

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Medizinische Mikrobiologie  
- Direktor: Prof. Dr. G. Peters -

Prävalenz von Adhäsionsproteinen von *S. aureus*  
bei Patienten mit Zystischer Fibrose und  
anderen *S. aureus* Infektionen

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälische Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Künzel, Rebecca Antonie  
aus Hamm

2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-  
Universität Münster

**Dekan: Univ.- Prof. Dr. med. V. Arolt**

**1. Berichterstatter: PD Dr. med. B. C. Kahl**

**2. Berichterstatter: PD Dr. med. A. W. Friedrich**

**Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2008**

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Medizinische Mikrobiologie  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. G. Peters -  
Referent: Priv.-Doz. Dr. B. C. Kahl  
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. A.-W. Friedrich

Zusammenfassung

**„Prävalenz von Adhäsionsproteinen von  
*Staphylococcus aureus* bei Patienten mit Zystischer Fibrose  
und anderen *Staphylococcus aureus* Infektionen“**

Künzel, Rebecca Antonie

**Einleitung:** *Staphylococcus aureus* ist nicht nur ein wichtiger Erreger ambulant und stationär erworbener Infektionen, sondern kolonisiert auch bei ca. 30% der gesunden Bevölkerung die Nase. Zudem ist *S. aureus* einer der häufigsten Pathogene der entzündeten Atemwege bei Patienten mit Zystischer Fibrose sowie der Erreger akuter und chronischer Osteomyelitiden. Um Infektionen hervorrufen zu können, muß *S. aureus* an Wirtsstrukturen adhären. Dazu besitzt der Erreger zahlreiche Adhäsionsproteine. Bisher gibt es keine hinreichenden Kenntnisse darüber, ob ein Zusammenhang zwischen verschiedenen *S. aureus* Infektionen und dem Adhäsionsprofil des Erregers besteht.

**Material und Methoden:** Es wurde die Prävalenz der folgenden Adhäsionsgene mittels PCR untersucht: *fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *clfB*, *cna*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*, *eap* und *emp*. Dazu wurden die nachstehenden *S. aureus* untersucht und die Adhäsionsprofile miteinander verglichen: persistierende *S. aureus* Isolate von Mukoviszidosepatienten (n= 78), chronische Osteomyelitis Isolate (n= 46), Bakteriämie Isolate (n= 89), sowie Isolate asymptomatischer Träger (n=90).

**Ergebnisse:** Signifikante Unterschiede fanden sich zwischen den Stammgruppen bei dem Nachweis folgender fünf Gene: *emp*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*, sowie *cna*.

**Diskussion:** *S. aureus* Stämme, die die Gene *sdrD*, *sdrE* und *emp* aufweisen, scheinen einen Selektionsvorteil während der Infektion zu besitzen, da sie bei Isolaten Gesunder signifikant seltener auftraten. Das Protein *cna* scheint nicht nur für die Osteomyelitis, sondern auch bei den von uns untersuchten Isolaten für die Kolonisation der Nase von Gesunden eine wichtige Rolle zu spielen.

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2008

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
<b>1 Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1 Ziel der Arbeit	3
1.2 Methodische Anlage der Untersuchungen	4
<b>2 Untersuchungsgegenstand</b>	<b>6</b>
2.1 Staphylococcus aureus	6
2.2 Adhäsine	6
2.2.1 Fibronektin-bindende Proteine FnbA und FnbB	8
2.2.2 Clumping factors, ClfA und ClfB	9
2.2.3 Serin-Aspartat-Wiederholungen beinhaltende Proteine SdrC, SdrD und SdrE	9
2.2.4 Kollagen-bindendes Adhäsins Cna	10
2.2.5 Extrazelluläres Adhäsionsprotein Eap	11
2.2.6 Extrazelluläre Matrix Protein-bindendes Protein Emp	12
2.3 Mukoviszidose	12
2.4 Atemwegsinfektionen bei Mukoviszidose	14
<b>3 Experimentelle Untersuchung: Material und Methoden</b>	<b>18</b>
3.1 Bakterienstämme	18
3.2 Lyse der DNA	19
3.3 PCR	19
3.3.1 <i>Eap</i> PCR	21
3.3.2 <i>emp</i> PCR	21
3.3.3 <i>cna</i> PCR	22
3.3.4 <i>fnbA</i> PCR	23
3.3.5 <i>fnbB</i> PCR	24
3.3.6 Multiplex-PCR für <i>clfB</i> und <i>sdrD</i>	24
3.3.7 Multiplex-PCR für <i>sdrC</i> , <i>sdrE</i> , <i>clfA</i>	25
3.4 Gelelektrophorese	28
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>29</b>
4.1 <i>emp</i>	30
4.2 <i>sdrC</i>	30
4.3 <i>sdrD</i>	31
4.4 <i>sdrE</i>	32
4.5 <i>cna</i>	32
4.6 <i>Eap</i>	33
4.7 <i>fnbA</i>	34
4.8 <i>fnbB</i>	34
4.9 <i>clfA</i>	35

4.10	<i>clfB</i>	36
5	Diskussion	43
5.1	Adhäsine als Virulenzfaktoren	43
5.1.1	<i>sdrD</i>	44
5.1.2	<i>sdrE</i>	45
5.1.3	<i>sdrC</i>	46
5.1.4	<i>cna</i>	47
5.1.5	<i>fnbA</i> und <i>fnbB</i>	48
5.1.6	<i>clfA</i>	50
5.1.7	<i>clfB</i>	51
5.2	<i>S. aureus</i> Adhäsine bei Zystischer Fibrose	52
5.3	Kombinationen der Virulenzfaktoren	55
5.4	Adhäsine als Angriffspunkt einer Therapie gegen <i>S. aureus</i>	58
5.4.1	<i>cna</i>	59
5.4.2	<i>clfA</i>	60
5.4.3	<i>clfB</i>	61
5.4.4	<i>fnbA</i>	61
5.4.5	Rekombinante Proteine	62
5.5	Schlussfolgerung	63
6	Zusammenfassung	64
7	Literaturverzeichnis	67
	Anhang	I
	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	I
	Lebenslauf	III
	Danksagung	IV

# 1 Einleitung

## 1.1 Ziel der Arbeit

Die Adhärenz eines Bakteriums an Zellen sowie an Komponenten der extrazellulären Matrix stellt einen essentiellen ersten Schritt im Infektionsprozess von Bakterien dar (55). *Staphylococcus aureus* bildet eine Reihe von Proteinen aus, die die Adhärenz der Bakterien an Wirtszellkomponenten vermitteln. Diese Proteine nennt man Adhäsine. Durch diese Adhäsine wird die Bindung der Bakterien an die Wirtszelle vermittelt. An die Adhäsion schließt sich die bakterielle Kolonisation und die Invasion des Wirtsgewebes an (19). Diese Kaskade spielt sich im Rahmen eines jeden Entzündungsprozesses ab.

Die Mukoviszidose (cystic fibrosis = CF) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die mit einem Defekt in einem Chloridkanal einhergeht (26), welcher zu einer abnormen Zusammensetzung von Sekreten exokriner Drüsen führt mit der Folge der Entstehung eines besonders zähen Schleims in den Atemwegen. Der ausserordentlich zähe Schleim kann durch eine verminderte mukoziliäre Clearance von den Bronchialepithelien nicht ausreichend eliminiert werden (22). Typische Erkrankungsfolgen sind pulmonale Manifestationen wie rezidivierende Atemwegsinfektionen durch eine bakterielle Besiedlung der vom zähen Schleim bedeckten Bronchialepithelien. Die häufigsten bakteriellen Erreger früher Atemwegsinfektionen sind *S. aureus* und *Haemophilus influenzae*, im späteren Lebensalter wird *Pseudomonas aeruginosa* am häufigsten beobachtet (48). Die chronische bakterielle Infektion führt zu einer fortschreitenden Destruktion der Atemwege und des Lungenparenchyms. Es entwickelt sich eine zunehmende respiratorische Insuffizienz mit der Gefahr einer pulmonalen Hypertonie (47) und in vielen Fällen letzten Endes ein Lungenversagen.

Es ist nicht bekannt, ob sich bei klinischen *S. aureus* Isolaten von Mukoviszidosepatienten eine besondere Ausstattung mit Adhäsinen findet. Auch ist nicht bekannt, ob sich ein Zusammenhang zwischen dem Adhäsinprofil und der Prävalenz und Persistenz in den Luftwegen der CF-Patienten zeigt. Daher hat diese Arbeit zum Ziel, die

Adhäsinausstattung klinischer *S. aureus* Isolate, von denen bekannt ist, dass sie über viele Monate und Jahre in den Luftwegen von CF-Patienten persistierten, zu bestimmen. Zusätzlich wird die Adhäsinausstattung von Osteomyelitis-Isolaten, Blutkultur-Isolaten und nasalen Isolate gesunder Träger bestimmt, um herauszufinden, ob sich Unterschiede in der Häufigkeit der Prävalenz einzelner Adhäsine in Bezug auf die jeweilige Infektion zeigen. Etwaige Unterschiede könnten auf solche Adhäsine hindeuten, die mit einem Tropismus der Isolate und möglicherweise der Virulenz eines *S. aureus* Stammes assoziiert sind.

Die steigende Anzahl multiresistenter Bakterienstämme macht deutlich, wie wichtig es ist, neue Behandlungsstrategien und Präventionsmethoden für die Therapie von *S. aureus* Infektionen zu entwickeln. Ein Schritt in diese Richtung ist die Identifikation von Faktoren, die bei der Pathogenese des Infektionsprozesses, insbesondere bei der Adhäsion als einem der ersten Schritte der Pathogen-Wirtsbeziehung, eine wichtige Rolle spielen.

## ***1.2 Methodische Anlage der Untersuchungen***

In dieser Studie wurden insgesamt 303 *S. aureus* Stämme untersucht, die einer der vier folgenden Gruppen von *S. aureus* Stämmen zugehörig waren:

1. Stämme, die aus Rachenabstrichen oder Sputumproben von 72 Patienten mit CF isoliert wurden (n=78)
2. Stämme von Patienten mit chronischer Osteomyelitis (n=46)
3. Stämme, die aus Blutkulturen von Patienten mit verschiedenen Infektionen, zum Beispiel Katheter-assoziierte Infektionen, Wundinfekten oder Abszessen, isoliert wurden (n=89)
4. Stämme, die von gesunden nasalen Trägern isoliert wurden (n=90).

Die Prävalenz der Adhäsine wurde mittels der „polymerase chain reaction“ (PCR) getestet. Zunächst wurde die Häufigkeit der Prävalenz der einzelnen Gene innerhalb der vier Gruppen ermittelt und mittels Chi-Quadrat Test auf statistische Signifikanz untersucht. In einem zweiten Schritt wurde eine Analyse aller vorkommenden Kombinationen der

Adhäsine durchgeführt (binäre Analyse) und das Auftreten der häufigsten Kombinationen mittels Chi-Quadrat Test auf deren statistische Signifikanz untersucht.

## 2 Untersuchungsgegenstand

### 2.1 *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* ist ein grampositives, koagulase-positives, nicht-sporenbildendes, nicht-bewegliches und fakultativ anaerobes Kugelbakterium. Die Kolonien sind 6-8  $\mu\text{m}$  groß und gold-gelblich. Dieses Bakterium ist ein wichtiger humanpathogener Keim, der sowohl ambulant erworbene als auch nosokomial erworbene Infektionen hervorrufen kann (18). Die Infektionen reichen von Hautabszessen und Furunkeln bis hin zu invasiven Infektionen wie Osteomyelitis und Septikämie (101). *S. aureus* ist außerdem einer der häufigsten Erreger nosokomial erworbener Pneumonien (4), und wird für einen großen Teil der infektiösen Endokarditiden auch an nicht vorgeschädigten Herzklappen verantwortlich gemacht (33). Zudem werden die meisten septischen Arthritiden durch *S. aureus* verursacht (38). Des Weiteren ist *S. aureus* neben *P. aeruginosa* einer der häufigsten Pathogene im Rahmen bronchopulmonaler Infekte bei Patienten mit Mukoviszidose (17,48). *S. aureus* wird meist in den Atemwegen von Säuglingen und Kleinkindern mit Mukoviszidose nachgewiesen, wohingegen im späteren Lebensalter von CF-Patienten die Besiedlung mit *P. aeruginosa* überwiegt (48). Die Infektion mit *S. aureus* bei CF ist in vielen Fällen trotz Einsatz Staphylokokken-wirksamer Antibiotika über Monate und Jahre persistierend (41).

Das normale Habitat von *S. aureus* ist der Nasenvorhof (103). 20% der Bevölkerung trägt ständig *S. aureus* in der Nase (persistierende Träger), 60% sind intermittierende Träger, und 20% sind niemals Träger dieses Bakteriums (103). Die nasale Kolonisation mit *S. aureus* stellt einen wichtigen Faktor in der Pathogenese eines Infektionsprozesses dar (71,100). So kann es in der Folge einer nasalen Kolonisation zu einer hämatogenen Streuung kommen, und systemische Infektionen wie Endokarditiden oder Septikämien können hervorgerufen werden (100).

### 2.2 *Adhäsine*

Die Adhärenz der Bakterien an das Gewebe des Wirts ist eine entscheidende Voraussetzung für die Kolonisation und die Initiierung eines Infektionsprozesses (59).

*S. aureus* kann eine Reihe von Oberflächenproteinen ausbilden, die die Adhärenz an verschiedene Gewebe vermitteln (10). Das Bakterium kann durch diese Oberflächenproteine zum Beispiel an extrazelluläre Matrixproteine wie Fibrinogen, Fibronektin und Kollagen binden (59).

Die Adhäsine werden in drei verschiedene Klassen eingeteilt:

Die erste Gruppe von Oberflächenproteinen werden als „microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“, kurz MSCRAMMs zusammengefasst (19,67). Gekennzeichnet sind die Gruppe der MSCRAMMs durch ähnliche Eigenschaften wie eine N-terminale Signalsequenz, die eine etwa 500 Aminosäuren lange A-Region enthält, und eine C-terminale Region, die ein Konsensusmotiv (LPXTG) beinhaltet, welches eine kovalente Bindung an Peptidoglykan eingeht. MSCRAMMs vermitteln die Adhärenz der Bakterien an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix (34). In die Gruppe der MSCRAMMs gehören unter anderem das Kollagen-bindende Protein Cna, die beiden Fibronektin-bindenden Proteine FnbA und FnbB, die drei Adhäsine SdrC, SdrD und SdrE (Serin-Aspartat Wiederholungen enthaltende Proteine) sowie die beiden Fibrinogen-bindenden Proteine, clumping factor A und B, ClfA und ClfB.

Zu der zweiten Gruppe der Adhäsine werden Proteine gezählt, die nach der Sekretion nicht kovalent, sondern ionisch an verschiedene Wirtsproteine binden. Diese Gruppe der Adhäsine wird auch „SERAMs“ genannt (secretable expanded repertoire adhesive molecules) (8). Diese löslichen Bindungsproteine haben meist ein wesentlich breiteres Bindungsspektrum von Wirtsproteinen, wie zum Beispiel Fibronektin, Fibrinogen, Kollagen und Vitronektin. In diese Gruppe der Adhäsine gehören unter anderem das extrazelluläre Matrix Protein-bindende Protein Emp, das „extracellular adhesion protein“ Eap, das Von-Willebrand-factor bindende Protein vWbp, sowie die das Protein Koagulase, Coa (8).

Die dritte Gruppe von Adhäsinen umfasst die integralen Transmembranproteine. Zu dieser Gruppe zählt das Elastin-bindende Protein Ebp (14). Bei diesem Protein fehlt ebenso wie bei den SERAMs das für die MSCRAMMs typische LPXTG-Motiv am C-Terminus, sowie die Signalsequenz am N-Terminus. Das Elastin-bindende Protein bindet lösliches Elastin und Tropoelastin (14).

Diese Studie befasst sich mit dem Nachweis und der Prävalenz von acht Adhäsinen aus der Gruppe der MSCRAMMs, sowie zwei Adhäsinen aus der Gruppe der SERAMs.

Bei den acht den MSCRAMMs zugeordneten Adhäsinen handelt es sich um die Fibronectin-bindenden Proteine FnbA und FnbB, die drei „Serin-Aspartat Wiederholungen enthaltende Proteine“ SdrC, SdrD und SdrE, das Kollagen-bindende Protein Cna sowie die Fibrinogen-bindenden Proteine ClfA und ClfB. Bei den beiden zu den SERAMs zählenden Adhäsinen handelt es sich um Eap und Emp.

### **2.2.1 Fibronectin-bindende Proteine FnbA und FnbB**

Die Gene *fnbA* und *fnbB* kodieren für zwei eng verwandte Fibronectin-bindende Proteine (37). Beide Proteine haben am N-terminalen Ende eine Signalsequenz, auf die eine A-Region folgt. Neben der A-Region liegen nebeneinander B-, Du-, C- und D-Domänen. Am C-terminalen Ende befindet sich ein LPXTG-Motiv (79).

FnbA kann neben Fibronectin auch an Fibrinogen binden (102), und sowohl FnbA als auch FnbB können eine Bindung mit Elastin eingehen (44,79). FnbA bindet auch an Tropoelastin, eine Vorstufe von Elastin (43). Die Fibrinogen-, Elastin- und Tropoelastin-bindenden Bereiche befinden sich in der A-Region des Proteins, wohingegen die Fibronectinbindung an der D-Domäne stattfindet.

FnbA und FnbB sind außerdem an der Invasion der Bakterien durch nicht-professionelle Phagozyten wie Endothelzellen, Epithelzellen und Osteoblasten beteiligt (75,87). Die Internalisierung der Bakterien durch Endothelzellen ist wahrscheinlich auch für „metastatische“ Infektionen auf dem Boden hämatogener Streuung der Bakterien, wie Osteomyelitis und Abszeßbildung verantwortlich (89).

FnbA induziert außerdem eine Thrombozytenaggregation (30). Die thrombozytenaggregierende Wirkung durch die FnbPs von *S. aureus* wird auch als ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der infektiösen Endokarditis angesehen, dadurch dass die Thromben aus Bakterien und Thrombozyten gebildet und an Herzklappen gebunden werden (30).

### 2.2.2 Clumping factors, ClfA und ClfB

Die Gene *clfA* und *clfB* kodieren für hochmolekulare Fibrinogen-bindende Proteine, die an die Zelloberfläche von *S. aureus* gebunden sind. Beide Proteine weisen eine ähnliche Struktur auf. ClfA und ClfB besitzen beide eine dem N-terminalen Ende nahe Signalsequenz, der die ligandenbindende A-Region folgt. Hinter dieser A-Region liegt die R-Domäne, eine Serin-Aspartat-Dipeptid-wiederholende Region. Nach dieser R-Domäne folgt eine membranspannende Region, und am C-Terminus befindet sich ein LPXTG-Motiv (29,74).

Die ligandenbindenden Regionen von ClfA und ClfB, die A-Regionen, sind zu 26% identisch (60). ClfA bindet mit der A-Region ausschließlich an das C-terminale Ende der  $\gamma$ -Kette des Fibrinogens, wohingegen ClfB mit der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette des Fibrinogens reagiert (51,60).

ClfA und in einem geringeren Maße auch ClfB vermitteln neben der Bindung von Fibrinogen auch die Bindung und Aktivierung von Thrombozyten (53,85). An Thrombozyten gebundene Bakterien ziehen weitere Bakterien und Thrombozyten an den entstehenden Bakterien-Thrombozyten-Thrombus an, so dass durch die Bindung und Aktivierung von Thrombozyten zum Beispiel die Vegetation an Herzklappen an Größe zunimmt. Aus diesem Grund wird die Thrombozytenaggregation als ein wichtiger Faktor bei der Entstehung der infektiösen Endokarditis angesehen (53).

Weiterhin bindet ClfB auch an Cytokeratin 10, welches von Nasenschleimhautepithelzellen exprimiert wird, wodurch ClfB eine wichtige Bedeutung für die nasale Kolonisation zukommt (63).

### 2.2.3 Serin-Aspartat-Wiederholungen beinhaltende Proteine SdrC, SdrD und SdrE

Die Adhäsine SdrC, SdrD und SdrE ähneln sowohl strukturell als auch sequenziell ClfA und ClfB. Sie unterscheiden sich von ClfA und ClfB dadurch, dass sie zwei bis fünf zusätzliche B-Motive besitzen, die zwischen der A-Region und der R-Region lokalisiert sind (10). Die C-terminale R-Region enthält 132 bis 170 Serin-Aspartat-Komponenten (39). Die Liganden der drei Proteine sind noch nicht vollständig identifiziert; eine thrombozytenaggregierende Wirkung ist für SdrE jedoch nachgewiesen (62). Neuere

Studien erzielten Hinweise darauf, dass diese Wirkung Fibrinogen-induziert zu sein scheint (21). Es wurde herausgestellt, dass unter anderem die Adhäsionsproteine SdrCDE eine wichtige Rolle bei Interaktionen zwischen *S. aureus* und Thrombozyten spielen können, in dem Fibrinogen als Brückenmolekül zwischen *S. aureus* und Thrombozyten fungiert. So kann *S. aureus* sich an Thrombozyten binden und zum Beispiel zur Entstehung von Vegetationen am Endokard im Rahmen einer Endokarditis beitragen (21).

#### 2.2.4 Kollagen-bindendes Adhäsins Cna

Das Adhäsins Cna besitzt eine dem N-Terminus des Proteins nahe A-Domäne, die verantwortlich für die Bindung verschiedener Arten von Kollagen ist (68,69). Die A-Region besteht aus drei Subdomänen, nämlich N1, N2 und N3. Die Kollagenbindung geschieht durch ein spezielles Bindungsmodell, an dem N1 und N2 Regionen beteiligt sind (106). Nach der A-Domäne folgen 1-4 Wiederholungen einer B-Region. Am C-terminalen Ende befindet sich ein LPXTG-Motiv, wie es für die Gruppe der MSCRAMMs typisch ist (77).

Das Gen *cna* kann in verschiedenen Referenzstämmen mit unterschiedlichen molekularen Massen nachgewiesen werden. So existieren mindestens drei verschiedene Allele von *cna*, die nach ihrem Referenzstamm Cowan, Phillips und Becker genannt werden. Die Allele unterscheiden sich durch die Anzahl der Wiederholungen der aus 561bp bestehenden B-Region; beim Stamm Becker besitzt *cna* nur eine einfache Ausführung der B-Region und hat eine Gesamtgröße von etwa 600bp, wohingegen beim Stamm Phillips zwei Wiederholungen der B-Region bestehen, so dass die Gesamtgröße des Gene ca. 1,160bp beträgt. Der Stamm Cowan weist drei Wiederholungen der B-Region auf, so dass die Größe des Gens ca. 1,720bp beträgt.

