25 °C gefolgt von 50 min bei 42 °C. Zum Schluss erfolgt eine Erhöhung der Temperatur für 15 min auf 72 °C zur Inaktivierung der reversen Transkriptase. Die transkribierte cDNA kann bei -20 °C gelagert werden.

6.3.6 cDNA-Synthese aus bakterieller mRNA

Bakterielle RNA wird mit dem *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (ThermoFisher) zu cDNA transkribiert. Dafür werden 500 ng RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 10 µl verdünnt und 10 µl Mastermix hinzugegeben. Dieser besteht aus

2 µl 10x RT Puffer, 0,8 µl 25x dNTP Mix (100 mM), 2 µl 10x RT *Random Primer*, 1 µl MultiScribe Reverse Transkriptase und 4,2 µl RNase-freiem Wasser. Die Umschreibung der RNA zu cDNA erfolgt dann in einer einstufigen PCR. Zuerst wird der PCR-Ansatz für 10 min bei 25 °C inkubiert, anschließend für 120 min bei 37 °C. Die reverse Transkriptase wird im letzten Schritt durch eine 5-minütige Inkubation bei 85 °C inaktiviert. Die transkribierte cDNA kann bei -20 °C gelagert werden.

6.3.7 DNA-Extraktion aus bakteriellen Zellen

Zur Etablierung des Microarrays (6.3.10) wird intakte hochmolekulare genomische DNA benötigt. Zur Extraktion hochmolekularer DNA wird eine besonders schonende Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode genutzt. Dafür werden 50 ml Übernachtskulturen geerntet und mit AK-I Puffer gewaschen (5.000 rpm, 5 min). Nachfolgend werden die bakteriellen Zellen bei -20 °C für mindestens eine Stunde eingefroren, anschließend in 1 ml AK I Puffer resuspendiert und 30 mg/ml Lysozym hinzugegeben. Diese Suspension wird für 30-60 min bei 37 °C inkubiert. Danach wird zur Inhibition der freigesetzten DNasen 240 µl 0,5 M EDTA (pH 8) hinzugegeben. Proteine werden mittels 20 µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 37 °C für 10 min abgebaut. Zur Probe werden 140 µl 10 %-iges SDS gegeben, vorsichtig gemischt und für 1-2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Es folgt die Zugabe von 2,4 ml neutralem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und eine Mischung der Probe für 15 min. Diese wird anschließend für 15 min bei 4000 × g zentrifugiert und die Oberphase in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt. Zu der Oberphase werden 1,2 ml Chloroform-Isoamylalkohol hinzugegeben. Die Oberphase wird erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wird so lange wiederholt bis kein Phenolgeruch mehr zu vernehmen ist. In der Probe vorliegende RNA wird mit 40 µl RNase A (10 mg/ml) innerhalb einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C verdaut. Es folgt die Zugabe von 375 µl 5 M NaCl-Lösung sowie 618 µl PEG6000 (39 % w/v in Wasser). Die ausgefallene DNA wird mit einer sterilen Pasteurpipette aufgewickelt und jeweils eine Minute in 70 %-igem Ethanol, in absolutem Ethanol und noch einmal in 70 %-igem Ethanol gehalten. Die DNA wird dann für 3-5 min an der Luft getrocknet, in 100 µl TE Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) eingetaucht und vorsichtig von der Pasteurpipette abgewickelt. Über Nacht kann die DNA im TE-Puffer quellen und sich lösen. Die DNA kann frühestens am nächsten Tag mittels des Nanodrop 2000 quantifiziert (6.3.3) werden. Die Qualität wird mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft (6.3.8).

6.3.8 Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse genomischer DNA sowie PCR-Produkten

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wird DNA auf Agarose-Gele aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Dies dient der qualitativen Bestimmung genomischer DNA und der Überprüfung von PCR-Produkten. Zur Herstellung von Agarose-Gelen wird Agarose in $0,5 \times$ TBE-Puffer gekocht und mit Ethidiumbromid ($5 \mu\text{l}$ 0,1 %-iges Ethidiumbromid auf 100 ml) versetzt. Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und fluoresziert bei Anregung mit Licht im UV-Bereich. Die Reaktionsansätze werden im Verhältnis 1:5 mit Proben-Auftragspuffer vermischt und in die Geltaschen des Agarosegels aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt bei einer Spannung von 100 V und einem Strom von 100 mA, der für 42 min angelegt wird. Die negative DNA migriert aufgrund der angelegten Spannung zur Anode. Die Auftrennung der DNA im Gel kann durch einen UV-Transilluminator detektiert und dokumentiert werden. Zur Größenermittlung wird der GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder DNA-Längenstandard oder 50 bp DNA Ladder DNA-Längenstandard der Firma Fermentas verwendet.

6.3.9 Relative quantitative *Real-time* PCR

Die *Real-time* PCR dient der relativen Quantifizierung von Genexpressionen. Diese werden mittels des *LightCycler 480 SYBR Green I Master-Kits* am LightCycler 480 II der Firma Roche durchgeführt. Der Farbstoff SYBR Green lagert sich in die kleine Furche doppelsträngiger DNA ein, wodurch ein fluoreszierender Farbstoff-Komplex gebildet wird. Der gebildete DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex wird bei einer Wellenlänge von $\lambda = 480 \text{ nm}$ angeregt und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 521 \text{ nm}$. Die Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zur Konzentration der doppelsträngigen DNA. Die Zyklusanzahl, bei der ein Schwellenwert überschritten wird und die Amplifikation in die exponentielle Phase übergeht, wird Ct (*Cycle Threshold*)-Wert oder Cp (*Crossing Point*)-Wert genannt. Eine Schmelzkurve am Ende der Amplifikation dient zur Kontrolle des Amplifikats.

Der Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Light Cycler 480 SYBR GreenI Master	5,00 μl
Wasser	2,00 μl
Forward-Primer (20 μM)	0,25 μl
Reverse-Primer (20 μM)	0,25 μl
Template (cDNA)	2,50 μl

PCR-Temperaturprofil zur relativen Quantifizierung von Genexpressionen:

Denaturierung	45 ×			Schmelzkurve			
	Denaturierung	Annealing	Elongation				
95 °C	95 °C	T _{AN}	72 °C	60 °C	60 → 95°C	95 °C	30 °C
120 s	10 s	15 s	20 s	15 s	15 min	15 s	10 s

Die Effizienzen für die verwendeten Primer-Systeme können der **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** und der Tabelle 7.4 entnommen werden. Die ideale Effizienz eines Primerpaares liegt bei 2, so dass bei jedem Zyklus die DNA-Menge verdoppelt wird. Die reale Effizienz liegt meist etwas unter diesem Wert. Die Auswertung der *Real-time* PCR erfolgt relativ zur Quantifizierung der Referenzgene. Dabei handelt es sich um Gene, die durch eine nicht regulierte und somit gleichbleibende Genexpression charakterisiert sind. Die geeignetsten Referenzgene werden mittels GenNorm ermittelt (Vandesompele *et al.*, 2002). Die Genexpression des zu untersuchenden Zielgens wird mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet (Vandesompele *et al.*, 2002). Die relative Expression (R) wird durch folgende Formel bestimmt (MW = Mittelwert):

$$R = \frac{(E \text{ Zielgen})^{\Delta C_t \text{ Zielgen (MW Kontrolle - MW Behandlung)}}}{(E \text{ Referenzgen})^{\Delta C_t \text{ Referenzgen (MW Kontrolle - MW Behandlung)}}$$

6.3.10 Microarray Entwicklung

Die Microarray-Entwicklung zur Genexpressions-Analyse von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* erfolgte in Zusammenarbeit mit der Firma OakLabs (Hennigsdorf). Die Microarrays werden von Agilent mit Hilfe der *Inkjet Technology* hergestellt. Zunächst wird ein Microarray im XL-Design (8×60K Design) entwickelt. Dafür wird die vollständig sequenzierten Genome dieser vier *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme verwendet: DSM 16831, BAA-2069, UCN 34 und ATCC 43143. Auf dem XL-Array repräsentieren bis zu 20 verschiedene Oligonukleotide (60-mer) jedes einzelne Gen der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme. Die verschiedenen Oligonukleotide des Microarrays werden dafür genutzt, die am besten bindenden Oligonukleotide zu finden. Hierfür werden verschiedene RNA-Proben und DNA-Proben für die Untersuchung der Hybridisierung verwendet.

Von den insgesamt fünf verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen (DSM 16831, BAA-2069, LMG 17956, UCN 34 und ATCC 43143) wurde reine Bakterien-RNA und RNA aus Mischkulturen (Menge: mind. 200 ng; Konzentration: ca. 50 ng/μl), die aus

bakteriellen und humanen Zellen bestehen, unter folgenden Bedingungen (37 °C) isoliert und gepoolt:

Reine bakterielle RNA-Probe:

Übernachtskultur in BHI

Kultur in exponentieller Phase in BHI (2,5 h)

Kultur in RPMI+FBS (6 h)

Übernachtskultur in SBHI

Kultur in exponentieller Phase in SBHI (2,5 h)
--

Kultur in Wasser (1 d)

Kultur in TS-Medium (pH 5; 1 d)

An Kollagen adhärenente Bakterien in BHI (2 h)
--

An Fibronectin adhärenente Bakterien in BHI (2 h)

Misch-RNA (bakterielle und humane)-Probe:

Inkubation nach Phagozytose durch Makrophagen (5 h)

Kultivierung mit Monozyten und Endothelzellen (EAhy926) (6 h)

Inkubation in humanem Vollblut (6 h)

Die RNA-Proben sollten mindestens einen RIN-Wert von 6 (Bioanalyzer-Analyse 5.3.4) aufweisen. Außerdem sollten die OD 260/280- und OD 260/230-Quotienten in der Nanodrop-Analyse größer als 1,8 sein. Zusätzlich wird von allen fünf Stämmen die genomische DNA (mind. 1,5 µg, um 100 ng/µl) isoliert (6.3.7), um die Hybridisierung an Oligonukleotide nicht-exprimierter Gene zu erfassen. Die verschiedenen Proben werden mit Cy3 oder Cy5 markiert. Danach wird eine Zwei-Farben-Hybridisierung durchgeführt (Abbildung 6.2). Für jedes Gen wird ein Diagramm erstellt, in dem die Fluoreszenzintensitäten nach Hybridisierung mit unterschiedlichen Proben dargestellt werden (Abbildung 6.3).

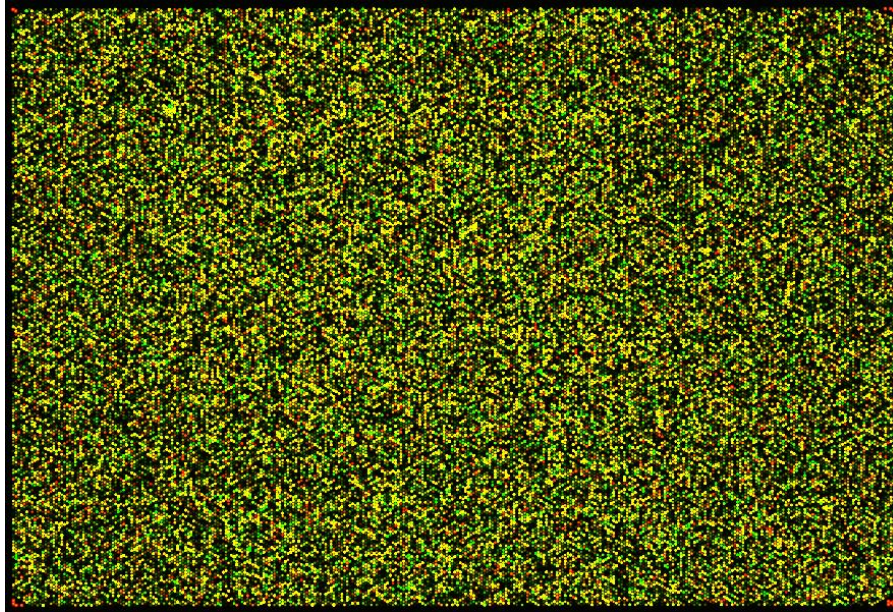


Abbildung 6.2: Fluoreszenzsignale eines Arrays nach Hybridisierung von RNA- und DNA-Proben
In Grün sind die Spots dargestellt, an denen gepoolte RNA aus Reinkulturen (Cy3-markiert) hybridisiert ist. In Rot sind die Spots gezeigt, an deren Oligonukleotide RNA aus Kokulturen (Cy5-markiert) hybridisiert vorlag. Die gelben Spots repräsentieren eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale.

