

Optimierung muriner *S. aureus*-Infektionsmodelle
durch die Verwendung von mausadaptierten
S. aureus-Isolaten

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Greifswald

vorgelegt von

Patricia Trübe

Greifswald, Mai 2020

Dekan: Prof. Dr. Gerald Kerth.....

1. Gutachter : Prof. Dr. Barbara Bröker.....

2. Gutachter: Prof. Dr. Eva Medina.....

Tag der Promotion: 12.10.2020.....

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Kapitel 1 Einleitung	1
1.1 Die mukosale Immunantwort.....	1
1.1.1 Allgemeiner Aufbau des mukosalen Immunsystems	1
1.1.2 <i>Innate Lymphoid Cells</i> und $\gamma\delta$ -T-Zellen.....	2
1.1.3 Die adaptive Immunantwort	3
1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	5
1.3 Die Interaktion zwischen Immunsystem und <i>S. aureus</i> bei Infektionen	7
1.3.1 Die Interaktion zwischen dem innaten Immunsystem und <i>S. aureus</i> bei Infektionen....	7
1.3.2 Die Interaktion zwischen dem adaptiven Immunsystem und <i>S. aureus</i> bei Infektionen	8
1.3.3 Wirts- <i>S. aureus</i> -Interaktion bei der nasalen Besiedlung	10
1.4 Wirtsanpassung von <i>S. aureus</i>	13
1.4.1 Wirtsspezifität von <i>S. aureus</i>	13
1.4.2 Mäuse als Tiermodell für die <i>S. aureus</i> -Forschung	14
1.5 Ziele der Arbeit	16
Kapitel 2 Material.....	17
2.1 Laborgeräte	17
2.2 Verbrauchsmaterialien	19
2.3 Chemikalien und Reagenzien	20
2.4 Medien, Puffer und Lösungen	22
2.5 Versuchstiere.....	24
2.6 Bakterienstämme	24
2.7 Primer	25
2.8 Antikörper	25
2.9 Kits	26
2.10 Software und Datenbanken	26
Kapitel 3 Methoden	27
3.1 Mikro- und Molekularbiologische Methoden	27

Inhaltsverzeichnis

3.1.1	Anlegen von Glycerolstocks.....	27
3.1.2	Anlegen von Infektionsstocks.....	27
3.1.3	Herstellen der Infektionsdosis.....	27
3.1.4	Kultivierung von Bakterien	28
3.1.5	Nachweis der Hämolyseproduktion auf Schafblutagarplatten	28
3.1.6	Transduktion.....	28
3.1.7	Polymerasekettenreaktion zum Nachweis der Erythromycinresistenz	29
3.1.8	Polymerasekettenreaktion zum Nachweis von <i>S. aureus</i>	30
3.1.9	Agarosegelelektrophorese	31
3.2	Tierexperimentelle Methoden	31
3.2.1	Haltung	31
3.2.2	Ethikantrag	32
3.2.3	Bakteriämie	32
3.2.4	Pneumonie	32
3.2.5	Besiedlung	33
3.3	Zellbiologische Methoden.....	36
3.3.1	Isolation von Zellen aus den zervikalen Lymphknoten	36
3.3.2	Bestimmung der bakteriellen Last.....	36
3.3.3	Koagulationsassay	37
3.3.4	<i>Whole Blood Survival Assay</i>	37
3.3.5	<i>Whole Genome Sequencing</i>	38
3.4	Durchflusszytometrische Analysen	38
3.4.1	Bestimmung der Zellzahl mittels TruCount™ Beads	38
3.4.2	Nachweis von Zytokinen im Cytometric Bead Array (CBA)	38
3.4.3	Nachweis intrazellulärer Zytokine	39
3.5	Proteinbiochemische Methoden.....	40
3.5.1	Fällung extrazellulärer Proteine	40
3.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	41
3.5.3	ELISA	42
3.6	Statistische Auswertung.....	42
Kapitel 4	Ergebnisse	43
4.1	<i>In vitro</i> Vorversuche zur Auswahl von murinen <i>S. aureus</i> -Stämmen für Infektionsversuche im Mausmodell.....	43
4.2	Die mausadaptierten <i>S. aureus</i> -Stämme unterscheiden sich deutlich in ihrer Virulenz im Pneumoniemodell	46
4.3	Die mausadaptierten <i>S. aureus</i> -Stämme unterscheiden sich deutlich in ihrer Virulenz im Bakteriämiemodell	48

4.4	Das <i>S. aureus</i> -Isolat DIP (CC49) verhält sich hochvirulent im murinen Pneumoniemodell ..	50
4.5	Das <i>S. aureus</i> -Isolat DIP (CC49) verhält sich hochvirulent im murinen Bakteriämiemodell .	53
4.6	<i>S. aureus</i> DIP kodiert die Gene für das porenformende Toxin LukMF'	56
4.7	Charakterisierung der Immunantwort im murinen Besiedlungsmodell	59
4.7.1	Murine <i>S. aureus</i> -Stämme können Mäuse besser besiedeln als das humane Isolat <i>S. aureus</i> Newman.....	59
4.7.2	Bei Besiedlung mit <i>S. aureus</i> DIP produzieren sowohl CD4 ⁺ -T Zellen als auch γδ-T-Zellen IL-17	62
4.7.3	Die Besiedlung mit <i>S. aureus</i> induziert nach 7 Tagen keine sIgA-Antikörperantwort ..	67
Kapitel 5	Diskussion	69
5.1	Vorsage des <i>in vivo</i> -Verhaltens von <i>S. aureus</i> anhand von <i>in vitro</i> -Experimenten.....	69
5.2	Sind mausadaptierte <i>S. aureus</i> -Stämme zur Optimierung muriner Besiedlungs- und Infektionsmodelle geeignet?	73
5.3	Sind Mäuse ein geeignetes Modell für <i>S. aureus</i> Besiedlungs- und Infektionsversuche?	74
5.4	<i>S. aureus</i> DIP – vielversprechendes Isolat aus der Rötelmaus	78
5.5	Die Besiedlung mit <i>S. aureus</i> induziert nur eine sehr milde lokale Immunantwort	80
5.6	Ausblick.....	84
Kapitel 6	Zusammenfassung	86
Kapitel 7	Anhang	88
Kapitel 8	Literaturverzeichnis	95
Kapitel 9	Tabellenverzeichnis	120
Kapitel 10	Abbildungsverzeichnis	121
Kapitel 11	Publikationen	123
Kapitel 12	Danksagung.....	124

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
$\times g$	Vielfaches der Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ M/s}^2$)
°	Well
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser (<i>Aqua bidestillata</i>)
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMP	antimikrobielle Peptide
BALT	Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe
BCR	B-Zell-Rezeptor (<i>B cell receptor</i>)
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BW	Baden-Württemberg
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CC	klonaler Komplex (<i>clonal complex</i>)
CD	Differenzierungsantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
CFU	Koloniebildende Einheit (<i>Colony forming Unit</i>)
CHIP	Chemotaxis-inhibierendes Protein
ClfB	<i>Clumpingfactor B</i>
cm	Zentimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag (<i>day</i>)
d.h.	das heißt
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat

Abkürzung	Bedeutung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Efb	extrazelluläres Fibrinogen-bindendes Protein
ELISA	Enzyme-linked Immuno Assay
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
Fc	<i>crystallisable fragment</i>
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm
G	Gauge
GALT	Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (<i>gut-associated lymphoid tissue</i>).
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
h	Stunde(n) (lat. <i>Hora</i>)
H₂SO₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
H1a	α-Hämolyisin
H1b	β-Hämolyisin
H1d	Δ-Hämolyisin
<i>i.n.</i>	<i>intranasal</i>
<i>i.p.</i>	<i>intraperitoneal</i>
<i>i.v.</i>	<i>intravenös</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILC	angeborene lymphoide Zellen (<i>innate lymphoid cells</i>)
IsdA/B	<i>Iron-regulated surface determinant protein A/B</i>
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
kHz	Kilohertz
KO	<i>knock-out</i>
L	Liter
LK	Lymphknoten
LukF'	Leukozidin F'-Untereinheit

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
LukM	Leukozidin M-Untereinheit
M	Molar (g/L)
m²	Quadratmeter
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MAMP	Mikroorganismen-assoziierte molekulare Muster (<i>microbe associated molecular patterns</i>)
Mb	Megabasenpaare
MGE	mobiles genetisches Element
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
mL	Milliliter
MLST	<i>multi-locus sequence typing</i>
mm	Millimeter
mM	Millimol
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MV	Mecklenburg-Vorpommern
M-Zellen	Mikrofalten-Zellen
n	Anzahl
N	Normale
NaCl	Natriumchlorid
NALT	Nasen-assoziiertes lymphatisches Gewebe
NET	<i>neutrophil extracellular traps</i>
NLR	NOD-like Rezeptor
nm	Nanometer
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NWM	Newman
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
POD	Meerrettichperoxidase
PRR	Pathogen-Erkennungsrezeptoren (<i>pattern recognition receptor</i>)
PVL	Panton-Valentine-Leukozidin

Abkürzung	Bedeutung
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SA	Streptavidin
SAG	Superantigen
Saint	<i>Staphylococcus aureus</i> Integrase
SAK	Staphylokinase
SasD/G/X	<i>Surface Protein D/G/X</i>
Sbi	<i>second binding protein of immunoglobulin</i>
SCIN	Staphokokken-Komplementinhibitor
SdrD	<i>Serine aspartate repeat containing protein D</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfate</i>)
slgA	sekretorisches Immunglobulin A
SOPF	<i>specified and opportunistic pathogen free</i>
Spa	Staphylokokken Protein A
SREC-1	<i>scavenger receptor expressed by endothelial cell-1</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
SSSS	<i>staphylococcal scalded skin syndrome</i>
ST	Sequenztyp
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TCR	T-Zellrezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
TSLP	thymusstromales Lymphopoetin (<i>thymic stromal lymphoprotein</i>)
UV	Ultraviolett
vWbp	von-Willebrand-Faktor-Bindeprotein
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
WT	Wildtyp

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
WTA	Zellwandteichonsäure (<i>wall teichoic acid</i>)
z.B.	zum Beispiel
Δ	Deletion
φ	Phage

Gen-Abkürzung	Kodiert für
<i>agr</i>	akzessorischer Genregulator (<i>accessory gene regulator</i>)
<i>chp</i>	Chemotaxis-inhibierendes Protein (CHIP)
<i>coa</i>	Koagulase
<i>eta</i>	Exfoliativtoxine A (ETA)
<i>etd</i>	Exfoliativtoxine D (ETD)
<i>fnbA</i>	Fibronectin-bindendes Protein A
<i>fnbB</i>	Fibronectin-bindendes Protein B
<i>gyr</i>	Gyrase
<i>hla</i>	α-Hämolyisin
<i>hlb</i>	β-Hämolyisin
<i>hld</i>	Δ-Hämolyisin
<i>lukF-PV(P83)</i>	Leukozidin F'-Untereinheit
<i>lukM</i>	Leukozidin M-Untereinheit
<i>mecA</i>	Penicillin-bindendes Protein
<i>mecC</i>	alternatives Penicillin-bindendes Protein
<i>nuc</i>	Nuklease
<i>sak</i>	Staphylokinase (SAK)
<i>scn</i>	Staphokokken-Komplementinhibitor (SCIN)
<i>spa</i>	Staphylokokken Protein A

Kapitel 1 Einleitung

1.1 Die mukosale Immunantwort

1.1.1 Allgemeiner Aufbau des mukosalen Immunsystems

Die Schleimhautoberflächen im menschlichen Körper entsprechen in etwa einer Fläche von 400 m² und bilden somit die größte Fläche, die mit der Außenwelt in Kontakt steht. Sie trennen die äußere Umgebung von der inneren und stellen dadurch eine physikalische Barriere, aber auch die erste Verteidigungslinie dar. Die meisten Antigene, die im Laufe des Lebens auf das Immunsystem treffen, dringen durch die Schleimhautoberflächen des Respirations-, Intestinal- oder Urogenitaltrakts in den Körper ein. Die Aufgabe der Schleimhäute ist es harmlose Antigene aus Lebensmitteln, der Luft sowie kommensalen Darmbakterien zu tolerieren, aber dennoch pathogene Mikroorganismen zu erkennen und zu eliminieren [1,2].

Alle Schleimhäute haben eine grundlegende anatomische Organisation. Sie besitzen eine Epithelschicht, die durch die Bildung von *tight junctions* zwischen benachbarten Epithelzellen als physikalische Barriere das Eindringen von Mikroorganismen verhindert. Diese ist überzogen von einer dicken Schleimschicht, die die meisten Organismen im Lumen vom Epithel fernhält. Epithelzellen produzieren antimikrobielle Peptide (AMPs) wie Defensine, Cathelicidine oder Calprotectin, welche Pathogene bereits im Lumen abtöten oder deren Eintritt in das Epithel reduzieren [2–4]. Zudem exprimieren Epithelzellen ein breites Spektrum an Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR), wie Toll-like Rezeptoren (TLRs) und intrazelluläre NOD- (*nucleotide-binding oligomerization domain*)-like Rezeptoren (NLRs), die konservierte Strukturen auf der Oberfläche von Mikroorganismen, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster, erkennen [1–4]. Die Oligomerisierung von TLRs und NLRs führt zur Aktivierung der Epithelzellen, wodurch die Expression proinflammatorischer Zytokine, Chemokine sowie AMPs induziert wird und Immunzellen rekrutiert werden. Zudem können durch die Oligomerisierung von NLRs Inflammasomen aktiviert werden, wodurch die Produktion von Interleukin (IL)-1 und IL-18 induziert wird. Dadurch wird die Integrität der Epithelzellbarriere gefördert und das Eindringen von Mikroorganismen verhindert [1–3,5].

Unter der Epithelschicht liegt das Bindegewebe (*lamina propria*), welches das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (MALT) enthält. Jede Schleimhaut besitzt ein spezielles lymphatisches Gewebe. So gibt es im Respirationstrakt zum Beispiel das Nasen-assoziierte lymphatische Gewebe (*nasal-associated lymphoid tissue*, NALT) oder im Darm das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT). In der Lunge gibt es das Bronchus-assoziierte lymphatische Gewebe

(*bronchus-associated lymphoid tissue*, BALT), welches in Menschen und Mäusen jedoch nur nach Infektion erscheint und deshalb als induzierbares BALT bezeichnet wird [2,6].

Das MALT besteht aus lymphoiden Follikeln, welche B-Zellen enthalten, die von intrafollikulären T-Zell-Arealen mit Dendritischen Zellen (DCs) und hochendothelialen Venolen umgeben sind. Darüber befindet sich das Follikel-assoziierte Epithel, welches Epithelzellen und zum Teil auch M-(Mikrofalten)-Zellen enthält. M-Zellen kommen nur im Dünndarm und den Tonsillen vor. Sie produzieren keinen Schleim und sind nicht von einer Glykokalix überzogen. Sie phagozytieren oder endozytieren antigenes Material, transportieren es in Vesikeln und setzen es an der basolateralen Seite frei, wo es von DCs aufgenommen wird und anschließend den T-Zellen im MALT präsentiert wird, was schließlich zur Aktivierung antigenspezifischer B-Zellen führt [1,2,5,7,8].

1.1.2 Innate Lymphoid Cells und $\gamma\delta$ -T-Zellen

Innate Lymphoid Cells (ILCs) sind eine Untergruppe von Lymphozyten, die in peripheren Geweben zu finden sind und an Barriereoberflächen besonders häufig vorkommen [9]. Sie tragen wesentlich zur mukosalen Immunantwort bei. ILCs ähneln in ihrer Morphologie und ihrer Funktion T-Zellen, sie besitzen jedoch keinen T-Zell-Rezeptor (TCR). Sie werden nicht durch Antigenstimulation, sondern durch andere Zytokine, die von geweberesidenten Zellen produziert werden, zur Zytokinproduktion aktiviert [10]. Anhand ihres Zytokinprofils und ihrer Transkriptionsfaktoren wurden ILCs ursprünglich in drei Gruppen eingeteilt [11–13]. Neuste Erkenntnisse berücksichtigen zudem die unterschiedliche Entwicklung der Zellen, weshalb NK-Zellen und LTi (*Lymphoid Tissue inducer*)-Zellen nun auch als eigenständige Gruppen gelistet werden [10,14] (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Übersicht über die verschiedenen Gruppen von *Innate Lymphoid Cells* (ILCs)

ILC	Bedeutung	Stimulation	Transkriptionsfaktor	Leitzytokin
NK-Zellen	Zytotoxizität, Tumoren	IL-12, IL-18	t-bet	IFN- γ , TNF- α
ILC 1	Abwehr intrazellulärer Erreger	IL-12, IL-18	t-bet	IFN- γ , TNF- α
ILC 2	Abwehr von Helminthen	IL-25, IL-33, TSLP	GATA3, RoR α	IL-5, IL-13
ILC 3	Abwehr extrazellulärer Erreger	IL-1 β , IL-23	ROR γ t	IL-17, IL-22
LTi	Entwicklung sekundärer lymphatischer Organe	IL-23	ROR γ t	IL-17, IL-22

ILC1-Zellen sind wichtig zur Abwehr intrazellulärer Erreger. NK-Zellen sind cytotoxische Zellen, die virusinfizierte Zellen sowie Tumorzellen töten. Sowohl NK- als auch ILC1-Zellen sezernieren Interferon (IFN) γ und Tumornekrosefaktor (TNF) α als Reaktion auf IL-12 und IL-18, wodurch Makrophagen aktiviert werden [10].

ILC2-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr von Helminthen. Sie sezernieren in Reaktion auf thymusstromales Lymphopoetin (TSLP), IL-33 und IL-25 vor allem IL-5 und IL-13. IL-5

aktiviert Eosinophile, welche Enzyme sezernieren, die das äußere Integument von Helminthen abbauen. IL-13 wiederum erhöht die Schleimproduktion und die Kontraktion der Muskulatur und trägt so zum Ausschluss der Würmer bei [13,15,16].

ILC3-Zellen befinden sich vor allem im Darm. Als Reaktion auf das Alarmin IL-1 β und IL-23 sezernieren sie ILC3-Zellen IL-17 und IL-22. Beide Zytokine stimulieren die Produktion von Defensinen und steigern die Funktion der *tight junctions* des Epithels, wodurch die Barrierefunktion verbessert wird. Zudem stimuliert IL-17 die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (G-CSF, GM-CSF) und Chemokinen, wodurch die Rekrutierung von Monozyten und Neutrophilen induziert wird [5,12,13,16,17]. LTi-Zellen spielen eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung sekundärer lymphatischer Organe [14].

Zusätzlich zu diesen konventionellen angeborenen Zellen spielen auch $\gamma\delta$ -T-Zellen, die zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem eingeordnet werden, eine bedeutende Rolle bei der mukosalen Immunantwort [18]. Sie stellen lediglich einen kleinen Anteil der Gesamt-T-Zell-Population dar (1-5 %), machen jedoch im mukosalen Gewebe bis zu 50 % der intraepithelialen T-Zellen aus. Sie produzieren unter anderem IL-17 und IL-22, wodurch die Produktion von AMPs durch Epithelzellen induziert wird und Neutrophile, DCs und Makrophagen rekrutiert werden. Zudem wird die Integrität der Epithelbarriere erhöht [5,19,20].

1.1.3 Die adaptive Immunantwort

Wie ILCs so lassen sich auch CD4⁺-T Zellen anhand ihrer Transkriptionsfaktoren und ihrer Leitzytokine in mehrere Subpopulationen unterteilen. Ebenso wie ILC1-Zellen dienen auch Th1-Zellen der Abwehr intrazellulärer Pathogene. Sie exprimieren den Transkriptionsfaktor T-bet und werden durch IL-12 und IFN- γ aktiviert. Th1-Zellen produzieren IFN- γ , welches die Rekrutierung von Neutrophilen induziert, Makrophagen aktiviert und die Aktivierung und Differenzierung von Th17- sowie Th2-Zellen hemmt. [5,21,22].

Th2-Zellen spielen, wie auch ILC2-Zellen, eine wesentliche Rolle bei der Immunabwehr von Helminthen. Th2-Zellen werden durch IL-4 induziert und exprimieren die Transkriptionsfaktoren GATA3 und STAT6. Sie sezernieren die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13. Diese fördern die Schleimproduktion, die Mikroorganismen das Eindringen ins Lumen erschwert und die Kontraktion der Muskulatur, wodurch Würmer ausgeschieden werden. Zudem werden Eosinophile aktiviert und Mastzellen und Basophilen werden rekrutiert. Durch die Produktion von IL-4 wird die Differenzierung von Th1- und Th17-Zellen inhibiert [5,23,24]. Darüber hinaus spielen Th2-Zellen eine Rolle bei der Pathogenese von Asthma [25].

Bei der mukosalen Immunantwort spielen vor allem Th17-Zellen eine wichtige Rolle bei der Abwehr extrazellulärer Mikroorganismen. Wie ILC3-Zellen exprimieren auch Th17-Zellen den Transkriptionsfaktor ROR γ t und sezernieren nach Stimulation mit IL-6 und *Transforming Growth Factor* (TGF) - β die Zytokine IL-17 und IL-22, wodurch Neutrophile rekrutiert werden und die Produktion von AMPs induziert wird [26].

Eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Immunantwort spielen regulatorische T-Zellen (Treg). Sie kommen im MALT wesentlich häufiger vor als in anderen lymphatischen Organen, da es vor allem auf Schleimhäuten wichtig ist die Toleranz gegenüber Fremdanitigenen, wie z.B. Nahrungsmittelantigenen oder Pollen aufrechtzuerhalten. Treg exprimieren den Transkriptionsfaktor FoxP3 und sezernieren nach Stimulation mit TGF- β die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β , welche die Immunantwort supprimieren. Dadurch werden die Differenzierung und Proliferation von Th1- und Th2-Zellen gehemmt. Zudem stimuliert TGF- β die Produktion von IgA, welches eine zentrale Rolle bei der mukosalen Immunantwort einnimmt [27,28].

IgA wird von Plasmazellen in der *Lamina propria* produziert. Obwohl die Serumkonzentration von IgA sehr gering ist, stellt es die vorherrschende Antikörperklasse im Körper dar, da es das dominierende Immunglobulin auf den Schleimhäuten der Atemwege, des Verdauungs- und des Genitaltrakts, im Speichel und Tränen sowie in der Muttermilch darstellt [29]. Spezialisierte Plasmazellen sezernieren dimeres IgA, welches durch eine J-*(joining)* Kette zusammengehalten wird. Diese ermöglicht die Bindung an spezifische Poly-Ig-Rezeptoren auf der basolateralen Seite und den Transport zur apikalen Seite der Epithelzellen (Transzytose). Auf der apikalen Seite wird der Poly-Ig-Rezeptor proteolytisch gespalten. Ein Teil des Rezeptors, die sogenannte sekretorische Komponente, bleibt jedoch an IgA gebunden. Im Lumen wird es nun als sekretorisches IgA (sIgA) bezeichnet [2,5,30]. Die wichtigste Aufgabe des sIgA ist die Neutralisation von Bakterien und Toxinen, d. h., dass durch Bindung von sIgA an Mikroorganismen und Toxine deren Bindung an die Wirtszellen verhindert wird. Des Weiteren können Glykane der sekretorischen Komponente von IgA an Bakterien binden und dadurch ihre Mobilität reduzieren, wodurch sie nicht mehr zur Epithelbarriere gelangen [2,31,32].

1.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ist ein grampositives kokkenförmiges Bakterium, welches als Pathobiont sowohl Menschen als auch Tiere besiedelt [33,34]. Es besiedelt vorrangig die Haut und Schleimhäute des Nasen- und Rachenraumes, aber auch Achselhöhlen und den Genitalbereich [33,35–37]. Bis zu 30 % der Bevölkerung sind persistent besiedelt. [38].

Nach wie vor ist *S. aureus* ein bedeutendes Pathogen, welches für eine Vielzahl von Erkrankungen verantwortlich ist. Das Spektrum reicht von leichten Hautinfektionen wie subkutanen Abszessen und Furunkulose bis hin zu lebensbedrohlichen Erkrankungen wie Sepsis, Endokarditis oder Pneumonie [34,39]. Darüber hinaus produzieren einige *S. aureus*-Stämme bestimmte Toxine, welche Toxinvermittelte Erkrankungen wie das toxische Schocksyndrom, die Enterotoxin-vermittelte akute Lebensmittelvergiftung (Gastroenteritis) oder das *staphylococcal scalded skin syndrome* (SSSS) induzieren [33,34,36].

S. aureus ist einer der häufigsten Erreger nosokomialer Infektionen und die häufigste Ursache von postoperativen Wundinfektionen [33,36,40]. Die Besiedlung mit *S. aureus* spielt eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von *S. aureus*-Infektionen, besonders während Krankenhausaufenthalten. Carrier haben ein dreimal höheres Risiko eine Infektion mit *S. aureus* zu erleiden im Vergleich zu Non-Carriern [36,41,42]. In den meisten Fällen ist der isolierte *S. aureus*-Stamm identisch mit dem besiedelnden Stamm [42,43]. Trotz des erhöhten Risikos haben Carrier jedoch bessere Überlebenschancen [43,44].

Die hohe Prävalenz antibiotikaresistenter *S. aureus* erschwert die Behandlung. Etwa 60 % aller *S. aureus*-Stämme produzieren β -Laktamase, welche β -Lactam-Antibiotika der 1. Generation, wie Penicillin, Ampicillin und Amoxicillin, inaktiviert [40,45]. Aus diesem Grund wurden β -Laktamase-resistente Antibiotika, wie beispielsweise Methicillin, entwickelt. Jedoch erwarb *S. aureus* auch hiergegen Resistenzen, indem es ein modifiziertes Penicillinbindeprotein produziert, welches durch das *mecA*-Gen kodiert wird. In Deutschland sind mittlerweile 0,34 % der kolonisierenden *S. aureus*-Isolate der Normalbevölkerung sowie 20 % aller Krankenhausisolate resistent [46,47]. Häufig erwerben diese Methicillin-resistenten Stämme, sogenannte MRSA, weitere Resistenzen gegen andere Antibiotikaklassen und können dann nur noch mit dem Reserveantibiotikum Vancomycin behandelt werden. Allerdings sind auch hier bereits Resistenzen beschrieben worden [48–51]. Anfangs war MRSA lediglich mit nosokomialen Infektionen assoziiert (*hospital-acquired* MRSA; HA-MRSA), aber in den letzten Jahrzehnten sind MRSA nun auch zunehmend in der Bevölkerung nachweisbar (*community-acquired* MRSA; CA-MRSA) und verursachen sogar bei gesunden Menschen Haut- und Weichteilinfektionen sowie Pneumonien [33,40].

Ursache für die schnelle Entwicklung von Resistenzen ist das variable Genom von *S. aureus*, welches zwischen zwei Stämmen um bis zu 20 % variieren kann. Es ist etwa 2,8 Mb groß und wird in drei Bereiche eingeteilt:

- das **Kerngenom**, welches etwa 75 % der Gene umfasst,
- das **kernvariable Genom**, welches etwa 10 % des Genoms entspricht und
- das **variable Genom**, welches 15 % der Gene umfasst [52–54].

Das Kerngenom kodiert für Haushaltsgene sowie einige konservierte Virulenzfaktoren (Protein A (Spa); α -Hämolysin (Hla) und einige Exoenzyme) [55]. Da das Kerngenom hochkonserviert ist, kann es zur Bestimmung von Verwandtschaftsverhältnissen zwischen verschiedenen *S. aureus*-Stämmen genutzt werden [25]. Das *multilocus sequence typing* (MLST) ist eine sequenzbasierte Genotypisierungsmethode, bei der Sequenzunterschiede in den sieben Haushaltsgenen analysiert werden. Die *S. aureus*-Stämme werden Sequenztypen zugeordnet, die wiederum in klonalen Komplexen (*clonal complex*; CC) zusammengefasst werden, sofern sie in mindestens fünf Allelen übereinstimmen [53,56]. Die *spa*-Typisierung beruht auf dem Polymorphismus der X-Region des *spa*-Gens, welche aus einer unterschiedlichen Anzahl an Wiederholungen der 24 Basenpaare besteht. Anhand der Nukleotidsequenzen und der Anzahl an Wiederholungen können die verschiedenen *S. aureus*-Stämme schließlich in diverse *spa*-Typen kategorisiert werden [57]. Beide Methoden sind stark konkordant.

Das kernvariable Genom kodiert vor allem für Adhäsine und Transkriptionsregulatoren. Isolate verschiedener Linien besitzen meist alle Varianten dieser Gene, innerhalb eines klonalen Komplexes ist das kernvariable Genom jedoch konserviert [54].

Das variable Genom von *S. aureus* besteht aus mobilen genetischen Elementen (MGEs) wie Bakteriophagen, Pathogenitätsinseln, chromosomalen Kassetten, Transposons und Plasmiden, die leicht durch horizontalen Gentransfer weitergeben werden können. MGEs tragen wesentlich zur Verbreitung von Resistenzen bei, da Resistenzgene vor allem auf chromosomalen Kassetten, Transposons und Plasmiden kodiert sind [33,55].

Die wachsende Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen stellt eine weltweite Bedrohung dar. In den meisten WHO-Mitgliedsstaaten beträgt der Anteil an MRSA mehr als 20 %, in einigen Ländern sogar bis zu 80 % [58]. Trotz intensiver Bemühungen in den vergangenen Jahrzehnten ist es bislang noch nicht gelungen eine *S. aureus*-Vakzine für den Menschen zu entwickeln, da keine protektive Immunität generiert werden konnte [59–64]. Da die Behandlungsmöglichkeiten für *S. aureus*-Infektionen mittlerweile stark limitiert sind, warnt die WHO nun vor einer möglichen postantibiotischen Ära, in der bereits einfache Infektionen und kleinere Verletzungen tödlich sein können [58]. Aus diesem Grund

wird es immer bedeutender die grundlegenden Prozesse der Besiedlung und Infektion mit *S. aureus* zu verstehen, denn nur so ist es möglich neue Strategien gegen *S. aureus* zu entwickeln. Dafür sind Infektionsmodelle, welche die klinische Situation möglichst exakt widerspiegeln, essenziell.