Die Anwesenheit dieses Adhäsins ist ausreichend und notwendig für die Adhärenz an kollagenes Gewebe, wie zum Beispiel Knorpel (68). Cna wurde in verschiedenen Tierstudien als Virulenzfaktor bei der Entstehung der Osteomyelitis und septischer Arthritis herausgestellt (16,68). Diese Beobachtung lässt sich damit erklären, dass durch Cna eine Adhäsion von *S. aureus* an kollagenhaltiges Gewebe, wie Knochen und Knorpel es sind, unterstützt wird, so dass der erste Schritt in einem Infektionsprozess, die Adhäsion, durch Cna maßgeblich gewährleistet wird (104).

In der vorliegenden Studie wurden die *S. aureus* Stämme neben der Prävalenz der bisher genannten Mitgliedern der MSCRAMM-Gruppe darüber hinaus auf die Prävalenz zweier weiterer Adhäsionsproteine untersucht, die zu der Gruppe der SERAMs (secretable expanded repertoire adhesive molecules) gehören, namentlich das extrazelluläre Adhäsionsprotein Eap und das Extrazelluläre Matrix Protein-bindende Protein Emp. Diese beiden Adhäsine sind nicht wie die oben aufgeführten MSCRAMMs kovalent an die Zellwand gebunden, sondern ionisch. Zudem verfügen sie nicht über das für die MSCRAMMs typische LPXTG-Motiv am C-terminalen Ende.

### 2.2.5 Extrazelluläres Adhäsionsprotein Eap

Das „extracellular adhesion protein“ Eap stellt ein Major Histocompatibility Complex Klasse II-analoges Protein dar. Es existieren Analoga von Eap, die sich in der Anzahl von Sequenzwiederholungen und Translationsterminierungen unterscheiden. So unterscheiden sich zum Beispiel die Genprodukte von *Eap* bei den Stämmen Newman, Wood 46 und Referenzstamm 7. Ein anderer Name für Eap ist Map (MHC class II analogous protein) (35).

Eap vermittelt die Adhärenz unter anderem an Fibronectin und Prothrombin und trägt zur Bindung an Fibroblasten und Epithelzellen bei (64). Außerdem vermittelt es die Invasion von eukaryotischen Zellen durch *S. aureus* (27). Eap/Map soll durch eine Veränderung der T-Zell Funktion eine Rolle als immunmodulatorisches Protein spielen und hierdurch in der Aufrechterhaltung von chronischen Infektionen involviert sein (46). In *in vitro* Studien wurde weiterhin eine Inhibierung der Neutrophilenrekrutierung gezeigt, so dass eine anti-inflammatorische Wirkung von Eap diskutiert wird (7). Darüber hinaus konnte eine nicht nur anti-angiogene Eigenschaft des Proteins (92), sondern auch eine Rolle bei der Pathogenese von Wundheilungsstörungen im Rahmen von *S. aureus* Infektionen beschrieben werden (2). Insgesamt stellt Eap durch diese anti-inflammatorischen und immunmodulatorischen Eigenschaften einen wichtigen Virulenzfaktor im Rahmen einer Staphylokokkeninfektion dar (46).

### 2.2.6 Extrazelluläre Matrix Protein-bindendes Protein Emp

Das Gen *emp* kodiert für ein an extrazelluläre Matrix bindendes Protein mit einer molekularen Masse von 35,5 kDa, welches an adhäsive Glykoproteine wie Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen und Vitronectin binden kann (36). Es wird vermutet, dass die hohe Affinität zu diesen Glykoproteinen in eine Reihe biologischer Prozesse eingreifen kann, wie zum Beispiel die Komplementaktivierung und die Gerinnung (10,89). Die genaue pathogenetische Rolle des Emp ist jedoch noch nicht vollständig geklärt (8).

## 2.3 Mukoviszidose

Die Zystische Fibrose (CF), auch Mukoviszidose bezeichnet, ist mit einer Inzidenz von ca. 1:2.500 die häufigste autosomal-rezessive Erbkrankheit der weißen Bevölkerung. Die Mukoviszidose beruht auf Mutationen im „cystic fibrosis transmembrane regulator“-Gen (CFTR-Gen) (22). Das CFTR-Gen ist ein ca. 250kb großes Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 7. Derzeit sind mehr als 1200 verschiedene Mutationen dieses Gens bekannt; die mit 70% am häufigsten nachgewiesene Mutation ist die Mutation  $\Delta F-508$  (22).

Der CFTR-Kanal liegt in den apikalen Zellmembranen und reguliert dort den Chloridein- und -ausstrom der Epithelzelle. Er nimmt eine Schlüsselfunktion in der Flüssigkeits- und Elektrolytsekretion im Darm, im Pankreas und in Schweißdrüsen ein (84). Der der Mukoviszidose zugrunde liegende Defekt des CFTR-Gens führt zu einer Fehlfunktion des vom CFTR-Gen kodierten, cAMP-regulierten Chloridkanals. Es kommt zu einer verminderten Chloridsekretion durch den CFTR-Kanal. Hieraus resultiert eine geringere extrazelluläre Chloridkonzentration mit Akkumulation der intrazellulären Chloridionen. Zur Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gleichgewichts strömen  $\text{Na}^+$  Ionen und  $\text{H}_2\text{O}$  in die Zelle. Dies führt zu einer Dehydratation des produzierten Sekretes im Lumen. Die Viskosität des Sekretes ist durch die Dehydratation erhöht, was den Abtransport des Sekrets erschwert. Somit kann es zu einer Verlegung der Drüsenausführungsgänge kommen. Der Sekretstau kann eine sekundäre zystische und/oder fibrotische Umwandlung der Organe nach sich ziehen, ebenso wie eine

Dilatation der Atemwege mit Bildung von Bronchiektasen. Die Auswirkung der Bronchiektasen und des fibrotischen Umbaus ist eine zunehmende respiratorische Insuffizienz (22), welche durch Dyspnoe, peripherer Zyanose, Kachexie und Cephalgien angezeigt wird und die wichtigste Todesursache bei Patienten mit Zystischer Fibrose darstellt (32).

Die Mukoviszidose-Erkrankung resultiert häufig sowohl in chronischen respiratorischen Infekten als auch in gastrointestinalen Problemen wie Malabsorption und Mangelernährung.

Die Verdachtsdiagnose Mukoviszidose wird oft aufgrund von Symptomen wie Atembeschwerden, Steatorrhoe und Mekoniumileus gestellt (22). Ein Schritt in Richtung Diagnosesicherung wird durch den Pilocarpin-Iontophorese-Schweißtest getan, wobei eine Chloridkonzentration von über 60mmol/l als pathognomonisch gilt (54). Die endgültige Diagnosesicherung geschieht dann durch genetische Testung des Genotyps mit Gensonden, sowie die Messung der bioelektrischen Eigenschaften der Epithelzellen durch Bestimmung der transepithelialen Potentialdifferenzen (11,12).

Eine kausale Therapie der Erkrankung ist bis heute nicht möglich, obwohl sich derzeit viele Untersuchungen der Gentherapie und der Zelltherapie der Erkrankung widmen. Diese therapeutischen Ansätze befinden sich allerdings noch im experimentellen Stadium (11). Die Gentherapie zielt darauf ab, eine normale Kopie des CFTR-Gens in das Atemwegsepithel einzufügen. Hierzu werden sowohl virale Vektoren - meistens modifizierte und zur Replikation unfähige Adenoviren - als auch synthetische Gene getestet. Die Zelltherapie beruht auf der Tatsache, dass Stammzellen zum Beispiel des Knochenmarks und der Nabelschnur sich zu Atemwegszellen differenzieren können. Der experimentelle Ansatz besteht darin, Stammzellen von CF-Patienten mit intaktem CFTR-Gen in deren Atemwegsepithelien zu transplantieren und dadurch gesunde, funktionierende Zellen zu erlangen (11). Die Zelltherapie steht noch im prä-klinischen Stadium, wohingegen die Gentherapie bereits in einigen klinischen Studien getestet wurde. Derzeit ist aber auch durch die Gentherapie keine Heilung der Erkrankung möglich.

Eine symptomatische Therapie zielt auf den Ausgleich von Organfunktionsstörungen ab, außerdem auf das Verhindern sekundärer Schädigungen. So stehen eine adäquate Nahrungsaufnahme, der Erhalt der Lungenfunktion und eine ausreichende Stoffwechseleinstellung im Vordergrund. Spezielle physiotherapeutische Atem- und Hustentechniken werden verwendet, um die obstruktive Lungenschädigung zu

verlangsamen. Eine Therapieoption im Endstadium der Mukoviszidose stellt die Lungentransplantation dar, die zu einer Steigerung der Lebensqualität und der Lebenserwartung führen kann.

Die mittlere Lebenserwartung von Patienten mit Mukoviszidose liegt heutzutage bei etwa 33 Jahren (3,22). In etwa 90% der Fälle sterben die Patienten an einem respiratorischen Versagen – vielfach eine Folge chronischer Atemwegsinfektionen (3).

## ***2.4 Atemwegsinfektionen bei Mukoviszidose***

Bereits im frühen Lebensalter werden die Atemwege bei einem Großteil der Patienten mit Mukoviszidose bakteriell besiedelt und chronisch infiziert. Es gibt derzeit diverse Erklärungsansätze für die bakterielle Besiedlung und chronische Entzündung der Atemwege. Pathogenetisch wichtig ist unter anderem die veränderte mukoziliäre Clearance der Atemwege, die durch den bei der Mukoviszidose vorliegenden Defekt des CFTR-Gens verursacht wird (22). Die mukoziliäre Clearance stellt eine der wichtigsten Abwehrmechanismen der Atemwege gegenüber eindringenden Fremdkörpern dar. Für eine effektive mukoziliäre Clearance wird sowohl eine ausreichende Schleimproduktion benötigt, als auch eine geordnete ziliäre Funktion (1). Die Erschwerung der mukoziliären Clearance bei der Zystischen Fibrose rührt daher, dass eine Schicht, die so genannte „periciliary liquid layer“ (PCL), eine Flüssigkeitszone an der Zelloberfläche, in der sich die Zilien befinden (45), bei der Mukoviszidose vermindert ist. In der Folge können sich die Zilien nicht regulär bewegen und dadurch nicht zu einer ausreichenden mukoziliären Clearance beitragen (45). Durch das verminderte PCL Volumen kommt es zu einer Anlagerung des Mukus an die Zelloberfläche, so dass die Patienten den adhären, dehydrierten und hochviskosen Schleim nicht ausreichend abhusten können (45). Diese verminderte Clearance gilt als ein wichtiger pathogenetischer Faktor bei der Entstehung der endobronchialen Infektion; die eindringenden Bakterien werden hierdurch langsamer beseitigt als bei gesunden Personen. In normalen peripheren Atemwegsepithelien dauert die mukoziliäre Clearance bis zu 6 Stunden; bei CF ist diese Zeit deutlich verlängert (22,45).

Andere Studien sehen den Grund für die bakterielle Besiedlung der Atemwege bei CF-Patienten in der erhöhten Kochsalzkonzentration der Oberflächenflüssigkeit der Atemwegsepithelien (22,91). Diese Studien postulieren, dass die bei der Mukoviszidose erhöhte Natriumchlorid (NaCl) Konzentration die bakterizide Kapazität der Atemwegsepithelien vermindert. Die Ergebnisse zeigen, dass eine niedrige Natriumchloridkonzentration notwendig ist, um eingedrungene Bakterien abzutöten, wie es bei gesunden Patienten der Fall ist. Durch den Defekt des CFTR-Kanals wird bei Patienten mit Zystischer Fibrose eine höhere NaCl-Konzentration in den Atemwegsepithelien produziert, was die antibakterielle Aktivität der Atemwegsepithelien reduziert und eindringende Bakterien überleben lässt (91).

Weitere Erklärungsansätze der bakteriellen Besiedlung der Atemwege bei CF machen einen intrinsischen Defekt der Oberflächenflüssigkeit („airway surface liquid“, ASL) der Atemwege selbst verantwortlich, durch den die bakteriziden Eigenschaften der ASL durch bislang ungeklärte Wirkmechanismen herabgesetzt sind (56).

Neuere Studien ergaben, dass der CFTR-Defekt zu einer verminderten Thiozyanat-Sekretion der Atemwegsepithelien führt, die in der Folge zu einer Inaktivierung des oxidativen antimikrobiellen Systems führt. Das oxidative antimikrobielle System tötet in gesunden Epithelzellen eindringende Bakterien ab; durch die Inaktivierung dieses antimikrobiellen Systems bleibt das Abtöten der eindringenden Bakterien aus (58).

Möglicherweise kommt es durch das Zusammenspiel dieser verschiedenen Mechanismen bereits im frühen Lebensalter zu einer bakteriellen Besiedlung der Atemwege der Patienten (81), sowie zu einer daraus resultierenden chronischen Atemwegsinfektion. Durch proteolytische und chondrolytische Auswirkungen der Infektion kommt es zu Bronchiektasen; in späteren Stadien kann das Lungenparenchym von Atelektasen und Pneumonien betroffen sein. Die entzündlichen Vorgänge können so zu respiratorischer Insuffizienz und zum Tode führen (9). So erleiden 80-95% der Patienten, die an Mukoviszidose erkrankt sind, ein Lungenversagen, das durch die persistierende Kolonisation mit fakultativ pathogenen Keimen und die nachfolgende chronische Inflammation der Atemwege verursacht wird. Die bakterielle Infektion der Atemwege trägt somit zum größten Anteil der Morbidität und Mortalität der Mukoviszidose-Erkrankung bei (48). In der präantibiotischen Ära lag die Lebenserwartung bedingt durch die Infektion der Atemwege mit daraus resultierender pulmonaler Insuffizienz bei etwa zwei Jahren (23).

Heutzutage ist die Lebenserwartung unter anderem auch durch den Einsatz verschiedener Antibiotika deutlich gestiegen (3).

Nur wenige fakultativ humanpathogene Erreger werden in den Atemwegen der CF-Patienten gefunden. Frühe Atemwegsinfektionen bei jungen CF-Patienten werden am häufigsten durch *S. aureus* verursacht; etwas seltener auch durch *H. influenzae*. Bei älteren CF-Patienten wird häufig *P. aeruginosa* nachgewiesen (48). *P. aeruginosa* wird als einer der wichtigsten Pathogene bei der Mukoviszidose angesehen, da dieser Keim durch eine Reihe verschiedener Mechanismen extrem resistent ist gegenüber sowohl der körpereigenen Abwehr als auch der Anwendung von antimikrobiellen Chemotherapeutika. So ist *P. aeruginosa* zum Beispiel in der Lage, Biofilme auszubilden, als mukoider Phänotyp aufzutreten oder eine Vielzahl effektiver Toxine zu produzieren (48). Weitere Bakterien in den Atemwegen von CF-Patienten sind *Burkholderia cepacia* (lateinisch: *cepacia* = zwiebelähnlich) sowie *Stenotrophomonas maltophilia* (5).

Insbesondere Studien unserer Arbeitsgruppe haben mittels molekularer Analysen der von Mukoviszidosepatienten isolierten *S. aureus* Stämme herausgestellt, dass dieselben *S. aureus* Klone über lange Beobachtungszeiträume in den Atemwegen der Patienten nachzuweisen sind (40). So wurde gezeigt, dass die Infektion der Atemwege mit *S. aureus* häufig über mehrere Monate und Jahre persistiert (41). Auch der prophylaktische und intermittierende Einsatz verschiedener Antibiotika ist häufig nicht in der Lage, die *S. aureus* Infektion zu eradizieren (40).

In einer Studie der molekularen Epidemiologie von *S. aureus* in der Nasenschleimhaut wurden zu einem weitaus geringeren Maße über längere Beobachtungszeiträume hinweg identische *S. aureus* Klone nachgewiesen (24), weshalb man vermutet, dass die Persistenz nasaler *S. aureus* Kolonisation weitaus geringer ist als die Persistenz in Atemwegen von CF-Patienten. Hieraus lässt sich ableiten, dass *S. aureus* möglicherweise einen Selektionsvorteil in den Atemwegen besitzt, und dass möglicherweise eine Adaptation von *S. aureus* an das Milieu von CF-Atemwegen existiert (40,76).

Die vorliegende Studie untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Persistenz und der Prävalenz bestimmter Adhäsine von *S. aureus* Stämmen, die bei CF-Patienten persistierend nachweisbar waren, gibt. Weiterhin werden Unterschiede in der Adhäsinausstattung von *S. aureus* Stämmen gesucht zwischen solchen Stämmen, die von

CF Patienten isoliert wurden und Stämmen, die von anderen Infektionen stammen sowie Stämmen, die von asymptomatischen *S. aureus* Trägern isoliert wurden.

## 3 Experimentelle Untersuchung: Material und Methoden

### 3.1 Bakterienstämme

Für die vorliegende Studie wurden *S. aureus* Stämme von CF-Patienten, die das Universitätsklinikum Münster im Zeitraum zwischen April 1994 und Januar 2000 aufsuchten und einen Beobachtungszeitraum von mindestens 12 Monaten aufwiesen, untersucht (n= 72). Die Isolate stammen aus Sputumproben und/oder von Rachenabstrichen. Zu diesen Patienten zählten 41 männliche und 31 weibliche Patienten, die zu Beginn des Untersuchungszeitraums zwischen 1 und 33 Jahren mit einem Altersdurchschnitt von 9,5 Jahren alt waren. Zur Bestimmung der klonalen Identität der Bakterienstämme wurde mit jedem der 695 auf diese Weise erworbenen Bakterienstämme eine Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) durchgeführt, anschließend wurden die Ergebnisse der einzelnen Isolate miteinander verglichen. Isolate, deren Ähnlichkeitsindex unter 85% lag, wurden als unterschiedliche Klone angesehen. Auf diese Weise ließen sich insgesamt 78 verschiedene *S. aureus* Stämme unterscheiden (41). Von jedem Patienten wurde jeweils ein Isolat aller nachgewiesenen Klone untersucht.

46 *S. aureus* Stämme wurden jeweils von Patienten mit chronischer Osteomyelitis, die in der Klinik für Orthopädie des Universitätsklinikums Münster behandelt wurden, gesammelt. Die Bakterienstämme wurden von intraoperativen Wundabstrichen, Implantaten, Knochenmaterial oder von während einer Operation entnommenem Gewebe gewonnen.

89 *S. aureus* Stämme wurden aus Blutkulturen von Patienten mit *S. aureus* Bakteriämie isoliert. Als Focus der Bakteriämie lagen folgende Infektionen zu Grunde: Infektionen bei Patienten mit venösen Kathetern oder Hämodialyse Shunts (n=24), postoperative Infektionen (n=7), Wundinfektionen (n=9), Abszesse (n=6), Pneumonien (n=4), Kniegelenkempyeme (n=2), Endokarditis (n=3), Pankreatitis (n=3), Sternum Infektion (n=3), diabetische Gangrän (n=2), Infektion offener Frakturen (n=2) und andere (n=10). In 14 Fällen war die zugrunde liegende Erkrankung unbekannt.

Als Kontrolle wurden Nasenisolat gesunder Mitarbeiter des Institutes für Mikrobiologie des Universitätsklinikums Münster sowie von Medizinstudenten dieser Universität untersucht (n=90).

### **3.2 Lyse der DNA**

Zur Lyse der genomischen DNA der Bakterienstämme wurde etwas bakterielles Material (2-3 Kolonien) in 180 µl TE Puffer (pH 8,0; 20 mM TrisHCl, 2 mM EDTA) suspendiert und es wurden 15 µl Lysostaphin (c= 5 mg/ml; AMBI, New York) hinzugefügt. Diese Suspension wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 25 µl Proteinkinase K (Qiagen, Hilden) sowie 200 µl AL Puffer (Qiagen, Hilden) hinzugegeben. Die Lösung wurde gemischt, bis sich alle Bestandteile aufgelöst hatten. Anschließend wurde erneut inkubiert, zuerst 30 min bei 56°C, dann 5 min bei 95°C mit nachfolgendem kurzen Anzentrifugieren. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol (Merck, Darmstadt) wurde sofort gemischt. Dieser Mix wurde auf eine Säule aufgetragen und bei 9000 rpm 1 min zentrifugiert. Nach Umsetzen der Säule erfolgte das Zufügen von 500 µl AW1-Puffer (Qiagen, Hilden) sowie erneutes einminütiges Zentrifugieren bei 9000 rpm. Anschließend wurde die Säule weitergesetzt und 500 µl AW2-Puffer (Qiagen, Hilden) hinzugefügt mit folgendem dreiminütigem Zentrifugieren bei 13.000 rpm. Die Säule wurde danach in ein 2,0 ml Eppendorf Röhrchen (Eppendorf, Hamburg) platziert, 200 µl AE-Puffer (56°C; Qiagen, Hilden) zugegeben, 5 min bei 56°C inkubiert und 1 min bei 9000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen und das Lysat 1:10 in 10 mM Tris-HCL verdünnt und photometrisch gemessen.

### **3.3 PCR**

Das Verfahren der „polymerase chain reaction“, kurz PCR, wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt. Das Prinzip beruht auf der selektiven Amplifizierung einer spezifischen Sequenz eines DNA-Doppelstrangs. Dies wird durch mehrere Schritte erzielt. Im ersten

Schritt wird die Denaturierung des Doppelstranges erreicht. Hierbei werden die beiden Stränge durch Erhitzen auf 95°C voneinander getrennt. Es folgt das „Annealing“, in dem sich so genannte Primer am 5' Ende der zu amplifizierenden Sequenz der getrennten Stränge anlagern. Die Primer bestehen aus 15-25 Basen, so genannte Oligonucleotide, die so ausgewählt sind, dass sie in ihrer Sequenz komplementär zur Zielsequenz sind. Für diesen Schritt ist die optimale Hybridisierungstemperatur abhängig von den verwendeten Primern und liegt für die hier verwendeten PCRs zwischen 50°C und 59°C. Der dritte Schritt beinhaltet die Synthese eines jeweils komplementären DNA Stranges, die von den angelagerten Primern ausgehend in 3' Richtung fortschreitet. Für die DNA-Synthese werden einzelne Desoxyribonukleotidtriphosphate, kurz dNTPs, benötigt, die in den PCR-Reaktionsansatz zugegeben werden. Diese Reaktion wird durch das Enzym DNA-Polymerase katalysiert. Die Temperatur bei diesem Amplifikationsschritt beträgt 72°C. Am Ende dieser so genannten Extensionsphase liegt die DNA wieder doppelsträngig vor. Diese Reaktionsschritte werden mehrfach wiederholt und führen zu einer exponentiellen Zunahme der durch die Primer bestimmten DNA-Abschnitte. In den hier verwendeten PCRs wurden je 30 Zyklen der Reaktionsschritte durchgeführt.