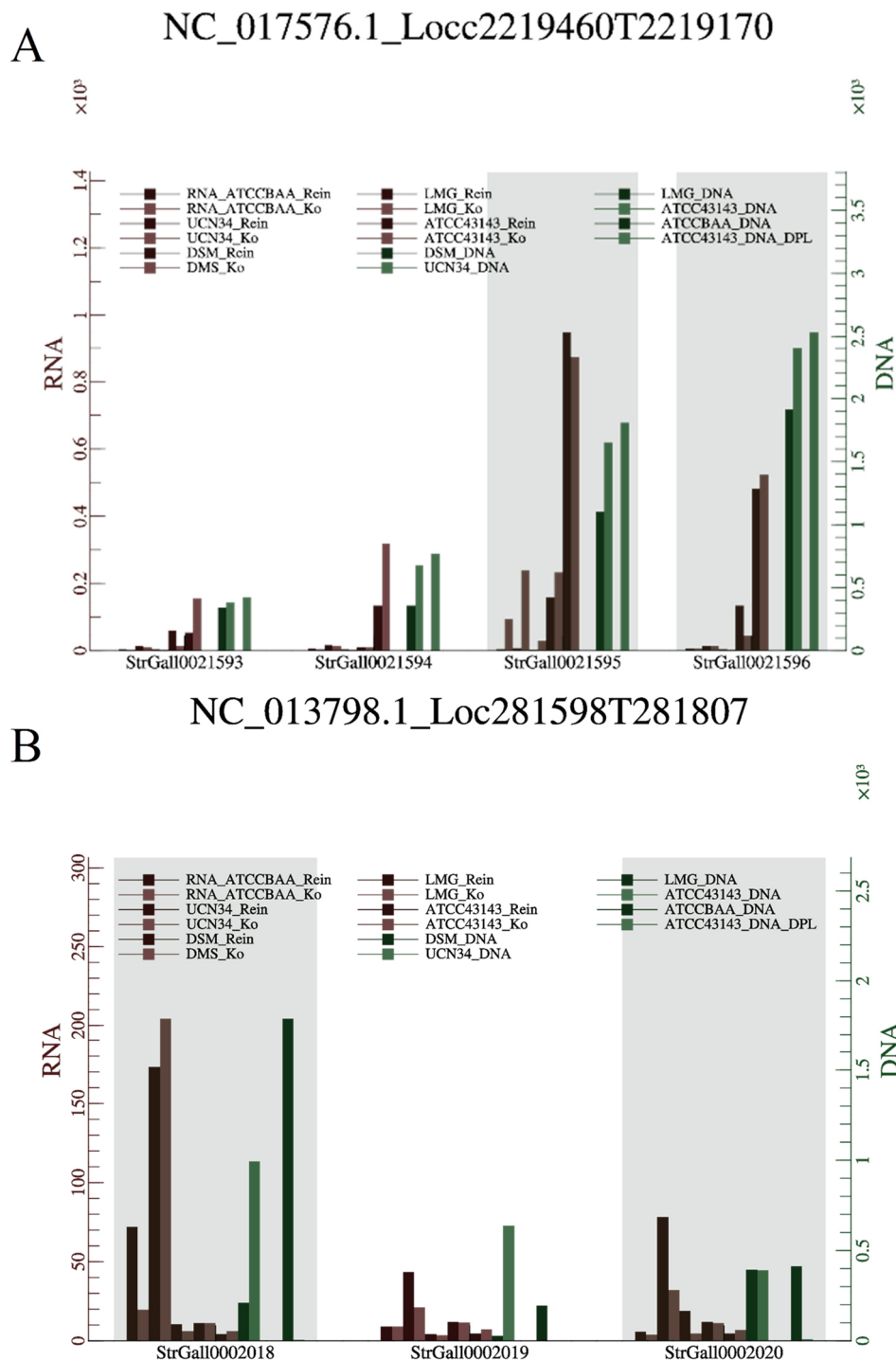


Abbildung 6.3 Signalstärken nach Hybridisierung von verschiedenen Proben an verschiedene Oligonukleotide, die ein Gen repräsentieren

Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten nach Hybridisierung verschiedener RNA- und DNA-Proben an Oligonukleotide, die zwei verschiedene Gene repräsentieren. In der Abbildung A sind die Fluoreszenzintensitäten nach Hybridisierung von Nukleinsäure an das Gen NC_017576.1, dargestellt. In der Abbildung B sind die Fluoreszenzintensitäten nach Hybridisierung von Nukleinsäuren an Oligonukleotide die das nicht-exprimierte Gen NC_013798.1 repräsentieren. Die linke y-Achse skaliert die Fluoreszenzintensität nach Hybridisierung von RNA-Proben (rote Balken), die rechte y-Achse skaliert die Fluoreszenzintensität nach Hybridisierung von DNA-Proben (grüne Balken). In grau hinterlegt sind die Oligonukleotide, die am besten geeignet sind für Microarray-Analysen. Rein = RNA-Reinkultur; Ko = RNA-KoKultur; ATCCBAA = BAA-2069; DSM = DSM 16831; LMG = LMG 17956

Die Auswertung der XL-Array-Analyse führt zur Entwicklung eines Arrays im 8x15K Design, auf dem 2-3 Oligonukleotide pro Gen vorhanden sind. Dieser enthält final 10.607 verschiedene Oligonukleotide, die insgesamt 4.382 Gene repräsentieren. Davon sind allein 1.326 Sequenzen spezifisch für den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm DSM 16831. Alle Gene, außer denen, die spezifisch für die Stämme DSM 16831 (1326 Gene), UCN 34 (475 Gene) oder ATCC 43143 (292 Gene) sind, wurden nach dem Genom von BAA-2069 (2270 Gene) annotiert. Die Daten des Microarrays sind bei Gene Expression Omnibus (GEO) von NCBI unter der Nummer GPL23196 (Agilent-072445 ArrayXS_ *S.gallolyticus*_01-2015) hinterlegt.

6.3.11 Proben-Prozessierung und Micorarray-Hybridisierung

6.3.11.1 *cDNA-Synthese*

Die Markierung von RNA erfolgte mit dem *Low Input Quick Amp WT Labeling Kit* von Agilent für eine *One-Color Microarray-based Gene Expression Analysis*. Dafür werden 50 ng RNA aus Reinkulturen eingesetzt oder 75 ng gemischte RNA aus humanen und bakteriellen Zellen. Zusätzlich wird die Probe mit RNA aus dem Spike-in-Mix als Kontrolle versetzt. Dafür wird der Spike-in-Mix für 5 min auf 37 °C aufgewärmt, gevortext und anschließend seriell so verdünnt, dass 20 ng in 2 µl RNase-freiem Wasser vorliegen. Als erster Schritt wird die RNA in cDNA transkribiert. Dafür werden 1 µl WT-Primer, 2 µl verdünnter Spike-in-Mix und 2,5 µl verdünnte RNA-Probe in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert, für 10 min bei 65 °C inkubiert und die Proben für mindestens 5 min auf Eis gehalten. Nachfolgend wird der cDNA Master Mix vorbereitet. Dieser besteht aus folgenden Komponenten:

5x First Strand Buffer	2,00 µl
0,1 M DTT	1,00 µl
10 mM dNTP Mix	0,50 µl
Affinity Script RNase Block Mix	1,20 µl

10 µl dieses Mastermixes wird zu der Probe gegeben. Dann erfolgt die cDNA-Synthese im Thermocycler (Biometra). Zunächst werden die Proben für 120 min bei 40 °C, dann bei 70 °C für 15 min inkubiert und abschließend auf Eis gehalten. Durch die WT-Primer liegt die T7 Promoter-Sequenz in der doppelsträngigen cDNA vor, die der cRNA-Synthese dient.

6.3.11.2 cRNA-Synthese

Bei der cRNA-Synthese wird die RNA mit Cy3-CTP markiert. Dafür wird der *CyeDye*-Mix wie folgt zusammenpipettiert:

Wasser	0,75 µl
5x Transcription Buffer	3,20 µl
0,1 M DTT	0,60 µl
NTP Mix	1,00 µl
T7 RNA Polymerase Blend	0,21 µl
Cyanine 3-CTP	0,24 µl

Die cRNA-Synthese erfolgt dann bei 40 °C für 120 min im Thermocycler (Biometra) mit anschließender Inkubation auf Eis.

6.3.11.3 cRNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung der cRNA erfolgt mit dem *RNeasy Mini Kit* von Qiagen. Die cRNA-Proben werden mit 84 µl Wasser verdünnt, so dass insgesamt ein Volumen von 100 µl vorhanden ist. Diese wird dann weiter mit 350 µl RLT Puffer sowie 250 µl reinstem Ethanol gut vermischt. Das gesamte Gemisch wird auf die Säule gegeben und die RNA durch Zentrifugation bei 4 °C, 30 s und 13.000 rpm an die Säule gebunden. Der Durchfluss wird verworfen, die Säule mit 500 µl RPE Puffer gewaschen und bei 13.000 rpm, 4 °C für 30 s zentrifugiert. Dieser Schritt wird mit verlängerter Zentrifugation (1 min) wiederholt. Die cRNA wird mit 30 µl RNase-freiem Wasser nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur durch Zentrifugation (4 °C, 30 s, 13.000 rpm) eluiert. Das Eluat wird auf Eis gelagert. Mit dem Nanodrop 2000 wird die RNA quantifiziert sowie die Qualität überprüft (6.3.11.4).

6.3.11.4 Überprüfung der cRNA mittels Nanodrop 2000

Mit Hilfe des Nanodrops kann die cRNA quantifiziert werden. Außerdem lässt sich die Qualität der cRNA überprüfen. Dafür wird die Microarray Messung genutzt, bei der RNA-40 als Probentyp und Cy3 als Marker eingestellt wird. Es werden 2 µl cRNA-Probe eingesetzt. Die Software berechnet dann die cRNA-Konzentration und das Verhältnis zwischen dem Cy3-Marker und der cRNA-Konzentration (pmol Cy3 pro µg cRNA). Es sollte wenigstens 0,825 µg cRNA vorhanden sein. Außerdem sollte der Quotient Cy3/cRNA mindestens 5 pmol/µg betragen.

6.3.11.5 Hybridisierung

Für die Hybridisierung werden 600 ng RNA aus Reinkulturen oder 900 ng aus Mischkulturen (humane Zellen und Bakterien) eingesetzt. Dafür wird der Fragmentierungs-Mastermix wie folgt zusammengesetzt:

10x Genexpressions Blockierungsreagenz	5,00 µl
25x Fragmentierungspuffer	1,00 µl
cRNA Cy3	x µl (600 ng)
Wasser	add 25,00 µl

Die Fragmentierung der RNA findet bei 60 °C für 30 min statt. Nach der Fragmentierung werden 25 µl Hi-RPM Hybridisierungspuffer zu den Proben gegeben und für 1 min bei RT und 13.000 rpm zentrifugiert. Die Proben können anschließend auf die *Gasket slides*, die in einer SureHyb Hybridisierungskammer liegen, von links oben nach rechts unten aufgetragen werden. Um die Bildung kleiner Blasen zu vermeiden, wird revers pipettiert. Auf das *Gasket slide* werden dann die Microarrays mit der Agilent-Seite nach unten gelegt und die Hybridisierungskammer zgedreht. Bevor die Kammern in den Hybridisierungsofen (Agilent) eingespannt werden, wird überprüft, ob sich die großen Blasen im *Gasket slide* frei bewegen können. Die Hybridisierung von RNA aus Reinkultur findet bei 65 °C für 17 h statt. Bei RNA aus Mischkulturen wird die Hybridisierung auf 38 h verlängert.