1.3 Die Interaktion zwischen Immunsystem und *S. aureus* bei Infektionen

1.3.1 Die Interaktion zwischen dem innaten Immunsystem und *S. aureus* bei Infektionen

Sobald es *S. aureus* gelungen ist, die äußere Barriere (Haut, Schleimhäute) zu überwinden, kann es eine Vielzahl von Erkrankungen hervorrufen. Bei einer Infektion trifft *S. aureus* zunächst auf Bestandteile des angeborenen Immunsystems. Hierbei spielen vor allem die Proteine des Komplementsystems sowie neutrophile Granulozyten eine wesentliche Rolle [5,65,66].

Das Komplementsystem besteht aus einer Vielzahl von Serumproteinen, die kaskadenartig aktiviert werden. Dadurch entstehen diverse Spaltprodukte, die Pathogene lysieren, durch Bindung an bakterielle Membranen opsonieren oder als Anaphylatoxine weitere Immunzellen an den Infektionsherd rekrutieren [5,7]. Neutrophile Granulozyten gehören zu den ersten Zellen, die bei einer *S. aureus* Infektion rekrutiert werden. Sie können *S. aureus* phagozytieren und verdauen, produzieren reaktive Sauerstoffspezies und können durch die Bildung von *neutrophil extracellular traps* (NETs) *S. aureus* binden und abtöten [66,67]. Zudem sezernieren Phagozyten und Epithelzellen AMPs, die mit ihren kationischen und hydrophoben Aminosäureresten an die negativ geladene Membran von Viren, Bakterien und Pilzen binden und diese somit zerstören [5,7,68,69]. Ein großer Teil der Pathologie bei *S. aureus*-Infektionen kann auf den übermäßigen Influx von Neutrophilen und deren toxische Produkte zurückgeführt werden [65,70,71].

Gegen die Komponenten des innaten Immunsystems hat *S. aureus* eine Vielzahl von Immunevasionsmechanismen entwickelt, um diese zu umgehen bzw. sie für sich zu nutzen. Beispielsweise bilden die meisten *S. aureus*-Stämme Polysaccharidkapseln, um sich vor AMPs und dem Komplementsystem zu schützen [72,73]. Zudem kann *S. aureus* AMPs mit Hilfe des Enzyms Staphylokinase (SAK) binden und inaktivieren oder durch die Metalloprotease Aureolysin spalten [74–76]. Aureolysin kann zudem die C3-Konvertase spalten, was zu einer verminderten Opsonierung und somit zur Inhibition der Phagozytose führt [65,77]. Des Weiteren könne NETs durch die Bildung von extrazellulären Nukleasen enzymatisch aufgebrochen werden [78].

Ein wesentlicher Immunevasionsmechanismus ist die Expression des Immunevasionsclusters. Dieses ist humanspezifisch und auf dem Sa3int-Phagen kodiert. Es inhibiert das innate Immunsystem [52,79,80]. So wird zum Beispiel der C5a-Rezeptor auf der Oberfläche von Neutrophilen durch das

Chemotaxis-inhibierende Protein (CHIP) blockiert, wodurch deren Rekrutierung verhindert wird [65,80]. Der Staphokokken-Komplementinhibitor (SCIN) hingegen inaktiviert die C3-Konvertase, so dass die Komplementkaskade nicht vollständig ablaufen kann. Des Weiteren baut SAK die Komplementkomponenten C3b/C3bi ab [80,81]. Zudem wird durch den Abbau von IgG durch SAK die Opsonophagozytose erheblich gestört [82,83].

Auch durch Zellwand-assoziiertes Protein A (Spa) sowie das Staphylokokken Immunglobulin-bindende Protein (Sbi), welche an den Fc-Teil von Antikörpern binden, wird die Opsonophagozytose unterbunden [65,84,85]. Sollte *S. aureus* dennoch phagozytiert werden, so schützen Staphyloxanthin, Katalase und Superoxid-Dismutase teilweise vor der Abtötung durch reaktive Sauerstoffspezies [86,87]. Die Proteine Efb (*extracellular fibrinogen binding protein*) und Ecb (*extracellular complement binding protein*) blockieren sowohl die C3- als auch die C5-Konvertase, wodurch nicht nur der Ablauf der Komplementkaskade gestört wird, sondern auch die Rekrutierung von Neutrophilen verhindert wird [81,88,89]. Schließlich können Wirtszellen auch durch diverse bakterielle Toxine, wie Panton-Valentin-Leukozidin (PVL) und α -, β -, γ - oder δ -Toxin lysiert werden [35,70,86,90].

1.3.2 Die Interaktion zwischen dem adaptiven Immunsystem und *S. aureus* bei Infektionen

Antikörper sind ein wesentlicher Bestandteil des adaptiven Immunsystems. Sie dienen zur Opsonierung von Erregern, zur Neutralisation von Toxinen sowie zur Aktivierung des Komplementsystems [7,91]. Bei Erwachsenen lässt sich ein breites Spektrum an *S. aureus*-spezifischen Antikörpern nachweisen, welche vor allem gegen extrazelluläre Proteine sowie gegen Oberflächenproteine, aber auch gegen Wandteichonsäure, Lipoteichonsäure und Peptidoglykan gerichtet sind [92]. Meistens sind die Antikörpertiter bei *S. aureus* Carriern höher als bei Non-Carriern [93,94]. Zudem werden *S. aureus* Superantigene (SAGs) von Carriern effizienter neutralisiert [92,93].

T-Zellen tragen wesentlich zur Opsonophagozytose bei, indem sie B-Zellen T-Zell-Hilfe leisten oder durch die Freisetzung von Zytokinen, welche Neutrophile an den Infektionsherd rekrutieren. Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass auch T-Zellen eine wesentliche Rolle bei *S. aureus*-Infektionen spielen. Das breite Repertoire an *S. aureus*-spezifischen Antikörpern lässt vermuten, dass es eine Vielzahl *S. aureus*-spezifischer T-Zellen vorhanden sind [95]. Dies wurde durch Kolata *et al.* bestätigt. Sie zeigten, dass ca. 3,6 % (Range: 0,2 % - 5,7 %) der humanen peripheren T-Zellen auf *S. aureus*-spezifische Antigene reagieren [96].

Des Weiteren konnte in murinen Modellen gezeigt werden, dass T-Zellen zwar anscheinend während der akuten Phase einer systemischen *S. aureus*-Infektion entbehrlich sind, jedoch leisten sie einen wesentlichen Beitrag in chronischen Infektionen [97,98]. Auch für *S. aureus*-induzierte Pneumonien konnte eine Beteiligung von CD4⁺-T-Zellen nachgewiesen werden, die teilweise auf SAGs

zurückzuführen ist [99]. Parker *et al.* zeigten ein besseres Überleben, eine reduzierte bakterielle Last sowie eine reduzierte Inflammation bei T-Zell-defizienten Mäusen, was auf eine schädliche Rolle von CD4⁺-T-Zellen in diesem Modell hindeutet [99]. Diese Ergebnisse konnten in humanisierten Mäusen bestätigt werden [100]. Auch in Modellen der Sepsis und bei Hautinfektion konnte gezeigt werden, dass T-Zellen an der Pathogenese von *S. aureus* beteiligt sind [101–103].

Vor allem IL-17-produzierende T-Zellen sind anscheinend wesentlich an *S. aureus*-Infektionen beteiligt. Sowohl bei Haut- und Weichteilinfektionen als auch bei Wundinfektionen wurde nachgewiesen, dass IL-17, welches vor allem von Th17-Zellen produziert wurde, eine wesentliche Rolle spielt [104,105]. Bei Hautinfektionen war die bakterielle Last in T-Zell-defizienten Mäusen erhöht, wohingegen der adoptive Transfer von Th17-Zellen bzw. Antikörpern jeweils einen gewissen Schutz lieferte [106,107].

Cheng *et al.* beobachteten zudem bei *S. aureus*-induzierter Pneumonie eine schnelle Akkumulation von $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Lunge, welche ebenfalls IL-17 produzieren. In $\gamma\delta$ -T-Zell-defizienten Tieren kam es zu einer reduzierten IL-17 Produktion und dadurch auch zum reduzierten Influx von Neutrophilen sowie einer verminderten Fähigkeit die *S. aureus*-Infektion zu beseitigen. Allerdings waren die Gewebeschäden in den Wildtyp (WT)-Mäusen schwerwiegender. Hinsichtlich des Überlebens gab es hingegen keine Unterschiede zwischen den WT-Mäusen und den $\gamma\delta$ -T-Zell-defizienten Tieren [18]. In einer weiteren Studie wurde eine wesentliche Rolle von IL-17 und IL-22 nachgewiesen, wobei IL-17 sowohl von Th17 als auch von $\gamma\delta$ -T-Zellen produziert wurde [108]. Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von Th17-Zellen ist, dass Patienten mit einem genetischen Defekt in der Th17-Zell-Entwicklung anfälliger für *S. aureus*-Infektionen sind [109–111]. Bei Infektionen des Blutkreislaufes zeigten sich hingegen IFN- γ -produzierende T-Zellen als essenziell [112]. Es gab keine Unterschiede im Krankheitsverlauf zwischen WT und IL-17-KO Mäusen [113]. Auch nach Stimulation von T-Zell-Subpopulationen mit inaktiviertem *S. aureus* wurden vor allem Th17- und Th1-Zellen nachgewiesen [114].

Auch gegen die Mechanismen des adaptiven Immunsystems hat *S. aureus* Immunevasionsstrategien entwickelt. So kann z. B. Spa B-Zellen auch T-Zell-unabhängig aktivieren. Dies führt zur Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10, welches wiederum die T-Zell-Antwort limitiert [115]. Des Weiteren kann lösliches Spa eine Antigenbindung imitieren und so ebenfalls B-Zellen aktivieren. Da jedoch co-stimulatorische Signale fehlen, sterben die B-Zellen [116]. Zudem sezernieren Staphylokokken extrazelluläre Proteasen, zu denen auch die V8-Protease zählt. Sie spaltet die schwere Kette von Immunglobulinen, wodurch *S. aureus* das adaptive Immunsystem umgehen könnte [117,118].

S. aureus bildet eine Vielzahl von SAgS. Bis heute sind mindestens 25 verschiedene SAgS von *S. aureus* beschrieben worden [119–121]. Sie wirken als T-Zell-Mitogene, welche konservierte Strukturen der MHC-II-Moleküle auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen mit den TCRs sowie CD28 auf der Oberfläche von T-Zellen antigenunabhängig kreuzvernetzen. Dadurch werden bis zu 20 % der T-Zellen polyklonal aktiviert [122–124]. Das führt zur Proliferation der T-Zellen sowie einer überschießenden Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und kann sogar Erkrankungen wie das toxische Schocksyndrom und Lebensmittelvergiftungen hervorrufen [125]. Die zunächst überschießende proinflammatorische Immunantwort resultiert letztendlich in Anergie oder Aktivierungs-induziertem Zelltod der T-Zellen. Es ist anzunehmen, dass auch die Funktionen der humoralen Immunantwort durch SAgS inhibiert werden, da B-Zellen auf die Hilfe von T-Zellen angewiesen sind [65,125–127].

Schließlich können T-Zellen von Staphylokokken auch direkt durch die Bildung porenbildender Toxine, welche die Membranen der Wirtszellen zerstören, getötet werden. Zu ihnen zählen z. B. Hla sowie das Leukozidin Luk DE [35,90].

1.3.3 Wirts-*S. aureus*-Interaktion bei der nasalen Besiedlung

S. aureus besiedelt die gesamte Nasenhöhle - sowohl den Nasenvorhof, als auch den inneren Teil der Nasenhöhlen, aber auch die Achselhöhlen und den Genitalbereich [35,36,128–130]. Die oberste Schicht, das *stratum corneum*, enthält Keratinozyten, die Loricrin, Zytokeratin 10, Involucrin, Filaggrin und andere Proteine exprimieren, welche als Liganden für die Oberflächenproteine Clumping factor B (ClfB) und *iron-regulated surface determinant A* (IsdA) von *S. aureus* dienen [128,131–135]. Die Expression der Liganden von *S. aureus* wird durch die Zytokine IL-6 und IL-22 reguliert. Sowohl IL-6 als auch IL-22 führen zur Reduktion von Loricrin, Zytokeratin K1, Zytokeratin K10 und Filaggrin und somit zu einer reduzierten Besiedlung mit *S. aureus* [136–139].

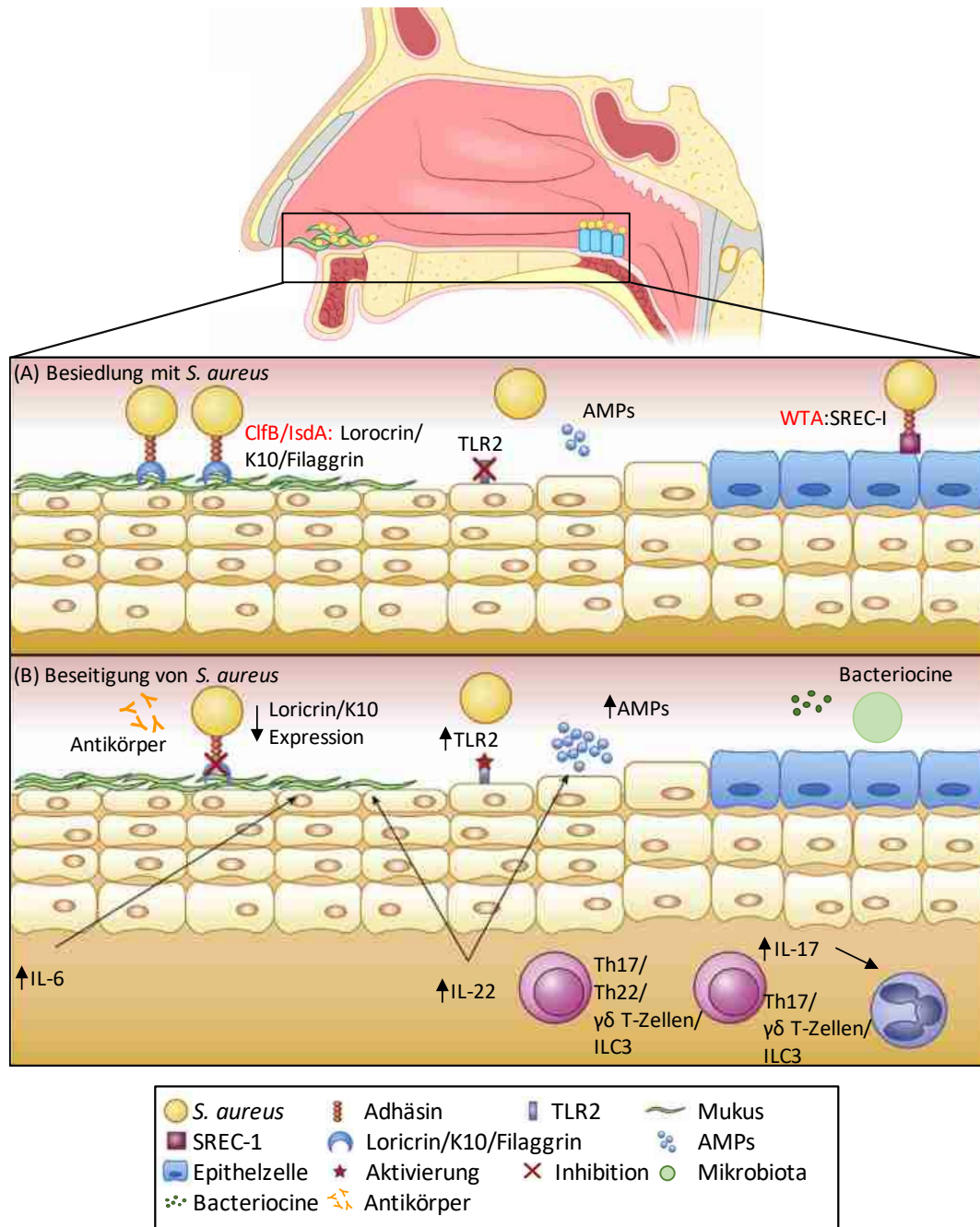


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Besiedlung mit *S. aureus* sowie der Beseitigung von *S. aureus* durch das Immunsystem (modifiziert nach Mulcahy *et al.*, 2016)

(A) Besiedlung mit *S. aureus*: Anheftung von *S. aureus* an das Epithel über bakterielle Adhäsine (rot), die an Oberflächenproteine der Keratinozyten binden. Besiedelnde Stämme können die Expression von TLR2 verzögern sowie die Produktion von AMP herunterregulieren. (B) Beseitigung von *S. aureus*: *S. aureus* aktiviert TLR2, was wiederum die AMP-Produktion durch Keratinozyten induziert. IL-6 sowie IL-22 regulieren die Expression von Loricrin und K10 herunter. Zudem kommt es zum Neutrophilen-Influx induziert durch IL-17. IL-22 produzierende Zellen steuern die AMP-Produktion und können ebenfalls die Expression von Loricrin und K10 herunterregulieren. Mikrobiota können durch Bacteriocine andere Mikroorganismen abtöten. Darüberhinaus spielen auch Antikörper bei der Besiedlung mit *S. aureus* eine Rolle.

Wichtige Abwehrmechanismen der Schleimhäute sind die Epithelbarriere, antimikrobielle Enzyme und AMPs, die Mikrobiota, sowie die innate und adaptive Immunabwehr. Durch die Bildung von *tight junctions* zwischen benachbarten Epithelzellen verhindert die Epithelbarriere das Eindringen von Mikroorganismen. Die darüberliegende Schleimschicht hält die meisten Organismen im Lumen vom Epithel fern [2–4]. Epithelzellen sezernieren zudem Nasensekret, welches AMPs wie β -Defensin, RNase-7, and LL-37 enthält. Darüberhinaus sezernieren die Keratinozyten bei mechanischer Schädigung oder Stimulation mit konservierten bakteriellen Strukturen, sogenannten MAMPs (*microbe associated molecular patterns*), Zytokine wie IL-6, TNF und IL-10, aber auch das Chemokin IL-8 [140–143]. Eine persistente Besiedlung mit *S. aureus* ist mit einem Defekt in der AMP-Produktion verbunden. Zum Beispiel korreliert eine niedrige Expression von β -Defensin-3 beim Menschen mit einer persistenten *S. aureus* Besiedlung. Unterschiede im Expressionsprofil der AMPs könnten somit für die verschiedenen *S. aureus* Besiedlungstypen mitverantwortlich sein [144–146].

Die Zytokine IL-17 und IL-22, die bei Besiedlung oder Infektion der Schleimhäute gebildet werden, fördern die Produktion von AMPs und verstärken somit die Schleimhautbarriere. Zudem konnte gezeigt werden, dass IL-17 ein Influx von Neutrophilen verursacht, welcher essenziell zur Bekämpfung der Besiedlung ist. Mäuse, deren Neutrophile depletiert wurden, zeigten eine signifikant höhere Besiedlung im Vergleich zu den Kontrolltieren, welches die Bedeutung von Neutrophilen bei der Elimination von *S. aureus* widerspiegelt [147].

Auch die Mikrobiota spielen eine entscheidende Rolle bei dem Schutz vor pathogenen Mikroorganismen indem sie das Immunsystem modulieren, die Epithelbarriere stärken oder mit Pathogenen um Nährstoffe konkurrieren [148–150]. Einige Stämme produzieren sogar Bacteriocine, antimikrobielle Substanzen, die phylogenetisch verwandte pathogene Bakterien abtöten können [148,151–154].

Die Besiedlung mit *S. aureus* induziert zudem eine adaptive Immunantwort. Diese Antikörper vermittelt zwar in der Regel keine sterile Immunität, schützen jedoch zumindest vor schweren Krankheitsverläufen [91,93]. Im Gegensatz dazu konnten Kurzzeit-Besiedlungsexperimente im Menschen keine systemische Antikörperreaktion auslösen, was vermuten lässt, dass eine mukosale Besiedlung zur Ausbildung einer systemischen Antikörperantwort nicht ausreichend ist [38,155].

Auch Spa scheint eine Rolle bei der Produktion von Antikörpern gegen *S. aureus* zu spielen und ist ebenfalls für eine persistente Besiedlung erforderlich. Mäuse, die mit einer *spa*-Deletionsmutanten besiedelt wurden, zeigten eine gesteigerte IgG-Antwort gegen bedeutende Besiedlungsfaktoren wie ClfB, IsdA und SasG, was die Elimination der Δspa -Mutante aus dem Nasopharynx zu fördern scheint [156]. Zudem konnten humane Studien zeigen, dass *S. aureus*-Stämme von Carriern SpA signifikant

höher exprimieren als Stämme, die nicht mit *S. aureus*-Besiedlung assoziiert sind [157]. In einer nachfolgenden Studie konnte gezeigt werden, dass SpA-defiziente Carrier-Stämme schneller eliminiert wurden als die Wildtypen, die eine Hochregulierung von lokalen Entzündungsmarkern zeigten [158].

Des Weiteren scheinen Th17-Zellen bei der Bekämpfung von *S. aureus* bei Besiedlung und Infektion eine wesentliche Rolle zu spielen. Th17-Zellen produzieren die Zytokine IL-17 und IL-22, die die AMP-Sekretion anregen und durch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen die Rekrutierung von Neutrophilen induzieren. Zudem induzieren sie die Expression von Liganden für die Adhäsion von *S. aureus* [159]. Neben Th-17-Zellen produzieren auch ILC3-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen IL-17 und IL-22 [2,18,159]. Archer *et al.* zeigten, dass IL-17A/F-defiziente Mäuse eine höhere bakterielle Last aufwiesen als WT-Mäuse [147,160]. Auch IL-22-defiziente Mäuse waren nicht in der Lage nach nasaler Besiedlung *S. aureus* zu entfernen [159]. Im Gegensatz dazu konnte in einer humanen Studie, in der Entzündungsfaktoren des Nasensekrets untersucht wurden, IL-17 nicht nachgewiesen werden, jedoch IFN- γ , was vermuten lässt, dass beim Menschen eine Th1-Antwort an der Entfernung von *S. aureus* beteiligt ist [158,161]. Eine niedrige Gesamt-Ratio von Th1- zu Th17-Zellen scheint beim Menschen die Neigung zur persistenten Besiedlung mit *S. aureus* zu erhöhen [162].

Um die T-Zell-Antwort und die Rolle der AMPs in der Besiedlung mit *S. aureus* genauer zu untersuchen, werden geeignete Besiedlungsmodelle benötigt, die so exakt wie möglich die klinischen Bedingungen nachahmen. Eine wesentliche Rolle spielt dabei die Verwendung von wirtsadaptierten Stämmen. Der Einsatz von mausadaptierten *S. aureus*-Stämmen im Mausmodell könnte schließlich zu einem besseren Verständnis der Besiedlung und somit zur Entwicklung neuer Therapieansätze beitragen.

1.4 Wirtsanpassung von *S. aureus*

1.4.1 Wirtsspezifität von *S. aureus*

S. aureus besiedelt und infiziert nicht nur Menschen, sondern eine ganze Bandbreite von Haus-, Nutz- und Wildtieren. Genomanalysen zeigten, dass *S. aureus* stark wirtsspezifisch ist [163]. Die meisten humanen Isolate lassen sich den Linien CC8, CC15, CC25, CC30 und CC45 zuordnen, wohingegen bei Wiederkäuern (Rindern, Ziegen, Schafen) die Linien CC97, CC130 und CC151, die beim Menschen eher selten auftreten, relativ häufig vorkommen [164–167]. Des Weiteren wurde bei Schweinen vorwiegend die Linie CC398 isoliert, während die meisten aviären *S. aureus*-Isolate zur Linie CC5 gehören [168,169].

Überraschenderweise sind tierische *S. aureus*-Linien genetisch sehr eng mit humanen Linien verwandt. Lediglich eine Handvoll Gene oder Genkombinationen sind für die Wirtsspezifität verantwortlich.

Einige Gene, die in allen humanen Isolaten konserviert sind, sind variabel oder fehlen sogar gänzlich in tierischen Isolaten [165]. Hierzu zählen die Gene *fnbA* (Fibronektin-bindendes Protein A), *fnbB* (Fibronektin-bindendes Protein B) und *coa* (Koagulase). Diese Gene konnten zwar in nahezu allen getesteten tierischen *S. aureus*-Isolaten (von Pferden, Schafen, Ziegen und Kühen) nachgewiesen werden, sie wiesen jedoch einzigartige allele Varianten auf [165]. Auch die Proteine des Immunevasionsclusters, die auf dem Sa3int-Phagen die Proteine Chemotaxis-inhibierendes Protein (CHIP), Staphylokokken-Komplementinhibitor (SCN) und Staphylokinase (SAK) kodieren, kommen in nahezu allen humanen, jedoch nur sehr selten in tierischen *S. aureus*-Isolaten vor [79–81,165]. Des Weiteren kann lukM, ein wichtiger Virulenzfaktor in der Pathogenese der Rindermastitis, nur in *S. aureus*-Stämmen von Wiederkäuer nachgewiesen werden [166,170]. Das PVL lysiert humane Neutrophile sehr effizient, während es auf bovine Neutrophile nur schwach lysierend wirkt [171]. Im Gegensatz dazu, lysiert bovines lukMF' bovine Neutrophile sehr effizient, während es auf humanen polymorphkernigen Zellen kaum toxisch wirkt [171–173].

1.4.2 Mäuse als Tiermodell für die *S. aureus*-Forschung

In der *S. aureus*-Forschung werden häufig Mäuse als Tiermodell eingesetzt, da sie einige Vorteile mit sich bringen. Die Haltung ist sehr kostengünstig und die Zucht relativ einfach. Auch das Handling der Tiere ist wesentlich leichter als bei größeren Tieren. Zudem sind sehr viele genetische Varianten (*knock-out* Mäuse, *knock-in* Mäuse, Auszucht- und Inzuchtstämme) verfügbar [163]. Häufig werden humane Stämme, wie *S. aureus* Newman oder USA 300, im Mausmodell eingesetzt. Da *S. aureus* stark wirtsspezifisch ist, müssen diese jedoch in nicht-physiologischen Infektionsdosen eingesetzt werden. Zudem sind viele Virulenzfaktoren, wie z.B. PVL oder SAGs, humanspezifisch und somit kaum wirksam bzw. unwirksam im Mausmodell. Generell ist bekannt, dass Mäuse eine reduzierte Sensitivität gegenüber Zytotoxinen und SAGs von *S. aureus* zeigen [80,81,165,173,174].

Ein weiteres Argument gegen den Einsatz von Mäusen war die Annahme, dass Mäuse keine natürlichen Wirte von *S. aureus* sind [128,163,175,176]. Das konnte 2008 durch unsere Arbeitsgruppe widerlegt werden. Bei einem Ausbruch von Vorhautdrüsenabszessen bei männlichen C57BL/6-Mäusen in Auckland (Neuseeland) wurde *S. aureus* als Ursache ermittelt [163]. Der isolierte Stamm, welcher JSNZ genannt wurde, gehört zum MLST CC88, besitzt weder SAGs noch den Sa3int-Phagen, welcher für das humane Immunevasionscluster kodiert. Es zeigte sich, dass JSNZ Mäuse bis zu 42 Tage besiedelt, sogar ohne vorherige Antibiotikagabe. Der humane Stamm Newman hingegen führt lediglich zu einer transienten Besiedlung [156,163,177,178]. Damit ist es erstmals möglich, die für Menschen typische persistente Besiedlung auch im Tiermodell nachzustellen. Auch im *i. p.* Infektionsmodell zeigten sich Tendenzen einer gesteigerten Virulenz [163]. Des Weiteren konnte in Vorarbeiten gezeigt werden,

dass murine *S. aureus*-Stämme unterschiedlicher klonaler Komplexe auch von den Elterntieren auf die Nachkommen übertragen werden [178,179].

Nachdem JSNZ identifiziert wurde, begann unsere Arbeitsgruppe mit einer detaillierten Literaturrecherche. Anhand weniger veterinärmedizinischer Aufsätze zeigte sich, dass Mäuse wie Menschen vor allem auf der Haut, im Nasenrachenraum und im unteren Verdauungstrakt besiedelt sind. Zudem führt *S. aureus* auch bei Mäusen zu eitrigen Entzündungen mit Abszessbildung in nahezu jedem Organ [180,181].

Anschließend wurden sowohl Labor- als auch Wildmäuse hinsichtlich ihres *S. aureus*-Besiedlungsstatus untersucht. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sowohl spezifisch pathogenfreie Labormäuse aus Zuchtanlagen von kommerziellen Anbietern und Universitäten als auch Wildmäuse, die in abgelegenen Gegenden gefangen wurden, mit *S. aureus* besiedelt sind [178,182–184]. Überraschenderweise konnten bei den Labormäusen nur wenige verschiedene Linien nachgewiesen werden, die beim Menschen eher selten vorkommen. In insgesamt 221 Labormäusen konnte vor allem die Linie CC88 (39,4 %), aber auch CC1 (16,7 %), CC8 (15,4 %) und CC15 (10,9 %) nachgewiesen werden [163,182,185]. In Wildmäusen wurde in einer Pilotstudie zunächst vor allem die Linie CC8 nachgewiesen, welche auch beim Menschen häufig vorkommt [184]. In einer nachfolgenden Studie wurden dann die Linien CC49 (35,4%), CC1956 (29,2%), ST890 (18,8%) und ST3033 (10,4%) detektiert. Zudem wurde aus zwei Mäusen die Linie CC130 (4,2 %) und sogar aus einer Maus die Linie CC88 (2,1 %), welche in Labormäusen dominant vorkam, isoliert [183,184].

Wie bei *S. aureus* JSNZ zeigten auch die anderen murinen Isolate Hinweise auf Wirtsanpassung. Lediglich ein CC30-Isolat war *mecC*-positiv. Ansonsten konnten keine Antibiotikaresistenzen detektiert werden, den Stämmen fehlten ebenfalls die Sa3int-Phagen und es wurden auch nur vereinzelt SAg-Gene nachgewiesen [182–185].

Auch aus freilebenden Ratten konnten die Linien CC49 und CC130 isoliert werden, wohingegen in Laborratten die Linien CC15, CC1 und CC7 dominierten [186]. Des Weiteren konnten auch andere Arbeitsgruppen zeigen, dass Mäuse und Ratten aus urbanen Gegenden mit *S. aureus* besiedelt sind. Hierbei handelte es sich jedoch um typisch humane Stämme [187,188].

Um ein besseres Verständnis über die Besiedlung und Infektion mit *S. aureus* zu erlangen und neue Strategien gegen *S. aureus* zu entwickeln, sollte die Wirtsspezifität von *S. aureus* berücksichtigt werden. Die Verwendung eines geeigneten Infektionsmodells mit einem wirtsspezifischen *S. aureus*-Stamm, das die klinische Situation möglichst exakt widerspiegelt, könnte wesentlich dazu beitragen [59,173].