Die Protokolle der hier verwendeten Single- und Multiplex-PCRs wurden vor Beginn der eigentlichen Experimente in mehreren Schritten erstellt und optimiert, indem die Mengen der Reagenzien, die benötigten Primer, die notwendige Menge der DNA sowie die optimalen Temperaturbereiche der einzelnen Primer in mehreren Testreihen ermittelt wurden. Einige Gene wurden zur Zeit- und Arbeitersparnis mittels Multiplex-PCR untersucht. Entscheidend darüber, ob Gene in einer Multiplex-PCR untersucht werden konnten, waren zum einen die in einer Multiplex-PCR notwendigen Größenunterschiede der zu amplifizierenden Gene, zum anderen gleiche Reaktionsbedingungen wie Menge an Reagenzien und Reaktionstemperaturen.

Zur Ermittlung der optimalen Reaktionstemperatur jeder PCR wurden die PCR-Protokolle in einem Temperaturgradienten getestet. Hierfür wurden für jeweils acht gleiche PCR-Ansätze unterschiedliche Annealing-Temperaturen angewendet, und anschließend die Temperatur festgelegt, bei der die jeweilige positive Kontrolle das beste Ergebnis zeigte.

### 3.3.1 *Eap* PCR

Zu 47,5 µl Reaktionsmix, bestehend aus 40 µl H<sub>2</sub>O (Qiagen, Hilden), 5 µl 10x Puffer inklusive MgCl<sub>2</sub> (Qbiogene, Foster City, USA), 1 µl dNTP (Qbiogene, Foster City, USA), je 0,5 µl der Primer EAP P<sub>2</sub>OT und EAP P<sub>3</sub>OT (35) (MWG Biotech AG, Ebersberg) sowie 0,5 µl Taq-Polymerase (Qbiogene, Foster City, USA), wurden 2,5 µl DNA hinzugefügt. 10 µl dieser Lösung wurden in einem Thermocycler (iCycler, Biorad, Hercules, USA) nach initialer Denaturation bei 95°C (5 min) in 30 Zyklen amplifiziert. Jeder dieser Zyklen bestand aus einer einminütigen Denaturierung bei 95°C, einem einminütigen Annealing bei 56°C sowie einer anschließenden Extension bei 72°C für 2 min. Aufgrund der oben bereits erwähnten Analoga des Gens *Eap* wurden für diese PCR zwei positive Kontrollen gewählt, nämlich die *S. aureus* Stämme Newman und Wood. Die Gene unterscheiden sich in der Größe aufgrund einer unterschiedlichen Anzahl von Sequenzwiederholungen und Translationsterminierungen.

**Tabelle 1: Ansatz der *Eap* PCR**

<b>Reaktionsmix</b>	
H <sub>2</sub> O (Qiagen, Hilden)	40 µl
10x Puffer incl. MgCl <sub>2</sub> (Qbiogene, Foster City, USA)	5 µl
dNTP (Qbiogene, Foster City, USA)	1 µl
EAP P <sub>2</sub> OT (MWG-Biotech AG, Ebersberg)	0,5 µl
EAP P <sub>3</sub> OT (MWG-Biotech AG, Ebersberg)	0,5 µl
Taq Polymerase (Qbiogene, Foster City, USA)	0,5 µl
DNA	2,5 µl

### 3.3.2 *emp* PCR

Der Reaktionsmix für diese PCR bestand aus 40,5 µl H<sub>2</sub>O (Qiagen, Hilden), 5 µl 10x Puffer inklusive MgCl<sub>2</sub> (Qbiogene, Foster City, USA), 1 µl dNTP (Qbiogene, Foster City, USA), je 0,5 µl der Primer 40 New FOR Bam HI und 40 New Rev KpnI (36) (MWG Biotech AG, Ebersberg) sowie 0,5 µl Taq-Polymerase (Qbiogene, Foster City, USA). Zu

diesen 48 µl des Reaktionsmixes wurden 2 µl der jeweiligen DNA hinzugefügt. 10 µl dieser Lösung wurden in einem Thermocycler (iCycler, BioRad, Hercules, USA) nach initialer Denaturierung bei 95°C (5 min) in 30 Zyklen amplifiziert. Jeder dieser Zyklen bestand aus einer Denaturierung bei 95°C für 1 min, einem Annealing bei 50°C für 1 min sowie einer Extension bei 72°C für 2 min. Die positive Kontrolle für diese PCR war der *S. aureus* Stamm Newman.

**Tabelle 2: Ansatz der *emp* PCR**

<b>Reaktionsmix</b>	
H <sub>2</sub> O (Qiagen, Hilden)	40,5 µl
10x Puffer incl. MgCl <sub>2</sub> (Qbiogene, Foster City, USA)	5 µl
dNTP (Qbiogene, Foster City, USA)	1 µl
40 New FOR Bam HI (MWG-Biotech AG, Ebersberg)	0,5 µl
40 New Rev KpnI (MWG-Biotech AG, Ebersberg)	0,5 µl
Taq Polymerase (Qbiogene, Foster City, USA)	0,5 µl
DNA	2 µl

### 3.3.3 *cna* PCR

Jeweils 1 µl DNA der *S. aureus* Stämme wurde zu einem Reaktionsmix, bestehend aus 40,5 µl H<sub>2</sub>O (Qiagen, Hilden), 5 µl 10x Puffer inklusive MgCl<sub>2</sub> (Qbiogene, Foster City, USA), 1µl dNTP (Qbiogene, Foster City, USA), je 1 µl der Primer CNA1 und CNA2 (69) (MWG Biotech AG, Ebersberg) sowie 0,5 µl Taq-Polymerase (Qbiogene, Foster City, USA), hinzugefügt. Mittels eines Thermocycler (iCycler, BioRad, Hercules, USA) wurden 10 µl dieser Lösung nach initialer Denaturierung bei 95°C (5 min) in 30 Zyklen amplifiziert. Die Zyklen bestanden jeweils aus einer Denaturierung bei 95°C für 1 min, einem Annealing bei 58,5°C für 1 min sowie einer Extension bei 72°C für 2 min. Die positiven Kontrollen für diese PCR waren die *S. aureus* Stämme Becker (600bp), Phillips (1,160bp) und Cowan (1,720bp).

**Tabelle 3: Ansatz der *cna* PCR**

Reaktionsmix	
H <sub>2</sub> O (Qiagen, Hilden)	40,5 µl
10x Puffer incl. MgCl <sub>2</sub> (Qbiogene, Foster City, USA)	5 µl
dNTP (Qbiogene, Foster City, USA)	1 µl
CNA 1 (MWG-Biotech AG, Ebersberg)	1 µl
CNA 2 (MWG-Biotech AG, Ebersberg)	1 µl
Taq Polymerase (Qbiogene, Foster City, USA)	0,5 µl
DNA	1 µl

### 3.3.4 *fnbA* PCR

Zu 49 µl Reaktionsmix, bestehend aus 38,5 µl H<sub>2</sub>O (Qiagen, Hilden), 5 µl 10x Puffer inklusive MgCl<sub>2</sub> (Qbiogene, Foster City, USA), 1 µl dNTP (Qbiogene, Foster City, USA), je 1 µl der Primer (86) (MWG Biotech AG, Ebersberg), 1,5 µl einer 1M KCl Lösung (Merck, Darmstadt) sowie 1 µl Taq-Polymerase (Qbiogene, Foster City, USA), wurde 1 µl DNA hinzugefügt. 10 µl dieser Lösung wurden in einem Thermocycler (iCycler, Biorad, Hercules, USA) nach initialer Denaturierung bei 95°C (5 min) in 30 Zyklen amplifiziert. Jeder dieser Zyklen bestand aus einer dreißigsekündigen Denaturierung bei 95°C, einem dreißigsekündigen Annealing bei 55°C sowie einer anschließenden Extension bei 72°C für 1 min.

**Tabelle 4: Ansatz der *fnbA* PCR**

Reaktionsmix	
H <sub>2</sub> O (Qiagen, Hilden)	38,5 µl
10x Puffer incl. MgCl <sub>2</sub> (Qbiogene, Foster City, USA)	5 µl
dNTP (Qbiogene, Foster City, USA)	1 µl
fnbF1 (MWG-Biotech AG, Ebersberg)	1 µl
fnbAR1 (MWG-Biotech AG, Ebersberg)	1 µl
Taq Polymerase (Qbiogene, Foster City, USA)	1 µl
KCl 1M (Merck, Darmstadt)	1,5 µl
DNA	1 µl

### 3.3.5 *fnbB* PCR

Der Reaktionsmix für diese PCR bestand aus 38,5 µl H<sub>2</sub>O (Qiagen, Hilden), 5 µl 10x Puffer inklusive MgCl<sub>2</sub> (Qbiogene, Foster City, USA), 1 µl dNTP (Qbiogene, Foster City, USA), je 1 µl der Primer (37) (MWG Biotech AG, Ebersberg), 1,5 µl einer 1M KCl Lösung (Merck, Darmstadt) sowie 1 µl Taq-Polymerase (Qbiogene, Foster City, USA). Zu diesen 49 µl des Reaktionsmixes wurde 1 µl der jeweiligen DNA hinzugefügt. 10 µl dieser Lösung wurden in einem Thermocycler (iCycler, BioRad, Hercules, USA) nach initialer Denaturierung bei 95°C (5 min) in 30 Zyklen amplifiziert. Jeder dieser Zyklen bestand aus einer Denaturierung bei 95°C für 30 sek, einem Annealing bei 55°C für 30 sek sowie einer Extension bei 72°C für 1 min.

**Tabelle 5: Ansatz der *fnbB* PCR**

Reaktionsmix	
H <sub>2</sub> O (Qiagen, Hilden)	38,5 µl
10x Puffer incl. MgCl <sub>2</sub> (Qbiogene, Foster City, USA)	5 µl
dNTP (Qbiogene, Foster City, USA)	1 µl
<i>fnbF1</i> (MWG-Biotech AG, Ebersberg)	1 µl
<i>fnbBR1</i> (MWG-Biotech AG, Ebersberg)	1 µl
Taq Polymerase (Qbiogene, Foster City, USA)	1 µl
KCl 1M (Merck, Darmstadt)	1,5 µl
DNA	1 µl

### 3.3.6 Multiplex-PCR für *clfB* und *sdrD*

Zu 49 µl Reaktionsmix, bestehend aus 25 µl 2x Qia Multiplex Master Mix (Qiagen, Hilden), 18 µl H<sub>2</sub>O (Qiagen, Hilden), 5 µl Q-Solution (Qiagen, Hilden), sowie je 0,25 µl der Primer CLF B1, CLF B2 (60), SDR D1 und SDR D2 (39) (MWG Biotech AG, Ebersberg), wurde 1 µl DNA hinzugefügt. 10 µl dieser Lösung wurden in einem Thermocycler (iCycler, BioRad, Hercules, USA) nach initialer Denaturierung bei 95°C (5 min) in 30 Zyklen amplifiziert. Jeder dieser Zyklen bestand aus einer einminütigen Denaturierung bei 95°C,

einem einminütigen Annealing bei 55°C sowie einer anschließenden Extension bei 72°C für 2 min. Die positive Kontrolle für diese PCR war der *S. aureus* Stamm Newman.

**Tabelle 6: Ansatz der Multiplex-PCR für *clfB* und *sdrD***

Reaktionsmix	
H <sub>2</sub> O (Qiagen, Hilden)	18 µl
2x Qia Multiplex Master Mix (Qiagen, Hilden)	25 µl
Q-Solution (Qiagen, Hilden)	5 µl
CLF B 1 (MWG-Biotech AG, Ebersberg)	0,25 µl
CLF B 2 (MWG-Biotech AG, Ebersberg)	0,25 µl
SDR D1 (MWG-Biotech AG, Ebersberg)	0,25 µl
SDR D2 (MWG-Biotech AG, Ebersberg)	0,25 µl
DNA	1 µl

### 3.3.7 Multiplex-PCR für *sdrC*, *sdrE*, *clfA*

Für diese Multiplex PCR wurden zu 25 µl 2x Qia Multiplex Master Mix (Qiagen, Hilden), 17,5 µl H<sub>2</sub>O (Qiagen, Hilden) und 5 µl Q-Solution (Qiagen, Hilden) je 0,25 µl der Primer SDR C1, SDR C1, SDR E1, SDR E2 (39), CLF A1 und CLF A2 (50) (MWG Biotech AG, Ebersberg) hinzugefügt. Anschließend wurde 1 µl der jeweiligen DNA hinzugefügt. 10 µl dieser Lösung wurden in einem Thermocycler (iCycler, BioRad, Hercules, USA) nach initialer fünfminütiger Denaturierung bei 95° in 30 Zyklen amplifiziert. Jeder dieser Zyklen bestand aus einer Denaturierung bei 95°C für 1 min, einem einminütigen Annealing bei 55°C sowie einer Extension bei 72°C für 2 min. Die positive Kontrolle für diese PCR war der *S. aureus* Stamm Newman.

**Tabelle 7: Ansatz der Multiplex-PCR für *sdrC*, *sdrE* und *clfA***

<b>Reaktionsmix</b>	
H <sub>2</sub> O (Qiagen, Hilden)	17,5 µl
2x Qia Multiplex Master Mix (Qiagen, Hilden)	25 µl
Q-Solution (Qiagen, Hilden)	5 µl
<i>CLF A 1</i> (MWG-Biotech AG)	0,25 µl
<i>CLF A 2</i> (MWG-Biotech AG)	0,25 µl
SDR C1 (MWG-Biotech AG)	0,25 µl
SDR C2 (MWG-Biotech AG)	0,25 µl
SDR E1 (MWG-Biotech AG)	0,25 µl
SDR E2 (MWG-Biotech AG)	0,25 µl
DNA	1 µl

Tabelle 8: Verwendete Primer mit deren Sequenz

Adhäsin	Primer	Sequenz (5'-3')	Accession Number	Referenz
<i>Eap</i>	eap P <sub>2</sub> OT	CTCGGTACCTTAAAATTTAATTTCAATGTCTACTTTTTTAATGTC	AJ290973	(35)
	eap P <sub>3</sub> OT	CTCGGATCCGCAGCTAAGCCATTAGATAAAATCATCAAGTTCGTTACAC		
<i>emp</i>	40New FOR Bam HI	CTCGGATCCATGCTGTTAGTGAATATAACAGGG	AJ271347	(36)
	40New Rev KpnI	CTCGGTACCACAACCACATAGATTGTAGCCTATATTTA		
<i>fnbA</i>	fnbF1	TAG GAA CTG AAA ATG GTC AC	J04151	(86)
	fnbAR1	GAA GCA ATC AGA AAA CAC TC		
<i>fnbB</i>	fnbF1	TAG GAA CTG AAA ATG GTC AC	X62992	(37)
	fnbBR1	GAG TAT GTA ATT ATT TCT TGG		
<i>clfA</i>	clfA1	GTAGGTACGTTAATCGGTT	Z18852	(50)
	clfA2	CTCATCAGGTTGTTTCAGG		
<i>clfB</i>	clfB1	TGCAAGATCAAACCTGTTCCCT	AJ224764	(60)
	clfB2	TCGGTCTGTAAATAAAGGTA		
<i>sdrC</i>	sdrC1	GTACTTGAAATAAGCGGTTG	AJ005645	(39)
	sdrC2	ACGACTATTAAACCAAGAAC		
<i>sdrD</i>	sdrD1	GGAAATAAAGTTGAAGTTTC	AJ005646	(39)
	sdrD2	ACTTTGTCATCAACTGTAAT		
<i>sdrE</i>	sdrE1	CAGTAAATGTGTCAAAAAGA	AJ005647	(39)
	sdrE2	TTGACTACCAGCTATATC		
<i>cna</i>	cna1	AGTGGTTACTAATACTG	M81736	(69)
	cna2	CAGGATAGATTGGTTTA		

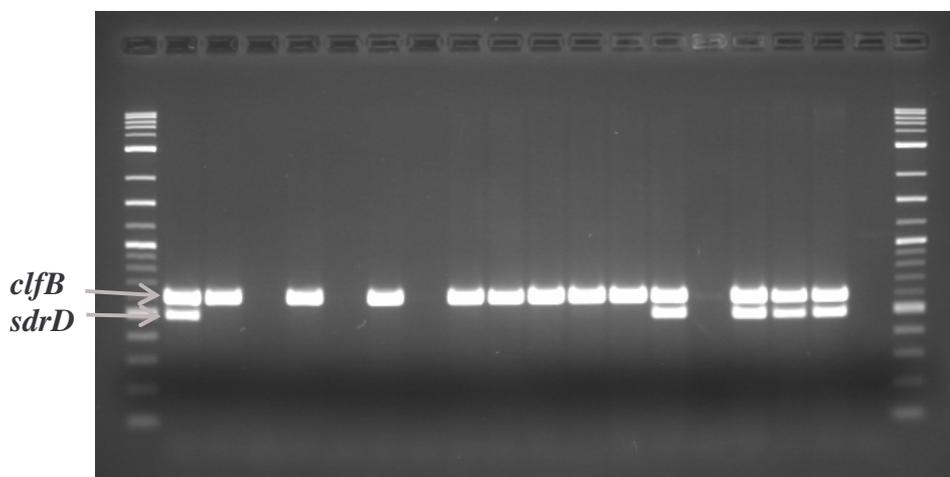
### 3.4 Gelelektrophorese

Mittels der Gelelektrophorese werden unterschiedlich große Amplifikate voneinander getrennt und durch eine anschließende Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die negativ geladene DNA wandert in einer Gelkammer durch ein Gel, der positiven Elektrode entgegen. Die Strecke, die die DNA im Gel zurücklegt, hängt von der molekularen Masse der Amplifikate ab. Diesem Prinzip zufolge werden Amplifikate ihrer Größe nach getrennt; Amplifikate mit geringerer molekularer Masse wandern weiter als Produkte mit einer höheren molekularen Masse.

Zur Herstellung eines Agarose-Gels wurde Agarose in einer 2% Konzentration (0,02g Agarose/ml) in TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA) unter Rühren aufgekocht. Die Masse wurde in ein mit Aussparungen für die Taschen versehenes Trägertablett für die Elektrophorese gegossen und gelierte beim Abkühlen.

Nach Durchführung der PCR wurden jeweils 10 µl der Amplifikate entnommen und mit 10 µl GEBS Puffer in je eine Tasche eines 2% Agarose-Gels in einer Elektrophoresekammer gebracht. 10 µl eines Markers (1 kb + 100 bp ladder, Biolabs) wurden jeweils in die beiden äußersten Kammern eines Gels pipettiert. Mittels eines Elektrophoresegerätes (BioRad Power Pac) wurden 160V und 400A für 45 min appliziert. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele in Ethidiumbromid gefärbt und anschließend unter UV Licht gesichtet und fotografiert.

**Abbildung 1: Fotografie eines Elektrophorese-Gels der Multiplex-PCR für *clfB* und *sdrD***



## 4 Ergebnisse

Ein positives Ergebnis einer PCR liegt vor, wenn anschließend in der Gelelektrophorese nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV- Licht eine eindeutig sichtbare Bande der erwarteten Größe im Gel zu sehen ist. Die Ergebnisse der einzelnen PCRs wurden notiert und in einer Tabelle zusammengefasst.

Die Ergebnisse der PCRs der vier verschiedenen *S. aureus* Kollektive wurden getrennt voneinander ausgewertet.

**Tabelle 9: Anzahl der positiven Ergebnisse innerhalb der einzelnen Stammgruppen**

Gen	Mukoviszidose, CF (n= 78)	Osteomyelitis, OM (n= 46)	Blutkulturen, BK (n=89)	Nasenstämmen N (n=90)
<i>eap</i>	76 (97,4%)	46 (100%)	89 (100%)	87 (96,7%)
<i>emp</i>	75 (96,2%)	46 (100%)	89 (100%)	75 (83,3%)
<i>fnbA</i>	66 (84,6%)	39 (84,8%)	82 (92,1%)	70 (77,8%)
<i>fnbB</i>	78 (100%)	46 (100%)	89 (100%)	90 (100%)
<i>clfA</i>	78 (100%)	46 (100%)	89 (100%)	90 (100%)
<i>clfB</i>	78 (100%)	46 (100%)	89 (100%)	90 (100%)
<i>sdrC</i>	72 (92,3%)	46 (100%)	89 (100%)	88 (97,8%)
<i>sdrD</i>	44 (56,4%)	36 (78,3%)	76 (85,4%)	43 (47,8%)
<i>sdrE</i>	46 (59,0%)	27 (58,7%)	71 (79,8%)	40 (44,4%)
<i>cna</i>	33 (42,3%)	28 (60,9%)	35 (39,3%)	53 (58,9%)

Die Ergebnisse wurden mittels des Chi-Quadrat Tests auf statistisch signifikante Unabhängigkeit geprüft. Ein Ergebnis von  $\leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet.

**Tabelle 10: Ergebnisse der Signifikanzprüfung der unterschiedlichen Prävalenzen der Adhäsine:**

Gen	Ergebnis des Chi-Quadrat Tests auf Unabhängigkeit (p) *
<i>Eap</i>	0,2368848
<i>Emp</i>	<b>&lt;0,0001</b>
<i>fnbA</i>	0,06676117
<i>fnbB</i>	1
<i>clfA</i>	1
<i>clfB</i>	1
<i>sdrC</i>	<b>0,00945097</b>
<i>sdrD</i>	<b>&lt;0,0001</b>
<i>sdrE</i>	<b>&lt;0,0001</b>
<i>cna</i>	<b>0,01261746</b>

\* Fettgedruckt sind statistisch signifikante Werte ( $p \leq 0,05$ )

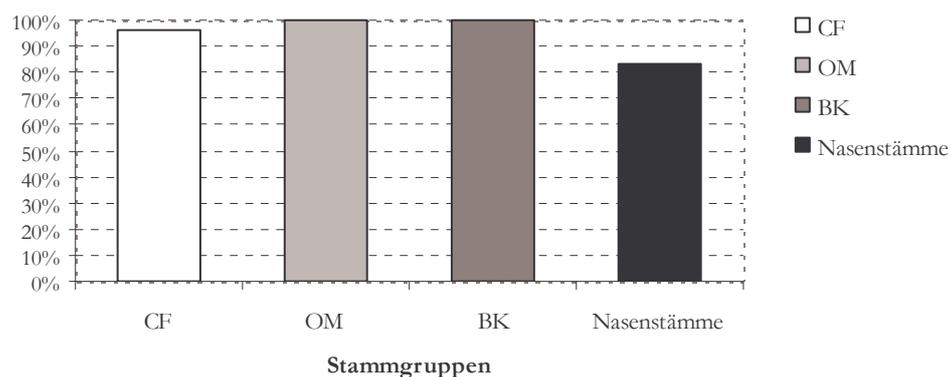
Die Ergebnisse der Gene *emp*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE* und *cna* unterschieden sich in den vier *S. aureus* Kollektiven statistisch signifikant voneinander.