6.3.11.6 Waschen des Microarrays und Stabilisierung der Hybridisierung

Nach der Hybridisierung wird die Hybridisierungskammer aufgeschraubt und der Microarray mit dem *Gasket slide* entnommen und in ein 50 ml-Zentrifugationsröhrchen mit Wasch Puffer I (inkl. Triton X-102) gegeben. Im Wasch Puffer I kann der Microarray vorsichtig mit einer Plastikpipette vom *Gasket slide* entfernt werden. Der *Gasket slide* kann danach verworfen werden und der Microarray wird in ein neues Zentrifugationsröhrchen mit Wasch Puffer I gegeben. Das Zentrifugationsröhrchen wird vorsichtig für 1 min geschwenkt und der Microarray in ein neues Zentrifugationsröhrchen mit Wasch Puffer II (inkl. Triton X-102, über Nacht bei 37 °C aufgewärmt) gegeben. Das Zentrifugationsröhrchen wird wieder für 1 min geschwenkt. Danach wird der Microarray in ein weiteres Zentrifugationsröhrchen mit Acetonitril gegeben und für 1 min inkubiert. Es folgt eine einminütige Inkubation in der Stabilisierungs- und Trocknungslösung von Agilent. Der Microarray wird vorsichtig und langsam entnommen, um Waschartefakte zu vermeiden. Für den Transport wird der gewaschene Microarray in ein mit gasförmigen Stickstoff gefülltes 50 ml-Zentrifugationsröhrchen gegeben, um eine Reduktion der Fluoreszenz durch Ozon zu

vermeiden. Die Microarrays wurden mit dem hochauflösendem Agilent Microarray Scanner G2565CA mit einer Auflösung von 5 µm gescannt. Die Ermittlung der Fluoreszenzintensitäten pro Spot erfolgte mit der *Feature Extraction Software* (Agilent).

6.3.12 Bestimmung der IL-6-Konzentration mittels ELISA

Die Interleukin 6-Konzentration wird in Zellkultur-Überständen mit Hilfe des *Human IL-6 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kits* bestimmt. Die Bestimmung wird mittels Biotin-markierter Antikörper, die an IL-6 binden ermöglicht, das wiederum Meerrettichperoxidase-gekoppeltes (HRP) Streptavidin binden kann. Das chromogene Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) ist ein Redoxindikator und färbt sich durch das Wasserstoffperoxid blaugrün. Diese Reaktion wird durch HRP katalysiert und ist direkt proportional zur IL-6-Konzentration. Die Reaktion zur Bestimmung der IL-6-Konzentration findet in 96-Kavitäten-Platten statt, die mit IL-6-Antikörpern beschichtet sind. Zunächst werden 50 µl Antikörper-Reagenz (biotinyliert) in jede Kavität gegeben. Mittels einer IL-6-Standardreihe kann die genaue IL-6 Konzentration bestimmt werden. Dafür werden 50 µl Standardlösung (0 pg/ml; 10,24 pg/ml; 25,6 pg/ml; 160 pg/ml; 400 pg/ml in RPMI+FBS+AB) sowie die Proben in Doppelbestimmung in die mit Antikörpern vorgelegten Kavitäten gegeben. Anschließend wird dies für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen. In die einzelnen Kavitäten werden dann 100 µl Streptavidin-HRP-Lösung (30 µl Streptavidin-HRP-Konzentrat in 12 ml Streptavidin-HRP-Verdünnungspuffer) pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Platte dreimal gewaschen und 100 µl TMB-Substratlösung in die Kavitäten gegeben. Die nachfolgende 30-minütige Inkubation erfolgt im Dunkeln und die Reaktion wird mit 100 µl Stopp-Lösung pro Kavität beendet. Die optische Dichte wird am Mikroplatten-Leser bestimmt. Die Absorption wird bei $\lambda = 450$ nm gemessen. Zur optischen Korrektur wird zusätzlich die Absorption bei $\lambda = 550$ nm gemessen und von den Werten der OD₄₅₀ subtrahiert. Durch die Eichgerade, die mithilfe der Standardreihe erstellt werden kann, können die IL-6-Konzentrationen der Proben berechnet werden.

6.3.13 In vitro-Zytotoxizitäts-Test

Mittels Laktatdehydrogenase (LDH) kann der Zelltod nach verschiedener Behandlung von Zellen quantifiziert werden. LDH ist ein zytosolisches Enzym, das in vielen verschiedenen Zelltypen vorhanden ist und durch die Lyse der Zelle freigesetzt wird. Mittels des *Pierce LDH Assay Kits* (ThermoFisher) kann die extrazelluläre LDH-Konzentration über eine enzymatische Reaktion bestimmt werden. Als erstes katalysiert das LDH die Umsetzung von Laktat zu

Pyruvat indem NAD^+ zu NADH reduziert wird. Die Diaphorase reduziert Tetrazoliumsalz mittels NADH zu einem roten Formazanprodukt, das photometrisch detektiert werden kann. Für die LDH-Bestimmung wird ein Phagozytose-Assay, wie im Kapitel 6.2.8 beschrieben, in 96-Kavitäten-Platten durchgeführt. Die Zugabe von Lysispuffer 15 min vor dem eigentlichen Zeitwert (5 h), simuliert die Maximalzytotoxizität. Die Zugabe von 10 μl Wasser dient der Stimulation einer spontanen Lyse und wird als Negativkontrolle eingesetzt. Die Funktionalität der Reagenzien wird durch die LDH Positivkontrolle des Kits überprüft. Nach 5 h wird der Überstand von allen Kavitäten abgenommen und in eine neue 96-Kavitäten-Platte überführt. Anschließend wird 50 μl Reaktionsmix (0,6 ml Assay Puffer in 11,4 ml Substratmix) zu den Überständen gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation im Dunkeln werden 50 μl Stopp-Lösung zu jeder Probe hinzugegeben. Die Proben werden gut gemischt. Nach Entfernung aller Blasen wird die Absorption bei $\lambda = 490 \text{ nm}$ gemessen. Messwerte des instrumentellen Hintergrunds (Absorption bei $\lambda = 680 \text{ nm}$) werden von der OD_{490} subtrahiert. Außerdem wird die Absorption vom Medium-bedingten Hintergrund (RPMI+FBS+AB mit Reaktionsmix und Stopp-Lösung) von allen anderen Werten abgezogen. Die Zytotoxizität wird folgendermaßen berechnet:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{\text{Absorptionswert} - \text{spontane Zytotoxizität}}{\text{Maximalzytotoxizität} - \text{spontane Zytotoxizität}} * 100$$

6.3.14 DCFH-DA Assay

Intrazellulär vorliegende reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können mit Hilfe des Reagens Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA) erfasst werden. DCFH-DA diffundiert durch die Zellmembran und wird von intrazellulären Esterasen zu DCFH hydrolysiert. Durch ROS wird DCFH oxidiert. Oxidiertes DCFH kann durch Licht mit $\lambda = 488 \text{ nm}$ angeregt werden und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 525 \text{ nm}$. Das ermittelte Fluoreszenzsignal ist direkt proportional zur ROS-Konzentration.

Für die relative ROS-Quantifizierung wird der Phagozytose-Assay, wie in 6.2.8 beschrieben, mit folgenden Ausnahmen durchgeführt: Bevor die Bakterien zu den Makrophagen gegeben werden, werden diese für 30 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ mit $5 \mu\text{M}$ DCFH-DA im Medium (RPMI+FBS) inkubiert, so dass das Reagenz in die Zellen gelangen kann. Anschließend werden die Makrophagen zweimal mit DPBS gewaschen, um extrazelluläres DCFH-DA zu entfernen. Um Fluoreszenzsignale durch BHI zu vermeiden, werden die bakteriellen Übernachtskulturen mit DPBS gewaschen und in RPMI+FCS resuspendiert. Anschließend wird der Phagozytose-Assay durchgeführt. Als Positivkontrolle werden 1 mM H_2O_2 anstatt einer Bakteriensuspension zu den Makrophagen gegeben. Nach 20-minütiger Inkubation mit Antibiotika-haltigem Medium, wird

die Emission des oxidierten DCFH am Mikroplatten-Leser gemessen. Als Negativkontrolle dient die Emission von Kavitäten mit Makrophagen ohne Bakterien-Zugabe.

6.4 Statistische Analysen

Microarray-Analysen werden mittels *DirectArray* ausgewertet. Zunächst werden die Daten normalisiert. Hierfür wird der Mittelwert der Signalintensitäten von den Replikaten gebildet. Die Signalintensitäten werden dann nach Bolstad *et al.* quantil normalisiert, um die Varianz zwischen zwei Arrays zu reduzieren (Bolstad *et al.*, 2003). Die Signalintensitäten zwischen den Replikaten werden miteinander verglichen und Unterschiede in Intensitäten zu \log_2 -Werten für jedes Gen berechnet. Zusätzlich wird die statistische Signifikanz für jeden \log_2 -Wert mittels eines *two-sample* Welch's t-Tests berechnet. Als reguliert werden nur Gene betrachtet, deren \log_2 -Werte unter -1 oder über +1 liegen. Statistisch signifikant sind *p*-Werte kleiner als 0,05. Um signifikante Unterschiede zwischen zwei Bedingungen und Stämme zu ermitteln, wird der Mann-Whitney U Test in GraphPad Prism 6 durchgeführt.

7 Material

7.1 Bakterienstämme

Tabelle 7.1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Spezies	Stamm	Isolationsquelle	Herkunft
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Klinisches Isolat	ATCC
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	DSM 16831	Koala Fäkalien	DSMZ
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	BAA-2069	Human, Endokarditispatient	ATCC
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 17956	Kalb	LMG
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	UCN 34	Human, Endokarditispatient	ATCC
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	ATCC 43143	Human, Endokarditispatient	ATCC
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 15572	Ziege	LMG
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14621	Rind	LMG
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14621	Taube	LMG
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 1029	Pute	HDZ
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 1250	Huhn	HDZ
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 16005	Rind	LMG
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 15053	Kuh, Mastitis	LMG
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 15049	Kuh, Mastitis	LMG
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14879	Taube	LMG
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 1323	Human, Stuhl	HDZ
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 1330	Human, Stuhl	HDZ
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 1332	Human, Stuhl	HDZ
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Isolat 52 F2	Human, Stuhl	HDZ
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Isolat 52 G9	Human, Stuhl	HDZ
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	904	Human, Endokarditispatient	Korea
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Isolat 021702/06	Human, Endokarditispatient	HDZ
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	AC 1181	Human, Endokarditispatient	RTWH
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 1140	Human, Endokarditispatient	HDZ
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Isolat 005950/03	Human, Endokarditispatient	HDZ
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	S91/1/16	Rind	HDZ
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	S87/1/16	Rind	HDZ

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

7.2 Humane Zelllinie

Tabelle 7.2: In dieser Arbeit verwendete Zelllinie

Zelllinie	Herkunft	Referenz
THP-1	Humane monozytäre Zelllinie	Tsuchiya <i>et al.</i> , 1980

7.3 Medien für die Anzucht von Bakterien

<i>Brain Heart Infusion-Agar</i> (Oxoid)	47 g Medium, <i>add.</i> 1 l H ₂ O <i>bidest.</i> , autoklavieren, in Petrischalen gießen und bei 4 °C lagern
<i>Brain Heart Infusion Broth</i> (Oxoid)	37 g Medium, <i>add.</i> 1 l H ₂ O <i>bidest.</i> , autoklavieren und bei 4 °C lagern
<i>Trypton-Soja</i> (TS)-Agar (Oxoid)	40 g Medium, <i>add.</i> 1 l H ₂ O <i>bidest.</i> , autoklavieren, in Petrischalen gießen und bei 4 °C lagern