1.5 Ziele der Arbeit

Es ist bekannt, dass *S. aureus* stark wirtsspezifisch ist. Dennoch werden häufig humane *S. aureus*-Isolate in murinen Besiedlungs- und Infektionsmodellen verwendet [163,165,173,174]. Denn die Forscher nahmen an, Mäuse seien keine natürlichen Wirte von *S. aureus* [128,163,176]. Das konnte durch unsere Arbeitsgruppe widerlegt werden, die zeigte, dass sowohl Labor- als auch Wildmäuse mit *S. aureus* besiedelt sind [162,181,182].

Um ein besseres Verständnis vom Prozess der Kolonisierung und Infektion mit *S. aureus* zu erlangen, sollte die Wirtsspezifität von *S. aureus* berücksichtigt werden. Die Verwendung von mausadaptierten *S. aureus*-Stämmen in murinen Besiedlungs- und Infektionsmodellen könnte in Zukunft sehr nützlich für die *S. aureus*-Forschung sein und wesentlich zur Entwicklung neuer Strategien gegen *S. aureus* beitragen.

In dieser Arbeit sollten deshalb folgende Fragen beantwortet werden:

1. Können murine Infektionsmodelle durch die Verwendung von mausadaptierten *S. aureus*-Stämmen optimiert werden? Unterscheiden sich mausadaptierte von humanadaptierten Stämmen hinsichtlich Infektionsdosis, Belastungsgrad, Erkrankungsdauer und induzierter Immunantwort?
2. Kann das murine Besiedlungsmodell durch die Verwendung von mausadaptierten *S. aureus*-Stämmen optimiert werden?
3. Welche Immunzellen sind die Quelle für IL-17A/F sowie IL-22 im murinen Besiedlungsmodell?

Kapitel 2 Material

2.1 Laborgeräte

Agarose-Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH München
Mini Sub™ DNA Cell	
Agarose-Gelelektrophoresekammer OWL A3-1	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Analysenwaage	Ohaus, Nänikon (Schweiz)
Analysenwaage BP210S	Sartorius AG, Göttingen
Analysewaage CP225D-OCE	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav 2540 EL	Tuttnauer Systec, Wettenberg
Bakterienschüttler (Wasserbad) OLS Auqua Pro	Grant, Shepreth (United Kingdom)
Bakterienschüttler (Wasserbad) OLS200	Grant, Shepreth (United Kingdom)
Bakterienschüttler Certomat IS	Sartorius AG, Göttingen
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
CO ₂ -Inkubator Binder BF 240	Binder GmbH, Göttingen
Durchflusszytometer LSR II	BD Bioscience, Heidelberg
Eismaschine	Enodis, Herborn
Folienschweißgerät FS3261	Clatronic International GmbH, Kempen
Geldokumentationsanlage GenoPlex	VWR International GmbH, Darmstadt
GeneRay UV-Photometer	Biometra GmbH, Göttingen
Heizblock Thermomixer C	Eppendorf, Hamburg
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Induktionskochplatte OSP 502	Media-Saturn-Holding GmbH, Ingolstadt
Isofluroan-Kammer	PerkinElmer Inc., Massachusetts (USA)
(IVIS Spectrum In Vivo Imaging System)	
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Lichtmikroskop CKX31	Olympus, Hamburg
Lochzange Finger Loop Ear Punch	FST Fine Science Tools, Heidelberg
Magnetrührer MR3001	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Magnetrührer RSM-10HS	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen
Mikrowelle	Severin, Sundern
PCR Thermocycler T Gradient	Biometra GmbH, Göttingen
PCR Thermocycler T1	Biometra GmbH, Göttingen

pH-Meter FiveEasy	Mettler Toledo, Gießen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Präparierbesteck (Schere, Pinzette)	Aesculap, Tuttlingen
Precellys 24 Homogenisator	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Scanner CanoScan LiDE 110	Canon, Krefeld
Schnellkochtopf	WMF, Geislingen
Schüttelplatte REAX	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Schüttler KL-2	Edmund Bühler, Hechingen
Spektralphotometer DS-11	DeNovix Inc., Wilmington (USA)
Sterilwerkbank Herasafe HS 18	Heraeus Instruments, Hanau
Sterilwerkbank Herasafe KS 12	Heraeus Instruments, Hanau
Sterilwerkbank Safe 2020	Heraeus Instruments, Hanau
Stromversorgungsgerät Power Pac Basis	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
TECAN Infinite M200 Pro	Tecan, Männedorf (Schweiz)
Tiefkühlschrank Hera freeze (-80 °C)	Heraeus Instruments, Hanau
Tiefkühlschrank KT1630 (-20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Ultraschall-Reinigungsgerät	VWR International GmbH, Darmstadt
UniVet Tischnarkosegeräte	GROPPLER Medizintechnik, Deggendorf
Vakuum-Pumpe	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
VetScan HM5	Abraxis, Union City (USA)
Vortexer lab dancer S40	VWR International GmbH, Darmstadt
Vortexer Reax Top	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Wasserbad Aqua Line AL5	LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & CO. KG, Lauda-Königshofen
Zentrifugen:	
Heraeus Biofuge Fresco	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Heraeus Biofuge pico	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Heraeus Megafuge 1.0	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Heraeus Megafuge 16	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Heraeus Megafuge 16R	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Heraeus Multifuge X3R	Thermo Scientific, Waltham (USA)
MICRO 200R	Hettich Zentrifugen, Kirchlingern

2.2 Verbrauchsmaterialien

BD Discardit™ II Spritze (2 mL, 10 mL)	BD Bioscience, Heidelberg
BD Micro-Fine™+ Insulinspritzen (1 mL, 29 G ½")	BD Bioscience, Heidelberg
BD Plastipak™ Sub-Q Einmalspritzen (1 mL, 26 G ½")	BD Bioscience, Heidelberg
BD TruCount™ Tubes	BD Bioscience, Heidelberg
BD Columbia Blutagar	BD Bioscience, Heidelberg
Bottle-Top Filter (0,22 µm)	Merck Millipore, Billerica (USA)
C-Chip Neubauer improved	Digital Bio, Seoul (Korea)
EDTA Röhrchen (1,6 mg EDTA /mL Blut)	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalküvetten	Roth, Karlsruhe
End-to-End-Kapillaren (20 µL, K2E)	Sarstedt, Nümbrecht
FACS™-Röhrchen	BD Bioscience, Heidelberg
Handschuhe (Latex, ungepudert)	Hartmann, Heidenheim
Homogenisierungsröhrchen	VWR International GmbH, Darmstadt
Impfösen	Nerbe Plus, Winsen/Luhe
Kanülen (20 G, 25 G)	BD Bioscience, Heidelberg
Kanülen Neoject	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Klebefolie für Mikrotiterplatten	Carl Roth, Karlsruhe
Kryoröhrchen (1,5 mL)	Roth, Karlsruhe
Nunc MaxiSorp® (96°, Flachboden)	Thermo Scientific, Rockford (USA)
Nunclon™ Δ Surface (24°, Flachboden)	Thermo Scientific, Rockford (USA)
Nunclon™ Δ Surface (96°, Flachboden)	Thermo Scientific, Rockford (USA)
Nunclon™ Δ Surface (96°, Rundboden)	Thermo Scientific, Rockford (USA)
Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging, Chicago (USA)
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 mL)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Perfusorspritzen (50 mL)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Petrischalen (10 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter, Aerosol-resistent	Biozym, Hessisch Oldendorf
Precellys-Gefäße	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Reaktionsgefäße (0,5 mL; 1,5 mL; 2,0 mL)	Eppendorf, Hamburg

Reaktionsgefäße (0,5 mL; 1,5 mL; 2,0 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (4,5 mL)	Greiner, Frickenhausen
Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen (2 mL, 10 mL, 50 mL)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritzenfilter 0,22 µm	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter (0,2 µm, Ø 15 mm)	Roth, Karlsruhe
Zellkulturplatten (96°, Flachboden)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsieb (70 µm)	BD Bioscience, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (15 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (50 mL)	BD Bioscience, Heidelberg
Zirkoniumoxid Kügelchen (1,4 mm; 2,8 mm)	VWR International GmbH, Darmstadt

2.3 Chemikalien und Reagenzien

5× Green Gotaq Flexi Buffer	Promega, Madison (USA)
Agar	GIBCO BRL
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
BD OptEIA ELISA-Substrat	BD, Heidelberg
Borsäure	AppliChem, Darmstadt
Bradfordreagenz	Bio-Rad, München
Brefeldin	BioLegend, San Diego (USA)
BSA (Rinderserumalbumin)	Thermo Scientific, Rockford (USA)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coatingbuffer (10×)	CANDOR Bioscience GmbH, Wangen
DNA-Größenmarker (GeneRuler™ 100 bp)	Thermo Scientific, Waltham (USA)
DNase/RNase freies Wasser	Life Technologies GmbH, Darmstadt
dNTPs	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Erythromycin	Roth, Karlsruhe
Ethanol (> 99,5 %)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
FACS Clean	BD Bioscience, Heidelberg
FACS Flow-Lösung	BD Bioscience, Heidelberg
FACS Rinse	BD Bioscience, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin

Glucose (45 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerol (87 %)	Roth, Karlsruhe
GoTaq-Polymerase	Promega, Madison (USA)
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
HPLC-Wasser	J.T. Baker Avantor, Center Valley (USA)
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
KETANEST® S 25 mg/mL Injektionslösung	Pfizer, Berlin
Esketaminhydrochloridlösung	
LB Broth EZMixTM	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Promega, Madison (USA)
Monensin	BioLegend, San Diego (USA)
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl; 0,9 %)	Berlin-Chemie, Berlin
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumlaurylsulfat (SDS) 20 %	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nicht-essenzielle Aminosäuren (100 ×)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Penicillin/Streptomycin/Glutamine (100 ×)	PAA Laboratories, Pasching (Österreich)
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin
RedSafe™ DNA-Färbelösung	Chembio, Medford, (USA)
Rompun® 2 % (20 mg/mL Xylazin als Xylazinhypochlorid)	Bayer Health Care, Berlin
RPMI1640 (ohne Glutamin)	PAA Laboratories, Pasching (Österreich)
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄ , 2 N)	Roth, Karlsruhe
SevoFlo® (100 % Sevofluran)	Abbott, Hannover
TexMACS-Medium	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Thiourea	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypton	AppliChem, Darmstadt
Tryptone Soya Broth (TSB)	Oxoid LTC, Cambridge (UK)

Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Urea	Sigma-Aldrich, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Roche Diagnostics, Mannheim

2.4 Medien, Puffer und Lösungen

5× TBE, pH 8,0	54 g Tris-Base 27,5 g Borsäure 3,75 g EDTA <i>ad 1 L A. bidest.</i>
Agarosegel (1,5 %)	3 g Agarose 200 mL 1× TBE 7,5 μ L Red Safe
Blockpuffer (ELISA)	PBS 10 % FCS
FACS-Puffer	20 mL FCS 2 mL Natriumazid 2 mM EDTA <i>ad 1 L FACS-Flow-Lösung</i>
Ketamin/Xylazin Narkose	0,5 mL Rompun® 2 % 4,0 mL KETANEST® S (25 mg/mL) 5,5 mL NaCl 0,9 %
LB-Agar	LB-Medium mit 1,3 % (w/v) Agar
LB-Medium	20,6 g LB broth <i>ad 1 L A. bidest.</i>
LK-Agar	LK-Medium mit 1,7 % (w/v) Agar
LK-Medium	1 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 0,7 % KCl

Lysepuffer zur DNA-Isolation	124 μ L <i>Enzymatic Lysis Puffer</i> 36 μ L Lysozym (100 mg/mL) 20 μ L Lysostaphin (2 mg/mL)
Rehydratisierungspuffer (RHB)	4,80 g 8 M Urea 1,52 g 2 M Thiourea 0,20 g 2 % (w/v) Chaps <i>ad</i> 10 mL HPLC-Wasser
RPMI-Vollmedium (Proliferationsassay)	427,2 mL RPMI1640 (ohne Glutamin) 50 mL FCS 5 mL Na-Pyruvat 5 mL nicht-essenzielle Aminosäuren 0,5 mL β -Mercaptoethanol (Stock 50 mM) 10 mL Penicillin/Streptomycin/Glutamin 2,3 mL Glucose (45 %)
Stimulationsansatz (intrazelluläre Zytokine)	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA; 50 ng/mL) Ionomycin (12,68 μ M) Brefeldin (1 \times) Monensin (1 \times)
TexMACS™ Proliferationsmedium	494,5 mL TexMACS 0,5 mL β -Mercaptoethanol 5 mL Glutamin Pen-Strep
TSB-Medium	15 g TSB <i>ad</i> 500 mL <i>A. bidest.</i>
Waschpuffer (ELISA)	PBS 0,05 % Tween

2.5 Versuchstiere

Für die Infektionsversuche wurden 8 Wochen alte, weibliche SOPF (*specific and opportunistic pathogen free*)-Mäuse aus der Zucht von Janvier Labs (Route du Genest, 53940 Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bzw. Charles River Laboratories (LDT Oncins, 69210 Saint Germain Nuelles, Frankreich) eingesetzt. Für den Vergleich der verschiedenen *S. aureus*-Stämme und die Dosistitration wurden BALB/c-Mäuse, für die Besiedlung wurden C57BL/6/Albino (B6(Cg)-Tyr^{c-2J}/J) verwendet.

2.6 Bakterienstämme

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Seren & Bakterienstämme

Bakterienstamm	Verwendung	Herkunft
<i>S. aureus</i> DIP	Bakteriämie, Pneumonie und Besiedlung	Daniel Mrochen und Silva Holtfreter, Universitätsmedizin Greifswald
<i>S. aureus</i> DIP Δ spa	ELISA (extrazelluläre Proteine)	Ilka Jorde und Patricia Trübe, Universitätsmedizin Greifswald
<i>S. aureus</i> JSNZ	EryR-PCR (Negativkontrolle)	Siouxie Wiles und Silva Holtfreter, The University of Auckland (Neuseeland)
	<i>S. aureus</i> -Kolonie-PCR (Positivkontrolle)	
	Bakteriämie, Pneumonie und Besiedlung	
<i>S. aureus</i> JSNZ Δ spa::ery	EryR-PCR (Positivkontrolle)	Siouxie Wiles und Silva Holtfreter, The University of Auckland (Neuseeland)
	ELISA (extrazelluläre Proteine)	
<i>S. aureus</i> muCC8	Bakteriämie und Pneumonie	Daniel Schulz und Silva Holtfreter, Universitätsmedizin Greifswald
<i>S. aureus</i> muCC88	Bakteriämie und Pneumonie	Daniel Schulz und Silva Holtfreter, Universitätsmedizin Greifswald
<i>S. aureus</i> Newman	Blood Survival Assay	Bettina Löffler, Universität Münster
	Koagulationstest	
	Besiedlungs- und Pneumoniemodell	
<i>S. aureus</i> Newman Δ spa	ELISA (extrazelluläre Proteine)	Christiane Wolz, Tübingen
<i>E. coli</i> DM5 α	<i>S. aureus</i> -Kolonie-PCR (Negativkontrolle)	Invitrogen, Göttingen

2.7 Primer

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert.

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Primer

Gen	Sequenz (5' - 3')	Fragmentgröße [bp]	Annealing-Temperatur [C°]
16S rRNA	aac tct gtt att agg gaa gaa ca	756	60
	cca cct tcc tcc ggt ttg tca cc		70
eryR	att ttg agg gtt gcc aga	456	48
	cgt gat ttt gcg gtt tta		
gyr	agt aca tcg tcg tat act ata tgg	281	60
	atc acg taa cag ttc aag tgt g		
nuc	gcg att gat ggt gat acg gtt	279	60
	agc caa gcc ttg acg aac taa agc		

2.8 Antikörper

Tabelle 2.3: Für ELISA verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma	Katalognummer
Ziege anti-Maus IgG POD	1:20.000	Jackson ImmunoResearch	115-036-071
Ziege anti-Maus IgM POD	1:5.000	Jackson ImmunoResearch	115-035-075
Ziege anti-Maus IgA POD	1:5.000	Southern Biotech	1040-05

Tabelle 2.4: Für die durchflusszytometrischen Analysen verwendete Antikörper

	Konjugat	Kanal	Wirt	Isotyp	Klon	Konz. [mg/mL]	Verd.	Hersteller	Kat.Nr
CD 3	PerCP/cy5.5	B710	Ratte	IgG2b,κ	17A2	0,2	1:50	Biolegend	100218
CD 4	FITC	B525	Ratte	IgG2a,k	RM4-5	0,5	1:200	Biolegend	100510
CD 25	BV 650	V670	Ratte	IgG1,λ	PC61	0,05	1:25	Biolegend	102037
CD 19	APC/Cy7	R780	Ratte	IgG2a,k	6D5	0,2	1:100	Biolegend	115529
TCR γδ	PE/Cy7	YG780	arm.Hamster	IgG	GL3	0,2	1:50	Biolegend	118123
CD127	BV510	V525	Ratte	IgG2a,k	A7R34	0,2	1:10	Biolegend	135033
IL-17A	Pe/Dazzle	YG610	Ratte	IgG1,k	TC11-18H10.1	0,2	1:10	Biolegend	506937
IL-22	PE	YG582	Ziege	IgG	Poly5164	0,025	1:10	Biolegend	516404
IL-17F	Alexa 647	R670	Maus	IgG1,k	9D3.1C8	0,5	1:50	Biolegend	517003
IL-9	BV 421	V450	Ratte	IgG1, k	RM9A4	0,2	1:50	Biolegend	514109
NIR	APC-Cy7	R780						Biolegend	423105

2.9 Kits

Legendplex™, Mouse Th Cytokine Panel (IL-2, IL-4; IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IFN- γ , TNF- α)	BioLegend, San Diego (USA)
Legendplex™, Mouse Proinflammatory Chemokine (MCP-1, RANTES, IP-10, Eotaxin, TARC, MIP-1 α , MIP-1 β , MIG, MIP-3 α , LIX, KC, BCL, MDC)	BioLegend, San Diego (USA)

2.10 Software und Datenbanken

BD FACS Diva Software 6.2	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
Citavi 6	Swiss Academic Software, Wädenswil (Schweiz)
FlowJo 10	Tree Star Inc., Ashland (USA)
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, Inc., La Jolla (USA)
i-control 1.10 (TECAN)	Tecan Group Ltd., Männedorf (Schweiz)
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
NCBI PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/

Kapitel 3 Methoden

3.1 Mikro- und Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Anlegen von Glycerolstocks

Für die Herstellung von Glycerolstocks wurden 200 µL steriles Glycerol (70 %) in ein Kryoröhrchen pipettiert und mit 800 µL einer in der stationären Phase befindlichen Bakterienkultur vermischt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.1.2 Anlegen von Infektionsstocks

Für die Herstellung der Infektionsstocks wurde zunächst eine Übernachtskultur des entsprechenden Stammes hergestellt. Am darauffolgenden Tage wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 595 nm mittels UV-Photometer gemessen. 100 mL Brain Heart Infusion (BHI) Medium wurden auf eine OD von 0,05 angeimpft und 3,5 Stunden im Wasserbad bei 100 rpm inkubiert. Zur Überprüfung des Wachstums wurde nun erneut die OD der Bakterienkultur gemessen, welche sich zu diesem Zeitpunkt in der logarithmischen Wachstumsphase befinden sollte. Danach wurden die Proben für 10 Minuten bei 4.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1/10 Volumen (10 mL) BHI-Medium aufgenommen. Zudem wurden 1/50 Volumen (2 mL) 87%iges Glycerol hinzugefügt: Die Infektionsstocks wurden in 1 mL Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.1.3 Herstellen der Infektionsdosis

Zum Einstellen der Infektionsdosis wurden die Infektionsstocks in ein 50 mL Falcon überführt und mit 50 mL PBS gewaschen. Nachdem die Proben zentrifugiert wurden (10 min, 8.000 × g), wurde das Pellet in 2 mL PBS resuspendiert und die OD bei einer Wellenlänge von 595 nm mittels UV-Photometer gemessen. Anhand der gemessenen OD konnte mit Hilfe der folgenden Formel die CFU/mL und daraus dann die Verdünnung der Infektionsdosis berechnet werden.

$$\frac{CFU}{mL} = (6 \times 10^{10} \times \text{gemessene OD} - 3 \times 10^9)$$

3.1.4 Kultivierung von Bakterien

3.1.4.1 Kultivierung auf Festmedium

Für die Kultivierung von Bakterien auf Festmedium wurde mit einer sterilen Impföse aus einem Glycerolstock etwas Material entnommen und auf einer Agarplatte ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

3.1.4.2 Kultivierung in Flüssigmedium

Für die Kultivierung von *S. aureus* in Flüssigmedium wurde zunächst eine 10 mL Übernachtskultur in 50 mL Reaktionsgefäß angesetzt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm (zirkulärer Bakterieneschüttler) inkubiert. Anschließend wurde die OD der Kultur bei einer Wellenlänge von 595 nm mittels UV-Photometer gemessen. Die nachfolgende Flüssigkultur wurde dann auf eine OD von 0,05 angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C und 100 rpm (linearer Bakterieneschüttler) solange inkubiert, bis sie sich etwa 3,5 Stunden in der stationären Phase befand (ca. 6,5 Stunden) und konnte dann für die Isolation extrazellulärer Proteine (3.5.1) verwendet werden.

3.1.5 Nachweis der Hämolyseproduktion auf Schafblutagarplatten

Um nachzuweisen, ob genetische Veränderungen der *S. aureus*-Stämme die Produktion von Hla und Hlb beeinflussen, wurde deren hämolytische Aktivität auf Schafblutagarplatten analysiert. Der CAMP-Faktor, welcher von *Streptococcus (S.) agalactiae* produziert wird, steigert die Hlb-Aktivität, welche wiederum den Hla-Effekt auf Schafblutagar inhibiert [189], wodurch eine zweifache Hämolysezone entsteht. Durch die synergistische Aktivität des CAMP-Faktors und Hlb entsteht eine vergrößerte hämolytische Zone.

Dafür wurden die *S. aureus*-Stämme senkrecht zum CAMP-Faktor-produzierenden Stamm *S. agalactiae* ausgestrichen. Als Positivkontrolle wurde der Hlb-produzierende *S. aureus*-Stamm ATCC25923 mitgeführt. Die Platten wurden 18 Stunden bei 37 °C und dann 4 Stunden bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Hämolyse bewertet.

3.1.6 Transduktion

Die Deletion des *spa*-Gens in *S. aureus* DIP erfolgte mittels Transduktion. Dabei wurde das *spa*-Gen durch ein Erythromycinresistenz (*eryR*)-Gen ersetzt. Dafür wurde zunächst der Donorstamm *S. aureus* 113 $\Delta spa::eryR$, mit dem Phagen $\phi 11$ infiziert. Es kommt vor, dass im Zuge der Phagenvermehrung im Bakterium (lytischer Zyklus) statt der Phagen-DNA Bruchstücke des bakteriellen Genoms in die Phagen eingebaut werden. Wenn diese Phagen ein anderes Bakterium infizieren, wird nun die bakterielle DNA in das bakterielle Genom eingebaut.

Als Empfängerstamm wurde *S. aureus* DIP verwendet. Dieser wurde als erstes auf einer Blutagarplatte ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde eine Kolonie gepickt und in 10 mL LK-Medium über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Diese wurde am nächsten Tag zentrifugiert (4.500 rpm, 10 min) und das Pellet anschließend in 0,5 mL LK-Medium resuspendiert. 100 µL der Suspension wurden nun in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und 2 Minuten bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurden 200 µL LK-Medium mit 10 mM Calciumchlorid sowie 100 µL Phagenlysats (*multiplicity of infection* (MOI) 5) zur Zellsuspension gegeben und 25 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 500 µL kaltes 0,02 M Natriumcitrat hinzugefügt, die Proben 10 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert und dann der Überstand entfernt. Das Pellet wurde nun in 500 µL 0,02 M Natriumcitrat resuspendiert und 3 Stunden auf Eis inkubiert. 100 µL des Ansatzes wurden schließlich auf LK-Agar (mit 10 µg/mL Erythromycin und 2 mM Natriumcitrat) ausplattiert. Die verbleibende Probe wurde zentrifugiert, ein Teil des Überstandes entfernt, das Pellet in den restlichen 100 µL resuspendiert und auf LK-Agar ausplattiert. Die Platten wurden bis zu 72 Stunden bei 37 °C inkubiert. Wenn Kolonien gewachsen sind, wurden diese zwei weitere Male gepickt, erneut auf LK-Agar ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Abschließend wurden von den so erhaltenen Protein A-Mutanten Glycerolstocks angelegt (3.1.1) und die Deletion des *spa*-Gens sowie der Erythromycinresistenz mittels PCR (3.1.7) nachgewiesen

3.1.7 Polymerasekettenreaktion zum Nachweis der Erythromycinresistenz

Zum Nachweis einer erfolgreichen Transduktion wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt, welche auf dem Nachweis des *eryR*-Gens mithilfe spezifischer Primer beruht. Zum Nachweis bakterieller DNA wurden zudem 16sRNA-Primer verwendet. Statt die bakterielle DNA aufzureinigen, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierfür wurde eine Kolonie von der Agarplatte im Mastermix resuspendiert. Der Mastermix wurde wie folgt angesetzt:

Volumen	Reagenz
4,3 µL	PCR-Wasser
5 µL	5x Gotaq buffer green
5 µL	MgCl ₂ (25 mM)
2,5 µL	dNTP (1 mM)
Je 2 µL	16SrRNA-5'/-3' (10 µM)
Je 2 µL	eryR-1/-2 (10 µM)
0,2 µL	Go taq -Polymerase
	1 Kolonie
25 µl	

Die Inkubation im Thermocycler erfolgte unter folgenden Bedingungen:

	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	10	1
Denaturierung	95	0,5	
Annealing	55	0,5	25
Elongation	72	1	
Final Elongation	72	7	1
Lagerung	4	∞	

Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese (3.1.9) untersucht.

3.1.8 Polymerasekettenreaktion zum Nachweis von *S. aureus*

Zur Bestätigung, dass es sich bei den Kolonien um *S. aureus* handelt, wurde eine PCR durchgeführt, welche *S. aureus*-spezifische Gyrase-Primer (Tabelle 2.2) verwendet. Zum Nachweis bakterieller DNA wurden zudem 16sRNA-Primer verwendet. Statt die bakterielle DNA aufzureinigen, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierfür wurde eine Kolonie von der Agarplatte im Mastermix resuspendiert. Der Mastermix wurde wie folgt angesetzt:

Volumen	Reagenz
4,3 µL	PCR-Wasser
5 µL	5x Gotaq buffer green
5 µL	MgCl ₂ (25 mM)
2,5 µL	dNTP (1 mM)
Je 2 µL	16SrRNA-5'/-3' (10 µM)
Je 2 µL	gyr-1/-2 (10 µM)
0,2 µL	Go taq -Polymerase
	1 Kolonie
25 µl	

Die Inkubation im Thermocycler erfolgte unter folgenden Bedingungen:

	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	10	1
Denaturierung	95	0,5	
Annealing	55	0,5	25
Elongation	72	1	
Final Elongation	72	7	1
Lagerung	4	∞	

Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese untersucht. Eine Probe wurde als *S. aureus*-positiv bezeichnet, wenn eine Gyrasebande nachgewiesen werden konnte.

3.1.9 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente durch das Anlegen einer elektrischen Spannung ihrer Größe nach aufgetrennt. Zur Herstellung eines Agarosegels wurden 1,5 % (w/v) Agarose durch mehrmaliges Aufkochen in 1 × TBE-Puffer gelöst. Sobald die Lösung abgekühlt war, wurde RedSafe (Verdünnung: 1:20.000), welches an Nukleinsäure bindet, hinzugefügt und das Gel in eine Gießkammer mit Probenkammern gegossen. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde es in eine Elektrophoresekammer mit Laufpuffer überführt und die Probenkämme entfernt. Es wurden 10 µL des PCR-Produkts bzw. des Markers (GeneRuler™ 100 bp) aufgetragen und ca. 1 Stunde bei 200 V aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel am VWR GenoPlex eingelesen.

3.2 Tierexperimentelle Methoden

3.2.1 Haltung

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte unter Einhaltung der Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes in den Räumen der Universität Würzburg (Josef-Schneider-Straße 2/D15, 97080 Würzburg) und der medizinischen Mikrobiologie der Universität Greifswald (Lutherstraße 6, 17489 Greifswald). Die Tiere wurden mit einem Tag-/Nachtrhythmus von 12/12 Stunden gehalten, der Zugang zu Futter und Trinkwasser erfolgte *ad libitum*.

3.2.2 Ethikantrag

Die Tierversuche zum Vergleich verschiedener *S. aureus*-Stämme im Mausmodell wurden von der lokalen Regierung Niederfranken (Nr.: 55.2 2532-2188, „Mausadaptierte *Staphylococcus aureus*-Stämme für die Entwicklung besserer Infektionsmodelle“), die Besiedlungsversuche wurden von der Ethikkommission Mecklenburg-Vorpommern (Nr. 7221.3-1-058/13, „Natürliche Reaktion von T-Zellen auf Kolonisierung und Infektion mit *Staphylococcus aureus* - nasale Besiedlung, Pneumonie, Abszess und Wundinfektion“) genehmigt. Die Experimente wurden nach dem Deutschen Tierschutzgesetz, der EU-Richtlinie 2010/63/EU für Tierversuche und der Föderation der Versuchstierfachverbände (FELASA) durchgeführt. Alle Tierversuche entsprechen den ARRIVE-Richtlinien.

3.2.3 Bakteriämie

Zum Vergleich der Virulenz verschiedener murinen *S. aureus*-Isolate wurde eine Bakteriämie in weiblichen 8 Wochen alten BALB/c-Mäusen (SOPF) induziert. Dafür wurden die Tiere mit einem Isofluran/Sauerstoffgemisch (1,5 % Isofluran) narkotisiert und anschließend intravenös (*i.v.*) in die Schwanzvene mit 100 µL Bakteriensuspension (5×10^7 CFU) infiziert.

Die Belastung der Tiere wurde anhand einer Scoresheets (Tabelle 3.1) zweimal täglich ermittelt. Es wurden Körpergewicht, Fell, Augen, Haltung, Spontanverhalten und Atmung der Tiere bewertet. Das Summieren der einzelnen Punkte lieferte den Summenbelastungsscore. Ein Summenbelastungsscore von ≥ 20 wurde als humaner Endpunkt definiert. Tiere, die diesen Score erreichten, wurden durch zervikale Dislokation getötet.