#### 4.1 *emp*

96,2% der Stämme von Patienten mit Mukoviszidose (CF, Gruppe 1) waren positiv für *emp*, 100% sowohl der Osteomyelitisstämme (OM, Gruppe 2) als auch der Blutkulturstämme (BK, Gruppe 3) zeigten ein positives Ergebnis in der PCR, und 83,3% der Stämme von den gesunden nasalen Trägern (Gruppe 4) waren positiv. Der durchgeführte Chi-Quadrat Test dieser Ergebnisse zeigte eine statistische Signifikanz, mit  $p < 0,0001$ .

**Abb. 2: Anteil der *emp* positiven Stämme**

in Prozent



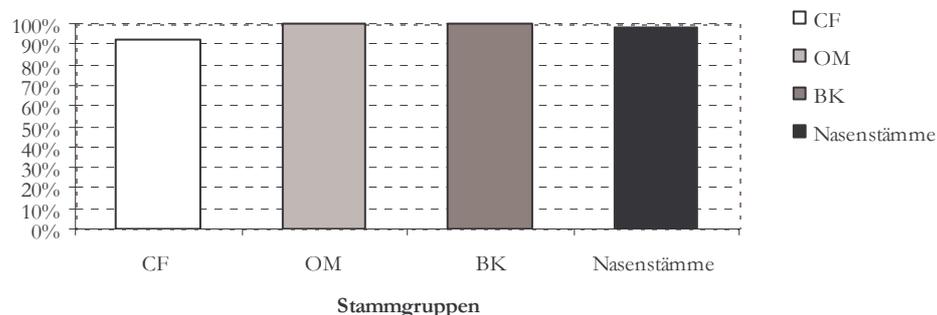
Die Osteomyelitis- und die Blutkulturstämme wiesen eine signifikant höhere Prävalenz des Gens *emp* auf als die CF- Stämme und die Stämme der gesunden nasalen Träger.

#### 4.2 *sdrC*

In den PCRs für das Gen *sdrC* fanden sich in 92,3% positive Ergebnisse in der Gruppe 1 (CF), je 100% in Gruppen 2 (OM) und 3 (BK), und 97,8% in Gruppe 4. Der Chi-Quadrat Test dieser Resultate zeigte eine statistische Relevanz mit  $p = 0,00945097$ .

**Abb. 3: Anteil der *sdrC* positiven Stämme**

in Prozent



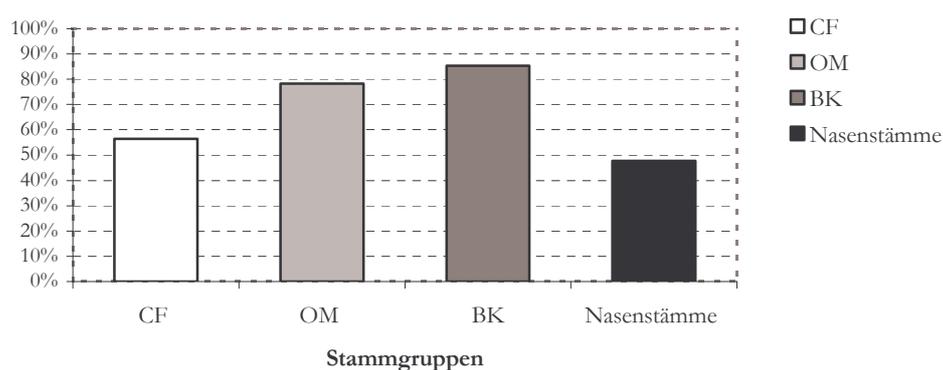
Die Osteomyelitis- und die Blutkulturstämmen zeigten eine signifikant höhere Prävalenz des Gens *sdrC* als die Nasen- und die CF-Stämme.

### 4.3 *sdrD*

Die CF Stämme waren in 56,4% der Fälle positiv für *sdrD*. Gruppe 2 (OM) hatte in 78,3% der Fälle ein positives Ergebnis in der PCR für *sdrD*, Gruppe 3 (BK) in 85,4%. Die Gruppe 4 zeigte in 47,8% ein positives Ergebnis. Diese Ergebnisse unterschieden sich signifikant voneinander, mit  $p < 0,0001$ .

**Abb. 4: Anteil der *sdrD* positiven Stämme**

in Prozent



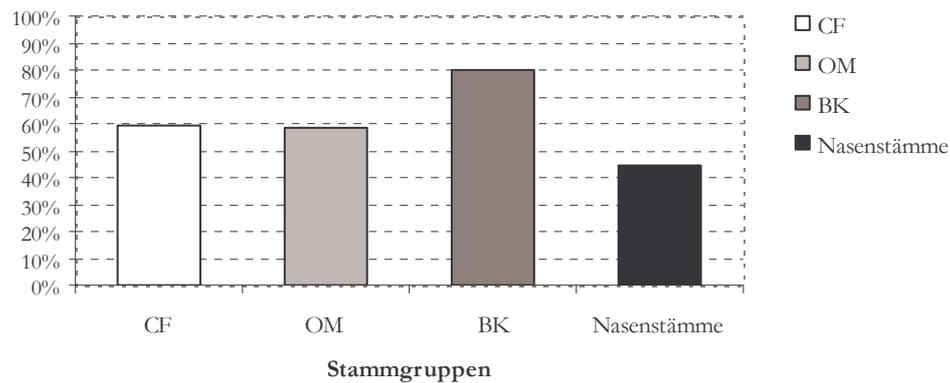
Bei den Ergebnissen für *sdrD* wiesen die Blutkulturstämmen eine signifikant höhere Prävalenz auf als die anderen drei Stammgruppen. Die Stämme der gesunden nasalen Träger besaßen die niedrigste Prävalenz des Gens *sdrD*.

#### 4.4 *sdrE*

59% der CF Stämme waren positiv für *sdrE*, 58,7% der OM Stämme und 79,8% der BK Stämme. Die Isolate der gesunden nasalen Träger zeigten in 44,4% ein positives Ergebnis. Die statistische Relevanz dieser Ergebnisse wurde mittels des Chi-Quadrat Tests ermittelt ( $p < 0,0001$ ).

**Abb. 5: Anteil der *sdrE* positiven Stämme**

in Prozent



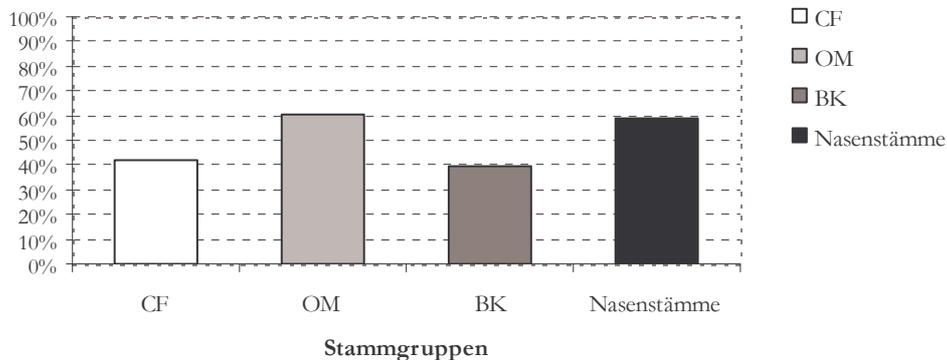
Die Prävalenz des Gens *sdrE* war bei den Blutkulturstämmen signifikant höher als bei den übrigen drei Stammgruppen. Die Nasenstämme wiesen die niedrigste Prävalenz auf.

#### 4.5 *cna*

Die PCR für das Gen *cna* zeigte in 41% der CF Stämme positive Ergebnisse, in 60,9% der Stämme der Gruppe 2 (OM), in 39,3% der Blutkulturstämmen und in 58,9% der Stämme der Gruppe 4 (Nasenstämme). Die statistische Relevanz wurde mittels des Chi-Quadrat Tests bestimmt ( $p = 0,01261746$ ).

**Abb. 6: Anteil der *cna* positiven Stämme**

in Prozent



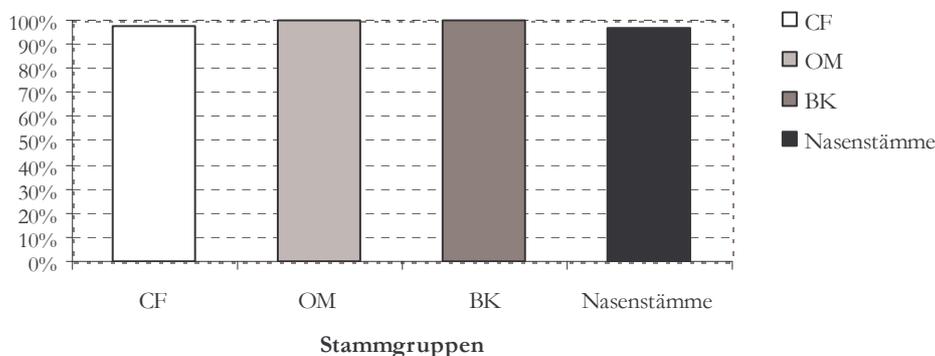
Die Osteomyelitisstämme wiesen von allen vier Stammgruppen die signifikant häufigste Prävalenz für das Gen *cna* auf, während die Prävalenz von *cna* bei den Blutkulturstämmen die niedrigste der vier Gruppen war.

#### 4.6 *Eap*

Von den 78 CF Stämmen waren 76 positiv in Bezug auf die Prävalenz des Gens *Eap*; dies entspricht einem Prozentsatz von 97,4. Die Osteomyelitis Stämme sowie die Blutkulturstämme waren zu 100% positiv. Von den 90 Nasenstämmen zeigten 87 ein positives Ergebnis (96,7%). Der Chi-Quadrat Test zeigt für diese Ergebnisse keinen statistisch relevanten Unterschied ( $p = 0,2368848$ ).

**Abb. 7: Anteil der *Eap* positiven Stämme**

in Prozent



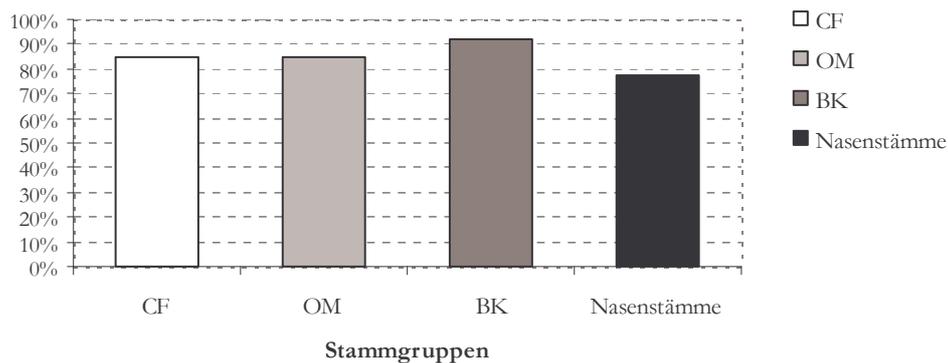
Die Osteomyelitis- und die Blutkulturstämmen zeigten eine häufigere Prävalenz des Gens *Eap* als die CF- und die Nasenstämmen. Diese Unterschiede in der Prävalenz waren jedoch nicht statistisch signifikant.

#### 4.7 *fnbA*

Die PCR für das Gen *fnbA* zeigte bei 66 der 87 CF Stämme ein positives Ergebnis (84,6%). Von den 45 OM Stämmen waren 39 positiv für *fnbA* (84,8%). 82 der 89 Blutkulturstämmen waren positiv (92,1%), und von den 90 Nasenstämmen zeigten 70 ein positives Ergebnis (77,8%). Der Chi-Quadrat Test zeigte eine deutliche Tendenz, jedoch kein statistisch relevantes Ergebnis ( $p = 0,06676117$ ).

**Abb. 8: Anteil der *fnbA* positiven Stämme**

in Prozent



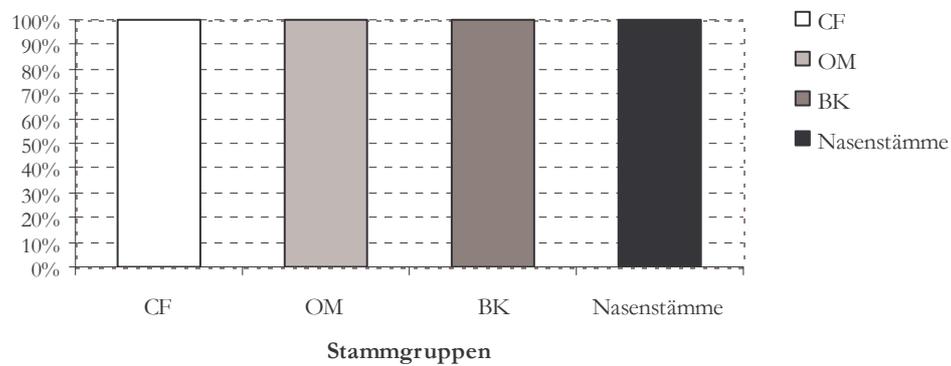
Die Blutkulturstämmen wiesen eine höhere Prävalenz für das Gen *fnbA* auf als die anderen drei Stammgruppen. Die Stämme der gesunden nasalen Träger wiesen die geringste Prävalenz von *fnbA* auf. Diese Unterschiede zeigen zwar eine deutliche Tendenz, sind statistisch jedoch nicht signifikant.

#### 4.8 *fnbB*

Die PCR für das Gen *fnbB* zeigte bei allen untersuchten *S. aureus* Stämmen ein positives Ergebnis (100%).

**Abb. 9: Anteil der *fnbB* positiven Stämme**

in Prozent



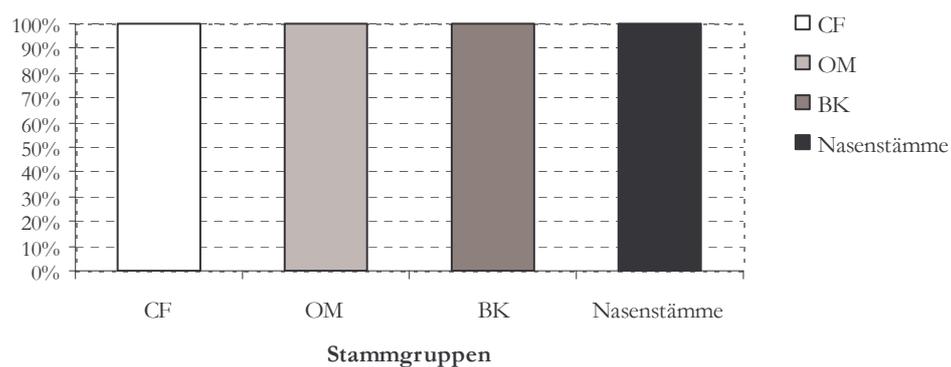
Alle vier Stammgruppen wiesen eine 100% Prävalenz des Gens *fnbB* auf.

#### 4.9 *clfA*

Auch die PCR für *clfA* zeigte bei allen 303 Stämmen ein 100% positives Ergebnis.

**Abb. 10: Anteil der *clfA* positiven Stämme**

in Prozent



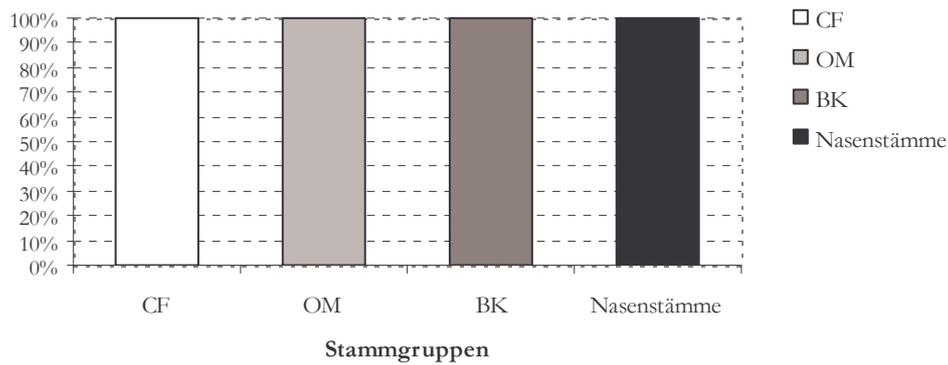
Alle Isolate der vier verschiedenen Stammgruppen wiesen das Gen *clfA* auf.

#### 4.10 *clfB*

Ebenfalls 100% positive Ergebnisse ergaben die *clfB*-PCRs der 303 verschiedenen Stämme.

**Abb. 11: Anteil der *clfB* positiven Stämme**

in Prozent



Alle untersuchten Stämme wiesen das Gen *clfB* auf.

Fasst man die drei Gruppen der Mukoviszidosestämmen, der Osteomyelitisstämmen und der Blutkulturstämmen zu einer einzigen Gruppe der Infektionsstämmen zusammen und vergleicht diese mit der Gruppe der Nasenstämmen Gesunder, ergibt sich folgende Tabelle. In der letzten Spalte ist das Ergebnis des Chi-Quadrat Tests als Test auf statistische Signifikanz aufgelistet.

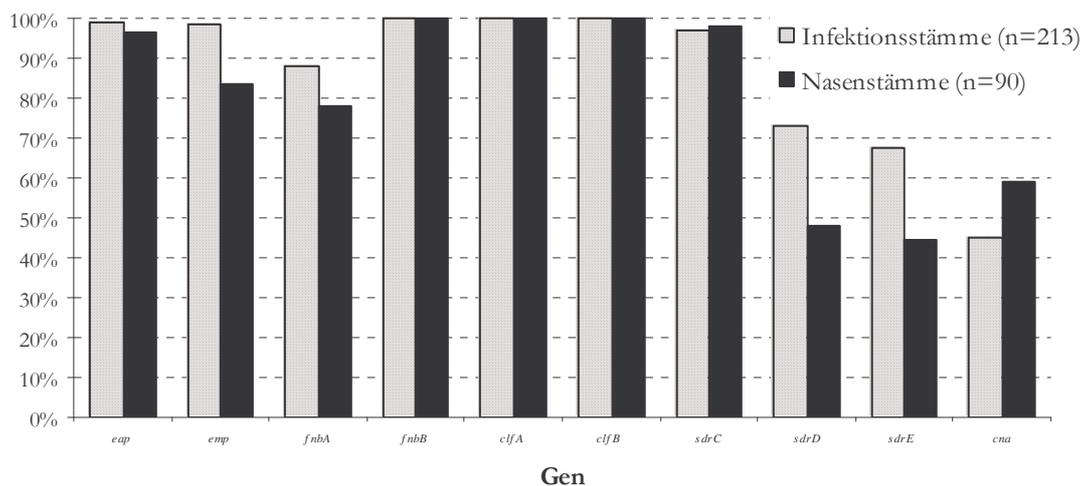
Tabelle 11: Vergleich Infektionsstämme und Nasenstämme

Gen	Infektionsstämme (n= 213)	Prozent Infektionsstämme (n=213)	Nasenstämme (n=90)	Prozent Nasenstämme (n=90)	p =
<i>Eap</i>	211	99,06%	87	96,70%	0,1349
<i>emp</i>	210	98,59%	75	83,30%	<0,0001
<i>fnbA</i>	187	87,79%	70	77,80%	0,0264
<i>fnbB</i>	213	100%	90	100%	1
<i>clfA</i>	213	100%	90	100%	1
<i>clfB</i>	213	100%	90	100%	1
<i>sdrC</i>	207	97,18%	88	97,80%	0,6780
<i>sdrD</i>	156	73,24%	43	47,80%	<0,0001
<i>sdrE</i>	144	67,61%	40	44,40%	0,0002
<i>cna</i>	96	45,07%	53	58,90%	0,0279

Die Ergebnisse der oben stehenden Tabelle wird im folgenden Diagramm anschaulich wiedergegeben.

Abb. 12: Infektionsstämme vs. Nasenstämme

in Prozent



In Abbildung 12 wird deutlich, dass es zwischen den Stämmen der gesunden nasalen Träger und den Stämmen, die von einer *S. aureus* Infektion isoliert wurden,

deutliche Unterschiede in der Prävalenz der Adhäsine gibt. Bei den Genen *emp*, *fnbA*, *sdrD* und *sdrE* bestand bei den Infektionsstämmen eine statistisch signifikant höhere Prävalenz als bei den Nasenstämmen. Bei dem Gen *cna* wiesen die Nasenstämmen eine signifikant höhere Prävalenz auf als die Infektionsstämmen.

In einem zweiten Schritt der Auswertung wurde untersucht, ob es Kombinationen der Adhäsine gab, die häufiger sind als andere. Unter den 10 untersuchten Adhäsinen gibt es theoretisch  $2^{10} = 1024$  verschiedene Kombinationsmöglichkeiten. Bei den hier untersuchten Stämmen kamen von diesen möglichen 1024 Kombinationen nur 28 tatsächlich vor. Die folgende Tabelle gibt die 12 häufigsten der vorkommenden Kombinationen an. 89,1% aller untersuchten Stämme wiesen eine dieser 12 häufigsten Kombinationen auf.