7.4 Medien für die Zellkultur

Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B (AB)	PAN Biotech, Aidenbach
<i>Dulbeccos Phosphate Buffered Saline</i> (DPBS)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FBS)	PAN Biotech, Aidenbach
Gentamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
RPMI-1640	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA-Lösung (10 x)	GE Healthcare, München

7.5 Chemikalien und Reagenzien

Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
2,7-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acetonitril	Roth, Karlsruhe
Biocoll	Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Chloroform-Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
dNTPs	Thermo Scientific, Waltham, USA
Ethanol 99,9 %	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fluorescein Isothiocyanat (FITC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Immersionsöl 518N	Zeiss, Peine
Kollagen Typ I (human, Plazenta)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
LysoTracker Red DND-99	Thermo Scientific, Waltham, USA
Oligo dT-Primer	Biomers, Ulm
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglycol (PEG)6000	Merck, Darmstadt

Roti-Mount FluorCare	Roth, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Streptavidin-AlexaFluor 546	Thermo Scientific, Waltham, USA
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Thermo Scientific, Waltham, USA
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasser (Aqua B. Braun)	Braun, Melsungen
Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Wasserstoffperoxid 30 %, stabilisiert	Roth, Karlsruhe

7.6 Lösungen und Puffer

AK I Puffer	6,7 % Sucrose 50 mM Tris-HCl (pH 8) 1 mM EDTA in bidest Wasser
Block-Lösung (Fluoreszenz-Mikroskopie)	5 % FBS in DPBS
Block-Lösung (Kollagen Assay)	1 % BSA 0,05 % Tween 20 in DPBS
FACS Clean	BD Biosciences, San José, USA
FACS Flow	BD Biosciences, San José, USA
Formaldehyd-Lösung	4 % Paraformaldehyd in DPBS (pH 6,9)
MACS-Puffer	0,5 % BSA 2 mM EDTA in DPBS
Waschpuffer I inkl. 0,005 % Triton X-102	Agilent
Waschpuffer II inkl. 0,005 % Triton X-102	Agilent

7.7 Proteine und Zytokine

DNase I	VWR, Erlangen
Interferon- γ	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma-Aldrich, Steinheim
M-CSF	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNase A	Sigma-Aldrich, Steinheim

7.8 Antikörper

CD3-APC	T-Zellen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD14-FITC	Monozyten	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD19-PE	B-Zellen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD68-PE	Monozyten/Makrophagen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD163-FITC	Monozyten/Makrophagen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD206-APC	Makrophagen/dendritische Zellen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

7.9 Geräte

aCOLyte 3 (<i>Colony Counter</i>)	Synbiosis, Cambridge, UK
Agilent Microarray Scanner G2565CA	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav	Tecnoma, Fernwald
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Brutschrank	Memmert GmbH&Co.KG, Schwabach
CB 210 CO ₂ -Brutschrank	Binder, Tuttlingen
FACS Canto II	BD Biosciences, San José, USA
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories
Gradient Cycler TGradient 96	Biometra GmbH, Langenhagen
Hybridisierungsöfen	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Inkubator Unimax 1000 mit Schüttler 1010	Heidolph, Schwabach
JuLI Br <i>Live Cell Analyzer</i>	Peqlab, Erlangen
Kolbenhubpipetten, verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg
Landgraf Thermocycler Various	Laborsysteme GmbH, Langenhagen
<i>LightCycler</i> 480 II	Roche, Basel, Schweiz

Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Mikrowelle	AEG, Dormagen
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop 2000	Thermo Scientific, Waltham, USA
Nikon Eclipse TE2000-S	Nikon Instruments, Düsseldorf
Nikon's Digital Sight DS-U3	Nikon Instruments, Düsseldorf
Sicherheitswerkbank	Wesco, Wettingen, Schweiz
Stickstofftank 500 series	MVE, Cleveland, USA
Infinite M200pro	Tecan, Crailsheim
Tisch-pH-Meter FiveEasy Plus	Roth, Karlsruhe
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge G-10, Rotor 11160	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zentrifuge Rotanta 460S, 380R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen
Wasserbad	

7.10 Größenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese

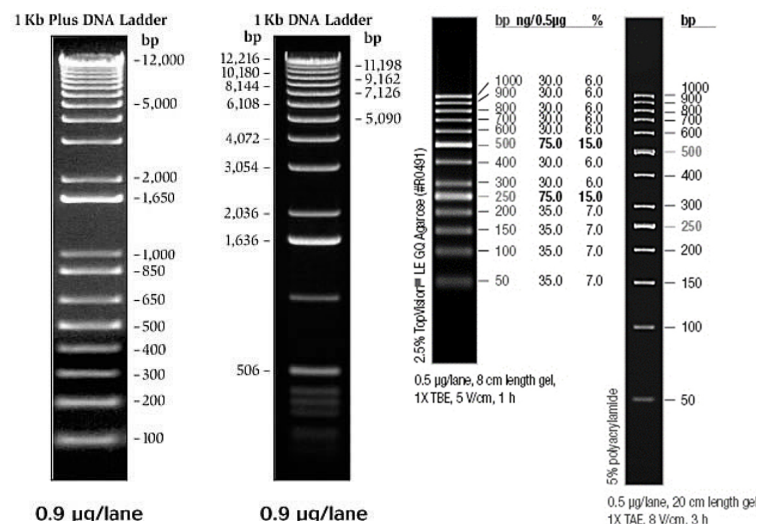


Abbildung 7.1: Verwendete Größenmarker für die Agarose-Gelelektrophorese
 Links: 1 kb-DNA Längenstandard von Fermentas (Thermo Scientific, Waltham, USA),
 Rechts: 50 bp-DNA Längenstandard von Fermentas (Thermo Scientific, Waltham, USA)

7.11 Oligonukleotide

Tabelle 7.3: Oligonukleotide zur relativen Quantifizierung von humaner mRNA

Protein (Gen)	T _{AN}	E	5'–3' sequence: Forward Reverse
Ribosomal protein L13 (<i>RPL13A</i>)	63°C	2,0	CGGAAGGTGGTGGTCGTA CTCGGGAAGGGTTGGTGT
Hydroxymethylbilane synthase (HMBS)	63°C	2,0	CTGCCAGAGAAGAGTGTG AGCTGTTGCCAGGATGAT
Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (<i>SDHA</i>)	63°C	1,8	AACTCGCTCTTGGACCTG GAGTCGCAGTTCGGATGT
Interleukin-1β (<i>IL-1B</i>)	63°C	1,9	ACAGATGAAGTGCTCCTTCCA GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT
Interleukin-6 (<i>IL-6</i>)	63°C	1,9	ACAGCCACTCACCTCTTCAG GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC
Interleukin-8 (<i>IL-8</i>)	63°C	1,9	GAACTGAGAGTGATTGAGAGTGGA CTCTTCAAAAACCTCTCCACAACC

Tabelle 7.4: Oligonukleotide zur relativen Quantifizierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-mRNA; T_{AN} = Annealing Temperatur; E = Effizienz

Protein (Gen)	T _{AN}	E	5'–3' sequence: Forward Reverse
1,4-alpha-glucan branching enzyme (<i>glgB</i>)	65°C	1,8	CAGGACGATTACGGAAAC GTTTGCCTGAAGTGCTTG
16S ribosomal RNA (<i>16S</i>)	65°C	1,9	TTATGACCTGGGCTACAC CCTACAATCCGAACTGAG
2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase (<i>dapD</i>)	65°C	1,7	TTACGCAAAGCGTCTTCGAGTG TTGACATGGGTGCTGTTCTTGG
23S ribosomal RNA (<i>23S</i>)	65°C	2,0	CTKCCAAGAAAAGCYTCT CATTTTGCCDAGTTCCTT
50S ribosomal protein L1 (<i>rplA</i>)	65°C	1,6	CGATAGCCATCATGTCTG GCGTAGAAGAAGCTGTAG
acyl-acyl carrier protein (ACP):phosphate acyltransferase (<i>plsX</i>)	65°C	2,0	GCTATGGGTGGCGACAATG AGCCCTGGACGGTCAATAC
Alanyl-tRNA synthetase (<i>alaS</i>)	65°C	2,0	GCTGCTACGCTTAAAGTC GTTGTCCGCAAATGTACG
Autolysin (<i>SGGBAA_c13580</i>)	65°C	2,0	ATCGTCCTGCCCTTATC CGGTTTCAGTTGCCAATC
Bifunctional N-acetylglucosamine-1-phosphate (<i>gcaD</i>)	65°C	1,8	TGAATCTGGGCGAACATGG ACTTGCGACAGCAGAAGAC
Carbonic anhydrase (<i>SGGBAA-c20810</i>)	65°C	1,9	TCAGCTTGAGGCAGAGCTAC GCGGACGGCAAACAGATT
Competence damage-inducible protein A (<i>cinA</i>)	65°C	1,8	GCTTCGCCCACCTATAAC GTTGCAGGACCAGATAGC
Conjugal transfer protein TraG (<i>traG</i>)	65°C	1,9	GCTGCTACGCTTAAAGTC GTTGTCCGCAAATGTACG
D-alanine carrier protein (<i>dltC</i>)	65°C	1,8	AGCATGGCAAAGTTCCTC ACGGTGGAACCTATTGTG
D-alanine transfer from Dcp to undecaprenol-phosphate (<i>dltB</i>)	65°C	2,0	AGCTGTGGCAATAGCAAGCTAC ACGGCGTGCTGAGTGAATTA
D-alanine transfer from undecaprenol-phosphate to the poly(glycerophosphate) chain (<i>dltD</i>)	65°C	1,8	CCACCGAGTTTGCTGTAAG GTGTTTATGACCGCTACGC
D-alanyl-D-alanine carrier protein ligase (<i>dltA</i>)	65°C	1,8	GACGGCATCATGTAATCC TATCACACGGGTGACTTAGG
<i>DSM16831_07375</i>	65°C	1,7	TAGGGTTGGTGTTCGATCAG GCAACCGCTTCAGGAGTTATTC

Protein (Gen)	T _{AN}	E	5'–3' sequence: Forward Reverse
Exogenous DNA-binding protein (<i>comEA</i>)	65°C	1,7	ATGCGCAAAGTGACCTACCTG CCGCCAAAGTTGCGGTATTAAG
F0F1 ATP synthase subunit A (<i>atpB</i>)	65°C	1,8	GCCGATGAACATTCTCGAAG TGAGAACCCTGTCCAAAG
Glucose-1-phosphate adenylyltransferase (<i>glgD</i>)	65°C	1,6	GACGGAACAGGCAAAGAAG CCAGAGCGTTTCAGGTAAG
Glycogen synthase (<i>glgA</i>)	65°C	1,5	AAGTAGGATGGCGTCATCAG ACGGAATCATGGCAGTATGG
Iron complex transport system ATP-binding protein (<i>fhuC</i>)	65°C	1,9	CACGCATTCATGCCCTTAAAGC ATGTGGAAAGCGACCGTATGAG
LrgA protein family (<i>GALLO_0983</i>)	65°C	1,8	ACAAAACCGATAACGGCAACA CCGCCTTAGACACATTGACG
Microcin immunity protein (<i>mccF</i>)	65°C	2,0	CCACCAATCGTAGCCAGAATAG AGTCACATTTCGCGTACTCAG
Multidrug resistance protein (<i>norN</i>)	65°C	2,0	AAGTCAATTGCCGATGGG ACCAGCACGCATCATTAG
NADH oxidase (<i>nox</i>)	65°C	2,0	CCTTAATTGGCGGGATGATTGG CGGTTGTGGTATGGCATTATGG
Nitrogen regulatory protein PII (<i>glnB</i>)	65°C	1,9	TCGTTCTCCTGTCCGAATAC CGGCGGTTGATGAAATTGTG
Nucleoside diphosphate kinase (<i>ndk</i>)	65°C	1,8	CAAACCAGAGGGCGATTTC GAGGTGCTTCACCGTATTG
Peptidase (<i>GALLO_0591</i>)	65°C	1,9	AGACTCAAGCTGGCAAGGTAG TGTTGGTTTGGCTCCTTCC
Peroxide resistance protein (<i>dpr</i>)	65°C	1,7	TGATGGACGGTCTTAACG CTTGAGCATCCAGATTG
Phosphopentomutase (<i>drm</i>)	65°C	1,7	AAATCGCAGCACACGAAG CATTACGACGGTGACCATAC
Post-translocation molecular chaperone (<i>prsA1</i>)	65°C	1,9	TATCGGTGCTGGTGTAAC GTGCGCTTGAGAATGATG
PTS system N-acetylgalactosamine-specific transporter subunit IIA (<i>levA</i>)	65°C	2,0	TTGGTGGTAGCCCACTTACAAC TGAAGAGCTGCTTGAGCTTCTG