Der Versuch wurde nach 72 Stunden beendet. Dafür wurden die Tiere mit einer Überdosis CO₂ getötet und anschließend die Organe (Nieren, Leber, Milz und Herz) für die Bestimmung der bakteriellen Last entnommen.

Für die Titration der Infektionsdosis von *S. aureus* DIP wurde dieser in drei verschiedenen Infektionsdosen (5×10^7 CFU, 5×10^6 CFU, 5×10^5 CFU) eingesetzt und mit *S. aureus* NWM (5×10^7 CFU) verglichen. Der weitere Versuchsaufbau entspricht dem zuvor beschriebenen Ablauf. Zusätzlich wurden die Überstände der homogenisierten Nieren zur Bestimmung der Zytokin- und Chemokinkonzentrationen mittels CBA verwendet.

3.2.4 Pneumonie

Zum Vergleich der Virulenz verschiedener murinen *S. aureus*-Isolate wurde die Pneumonie in weiblichen 8 Wochen alten BALB/c-Mäusen (SOPF) induziert. Dafür wurden die Tiere mit einem Isofluran/Sauerstoffgemisch (1,5 % Isofluran) narkotisiert und anschließend *intranasal (i.n.)* mit 30 µL Bakteriensuspension (1×10^8 CFU) infiziert. Die Tiere wurden hierfür ca. 1 Minute in

aufrechter Position gehalten. Die Belastung der Tiere wurde wie zuvor beschrieben (3.2.3, Tabelle 3.1) zweimal täglich ermittelt.

Der Versuch wurde nach 48 Stunden beendet. Dafür wurden die Tiere mit einer Überdosis CO₂ getötet und anschließend die Organe (Lungen, Nieren und Leber) für die Bestimmung der bakteriellen Last entnommen.

Für die Titration der Infektionsdosis von *S. aureus* DIP wurde dieser in drei verschiedenen Infektionsdosen (2×10^8 CFU, 2×10^7 CFU, 2×10^6 CFU) eingesetzt und mit *S. aureus* NWM (2×10^8 CFU) verglichen. Der weitere Versuchsaufbau entspricht dem zuvor beschriebenen Ablauf. Zusätzlich wurden die Überstände der homogenisierten Lungen zur Bestimmung der Zytokin- und Chemokinkonzentrationen mittels CBA verwendet.

3.2.5 Besiedlung

Für die Besiedlung wurden weibliche 8 Wochen alte C57BL/6/Albino-Mäuse (B6(Cg)-Tyr^{c-2J}/J, SOPF) verwendet. Um die Mäuse mit *S. aureus* zu besiedeln, wurden die Tiere erst mit einem Isofluran-Sauerstoffgemisch (1,5 % Isofluran) narkotisiert und anschließend *i.n.* mit 10 µL Bakteriensuspension (*S. aureus* JSNZ, NWM, DIP: 1×10^8 CFU und *S. aureus* DIP: 3×10^7 CFU) besiedelt. Dafür wurden die Tiere ca. 1 Minute in aufrechter Position gehalten. Der Kontrollgruppe wurden 10 µL PBS *i.n.* appliziert.

Die Belastung der Tiere wurde anhand einer Scoresheets (Tabelle 3.1) zunächst nach 6 und 24 Stunden, danach alle 24 Stunden beurteilt. Es wurden Körpergewicht, Fell, Augen, Haltung, Spontanverhalten und Atmung der Tiere bewertet. Der Summenbelastungsscore wurde durch das Summieren der einzelnen Punkte ermittelt.

Der Versuch wurde nach 24 Stunden bzw. 7 Tagen beendet. Dafür wurden die Tiere *intraperitoneal* (*i.p.*) mit Ketamin/Xylazin (100 mg/10 mg pro kg Körpergewicht) narkotisiert und anschließend durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus ausgeblutet. Nachdem die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet wurden erfolgte die Entnahme der zervikalen Lymphknoten für die durchflusszytometrischen Analysen. Zur Bestimmung der bakteriellen Last wurden die Lungen entnommen. An Tag 0, 1, 3, 5 und 7 wurden zudem Stuhlproben der Mäuse gesammelt. Diese wurden sowohl zur Bestimmung der bakteriellen Last als auch zur Analyse der IgA-AK verwendet. Des Weiteren wurde die Nase homogenisiert und die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen mittels CBA gemessen sowie die bakterielle Last ermittelt.

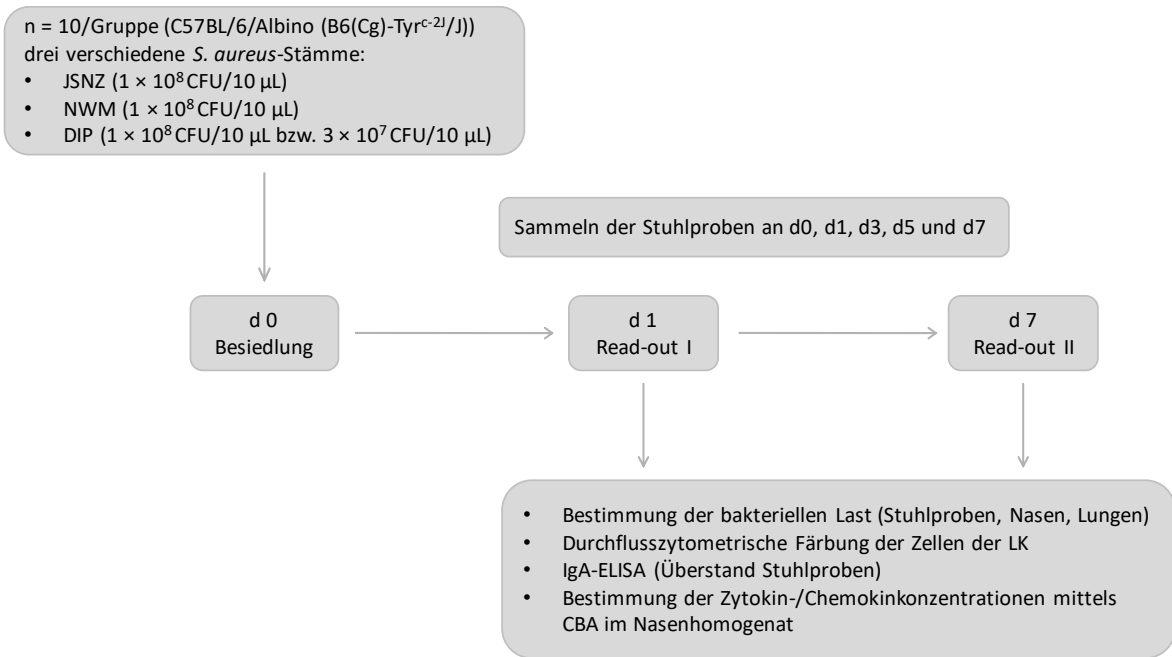


Abbildung 3.1: Schema des Versuchsaufbaus der Besiedlung

Weibliche C57BL/6/Albino (B6(Cg)-Tyr^{c-2j}/J) Mäuse (n = 10) wurden mit 10 μL *S. aureus* (1 × 10⁸ CFU bzw. 3 × 10⁷ CFU) *i.n.* besiedelt. Der Kontrollgruppe wurden 10 μL PBS appliziert. Der Belastungsscore wurde täglich ermittelt. Zur Bestimmung der bakteriellen Last wurden an den Tagen 0, 1, 3, 5 und 7 Stuhlproben von den Mäusen gesammelt. Zudem wurde in den Stuhlproben die IgA-Immunantwort mittels ELISA gemessen. Der Versuch wurde nach 24 Stunden bzw. 7 Tagen beendet. Dafür wurden die Tiere *i.p.* mit Katamin/Xylazin narkotisiert und nach der Blutentnahme durch zervikale Dislokation getötet. Die zervikalen Lymphknoten wurden für durchflusszytometrische Analysen genutzt. Die Nasen sowie die Lungen wurden zur Bestimmung der bakteriellen Last verwendet. Zudem wurden die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen im Nasenhomogenat mittels CBA detektiert.

Tabelle 3.1: Parameter zur Beurteilung der Schwere der Infektion (adaptiert nach AG Ohlsen, Würzburg)

Bewertung	Punkte
1 Körpergewicht	
• Unbeeinflusst oder Anstieg	0
• Gewichtsreduktion < 20%: die jeweilige Gewichtsreduktion in % geht als Punktwert in den Score ein 1 – 19 (z.B. Reduktion um 8 % Körpergewicht = 8 Punkte)	
• Gewichtsreduktion ≥20%	20
2 Allgemeinzustand	
2.1 Fell	
• normal, sauber gepflegtes Fell	0
• leicht gestäubtes Fell	2
• struppiges Fell	4
2.2 Augen	
• Augen klar / sauber	0
• Augen ungeputzt / verklebt	3
2.3 Haltung	
• Normale Haltung	0
• Unnormale Haltung	10
• Hoher Rücken, Stelzgang	20
2.4 Zusätzliche/ sofortige Abbruchkriterien	
Verkrampfungen, Lähmungen, Zittern, Atemgeräusche, Tier fühlt sich kalt an	20
3 Spontanverhalten	
• Normales Verhalten (Neugier, lebhaft)	0
• Geringe Abweichungen vom Normalverhalten (leicht reduzierte Aktivität)	1
• Moderate Abweichungen vom Normalverhalten (reduzierte Aktivität)	2
• Ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik	5
• Selbstisolation, Lethargie, Koordinationsstörungen	10
4 Klinischer Befund / Atmung	
• Normale Atmung	0
• Beschleunigte Atmung	5
• Schwere Atmung	10
• Schwache Atmung	20
Belastungsgrad	Punkte
Belastungsgrad 0 = keine Belastung; Tier wird als gesund klassifiziert	0 – 3
Belastungsgrad 1 = geringe Belastung; Tier wird als gering erkrankt klassifiziert	4 – 9
Belastungsgrad 2 = mittelgradige Belastung; Tier gilt als moderat erkrankt	10 - 15
Belastungsgrad 3 = mittel- bis hochgradige Belastung; Tier gilt als moderat erkrankt bis moribund; Ggf. Versuch abbrechen	16 – 19
Belastungsgrad 4 = hochgradige Belastung; Tier gilt als moribund; Versuch abbrechen	≥ 20

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Isolation von Zellen aus den zervikalen Lymphknoten

Für die Isolation der Zellen aus den zervikalen Lymphknoten wurde zunächst die Maus durch zervikale Dislokation getötet und die zervikalen Lymphknoten entnommen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die zervikalen Lymphknoten in sterilem 10%igem FCS/PBS aufbewahrt. Nun wurden die Lymphknoten mit einem Spritzenstempel durch ein 70 µm Zellsieb in ein 50 mL Zentrifugengefäß gedrückt. Zwischendurch wurde sowohl das Sieb als auch der Stempel mit 10%igem FCS/PBS gespült. Anschließend wurde das Zentrifugengefäß mit 10%igem FCS/PBS auf 30 mL aufgefüllt und sieben Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in 400 µL Proliferationsmedium resuspendiert und die Zellzahl am LSRII Flow Cytometer (BD) bestimmt (3.4.1).

3.3.2 Bestimmung der bakteriellen Last

Um die bakterielle Last zu bestimmen wurden Homogenisierungsröhrchen mit Zirkonoxid Beads (Durchmesser: 1,4/2,8 mm) befüllt, autoklaviert und 1 mL steriles PBS hinzugefügt. Die Organe wurde auf Eis aufgetaut und dann unter sterilen Bedingungen in die Homogenisierungsröhrchen überführt.

Das Homogenisieren erfolgte im Homogenisator bei 6.000 rpm für 2 x 20 Sekunden mit 15 Sekunden Pause. Für die Bestimmung der bakteriellen Last im Stuhl wurde die Proben auf Eis aufgetaut, abgewogen und mit sterilem PBS auf 0,2 g/mL eingestellt.

Anschließend wurden unter sterilen Bedingungen eine dekadische Verdünnungsreihe des Homogenisats angefertigt. Es wurden jeweils 3 x 10 µL/Verdünnungsstufe auf LB-Agar-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und am darauffolgenden Tag die Kolonien (CFU, *colony forming units*) gezählt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors konnte so die bakterielle Last/Organ (CFU/Organ) ermittelt werden.

Tabelle 3.2: Übersicht über die verwendete Verünnungsstufen

Organ/Material	Niedrigste Verdünnung	Höchste Verdünnung
Lunge	unverdünnt	1:1.000
Nieren	unverdünnt	1:1.000
BALF	unverdünnt	1:100.000
NALF	unverdünnt	1:100.000
Stuhl	unverdünnt	1:100

3.3.3 Koagulationsassay

Es konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* teils wirtsspezifische Koagulationsfaktoren besitzt, weshalb die Koagulation von murinem Plasma Aufschluss über die Wirtsadaptation liefern würde [190]. Aus diesem Grund wurden 65 μL einer Übernachtskultur der murinen *S. aureus*-Stämme mit 500 μL murinem Plasma in einem Glasröhrchen bei 37 °C inkubiert. Nach 30 Minuten, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h und 18 h wurde die Koagulationsfähigkeit der Stämme visuell anhand des folgenden fünfstufigen Punktesystem nach Sperber *et al.* [191] bewertet:

- 0: keine Gerinnung, Plasma ist klar
- 1: kleine Flocken zu erkennen, Plasma trübt sich leicht
- 2: Kleines Gerinnsel (bis ca. 40 % des Plasmavolumens)
- 3: Großes Gerinnsel, keine Invertierung möglich ohne Ablösen des Gerinnsels vom Röhrchenboden
- 4: vollständige Gerinnung des Plasmas, Invertierung möglich.

Der Versuch wurde für alle Stämme dreimal durchgeführt.

3.3.4 Whole Blood Survival Assay

Mittels des Whole Blood Survival Assay wurde das Überleben muriner *S. aureus*-Stämme in murinem Vollblut analysiert, da dieses ebenfalls Aufschluss über die Wirtsadaptation liefern kann. Dafür wurden zunächst 10 mL TSB mit einer Kolonie *S. aureus* angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler (200 rpm., zirkulär) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Kultur zentrifugiert (10 min, 4 °C, 4.000 \times g), der Überstand verworfen und das Pellet mit 20 mL PBS gewaschen (10 min, 4 °C, 4.000 \times g). Anschließend wurde das Pellet in 15 mL PBS resuspendiert. Die OD bei 595 nm gemessen, die Bakteriensuspension auf eine OD von 0,05 eingestellt und dann 1:40 in PBS verdünnt. Schließlich wurden 125 μL der Bakteriensuspension mit 375 μL heparinisiertem murinem Blut gemischt (Startkonzentration: ca. $2,5 \times 10^5$ CFU/ mL), jeweils 100 μL in vier Wells einer 96°-Platte pipettiert und bei 37 °C im Schüttler (200 rpm, zirkulär) inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Blut verwendet, welches mit PBS gemischt wurde.

Nach 0 h, 1 h, 3 h, 5 h und 24 h wurden 20 μL entnommen, mit 180 μL PBS gemischt und 3 Minuten bei Raumtemperatur (RT) im Ultraschallbad bei 45 kHz behandelt. Anschließend wurden eine dekadische Verdünnungsreihe angefertigt und jeweils 3 \times 10 μL der Verdünnungen 10^{-2} – 10^{-5} auf LB-Agar ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Der Versuch wurde für jedes Isolat dreimal durchgeführt.

3.3.5 Whole Genome Sequencing

Die Sequenzierung der *in vivo* verwendeten *S. aureus*-Stämme wurde am Robert Koch-Institut in Berlin durchgeführt. Es wurde eine Illumina MiSeq paired-end-Sequenzierung mit einer Ziel-Fragmentgröße von 300 bp und einer Abdeckung von > 90 × angewendet. Für die Qualitätskontrolle wurde das NGS tool kit 13 (70 % der Basen mit einem phred quality score > 20) genutzt. Das *de novo* Assembly einer zusammenhängenden Sequenz (*contiguous sequences*) erfolgte aus den qualitativ hochwertigen *reads* mit der Software SPAdes v3.11.0 [192], die Annotation mit der Software Prokka [193]. Mit Hilfe der Software Geneious 10.0.5 (Biomatters Ltd., Australia) wurden die verwendeten Stämme mit *S. aureus* Newman (GenBank Accession Number: AP009351) verglichen. Dieses Projekt wurde bei der DDBJ/ENA/GenBank mit den folgenden Accessionnumbers hinterlegt: QWKQ00000000 für JSNZ, QWKR00000000 für muC88d, QWKS00000000 für DIP und QWKT00000000 für muCC8c.

3.4 Durchflusszytometrische Analysen

3.4.1 Bestimmung der Zellzahl mittels TruCount™ Beads

Um die Zellzahl mittels TruCount™ Beads zu bestimmen, wurden die Zellen zunächst im Medium resuspendiert. Anschließend wurden 20 µL der Zellsuspension mit 200 µL TruCount™-Lösung, deren *bead*-Konzentration bekannt war, vermischt und am LSRII Flow Cytometer (BD) gemessen. Insgesamt wurden 50.000 Ereignisse gezählt. Die Berechnung erfolgte anhand der nachfolgenden Formel:

$$\text{Zellkonzentration} \left(\frac{\text{Zellen}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Anzahl der eingesetzten } beads}{\text{Anzahl gezählte } beads} \times \frac{\text{Anzahl gezählte Zellen}}{0,02 \text{ mL}}$$

3.4.2 Nachweis von Zytokinen im Cytometric Bead Array (CBA)

Die Bestimmung der Zytokin- und Chemokinkonzentrationen in den homogenisierten Lungen (Pneumonie) bzw. Nieren (Bakteriämie) erfolgte mit Hilfe des „LEGENDplex™ Mouse Th Cytokine Panel (13-plex)“ bzw. des „LEGENDplex™ Mouse Proinflammatory Chemokine Panel (13-plex)“ der Firma BioLegend®.

Beide Panel enthalten 13 *beads*, die sich in Größe und Fluoreszenzintensität (FL3) unterscheiden, welches die simultane Quantifizierung von 13 verschiedenen Zytokinen bzw. Chemokinen ermöglicht. Die *beads* des Zytokinpanels sind mit Antikörpern gegen die murinen Zytokine IL-2, IL-4, IL-5, IL IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IFN-γ und TNF-α konjugiert. Die *beads* des Chemokinpanels sind mit Antikörpern gegen die murinen Chemokine MCP-1 (CCL2), RANTES (CCL5),

IP-10 (CXCL10), Eotaxin (CCL11), TARC (CCL17), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), MIG (CXCL9), MIP-3 α (CCL20), LIX (CXCL5), KC (CXCL1), BLC (CXCL13) and MDC (CCL22) konjugiert. Wenn die *beads* mit einer Probe, welche die Zielanalyten enthält, gemischt werden, binden die spezifischen Antikörper an den entsprechenden Analyten. Nach einem Waschschrift erfolgt die Zugabe bioinylierter Detektionsantikörper, welcher die *bead*-gebundenen Zytokine bzw. Chemokine bindet. Danach wird Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) hinzugefügt, das an die biotinylierten Detektionsantikörper bindet, welche die Fluoreszenzintensität im Verhältnis zur Menge der gebundenen Analyten liefert. Da nun die *beads* nach Größe und Fluoreszenzintensität am Durchflusszytometer unterschieden werden können, können somit Analyten-spezifische Populationen voneinander getrennt werden und PE-Fluoreszenzsignal quantifiziert werden. Mittels des mitgeführten Standards konnte dann die absolute Konzentration eines Analyten ermittelt werden.

Die Zytokin- und Chemokinbestimmung erfolgte nach Herstellerangaben, jedoch wurden die verwendeten Volumina halbiert. Die Messung erfolgte am LSRII Flow Cytometer (BD). Für die Auswertung der Daten wurde die LEGENDplex™ Data Analysis Software genutzt.

3.4.3 Nachweis intrazellulärer Zytokine

Zur Bestimmung der intrazellulären Zytokine in den Zellen der zervikalen Lymphknoten wurden diese zunächst gemäß Protokoll isoliert (3.3.1) und anschließend auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/mL eingestellt. Nun wurden 400 μ L der Zellsuspension pro Well in eine 24°-Platte geben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 μ L Stimulationsansatz hinzufügen und 4 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und zweimal mit 2 mL PBS gewaschen und zentrifugiert (300 \times g, 7 min). Zu den dekantierten Zellen wurden 50 μ L NIR-Lösung (1:250 in PBS verdünnt) pipettiert und die Zellen wurden 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit 2 mL FACS-Puffer wurde der Überstand dekantiert, 50 μ L Fc-Block-Lösung (1:25 in FACS-Puffer) zu jeder Probe hinzugefügt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 4 °C erfolgte die Zugabe des 1. Antikörpergemisches (50 μ L/Probe, in FACS-Puffer verdünnt) zur Färbung der extrazellulären Marker (Tabelle 3.3). Die Proben wurden gut gemischt und 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit 2 mL FACS-Puffer gewaschen, bei 300 \times g und 4 °C 7 Minuten zentrifugiert und dann mit 500 μ L Fixation Buffer 20 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (300 \times g, 7 min, RT) wurde der Überstand dekantiert und die Proben 3 \times mit je 1 mL Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer gewaschen und zentrifugiert (300 \times g, 7 min, RT). Nachdem der Überstand dekantiert wurde, wurde 50 μ L Fc-Block-Lösung (1:25 in 1 \times Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer) je Probe hinzugefügt und 5 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nun folgte die Zugabe des 2. Antikörpergemisches (50 μ L in

1 × Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer) zur Färbung der intrazellulären Zytokine. Die Proben wurden gut gemischt und 30 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Abschließend wurden die Proben erneut zweimal mit je 2 mL 1 × Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer gewaschen, bei 300 × g 7 Minuten bei RT zentrifugiert, in 150 µL FACS-Puffer resuspendiert und am LSRII Flow Cytometer (BD) gemessen.

Tabelle 3.3: Übersicht über die verwendeten Antikörper zum Nachweis intrazellulärer Zytokine

Marker	AK-Gemisch	Konjugat	Host	Klon	Verd.
CD 3	extrazellulär	PerCP/cy5.5	Rat	17A2	1:50
CD 4	extrazellulär	FITC	Rat	RM4-5	1:200
CD 25	extrazellulär	BV 650	Rat	PC61	1:25
CD 19	extrazellulär	APC/Cy7	Rat	6D5	1:100
TCR γδ	extrazellulär	PE/Cy7	arm.Hamster	GL3	1:50
CD127	extrazellulär	BV510	Rat	A7R34	1:10
IL-17A	intrazellulär	Pe/Dazzle	Rat	TC11-18H10.1	1:10
IL-22	intrazellulär	PE	Goat	Poly5164	1:10
IL-17F	intrazellulär	Alexa 647	Mouse	9D3.1C8	1:50
IL-9	intrazellulär	BV 421	Rat	RM9A4	1:50

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Fällung extrazellulärer Proteine

Für die Gewinnung extrazellulärer Proteine von *S. aureus* wurden die Flüssigkulturen (3.1.4.2) 15 Minuten bei 8.000 x g und 4 °C zentrifugiert und anschließend der Überstand steril filtriert. Auf Eis und unter Schwenken erfolgte dann die tröpfchenweise Zugabe eiskalter 100%iger Trichloressigsäure (TCA) im Verhältnis 1:10 (Endkonzentration: 10 %). Die Proteine wurden 36 Stunden bei 4 °C gefällt. Durch Schwenken wurden die ausgefallten Proteine resuspendiert und dann für 1 Stunde bei 11.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet 5 × gewaschen. Dafür wurde das Pellet in 70%igem unvergälltem Ethanol resuspendiert, für 20 Minuten bei 700 rpm auf dem Thermomixer geschüttelt und danach 7 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nachfolgend wurde das Pellet noch einmal in 96%igem unvergälltem Ethanol resuspendiert und erneut für 20 Minuten bei 700 rpm geschüttelt. Nach der Zentrifugation (7 min, 13.000 rpm) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet für 2 Stunden unter der Werkbank getrocknet. Das Pellet wurde schließlich in ca. 150 µL Rehydratisierungspuffer (RHB) aufgenommen und bei 700 rpm solange geschüttelt bis sich die

Proteine vollständig gelöst hatten. Abschließend wurde die Probe erneut zentrifugiert (13.000 rpm, 30 min), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt. Die Proteine wurden bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford ist ein kolorimetrischer Assay, welcher auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an unpolare und kationische Seitenketten von Proteinen beruht. Durch die Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm.

Die Erstellung der Standardgeraden erfolgte mittels Rinderserumalbumin (BSA, *bovine serum albumin*). Das BSA in der Konzentration 0,1 mg/mL wurde wie folgt mit *A. bidest.* verdünnt:

Tabelle 3.4: Präparation des Standards zur Erstellung der Eichgraden zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Konzentration [$\mu\text{g/mL}$]	0	1	2	4	6	8	10	12
BSA [μL]	-	10	20	40	60	80	100	120
<i>A. bidest.</i> [μL]	800	790	780	760	740	720	700	680

Abschließend wurde jeder Ansatz mit 200 μL Bradford-Reagenz versetzt, gemischt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Proben wurden nun in eine Messküvette überführt und die Absorption bei 595 nm wurde am UV-Photometer gemessen. Durch das Auftragen der Absorption gegen die Proteinkonzentration wurde die Standardgerade erstellt.

Um die Proteinkonzentration in einer Probe zu bestimmen wurden die zu testenden Proteinlösungen unverdünnt oder 1:10 verdünnt eingesetzt. Je nach Proteinkonzentration wurden 1-5 μL verwendet, mit *A. bidest.* auf 800 μL aufgefüllt und mit 200 μL Bradford-Reagenz gemischt. Der Leerwert (RHB-Puffer) wurde wie das Proteingemisch angesetzt. Die Proben wurden ebenfalls 5 Minuten inkubiert und anschließend im UV-Photometer gemessen. Unter Berücksichtigung des verwendeten Volumens und der eingesetzten Verdünnung konnte die Proteinkonzentration mittels der Standardgeraden berechnet werden.

3.5.3 ELISA

Zum Nachweis einer erfolgreichen Besiedlung wurde unspezifisches IgA im Stuhl bestimmt. Dafür wurde eine 96 °-Platte mit polyklonalem α -Maus-IgA (Konzentration: 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Karbonatpuffer; 50 $\mu\text{L}/^\circ$) beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um spezifisches IgA nachzuweisen, wurden die extrazellulären Proteine von *S. aureus* NWM Δ spa, JSNZ Δ spa und DIP Δ spa zunächst zu gleichen Teilen gemischt. Anschließend wurde eine 96°-Platte mit dem Proteingemisch (Konzentration: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Karbonatpuffer; 50 $\mu\text{L}/^\circ$) beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer (PBS/0,05% Tween) gewaschen. Um freie Bindungsstellen zu blockieren wurden jeweils 100 μL Blockpuffer/ $^\circ$ (10 % FCS/PBS) pipettiert und 1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Blockpuffer entfernt und 50 $\mu\text{L}/^\circ$ der Stuhlproben (unverdünnt oder 1:200 in 10 % FCS/PBS) in Doppelbestimmung pipettiert. Als Leerwert diente Blockpuffer. Die Platten wurden erneut eine Stunde bei RT inkubiert, dann dreimal gewaschen und schließlich mit 50 $\mu\text{L}/^\circ$ Ziege anti-Maus IgA POD (1:5.000 in Blockpuffer) 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte die Zugabe der Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung (50 $\mu\text{L}/^\circ$). Nach 10 Minuten wurde die Substratreaktion durch die Zugabe von 20 $\mu\text{L}/^\circ$ 2N Schwefelsäure gestoppt. Zur Bestimmung des Antikörpergehalts wurde die Absorption bei 450 nm mit dem TECAN photometrisch bestimmt.

Um die Werte verschiedener Platten zu normalisieren, wurde ein Plattenstandard mitgeführt. Zunächst wurde von allen ermittelten Werten der Leerwert abgezogen. Anschließend wurde der Mittelwert über alle Standards (*ultimate mean*) gebildet. Zur Normalisierung wurde dann jeder Wert durch den Plattenstandard dividiert und mit dem *ultimate mean* multipliziert. Abschließend wurde der Mittelwert der Duplikate gebildet und die Daten mit Hilfe von GraphPad graphisch dargestellt sowie statistisch ausgewertet.

3.6 Statistische Auswertung

Die graphische Darstellung sowie die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgten mit der Software GraphPad Prism 7. Da keine der ermittelten Messwerte normalverteilt waren, wurde für den Vergleich zwischen mehreren Gruppen der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's Post Hoc Test verwendet. Es wurde jeweils eine Kontrollgruppe mit den anderen Gruppen verglichen. p-Werte $p \leq 0,05$ wurden als signifikant (*) gewertet. $p \leq 0,01$ wurden mit **, $p \leq 0,001$ mit *** und $p \leq 0,0001$ mit **** gekennzeichnet.

Kapitel 4 Ergebnisse

4.1 *In vitro* Vorversuche zur Auswahl von murinen *S. aureus*-Stämmen für Infektionsversuche im Mausmodell

Es ist bekannt, dass *S. aureus*-Linien und viele *S. aureus*-Virulenzfaktoren stark wirtsspezifisch sind [163,194]. So sind die Gene des Immunevasionsclusters *chp*, *sak* und *scn*, die auf Sa3int-Phagen kodiert sind, humanspezifisch und kommen nur sehr selten in murinen *S. aureus*-Isolaten vor [178,182,184]. Des Weiteren sind Mäuse nur wenig sensitiv gegenüber diversen Virulenzfaktoren humaner *S. aureus*-Isolate, wie z.B. PVL, Zytotoxinen und SAGs. Obwohl die Wirtsspezifität von Virulenzfaktoren bekannt ist, werden häufig humane *S. aureus*-Isolate im Mausmodell zur Untersuchung der Pathogenität von *S. aureus* verwendet. Um jedoch ein besseres Verständnis über den Prozess der Kolonisierung und Infektion mit *S. aureus* zu erlangen und neue Strategien gegen *S. aureus* entwickeln zu können, sollte die Wirtsspezifität von *S. aureus* berücksichtigt werden.