**Tabelle 12: Die 12 häufigsten Kombinationen der prävalenten Adhäsine**

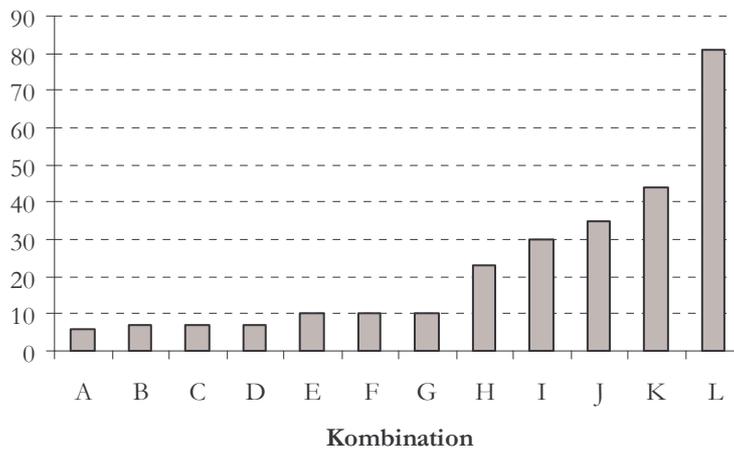
Kombination	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
<i>clfA</i>	pos	pos	pos									
<i>clfB</i>	pos	pos	pos									
<i>eap</i>	pos	pos	pos									
<i>fnbB</i>	pos	pos	pos									
<i>sdrC</i>	pos	pos	pos									
<i>emp</i>	<b>neg</b>	<b>neg</b>	pos	pos	pos							
<i>fnbA</i>	pos	<b>neg</b>	<b>neg</b>	<b>neg</b>	<b>neg</b>	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
<i>sdrD</i>	<b>neg</b>	<b>neg</b>	<b>neg</b>	pos	<b>neg</b>	<b>neg</b>	pos	<b>neg</b>	<b>neg</b>	pos	pos	pos
<i>sdrE</i>	<b>neg</b>	<b>neg</b>	<b>neg</b>	pos	<b>neg</b>	pos	<b>neg</b>	<b>neg</b>	pos	<b>neg</b>	pos	pos
<i>cna</i>	pos	pos	<b>neg</b>	pos	pos	<b>neg</b>	pos	pos	pos	<b>neg</b>	pos	<b>neg</b>

Tabelle 13 gibt die Häufigkeit der Kombinationen A bis L an, weiterhin den prozentualen einzelnen und kumulativen Anteil an der Gesamtzahl der Stämme.

**Tabelle 13: Prozentuale Häufigkeit der Kombinationen**

Kombination	Häufigkeit	Prozent von Total (%)	Kumulative Prozent (%)
A	6	2	2
B	7	2,3	4,3
C	7	2,3	6,6
D	7	2,3	8,9
E	10	3,3	12,2
F	10	3,3	15,5
G	10	3,3	18,8
H	23	7,6	26,4
I	30	9,9	36,3
J	35	11,6	47,9
K	44	14,5	62,4
L	81	26,7	<b>89,1</b>
Andere	33	10,9	10,9
Total	303	100	100

**Abb. 13: Absolute Häufigkeit der Kombinationen**



Untersucht man nun die Verteilung der Adhäsion-Kombinationen der Stämme innerhalb der vier Stammgruppen, ergibt sich die folgende Tabelle.

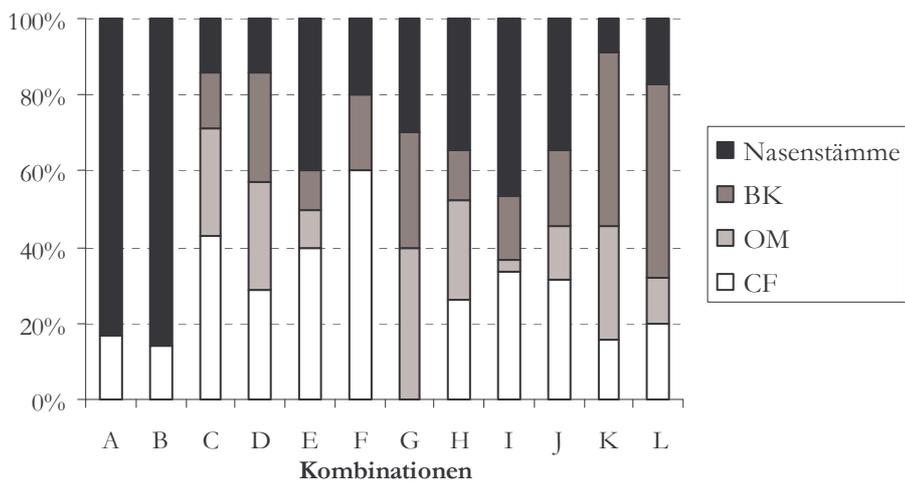
**Tabelle 14: Verteilung der Kombinationen auf die Stammgruppen**

Kombination	Stämme				Gesamt
	CF	OM	BK	N	
A	1	0	0	5	6
B	1	0	0	6	7
C	3	2	1	1	7
D	2	2	2	1	7
E	4	1	1	4	10
F	6	0	2	2	10
G	0	4	3	3	10
H	6	6	3	8	23
I	10	1	5	14	30
J	11	5	7	12	35
K	7	13	20	4	44
L	16	10	41	14	81
Anzahl	67	44	85	74	270
andere	11	2	4	16	33
Total	78	46	89	90	303

Zur visuellen Darstellung der prozentualen Verteilung der häufigsten Kombinationen innerhalb der Stammgruppen dient das folgende Diagramm. Die absolute Anzahl der Stämme mit der jeweiligen Kombination wurde als 100% angesehen.

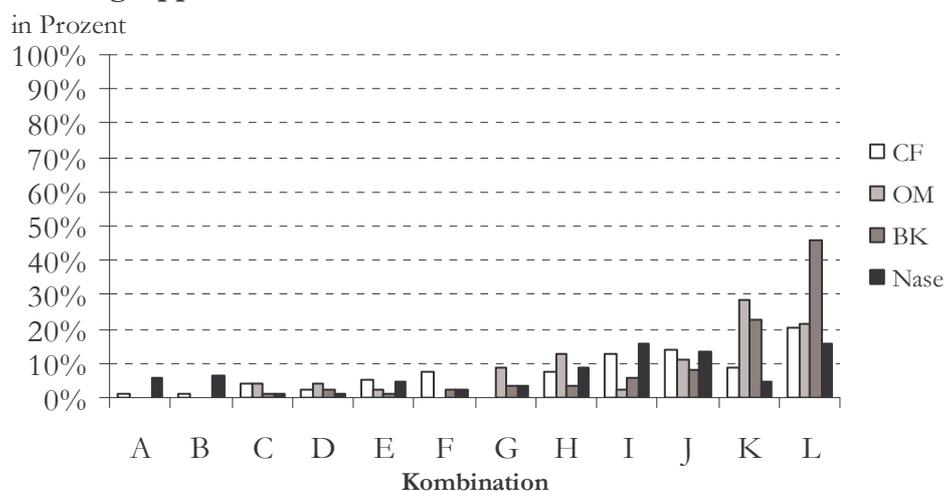
**Abb. 14: Verteilung der häufigsten Kombinationen**

in Prozent



Die absolute Häufigkeit der einzelnen Kombinationen im Vergleich der vier Stammgruppen wird in dem folgenden Diagramm dargestellt.

**Abb. 15: Häufigkeit der Kombinationen innerhalb der Stammgruppen**



Es wurde mittels des Chi-Quadrat Test untersucht, ob es eine statistische Signifikanz der unterschiedlichen Häufigkeiten im Vergleich der einzelnen Stammgruppen gibt. Die folgende Tabelle beinhaltet die Ergebnisse der Signifikanztestung.

**Tabelle 15: Ergebnis der Signifikanztestung der unterschiedlichen Häufigkeiten der Adhäsinkombinationen**

A	<b>0,0313</b>
B	<b>0,011</b>
C	0,4251
D	0,6954
E	0,4419
F	0,0744
G	0,0764
H	0,2188
I	<b>0,0309</b>
J	0,5763
K	<b>0,0001</b>
L	<b>0,00001</b>

Statistisch signifikant unterschiedlich zeigten sich die Verteilungen der Adhäsinkombinationen A, B, I, K und L ( $p \leq 0,05$ ) zwischen den vier verschiedenen Stammgruppen. Die Kombination A, B und I kamen bei den Nasenstämmen signifikant häufiger vor als bei den Stämmen der anderen drei Gruppen, die

Kombination K bei den Osteomyelitisstämmen und die Kombination L bei den Blutkulturstämmen. Die Kombinationen K und L waren bei den Nasenstämmen signifikant seltener vertreten als bei den anderen drei Stammgruppen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Adhäsine als Virulenzfaktoren

Die Adhäsion von Bakterien an die Wirtszelle stellt einen entscheidenden ersten Schritt in einem Infektionsprozess dar. Diese Adhäsion wird bei *S. aureus* durch verschiedene Proteine gewährleistet. Zum einen gibt es die Gruppe der MSCRAMMs, die eine kovalente Bindung zu Komponenten der extrazellulären Matrix der Wirtszellen eingehen können, zum anderen existieren lösliche Adhäsionsproteine, die ionisch an die Wirtszellen binden können.

Da die *S. aureus* Infektion bei Mukoviszidose-Patienten einen äußerst chronischen Verlauf aufweist, sollte in der vorliegenden Studie untersucht werden, ob bestimmte Adhäsine bei *S. aureus* Stämmen von Mukoviszidosepatienten häufiger vorkommen, ob es bestimmte Kombinationen von Adhäsinen gibt, die bei der Zystischen Fibrose bevorzugt vorkommen, und, ob sich die Adhäsinausstattung von *S. aureus* Stämmen, die von Patienten mit Mukoviszidose isoliert wurden, von der Adhäsinausstattung von *S. aureus* Stämmen, die von gesunden nasalen Trägern oder von anderen *S. aureus* Infektionen isoliert wurden, unterscheidet. Zum einen wurden also *S. aureus* Stämme untersucht, die aus den Atemwegen von Patienten mit Mukoviszidose isoliert wurden (Gruppe 1). Die übrigen Infektionsstämme, die untersucht wurden, setzten sich aus Isolaten zusammen, die von intraoperativen Abstrichen von Patienten mit Osteomyelitis (Gruppe 2) oder aus Blutkulturen von Patienten mit *S. aureus* Bakteriämie unterschiedlicher Genese (Gruppe 3) isoliert wurden.

Die untersuchten CF-Stämme wiesen allesamt die Gene *fnbB*, *clfA* und *clfB* auf. Bei über 90% der untersuchten CF-Stämme waren die Gene *eap*, *emp*, *sdrC* vorhanden. Das Gen *fnbA* war bei über 80% der Stämme prävalent. Über die Hälfte der CF Stämme wiesen die Gene *sdrD* und *sdrE* auf, und das Gen *cna* war bei weniger als der Hälfte der Stämme prävalent.

Im Vergleich der CF- Stämme mit den Ergebnissen der anderen Stammgruppen bestand bei 5 der 10 untersuchten Adhäsine zwischen den vier untersuchten Stammgruppen ein signifikanter Unterschied in der Prävalenz des jeweiligen Adhäsins.

- Das Adhäsins *emp* wurde bei den Stämmen der Mukoviszidose oder den Nasenstämmen signifikant seltener nachgewiesen als bei den Blutkultur- und Osteomyelitisstämmen.
- Die Stämme der CF-Patienten besaßen das Gen *sdrC* signifikant seltener als die Stämme der anderen drei Stammgruppen.
- Die CF-Stämme und die Stämme der gesunden Nasenträger wiesen eine statistisch signifikante geringere Prävalenz des Gens *sdrD* auf im Vergleich zu den Blutkulturstämmen und den Osteomyelitisstämmen.
- Das Adhäsins *sdrE* wurde in der hier vorliegenden Studie bei den Blutkulturstämmen signifikant häufiger nachgewiesen als bei den Stämmen der anderen drei Gruppen.
- Das Kollagen-bindende Adhäsins *cna* wiesen die Blutkulturstämmen signifikant seltener als die *S. aureus* Stämme der anderen drei Gruppen auf; die Osteomyelitisstämmen hatten eine signifikant häufigere Prävalenz für *cna* als die anderen drei Stammgruppen.

### 5.1.1 *sdrD*

Die CF- Stämme besaßen signifikant seltener das Gen *sdrD* als die anderen beiden mit einer Infektion assoziierten Stammgruppen (OM und BK), jedoch signifikant häufiger als die von einem nicht-infektiösen Hintergrund stammenden Nasenstämmen. Möglicherweise stellt also das Gen *sdrD* einen Virulenzfaktor dar, der *S. aureus* Stämme im Rahmen eines Entzündungsprozesses einen Selektionsvorteil bietet. Die etwas geringere Prävalenz des Gens bei den CF- Stämmen im Vergleich zu den anderen Infektionsstämmen könnte dadurch erklärbar sein, dass es sich um häufig über Monate und Jahre persistierende Infektionen handelt, bei denen der Selektionsdruck möglicherweise ein anderer ist als bei einer kürzer bestehenden Infektion. Die Atemwegsinfektion bei der Mukoviszidose scheint im Vergleich zu den Nasenstämmen einen Selektionsvorteil derjenigen *S. aureus* Stämme zu bewirken, bei denen das Gen *sdrD* prävalent ist.

Die Beobachtung, dass *sdrD* bei Infektions-assoziierten Stämmen häufiger vorkommt, machten auch Trad und Mitarbeiter in ihrer Studie 2004, und unterstützen dadurch die Vermutung, dass die Prävalenz von *sdrD* einen Selektionsvorteil im Rahmen eines Entzündungsprozesses darstellt. In der Studie berichteten Trad und Mitarbeiter über eine signifikant höhere Prävalenz des *sdrD* Gens bei Stämmen, die von Osteomyelitispatienten isoliert wurden, als bei Stämmen, die von asymptomatischen nasalen *S. aureus* Trägern isoliert wurden (95). Auch eine Studie von Sabat und Mitarbeitern kam zu diesem Ergebnis (80). Diese Beobachtung kann in der vorliegenden Studie nachvollzogen werden; hier bestand bei den Osteomyelitisstämmen eine signifikant höhere Prävalenz von *sdrD* im Vergleich zu der Prävalenz bei den Nasenstämmen.

Diese Resultate würden die Vermutung unterstützen, dass die Prävalenz des Gens *sdrD* zu einem Selektionsvorteil im Rahmen der Osteomyelitis, möglicherweise auch im Rahmen anderer Infektionen wie der Atemwegsinfektion bei der Mukoviszidose, führt.

Im Gegensatz zu dieser Vermutung stehen allerdings andere Ergebnisse von Sabat et al, die belegen, dass in deren Studie keine Assoziation zwischen einer *sdrD* Prävalenz und einem Nachweis von *S. aureus* bei Bakteriämie bestand (80). In der hier vorliegenden Studie zeigten zwar die Stämme, die aus Blutkulturen von Patienten isoliert wurden, sehr wohl eine höhere *sdrD* Prävalenz als die der Nasenstämmen, aber es bleibt also letztendlich unklar, ob die Prävalenz von *sdrD* auch bei anderen Infektionen möglicherweise einen Selektionsvorteil vermittelt. Die Ergebnisse dieser Studie deuten jedenfalls darauf hin.

### 5.1.2 *sdrE*

Die *S. aureus* Isolate von den Mukoviszidosepatienten besaßen eine signifikant höhere Prävalenz des Gens *sdrE* im Vergleich zu den Nasenstämmen. Prozentual war die Prävalenz bei den CF- Stämmen annähernd gleich wie die bei den OM- Stämmen. Die BK- Stämme zeigten die höchste Prävalenz des Gens *sdrE*. Es könnte aufgrund dieser Ergebnisse also ein Zusammenhang zwischen infektiöser Genese eines *S. aureus* Stammes und der Prävalenz des *sdrE* Gens vermutet werden, der auf einen Selektionsvorteil der *sdrE* aufweisenden Stämme hindeutet, und dies wiederum auf die Funktion des *sdrE* Gens als möglicher Virulenzfaktor bei der Mukoviszidose, der Osteomyelitis und der *S. aureus* Bakteriämie.

Ähnliche Vermutungen äußerten auch Peacock und Mitarbeiter 2002. Sie beschrieben *sdrE* in ihrer Studie als Virulenzfaktor, da *sdrE* in selbiger Studie bei invasiven *S. aureus* Stämmen signifikant häufiger präsent war als in nicht-invasiven Stämmen (73). Diese Beobachtung kann durch die hier vorliegende Studie bestätigt werden. Möglicherweise handelt es sich bei dem *sdrE* Gen also tatsächlich um einen Virulenzfaktor von *S. aureus*.

### 5.1.3 *sdrC*

Die Stämme, die aus den Atemwegen von Mukoviszidosepatienten isoliert wurden, wiesen im Vergleich aller vier Stammgruppen die geringste Prävalenz des Gens *sdrC* auf. Zwar war das Gen noch bei über 90% aller CF- Stämme vorhanden, aber insgesamt bestand bei den CF- Stämmen dennoch eine signifikant niedrigere Prävalenz des Gens. Hiermit scheint interessanterweise die Atemwegsinfektion der Mukoviszidose eine Sonderstellung bezüglich der *sdrC* Prävalenz unter den Infektionsstämmen von *S. aureus* darzustellen. Andere Studien belegen nämlich, wie im Falle der Osteomyelitis- und der Blutkulturstämmen die hier vorliegende Studie auch, eine hundertprozentige Prävalenz des Gens unter Infektionsstämmen. So berichten zum Beispiel Peacock et al in ihrer Studie über die Prävalenz des Adhäsins *sdrC* über eine hundertprozentige Prävalenz des Gens sowohl bei *S. aureus* Stämmen, die von Patienten mit einer invasiven Infektion isoliert wurden, als auch bei Stämmen von gesunden Trägern von *S. aureus* (73). Auch die Studie von Sabat und Mitarbeitern zeigte eine Prävalenz von *sdrC* bei allen untersuchten Stämmen, sowohl bei Stämmen von invasiven Infektionen als auch bei Trägerstämmen (80). Es scheint also, als wären bei der Mukoviszidose auch Stämme, bei denen das Gen *sdrC* nicht präsent ist, selektiert worden, wohingegen bei den anderen hier untersuchten, mit einer Infektion assoziierten Stammgruppen (BK und OM) ausschließlich Stämme selektiert wurden, bei denen das Gen *sdrC* vorhanden war, denn in der hier vorliegenden Studie wiesen sämtliche Blutkultur- und Osteomyelitisstämmen das Gen *sdrC* auf.

Die Nasenstämmen wiesen dieses Gen seltener auf. Demnach ließe sich möglicherweise in der hier vorliegenden Studie ein Zusammenhang zwischen invasiver Infektion und der Prävalenz von *sdrC* vermuten, bei dem *sdrC* einen Virulenzfaktor von *S. aureus* darstellen könnte.

Weiterführende Studien zur Prävalenz und Funktion von *sdrC* können in Zukunft möglicherweise die Bedeutung von *sdrC* als Virulenzfaktor klären, insbesondere im Hinblick auf die Mukoviszidose.

#### 5.1.4 *cna*

Die CF- Stämme wiesen das Gen *cna* seltener auf als die Osteomyelitisstämme und die Nasenstämme, und annähernd gleich häufig wie die Blutkulturstämme. Es scheint also, als ob im Infektionsprozess der Atemwegsinfektion bei der Mukoviszidose sowie bei der *S. aureus* Bakteriämie gegen Stämme mit *cna* selektiert wird. Bei der Osteomyelitis scheint *cna* hingegen einen Selektionsvorteil von *S. aureus* Stämmen darzustellen.

In einer Studie von Patti und Mitarbeitern wurde herausgestellt, dass *cna* in der Pathogenese von septischer Arthritis eine wichtige Rolle spielt (68). Andere Studien belegen weiterhin, dass *cna* einen wichtigen Beitrag zur Initiierung der Infektion bei Osteomyelitis leistet (16). Switalski und Mitarbeiter fanden 1993 heraus, dass *cna* bei *S. aureus* Stämmen, die von Patienten mit septischer Arthritis oder Osteomyelitis isoliert worden waren, signifikant häufiger nachgewiesen wurde, als bei Stämmen, die aus Weichteilinfektionen isoliert worden waren (93).

Auch in der hier vorliegenden Studie wiesen die Osteomyelitisstämme eine höhere Prävalenz des Gens *cna* auf als die *S. aureus* Stämme aller anderen Gruppen. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass *cna* einen Virulenzfaktor bei der Osteomyelitis darstellt.

In der bereits genannten Studie von Peacock et al. wurde *cna* von Stämmen, die von invasiven Infektionen isoliert wurden, signifikant häufiger nachgewiesen als bei *S. aureus* Stämmen, die von gesunden Probanden isoliert wurden (73). Hienz und Mitarbeiter postulierten 1996, dass *cna* eine Rolle im Infektionsprozess der Endokarditis spielt (31). Diese Ergebnisse lassen auch für andere invasive *S. aureus* Infektionen eine Rolle des *cna* als Virulenzfaktor vermuten.

Im Gegensatz dazu belegen die Ergebnisse von van Leeuwen und Mitarbeitern in ihrer 2005 veröffentlichten Studie jedoch, dass das Gen für das Kollagen-bindende Protein bei infektiösen humanen *S. aureus* Stämmen im Vergleich zu Stämmen von asymptomatischen *S. aureus* Trägern unterrepräsentiert ist (96). Auch in einer Studie von Vancraeynest und Mitarbeitern wurde die Prävalenz von *cna* bei verschiedenen

Stammgruppen untersucht. Sie verglichen hoch-invasive *S. aureus* Stämme von Kaninchen mit niedrig-invasiven *S. aureus* Stämmen von Kaninchen. Die Wissenschaftler stellten fest, dass das Gen *cna* bei hoch-invasiven Stämmen nicht prävalent war (97). Beide dieser Studien deuten darauf hin, dass *cna* nicht unbedingt einen Virulenzfaktor für eine invasive Infektion darstellt, sondern dass eher sogar bei invasiven Entzündungsprozessen gegen Stämme mit *cna* selektiert wurde.

In der hier vorliegende Studie ergeben sich auch keine Hinweise auf eine Bedeutung von *cna* als Virulenzfaktor bei systemischen Infektionen, da die Blutkulturstämme von allen untersuchten Stämmen die geringste *cna* Prävalenz aufwiesen. Diese Ergebnisse sind also mit den Resultaten von van Leeuwen und Vancraeynest übereinstimmend.

Es kann in der Zusammenschau der Ergebnisse geschlossen werden, dass *cna* bei der Osteomyelitis einen Virulenzfaktor darzustellen scheint, wohingegen bei der Atemwegsinfektion bei der Mukoviszidose und einer invasiven *S. aureus* Infektion mit Bakteriämie *S. aureus* Stämme, bei denen *cna* nicht präsent ist, einen Selektionsvorteil zu besitzen scheinen.