7.12 Kits

Agilent RNA6000 Pico Kit

Agilent Technologies, Santa Clara,
USA

Gene Expression Hybridisierungskit

Agilent Technologies, Santa Clara,
USA

High-Capacity cDNA Reverse Transcription

Thermo Scientific, Waltham, USA

Human IL-6 ELISA Kit

Thermo Scientific, Waltham, USA

Inside Stain Kit

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Light Cycler 480 SYBR Green I Master

Roche, Basel, Schweiz

Low Input Quick Amp WT Labeling Kit

Agilent Technologies, Santa Clara,
USA

NucleoSpin RNA II

Machery-Nagel, Düren

Pan Monocyte isolation kit

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

<i>PeqGold Bacterial RNA Kit</i>	VWR, Erlangen
<i>Pierce LDH Assay Kit</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>RNA Spike-in-Kit - eine Farbe</i>	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Superscript II Reverse Transcriptase Kit</i>	Invitrogen, San Diego, USA

7.13 Sonstige Materialien

6-, 12-, 24- und 96-Kavitäten-Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Deckgläser, quadratisch	Roth, Karlsruhe
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Gasket slide, 8 HD Arrays/Slide	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Glasgefäße	Schott, Mainz
Impfeschlingen/-ösen	Sarstedt, Nümbrecht
Kryoröhrchen Viabank	Abtek Biologicals, Liverpool, England
Kryostaten-Röhrchen	Roth, Karlsruhe
Lysing Matrix B	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
MACS Multistand	Miltenyi Biotec
MACS Trennsäulen Typ MS	Miltenyi Biotec
Mini-MACS-Magnet	Miltenyi Biotec
Neubauerzählkammer	Fleischhacker, Meckenheim
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Parafilm	Fleischhacker, Meckenheim
PCR Reaktionsgefäße 200 µL	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
qPCR Platten (96-Kavitäten), weiß	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Suspensionszellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen	Falcon, Heidelberg

7.14 Software und Datenbanken

Clone Manager Professionel 9.0	Scientific & Educational Software, USA
--------------------------------	--

DirectArray	OakLabs, Hennigsdorf
Feature Extraction Software	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
geNORM	http://medgen.ugent.be/~jvd esomp/genorm/
GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc., USA
i-Control Software	Tecan, Crailsheim
ImageJ	https://imagej.nih.gov/ij/
LightCycler 480 Software	Roche, Basel, Schweiz
Nanodrop 2000/2000c	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Nikon's NIS Elements	Nikon Instruments, Düsseldorf
PHAST	Zhou <i>et al.</i> , 2011
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
UniProt	The UniProt Consortium, 2014

8 Referenzen

- Abachin E, Poyart C, Pellegrini E, Milohanic E, Fiedler F, Berche P, *et al.* Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*. 2002;43(1):1–14.
- Abdulmir AS, Hafidh RR, Bakar FA, others. 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*. 2011;30(1):11–11.
- Abeni C, Rota L, Ogliosi C, Bertocchi P, Centurini PB, Zaniboni A. Correlation among *Streptococcus bovis*, endocarditis and septicemia in a patient with advanced colon cancer: a case report. *Journal of Medical Case Reports*. 2013;7:185.
- Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology*. 1999;17(1):593–623.
- Alvarez G, Campoy S, Spricigo DA, Teixidó L, Cortés P, Barbé J. Relevance of DNA alkylation damage repair systems in *Salmonella enterica* virulence. *Journal of Bacteriology*. 2010;192(7):2006–8.
- Baker J, Derr A, Karuppaiah K, MacGilvray M, Kajfasz J, Faustoferri R, *et al.* *Streptococcus mutans* NADH oxidase lies at the intersection of overlapping regulons controlled by oxygen and NAD⁺ levels. *Journal of Bacteriology*. 2014;196(12):2166–77.
- Balasubramanian D, Mathee K. Comparative transcriptome analyses of *Pseudomonas aeruginosa*. *Human Genomics*. 2009;3(4):1.
- Baran J, Guzik K, Hryniewicz W, Ernst M, Flad HD, Pryjma J. Apoptosis of monocytes and prolonged survival of granulocytes as a result of phagocytosis of bacteria. *Infection and Immunity*. 1996;64(10):4242–8.
- Beck M, Frodl R, Funke G. Comprehensive study of strains previously designated *Streptococcus bovis* consecutively isolated from human blood cultures and emended description of *Streptococcus galloyticus* and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli*. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(9):2966–72.
- Bellaire BH, Roop RM, Cardelli JA. Opsonized virulent *Brucella abortus* replicates within nonacidic, endoplasmic reticulum-negative, LAMP-1-positive phagosomes in human monocytes. *Infection and immunity*. 2005;73(6):3702–13.
- Bennermo M, Held C, Stemme S, Ericsson C-G, Silveira A, Green F, *et al.* Genetic predisposition of the interleukin-6 response to inflammation: implications for a variety of major diseases? *Clin Chem*. 2004;50(11):2136–40.
- Benoit M, Thuny F, Le Priol Y, Lepidi H, Bastonero S, Casalta J-P, *et al.* The transcriptional programme of human heart valves reveals the natural history of infective endocarditis. *PLoS ONE*. 2010;5(1):e8939.
- Berlanga M, Domènech Ò, Guerrero R. Biofilm formation on polystyrene in detached vs. planktonic cells of polyhydroxyalkanoate-accumulating *Halomonas venusta*. *International Microbiology*. 2015;17(4):205–12.
- Bi D, Xu Z, Harrison EM, Tai C, Wei Y, He X, *et al.* ICEberg: a web-based resource for integrative and conjugative elements found in Bacteria. *Nucleic Acids Research*. 2012;40(Database issue):D621–6.
- Boleij A, Muijtjens CMJ, Bukhari SI, Cayet N, Glaser P, Hermans PWM, *et al.* Novel clues on the specific association of *Streptococcus galloyticus* subsp *galloyticus* with colorectal cancer. *Journal of Infectious Diseases*. 2011;203(8):1101–9.

- Boleij A, Tjalsma H. The itinerary of *Streptococcus gallolyticus* infection in patients with colonic malignant disease. *Lancet Infectious Diseases*. 2013;13(8):719–24.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 2003;19(2):185–93.
- Brenciani A, Tiberi E, Morici E, Oryacsin E, Giovanetti E, Varaldo PE. ICESp1116, the genetic element responsible for erm (B)-mediated, inducible resistance to erythromycin in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;AAC–01494.
- Brenciani A, Tiberi E, Morroni G, Mingoia M, Varaldo PE, Giovanetti E. ICESp1116, the genetic element responsible for erm (B)-mediated, inducible erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes*, belongs to the TnGBS family of integrative and conjugative elements. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;AAC–00048.
- Callewaert L, Van Herreweghe JM, Vanderkelen L, Leysen S, Voet A, Michiels CW. Guards of the great wall: bacterial lysozyme inhibitors. *Trends in microbiology*. 2012;20(10):501–10.
- Chaussee MA, Dmitriev AV, Callegari EA, Chaussee MS. Growth phase-associated changes in the transcriptome and proteome of *Streptococcus pyogenes*. *Archives of Microbiology*. 2008;189(1):27–41.
- Collins LV, Kristian SA, Weidenmaier C, Faigle M, van Kessel KP, van Strijp JA, *et al.* *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *Journal of Infectious Diseases*. 2002;186(2):214–9.
- Corredoira J, Alonso M, García-Garrote F, García-Pais MJ, Coira A, Rabuñal R, *et al.* *Streptococcus bovis* group and biliary tract infections: an analysis of 51 cases. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013;
- Cotter PD, Hill C. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003;67(3):429–53.
- Crisóstomo MI, Vollmer W, Kharat AS, Inhülsen S, Gehre F, Buckenmaier S, *et al.* Attenuation of penicillin resistance in a peptidoglycan O-acetyl transferase mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*. 2006;61(6):1497–509.
- Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PloS one*. 2010;5(1):e8668.
- Danne C, Dubrac S, Trieu-Cuot P, Dramsi S. Single Cell Stochastic Regulation of Pilus Phase Variation by an Attenuation-like Mechanism. *PLoS pathogens*. 2014;10(1):e1003860.
- Danne C, Guérillot R, Glaser P, Trieu-Cuot P, Dramsi S. Construction of isogenic mutants in *Streptococcus gallolyticus* based on the development of new mobilizable vectors. *Research in Microbiology*. 2013;164(10):973–8.
- Darjee R, Gibb AP. Serological investigation into the association between *Streptococcus bovis* and colonic cancer. *Journal of Clinical Pathology*. 1993;46(12):1116–9.
- Davis KM, Weiser JN. Modifications to the peptidoglycan backbone help bacteria to establish infection. *Infection and immunity*. 2011;79(2):562–70.
- Deutscher J, Francke C, Postma PW. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2006;70(4):939–1031.

- Dong X, Tian B, Dai S, Li T, Guo L, Tan Z, *et al.* Expression of PprI from *Deinococcus radiodurans* Improves Lactic Acid Production and Stress Tolerance in *Lactococcus lactis*. *PloS one*. 2015;10(11):e0142918.
- Dumke J. Analyse der Transmission und des zoonotischen Potentials von *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. 2015;Dissertation Universität Bielefeld
- Dumke J, Hinse D, Vollmer T, Knabbe C, Dreier J. Development and Application of a Multilocus Sequence Typing Scheme for *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52 (7):2472–8.
- Dumke J, Hinse D, Vollmer T, Schulz J, Knabbe C, Dreier J. Potential Transmission Pathways of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. *PloS one*. 2015;10(5):e0126507.
- Dupré-Crochet S, Erard M, Nüße O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? *Journal of Leukocyte Biology*. 2013;94(4):657–70.
- El Aamri F, Remuzgo-Martínez S, Acosta F, Real F, Ramos-Vivas J, Icardo JM, *et al.* Interactions of *Streptococcus iniae* with phagocytic cell line. *Microbes and Infection*. 2015;17(4):258–65.
- Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002;15(4):613–30.
- Faherty CS, Maurelli AT. Staying alive: bacterial inhibition of apoptosis during infection. *Trends in microbiology*. 2008;16(4):173–80.
- Fei F, Mendonca ML, McCarry BE, Bowdish DM, Surette MG. Metabolic and transcriptomic profiling of *Streptococcus intermedius* during aerobic and anaerobic growth. *Metabolomics*. 2016;12(3):1–13.
- Fittipaldi N, Sekizaki T, Takamatsu D, De La Cruz Domínguez-Punaro M, Harel J, Bui NK, *et al.* Significant contribution of the *pgdA* gene to the virulence of *Streptococcus suis*. *Molecular microbiology*. 2008;70(5):1120–35.
- Fontaine L, Wahl A, Flécharde M, Mignolet J, Hols P. Regulation of competence for natural transformation in streptococci. *Infection, Genetics and Evolution*. 2015;33:343–60.
- Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol*. 2005;13(1):34–40.
- Galbavý S, Lukác L, Porubský J, Cerná M, Labuda M, Kmetová J, *et al.* Collagen type IV in epithelial tumours of colon. *Acta histochemica*. 2002;104(4):331–4.
- Ge X, Yu Y, Zhang M, Chen L, Chen W, Elrami F, *et al.* Involvement of NADH Oxidase in Competition and Endocarditis Virulence in *Streptococcus sanguinis*. *Infection and immunity*. 2016;84(5):1470–7.
- Gibson CM, Mallett TC, Claiborne A, Caparon MG. Contribution of NADH oxidase to aerobic metabolism of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Bacteriology*. 2000;182(2):448–55.
- Goh YJ, Klaenhammer TR. A functional glycogen biosynthesis pathway in *Lactobacillus acidophilus*: expression and analysis of the *glg* operon. *Molecular microbiology*. 2013;89(6):1187–200.
- Goh YJ, Klaenhammer TR. Insights into glycogen metabolism in *Lactobacillus acidophilus*: impact on carbohydrate metabolism, stress tolerance and gut retention. *Microbial cell factories*. 2014;13(1):1.
- Gómez-Sagasti MT, Becerril JM, Martín I, Epelde L, Garbisu C. cDNA microarray assessment of early gene expression profiles in *Escherichia coli* cells exposed to a mixture of heavy metals. *Cell biology and toxicology*. 2014;30(4):207–32.