Um zu untersuchen, ob mausadaptierte *S. aureus*-Stämme im Mausmodell virulenter sind als humane Isolate, sollten zunächst geeignete *S. aureus*-Isolate ausgewählt werden. Aus insgesamt 254 murinen *S. aureus*-Isolaten von Labor- und Wildmäusen wurden 5 Stämme pro klonalem Komplex (CC, *clonal complex*) mit einem repräsentativen *spa*-Typ sowie typischen Phagenmustern und Virulenzgenen ausgewählt (Tabelle 4.1). Die Linie CC88 ist die vorherrschende Linie in Labormäusen, wohingegen CC49 sowie CC8 die dominanten Linien in Wildmäusen darstellen [178,182,183].

Da bekannt ist, dass adaptierte *S. aureus*-Stämme das Plasma ihres Wirts koagulieren können, wurden die ausgewählten Stämme anschließend bezüglich ihrer Fähigkeit murines Plasma zu koagulieren untersucht (Abbildung 4.1A) [190]. Als Kontrolle wurde das humane *S. aureus*-Isolat Newman (NWM) mitgeführt, da dieser Stamm häufig im Mausmodell verwendet wird.

Tabelle 4.1: Übersicht über Genotyp, Virulenzgene und Phagenmuster der ausgewählten maus-adaptierten *S. aureus*-Stämme

Stamm	Wirt	Herkunft	Spa-Typ	MLST	nicht-egc SAg	egc SAg	nuc	gyr	agr	eta, etd	pvl	mecA	Phagenintegrase	sak	chp	scn	Referenz
muCC8a	Erdmaus	Gotha (TH, Deutschland)	t211	CC8	-	-	+	+	1	-	-	-	-	-	-	-	Trübe, 2018
muCC8b	Erdmaus	Gotha (TH, Deutschland)	t211	CC8	-	-	+	+	1	-	-	-	-	-	-	-	Trübe, 2018
muCC8c	Feldmaus	Gotha (TH, Deutschland)	t211	CC8	-	-	+	+	1	-	-	-	-	-	-	-	Trübe, 2018
muCC8d	Gelbhalsmaus	Gotha (TH, Deutschland)	t211	CC8	-	-	+	+	1	-	-	-	-	-	-	-	Trübe, 2018
muCC8e	Rötelmaus	Horst (MV, Deutschland)	t211	CC8	-	-	+	+	1	-	-	-	-	-	-	-	Trübe, 2018
muCC49a	Gelbhalsmaus	Horst (MV, Deutschland)	t208	CC49	-	-	+	+	2	-	-	-	5	-	-	-	Mrochen, 2017
muCC49b	Rötelmaus	Horst (MV, Deutschland)	t208	CC49	-	-	+	+	2	-	-	-	5	-	-	-	Mrochen, 2017
muCC49c	Rötelmaus	Horst (MV, Deutschland)	t208	CC49	-	-	+	+	2	-	-	-	5	-	-	-	Mrochen, 2017
muCC49d	Gelbhalsmaus	Heimerdingen (BW, Deutschland)	t4189	CC49	-	-	+	+	2	-	-	-	5	-	-	-	Mrochen, 2017
DIP	Rötelmaus	Heimerdingen (BW, Deutschland)	t4189	CC49	-	-	+	+	2	-	-	-	5	-	-	-	Mrochen, 2017
muCC88a	C57BL/6NCrl	Kingston (NY, USA)	t186	CC88	-	-	+	+	3	-	-	-	1	-	-	-	Schulz, 2017
muCC88b	C57BL/6NCrl	Kingston (NY, USA)	t12341	CC88	-	-	+	+	3	-	-	-	1	-	-	-	Schulz, 2017
muCC88c	C57BL/6	Vendor (USA)	t186	CC88	-	-	+	+	3	-	-	-	-	-	-	-	Schulz, 2017
muCC88d	Erdmaus	Gotha (TH, Deutschland)	t2311	CC88	-	-	+	+	3	-	-	-	1,2,3	+	+	+	Schulz, 2017
JSNZ	C57BL/6J	Auckland (Neuseeland)	t729	CC88	-	-	+	+	3	-	-	-	1	-	-	-	Holtfreter, 2013
Newman	human	Southampton (Hampshire, UK)	t008	CC8	a	-	+	+	1	-	-	-	3,5,6,7	+	+	+	Duthie & Lorenz, 1952

Abkürzungen: TH – Thüringen; MV – Mecklenburg-Vorpommern; BW – Baden-Württemberg; SAg – Superantigen; egc – Enterotoxingencluster; nuc – Nuklease; gyr – Gyrase; agr – akzessorischer Genregulator (accessory gene regulator); eta/etd – Exfoliativtoxin a/d; pvl – Panton-Valentine Leukozidin; mecA – Methicillinresistenz; sak – Staphylokinase; chp – Chemotaxis-inhibierendes Protein; scn – Staphokokken-Komplementinhibitor; spa – Staphylokokken Protein A; MLST – Multi Locus Sequenz Typisierung; rot hinterlegt: *in vivo* verwendete *S. aureus*-Isolate

Alle Stämme waren in der Lage murines Plasma zu koagulieren (Abbildung 4.1A). Innerhalb der Linie CC8 hatte der Stamm muCC8a die geringste prokoagulatorische Aktivität, während das humane *S. aureus*-Isolat Newman das murine Plasma am stärksten koagulierte. Die murinen Isolate der Linie CC49 wiesen alle eine ähnlich starke prokoagulatorische Aktivität auf. Die größte Diversität zeigte sich bei den Isolaten der Linie CC88. Der Stamm muCC88a war kaum in der Lage das Plasma zu koagulieren, während die Stämme muCC88b und muCC88c eine moderate Koagulation zeigten. Bei *S. aureus* JSNZ war innerhalb der ersten 2 Stunden keine Koagulation sichtbar. Das änderte sich jedoch nach 4 Stunden, als ein großes Gerinnsel erkennbar war. Beim Stamm muCC88d erfolgte die Koagulation schneller und war bereits nach 4 Stunden vollständig abgeschlossen.

Anhand der Ergebnisse der Koagulationsassays wurden drei Stämme pro Linie mit starker prokoagulatorischer Aktivität ausgewählt und anschließend deren Überleben in murinem Vollblut untersucht (Abbildung 4.1B). Die Probenzahl wurde reduziert, da hierfür große Mengen frischen Mausbluts (375 µL pro Stamm) benötigt werden. Dieser Test diente dazu die *in vivo*-Bedingungen zu imitieren und somit Stämme auszuwählen, die gut an den murinen Wirt angepasst sind.

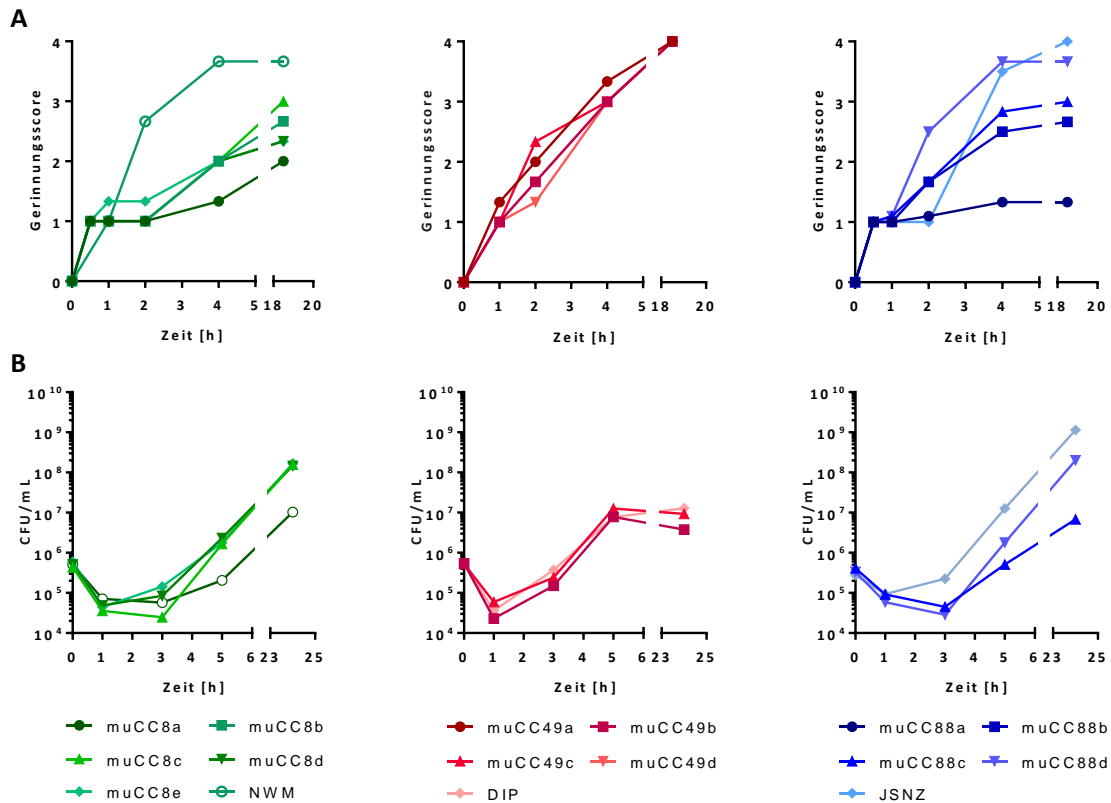


Abbildung 4.1: Auswahl geeigneter mausadaptierter *S. aureus*-Stämmen für murine Infektionsversuche.
 A) Koagulationsassay zur Analyse der Wirtsanpassung: Je 5 murine *S. aureus*-Isolate/Linie (CC8, CC49, CC88) sowie der humane *S. aureus*-Stamm Newman (CC8) wurden in 500 μ L murinem Plasma inkubiert und ihre Koagulationsfähigkeit verglichen. Die Koagulation wurde nach 1 h, 2 h, 4 h und 18,5 h visuell durch einen verblindeten Experimentator bewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier technischer Replikate.
 B) Vergleich von drei *S. aureus*-Stämmen/Linie bezüglich ihrer Replikationsfähigkeit in murinem Vollblut. 1×10^6 CFU/mL einer Bakterienkultur wurden mit frischem murinem Vollblut im Verhältnis 1:4 gemischt. Für die Bestimmung der CFU/mL wurde nach 0 h, 1 h, 3 h, 5 h und 24 h eine dekadische Verdünnungsreihe hergestellt, drei technische Replikate auf LB-Agar-Platten ausplattiert und für ca. 16 h bei 37 °C inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der ermittelten CFU von drei technischen Replikaten. Abkürzungen: NWM, Newman.

Alle Stämme zeigten zunächst eine Reduktion der CFU (*colony forming units*, koloniebildende Einheiten) um etwa eine log-Stufe. Bei den Stämmen der Linie CC8 war dies am stärksten bei *S. aureus* muCC8c ausgeprägt. Die Stämme muCC8d und muCC8e zeigten bereits nach 3 Stunden wieder einen Anstieg der CFU. Alle murinen Stämme der Linie CC8 wiesen am Ende jedoch eine ähnliche CFU auf und waren somit in der Lage in murinem Blut zu replizieren. Die Replikation des humanen Isolates *S. aureus* Newman hingegen war im Vergleich dazu um eine log-Stufe vermindert. Die Isolate der Linie CC49 zeigten erneut keine großen Unterschiede, während die Isolate der Linie CC88 wiederum die größte Diversität aufwiesen. Vor allem *S. aureus* JSNZ zeigte eine sehr gute Replikation (10^9 CFU/mL), wohingegen die Replikation des Stammes muCC88c um drei log-Stufen verringert war. Das Isolat muCC88d zeigte zunächst eine stärkere Reduktion der CFU im Vergleich zu JSNZ, wies dann aber schließlich ebenfalls eine gute Replikation auf.

Aufgrund der ermittelten Ergebnisse in den *in vitro*-Vorversuchen wurden vier Stämme ausgewählt, welche anschließend im murinen Pneumonie- sowie Bakteriämiemodell mit dem humanen *S. aureus*-Isolat Newman verglichen werden sollten: muCC8c, *S. aureus* DIP, muCC88d und JSNZ (Tabelle 4.1). Mit Ausnahme von *S. aureus* JSNZ, welcher nach einem Ausbruch von Vorhautdrüsenabszessen bei männlichen C57BL/6J-Mäusen entdeckt wurde, handelt es sich bei den Stämmen um Isolate, die aus Wildmäusen (Feld-, Rötel- und Erdmaus; Tabelle 4.1) isoliert wurden.

4.2 Die mausadaptierten *S. aureus*-Stämme unterscheiden sich deutlich in ihrer Virulenz im Pneumoniemodell

Nachdem verschiedene murine *S. aureus*-Isolate ausgewählt wurden, wurden diese im murinen Pneumoniemodell mit dem humanen Isolat Newman verglichen. Hierfür wurden weibliche BALB/c-Mäuse *intranasal* mit 1×10^8 CFU *S. aureus* (30 μ L) infiziert und zweimal täglich begutachtet. Es wurde das Gewicht ermittelt und der Zustand der Tiere beurteilt (Tabelle 3.1). Anschließend wurden das Überleben sowie der Belastungsscore ermittelt. Nach 46 Stunden wurde der Versuch beendet und die bakterielle Last in den Lungen und Nieren bestimmt.

Bereits beim Überleben fielen deutliche Unterschiede auf. Während 100 % der Tiere überlebten, die mit muCC88d, JSNZ bzw. Newman infiziert waren, starben 90 % der DIP-infizierten Tiere bereits 14 Stunden nach Infektion (Abbildung 4.2A). Bei muCC8c-infizierten Tieren lag die Letalität bei 20 %. Der Belastungsscore (Abbildung 4.2B) war vergleichbar zwischen *S. aureus* Newman und den murinen *S. aureus*-Isolaten, jedoch ist zu beachten, dass *S. aureus* DIP nicht mit einbezogen werden konnte. Nach 46 Stunden zeigten sich lediglich geringe Unterschiede im Belastungsscore zwischen muCC88d und JSNZ (CC88) im Vergleich zu Newman.

Überraschenderweise war die bakterielle Last in den Lungen (Abbildung 4.2C) von muCC8c-infizierten Tieren signifikant höher als die in Newman-infizierten Tieren. Hingegen wiesen Tiere, die mit JSNZ infiziert wurden, eine ähnliche bakterielle Last auf wie die Newman-infizierten Tiere. In Mäusen, die mit muCC88d infiziert waren, war die bakterielle Last leicht reduziert. Die Abwesenheit von *S. aureus*-Bakterien in den Nieren (Abbildung 4.2D) zeigte, dass der Großteil der Tiere eine lokale Infektion der Atemwege ohne systemische Streuung hatte.

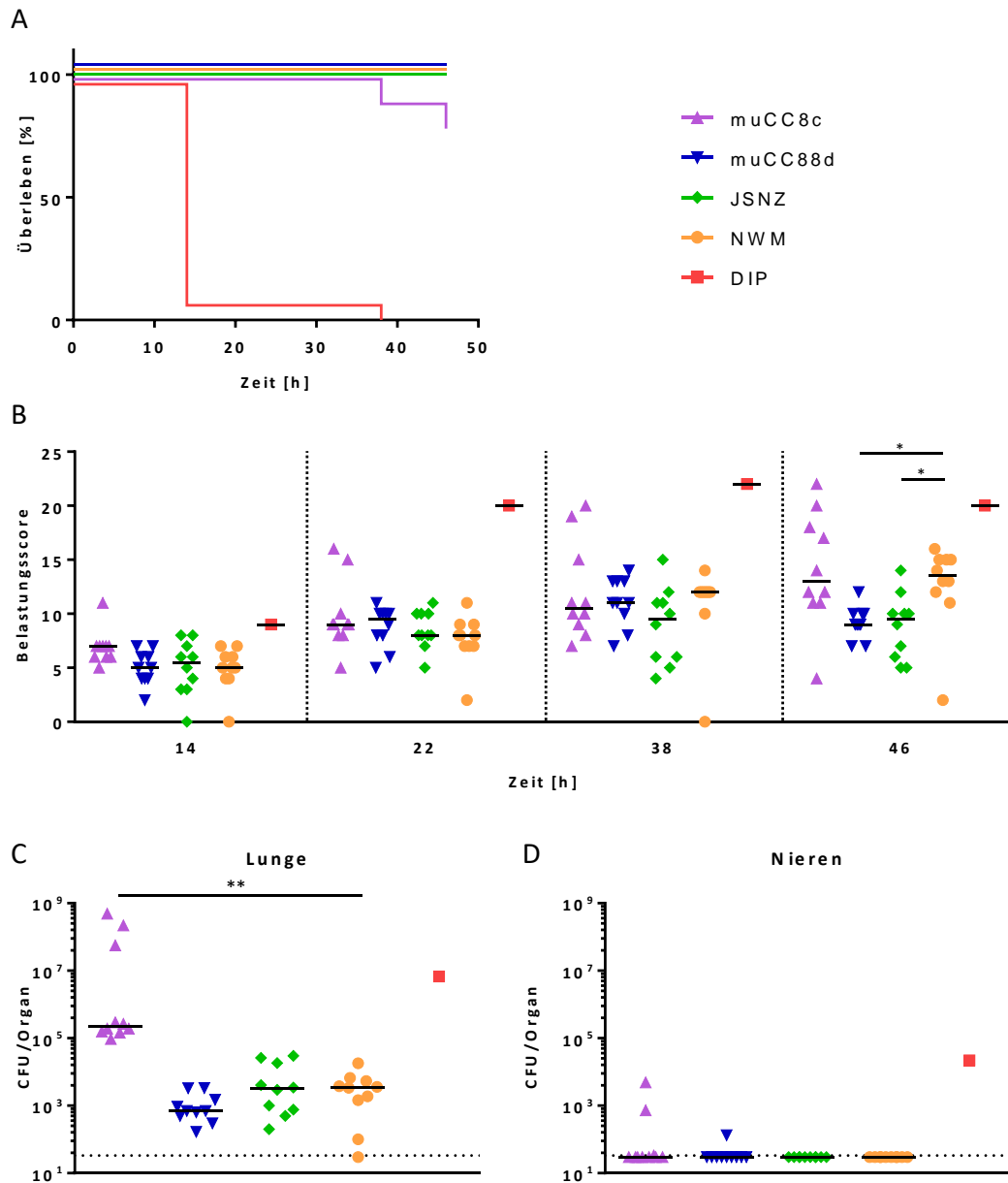


Abbildung 4.2 Murine *S. aureus*-Isolate unterscheiden sich bezüglich ihrer Virulenz im murinen Pneumoniemodell.

Weibliche BALB/c-Mäuse ($n = 10$) wurden *intranasal* mit 1×10^8 CFU *S. aureus* ($30 \mu\text{L}$) infiziert. Die Tiere wurden zweimal täglich begutachtet. Nach 46 Stunden wurden die Tiere mit einer Überdosis CO_2 getötet. Es wurde das Überleben (A), der Belastungsscore (B) sowie die bakterielle Last in den Lungen (C) und Nieren (D) ermittelt. Das Überleben bezieht sich auf den Belastungsscore. Tiere, die einen Wert von ≥ 20 erreichten, wurden als "tot" gewertet. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Experiment. Jeder Punkt stellt eine Maus dar. Die durchgezogene Linie zeigt den Median, die gestrichelte Linie die Detektionsgrenze. Für die statistische Auswertung wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Post Hoc Test verwendet. Die mausadaptierten Stämmen JSNZ, muCC8c und mucc88d wurden mit em Referenzstamm NWM verglichen. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; NWM, Newman.

Beim Überleben wurden Tiere mit einem Belastungsscore ≥ 20 als „tot“ dargestellt. Dennoch konnte bei einem DIP-infiziertes Tier die bakterielle Last in den Organen bestimmt werden. Es zeigte sich eine hohe Belastung der Lungen, aber auch in den Nieren, was auf eine systemische Infektion hindeutet.

Es konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* DIP im murinen Pneumoniemodell deutlich virulenter ist als *S. aureus* Newman und die anderen getesteten murinen Stämme. Abgesehen von der erhöhten bakteriellen Last in muCC8c-infizierten Tieren, konnten bei den anderen getesteten murinen Stämmen keine wesentlichen Unterschiede zu Newman nachgewiesen werden.

4.3 Die mausadaptierten *S. aureus*-Stämme unterscheiden sich deutlich in ihrer Virulenz im Bakteriämiemodell

Im nächsten Schritt wurden die ausgewählten murinen Stämme im Bakteriämiemodell mit *S. aureus* Newman verglichen. Hierfür wurden weibliche BALB/c Mäuse intravenös über die Schwanzvene mit 5×10^7 CFU *S. aureus* (100 μ L) infiziert und zweimal täglich beurteilt (Tabelle 3.1). Nach 65 Stunden wurde der Versuch beendet und die bakterielle Last in der Leber und den Nieren bestimmt.

Beim Überleben (Abbildung 4.3A) zeigten sich hier ebenfalls deutliche Unterschiede. Die höchste Lethalität wurde bei Infektion mit dem *S. aureus*-Stamm DIP beobachtet. Es starben 100 % der infizierten Tiere bereits 41 Stunden nach Infektion. Die Letalität bei *S. aureus* Newman lag bei 90 %, bei *S. aureus* JSNZ bei 70 %. Von den *S. aureus* muCC8c bzw. muCC88d-infizierten Tiere starben im Vergleich dazu lediglich 30 % bzw. 0 %.

In den ersten 24 Stunden zeigten die DIP-infizierten Tiere den höchsten Belastungsscore mit 13 Punkten. Auch die JSNZ-infizierten Tieren zeigten bereits nach 24 Stunden eine mittelgradige Belastung (11 Punkte). Bei den anderen Versuchsgruppen konnte bis zu diesem Zeitpunkt lediglich eine geringe Belastung nachgewiesen werden (Abbildung 4.3B). Da nach 41 Stunden alle DIP-infizierten Tiere verstorben waren, konnten keine weiteren Vergleiche gezogen werden. Die JSNZ- und Newman-infizierten Versuchstiere wiesen im weiteren Verlauf einen ähnlich hohen Belastungsscore auf (mittel- bis hochgradige Belastung). Mäuse, die mit den beiden murinen Stämmen muCC8c und muCC88d infiziert waren, zeigten eine signifikant geringere Belastung (mittelgradige Belastung) als Newman-infizierte Mäuse.

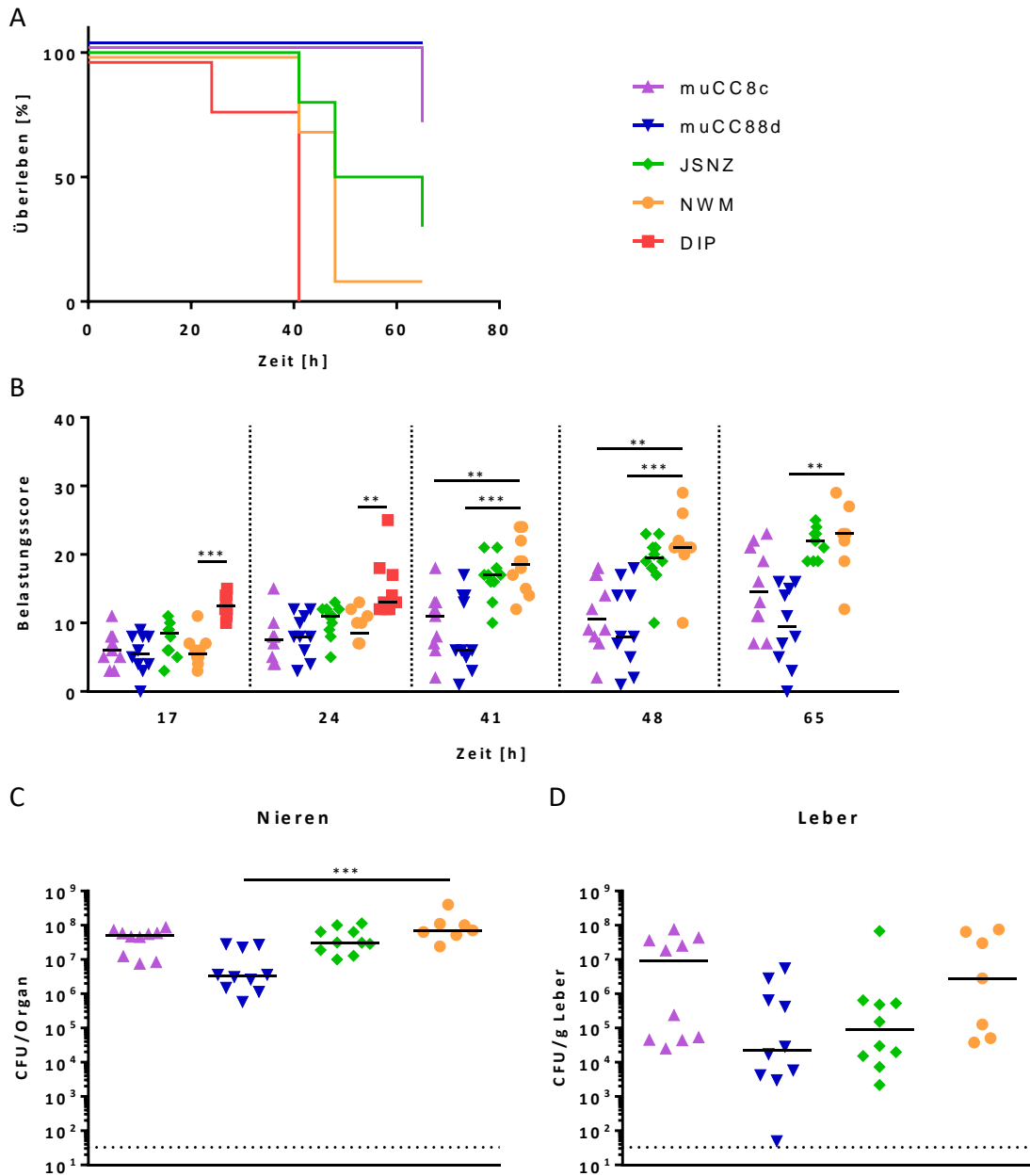


Abbildung 4.3: Murine *S. aureus*-Isolate unterscheiden sich bezüglich ihrer Virulenz im murinen Bakteriämiemodell.

Weibliche BALB/c-Mäuse (n=10) wurden intravenös in die Schwanzvene mit 5×10^7 CFU *S. aureus* (100 μ L) infiziert. Die Tiere wurden zweimal täglich begutachtet. Nach 65 Stunden wurden die Tiere mit einer Überdosis CO₂ getötet. Es wurde das Überleben (A), der Belastungsscore (B) sowie die bakterielle Last in den Nieren (C) und der Leber (D) ermittelt. Das Überleben bezieht sich auf den Belastungsscore. Tiere, die einen Wert von ≥ 20 erreichten, wurden als "tot" gewertet. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Experiment. Jeder Punkt stellt eine Maus dar. Die durchgezogene Linie zeigt den Median, die gestrichelte Linie die Detektionsgrenze. Für die statistische Auswertung wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Post Hoc Test verwendet. Die mauseadaptierten Stämme JSNZ, muCC8c und mucc88d wurden mit dem Referenzstamm NWM verglichen. **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$

Bei der Analyse der bakteriellen Last in den Nieren der Tiere, zeigten sich erneut keine Unterschiede zwischen *S. aureus* JSNZ- und Newman-infizierten Tieren (Abbildung 4.3C). Auch die der muCC8c-infizierten Tiere war ähnlich, obwohl der Belastungsscore geringer war als der der beiden anderen Versuchsgruppen. Die bakterielle Last in den Nieren von Tieren, die mit *S. aureus* muCC8d infiziert waren, war in den Nieren signifikant vermindert, wodurch sich die hohe Überlebensrate sowie der niedrige Belastungsscore erklären lässt.

Überraschenderweise war die bakterielle Last in der Leber (Abbildung 4.3D) von muCC8c-infizierten Mäusen tendenziell höher im Vergleich zu Tieren, die mit *S. aureus* Newman infiziert wurden. Da die bakterielle Last in den Lebern der Versuchstiere jedoch stark schwankte, können hier nur schwer Rückschlüsse gezogen werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* DIP auch im murinen Bakteriämiemodell virulenter als *S. aureus* Newman und die anderen getesteten murinen Stämme ist. Die Belastung mit *S. aureus* muCC8c und muCC8d war geringer als die von Newman-infizierten Tieren, wohingegen *S. aureus* JSNZ und Newman ähnliche Resultate aufwiesen.

4.4 Das *S. aureus*-Isolat DIP (CC49) verhält sich hochvirulent im murinen Pneumoniemodell

Für nachfolgende Versuche musste zunächst die geeignete Infektionsdosis für den hochvirulenten *S. aureus* DIP bestimmt werden. Dafür wurden drei verschiedene Infektionsdosen von *S. aureus* DIP (2×10^8 , 2×10^7 und 2×10^6 CFU) mit der Standarddosis von Newman (2×10^8 CFU) verglichen. Es wurde das Überleben, die Belastung, die bakterielle Last sowie die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen in den Lungen bestimmt.

Wie bei den Vorversuchen war die Letalität der *S. aureus* DIP-infizierten Mäuse (2×10^8 CFU) sehr hoch (90 %) (Abbildung 4.4A). Durch die Reduktion der Infektionsdosis um eine log-Stufe konnte diese jedoch auf 0 % reduziert werden und war somit identisch zur Kontrollgruppe *S. aureus* Newman. Betrachtet man den Belastungsscore, werden weitere Unterschiede ersichtlich (Abbildung 4.4B). Dieser war bei Tieren, die mit *S. aureus* Newman infiziert waren, nach 23 Stunden signifikant höher im Vergleich zu den Tieren, die mit 1/100 der Infektionsdosis mit *S. aureus* DIP, sowie tendenziell höher im Vergleich zu Tieren, die mit 1/10 der Infektionsdosis *S. aureus* DIP infiziert wurden.