### **5.1.5 *fnbA* und *fnbB***

Die CF- Stämme zeigten in 84,6% der Fälle eine Prävalenz des Gens *fnbA*. Annähernd gleich viele der OM- Stämme besaßen das Gen, und 92,1% der Blutkulturstämme. Damit besteht eine etwas höhere Prävalenz des Gens bei den invasiven Stammgruppen im Vergleich zu den Nasenstämmen. Diese Beobachtung lässt möglicherweise die Vermutung zu, dass bei den Infektionsstämmen solche selektiert wurden, die das Gen *fnbA* aufweisen; aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz sind diese Aussagen jedoch tatsächlich nur als Vermutungen zu werten.

Ähnliche Beobachtungen machten allerdings auch Peacock und Mitarbeiter in der oben bereits erwähnten Studie. Die belegten, dass *fnbA* bei *S. aureus* Stämmen, die mit invasiven Infektionen assoziiert sind, häufiger prävalent ist als bei Nasenstämmen Gesunder (73).

Die Prävalenz des Gens *fnbB* war bei allen untersuchten Stämmen 100%, so dass hier keine Unterschiede zwischen CF- Stämmen und den anderen Stammgruppen festgestellt werden können und entsprechend keine Rückschlüsse auf etwaige Virulenzfaktoren gezogen werden können.

Palmqvist und Mitarbeiter stellten 2005 heraus, dass bei einer *S. aureus* Infektion bei Mäusen die *fnb*-Gene zur Induktion einer systemischen Entzündungsreaktion, charakterisiert durch Gewichtsverlust und erhöhter Mortalität der untersuchten Mäuse, signifikant beitragen. Hieraus schlossen sie, dass die durch die *fnb*-Gene getriggerte Bindung von *S. aureus* an Fibronectin wahrscheinlich mit der Entstehung einer systemischen *S. aureus* Infektion in Zusammenhang stehen könnte (65). Dieser Beitrag der *fnb*-Gene zur systemischen Entzündungsreaktion mag darin begründet sein, dass durch die Fibronectin-bindenden Proteine eine Internalisierung von *S. aureus* in eine Reihe von nicht-professionellen Phagozyten, wie zum Beispiel Endothel- und Epithelzellen, vermittelt wird (15,20,72,88). Man vermutet, dass die Bakterien intrazellulär einer Phagozytose durch professionelle Phagozyten in Form von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten des Wirts entgehen können, und so auch vor der Wirkung von Antibiotika geschützt sind (88). Durch diesen intrazellulären Schutz könnten Langzeitkolonisationen von *S. aureus* und auch chronische *S. aureus* Infektionen begründbar sein (15).

Im Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse einer Studie von McElroy und Mitarbeitern, in der die Ausprägung von Lungengewebsveränderungen sowie bakterielle Persistenz bei einer *S. aureus* induzierten Pneumonie in einem Rattenmodell untersucht wurde (52). Die Studie zeigte, dass *S. aureus* Stämme, deren *fnb*-Gene deletiert worden waren, ausgeprägtere Lungengewebsveränderungen hervorriefen als der Wildtyp. Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, dass die durch die *fnb*-Proteine veranlasste Invasion von *S. aureus* in Alveolarepithelzellen in diesem Modell einer *S. aureus* Pneumonie keinen Virulenzmechanismus von *S. aureus* im Sinne einer akuten Infektion darstellt. Daher wurde von den Autoren postuliert, dass die Fibronectin-bindenden Proteine nicht für die akute Virulenz eines *S. aureus* Stammes wichtig sind, sondern sogar im Gegenteil die Virulenz eines *S. aureus* Stammes durch die *fnb*-Adhäsine zunächst gemindert werden könnte (52). Als Erklärungsansätze führen die Autoren zweierlei Theorien auf: Zum einen könnten die Stämme, bei denen die Fibronectin-bindenden Proteine nicht vorhanden sind, weniger effizient von Neutrophilen eliminiert werden, da sie nicht an Fibronectin binden. Zum

anderen könnte es durch die an Fibronectin gebundenen Bakterienstämme zu einer Aktivierung der Alveolarmakrophagen kommen. Ob die *fnb*-Adhäsine möglicherweise im Rahmen einer chronischen Infektion einen Virulenzfaktor darstellen, wird in dieser Studie nicht untersucht; es wird in diesem Modell nur die akute Infektionssituation untersucht. Möglicherweise ist im Rahmen eines chronischen Infektes der Selektionsvorteil der Internalisierung der Bakterien, die durch die Fibronectin-bindenden Proteine bedingt wird, durchaus gegeben. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie zeigen eine geringfügig erhöhte Prävalenz von *fnbA* bei den von invasiven Infektionen isolierten Stämmen im Vergleich zu den Stämmen von asymptomatischen Probanden; die Unterschiede sind allerdings statistisch nicht signifikant. Im Falle der Mukoviszidose und der Osteomyelitisstämme handelt es sich bei den hier untersuchten Stämmen um chronische Infektionen; die etwas erhöhte Prävalenz der Fibronectin-bindenden Proteine unter den Infektionsstämmen im Vergleich zu den Trägerstämmen könnte Hinweise auf einen Selektionsvorteil im Rahmen einer chronischen Entzündungsreaktion darstellen.

### 5.1.6 *clfA*

In einer Studie von Moreillon und Mitarbeitern wurde herausgestellt, dass *clfA* eine Rolle in der Virulenz von *S. aureus* Stämmen bei Ratten mit experimenteller Endokarditis spielt (57). Eine andere Studie zeigte, dass *clfA* ein ausschlaggebender Virulenzfaktor bei der septischen Arthritis darstellt (38). In der oben bereits erwähnten Studie von Palmqvist und Mitarbeitern von 2005 wurde ebenfalls belegt, dass die Präsenz der Fibrinogen-bindenden Gene *clfA* und *clfB* die Induktion von lokalisierten Gelenkinfekten potenzierte (65).

In der hier vorliegenden Studie konnten keine Rückschlüsse bezüglich einer möglichen Virulenz von *clfA* positiven Stämmen gegenüber *clfA* negativen Stämmen getroffen werden, da bei allen untersuchten Stämmen die Prävalenz von *clfA* bei 100% lag.

Die in den oben erwähnten Studien herausgestellte Funktion von *clfA* als Virulenzfaktor konnte hier also weder bestätigt noch widerlegt werden.

### 5.1.7 *clfB*

In einer Studie von Schaffer und Mitarbeitern wurde herausgestellt, dass *clfB* negative Stämme eine verminderte nasale Kolonisation im Vergleich zu *clfB* positiven Stämmen zeigten (82). Dies bestätigten auch O'Brien und Mitarbeiter und erklärten diese Beobachtung durch die Erkenntnis, dass *clfB* durch die Bindung an Cytokeratin 10 die Adhärenz an Nasenschleimhautepithelzellen vermittelt (63).

Alle in der hier vorliegenden Studie untersuchten Nasenstämmen wiesen das Gen *clfB* auf, so dass der Zusammenhang zwischen nasaler Kolonisation und *clfB* Prävalenz durchaus nachzuvollziehen ist. Stämme, bei denen das Gen *clfB* präsent ist, haben also möglicherweise in Bezug auf die nasale Kolonisation einen Selektionsvorteil.

Eine Aussage zur Funktion von *clfB* als Virulenzfaktor lässt sich jedoch nicht treffen, da auch die Stämme der anderen Stammgruppen zu 100% *clfB* aufwiesen, also keine Unterschiede bestehen zwischen Infektions-assoziierten Stämmen und Trägerstämmen.

Möglicherweise würden weitere Studien, die nicht wie in dieser Studie die Prävalenz, sondern die Expression eines Gens untersuchen, genauere Rückschlüsse auf die Funktion der einzelnen Gene zulassen. Auf diese Weise würde ein etwaiger Unterschied in Expression und Nicht-Expression eines Gens zwischen den Stämmen, die von einer Infektion stammen (CF-, OM- und Blutkulturstämmen) und den Trägerstämmen aufgedeckt werden, der auf die Funktion des jeweiligen Gens als Virulenzfaktor hindeuten könnte. Solche Studien könnten zum Beispiel mittels Westernblots oder Real-time-PCRs durchgeführt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Prävalenz der Gene *sdrC*, *sdrD*, *sdrE* und *emp* häufiger bei Infektions-assoziierten *S. aureus* Stämmen nachgewiesen wurde als bei Trägerstämmen; *S. aureus* Stämme, die diese Gene besaßen, scheinen im Rahmen des Infektionsprozesses selektiert worden zu sein. Hieraus kann möglicherweise auf eine Funktion dieser vier Gene als Virulenzfaktoren hingedeutet werden.

Die Prävalenz von *cna* bei *S. aureus* Isolaten scheint bei der Osteomyelitis einen Selektionsvorteil darzustellen. Die *cna* Prävalenz stellt, den hier herausgestellten

Ergebnissen zufolge und nach Vergleich dieser Ergebnisse mit denen anderer Studien, bei der Osteomyelitis möglicherweise einen Virulenzfaktor dar.

Bei *S. aureus* Stämmen, die mit der Atemwegsinfektion bei der Zystischen Fibrose assoziiert sind, scheinen im Gegensatz zu den anderen untersuchten Stammgruppen auch Stämme, die das Gen *sdrC* nicht aufweisen, selektiert zu werden.

## **5.2 *S. aureus* Adhäsine bei Zystischer Fibrose**

Etwa 90% der Patienten mit Zystischer Fibrose sterben aufgrund eines respiratorischen Versagens durch die fortschreitende obstruktive Lungenerkrankung.

Die Pathogenese der Lungenerkrankung beginnt mit der erhöhten Viskosität des von Patienten mit Zystischer Fibrose produzierten Sekrets. Das wasserarme, hochvisköse Sekret kann nicht ausreichend aus den Bronchien eliminiert werden. Durch diesen Sekretstau kann es zur Entstehung eines Emphysems mit Erhöhung des Totraums der Lunge kommen. Darüber hinaus begünstigt das Sekret in den Bronchien eine bakterielle Besiedlung, welche in vielen Fällen zu eitrigen Bronchitiden und Lobärpneumonien führt. Durch die chronischen Infektionen kommt es im Verlauf häufig zu einem fibrotischen Umbau des Lungengewebes.

Durch die bei der Zystischen Fibrose vorherrschenden pathophysiologischen Bedingungen wie der vermehrte, visköse Mukus an der Zelloberfläche, die veränderte Ionenkomposition und der verminderte Wassergehalt des Extrazellulärraums bestehen bei einer *S. aureus* Infektion der Atemwege bei Patienten mit Zystischer Fibrose andere Selektionsbedingungen als bei einer *S. aureus* Infektion von nicht-CF-Patienten. Auch im Rahmen der chronischen Entzündung und bedingt durch die Wirkung der von neutrophilen Granulozyten freigesetzten Sauerstoffradikale und proteolytischen Enzyme wie die neutrophile Elastase kann es für die besiedelnden Bakterien zu einer Veränderung der Selektionsbedingungen mit Veränderung des pH Werts und Temperaturerhöhung kommen. Weiterhin stellt der Einsatz verschiedener Antibiotika bei der chronischen Atemwegsinfektion bei der Zystischen Fibrose einen hohen Selektionsdruck dar. Bei der Zystischen Fibrose liegen also spezielle Bedingungen vor, an die sich *S. aureus* im Rahmen eines chronischen Entzündungsprozesses anpassen muss.

In dieser Studie galt es, mittels PCR die Prävalenz von 10 verschiedenen Adhäsionsproteinen bei *S. aureus* Stämmen von Mukoviszidosepatienten zu untersuchen, und mit der Prävalenz dieser Proteine bei anderen Infektions-assoziierten Stämmen und bei Trägerstämmen von *S. aureus* zu vergleichen. Es sollte untersucht werden, ob sich die chronische *S. aureus* Infektion mit den veränderten Selektionsbedingungen bei der Mukoviszidose im Vergleich zu nicht- CF- Stämmen in der Prävalenz der Adhäsine widerspiegelt.

Aussagen über eine Veränderung der Prävalenz von Adhäsinen oder der Adhäsine-Expression im Verlauf einer chronischen Kolonisation und Infektion sind anhand dieser Studie nicht möglich, da von jedem Patienten nur ein einziger *S. aureus* Stamm untersucht wurde. Um Informationen darüber zu erlangen, ob die chronische Kolonisation und Infektion im zeitlichen Verlauf bei einem jeweiligen Bakterienstamm eine Auswirkung auf die Prävalenz oder Expression der Adhäsine haben, wären nachfolgende Studien der *S. aureus* Isolate der untersuchten CF-Patienten notwendig. Auf diese Weise ließe sich auch herausstellen, ob im Zuge der chronischen Atemwegsinfektion bei der Zystischen Fibrose Veränderungen der Adhäsinausstattung stattfindet, zum Beispiel in Form einer Deletion von Genen, wie sie von Goerke und Mitarbeitern im Hinblick auf eine Mobilisierung von Phagen beschrieben wurde (25).

In den Ergebnissen dieser Studie lässt sich die Tendenz erkennen, dass die Stämme, die von Patienten mit Zystischer Fibrose isoliert wurden, in der Prävalenz der Adhäsine oftmals zwischen den invasiven Stämmen und den Trägerstämmen lagen. So befinden sich bei den PCRs für *emp*, *sdrD*, *eap* und *fnbA* die Ergebnisse der CF-Stämme zwischen den Werten der invasiven Infektionen (OM und BK) und denen der Nasenstämmen. Die Osteomyelitis- und Blutkulturstämmen haben bei diesen PCRs den höchsten Prozentsatz positiver Ergebnisse, gefolgt von den CF- Stämmen mit einer geringeren prozentualen Prävalenz der jeweiligen Gene. Die Nasenstämmen wiesen bei den genannten PCRs die geringste Prävalenz von Adhäsinen auf. Beim Gen *sdrE* zeigten die Blutkulturstämmen die höchste Prävalenz, gefolgt von den OM- und den CF Stämmen mit annähernd der gleichen Prävalenz. Auch hier besaßen die Nasenstämmen die niedrigste Prävalenz. Bei *emp*, *sdrD* und *sdrE* sind diese Unterschiede statistisch signifikant unterschiedlich.

Möglicherweise hat also bei der Zystischen Fibrose eine Selektion derjenigen *S. aureus* Stämme stattgefunden, die die Adhäsine *emp*, *sdrD* und *sdrE* aufweisen. Diese drei

Gene sind in der vorliegenden Studie als potentielle Virulenzfaktoren herausgestellt worden. Eine höhere Prävalenzrate dieser Gene bei CF im Vergleich zu den Trägerstämmen lässt sich mit einer infektiösen Genese der Stämme vereinbaren. Da es sich jedoch bei der Atemwegsinfektion der Zystischen Fibrose meist um eine chronische Infektion handelt, ist der Selektionsdruck für *S. aureus* Stämme in Bezug auf die Prävalenz von Virulenzfaktoren vermutlich ein anderer als bei einer akuten Infektion, so dass die niedrigere Prävalenz der Gene *emp*, *sdrD* und *sdrE* im Vergleich zu den Stämmen der Blutkulturen, die je eine akute Infektion bedingten, dadurch begründbar wäre. Die Selektionsbedingungen bei der chronischen Atemwegsinfektion bei CF Patienten, wie der visköse Mukus in den Atemwegen, die veränderte Ionenkomposition des Extrazellulärraumes, und die Wirkung der Entzündungsmediatoren (Sauerstoffradikale, Elastase) könnte zu einem Selektionsvorteil derjenigen Stämme geführt haben, die eine geringere Prävalenz der Gene *emp*, *sdrD* und *sdrE* besaßen.

Bei dem Gen *sdrC* wiesen die CF Stämme die signifikant niedrigste Prävalenz im Vergleich zu den anderen Stammgruppen auf. Scheinbar sind also Stämme, die *sdrC* nicht aufwiesen, bei der Mukoviszidose selektiert worden.

In einer Studie von Kahl und Mitarbeitern wurde herausgestellt, dass *S. aureus* in vitro von respiratorischen Epithelzellen internalisiert werden und sich innerhalb der CF-Trachealepithelzellen replizieren kann (42). Die intrazelluläre Aufnahme von *S. aureus* könnte also möglicherweise eine Erklärung sein, warum das Bakterium bei der Zystischen Fibrose häufig über Monate persistiert. Die intrazelluläre Lokalisation könnte *S. aureus* vor der Immunabwehr des Wirts sowie vor den häufig eingesetzten Antibiotika schützen.

In der oben bereits erwähnten Studie von McElroy und Mitarbeitern (52), sowie einer Studie von Sinha et al (88) wurden die Fibronectin-bindenden Proteine in vitro für eine Internalisierung von *S. aureus* in Alveolarepithelzellen verantwortlich gemacht. Diese Studien belegten ebenfalls eine durch die *fnb*-Proteine getriggerte Internalisierung von *S. aureus* auch in andere nicht-professionelle Phagozyten (52). Nimmt man also an, dass die beiden *fnb*-Gene eine Invasion von *S. aureus* in die Zellen bedingen können, und berücksichtigt man die Beobachtung, dass bei den CF-Stämmen in der vorliegenden Studie eine höhere Prävalenz des *fnbA* Gens verzeichnet wurde als es bei den Stämmen von asymptomatischen *S. aureus* Trägern der Fall war, könnte man die Theorie postulieren, dass im Rahmen des chronischen Entzündungsprozesses bei der Zystischen Fibrose eine Selektion derjenigen Stämme stattgefunden hat, die beide *fnb*-Gene aufweisen, da sie durch

die Prävalenz der *fnb*-Gene leicht intrazellulär aufgenommen werden können und so vor der Immunabwehr des Wirts und vor Antibiotikatherapie geschützt überleben können. Eine Internalisierung von *S. aureus* könnte möglicherweise auch die schnelle Rekolonisation und die nach Beendigung der antibiotischen Therapie rezidivierend auftretenden pulmonalen Infekte erklären, die bei Mukoviszidosepatienten häufig auftreten.

### **5.3 Kombinationen der Virulenzfaktoren**

Der Großteil von *S. aureus* Infektionen kann nicht durch das Wirken eines einzigen Virulenzfaktors erklärt werden, und man vermutet ein Zusammenspiel verschiedener Virulenzfaktoren während eines Infektionsprozesses (73). Die große Bandbreite verschiedener Staphylokokkeninfektionen könnte in Zusammenhang mit der unterschiedlichen Ausstattung des Erregers an Virulenzfaktoren oder mit dem Auftreten bestimmter Kombinationen von Virulenzfaktoren stehen (73).

Von den möglichen 1024 Kombinationsmöglichkeiten der 10 betrachteten Adhäsine kommen bei den hier untersuchten Stämmen nur 28 Kombinationen tatsächlich vor. Die 12 häufigsten dieser 28 vorkommenden Kombinationen werden von bereits 89,1% aller Stämme repräsentiert. Eine signifikant unterschiedliche Verteilung der Kombinationen zwischen den vier Stammgruppen fand sich bei 5 der Kombinationen, nämlich bei den Kombinationen A, B, I, K und L (siehe Tabelle 13).

Die Kombination A, B und I kommen bei den Nasenstämmen signifikant häufiger vor als bei den Stämmen der anderen drei Gruppen. Bei all diesen drei Kombinationen kommt das Gen *sdrD* nicht vor; bei der Kombination A kommen ebenso die Gene *emp* und *sdrE* nicht vor, und bei der Kombination B kommt zusätzlich das Gen *fnbA* nicht vor. Die in den bei den Nasenstämmen unterrepräsentierten Gene *emp*, *sdrE* und *sdrD* sind genau jene Gene, die in dieser Studie als Virulenz-assoziiert herausgestellt wurden, was die Vermutung nahe legt, dass auch Isolate, bei denen diese Gene nicht vorhanden sind, bei der Kolonisation der Nasenschleimhaut selektiert wurden.

Die Kombination K, bei der alle Adhäsine prävalent sind, kommt bei den Osteomyelitisstämmen signifikant am häufigsten vor. Die Kombination L, die lediglich das

Gen *cna* nicht aufweist, ist bei den Blutkulturstämmen signifikant am häufigsten vertreten. Diese Kombinationen K und L, also die Prävalenz aller Adhäsine bzw. aller Adhäsine bis auf *cna*, sind bei den Nasenstämmen signifikant seltener vertreten als bei den anderen drei Stammgruppen.

Unter den CF-Stämmen war keine der 12 häufigsten Kombinationen signifikant über- oder unterrepräsentiert im Vergleich zu den anderen Stammgruppen.

Betrachtet man bei den 5 signifikanten Kombinationen nur die in dieser Studie als potentielle Virulenzfaktoren herausgestellten Adhäsine, also *emp*, *sdrC*, *sdrD* und *sdrE*, so fällt auf, dass die Kombinationen, die bei den Infektionsstämmen überrepräsentiert sind im Vergleich zu den Nasenstämmen, jene Kombinationen sind, die die Virulenzfaktoren *emp*, *sdrC*, *sdrD* und *sdrE* in größerer absoluter Anzahl enthalten. Diejenigen der signifikanten Kombinationen, die diese möglicherweise virulenzvermittelnden Adhäsine in geringer Anzahl enthalten, kommen hingegen bei den Nasenstämmen häufiger vor. So findet sich bei den signifikant häufiger vorkommenden Kombinationen A und B der Nasenstämmen nur eines der virulenzvermittelnden Adhäsine, nämlich *sdrC*. In den Kombinationen K und L, die bei den Infektionsstämmen (Osteomyelitis- und Blutkulturstämmen) signifikant häufiger vorkommen als bei den Nasen- und CF- Stämmen, sind alle vier möglicherweise virulenzvermittelnden Adhäsine vertreten. Diese Beobachtungen könnten darauf hindeuten, dass die Prävalenz der Adhäsine *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*, *emp* mit einer erhöhten Virulenz der Stämme einhergeht.