- Grimm I, Dumke J, Dreier J, Knabbe C, Vollmer T. Transcriptome analysis of lysozyme resistance in association with biofilm formation by *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. submitted. 2017 a;
- Grimm I, Dumke J, Vollmer T, Hinse D, Kalinowski J, Knabbe C, *et al.* Complete genome sequence of the *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* strain DSM 16831. GenomeA. 2017b.
- Grimm I, Weinstock M, Birschmann I, Dreier J, Knabbe C, Vollmer T. Strain-dependent interactions of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* with human blood cells. submitted. 2017c.
- Gross M, Cramton SE, Götz F, Peschel A. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. Infection and Immunity. 2001;69(5):3423–6.
- Gu BJ, Baird PN, Vessey KA, Skarratt KK, Fletcher EL, Fuller SJ, *et al.* A rare functional haplotype of the P2RX4 and P2RX7 genes leads to loss of innate phagocytosis and confers increased risk of age-related macular degeneration. The FASEB Journal. 2013;27(4):1479–87.
- Guariglia-Oropeza V, Helmann JD. *Bacillus subtilis* sigma confers lysozyme resistance by activation of two cell wall modification pathways, peptidoglycan *O*-acetylation and *D*-alanylation of teichoic acids. Journal of Bacteriology. 2011;193(22):6223–32.
- Haas A. The phagosome: compartment with a license to kill. Traffic. 2007;8(4):311–30.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nature reviews microbiology. 2004;2(2):95–108.
- Hanes F, Roux C, Dunman PM, Salzberger B, Lee JC. *Staphylococcus aureus* gene expression in a rat model of infective endocarditis. Genome Medicine. 2014;6(10):93.
- Hardie JM, Whiley RA. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. Society for Applied Bacteriology Symposium Series. 1997;26:1S–11S.
- Hébert L, Courtin P, Torelli R, Sanguinetti M, Chapot-Chartier M-P, Auffray Y, *et al.* *Enterococcus faecalis* constitutes an unusual bacterial model in lysozyme resistance. Infection and immunity. 2007;75(11):5390–8.
- Helal R, Bader G, Melzig M. Stimulation of lysozyme release by selected microbial preparations. Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences. 2012;67(7):564–6.
- Helal R, Melzig MF. New aspects in the synthesis and secretion of lysozyme by cultured human monocyte cell lines. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. 2010;46(6):492–6.
- Herbert S, Bera A, Nerz C, Kraus D, Peschel A, Goerke C, *et al.* Molecular basis of resistance to muramidase and cationic antimicrobial peptide activity of lysozyme in staphylococci. PLoS Pathogen. 2007;3(7):e102.
- De Herdt P, Haesebrouck F, Charlier G, Ducatelle R, Devriese LA, Vandebossche G. Intracellular survival and multiplication of virulent and less virulent strains of *Streptococcus bovis* in pigeon macrophages. Veterinary Microbiology. 1995;45(2-3):157–69.
- Hertzén E, Johansson L, Wallin R, Schmidt H, Kroll M, Rehn AP, *et al.* M1 protein-dependent intracellular trafficking promotes persistence and replication of *Streptococcus pyogenes* in macrophages. Journal of innate immunity. 2010;2(6):534–45.

- Higuchi M, Yamamoto Y, Kamio Y. Molecular biology of oxygen tolerance in lactic acid bacteria: Functions of NADH oxidases and Dpr in oxidative stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2000;90(5):484–93.
- Hinse D, Vollmer T, Rückert C, Blom J, Kalinowski J, Knabbe C, *et al.* Complete genome and comparative analysis of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, an emerging pathogen of infective endocarditis. *BMC genomics*. 2011;12(1):400.
- Ho TD, Hastie JL, Intile PJ, Ellermeier CD. The *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function sigma factor sigma is induced by lysozyme and provides resistance to lysozyme. *Journal of bacteriology*. 2011;193(22):6215–22.
- Hyams C, Camberlein E, Cohen JM, Bax K, Brown JS. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infection and Immunity*. 2010;78(2):704–15.
- Jang I-A, Kim J, Park W. Endogenous hydrogen peroxide increases biofilm formation by inducing exopolysaccharide production in *Acinetobacter oleivorans* DR1. *Scientific reports*. 2016;6.
- Jans C, Meile L, Lacroix C, Stevens MJ. Genomics, evolution, and molecular epidemiology of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex (SBSEC). *Infection, Genetics and Evolution*. 2015;33:419–36.
- Jiménez N, Reverón I, Esteban-Torres M, de Felipe FL, de las Rivas B, Muñoz R. Genetic and biochemical approaches towards unravelling the degradation of gallotannins by *Streptococcus gallolyticus*. *Microbial Cell Factories*. 2014;13(1):154.
- Johnson LR. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *Journal of Theoretical Biology*. 2008;251(1):24–34.
- Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P, Claverys J-P. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;12(3):181–96.
- Jung C-J, Yeh C-Y, Shun C-T, Hsu R-B, Cheng H-W, Lin C-S, *et al.* Platelets enhance biofilm formation and resistance of endocarditis-inducing streptococci on the injured heart valve. *Journal of Infectious Diseases*. 2012;205(7):1066–75.
- Jung C-J, Zheng Q-H, Shieh Y-H, Lin C-S, Chia J-S. *Streptococcus mutans* autolysin AtlA is a fibronectin-binding protein and contributes to bacterial survival in the bloodstream and virulence for infective endocarditis. *Molecular microbiology*. 2009;74(4):888–902.
- Kajfasz JK, Rivera-Ramos I, Scott-Anne K, Gregoire S, Abranches J, Lemos JA. Transcription of oxidative stress genes is directly activated by SpxA1 and, to a lesser extent, by SpxA2 in *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology*. 2015;197(13):2160–70.
- Kaplan JB. Antibiotic-induced biofilm formation. *International Journal of Artificial Organs*. 2011;34(9):737–51.
- Karuppiah V, Thistlethwaite A, Dajani R, Warwicker J, Derrick JP. Structure and Mechanism of the Bifunctional CinA Enzyme from *Thermus thermophilus*. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(48):33187–97.
- Kawamura Y, Hou X-G, Sultana F, Miura H, Ezaki T. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1995;45(2):406–8.
- Kim H, Jung BJ, Jeong J, Chun H, Chung DK. Lipoteichoic acid from *Lactobacillus plantarum* inhibits the expression of platelet-activating factor receptor induced by *Staphylococcus*

- aureus* lipoteichoic acid or *Escherichia coli* lipopolysaccharide in human monocyte-like cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014;24:1051–8.
- Kohro T, Tanaka T, Murakami T, Wada Y, Aburatani H, Hamakubo T, *et al.* A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2004;11(2):88–97.
- Kokare C, Chakraborty S, Khopade A, Mahadik K. Biofilm: Importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology*. 2009;8(2):159–68.
- Kubica M, Guzik K, Koziel J, Zarebski M, Richter W, Gajkowska B, *et al.* A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One*. 2008;3(1):e1409.
- Kurtovic A, Jarvis GN, Mantovani HC, Russell JB. Ability of lysozyme and 2-deoxyglucose to differentiate human and bovine *Streptococcus bovis* strains. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(8):3951–4.
- Lazarovitch T, Shango M, Levine M, Brusovansky R, Akins R, Hayakawa K, *et al.* The relationship between the new taxonomy of *Streptococcus bovis* and its clonality to colon cancer, endocarditis, and biliary disease. *Infection*. 2013;41(2):329–37.
- Lechardeur D, Fernandez A, Robert B, Gaudu P, Trieu-Cuot P, Lamberet G, *et al.* The 2-Cys peroxiredoxin alkyl hydroperoxide reductase c binds heme and participates in its intracellular availability in *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(21):16032–41.
- Li J, Bi Y, Dong C, Yang J, Liang W. Transcriptome analysis of adaptive heat shock response of *Streptococcus thermophilus*. *PloS one*. 2011;6(10):e25777.
- Li Y-H, Tang N, Aspiras MB, Lau PCY, Lee JH, Ellen RP, *et al.* A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *Journal of bacteriology*. 2002;184(10):2699–708.
- Liddle AD, Abram S, Iyer S, Andrade AJMD. *Streptococcus gallolyticus* prosthetic joint infection associated with undiagnosed colonic malignancy. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*. 2012;20(6):1069–70.
- Lieberman J, Frankel FR. Engineered *Listeria monocytogenes* as an AIDS vaccine. *Vaccine*. 2002;20(15):2007–10.
- Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, *et al.* Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *Journal of Biological Chemistry*. *ASBMB*; 1999;274(47):33419–25.
- Liew YK, Hamat RA, van Belkum A, Chong PP, Neela V. Comparative Exoproteomics and Host Inflammatory Response in *Staphylococcus aureus* Skin and Soft Tissue Infections, Bacteremia, and Subclinical Colonization. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2015;22(5):593–603.
- Lin I-H, Liu T-T, Teng Y-T, Wu H-L, Liu Y-M, Wu K-M, *et al.* Sequencing and comparative genome analysis of two pathogenic *Streptococcus gallolyticus* subspecies: genome plasticity, adaptation and virulence. *PLoS One*. 2011;6(5):e20519.
- Mair RW, Senadheera DB, Cvitkovitch DG. CinA is regulated via ComX to modulate genetic transformation and cell viability in *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*. 2012;331(1):44–52.

- Malachowa N, Whitney AR, Kobayashi SD, Sturdevant DE, Kennedy AD, Braughton KR, *et al.* Global changes in *Staphylococcus aureus* gene expression in human blood. PLoS ONE. 2011;6(4):e18617.
- Marshall JM, Gunn JS. The O-antigen capsule of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium facilitates serum resistance and surface expression of FliC. Infection and immunity. 2015;83(10):3946–59.
- Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. F1000Prime Reports. 2014;6(13.10):12703.
- Martins M, Aymeric L, Du Merle L, Danne C, Robbe-Masselot C, Trieu-Cuot P, *et al.* *Streptococcus gallolyticus* Pil3 pilus is required for adhesion to colonic mucus and for colonization of mouse distal colon. Journal of Infectious Diseases. 2015;212(10):1646–55.
- Masoudian M, Derakhshandeh A, Seno MG. *Brucella melitensis* and *Mycobacterium tuberculosis* depict overlapping gene expression patterns induced in infected THP-1 macrophages. Iranian journal of veterinary research. 2015;16(4):368.
- McBride SM, Sonenshein AL. The *dlt* operon confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Clostridium difficile*. Microbiology. 2011;157(5):1457–65.
- Mesnage S, Dellarole M, Baxter NJ, Rouget J-B, Dimitrov JD, Wang N, *et al.* Molecular basis for bacterial peptidoglycan recognition by LysM domains. Nature communications. 2014;5.
- Mitchell TJ. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. Nature Reviews Microbiology. 2003;1(3):219–30.
- Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. Journal of medical microbiology. 2007;56(12):1581–8.
- Morrison DA, Guédon E, Renault P. Competence for natural genetic transformation in the *Streptococcus bovis* group streptococci *S. infantarius* and *S. macedonicus*. Journal of bacteriology. 2013;195(11):2612–20.
- Mouithys-Mickalad A, Deby-Dupont G, Dogne J-M, de Leval X, Kohnen S, Navet R, *et al.* Effects of COX-2 inhibitors on ROS produced by *Chlamydia pneumoniae*-primed human promonocytic cells (THP-1). Biochemical and biophysical research communications. 2004;325(4):1122–30.
- Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, Miró JM, Fowler VG, Bayer AS, *et al.* Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis-Pro prospective Cohort Study. Archives of internal medicine. 2009;169(5):463–73.
- Nash JA, Ballard TNS, Weaver TE, Akinbi HT. The peptidoglycan-degrading property of lysozyme is not required for bactericidal activity in vivo. The Journal of Immunology. 2006;177(1):519–26.
- Nawrocki KL, Crispell EK, McBride SM. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of gram-positive bacteria. Antibiotics. 2014;3(4):461–92.
- Nelson KE, Weinstock GM, Highlander SK, Worley KC, Creasy HH, Wortman JR, *et al.* A catalog of reference genomes from the human microbiome. Science. 2010;328(5981):994–9.
- Neuhaus FC, Baddiley J. A continuum of anionic charge: structures and functions of *D*-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2003;67(4):686–723.