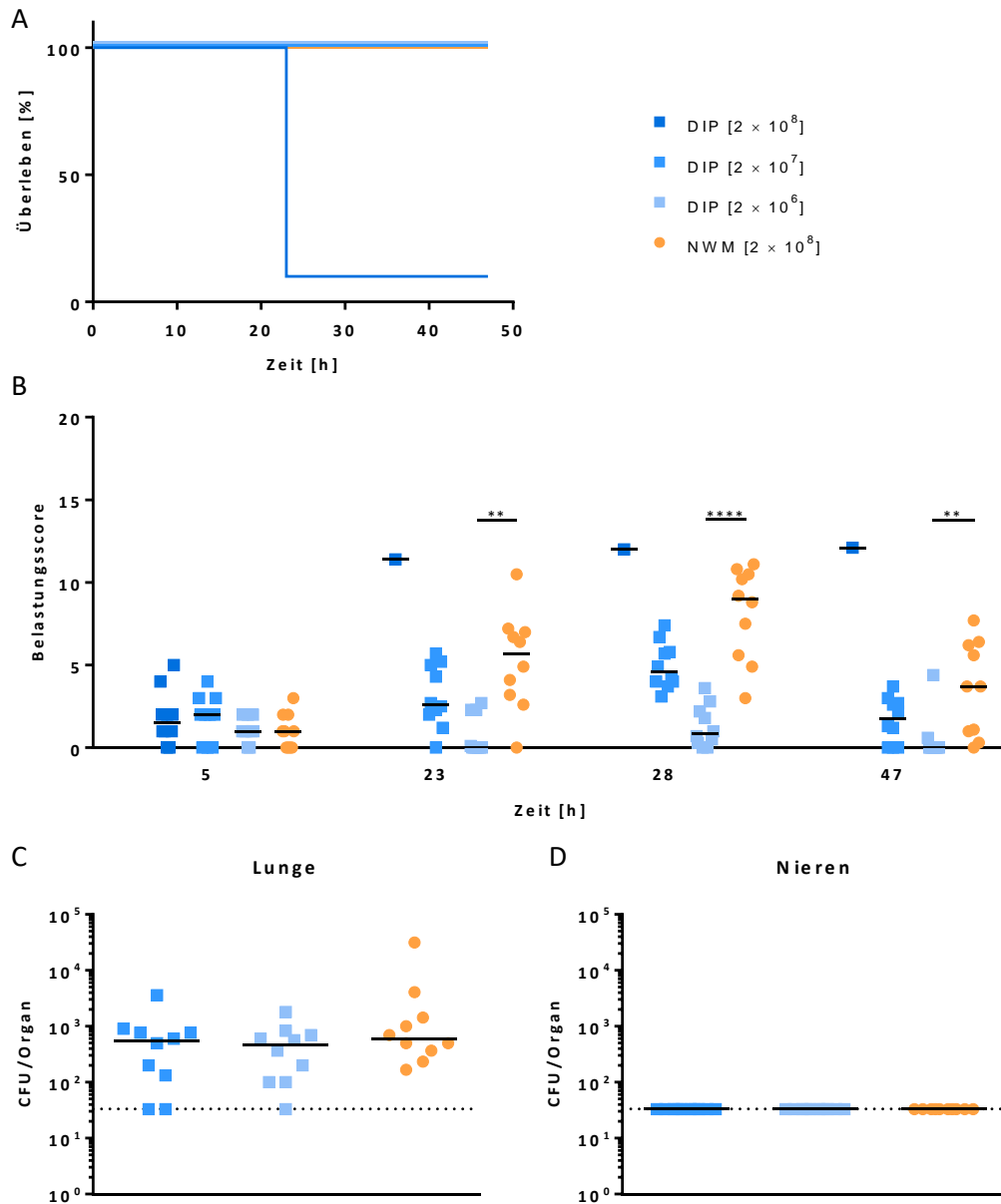


Abbildung 4.4: Das murine *S. aureus*-Isolat DIP induziert trotz reduzierter Infektionsdosis kaum Unterschiede in der Überlebensrate sowie der bakteriellen Last im Vergleich zum humanen *S. aureus*-Isolat Newman im murinen Pneumoniemodell.

Weibliche BALB/c Mäuse ($n = 10$) wurden *i.n.* mit $30 \mu\text{L}$ *S. aureus* DIP (2×10^8 CFU, 2×10^7 CFU, 2×10^6 CFU) bzw. Newman (1×10^8 CFU) infiziert. Die Tiere wurden zweimal täglich begutachtet. Nach 47 Stunden wurden die Tiere mit einer Überdosis CO_2 getötet. Es wurde das Überleben (A), der Belastungsscore (B) sowie die bakterielle Last in den Lungen (C) und Nieren (D) ermittelt. Das Überleben bezieht sich auf den Belastungsscore. Tiere, die einen Wert von ≥ 20 erreichten, wurden als "tot" gewertet. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Experiment. Jeder Punkt stellt eine Maus dar. Die durchgezogene Linie zeigt den Median, die gestrichelte Linie die Detektionsgrenze. Für die statistische Auswertung wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Post Hoc Test verwendet. Die unterschiedlichen Infektionsdosen von *S. aureus* DIP wurden mit *S. aureus* NWM verglichen. **, $p \leq 0,01$; ****, $p \leq 0,0001$

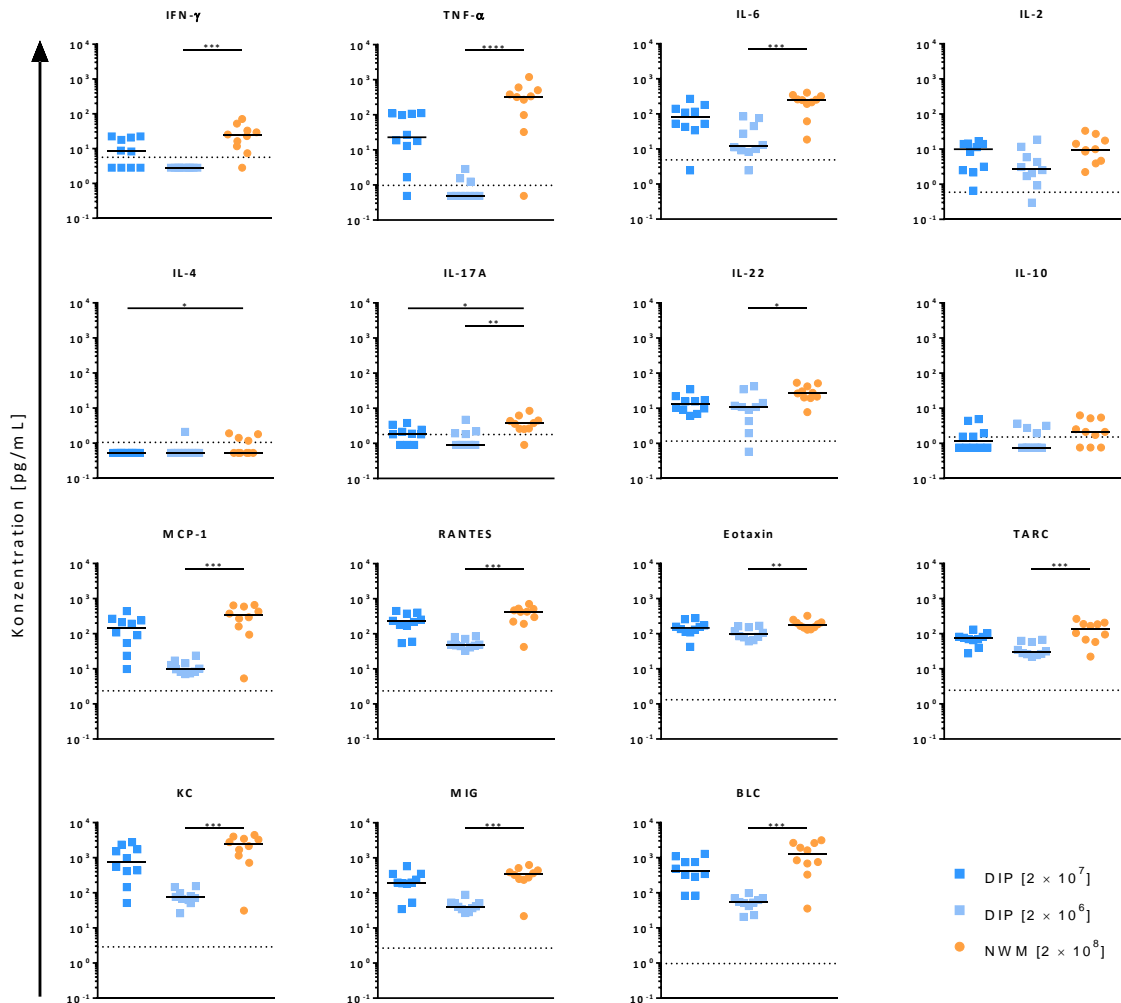


Abbildung 4.5: Das murine *S. aureus* Isolat DIP induziert trotz 10-fach reduzierter Infektionsdosis ein vergleichbares Zytokin- und Chemokinprofil wie das humane Isolat *S. aureus* Newman im murinen Pneumoniemodell

Weibliche BALB/c Mäuse (n=10) wurden *i.n.* mit 30 μ L *S. aureus* DIP (2×10^8 CFU, 2×10^7 CFU, 2×10^6 CFU) bzw. Newman (2×10^8 CFU) infiziert. Nach 47 Stunden wurden die Tiere mit einer Überdosis CO₂ getötet. In den Überständen der homogenisierten Lungen wurden die Zytokin- bzw. Chemokinkonzentrationen mit dem LEGENDplex™ Mouse Th Cytokine Panel bzw. dem Proinflammatory Chemokine Panel (BioLegend) ermittelt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Experiment. Jeder Punkt stellt eine Maus dar. Die durchgezogene Linie zeigt den Median, die gestrichelte Linie die Detektionsgrenze. Für die statistische Auswertung wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Post Hoc Test verwendet. Die unterschiedlichen Infektionsdosen von *S. aureus* DIP wurden mit *S. aureus* NWM verglichen. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$; ****, $p \leq 0,0001$

Obwohl Unterschiede im Belastungsscore erkennbar waren, war die bakterielle Last in den Lungen (Abbildung 4.4C) zwischen den verschiedenen Gruppen identisch. Zudem konnten keine Bakterien in den Nieren (Abbildung 4.4D) nachgewiesen werden, was zeigt, dass es nicht zu einer systemischen Streuung kam.

Um zu untersuchen, ob *S. aureus* DIP bei Reduktion der Infektionsdosis auf 1/10 eine ähnliche Immunantwort hervorruft wie Newman in der Standardosierung, wurden die Zytokin- und

Chemokinkonzentrationen in den Lungenhomogenaten gemessen (Abbildung 4.5; Anhang Abbildung 7.1). Die Konzentrationen waren häufig vergleichbar zwischen Newman-infizierten Tieren und Tieren, die mit 1/10 der Infektionsdosis mit *S. aureus* DIP infiziert waren. Lediglich bei IL-4, IL-17A sowie IL-17F (siehe Anhang Abbildung 7.1) waren die Konzentrationen bei DIP-infizierten Tieren niedriger. Tiere, die nur mit 1/100 der Infektionsdosis *S. aureus* DIP infiziert wurden, zeigten wie erwartet häufig niedrigere Zytokin- und Chemokinkonzentrationen als die Newman-infizierte Vergleichsgruppe.

Zusammengefasst zeigten Mäuse nach Infektion mit 1/10 der Infektionsdosis mit *S. aureus* DIP einen etwas niedrigeren Belastungsscore, aber eine vergleichbare bakterielle Last in der Lunge und ein ähnlich stark ausgeprägtes Zytokin- und Chemokinmuster. Bei Infektion mit 1/100 der Infektionsdosis mit *S. aureus* DIP zeigten die Tiere hingegen kaum noch Krankheitszeichen und eine stark verminderte Immunantwort trotz ähnlich hoher bakterieller Last in der Lunge. Somit kann die Infektionsdosis für DIP im Pneumoniemodell in BALB/c-Mäusen um nahezu 90% reduziert werden.

4.5 Das *S. aureus*-Isolat DIP (CC49) verhält sich hochvirulent im murinen Bakteriämiemodell

Da es sich beim murinen Pneumoniemodell um eine lokal begrenzte Infektion handelt, wurde *S. aureus* DIP auch noch in dem invasiven Bakteriämiemodell getestet. Dafür wurden BALB/c-Mäuse *i.v.* über die Schwanzvene mit drei verschiedenen Infektionsdosen von *S. aureus* DIP (5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 CFU) bzw. der Standardinfektionsdosis von *S. aureus* Newman (5×10^7 CFU) infiziert. Nach 72 Stunden wurden das Überleben, die Belastung, die bakterielle Last sowie die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen in den Nieren verglichen.

Wie zuvor beim Stammvergleich (4.2) starben auch hier alle DIP-infizierten Tiere innerhalb der ersten beiden Tage bei Inokulation mit der Standardinfektionsdosis 5×10^7 CFU (Abbildung 4.6A) und wiesen einen sehr hohen Belastungsscore auf (Abbildung 4.6B). Bei Reduktion auf 1/10 der Standardinfektionsdosis (5×10^6 CFU) hingegen war sowohl die Überlebenskinetik (50 % vs. 30 %), als auch der Belastungsscore und die bakterielle Last in den Nieren ähnlich zu Newman (Abbildung 4.6). Bei weiterer Reduktion der Infektionsdosis auf 1/100 der Standardinfektionsdosis (5×10^5 CFU) stieg die Überlebensrate auf 70 % und der Belastungsscore sowie die bakterielle Last in den Lebern der Tiere war signifikant niedriger als bei Newman. Auch in den Nieren war die bakterielle Last im Vergleich zu Newman leicht vermindert. Wenn *S. aureus* in der Leber nachgewiesen werden konnte, dann konnte *S. aureus* bei diesen Tieren auch in den Nieren detektiert werden.

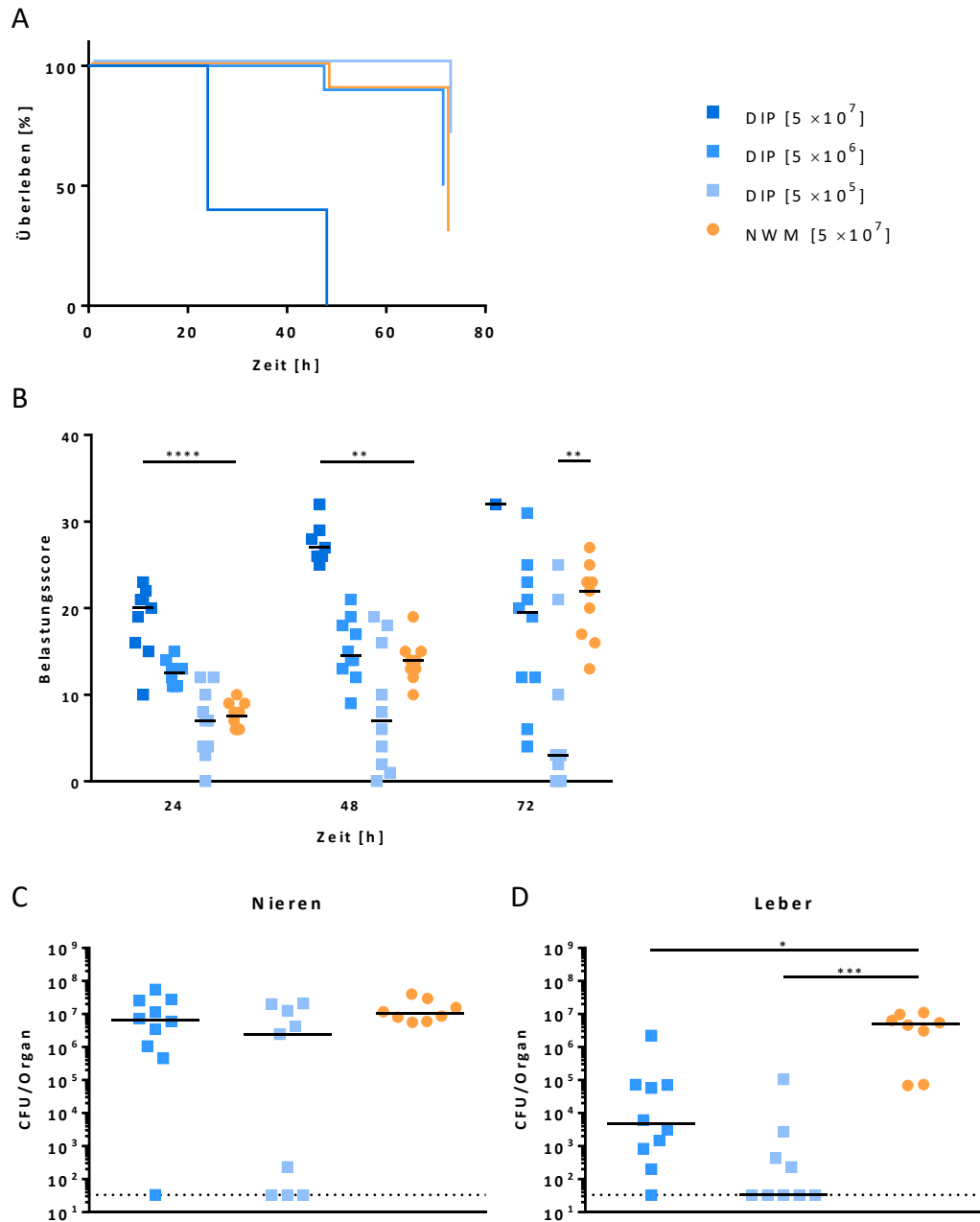


Abbildung 4.6: Das murine *S. aureus*-Isolat DIP induziert trotz 10-fach reduzierter Infektionsdosis kaum Unterschiede in der Überlebensrate sowie der bakteriellen Last im Vergleich zum humanen *S. aureus*-Isolat Newman im murinen Bakteriämie Modell.

Weibliche BALB/c Mäuse (n=10) wurden intravenös in die Schwanzvene mit 100 μ L *S. aureus* DIP (5×10^7 CFU, 5×10^6 CFU, 5×10^5 CFU) bzw. Newman (5×10^7 CFU) infiziert. Die Tiere wurden zweimal täglich begutachtet. Nach 72 Stunden wurden die Tiere mit einer Überdosis CO₂ getötet. Es wurde das Überleben (A), der Belastungsscore (B) sowie die bakterielle Last in den Nieren (C) und der Leber (D) ermittelt. Das Überleben bezieht sich auf den Belastungsscore. Tiere, die einen Wert von ≥ 20 erreichten, wurden als "tot" gewertet. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Experiment. Jeder Punkt stellt eine Maus dar. Die durchgezogene Linie zeigt den Median, die gestrichelte Linie die Detektionsgrenze. Für die statistische Auswertung wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Post Hoc Test verwendet. Die unterschiedlichen Infektionsdosen von *S. aureus* DIP wurden mit *S. aureus* NWM verglichen. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$; ****, $p \leq 0,0001$

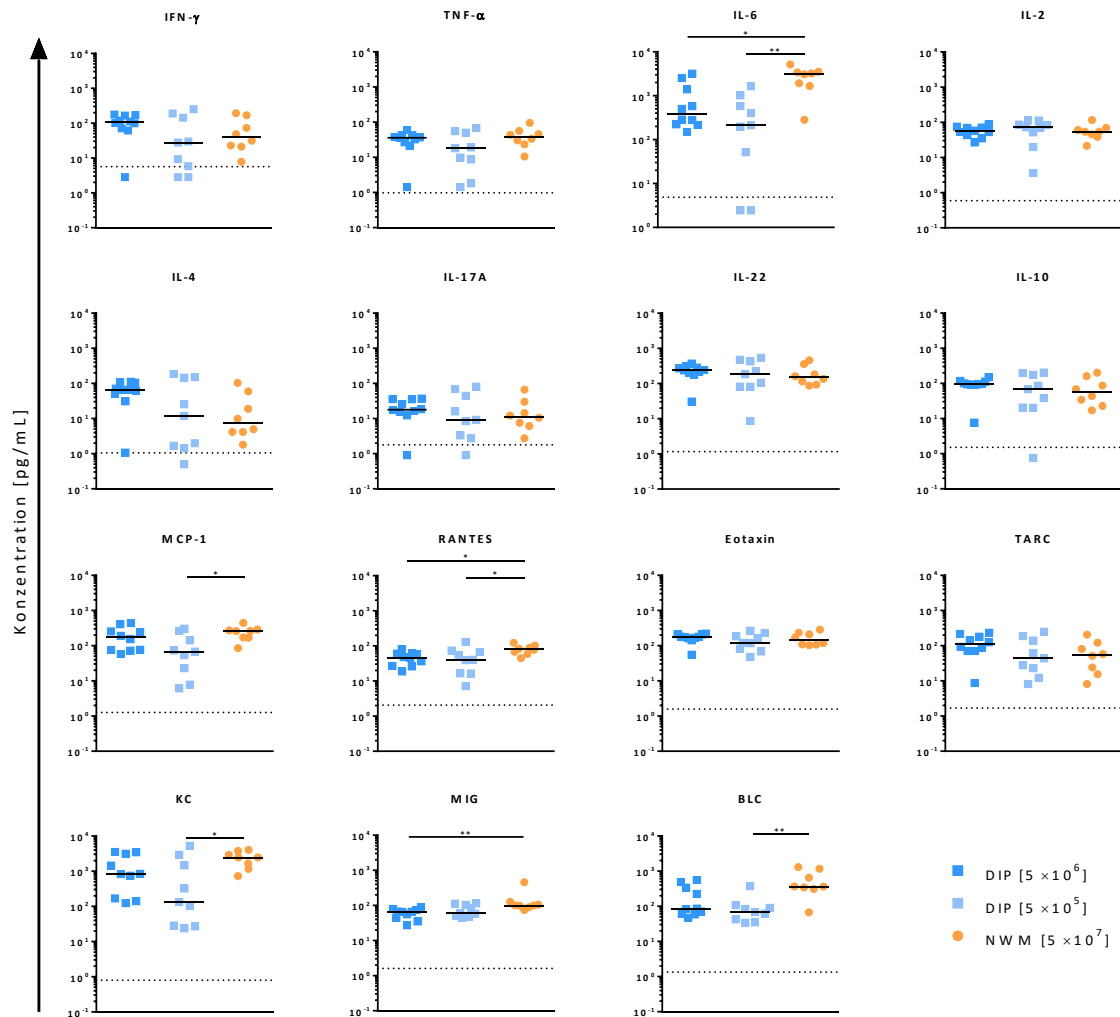


Abbildung 4.7: Das murine *S. aureus* Isolat DIP und das humane Isolat Newman induzieren vergleichbare Zytokin- und Chemokinkonzentrationen im murinen Bakteriämiemodell.

Weibliche BALB/c Mäuse (n=10) wurden *i.v.* über die Schwanzvene mit 100 μL *S. aureus* DIP (5×10^7 CFU, 5×10^6 CFU, 5×10^5 CFU) bzw. Newman (5×10^7 CFU) infiziert. Nach 72 Stunden wurden die Tiere mit einer Überdosis CO_2 getötet. Es wurden die Überstände der homogenisierten Nieren verwendet. Die Zytokinkonzentrationen wurden mit dem LEGENDplex™ Mouse Th Cytokine Panel (BioLegend), die Chemokinkonzentrationen mit dem Proinflammatory Chemokine Panel (BioLegend) ermittelt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Experiment. Jeder Punkt stellt eine Maus dar. Die durchgezogene Linie zeigt den Median, die gestrichelte Linie die Detektionsgrenze. Für die statistische Auswertung wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Post Hoc Test verwendet. Die unterschiedlichen Infektionsdosen von *S. aureus* DIP wurden mit *S. aureus* NWM verglichen. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$

Anschließend wurden die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen in den Überständen der homogenisierten Nieren (Abbildung 4.7, Anhang Abbildung 7.2) gemessen, um Rückschlüsse auf die Immunantwort zu ziehen. Die Zytokin- und Chemokinprofile bei Infektion mit DIP (5×10^6 CFU) ähnelten sehr stark dem durch Newman induzierten Profil.

Lediglich bei IL-6 sowie den Chemokinen RANTES und MIG waren die Konzentrationen bei den Newman-infizierten Tieren signifikant höher im Vergleich zu Tieren, die mit der 90 % reduzierten

Infektionsdosis von *S. aureus* DIP infiziert wurden. Tiere die mit der geringsten Infektionsdosis *S. aureus* DIP (5×10^5 CFU) infiziert wurden, zeigte im Vergleich zu Newman-infizierten Tieren signifikant geringere Konzentrationen der Chemokine MCP-1, MIP-1 α , BLC, KC und RANTES sowie des Zytokines IL-6.

Zusammenfassend konnte auch im murinen Bakteriämiemodell gezeigt werden, dass *S. aureus* DIP mit einer um 90 % reduzierten Infektionsdosis ähnliche Werte beim Belastungsscore, der bakteriellen Last sowie der Zytokin- und Chemokinkonzentrationen induziert wie der Referenzstamm *S. aureus* Newman (5×10^7 CFU).

4.6 *S. aureus* DIP kodiert die Gene für das porenformende Toxin LukMF'

Um zu analysieren, ob genetische Unterschiede die Ursache für die gesteigerte Virulenz von *S. aureus* DIP sind, wurden die *in vivo* verwendeten murinen *S. aureus*-Stämme durch Kooperationspartner (Birgit Walther, Torsten Semmler, Robert-Koch-Institut Berlin) sequenziert und mit dem bereits sequenzierten humanen Isolat Newman verglichen.

Besonders fiel auf, dass nur in *S. aureus* DIP die Gene für das porenformende Toxin LukMF' nachgewiesen werden konnten, welches zuvor bereits in *S. aureus*-Isolaten von Wiederkäuern, aber auch Wildnagern identifiziert wurde [183,195,196]. Die Analyse der Genregion zeigte, dass die Gene *lukM* und *lukF-PV(P83)* auf einem Sa5int-Phagen lokalisiert waren, welche zur Familie der *Siphoviridae* (Genus: *Caudovirales*) gehört [197].

Des Weiteren wurde in *S. aureus* DIP eine Nukleotidinsertion in der üblicherweise 514 Basenpaar langen RNAIII-kodierenden Sequenz nachgewiesen, dem Effektormolekül des *agr quorum sensing*-Systems. Es reguliert die Expression vieler *S. aureus*-Gene, die für Exoproteine und Zellwand-assoziierte Proteine kodieren. Das 5'-Ende der RNAIII reguliert die Translation von *hla*, das 3'-Ende ist erforderlich für die Repression der Protein A-Synthese [198–200]. Zudem kodiert RNAIII als mRNA das 26 Aminosäuren lange Deltahämolysin (*hld*) [198]. Die Nukleotidinsertion hat eine Verschiebung des *hld* Leserahmens zur Folge, was zu einem vorzeitigen Stopp-Codon im *hld*-Gen führt (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Vergleich der Konservierung von Proteinprodukten ausgewählter *open reading frames* in den Genomen von *S. aureus* DIP, JSNZ, muCC88d und muCC8c mit Newman.

Gruppe	Protein	Symbol	Gen	Newman (Referenzgenom: AP009351)			DIP			JSNZ			muCC88d			muCC8c		
				Gen	Gen ¹		Gen	AA		Gen	AA		Gen	AA		Gen	AA	
					AV	C (%)		I (%)	AV		C (%)	I (%)		AV	C (%)		I (%)	AV
Adhäsine	Clumping factor A	ClfA	<i>clfA</i>	5	100	95.5	2	88.9	89.3	7	90.3	100	4	100	99			
	Clumping factor B	ClfB	<i>clfB</i>	5	91.3	89	2	90.7	83.4	2	83.4	90.7	4	100	95.9			
	Fibronectin binding protein A	FnBPA	<i>fnbA</i>	5	100	80.9	2	100	82.2	2	82.2	100	4	100	99.2			
	Fibronectin binding protein B	FnBPB	<i>fnbB</i>	5	100	85.1	2	80.9	85.5	2	85.5	80.9	4	100	100			
	Iron-regulated surface determinant protein A	IsdA	<i>isdA</i>	4	100	96.3	2	100	99.4	2	99.4	100	1	100	100			
	Iron-regulated surface determinant protein B	IsdB	<i>isdB</i>	4	100	96.3	2	100	98.6	2	98.6	100	1	100	100			
	Serine-aspartate repeat-containing protein C	SdrC	<i>sdrC</i>	5	93.1	87.2	2	100	95.6	2	95.6	100	4	89	95.1			
	Serine-aspartate repeat-containing protein D	SdrD	<i>sdrD</i>	5	77.7	82.7	2	89.7	89.3	2	89.3	89.7	4	100	97			
	Serine-aspartate repeat-containing protein E	SdrE	<i>sdrE</i>	4	100	97.3	2	94.5	92.7	6	97.2	94.5	NA	NA	NA			
	Cell-wall-anchored protein SasA	SasA	<i>sasA</i>	4	100	92.1	2	82.3	96.5	2	96.5	82.3	1	100	100			
	Cell-wall-anchored protein SasD	SasD	<i>sasD</i>	NA	NA	NA	2	100	99.6	2	99.6	100	4	100	86.4			
	Cell-wall-anchored protein SasF	SasF	<i>sasF</i>	4	100	96.4	2	100	98	2	98	100	3	100	99.8			
	Iron-regulated surface determinant protein H	SasH	<i>isdH</i>	5	100	97	2	100	99.6	2	99.6	100	4	100	99.9			
	Cell-wall-anchored protein SasG ^a	SasG ^a	<i>sasG^a</i>	5	100	95.9	2	100	75.8	6	75.8	100	4	100	96.8			
	Cell-wall-anchored protein SasK ^b	SasK ^b	<i>sasK^b</i>	3	100	98	2	100	92.4	2	92.4	100	NA	NA	NA			
	Extracellular adherence protein	Eap	<i>map</i>	4	99.8	93	5	95.6	82.8	2	88.5	100	1	100	100			
Koagulation	Coagulase	Coa	<i>coa</i>	4	94.2	71.5	2	90.6	95.8	2	95.8	90.6	1	100	100			
	von Willebrand factor-binding protein	vWbp	<i>vwb</i>	3	55	66	3	100	70	2	58.8	99.9	2	92	99			
	Extracellular fibrinogen-binding protein	Efb	<i>efb</i>	4	100	98.2	2	100	98.8	2	98.8	100	1	100	100			
Leukozidine	Panton-Valentine Leukocidin F-PV (P83) ^c	LukF-PV ^c	<i>luk F-PV^c</i>	2	100	100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA			
	Leukocidin-M subunit ^c	LukM ^c	<i>luk M^c</i>	2	100	99.7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA			
	Leukocidin-F subunit	LukF	<i>luk F</i>	4	100	96.4	2	100	97.9	2	97.9	100	1	100	100			
	Leukocidin-S subunit	LukS	<i>luk S</i>	4	100	99.4	2	100	97.7	2	97.7	100	1	100	100			
	Leukotoxin LukD	LukD	<i>luk D</i>	5	99.9	98.5	2	99.9	99.4	2	99.4	99.9	4	100	100			
	Leukotoxin LukE	LukE	<i>luk E</i>	5	100	99.7	2	100	100	2	100	100	4	98	100			
Hämolsine	Alpha hemolysin	Hla	<i>hly</i>	4	100	99.7	FS ^e	FS ^e	FS ^e	5	99.1	100	1	100	100			
	Phospholipase C/beta hemolysin ^d	Hlb ^d	<i>hly^d</i>	5	100	100	2	100	99.7	PI	PI	PI	4	100	100			
	Gamma hemolysin component A	HlgA	<i>hlyA</i>	4	100	100	2	100	100	2	100	100	1	100	100			
	Gamma hemolysin component B	HlgB	<i>hlyB</i>	4	100	99.7	2	100	100	2	100	100	1	100	100			
	Gamma hemolysin component C	HlgC	<i>hlyC</i>	4	100	97.8	2	100	99.7	2	99.7	100	1	100	100			
	Delta hemolysin ^a	Hld ^a	<i>hly^a</i>	FS ^e	FS ^e	FS ^e	1	100	100	1	100	100	1	100	100			
Proteasen	Serine protease SplA	SplA	<i>splA</i>	5	100	95.8	2	100	95.4	2	95.4	100	4	100	98.7			
	Serine protease SplB	SplB	<i>splB</i>	3	100	97.5	2	100	100	2	100	100	1	100	100			
	Serine protease SplC	SplC	<i>splC</i>	5	100	94.6	2	100	87.4	2	87.4	100	4	100	100			
	Serine protease SplD	SplD	<i>splD</i>	5	100	93.7	2	100	97.9	2	97.9	100	4	100	100			
	Serine protease SplE	SplE	<i>splE</i>	3	100	97.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	100	100			
	Serine protease SplF	SplF	<i>splF</i>	4	100	95.4	2	100	100	2	100	100	1	100	100			
	Aureolysin	Aur	<i>aur</i>	5	100	99.2	2	100	99.6	6	99.8	100	4	100	99.8			
	Staphylococcus serine protease A	SspA	<i>sspA</i>	4	95.9	95.1	2	100	98	5	97	90.6	1	100	100			
	Staphylococcus serine protease B	SspB	<i>sspB</i>	4	100	99.7	2	100	99	2	99	100	1	100	100			
	Staphylococcal complement inhibitor	Scin	<i>scn</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	100	100	NA	NA	NA			
IEC	Chemotaxis inhibitory protein	Chip	<i>chp</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	100	100	NA	NA	NA			
	Staphylokinase	Sak	<i>sak</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	100	100	NA	NA	NA			

¹ Vergleich ausgewählter virulenzassoziierter Gene für *S. aureus* DIP, JSNZ, muCC88d und muCC8c mit Bezug zu *S. aureus* Newman (AP009351). Abweichungen vom Referenzgenom sind durch Buchstaben angezeigt.