Sabat und Mitarbeiter berichteten 2005 über ihre Studie über die Prävalenz der *sdr*-Gene von insgesamt 497 *S. aureus* Stämmen [151]. Sie verglichen die Prävalenz der Gene von 259 Nasenstämmen mit derer von 98 Osteomyelitisstämmen und 52 Blutinfektionsstämmen und stellten heraus, dass die Kombination „*sdrC* positiv, *sdrD* und *sdrE* negativ“ bei Stämmen, die von Patienten mit Osteomyelitis isoliert wurden, nicht vorkommt. Sabat und Mitarbeiter schlossen hieraus, dass Isolate mit besagter Kombination ein geringeres Potential besitzen, eine Knochenentzündung zu verursachen, als Isolate mit anderen Kombinationen der *sdr*-Gene. In der hier vorliegenden Studie kommt die genannte Kombination der *sdr*-Gene unter den 12 häufigsten Kombinationen bei den OM-Stämmen in den Kombinationen A, B, C, E und H insgesamt 9 Mal vor. Insgesamt vertreten waren unter den 12 häufigsten Kombinationen 44 der Osteomyelitisstämme. Dies entspricht einem Prozentsatz von 20,45%. Vergleicht man hierzu die Ergebnisse der in den anderen

drei Stammgruppen unter den 12 häufigsten Kombinationen vertretenen 226 Stämme, kommt die Kombination „*sdrC* positiv, *sdrD* negativ, *sdrE* negativ“ insgesamt 44 mal vor, was einem Prozentsatz von 19,46% entspricht. Der Unterschied zwischen den Osteomyelitisstämmen und den restlichen Stämmen im Hinblick auf die besagte Kombination der *sdr*-Gene ist statistisch nicht signifikant ( $p=0,879$ ). Somit kann aber das von Sabat und Mitarbeitern genannte Ergebnis, dass *S. aureus* Stämme, die kein *sdrD* und *sdrE* aufweisen, wohl aber *sdrC*, ein geringeres Potential besitzen, zu einer Knochenentzündung zu führen, mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie nicht belegt werden. Möglicherweise kann diese Diskrepanz damit erklärt werden, dass es sich in dieser Studie um Isolate von Patienten mit chronischer Osteomyelitis handelt, wohingegen zur Art der Osteomyelitis in der Studie von Sabat et al. keine genauere Angabe gemacht wird, es sich also vielleicht um Isolate einer akuten Form der Osteomyelitis handelt, die sicherlich mit anderen Selektionsdrücken verbunden ist als die hier untersuchte chronische Form.

Die Auswertung der in der vorliegenden Studie erlangten Ergebnisse deutet darauf hin, dass im Infektionsprozess der Osteomyelitis jene Stämme einen Selektionsvorteil besitzen, die *cna* aufweisen. Ebenfalls war *sdrD* bei den Osteomyelitisstämmen sehr häufig nachzuweisen.

Die Kombination „*sdrD* positiv, *cna* positiv“ kam bei 19 der in den 12 häufigsten Kombinationen vertretenen 44 Osteomyelitisstämmen vor. Bei den anderen drei Stammgruppen kam diese Kombination signifikant seltener vor. In Bezug auf die Osteomyelitis scheint die Kombination „*sdrD* positiv, *cna* positiv“ auf eine virulente Kombination der Adhäsine hinzuweisen.

In einer Studie von S. J. Peacock und Mitarbeitern wurde der Zusammenhang zwischen der Anzahl der prävalenten *fnb*-Gene und einer invasiven *S. aureus* Erkrankung untersucht (70). Die mit einer invasiven *S. aureus* Infektion assoziierten *S. aureus* Isolate besaßen statistisch signifikant häufiger sowohl *fnbA* als auch *fnbB*, im Vergleich zu Stämmen, die mit einem Trägertum von *S. aureus* assoziiert sind. Die Anzahl an Stämmen, die beide *fnb*-Gene auswiesen, lag in der Studie von Peacock bei Nasenträgern bei 63,6%, bei Endokarditis bei 85,3%, bei septischer Arthritis/Osteomyelitis bei 83,9%, und bei orthopädischen Implantat-assoziierten Infektionen bei 75,5% (70). In der hier vorliegenden

Studie lag die Anzahl der sowohl *fnbA* als auch *fnbB* aufweisenden Stämme bei den Nasenisolaten bei 77,8%, bei den CF- Stämmen bei 84,6%, bei den Osteomyelitisstämmen bei 84,8% und bei den Blutkulturstämmen bei 92,1%. Auch hier zeigte sich also bei den invasiven Stämmen eine häufigere Prävalenz beider Fibronektin-bindenden Proteine; die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch relevant.

#### **5.4 Adhäsine als Angriffspunkt einer Therapie gegen *S. aureus***

Bei der stetig steigenden Anzahl an Antibiotika-resistenten *S. aureus* Stämmen gewinnen neue antimikrobielle Behandlungsstrategien und Präventionsmöglichkeiten von *S. aureus* Infektionen zunehmend an Bedeutung. Der bakteriellen Adhäsion wird im Rahmen des Entzündungsprozesses eine große Bedeutung zugeordnet. Aus diesem Grund stellen die Adhäsionsproteine von *S. aureus* einen wichtigen Angriffspunkt neuer Therapieoptionen dar.

Neuere Forschungsinhalte bestehen derzeit darin, Impfstoffe und gegen die Adhäsine gerichtete Antikörper zu entwickeln, um damit direkt in die bakterielle Kolonisation und somit in eine potentiell nachfolgende Infektion einzugreifen (78).

Eine Immunisierung mit einem Antikörper gegen ein Adhäsionsprotein von *S. aureus* würde jedoch nur dann Sinn machen, wenn es sich um ein Adhäsion handelt, das bei möglichst vielen Stämmen von *S. aureus* prävalent ist. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eine höhere Prävalenz einiger Adhäsine im Vergleich von Infektionsstämmen und Nasenstämmen von *S. aureus*. Hierdurch wird deutlich, dass die Adhäsine durchaus eine wichtige Rolle als Ansatzpunkt einer Therapie gegen *S. aureus* Infektionen darstellen könnten, sowohl die Prävention akuter Infektionen als auch besonders der Chronifizierung von *S. aureus* Infektionen.

### 5.4.1 *cna*

In einer der ersten Studien, die sich mit Impfstoffen gegen *S. aureus* befasste, wurde von Nilsson et al 1998 herausgestellt, dass die aktive Immunisierung von Mäusen mit einem rekombinanten Fragment der A-Region des Adhäsins *cna* zu einem signifikant erhöhtem Überleben einer Inokulation mit *S. aureus* führte, als es bei nicht-immunisierten Mäusen der Fall war (61). Die passive Immunisierung mit *cna*-spezifischen Antikörpern schützte die Mäuse ebenso vor einem Sepsis-bedingten Tod (61). Diese Beobachtung machten auch Smeltzer und Mitarbeiter. In ihrer Studie führte eine Immunisierung mit einem rekombinanten Fragment von *cna* zu einem Schutz gegen Tod in Folge einer Sepsis und minderte außerdem die bakterielle Kolonisierung von Knochenmaterial (90).

Visai und Mitarbeiter charakterisierten einige gegen *cna* gerichtete Antikörper. Die meisten der getesteten Antikörper waren in der Lage, mit der Bindung von *S. aureus* an kollagenhaltige Oberflächen zu interferieren. Einige Antikörper waren sogar in der Lage, bereits an kollagenhaltige Substrate gebundene Bakterien wieder abzulösen (99).

Eine neue Studie von Therrien und Mitarbeitern untersuchte die immunologischen und protektiven Eigenschaften einer *cna*-basierten DNA Immunisierung (94). Die immunisierten Mäuse bildeten hohe Titer eines gegen *cna* gerichteten Antikörpers aus. In vitro verhinderten diese Antikörper die Bindung an Kollagen; die immunisierten Mäuse waren jedoch in vivo nicht gegen eine intraperitoneale *S. aureus* Applikation geschützt (94).

Es wird vermutet, dass die Bindung von *S. aureus* an Kollagen einen wichtigen Punkt in der Pathogenese von muskuloskeletalen Infektionen darstellt (90). Infektionen wie Arthritis und Osteomyelitis sind durch Antibiotikatherapie allein meist schwierig zu behandeln (99). Die gezielte Immunisierung gegen *cna*, die eine Ablösung der Bakterien von den Geweben des Wirts bedingen kann, erscheint also eine sinnvolle gezielte prophylaktische Strategie gegen Osteomyelitis und septische Arthritis. Durch die Ablösung der Bakterien von den kollagenhaltigen Geweben des Wirts würden sich die Bakterien in einer Art Suspension befinden, wo sie zugänglicher für die körpereigene Immunabwehr und für die eingesetzten Antibiotika sein könnten (99). Eine breite Anwendung dieser gegen *cna* gerichteten Impfstoffe oder Antikörper als Immunisierung gegen andere Arten

von *S. aureus* Infektionen scheint aber nicht ideal zu sein, da einerseits nur ein Teil der *S. aureus* Stämme *cna* aufweisen (90), und andererseits klinische Studien eine Wirksamkeit solcher Immunisierungen widerlegen (94).

#### 5.4.2 *clfA*

2001 veröffentlichten Joseffson et al Ergebnisse über eine Immunisierung mit rekombinanten Fragmenten von *clfA*, die zeigten, dass immunisierte Mäuse eine geringere Schwere und Ausprägung einer septischen Arthritis aufwiesen als nicht immunisierte Mäuse, und außerdem in einer geringeren Anzahl der Fälle einen staphylokokkenbedingten septischen Tod erlitten (38). In dieser Studie wurde außerdem im Sinne einer passiven Immunisierung Mäusen intraperitoneal IgG Fraktionen injiziert, die von den im ersten Schritt immunisierten Mäusen gewonnen worden waren. Hier zeigte sich eine wesentlich geringere Ausprägung einer hervorgerufenen Arthritis (38). In einer anderen Studie wurde mittels eines humanen polyklonalen Immunglobulins, das erhöhte Mengen eines *clfA*-Antikörpers enthält, eine die konventionelle antibiotische Therapie unterstützende Behandlung einer infektiöser Endokarditis untersucht (98). Die Ergebnisse belegten bei den mit diesem Immunglobulin passiv immunisierten Kaninchen sowohl eine erhöhte Eradikation von Bakterien aus dem Blutkreislauf als auch von den Vegetationen an Herzklappen (98).

Patti veröffentlichte 2004 eine Studie über einen humanisierten monoklonalen Antikörper mit einer hohen Affinität und Spezifität für *clfA*. Es wurde in einem Septikämie- und in einem Endokarditismodell von einem signifikanten Schutz vor einer intravenösen MRSA-Applikation bereits nach einer einmaligen Gabe dieses Antikörpers berichtet (66).

Domanski und Mitarbeiter arbeiteten an der Entwicklung eines anti-*clfA* monoklonalen Antikörpers zur Behandlung von *S. aureus* Infektionen. Die Ergebnisse belegen in einem Kaninchen- Endokarditismodell einen Schutz vor intravenös appliziertem *S. aureus* (13). In einer früheren Studie führte eine einzelne Infusion mit monoklonalen Antikörpern gegen *clfA* zu einem Schutz gegen intravenös applizierte MRSA Stämme (28,66).

Die hier genannten Studien zeigen im Hinblick auf die Wirksamkeit einer Immunisierung gegen *clfA* gute Ergebnisse. Außerdem erfüllt *clfA* nach den in dieser Studie

erhobenen Ergebnissen die Anforderung an einen Zielpunkt einer Immunisierungstherapie, bedingt dadurch, dass nahezu alle *S. aureus*-Stämme dieses Gen aufweisen. *clfA* scheint deshalb ein geeigneter Angriffspunkt für prophylaktische und therapeutische Immunisierungen gegen *S. aureus* Infektionen zu sein.

### 5.4.3 *clfB*

*clfB* vermittelt die Adhärenz an Cytokeratin 10, wie es an den Oberflächen humaner Nasenepithelzellen vorkommt (63). Man vermutet, dass dadurch die Adhärenz von *S. aureus* an Nasenepithelzellen erklärbar ist, und dass somit *clfB* eine wichtige Rolle in der nasalen Kolonisation von *S. aureus* spielt (63).

In neueren Studien wurde gezeigt, dass die Immunisierung von Mäusen mit einem monoklonalen *clfB* Antikörper zu einer signifikant geringeren nasalen Kolonisation führte (82). Da in vielen Studien gezeigt wurde, dass eine nasale Kolonisation mit *S. aureus* einen entscheidenden Faktor in der Initialisierung eines Infektionsprozesses darstellt (71,100) könnten Immunisierungen mit solchen Antikörpern eine Möglichkeit bieten, *S. aureus* Infektionen zu vermeiden.

Die Prävalenz des Gens *clfB* konnte in der hier vorliegenden Studie in allen untersuchten Stämmen nachgewiesen werden, so dass Vakzinierungsstrategien gegen *clfB* geeignet scheinen, um *S. aureus* Infektionen zu unterbinden.

### 5.4.4 *fnbA*

In einer Studie von Mamo et al von 1994 wurde nachgewiesen, dass die Immunisierung von Mäusen mit Fusionsproteinen der Fibronectin-bindenden Region von *fnbA* zu einem signifikant selteneren Auftreten einer schweren Mastitis führte (49). Hieraus schlossen Mamo und Mitarbeiter, dass die Immunisierung mit rekombinantem *fnbA* einen Schutz gegen *S. aureus* gewährleistet (49).

Schennings und Mitarbeiter zeigten 1993, dass die Immunisierung von Mäusen mit Fusionsproteinen aus Beta-Galaktosidase und der Fibronectin-bindenden Domäne des Fibronectin-bindenden Proteins nach intravenöser *S. aureus* Applikation zu einer

signifikant geringeren bakteriellen Besiedlung der Aortenklappen führt (83). Die Wissenschaftler folgerten, dass die Immunisierung mit *fnbA* einen Schutz vor einer experimentellen Endokarditis gewährleistet.

Da in dieser Studie die Gene der Fibronektin-bindenden Proteine bei allen hier untersuchten Stämmen nachgewiesen wurden, scheinen Vakzinierungsstrategien gegen die Fibronektin-bindenden Proteine ein geeignetes Ziel einer Prävention von *S. aureus* Infektionen darzustellen.

#### **5.4.5 Rekombinante Proteine**

In der von Zhou et al. 2006 veröffentlichten Studie wurde ein signifikant verlängertes Überleben von Mäusen beobachtet, die mit einem rekombinanten Protein *ena-fnb* geimpft wurden, und anschließend einer *S. aureus* Inokulation ausgesetzt waren (105). Es wurde daraus geschlossen, dass die Impfung mit diesem rekombinanten Protein eine viel versprechende Prävention gegen *S. aureus* Infektionen darstellen könnte (105).

Castagliuolo et al. veröffentlichten 2006 eine Studie, in der die intranasale Immunisierung von Mäusen mit einer DNA-Mischung, die für die Adhäsine *fnbA*, *cna*, *efb* und *clfA* kodierte, zu einem signifikanten Level an spezifischem Immunglobulin mit einer daraus resultierenden geringeren Adhäsion von *S. aureus* an bovinen Brustdrüsenepithelzellen führten (6). Des Weiteren zeigten sich bei immunisierten Mäusen im Vergleich zu nicht-immunisierten Mäusen eine signifikant geringere Anzahl an Bakterien in den Brustdrüsen, nachdem 48 Stunden vorher bei beiden Gruppen  $5 \times 10^6$  Kolonie-bildende Einheiten (KBE) von *S. aureus* in die Zitzenkanäle der Mäuse eingebracht worden war (6). Diese Ergebnisse deuten an, dass eine muköse Immunisierung mit Adhäsinen eine Prävention gegenüber einer *S. aureus* induzierten Mastitis herbeiführen könnte.

Diese beiden Studien belegen, dass auch die aktive Immunisierung mit rekombinanten Adhäsinen einen Erfolg in Bezug auf den Schutz vor *S. aureus* Infektionen zu haben scheint.

## 5.5 *Schlussfolgerung*

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie lassen sich Hinweise auf die Funktion der Adhäsionsproteine im Hinblick auf die Virulenz eines *S. aureus* Stammes im Hintergrund unterschiedlicher Infektionen erzielen.

Die Virulenzfaktoren von *S. aureus* einer besonderen Untersuchung zu unterziehen ist insbesondere wegen der immer häufiger auftretenden Anzahl Antibiotika-resistenter Bakterienstämme ein wichtiges Ziel der heutigen Forschung, um dadurch Ansatzpunkte neuer Präventions- und Therapiestrategien zu entwickeln. Diese Studie trägt dazu bei, indem sie die Prävalenz derjenigen Virulenzfaktoren in klinischen Isolaten untersuchte, die für einen ersten Schritt in der Pathogenese von *S. aureus*- Infektionen, der Adhäsion, verantwortlich und somit auch mit der Virulenz des Erregers assoziiert sind.

Weitere Studien werden notwendig sein, die Adhäsine im Hinblick auf ihre genaue Funktion als Virulenzfaktor zu untersuchen, hiermit im Zusammenhang stehende Präventions- und Therapiestrategien gegen *S. aureus* weiter zu entwickeln, sowie diese *in vitro* und *in vivo* zu testen.

Denkbar als optimales Ziel von *S. aureus* Immunisierungen wäre ein rekombinantes Adhäsine, das aus denjenigen Adhäsionsproteinen besteht, die in der vorliegenden Studie als Virulenz- assoziiert herausgestellt wurden. Im Vergleich zu den *S. aureus* Stämmen, die von den gesunden Probanden isoliert wurden, zeigten sowohl die CF-Stämme als auch die OM- und die Blutkulturstämme signifikant höhere Prävalenzen der Gene *emp*, *sdrD* und *sdrE*. Denkbar wäre also ein rekombinantes Vakzin, das aus Genen der Adhäsine besteht, um Grundlage einer Immunisierung gegen *S. aureus* Infektionen darzustellen.

Die Kombination mit den clumping factors *clfA* und *clfB* und den Fibronektin-bindenden Proteinen *fnbA* und *fnbB*, die von fast allen *S. aureus* Stämmen exprimiert werden, könnte ein weiterer Ansatz für immunologische Präventions- und Therapieoptionen gegen *S. aureus* Infektionen sein.

Durch eine wirksame Prävention und Therapie von *S. aureus* Infektionen könnten Inzidenz und Mortalität von *S. aureus* Infektionen gesenkt werden. Für Patienten mit Zystischer Fibrose könnte dieses möglicherweise einen deutlichen Anstieg der Lebensqualität und -erwartung bedeuten.

## 6 Zusammenfassung

Viele Studien haben bisher herausgestellt, dass Proteine, die die Adhärenz eines Bakteriums an Wirtszellen gewährleisten, als Virulenzfaktoren fungieren können, und dass die Ausstattung der Erreger mit Adhäsinen möglicherweise mit der großen Bandbreite der *S. aureus* Infektionen im Zusammenhang steht.

Die vorliegende Studie befasste sich mit der Prävalenz von Adhäsionsproteinen bei 78 Stämmen, die aus Rachenabstrichen oder Sputumproben von Patienten mit Zystischer Fibrose isoliert wurden. Ziel war es, herauszustellen, ob sich bei den *S. aureus* Isolaten von Mukoviszidosepatienten eine besondere Ausstattung mit Adhäsinen findet. Daher wurde die Adhäsinausstattung bei diesen CF Stämmen mit der Adhäsinausstattung bei klinischen *S. aureus*-Isolaten, die von verschiedenen Infektionen und von gesunden nasalen Trägern isoliert wurden, verglichen.

Dafür wurden *S. aureus* Stämme von Patienten mit chronischen Atemwegsinfektionen bei Zystischer Fibrose analysiert, weiterhin Stämme von Patienten mit Osteomyelitis, Stämme aus Blutkulturen von Patienten mit verschiedenen Infektionen (Katheter-assoziierte Infektionen, Abszesse, Wundinfektionen, Pneumonien, Gelenkempyeme, Pankreatitis, Endokarditis und andere ) sowie von gesunden *S. aureus* Trägern.

Die Stämme wurden mittels PCR auf die Prävalenz der Adhäsine *eap*, *emp*, *fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *clfB*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE* und *cna* untersucht.

Die untersuchten CF-Stämme wiesen allesamt die Gene *fnbB*, *clfA* und *clfB* auf. Bei über 90% der untersuchten CF-Stämme waren die Gene *eap*, *emp*, *sdrC* vorhanden. Das Gen *fnbA* war bei über 80% der Stämme prävalent. Über die Hälfte der CF Stämme wiesen die Gene *sdrD* und *sdrE* auf, und das Gen *cna* war nur bei weniger als der Hälfte der Stämme prävalent.

Signifikante Unterschiede ergaben sich im Vergleich der vier klinischen Gruppen bei den Genen *emp*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE* und *cna*.

Die *S. aureus* Stämme der Mukoviszidosepatienten wiesen signifikant seltener das Gen *sdrC* im Vergleich zu den anderen Stammgruppen auf.

Die Gene *emp*, *sdrD* und *sdrE* wurden bei den Mukoviszidosestämmen signifikant häufiger nachgewiesen als bei den Trägerstämmen, jedoch signifikant seltener als bei den Blutkulturstämmen.

Die Prävalenz der Gene *emp*, *sdrC*, *sdrD* und *sdrE* war bei Stämmen, die von Patienten mit einer Bakteriämie isoliert worden waren, signifikant häufiger als bei den Stämmen, die von Patienten mit Zystischer Fibrose stammten und denen von asymptomatischen *S. aureus* Trägern. Weiterhin waren bei den Osteomyelitisstämmen und Blutkulturstämmen im Vergleich zu den Trägerstämmen jene Kombinationen der Adhäsionsproteine überrepräsentiert, welche sämtliche dieser 4 Gene aufwiesen. Dahingegen waren bei den Trägerstämmen solche Kombinationen überrepräsentiert, bei denen diese 4 Adhäsine in geringer Anzahl prävalent waren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen vermuten, dass das Fehlen von *sdrC* *S. aureus* Stämmen bei den chronischen Atemwegsinfektionen bei der Zystischen Fibrose einen Selektionsvorteil gewährleisten könnte.

Da die von Patienten mit Zystischer Fibrose isolierten *S. aureus* Stämme die Adhäsine *emp*, *sdrD* und *sdrE* signifikant häufiger aufwiesen als die Trägerstämme, können hieraus möglicherweise Rückschlüsse gezogen werden, dass die speziellen Bedingungen an *S. aureus* Stämme bei der chronischen Atemwegsinfektion bei CF Patienten, wie zum Beispiel der visköse Mukus in den Atemwegen und die veränderte Ionenkomposition des Extrazellulärtraumes, zu einem Selektionsvorteil derjenigen Stämme geführt haben, die eine höhere Prävalenz der Gene *emp*, *sdrD* und *sdrE* besaßen.

Weiterhin bestehen Hinweise darauf, dass die Gene, die für die Adhäsine *emp*, *sdrC*, *sdrD* und *sdrE* kodieren, bedeutende Virulenzfaktoren für die Osteomyelitis oder eine Bakteriämie darstellen.