- Nieto C, Espinosa M, Puyet A. The maltose/maltodextrin regulon of *Streptococcus pneumoniae* Differential promoter regulation by the transcriptional repressor MalR. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(49):30860–5.
- Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2009;73(3):407–50.
- Nordenfelt P, Grinstein S, Björck L, Tapper H. V-ATPase-mediated phagosomal acidification is impaired by *Streptococcus pyogenes* through Mga-regulated surface proteins. *Microbes and Infection*. 2012;14(14):1319–29.
- O'Donovan L, Brooker JD. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Microbiology*. 2001;147(4):1025–33.
- Oh E, Jeon B. Role of alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) in the biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. *PLoS ONE*. 2014;9(1):e87312.
- Osawa R, Fujisawa T, Sly LI. *Streptococcus gallolyticus* sp. nov.; Gallate Degrading Organisms Formerly Assigned to *Streptococcus bovis*. *Systematic and Applied Microbiology*. 1995;18(1):74–8.
- Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Reviews in Microbiology*. 2003;57(1):677–701.
- Poyart C, Pellegrini E, Marceau M, Baptista M, Jaubert F, Lamy M-C, *et al.* Attenuated virulence of *Streptococcus agalactiae* deficient in *D*-alanyl-lipoteichoic acid is due to an increased susceptibility to defensins and phagocytic cells. *Molecular microbiology*. 2003;49(6):1615–25.
- Prakash B, Veeregowda B, Krishnappa G. Biofilms: a survival strategy of bacteria. *Current science*. 2003;85(9):1299–307.
- Radtke AL, Anderson KL, Davis MJ, DiMagno MJ, Swanson JA, O'Riordan MX. *Listeria monocytogenes* exploits cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) to escape the phagosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2011;108(4):1633–8.
- Rajaraman S, Subbiahdoss G, Patchirajan P. Effect of Hen Egg White on Microbial Adhesion and Biofilm Growth of Biomaterial Associated Infection Causing Pathogens. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology*. 2014;6(2):99–106.
- Reichmann NT, Cassona CP, Gründling A. Revised mechanism of *D*-alanine incorporation into cell wall polymers in Gram-positive bacteria. *Microbiology*. 2013;159(9):1868–77.
- Resch A, Rosenstein R, Nerz C, Götz F. Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Applied and environmental microbiology*. 2005;71(5):2663–76.
- Rhodes B, Fürnrohr BG, Roberts AL, Tzircotis G, Schett G, Spector TD, *et al.* The rs1143679 (R77H) lupus associated variant of ITGAM (CD11b) impairs complement receptor 3 mediated functions in human monocytes. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012;annrheumdis–2012.
- Richter E, Ventz K, Harms M, Mostertz J, Hochgräfe F. Induction of Macrophage Function in Human THP-1 Cells Is Associated with Rewiring of MAPK Signaling and Activation of MAP3K7 (TAK1) Protein Kinase. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2016;4.
- Romero-Hernández B, Tedim AP, Sánchez-Herrero JF, Librado P, Rozas J, Muñoz G, *et al.* *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* from human and animal origins: genetic diversity, antimicrobial susceptibility, and characterization of a vancomycin-resistant calf

- isolate carrying a vanA-Tn1546-like element. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(4):2006–15.
- Rusniok C, Couvé E, Da Cunha V, El Gana R, Zidane N, Bouchier C, *et al.* Genome sequence of *Streptococcus gallolyticus*: insights into its adaptation to the bovine rumen and its ability to cause endocarditis. *Journal of bacteriology*. 2010;192(8):2266–76.
- Sasaki E, Osawa R, Nishitani Y, Whiley RA. Development of a diagnostic PCR assay targeting the Mn-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) for identification of *Streptococcus gallolyticus*. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(3):1360–2.
- Schlegel L, Grimont F, Ageron E, Grimont PA, Bouvet A. 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*. 2003;53(3):631–45.
- Schreur PJW, Van Weeghel C, Rebel JM, Smits MA, van Putten JP, Smith HE. Lysozyme resistance in *Streptococcus suis* is highly variable and multifactorial. *PloS one*. 2012;7(4):e36281.
- Seok YJ, Koo BM, Sondej M, Peterkofsky A. Regulation of *E. coli* glycogen phosphorylase activity by HPr. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2001;3(3):385–93.
- Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(11):762–74.
- Shimada T, Park BG, Wolf AJ, Brikos C, Goodridge HS, Becker CA, *et al.* *Staphylococcus aureus* evades lysozyme-based peptidoglycan digestion that links phagocytosis, inflammasome activation, and IL-1b secretion. *Cell host & microbe*. 2010;7(1):38–49.
- Sillanpää J, Nallapareddy SR, Singh KV, Ferraro MJ, Murray BE. Adherence characteristics of endocarditis-derived *Streptococcus gallolyticus* ssp. *gallolyticus* (*Streptococcus bovis* biotype I) isolates to host extracellular matrix proteins. *FEMS microbiology letters*. 2008;289(1):104–9.
- Sitkiewicz I, Musser JM. Analysis of growth-phase regulated genes in *Streptococcus agalactiae* by global transcript profiling. *BMC microbiology*. 2009;9(1):1.
- Sjollema J, Rustema-Abbing M, van der Mei HC, Busscher HJ. Generalized relationship between numbers of bacteria and their viability in biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011;77(14):5027–9.
- Slauch JM. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Molecular Microbiology*. 2011;80(3):580–3.
- Smith HE, Damman M, van der Velde J, Wagenaar F, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, *et al.* Identification and Characterization of the cps Locus of *Streptococcus suis* Serotype 2: the Capsule Protects against Phagocytosis and Is an Important Virulence Factor. *Infection and immunity*. 1999;67(4):1750–6.
- Smith LM, May RC. Mechanisms of microbial escape from phagocyte killing. *Biochemical Society Transactions*. 2013;41(2):475–90.
- Song X-M, Connor W, Hokamp K, Babiuk LA, Potter AA. *Streptococcus pneumoniae* early response genes to human lung epithelial cells. *BMC research notes*. 2008;1(1):64.
- Song X-M, Connor W, Hokamp K, Babiuk LA, Potter AA. Transcriptome studies on *Streptococcus pneumoniae*, illustration of early response genes to THP-1 human macrophages. *Genomics*. 2009;93(1):72–82.

- Srisuwan S, Tongtawe P, Srimanote P, Voravuthikunchai SP. Rhodomyrtone modulates innate immune responses of THP-1 monocytes to assist in clearing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PloS one. 2014;9(10):e110321.
- Stoodley P, Sauer K, Davies D, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. Annual Reviews in Microbiology. 2002;56(1):187–209.
- Sudagidan M, Yemenicioglu A. Effects of nisin and lysozyme on growth inhibition and biofilm formation capacity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk and cheese samples. Journal of Food Protection. 2012;75(9):1627–33.
- Suntharalingam P, Cvitkovitch DG. Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. Trends in microbiology. 2005;13(1):3–6.
- Svensson S, Forsberg M, Hulander M, Vazirisani F, Palmquist A, Lausmaa J, *et al.* Role of nanostructured gold surfaces on monocyte activation and *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. International journal of nanomedicine. 2014;9:775.
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. International immunology. 2005;17(1):1–14.
- Tan X, Qin N, Wu C, Sheng J, Yang R, Zheng B, *et al.* Transcriptome analysis of the biofilm formed by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. Scientific reports. 2015;5.
- Terzic J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. Gastroenterology. 2010;138(6):2101–14.
- Tikhonov A, Kazakov T, Semenova E, Serebryakova M, Vondenhoff G, Van Aerschot A, *et al.* The mechanism of microcin C resistance provided by the MccF peptidase. Journal of Biological Chemistry. 2010;285(49):37944–52.
- Tischendorf J, Yagmur E, Scholten D, Vidacek D, Koch A, Winograd R, *et al.* 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. 2007;34(6):413–8.
- Tiwari R, Timoney JF. *Streptococcus equi* bacteriophage SeP9 binds to group C carbohydrate but is not infective for the closely related *S. zooepidemicus*. Veterinary microbiology. 2009;135(3):304–7.
- Tjalsma H, Lambooy L, Hermans PW, Swinkels DW. Shedding & shaving: disclosure of proteomic expressions on a bacterial face. Proteomics. 2008;8(7):1415–28.
- Traore K, Trush MA, George M, Spannhake EW, Anderson W, Asseffa A. Signal transduction of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced growth inhibition of human monocytic leukemia THP-1 cells is reactive oxygen dependent. Leukemia research. 2005;29(8):863–79.
- Treangen TJ, Maybank RA, Enke S, Friss MB, Diviak LF, Karaolis DKR, *et al.* Complete Genome Sequence of the Quality Control Strain *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923. Genome Announcements. 2014;2(6).
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). International journal of cancer. 1980;26(2):171–6.
- Underhill DM, Goodridge HS. Information processing during phagocytosis. Nature Reviews Immunology. 2012;12(7):492–502.
- Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. Annual review of immunology. 2002;20(1):825–52.

- Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, *et al.* The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*. Nature Publishing Group; 1999;401(6755):811–5.
- Vanderkelen L, Van Herreweghe JM, Vanoirbeek KGA, Baggerman G, Myrnes B, Declercq PJ, *et al.* Identification of a bacterial inhibitor against g-type lysozyme. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011;68(6):1053–64.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*. 2002;3(7):1.
- Vasudevan R. Biofilms: microbial cities of scientific significance. *Journal of Microbiology and Experimentation*. 2014;1(3):00014.
- Veiga P, Bulbarela-Sampieri C, Furlan S, Maisons A, Chapot-Chartier M-P, Erkelenz M, *et al.* SpxB regulates O-acetylation-dependent resistance of *Lactococcus lactis* peptidoglycan to hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(27):19342–54.
- Veloso TR, Oechslin F, Que Y-A, Moreillon P, Entenza JM, Mancini S. Aspirin plus ticlopidine prevented experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus gallolyticus*. *Pathogens and disease*. 2015;73(8):ftv060.
- Vollmer T, Hinse D, Kleesiek K, Dreier J. Interactions between endocarditis-derived *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* isolates and human endothelial cells. *BMC Microbiology*. 2010 a;10:78.
- Vollmer T, Piper C, Horstkotte D, Körfer R, Kleesiek K, Dreier J. 23S rDNA real-time polymerase chain reaction of heart valves: a decisive tool in the diagnosis of infective endocarditis. *European Heart Journal*. 2010 b;31(9):1105–13.
- Wang L, Qin W, Ruidong Z, Liu S, Zhang H, Sun C, *et al.* Differential gene expression profiling of *Actinobacillus pleuropneumoniae* during induction of primary alveolar macrophage apoptosis in piglets. *Microbial Pathogenesis*. Elsevier; 2015;78:74–86.
- Wang T, Lafuse WP, Zwilling BS. Regulation of toll-like receptor 2 expression by macrophages following *Mycobacterium avium* infection. *The Journal of Immunology*. 2000;165(11):6308–13.
- Wavre-Shapton ST, Meschede IP, Seabra MC, Futter CE. Phagosome maturation during endosome interaction revealed by partial rhodopsin processing in retinal pigment epithelium. *Journal of Cell Science*. 2014;127(17):3852–61.
- Weinstock M. Inflammation, Pathogen-Zell-Interaktionen und Stamm-Charakterisierung von *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* als Erreger der infektiösen Endokarditis. 2014. Dissertation Universität Bielefeld.
- Werdan K, Dietz S, Löffler B, Niemann S, Bushnaq H, Silber R-E, *et al.* Mechanisms of infective endocarditis: pathogen-host interaction and risk states. *Nature Reviews Cardiology*. 2014;11(1):35–50.
- Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S, *et al.* Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*. 2001;413(6858):860–4.
- Wu C, Zhang J, Du G, Chen J. Heterologous expression of *Lactobacillus casei* RecO improved the multiple-stress tolerance and lactic acid production in *Lactococcus lactis* NZ9000 during salt stress. *Bioresource technology*. 2013;143:238–41.
- Yan X, Budin-Verneuil A, Verneuil N, Gilmore MS, Artigaud S, Auffray Y, *et al.* Transcriptomic response of *Enterococcus faecalis* V583 to low hydrogen peroxide levels. *Current microbiology*. 2015;70(2):156–68.