^a alternative Referenz: USA300 (CP000255)

^b alternative Referenz: N315 (BA000018)

^c alternative Referenz: *Staphylococcus aureus* phage 187, PV83 (AB044554)

^d alternative Referenz: COL (CP000046)

^e Nukleotid-Insertion, Frame-Shift-Mutation, vorzeitiges Stopp-Codon

Abkürzungen: AA: Aminosäure-Sequenz; AV: allele Variante; C: Sequenzabdeckung von Referenzgen; I: Identität der Aminosäure-Sequenz mit Referenz; FS: Frame-Shift in der Nukleotid-Sequenz; NA: Nicht verfügbar, PI: Phagen-Insertion

Die regulatorische Aktivität der RNAIII scheint von der Insertion jedoch nicht beeinflusst worden zu sein, da sich im CAMP-Test zeigte, dass das *hla*-Gen weiterhin exprimiert wird (Abbildung 4.8). Lediglich *S. aureus* JSNZ und muCC88d zeigten keine Hla-Aktivität. Der CAMP-Test gibt zudem noch Aufschluss über die Hlb-Produktion, welche bei *S. aureus* Newman und muCC88d nicht nachgewiesen werden konnte. Dies ist auf die Anwesenheit des Sa3int-Phagen zurückzuführen, welcher ins *hlb*-Gen integriert (Tabelle 4.1).



Abbildung 4.8: Die Nucleotidinsertion in *S. aureus* DIP hat keinen Einfluss auf dessen Hla-Expression.

Die hämolytische Aktivität von *S. aureus* NWM, DIP, muCC8c, muCC88d und JSNZ wurde ermittelt, indem die Stämme senkrecht zum CAMP-Faktor-produzierenden Stamm *Streptococcus agalactiae* ausgestrichen wurden, welcher die Hlb-Aktivität steigert. Die Hlb-Produktion inhibiert den Hla-Effekt auf Schafblutagar, wodurch eine zweifache Hämolysezone (dicker Pfeil) entsteht. Durch die synergistische Aktivität des CAMP-Faktors und Hlb entsteht eine vergrößerte hämolytische Zone (dünner Pfeil). Als Positivkontrolle wurde Hlb-produzierende *S. aureus*-Stamm ATCC25923 mitgeführt.

Da die murinen Stämme sich in ihrer Fähigkeit murines Plasma zu koagulieren, unterschieden (Abbildung 4.1), wurden auch die prokoagulatorischen Faktoren betrachtet. Es zeigten sich allele Variationen der Gene für Koagulase und des von Willebrandt-Faktor-bindenden Proteins (vWbp) in *S. aureus* DIP mit 71,5 % und 66 % Aminosäureidentität im Vergleich zum Referenzgenom *S. aureus* Newman. Auch konnte die Präsenz einer allelen Variante des vWbp in *S. aureus* JSNZ mit 70 % Sequenzidentität zu *S. aureus* Newman bestätigt werden [156]. Darüber hinaus fiel auf, dass SasD, ein LPXAG-verankertes Oberflächenprotein mit unbekannter Funktion, in *S. aureus* DIP nicht nachweisbar war.

Aus den Daten des WGS kann geschlussfolgert werden, dass die Präsenz des Virulenzfaktors LukMF' für die gesteigerte Virulenz von *S. aureus* DIP verantwortlich sein könnte.

4.7 Charakterisierung der Immunantwort im murinen Besiedlungsmodell

S. aureus besiedelt als Kommensale vorrangig die Nasenvorhöfe, aber auch die Achselhöhlen, den Rachenraum und den unteren Verdauungstrakt von Menschen und Tieren [33,35–37]. Bis zu 30 % der Bevölkerung sind persistent besiedelt [38,44]. Die Besiedlung mit *S. aureus* stellt einen Risikofaktor für *S. aureus*-Infektionen dar. Zur Entwicklung neuer Therapieansätze ist es deshalb essenziell den Prozess der nasalen Besiedlung im Detail zu verstehen.

Im murinen Besiedlungsmodell wurden zwei murine *S. aureus*-Stämme (JSNZ, DIP) mit dem humanen Isolat Newman verglichen. Um die Tiere zu besiedeln, wurden Albino-C57BL/6-Mäuse unter Isoflurannarkose mit 1×10^8 CFU *S. aureus intranasal* besiedelt. Da aus vorherigen Experimenten bekannt ist, dass *S. aureus* DIP virulenter ist als die anderen verwendeten Stämme, wurde dieser zusätzlich mit einer CFU von 3×10^7 eingesetzt. Es wurde die Belastung, die bakterielle Last im Stuhl und in den Lungen sowie die IgA-Antikörperantwort ermittelt. Die Zellen der zervikalen Lymphknoten wurden bezüglich ihrer Zytokinproduktion analysiert. Zudem sollte die bakterielle Last im Nasenhomogenat bestimmt werden. Des Weiteren wurden die Überstände des Nasenhomogenats verwendet, um die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen mittels CBA zu messen.

4.7.1 Murine *S. aureus*-Stämme können Mäuse besser besiedeln als das humane Isolat *S. aureus* Newman

Da es sich lediglich um eine mukosale Besiedlung handelt, war nicht mit einer starken Belastung der Tiere zu rechnen. Nach 6 Stunden konnte bei Tieren, die *S. aureus* JSNZ, NWM sowie der hohen Dosis DIP besiedelt wurden, ein leichter, nicht signifikanter Anstieg des Belastungsscores detektiert werden. Lediglich die Tiere, die mit der geringen Dosis DIP (3×10^7 CFU) besiedelt wurden, zeigten im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe keine erhöhte Belastung (Abbildung 4.9A). Nach 24 Stunden sinkt der Belastungsscore der Tiere, die mit JSNZ und NWM besiedelt wurden, ebenfalls auf das Niveau der Kontrollgruppe und geht dann nach 48 Stunden gegen null. Eine Ausnahme stellten die Mäuse dar, die mit der hohen Dosis *S. aureus* DIP (1×10^8 CFU) besiedelt wurden. Diese Mäuse hatten einen deutlich höheren Belastungsscore und zeigten signifikante Unterschiede zu NWM.

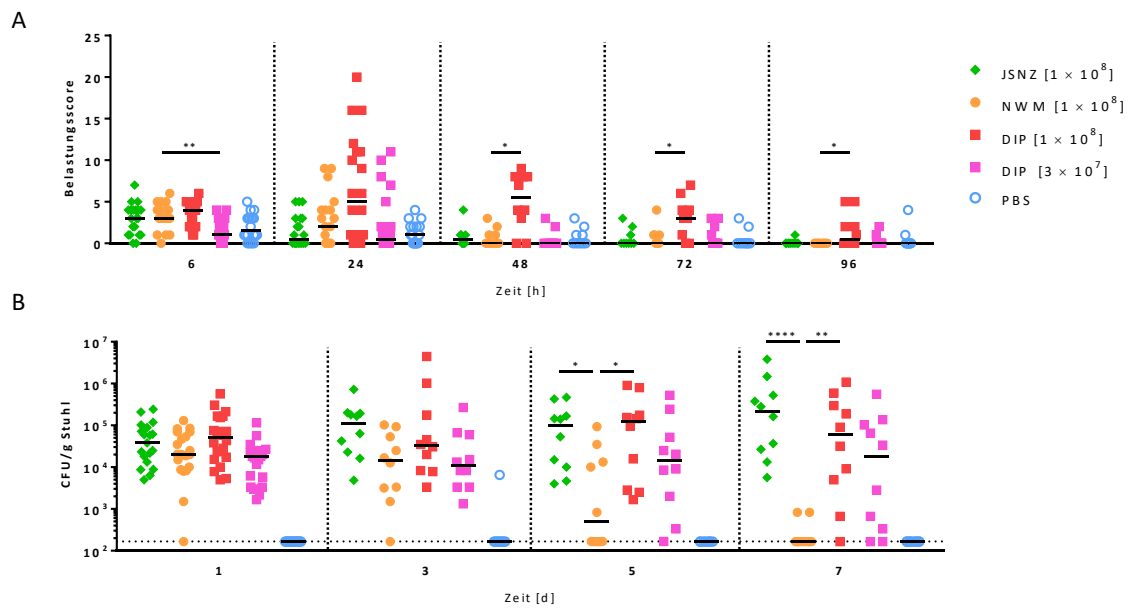


Abbildung 4.9: Murine *S. aureus*-Isolate können Mäuse länger besiedeln als das humane Isolat Newman.

Weibliche Albino-C57BL/6-Mäuse ($n = 10$) wurden *intranasal* mit $10 \mu\text{L}$ *S. aureus* (1×10^8 CFU bzw. 3×10^7 CFU) besiedelt. Kontrolltieren wurden $10 \mu\text{L}$ PBS *intranasal* appliziert. Es wurde täglich der Belastungsscore ermittelt (A). An Tag 0 (nicht gezeigt), 1, 3, 5 und 7 wurden frische Stuhlproben von jeder Maus gesammelt und die bakterielle Last pro g Stuhl bestimmt (B). Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Jeder Punkt stellt eine Maus dar. Die durchgezogene Linie zeigt den Median, die gestrichelte Linie die Detektionsgrenze. Für die statistische Auswertung wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Post Hoc Test verwendet. Die mausadaptierten Stämme JSNZ und DIP wurden mit dem Referenzstamm *S. aureus* NWM verglichen. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ****, $p \leq 0,0001$

Aufgrund technischer Probleme gelang es nicht die bakterielle Last im Nasenhomogenat zu bestimmen. Da bekannt ist, dass die nasale Besiedlung im Mausmodell nach 24 Stunden in den Gastrointestinaltrakt übergeht und somit die Besiedlung in Stuhlproben nachgewiesen werden kann, wurde an den Tagen 0, 1, 3, 5 und 7 Stuhlproben genommen und der Besiedlungsstatus über den Versuchszeitraum ermittelt (Abbildung 4.9B). Zum Zeitpunkt 0 war wie erwartet keines der Versuchstiere im Darm besiedelt (Daten nicht gezeigt). Nach 24 Stunden war die bakterielle Last im Stuhl bei allen besiedelten Tieren nachweisbar und annähernd identisch, die Kontrolltiere waren negativ. Bereits nach 3 Tagen waren jedoch leichte Unterschiede zwischen den *S. aureus*-Stämmen erkennbar. Die bakterielle Last der JSNZ-besiedelten Tiere stieg an, wohingegen sie bei den anderen drei Stämmen nahezu unverändert blieb.

Nach 5 Tagen waren bereits 50 % der mit NWM-besiedelten Tiere sowie eine Maus, die mit der geringen Dosis *S. aureus* DIP (3×10^7 CFU) besiedelt war *S. aureus*-negativ. Die beiden anderen Stämme besiedelten auch nach 5 Tagen noch 100 % der Mäuse mit ähnlicher CFU. Schließlich waren nach 7 Tagen nur noch 20 % der mit NWM besiedelten Tiere *S. aureus* positiv. Hingegen waren bei

der geringen Dosis *S. aureus* DIP noch 80 %, bei der hohen Dosis sogar 90 % *S. aureus*-positiv. Bei JSNZ-besiedelten Tieren waren auch nach 7 Tagen 100 % *S. aureus*-positiv. Über den gesamten Zeitraum blieb die bakterielle Last in den Tieren, die mit murinen *S. aureus*-Stämmen besiedelt wurden, stabil. Bei JSNZ-besiedelten Tiere konnte sogar ein Anstieg von 4×10^4 CFU/g Stuhl auf 2×10^5 CFU/g Stuhl detektiert werden.

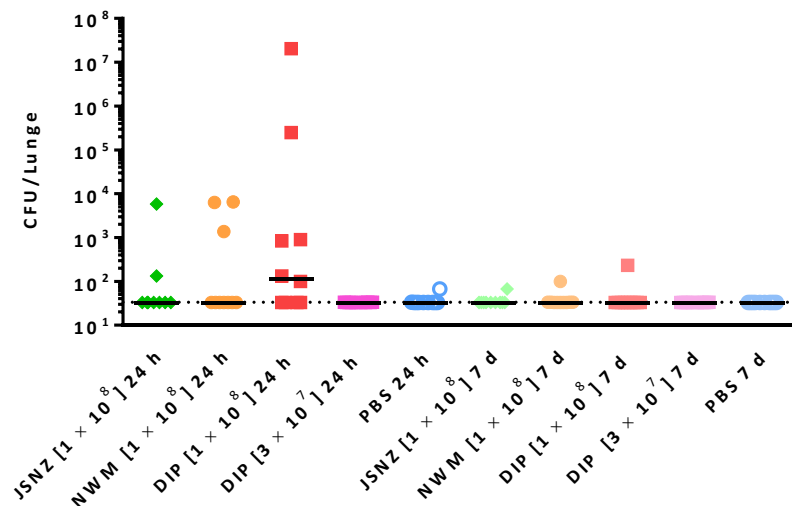


Abbildung 4.10: Der murine Stamm *S. aureus* DIP ist nach 24 Stunden auch in den Lungen besiedelter Tiere nachweisbar.

Weibliche Albino-C57BL/6-Mäuse (n = 10) wurden *intranasal* mit 10 μ L *S. aureus* (1×10^8 CFU bzw. 3×10^7 CFU) besiedelt. Kontrolltieren wurden 10 μ L PBS *intranasal* appliziert. Nach 24 Stunden bzw. 7 Tagen wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, die Lungen entnommen, homogenisiert und zur Bestimmung der bakteriellen Last in einer dekadischen Verdünnungsreihe ausplattiert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Jeder Punkt stellt eine Maus dar. Die durchgezogene Linie zeigt den Median, die gestrichelte Linie die Detektionsgrenze. Für die statistische Auswertung wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Post Hoc Test verwendet. Die mausadaptierten Stämmen JSNZ und DIP wurden mit *S. aureus* NWM verglichen.

Um sicherzustellen, dass die *intranasale* Applikation zu einer Besiedlung und nicht zu einer Atemwegsinfektion führte, wurde zusätzlich die bakterielle Last in den Lungen der Tiere ermittelt (Abbildung 4.10). Es zeigte sich, dass nach 24 Stunden bei JSNZ-besiedelten Tieren zwei Mäuse *S. aureus* in der Lunge hatten, bei NWM waren es sogar drei. Überraschenderweise wurden 60 % der Lungen der Tiere, die mit der hohen Dosis DIP (1×10^8 CFU) besiedelt waren, positiv auf *S. aureus* getestet, teilweise waren sehr hohe CFUs detektierbar. Tiere mit einer bakteriellen Last $\geq 8 \times 10^2$ CFU in der Lunge wiesen auch einen erhöhten Belastungsscore (≥ 16) auf. Hingegen waren alle Lungen der Tiere, die mit der reduzierten Dosis DIP (3×10^7 CFU) besiedelt waren, *S. aureus* negativ. Nach 7 Tagen waren in den drei Gruppen *S. aureus* JSNZ, NWM und DIP (1×10^8 CFU) bei jeweils einem Tier Bakterien in den Lungen nachweisbar.

Des Weiteren sollten die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen im Nasenhomogenat der Tiere analysiert werden. Hier wurden jedoch lediglich sehr geringe Konzentrationen detektiert (Anhang Abbildung 7.4 und Abbildung 7.5), weshalb keine Rückschlüsse auf das Zytokin-/Chemokinprofil möglich sind.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass eine Besiedlung mit murinen *S. aureus*-Isolaten über einen Zeitraum von 7 Tagen stabil bleibt, wohingegen die Mäuse in der Lage waren eine Besiedlung mit *S. aureus* Newan zu überwinden. Mit der hohen Dosis *S. aureus* DIP steigt jedoch das Risiko eine Atemwegsinfektion, statt einer Besiedlung zu induzieren.

4.7.2 Bei Besiedlung mit *S. aureus* DIP produzieren sowohl CD4⁺-T Zellen als auch $\gamma\delta$ -T-Zellen IL-17

Es ist bereits bekannt, dass IL-17 sowie IL-22 eine wesentliche Rolle bei der Besiedlung mit *S. aureus* spielen. Jedoch ist die zelluläre Quelle dieser Zytokine derzeit noch unbekannt. IL-17 und IL-22 können sowohl von Th17-Zellen als auch von ILCs und $\gamma\delta$ -T-Zellen sezerniert werden. Zudem ist nicht bekannt, ob nur IL-17A oder aber auch IL-17F bei der Besiedlung von Bedeutung sind [5,161]. Dies sollte im Folgenden untersucht werden. Zudem sollte die Beteiligung von IL-9 bei Besiedlung mit *S. aureus* betrachtet, da erste Pneumonieversuche einen leichten, nicht signifikanten Anstieg der IL-9-Konzentration in den Lungen *S. aureus*-infizierter Mäuse im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe zeigten [201]. Dafür wurden die zervikalen Lymphknoten *S. aureus*-besiedelter Mäuse isoliert und die Zellen im FACS bezüglich ihrer Zytokinproduktion analysiert. Die *Gating*-Strategie ist in Abbildung 7.3 dargestellt.

CD4⁺-T Zellen

Zunächst wurden die Produktion von IL-17A, IL-17F, IL-22 und IL-9 durch CD4⁺-T Zellen der zervikalen Lymphknoten betrachtet (Abbildung 4.11). Nach 24 Stunden gab es weder Unterschiede in der Gesamtzahl CD4⁺-T Zellen noch in dem Anteil an Zytokin-produzierenden Zellen zwischen den verschiedenen *S. aureus*-Stämmen und den PBS-Kontrolltieren, was nicht überrascht, da es sich hierbei um Zellen des adaptiven Immunsystems handelt. Allerdings konnte auch nach 7 Tagen mit dem eingesetzten Analysesystem keine T-Zellaktivierung nachgewiesen werden. Lediglich bei bei Tieren, die mit der hohen Dosis *S. aureus* DIP besiedelt waren, stieg im Vergleich zu den PBS-Tieren der Anteil IL-17A-, IL-17F- und IL-22-produzierender CD4⁺-T Zellen an. Alle drei Zytokine wurden in denselben Tieren nachgewiesen, die nach 24 Stunden einen hohen Belastungsscore (zwischen 6 und 12) aufwiesen. IL-9-produzierende CD4⁺-T Zellen konnten in den besiedelten Tieren nicht nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass eine *intranasale* Besiedlung keine T-Zellaktivierung in den zervikalen Lymphknoten induziert. Lediglich DIP-besiedelten Mäusen (hohe CFU) konnten IL-17A-, IL-17-F und IL-22-produzierende CD4⁺-T Zellen nachgewiesen werden.

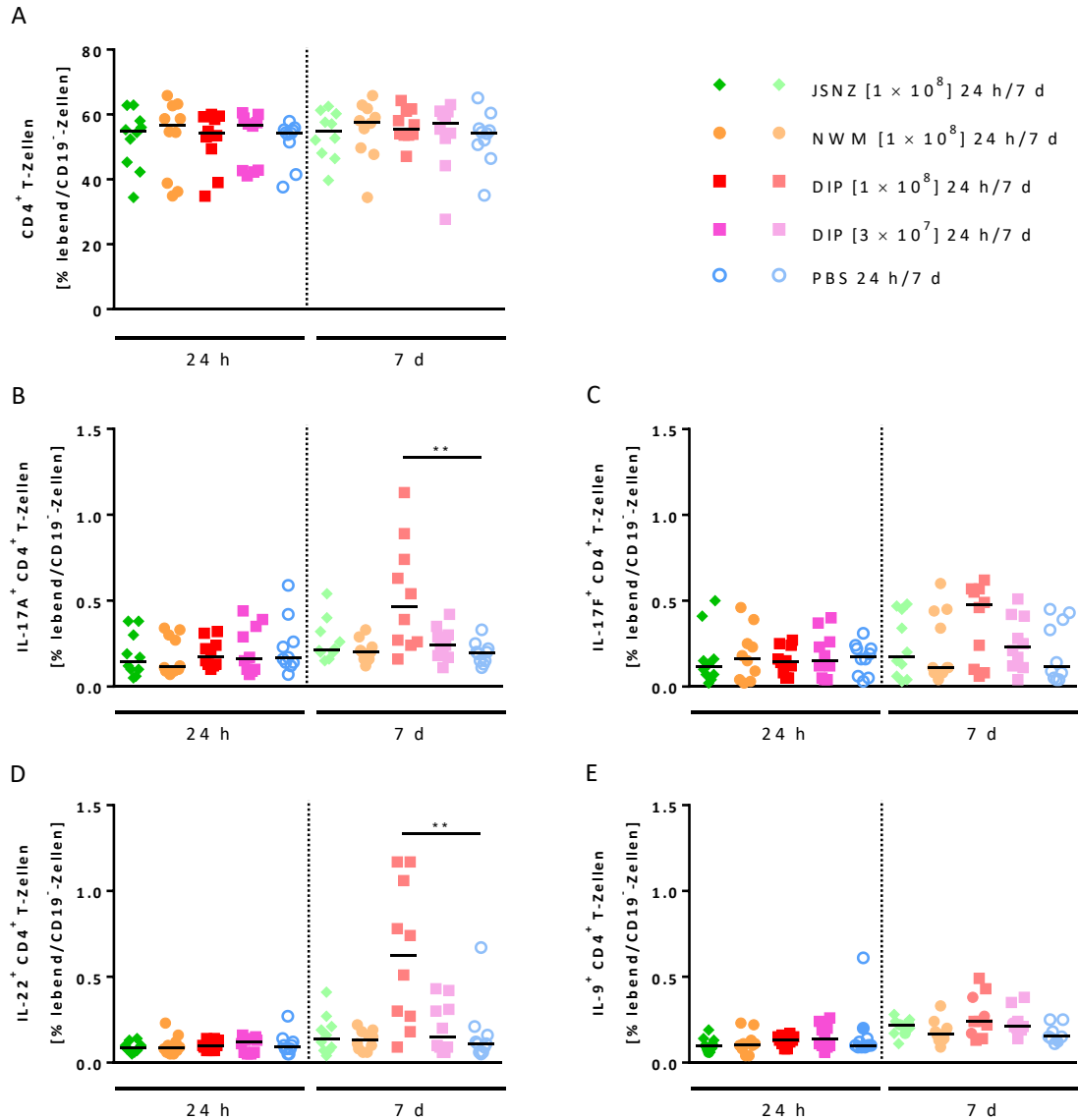


Abbildung 4.11: Nur CD4⁺-T-Zellen in den zervikalen Lymphknoten von *S. aureus* DIP besiedelten Mäusen produzieren nach 7 Tagen IL-17A/F sowie IL-22.

Weibliche Albino-C57BL/6-Mäuse (n=10) wurden *intranasal* mit 10 μ L *S. aureus* (1×10^8 CFU bzw. 3×10^7 CFU) besiedelt. Kontrolltieren wurden 10 μ L PBS *intranasal* appliziert. Nach 24 Stunden bzw. 7 Tagen wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, die zervikalen Lymphknoten entnommen und die gewonnenen Zellen mit Antikörpern gegen CD19, CD3, CD4, IL-17A, IL-17F, IL-22 und IL-9 gefärbt. Abgebildet ist der prozentuale Anteil CD4⁺-T Zellen (A), IL-17A⁺ CD4⁺-T Zellen (B), IL-17F⁺ CD4⁺-T Zellen (C), IL-22⁺ CD4⁺-T Zellen (D) und IL-9⁺ CD4⁺-T Zellen (E) an lebenden CD19⁻ Zellen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Jeder Punkt stellt eine Maus dar. Die durchgezogene Linie zeigt den Median. Für die statistische Auswertung wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Post Hoc Test verwendet. Die *S. aureus*-besiedelten Tiere wurden mit PBS-applizierten Tieren verglichen. **, $p \leq 0,01$

$\gamma\delta$ -T-Zellen

Des Weiteren wurden $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihre Zytokinproduktion analysiert (Abbildung 4.12). Auch hier gab es nach 24 Stunden weder Unterschiede im prozentualen Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen noch an den Zytokin-produzierenden Zellen.

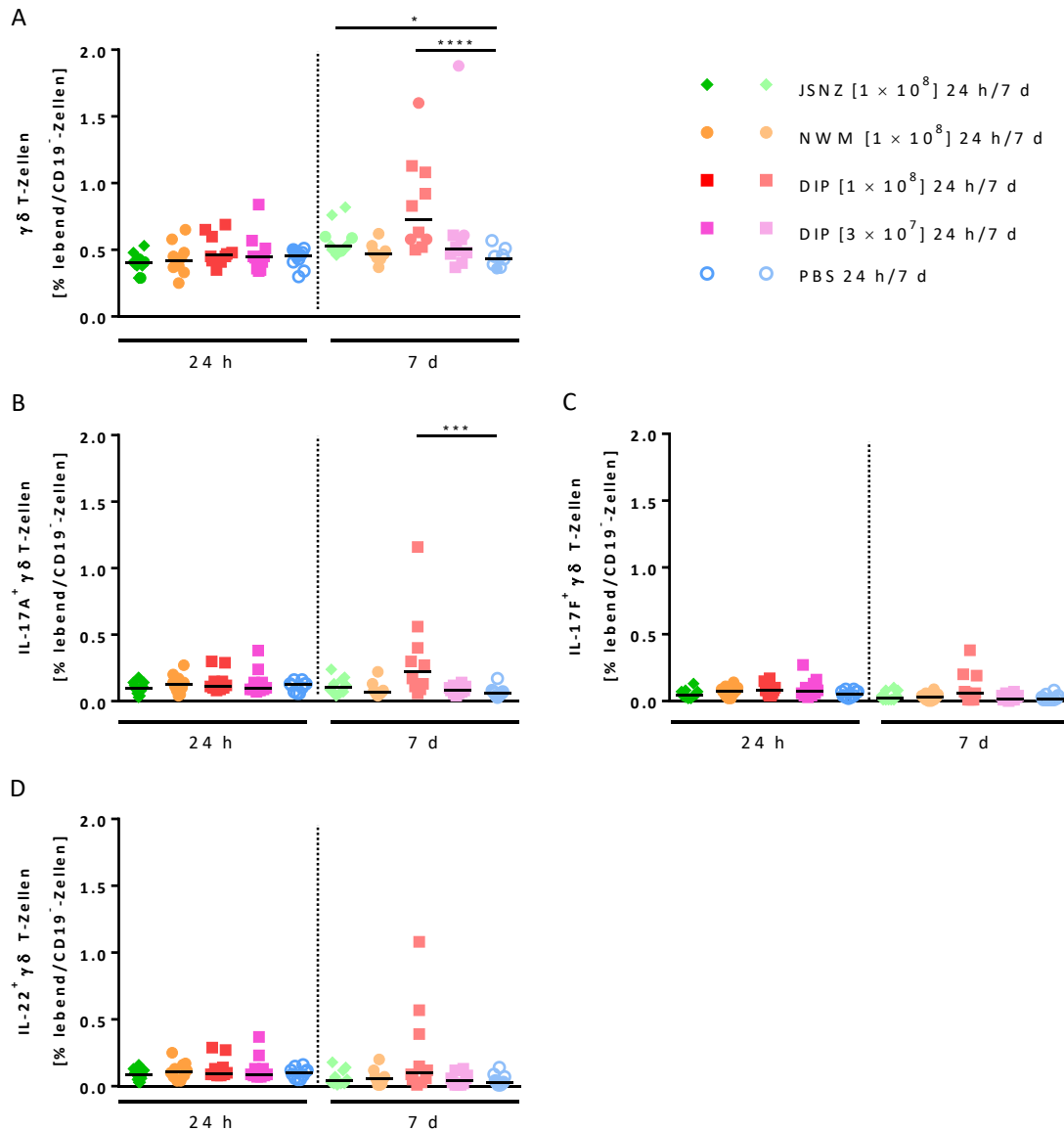


Abbildung 4.12: $\gamma\delta$ -T-Zellen in den zervikalen Lymphknoten von *S. aureus* DIP-besiedelten Mäusen produzieren nach 7 Tagen vor allem IL-17A.