Das Gene *cna* wiesen die Stämme von Patienten mit Osteomyelitis signifikant häufiger auf als die anderen Stammgruppen. Das Gen *sdrD* war bei fast 80% der OM-Stämme prävalent. Eine gemeinsame Prävalenz der beiden Gene *cna* und *sdrD* war bei den Osteomyelitisstämmen signifikant häufiger als bei den anderen Stammgruppen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass *cna* und *sdrD* bei der Osteomyelitis einen besonderen Virulenzfaktor darstellen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Prävalenz der Gene *sdrC*, *sdrD*, *sdrE* und *emp* häufiger bei Infektions-assoziierten *S. aureus* Stämmen nachgewiesen wurde als bei *S. aureus* Stämmen, die von gesunden Probanden isoliert wurden. Stämme, die diese Gene besaßen, scheinen im Rahmen des Infektionsprozesses selektiert worden zu sein. Dies kann möglicherweise auf eine Funktion dieser vier Gene als Virulenzfaktoren hindeuten.

Durch die Ergebnisse dieser Studie konnte die Bedeutung von Virulenz-assoziierten Adhäsionsproteinen, die bei der chronischen *S. aureus* Kolonisation und/oder Infektion eine Rolle spielen könnten, verdeutlicht werden. Die Identifikation der Virulenzfaktoren von *S. aureus* ist ein wichtiger Schritt, um neue Therapieoptionen zu entwickeln, die es ermöglichen, *S. aureus* Infektionen sowie deren Chronifizierung zu verhindern.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Antunes MB, Cohen NA. Mucociliary clearance - a critical upper airway host defense mechanism and methods of assessment. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7: 5-10, 2007.
2. Athanasopoulos AN, Economopoulou M, Orlova VV, Sobke A, Schneider D, Weber H, Augustin HG, Eming SA, Schubert U, Linn T, Nawroth PP, Hussain M, Hammes HP, Herrmann M, Preissner KT, Chavakis T. The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. *Blood* 107: 2720-7, 2006.
3. Belkin RA, Henig NR, Singer LG, Chaparro C, Rubenstein RC, Xie SX, Yee JY, Kotloff RM, Lipson DA, Bunin GR. Risk factors for death of patients with cystic fibrosis awaiting lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 659-66, 2006.
4. Benhamou D, Carrie AS, Lecomte F. *Staphylococcus aureus*: role and impact in the treatment of nosocomial pneumonia. *Rev Mal Respir* 22: 595-603, 2005.
5. Brennan AL, Geddes DM. Cystic fibrosis. *Curr Opin Infect Dis* 15: 175-82, 2002.
6. Castagliuolo I, Piccinini R, Beggiao E, Palu G, Mengoli C, Ditadi F, Vicenzoni G, Zecconi A. Mucosal genetic immunization against four adhesins protects against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *Vaccine* 24: 4393-402, 2006.
7. Chavakis T, Hussain M, Kanse SM, Peters G, Bretzel RG, Flock JI, Herrmann M, Preissner KT. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med* 8: 687-93, 2002.
8. Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, Herrmann M. *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost* 94: 278-85, 2005.
9. Chmiel JF, Davis PB. State of the art: why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respir Res* 4: 8, 2003.
10. Clarke SR, Foster SJ. Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Adv Microb Physiol* 51: 187-224, 2006.
11. Davies JC. Gene and cell therapy for cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 7 Suppl 1: S163-S165, 2006.
12. Davies JC. New tests for cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 7 Suppl 1: S141-S143, 2006.

13. Domanski PJ, Patel PR, Bayer AS, Zhang L, Hall AE, Syribeys PJ, Gorovits EL, Bryant D, Vernachio JH, Hutchins JT, Patti JM. Characterization of a humanized monoclonal antibody recognizing clumping factor A expressed by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 73: 5229-32, 2005.
14. Downer R, Roche F, Park PW, Mecham RP, Foster TJ. The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. *J Biol Chem* 277: 243-50, 2002.
15. Dziewanowska K, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW, Trumble WR, Bohach GA. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect Immun* 67: 4673-8, 1999.
16. Elasm MO, Thomas JR, Skinner RA, Blevins JS, Beenken KE, Nelson CL, Smeltzer MS. *Staphylococcus aureus* collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis. *Bone* 30: 275-80, 2002.
17. European CF Registry, European Cystic Fibrosis Society (ECFS). Annual Reports for the 2003 data. 2006.
18. Foster TJ. The *Staphylococcus aureus* "superbug". *J Clin Invest* 114: 1693-6, 2004.
19. Foster TJ, Hook M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 6: 484-8, 1998.
20. Fowler T, Wann ER, Joh D, Johansson S, Foster TJ, Hook M. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur J Cell Biol* 79: 672-9, 2000.
21. George NP, Wei Q, Shin PK, Konstantopoulos K, Ross JM. *Staphylococcus aureus* adhesion via Spa, ClfA, and SdrCDE to immobilized platelets demonstrates shear-dependent behavior. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 2394-400, 2006.
22. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 918-51, 2003.
23. Gilligan PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 4: 35-51, 1991.
24. Goerke C, Kraning K, Stern M, Doring G, Botzenhart K, Wolz C. Molecular epidemiology of community-acquired *Staphylococcus aureus* in families with and without cystic fibrosis patients. *J Infect Dis* 181: 984-9, 2000.
25. Goerke C, Papenberg S, Dasbach S, Dietz K, Ziebach R, Kahl BC, Wolz C. Increased frequency of genomic alterations in *Staphylococcus aureus* during chronic infection is in part due to phage mobilization. *J Infect Dis* 189: 724-34, 2004.

26. Gregory RJ, Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Paul S, Hehir K, Ostedgaard L, Klinger KW, Welsh MJ, Smith AE. Expression and characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* 347: 382-6, 1990.
27. Haggar A, Hussain M, Lonnie H, Herrmann M, Norrby-Teglund A, Flock JI. Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect Immun* 71: 2310-7, 2003.
28. Hall AE, Domanski PJ, Patel PR, Vernachio JH, Syribey PJ, Gorovits EL, Johnson MA, Ross JM, Hutchins JT, Patti JM. Characterization of a protective monoclonal antibody recognizing *Staphylococcus aureus* MSCRAMM protein clumping factor A. *Infect Immun* 71: 6864-70, 2003.
29. Hartford OM, Wann ER, Hook M, Foster TJ. Identification of residues in the *Staphylococcus aureus* fibrinogen-binding MSCRAMM clumping factor A (ClfA) that are important for ligand binding. *J Biol Chem* 276: 2466-73, 2001.
30. Heilmann C, Niemann S, Sinha B, Herrmann M, Kehrel BE, Peters G. *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein (FnBP)-mediated adherence to platelets, and aggregation of platelets induced by FnBPA but not by FnBPB. *J Infect Dis* 190: 321-9, 2004.
31. Hienz SA, Schennings T, Heimdahl A, Flock JI. Collagen binding of *Staphylococcus aureus* is a virulence factor in experimental endocarditis. *J Infect Dis* 174: 83-8, 1996.
32. Hirche TO, Smaczny C, Mallinckrodt C, Krüger S, Wagner TOF. Pulmonale Manifestation der Mukoviszidose im Erwachsenenalter. *Deutsches Ärzteblatt Jg. 100 Heft 5*, 264-270. 2003.
33. Hoen B, Alla F, Selton-Suty C, Beguinot I, Bouvet A, Briancon S, Casalta JP, Danchin N, Delahaye F, Etienne J, Le M, V, Lepout C, Mainardi JL, Ruimy R, Vandenesch F. Changing profile of infective endocarditis: results of a 1-year survey in France. *JAMA* 288: 75-81, 2002.
34. Höök M, Foster TJ. Staphylococcal Surface Proteins. Gram-positive pathogens ed. by V.A. Fischetti et al American Society for Microbiology, Washington, DC. 2000.
35. Hussain M, Becker K, Von Eiff C, Peters G, Herrmann M. Analogs of Eap protein are conserved and prevalent in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 1271-6, 2001.
36. Hussain M, Becker K, Von Eiff C, Schrenzel J, Peters G, Herrmann M. Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. *J Bacteriol* 183: 6778-86, 2001.
37. Jonsson K, Signas C, Muller HP, Lindberg M. Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide

- sequence and characterization of the second gene. Eur J Biochem 202: 1041-8, 1991.
38. Josefsson E, Hartford O, O'Brien L, Patti JM, Foster T. Protection against experimental *Staphylococcus aureus* arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant. J Infect Dis 184: 1572-80, 2001.
  39. Josefsson E, McCrea KW, Ni ED, O'Connell D, Cox J, Hook M, Foster TJ. Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene family of *Staphylococcus aureus*. Microbiology 144 ( Pt 12): 3387-95, 1998.
  40. Kahl B, Herrmann M, Everding AS, Koch HG, Becker K, Harms E, Proctor RA, Peters G. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. J Infect Dis 177: 1023-9, 1998.
  41. Kahl BC, Duebbers A, Lubritz G, Haeberle J, Koch HG, Ritzerfeld B, Reilly M, Harms E, Proctor RA, Herrmann M, Peters G. Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. J Clin Microbiol 41: 4424-7, 2003.
  42. Kahl BC, Goulian M, van Wamel W, Herrmann M, Simon SM, Kaplan G, Peters G, Cheung AL. *Staphylococcus aureus* RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line. Infect Immun 68: 5385-92, 2000.
  43. Keane FM, Clarke AW, Foster TJ, Weiss AS. The N-terminal A domain of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A binds to tropoelastin. Biochemistry 46: 7226-32, 2007.
  44. Keane FM, Loughman A, Valtulina V, Brennan M, Speziale P, Foster TJ. Fibrinogen and elastin bind to the same region within the A domain of fibronectin binding protein A, an MSCRAMM of *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol 63: 711-23, 2007.
  45. Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. J Clin Invest 109: 571-7, 2002.
  46. Lee LY, Miyamoto YJ, McIntyre BW, Hook M, McCrea KW, McDevitt D, Brown EL. The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. J Clin Invest 110: 1461-71, 2002.
  47. Leitlinien der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie, AWMF-Leitlinien. Mukoviszidose, Cystische Fibrose. Register Nr. 026/014 . 1998.
  48. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 15: 194-222, 2002.
  49. Mamo W, Jonsson P, Flock JI, Lindberg M, Muller HP, Wadstrom T, Nelson L. Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis: immunological response of mice vaccinated with fibronectin-binding protein (FnBP-A) to challenge with *S. aureus*. Vaccine 12: 988-92, 1994.

50. McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 11: 237-48, 1994.
51. McDevitt D, Nanavaty T, House-Pompeo K, Bell E, Turner N, McIntire L, Foster T, Hook M. Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. *Eur J Biochem* 247: 416-24, 1997.
52. McElroy MC, Cain DJ, Tyrrell C, Foster TJ, Haslett C. Increased virulence of a fibronectin-binding protein mutant of *Staphylococcus aureus* in a rat model of pneumonia. *Infect Immun* 70: 3865-73, 2002.
53. Miajlovic H, Loughman A, Brennan M, Cox D, Foster TJ. Both complement- and fibrinogen-dependent mechanisms contribute to platelet aggregation mediated by *Staphylococcus aureus* clumping factor B. *Infect Immun* 75: 3335-43, 2007.
54. Mishra A, Greaves R, Massie J. The Limitations of Sweat Electrolyte Reference Intervals for the Diagnosis of Cystic Fibrosis: A Systematic Review. *Clin Biochem Rev* 28: 60-76, 2007.
55. Mongodin E, Bajolet O, Cutrona J, Bonnet N, Dupuit F, Puchelle E, de Bentzmann S. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium. *Infect Immun* 70: 620-30, 2002.
56. Moraes TJ, Plumb J, Martin R, Vachon E, Cherepanov V, Koh A, Loeve C, Jongstra-Bilen J, Zurawska JH, Kus JV, Burrows LL, Grinstein S, Downey GP. Abnormalities in the pulmonary innate immune system in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 364-74, 2006.
57. Moreillon P, Entenza JM, Francioli P, McDevitt D, Foster TJ, Francois P, Vaudaux P. Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect Immun* 63: 4738-43, 1995.
58. Moskwa P, Lorentzen D, Excoffon KJ, Zabner J, McCray PB, Jr., Nauseef WM, Dupuy C, Banfi B. A novel host defense system of airways is defective in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 175: 174-83, 2007.
59. Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 174-229, 1999.
60. Ni ED, Perkins S, Francois P, Vaudaux P, Hook M, Foster TJ. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 30: 245-57, 1998.
61. Nilsson IM, Patti JM, Bremell T, Hook M, Tarkowski A. Vaccination with a recombinant fragment of collagen adhesin provides protection against *Staphylococcus aureus*-mediated septic death. *J Clin Invest* 101: 2640-9, 1998.
62. O'Brien L, Kerrigan SW, Kaw G, Hogan M, Penades J, Litt D, Fitzgerald DJ, Foster TJ, Cox D. Multiple mechanisms for the activation of human platelet

- aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. *Mol Microbiol* 44: 1033-44, 2002.
63. O'Brien LM, Walsh EJ, Massey RC, Peacock SJ, Foster TJ. *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. *Cell Microbiol* 4: 759-70, 2002.
  64. Palma M, Haggar A, Flock JI. Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J Bacteriol* 181: 2840-5, 1999.
  65. Palmqvist N, Foster T, Fitzgerald JR, Josefsson E, Tarkowski A. Fibronectin-binding proteins and fibrinogen-binding clumping factors play distinct roles in staphylococcal arthritis and systemic inflammation. *J Infect Dis* 191: 791-8, 2005.
  66. Patti JM. A humanized monoclonal antibody targeting *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* 22 Suppl 1: S39-S43, 2004.
  67. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 48: 585-617, 1994.
  68. Patti JM, House-Pompeo K, Boles JO, Garza N, Gurusiddappa S, Hook M. Critical residues in the ligand-binding site of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding adhesin (MSCRAMM). *J Biol Chem* 270: 12005-11, 1995.
  69. Patti JM, Jonsson H, Guss B, Switalski LM, Wiberg K, Lindberg M, Hook M. Molecular characterization and expression of a gene encoding a *Staphylococcus aureus* collagen adhesin. *J Biol Chem* 267: 4766-72, 1992.
  70. Peacock SJ, Day NP, Thomas MG, Berendt AR, Foster TJ. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in *fnb* genes and adhesion to human fibronectin. *J Infect* 41: 23-31, 2000.
  71. Peacock SJ, de S, I, Lowy FD. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends Microbiol* 9: 605-10, 2001.
  72. Peacock SJ, Foster TJ, Cameron BJ, Berendt AR. Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiology* 145 ( Pt 12): 3477-86, 1999.
  73. Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, O'Neill G, Day NP. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 70: 4987-96, 2002.
  74. Perkins S, Walsh EJ, Deivanayagam CC, Narayana SV, Foster TJ, Hook M. Structural organization of the fibrinogen-binding region of the clumping factor B MSCRAMM of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 276: 44721-8, 2001.
  75. Que YA, Haefliger JA, Piroth L, Francois P, Widmer E, Entenza JM, Sinha B, Herrmann M, Francioli P, Vaudaux P, Moreillon P. Fibrinogen and fibronectin

- binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. *J Exp Med* 201: 1627-35, 2005.
76. Renders NH, van Belkum A, Overbeek SE, Mouton JW, Verbrugh HA. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains colonizing the lungs of related and unrelated cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* 3: 216-21, 1997.
  77. Rich RL, Demeler B, Ashby K, Deivanayagam CC, Petrich JW, Patti JM, Narayana SV, Hook M. Domain structure of the *Staphylococcus aureus* collagen adhesin. *Biochemistry* 37: 15423-33, 1998.
  78. Rivas JM, Speziale P, Patti JM, Hook M. MSCRAMM--targeted vaccines and immunotherapy for staphylococcal infection. *Curr Opin Drug Discov Devel* 7: 223-7, 2004.
  79. Roche FM, Downer R, Keane F, Speziale P, Park PW, Foster TJ. The N-terminal A domain of fibronectin-binding proteins A and B promotes adhesion of *Staphylococcus aureus* to elastin. *J Biol Chem* 279: 38433-40, 2004.
  80. Sabat A, Melles DC, Martirosian G, Grundmann H, van Belkum A, Hryniewicz W. Distribution of the serine-aspartate repeat protein-encoding sdr genes among nasal carriage and invasive *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 44: 1135-8, 2006.
  81. Saiman L. Microbiology of early CF lung disease. *Paediatr Respir Rev* 5 Suppl A: S367-S369, 2004.
  82. Schaffer AC, Solinga RM, Cocchiari J, Portoles M, Kiser KB, Risley A, Randall SM, Valtulina V, Speziale P, Walsh E, Foster T, Lee JC. Immunization with *Staphylococcus aureus* clumping factor B, a major determinant in nasal carriage, reduces nasal colonization in a murine model. *Infect Immun* 74: 2145-53, 2006.
  83. Schennings T, Heimdahl A, Coster K, Flock JI. Immunization with fibronectin binding protein from *Staphylococcus aureus* protects against experimental endocarditis in rats. *Microb Pathog* 15: 227-36, 1993.
  84. Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 79: S23-S45, 1999.
  85. Siboo IR, Cheung AL, Bayer AS, Sullam PM. Clumping factor A mediates binding of *Staphylococcus aureus* to human platelets. *Infect Immun* 69: 3120-7, 2001.
  86. Signas C, Raucci G, Jonsson K, Lindgren PE, Anantharamaiah GM, Hook M, Lindberg M. Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*: use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 699-703, 1989.
  87. Sinha B, Francois P, Que YA, Hussain M, Heilmann C, Moreillon P, Lew D, Krause KH, Peters G, Herrmann M. Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect Immun* 68: 6871-8, 2000.

88. Sinha B, Francois PP, Nusse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Herrmann M, Krause KH. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cell Microbiol* 1: 101-17, 1999.
89. Sinha B, Herrmann M. Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by *Staphylococcus aureus*. *Thromb Haemost* 94: 266-77, 2005.
90. Smeltzer MS, Gillaspay AF. Molecular pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Poult Sci* 79: 1042-9, 2000.
91. Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 85: 229-36, 1996.
92. Sobke AC, Selimovic D, Orlova V, Hassan M, Chavakis T, Athanasopoulos AN, Schubert U, Hussain M, Thiel G, Preissner KT, Herrmann M. The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* abrogates angiogenic responses of endothelial cells by blocking Ras activation. *FASEB J* 20: 2621-3, 2006.
93. Switalski LM, Patti JM, Butcher W, Gristina AG, Speziale P, Hook M. A collagen receptor on *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesion to cartilage. *Mol Microbiol* 7: 99-107, 1993.
94. Therrien R, Lacasse P, Grondin G, Talbot BG. Lack of protection of mice against *Staphylococcus aureus* despite a significant immune response to immunization with a DNA vaccine encoding collagen-binding protein. *Vaccine* 2007.
95. Trad S, Allignet J, Frangeul L, Davi M, Vergassola M, Couve E, Morvan A, Kechrid A, Buchrieser C, Glaser P, El Solh N. DNA microarray for identification and typing of *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 42: 2054-64, 2004.
96. van Leeuwen WB, Melles DC, Alaidan A, Al Ahdal M, Boelens HA, Snijders SV, Wertheim H, van Duijkeren E, Peeters JK, van der Spek PJ, Gorkink R, Simons G, Verbrugh HA, van Belkum A. Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 187: 4584-91, 2005.
97. Vancraeynest D, Hermans K, Haesebrouck F. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. *Vet Microbiol* 103: 241-7, 2004.
98. Vernachio J, Bayer AS, Le T, Chai YL, Prater B, Schneider A, Ames B, Syribeys P, Robbins J, Patti JM. Anti-clumping factor A immunoglobulin reduces the duration of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in an experimental model of infective endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3400-6, 2003.
99. Visai L, Xu Y, Casolini F, Rindi S, Hook M, Speziale P. Monoclonal antibodies to CNA, a collagen-binding microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, detach *Staphylococcus aureus* from a collagen substrate. *J Biol Chem* 275: 39837-45, 2000.

100. Von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. N Engl J Med 344: 11-6, 2001.
101. Waldvogel FA. *Staphylococcus aureus*. In "Principles and Practice of Infectious Diseases", 4<sup>th</sup> edition. 1754-1777. 1995.
102. Wann ER, Gurusiddappa S, Hook M. The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. J Biol Chem 275: 13863-71, 2000.
103. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis 5: 751-62, 2005.
104. Xu Y, Rivas JM, Brown EL, Liang X, Hook M. Virulence potential of the staphylococcal adhesin CNA in experimental arthritis is determined by its affinity for collagen. J Infect Dis 189: 2323-33, 2004.
105. Zhou H, Xiong ZY, Li HP, Zheng YL, Jiang YQ. An immunogenicity study of a newly fusion protein Cna-FnBP vaccinated against *Staphylococcus aureus* infections in a mice model. Vaccine 24: 4830-7, 2006.
106. Zong Y, Xu Y, Liang X, Keene DR, Hook A, Gurusiddappa S, Hook M, Narayana SV. A 'Collagen Hug' model for *Staphylococcus aureus* CNA binding to collagen. EMBO J 24: 4224-36, 2005.

# Anhang

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

µl	Mikroliter
A	Ampère
BK	Blutkulturstämmen
bp	base pairs
bzw	beziehungsweise
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
<i>clfA</i>	Clumping factor A
<i>clfB</i>	Clumping factor B
<i>cna</i>	collagen adhesin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>Eap</i>	extracellular adherence protein
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
<i>emp</i>	extracellular matrix protein binding protein
et al.	et alteri
<i>fnbA</i>	fibronectin binding protein A
<i>fnbB</i>	fibronectin binding protein B
GEBS	20% Glycerin, 50mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 0,5% Sarkosyl
H <sub>2</sub> O	aqua destillata
incl	inklusive
kb	Kilobase
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
LPXTG	Leucin-Prolin-x-Threonin-Glycin
M	Mol
Map	MHC class II analogous protein
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mmol/l	Millimol pro Liter
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule
n	numerus
N	Nasenstämmen
OM	Osteomyelitis
PCL	Periciliary liquid layer
PCR	Polymerase chain reaction
Rpm	rounds per minute

<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>sdrC</i>	Serine-Aspartate-repeat containing protein C
<i>sdrD</i>	Serine-Aspartate-repeat containing protein D
<i>sdrE</i>	Serine-Aspartate-repeat containing protein E
sek	Sekunde
TAE	Tris-Actat-EDTA- Puffer
TE	Tris- EDTA Puffer
Tris- HCL	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid
V	Volt