- Yu J, Bryant AP, Marra A, Lonetto MA, Ingraham KA, Chalker AF, *et al.* Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* NADH oxidase that is required for infection. *Microbiology*. 2001;147(2):431–8.
- Zeller T, Moskvina OV, Li K, Klug G, Gomelsky M. Transcriptome and physiological responses to hydrogen peroxide of the facultatively phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of bacteriology*. 2005;187(21):7232–42.
- Zhou M, Boekhorst J, Francke C, Siezen RJ. LocateP: genome-scale subcellular-location predictor for bacterial proteins. *BMC Bioinformatics*. 2008;9(1):1.
- Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS. PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic acids research*. 2011;gkr485.
- Zwick JV, Noble S, Ellaicy YK, Coe GD, Hakey DJ, King AN, *et al.* AhpA is a peroxidase expressed during biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *MicrobiologyOpen*. 2016;

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Pathogenese von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	5
Abbildung 2.2: Phagozytose von Mikroorganismen durch Makrophagen.....	7
Abbildung 2.3: Model der Signaltransduktion bei Induktion genetischer Kompetenz durch ein Kompetenz-stimulierendes Peptid-System.....	10
Abbildung 4.1: Phagozytoserate von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> durch THP-1 Makrophagen.....	13
Abbildung 4.2: Überlebensrate von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> in THP-1 Makrophagen.....	14
Abbildung 4.3: Fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von phagozytierten <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> Stämmen	16
Abbildung 4.4: Fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> Stämmen nach Phagozytose von THP-1 Makrophagen	18
Abbildung 4.5: Relative mRNA-Expression der Zytokine IL-1 β und IL-6 in THP-1 Makrophagen nach Phagozytose von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> Stämmen.....	19
Abbildung 4.6: Relative mRNA-Expression des Chemokins IL-8 sowie des Rezeptors TLR-2 in THP-1 Makrophagen nach Phagozytose von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> Stämmen.	20
Abbildung 4.7: Anzahl der lysierten THP-1 Makrophagen und relative Konzentration reaktiver Sauerstoffradikale.....	22
Abbildung 4.8: Prozentualer Anteil des durch primäre Makrophagen phagozytierten zugegebenen Inokulums verschiedener <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> Stämme	23
Abbildung 4.9: Überlebensrate verschiedener <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> Stämme in primären Makrophagen.....	24
Abbildung 4.10: Interleukin-6 (IL-6)-Sekretion verschiedener Makrophagen nach Phagozytose von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> Stämme	25
Abbildung 4.11: Regulierte Gene in der Phagozytose nach Funktionen sortiert	29
Abbildung 4.12: Regulierte Gene in der Phagozytose nach Funktionen sortiert	30
Abbildung 4.13: Verifikation der Genexpression-Änderungen mittels relativer quantitativer <i>Real-time</i> PCR, die durch die Microarray-Analyse detektiert wurden.....	31
Abbildung 4.14: Überleben von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> Stämmen in saurem Milieu	33
Abbildung 4.15: Prozentualer Anteil vitaler <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> Stämme nach fünfständiger Inkubation in BHI mit verschiedenen H ₂ O ₂ -Konzentrationen.....	34
Abbildung 4.16: Wachstum von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> Stämmen in Medium mit verschiedenen Lysozymkonzentrationen.....	36
Abbildung 4.17: Anteil vitaler tierischer oder humaner <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> Isolate nach fünfständiger Inkubation in BHI mit verschiedenen Lysozymkonzentrationen ..	37
Abbildung 4.17: Biofilmbildung von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> in Lysozym-supplementiertem Medium.....	38

Abbildung 4.18: Bakterieller Titer im Biofilm von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> in Lysozym-supplementiertem Medium.....	39
Abbildung 4.19: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der an Polystyrol adhärenen <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> Stämme nach Inkubation in BHI ohne Lysozym, 10 mg/ml Lysozym, 20 mg/ml Lysozym.....	41
Abbildung 4.20: Adhäsion von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> an Kollagen Typ I in Gegenwart von Lysozym nach fünfstündiger Inkubation	42
Abbildung 4.21: Biofilmbildung von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> in Gegenwart von H ₂ O ₂	43
Abbildung 4.22: Anzahl der Gene, deren Expression durch Lysozym in den <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> Stämmen BAA-2069 und UCN 34 reguliert waren.....	50
Abbildung 4.23: Verifizierung der durch Microarray-Analyse ermittelten Regulationen der Genexpressionen nach fünfstündiger Inkubation mit Lysozym mittels <i>Real-time</i> PCR.....	52
Abbildung 4.24: Adhäsion von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> Stämmen an Kollagen Typ I.....	53
Abbildung 4.25: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> Stämmen nach Adhäsion an Kollagen Typ I	54
Abbildung 4.26: Verifizierung der durch Microarray-Analyse ermittelten Genexpressions-Regulation nach Adhäsion an Kollagen mittels <i>Real-time</i> PCR	58
Abbildung 5.1: Ergebnisse dieser Arbeit im Zusammenhang mit der Phagozytose von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	62
Abbildung 6.1: Auswertung des Bioanalyzers 2100	91
Abbildung 6.2: Fluoreszenzsignale eines Arrays nach Hybridisierung von RNA- und DNA-Proben.....	96
Abbildung 6.3 Signalstärken nach Hybridisierung von verschiedenen Proben an verschiedene Oligonukleotide, die ein Gen repräsentieren	97
Abbildung 7.1: Verwendete Größenmarker für die Agarose-Gelelektrophorese.....	108

10 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
AB	Antibiotikum
AM	Antimykotikum
APC	Allophycocyanin
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	<i>Circa</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cRNA	Complementary RNA
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<i>D</i>	<i>Dextra</i> , rechts
DCFH-DA	2',7'-Dichlorofluorescein Diacetat
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbeccos Phosphate buffered saline</i>
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
E	Effizienz
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<i>et al.</i>	und Andere
FBS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICE	<i>Integrative and conjugative element</i>
IE	infektiöse Endokarditis
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KBE	koloniebildende Einheiten
KO	<i>Knockout</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
LMG	Laboratorium für Mikrobiologie
M-CSF	Makrophagenkolonien-stimulierender Faktor
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NBTE	nicht bakterielle thrombotische Endokarditis
NK	Negativkontrolle
NO	Stickstoffoxide
OD	Optische Dichte
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PE	Phycoerythrin
pH	negative dekadische Logarithmus der Protonenkonzentration
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SGG	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin

11 Kongressbeiträge und Publikationen

Kongressbeiträge

Weinstock, M., Grimm, I., Dreier, J., Knabbe, C., Vollmer, T. (2013). Co-Cultivation of monocyte and endothelial cells revealed new insights in *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-mediated infective endocarditis. Int J Med Microbiol 303 (S1): IPP04.

Weinstock, M., Grimm, I., Dreier, J., Knabbe, C., Vollmer, T. (2013). Strain-dependent phagocytosis of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in a macrophage cell culture system. Int J Med Microbiol 303 (S1): MPP06.

Weinstock, M., Grimm, I., Dreier, J., Knabbe, C., Vollmer, T. (2013). Cytokine gene-expression in a co-cultivation of monocytes and endothelial cells in response to *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Clin Chem Lab Med 51: eA57 (P083).

Weinstock, M., Grimm, I., Dreier, J., Knabbe, C., Vollmer, T. (2013). Phagocytosis of IE-associated *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* strains: evaluation of potential pathomechanisms in a macrophage cell culture system. Clin Chem Lab Med 51: eA26 (P008).

Grimm, I., Weinstock, M., Vollmer, T., Knabbe, C., Dreier, J. (2014). Analysis of the stimulatory potential of secreted and surface proteins from *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Clin Chem Lab Med. 52(11): 172 (P028).

Grimm, I., Weinstock, M., Vollmer, T., Knabbe, C., Dreier, J. (2014). Expression of IL-6 by monocytes activated by secreted proteins and surface peptides from *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Biospektrum, Sonderausgabe 2014: 313 (MPP48).

Grimm, I., Weinstock, M., Vollmer, T., Knabbe, C., Dreier, J. (2015). A microarray gene expression study of collagen-binding of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Clin Chem Lab Med. 53(11): eA143 (P076).

Grimm, I., Weinstock, M., Vollmer, T., Knabbe, C., Dreier, J. (2015). Transcriptome analysis of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* with regard to collagen binding ability as virulence factor. Int J Med Microbiol 265 (ZOP).

Grimm, I., Dreier, J., Knabbe, C., Vollmer, T. (2016). Phagocytosis of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* by monocyte-derived macrophages. Clin Chem Lab Med. 54(10): eA426 (P047).

Grimm, I., Garben, N., Dreier, J., Knabbe, C., Vollmer, T. (2016). Interaction of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* with human macrophages. Int J Med Microbiol. (242/MPP)

Grimm, I., Dreier, J., Knabbe, C., Vollmer, T. (2017). Lysozyme triggers biofilm formation of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Biospektrum, Sonderausgabe 2017: 310 (787/MPP)

Publikationen

Weinstock, M., Grimm, I., Dreier, J., Knabbe, C., Vollmer, T. (2014). Genetic variants in genes of the inflammatory response in association with infective endocarditis. PLOS ONE. DOI: 10.1371/journal.pone.0110151.

Grimm, I.*, Dumke, J. *, Vollmer, T., Hinse, D., Kalinowski, J., Knabbe, C., Dreier, J. (2017) Complete genome sequence of the *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* strain DSM 16831. GenomeA. DOI:10.1128/genomeA.00108-17. (*contributed equally)

Grimm, I.*, Weinstock, M. *, Birschmann, I., Dreier, J., Knabbe, C., Vollmer, T. Strain-dependent interactions of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* with human blood cells (BMC microbiology; Manuskript eingereicht; * contributed equally)

Grimm, I., Garben, N., Dreier, J., Knabbe, C., Vollmer, T., Transcriptome analysis of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in interaction with THP-1 macrophage-like cells (PLOS ONE; Revision)

Grimm, I., Dumke, J., Dreier, J., Knabbe, C., Vollmer, T., Biofilm formation and transcriptome analysis of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in response to lysozyme (International Journal of Medical Microbiology; Manuskript eingereicht)

12 Erklärung

Hiermit erkläre ich, Imke Grimm, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt zu haben. Stellen der Arbeit, die deren Werken im Sinn oder Wortlaut nach entnommen sind, wurden in jedem einzelnen Fall der Entlehnung kenntlich gemacht.

Bielefeld, den 23.03.2017

Imke Grimm