Weibliche Albino-C57BL/6-Mäuse (n=10) wurden *intranasal* mit 10 μ L *S. aureus* (1×10^8 CFU bzw. 3×10^7 CFU) besiedelt. Kontrolltiere wurden 10 μ L PBS *intranasal* appliziert. Nach 24 Stunden bzw. 7 Tagen wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, die zervikalen Lymphknoten entnommen und die gewonnenen Zellen mit Antikörpern gegen CD19, CD3, CD4, TCR $\gamma\delta$, IL-17A, IL-17F und IL-22 gefärbt. Abgebildet ist der prozentuale Anteil von $\gamma\delta$ -T-Zellen (A), IL-17A⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen (B), IL-17F⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen (C) und IL-22⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen (D) an lebenden CD19⁺-Zellen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Jeder Punkt stellt eine Maus dar. Die durchgezogene Linie zeigt den Median. Für die statistische Auswertung wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Post Hoc Test verwendet. Die mit *S. aureus*-besiedelten Tiere wurden mit den PBS-applizierten Tieren verglichen. *, $p \leq 0,05$; ***, $p \leq 0,001$; ****, $p \leq 0,0001$

Nach 7 Tagen zeigten sich jedoch Differenzen am Gesamtanteil von $\gamma\delta$ -T-Zellen. In Tieren, die mit *S. aureus* JSNZ bzw. DIP besiedelt waren, war der Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen signifikant höher als in den PBS-Kontrolltieren. Zudem waren signifikant mehr IL-17A⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen in Mäusen, die mit der hohen Dosis DIP (1×10^8 CFU) besiedelt waren, nachweisbar. Bei den IL-22⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen zeigte sich ebenfalls eine leichte, nicht-signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils bei Tieren, die mit der hohen Dosis DIP (1×10^8 CFU) besiedelt waren. Auch hier handelte es sich immer um dieselben Tiere, bei denen die intrazellulären Zytokine nachgewiesen werden konnten. In allen anderen Versuchsgruppen waren keine Unterschiede zu den Kontrolltieren ersichtlich.

Innate lymphoide cells

ILCs sind innate Zellen, die in ihrem Zytokinprofil sowie ihren Transkriptionsfaktoren den T-Zellen gleichen. Natürliche Killerzellen (NK) können als das angeborene Pendant von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen, ILC1, ILC2 und ILC3 für die angeborenen Pendants von Th1-, Th2- und Th17-Zellen angesehen werden. Da sie im Infektionsverlauf sehr schnell aktiviert werden, sollte abschließend noch die Frage beantwortet werden, ob ILCs vor allem in den ersten Tagen der Besiedlung die Quelle für IL-17A, IL-17F sowie IL-22 darstellen.

Der prozentuale Anteil von ILCs an lebenden CD19⁻ Zellen war gering (ca 0,2 %) und schwankte stark innerhalb der einzelnen Gruppen, so dass nur sehr schwer Rückschlüsse gezogen werden können (Abbildung 4.13A). Dennoch scheint der Anteil an ILCs in allen Gruppen nach 24 Stunden etwas höher zu liegen als nach 7 Tagen. Aus der Analyse der IL-17A⁺, IL-17F⁺, IL-22⁺ und IL-9⁺ ILCs konnten aufgrund der geringen Zellzahl und der hohen interindividuellen Schwankungen keine validen Rückschlüsse gezogen werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die *intranasale* Besiedlung mit *S. aureus* keine deutliche Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen und ILCs in den zervikalen Lymphknoten induziert. Lediglich bei Mäusen, die mit einer hohen Dosis *S. aureus* DIP (1×10^8 CFU) besiedelt wurden, war in einigen Tieren ein Anstieg Zytokin-produzierender CD4⁺-T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen nachweisbar. Dies lässt vermuten, dass vor allem Th17-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen für die Produktion von IL-17A, aber auch IL-17F und IL-22 verantwortlich sind. Eine Beteiligung von IL-9-produzierender Zellen bei der Besiedlung mit *S. aureus* konnte nicht nachgewiesen werden. Zudem war es durch den geringen prozentualen Anteil an ILCs in den zervikalen Lymphknoten nicht möglich Rückschlüsse auf deren Zytokinproduktion zu ziehen.

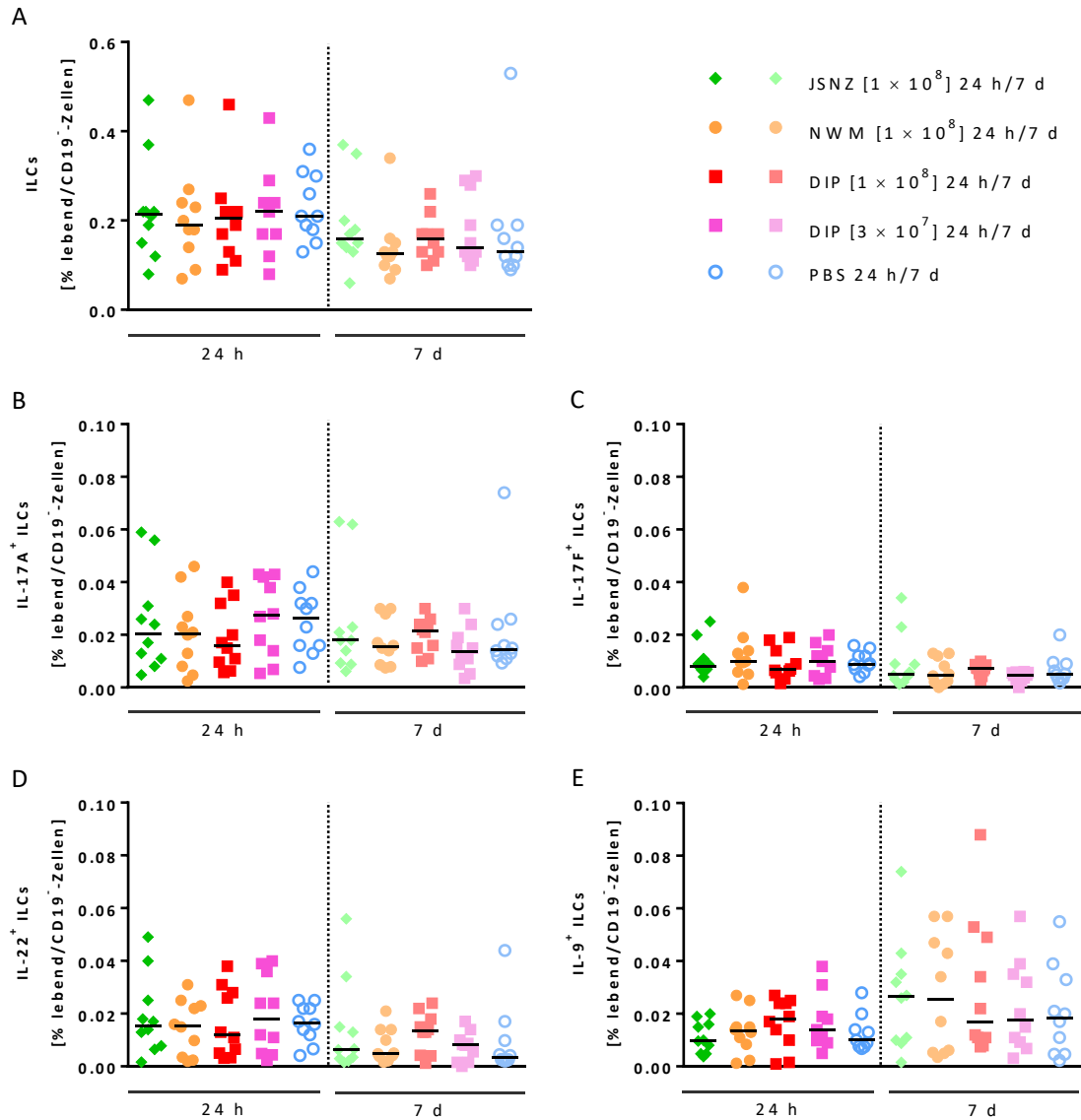


Abbildung 4.13: Innate lymphoid cells in den zervikalen Lymphknoten zeigen nach intranasaler Besiedlung mit *S. aureus* keine Zytokinproduktion.

Weibliche Albino-C57BL/6-Mäuse (n=10) wurden intranasal mit 10 μ L *S. aureus* (1×10^8 CFU bzw. 3×10^7 CFU) besiedelt. Kontrolltieren wurden 10 μ L PBS intranasal appliziert. Nach 24 Stunden bzw. 7 Tagen wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, die zervikalen Lymphknoten entnommen und die gewonnenen Zellen mit Antikörpern gegen CD3, CD4, CD25, CD127, IL-17A, IL-17F, IL-22 und IL-9 gefärbt. Abgebildet ist der prozentuale Anteil von ILCs (A), IL-17A⁺ CD4⁺ ILCs (B), IL-17F⁺ ILCs (C), IL-22⁺ ILCs (D) und IL-9⁺ ILCs (E) an lebenden CD19⁻ Zellen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Jeder Punkt stellt eine Maus dar. Die durchgezogene Linie zeigt den Median. Für die statistische Auswertung wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Post Hoc Test verwendet. Die *S. aureus*-besiedelten Tiere wurden mit PBS-applizierten Tieren verglichen

4.7.3 Die Besiedlung mit *S. aureus* induziert nach 7 Tagen keine sIgA-Antikörperantwort

Auf Schleimhautoberflächen stellt sekretorisches IgA (sIgA) die dominante Antikörperklasse dar. Die wichtigste Aufgabe des sIgA ist die Neutralisation von Bakterien und Toxinen [2,31,32]. Es ist bekannt, dass *S. aureus* Carrier höhere IgA-Konzentrationen aufweisen als Non-Carrier, was darauf hindeutet, dass bereits eine Besiedlung mit *S. aureus* die Produktion von IgA induziert [94,202].

Der Nachweis von Gesamt-IgA im Stuhl besiedelter Mäuse erfolgte mittels ELISA (Abbildung 4.14 A). Dabei wurde der IgA-Gehalt von *S. aureus*-besiedelten Tieren mit den Kontrolltieren (PBS) verglichen. Es zeigte sich ein Abfall des Gesamt-IgA-Spiegels nach 1, 3 und 5 Tagen im Vergleich zu Tag 0. Nach 7 Tagen war dann ein leichter Anstieg zu erkennen, allerdings sowohl in Tieren, die PBS erhalten haben, als auch in *S. aureus*-besiedelten Mäusen, was darauf schließen lässt, dass die Besiedlung mit *S. aureus* keine Änderung des Gesamt-IgAs im Darm induziert hat.

Zum Nachweis von *S. aureus*-spezifischen Antikörpern werden im Allgemeinen extrazelluläre Proteine oder abgetötete Zellen eingesetzt. Da das vorhandene Protein A den Fc-Teil von Antikörpern bindet und dies zu falsch positiven Ergebnissen führen kann, wurde zunächst das Protein A-Gen mittels Phagentransduktion deletiert. Die Isolate JSNZ Δ spa und NWM Δ spa lagen bereits vor, *S. aureus* DIP Δ spa wurde im Rahmen dieser Arbeit generiert (Anhang Abbildung 7.7). Als Donorstamm diente *S. aureus* 113 Δ spa::eryR.

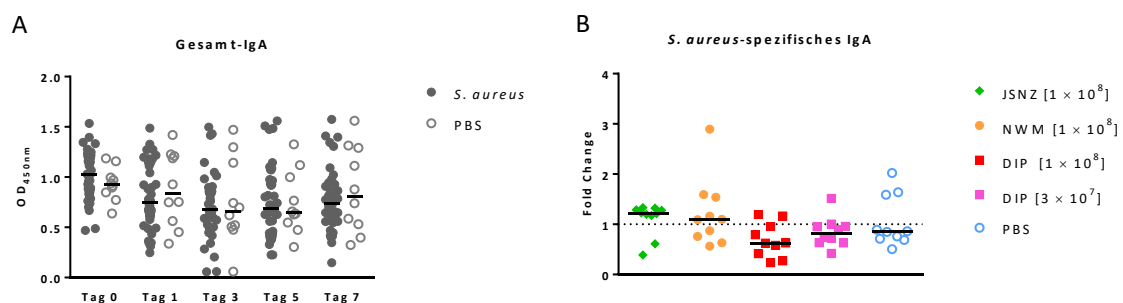


Abbildung 4.14: 7 Tage nach intranasaler Besiedlung mit *S. aureus* konnte keine Änderung der IgA-Level im Stuhl der Mäuse nachgewiesen werden.

Weibliche Albino-C57BL/6-Mäuse ($n = 10$) wurden *intranasal* mit $10 \mu\text{L}$ *S. aureus* (1×10^8 CFU bzw. 3×10^7 CFU) besiedelt. Kontrolltieren wurden $10 \mu\text{L}$ PBS *intranasal* appliziert. An Tag 0, 1, 3, 5 und 7 wurden Stuhlproben der Tiere gesammelt und auf $0,2 \text{ g/mL}$ verdünnt. Das Gesamt-IgA im Stuhl (A) sowie *S. aureus*-spezifisches IgA gegen extrazelluläre Proteine von *S. aureus* JSNZ Δ spa, NWM Δ spa und DIP Δ spa (B) wurde mittels ELISA nachgewiesen. Zur Bestimmung des Gesamt-IgA wurden die Stuhlproben 1:200 verdünnt, für das *S. aureus*-spezifisches IgA wurden die Stuhlproben unverdünnt eingesetzt. Die Bindung muriner Antikörper wurde mit einem Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-Maus-IgA-Detektionsantikörper (1:5.000) nachgewiesen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Die Messung der Absorption erfolgte bei OD_{450nm} in Duplikaten, die um den mitgeführten Leerwert korrigiert wurden. Jeder Punkt stellt eine Maus dar. Die durchgezogene Linie zeigt den Median. Für die statistische Auswertung wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Post Hoc Test verwendet. Die *S. aureus*-besiedelten Tiere wurden mit PBS-applizierten Tieren verglichen.

Zum Nachweis von *S. aureus*-spezifischen IgA-Antikörpern im Stuhl besiedelter Mäuse mittels ELISA wurden die extrazellulären Proteine der drei *S. aureus*-Stämme JSNZ Δ spa, NWM Δ spa und DIP Δ spa

zu gleichen Teilen gemischt. Die Antikörperantwort der Mäuse an Tag 0 wurde mit der an Tag 7 verglichen (Abbildung 4.14 B). Am Tag 0 waren bei keiner Versuchsgruppe spezifische IgA-Antikörper detektierbar (Daten nicht gezeigt). Auch nach 7 Tagen konnten keine *S. aureus*-spezifischen IgA-Antikörper nachgewiesen werden.

Die Daten deuten darauf hin, dass eine Besiedlung mit *S. aureus* innerhalb von 7 Tagen noch keine sIgA-Antikörperantwort im Gastrointestinaltrakt induziert. Hierbei spielte es keine Rolle, ob die Tiere mit einem humanen oder einem murinen *S. aureus*-Isolat besiedelt wurden.

Kapitel 5 Diskussion

5.1 Vorsage des *in vivo*-Verhaltens von *S. aureus* anhand von *in vitro*-Experimenten

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob murine Besiedlungs- und Infektionsmodelle durch die Verwendung mausadaptierter *S. aureus*-Stämme optimiert werden können. Insgesamt standen dafür über 250 *S. aureus*-Stämmen zur Wahl, die aus Labor- und Wildmäusen isoliert wurden. Die Stämme wurden mit Hilfe von *in vitro*-Methoden vorcharakterisiert, um die Anzahl mausadaptierte Stämme für nachfolgende *in vivo*-Versuche einzugrenzen.

Bei Labormäusen gab es nur drei *S. aureus*-Linien, die weltweit nachgewiesen werden konnten: CC88, CC15 und CC1, wobei CC88 die vorherrschende Linie darstellte. Insgesamt konnten 22 verschiedene Spa-Typen dieser Linie nachgewiesen werden. Die große Diversität lässt vermuten, dass diese Linie bereits seit vielen Jahren in Labormäusen existiert [182]. Beim Menschen kommen CC88-Isolate hingegen nur selten vor [47,163,164].

Die Linie CC49 ist vorherrschend in Wildmäuse (35,4 %) und Wildratten (40,5 %) [183,186]. Sie konnte jedoch nicht in Labortieren nachgewiesen werden [182,183,186]. In Schweinen stellt CC49 die dritthäufigste *S. aureus*-Linie dar [203,204]. Bei Menschen kommt auch diese Linie nur selten vor [47,165,205]. Allerdings konnten Oppliger *et al.* zeigen, dass eine Übertragung auf den Menschen grundsätzlich möglich ist, da sie zumindest auch bei Schweinezüchtern nachgewiesen wurde [203,204,206,207]. Vereinzelt wurde die Linie in Eichhörnchen [207], Ratten [208], Pferden [209], Wallabys [210], Wühlmäuse und Wildkatzen [211] nachgewiesen, was auf ein eher enges Wirtsspektrum hindeutet.

In einer Pilotstudie wurde zunächst CC8 als dominierende *S. aureus*-Linie in Wildmäusen nachgewiesen, weshalb sie ebenfalls im Mausmodell getestet wurde. Spätere Genomsequenzierungen der 24 CC8-Isolate ergaben jedoch einen maximalen Unterschied von elf *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) zwischen den einzelnen Isolaten. Die eingeschränkte Variabilität lässt vermuten, dass es sich hierbei um eine Kontamination handelt und die Isolate aus einem einzigen Organismus stammen (persönliche Mitteilung Birgit Walther, FU Berlin, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen). Im Gegensatz zu den anderen beiden Linien hat die Linie CC8 ein breites Wirtsreservoir, einschließlich Menschen, Pferden und Wildtieren [47,212].

Allen murinen *S. aureus*-Isolaten fehlten bestimmte Eigenschaften, die in humanen *S. aureus*-Stämmen häufig vorkommen. Alle waren negativ für die Methicillin-Resistenzgene *mecA* und *mecC* [183,184]. Zudem konnten Superantigen-Gene lediglich in zwei Isolaten der Linie CC8 (1,9 %) nachgewiesen werden [184]. Des Weiteren konnten auch Sa3int-Phagen, welche für das humane Immunevasionscluster kodieren, lediglich in 13,0 % der murinen CC88-Stämme, nicht aber in den Isolaten der Linien CC88 und CC49 nachgewiesen werden [182–184]. Es ist bereits bekannt, dass das Immunevasionscluster humanspezifisch ist und deshalb eher selten in tierischen *S. aureus*-Isolaten detektiert werden kann [163,165,213]. Durch die Integration der Sa3int-Phagen in das bakterielle Chromosom wird das *hly*-Gen zerstört, welches einen wichtigen Virulenzfaktor in Mausinfektionsmodellen darstellt [214]. Die Faktoren des Immunevasionsclusters zeigen im murinen System hingegen keine oder nur eine vernachlässigbare Aktivität [81,215,216].

Pro klonalem Komplex wurde fünf Isolate mit repräsentativem *spa*-Typ sowie typischen Phagemustern und Virulenzgenen ausgewählt. Diese wurden anschließend auf ihre Fähigkeiten murines Plasma zu koagulieren sowie in murinem Vollblut zu überleben untersucht

Der Koagulationsassay wurde verwendet, da bekannt ist, dass *S. aureus* teils wirtsspezifische Koagulationsfaktoren besitzt, wie z.B. vWbp und Staphylokinase. Somit kann der Koagulationsassay Aufschluss über die Wirtsadaptation liefern [156,178,190].

Betrachtet man die verschiedenen Linien, so zeigte sich im Koagulationsassay, dass die Linien CC8 und CC49 einen linienspezifischen Phänotyp aufweisen. Es gab kaum Unterschiede zwischen den Stämmen innerhalb der Linie. Das könnte mit der Präsenz linienspezifischer Varianten prokoagulatorischer Gene wie z.B. des vWbp erklärt werden [156].

Im Vergleich dazu konnten bei der Linie CC88 große Unterschiede zwischen den einzelnen *S. aureus*-Isolaten detektiert werden. Dies könnte durch den Erwerb zusätzlicher pro- oder antikoagulatorischer Gene oder durch die differentielle Regulation auf Proteinebene erklärt werden. Ein Vergleich der Gesamtgenomsequenz mit dem Stamm Newman ergab, dass *S. aureus* DIP (CC49) und JSNZ (CC88) alle Varianten des vWbp-Gens tragen [156]. Zudem besitzt *S. aureus* DIP eine allele Variante des Gens *coa*. Vor kurzem berichteten Sun *et al.*, dass die prokoagulatorische Aktivität von *S. aureus* JSNZ und Newman auch von der Proteinexpression abhängt. Newman sezernierte große Mengen an Koagulase und agglutinierte schnell humanes und murines Plasma. Im Gegensatz dazu sezernierte JSNZ weniger Koagulase und kodierte eine allele Variante von vWbp, die es ihnen ermöglichte, murines Plasma leichter als humanes Plasma zu agglutinieren [156]. Um die Funktionalität der DIP-spezifischen Varianten zu testen, sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich.

Nach dem Koagulationsassay wurde ein Überlebens-Assay in murinem Vollblut zur Vorcharakterisierung der *S. aureus*-Stämme eingesetzt, welcher die *in vivo*-Bedingungen imitieren sollte. Nach anfänglicher Reduktion der CFU/mL waren alle Stämme in der Lage im murinen Vollblut zu replizieren, allerdings unterschiedlich gut.

Wie im Koagulationsassay so zeigte sich auch hier für die Linien CC8 und C49 ein linienspezifischer Phänotyp. Nach 24 Stunden konnten bei den Stämmen der Linie CC49 10^7 CFU/mL ermittelt werden, wohingegen die murinen Stämme der Linie CC8 sogar 10^8 CFU/mL erreichten. Die Replikation des humanen CC8-Isolates *S. aureus* Newman war allerdings eher mit der Linie CC49 vergleichbar, da hier nach 24 Stunden ebenfalls nur 10^7 CFU/mL detektiert werden konnten. Hingegen zeigten die drei Isolate der Linie CC88 eine größere Diversität. Diese reichte von 10^7 CFU/mL bei muCC88c bis 10^9 CFU/mL bei JSNZ.

Nach Abschluss der *in vivo*-Experimente konnte nun die Vorhersagbarkeit des Verhaltens der *S. aureus*-Isolate im Tiermodell anhand von *in vitro*-Vorversuchen überprüft werden. Die *S. aureus*-Stämme Newman, muCC88d, JSNZ und DIP waren alle in der Lage murines Plasma vollständig zu koagulieren. Lediglich muCC8c gelang dies nicht vollständig (Abbildung 4.1 und Abbildung 7.6 A). Dementsprechend wäre anzunehmen, dass muCC8c *in vivo* eher eine verminderte Virulenz aufweist, wohingegen es zwischen den anderen vier Isolaten mit ähnlicher koagulatorischer Aktivität nur minimale Differenzen geben sollte. Anhand des Replikationsverhaltens wäre hingegen anzunehmen gewesen, dass sich die Stämme *S. aureus* DIP und NWM *in vivo* ähnlich verhalten und eher einen milden Infektionsverlauf zeigen, wohingegen *S. aureus* JSNZ eine gesteigerte Virulenz aufweisen sollte (Abbildung 7.6 B). Fasst man die Ergebnisse der *in vitro*-Vorversuche zusammen, so müsste *S. aureus* JSNZ hoch-virulent im Mausmodell sein, wohingegen Infektionen mit *S. aureus* DIP sowie muCC88d moderat und mit Newman und muCC8c eher mild verlaufen müssten.

Das war jedoch nicht der Fall. *In vivo* fiel vor allem die hohe Virulenz von *S. aureus* DIP auf. Zwar zeigte DIP *in vitro* eine starke koagulatorische Aktivität, aber die Replikationsfähigkeit war im Vergleich zu den anderen *S. aureus*-Isolaten vermindert. Dennoch war *S. aureus* DIP in beiden Infektionsmodellen wesentlich virulenter als die anderen Isolate. Sowohl im Pneumonie- als auch im Bakteriämiemodell lag die Überlebensrate bei 0%. Die Infektionen mit *S. aureus* Newman verliefen ebenfalls virulenter als es anhand der Vorversuche anzunehmen gewesen wäre.

Im Gegensatz dazu zeigte der murine Stamm muCC8c, welcher die schwächste Koagulation und eine moderate Replikation aufwies, eine mit *S. aureus* Newman vergleichbare Virulenz im Pneumoniemodell. Zudem konnte bei den Tieren eine 100fach höhere bakterielle Last in den

Lungen (Pneumonie) detektiert werden. Das deutet darauf hin, dass muCC8c in der Lage ist in den Lungen der Mäuse über einen Zeitraum von 2 Tagen zu überleben, ohne dass die Tiere jedoch schwer erkranken. Im Bakteriämiemodell war der Verlauf mit einer Überlebensrate von 70 % zwar milder als bei *S. aureus* Newman, dennoch entsprach die bakterielle Last in den Nieren denen der anderen Stämme. Somit gibt es auch hier Hinweise darauf, dass *S. aureus* muCC8c in der Lage war in den Tieren, ohne sichtliche Symptome zu erzeugen, zu überleben.

Die sehr gute Replikationsfähigkeit und die sehr gute Koagulationsfähigkeit von *S. aureus* JSNZ spiegelte sich ebenfalls nicht in den Ergebnissen der *in vivo*-Versuche wider. Die Pneumonie mit *S. aureus* JSNZ verlief mild. Alle Tiere überlebten und die Gruppe wies insgesamt den niedrigsten Belastungsscore auf. Im Bakteriämiemodell hingegen war JSNZ virulenter als die beiden anderen murinen *S. aureus*-Isolate muC8c und muCC88d und war insgesamt eher mit Newman vergleichbar. Im Besiedlungsmodell zeigte sich jedoch, dass *S. aureus* JSNZ Mäuse effizienter besiedelt als *S. aureus* DIP und NWM. Dies lässt vermuten, dass JSNZ eher für die Kolonisation, nicht aber für invasive und lebensbedrohliche Erkrankungen an seinen murinen Wirt angepasst ist.

Des Weiteren zeigte *S. aureus* muCC88d, welcher ebenfalls murines Plasma vollständig koagulieren und sich auch in murinem Vollblut gut replizieren konnte, *in vivo* die niedrigste Virulenz in beiden Infektionsmodellen.

Zur Charakterisierung der murinen *S. aureus*-Isolate werden diese aktuell sequenziert und in Hinblick auf neue mausspezifische Virulenzfaktoren sowie mobile genetische Elemente untersucht (Ross Fitzgerald, Edinburgh).

Weder die gesteigerte Virulenz von *S. aureus* DIP in beiden Infektionsmodellen noch der milde Verlauf der Infektionen mit muCC88d war anhand der Ergebnisse des Koagulationsassays zu erwarten. Unsere Versuche zeigen, dass die *in vitro*-Assays keine eindeutigen Rückschlüsse auf das Verhalten *in vivo* zulassen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der tierische Organismus wesentlich komplexer ist als es sich mit Zellen in Zellkultur oder ähnlichen *in vitro*-Verfahren nachstellen lässt. *In vitro* kann nur ein kleiner Teil dieses komplexen Systems betrachtet werden, jedoch aber nicht das Zusammenspiel unterschiedlicher Zelltypen in Organen und diversen Geweben. *In vitro*-Methoden bieten die Möglichkeit die Tierzahlen durch Vorversuche drastisch zu reduzieren. Dennoch ist es zurzeit noch nicht möglich gänzlich auf Tierversuche zu verzichten. Hierfür sind weitere Methoden notwendig, die die Komplexität von Organismen widerspiegeln.

5.2 Sind mausadaptierte *S. aureus*-Stämme zur Optimierung muriner Besiedlungs- und Infektionsmodelle geeignet?

In der *S. aureus*-Forschung werden Mäuse zumeist mit humanen *S. aureus*-Isolaten infiziert. Da *S. aureus* jedoch stark wirtsspezifisch ist, werden unphysiologisch hohe Infektionsdosen benötigt, um eine Erkrankung auszulösen. Zudem sind viele Virulenzfaktoren humanspezifisch und somit meist unwirksam im Mausmodell [81,194,217,218]. Um ein besseres Verständnis für die Pathogen-Wirts-Interaktion zu erlangen, welches schließlich zur Entwicklung neuer Therapieansätze führen könnte, scheint die Verwendung mausadaptierter *S. aureus*-Stämme im Mausmodell vielversprechend zu sein.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die murinen *S. aureus*-Isolate JSNZ und DIP Mäuse länger besiedeln können als der humane Referenzstamm *S. aureus* Newman. Dieser wurde bereits nach 7 Tagen nahezu vollständig eliminiert, wohingegen die Tiere, die mit *S. aureus* JSNZ und DIP inokuliert wurden, über den gesamten Versuchszeitraum von 7 Tagen besiedelt waren. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass die bakterielle Last lediglich im Stuhl der Tiere nachgewiesen wurde, da es aus technischen Gründen nicht gelang *S. aureus* in den Nasen der Tiere zu detektieren. Dies ist vermutlich auf eine zu lange Homogenisierungszeit der Nasen zurückzuführen, was zur Erhitzung der Proben und somit dem Absterben der Bakterien geführt hat. Somit können keine Rückschlüsse über die nasale Besiedlung gezogen werden. Nachfolgende Experimente zeigten, dass es mit einem schonenderen Homogenisierungsverfahren möglich ist, *S. aureus* aus den Nasen der Tiere zu isolieren und die bakterielle Last zu bestimmen [persönliche Mitteilung Liliane Maria Fernandes de Oliveira].

Auch andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass mausadaptierte *S. aureus*-Stämme Mäuse besser besiedeln als humane Isolate. Sowohl die murinen CC88-Isolate JSNZ und WU1, als auch SaF_1 (CC15) waren in der Lage den Nasopharynx und den Gastrointestinaltrakt von Labormäusen persistent zu besiedeln, wohingegen humane Isolate bereits wenige Tage nach der nasalen Besiedlung wieder eliminiert wurden [156,163,179]. Mit *S. aureus* JSNZ gelang es Mäuse bis zu 42 Tage zu besiedeln, auch ohne vorangegangene Behandlung der Mäuse mit Antibiotika [156]. Zudem konnte gezeigt werden, dass wie auch beim Menschen eine Übertragung der besiedelnden Stämme auf die Nachkommen möglich ist [178,219]. Somit scheinen mausadaptierte *S. aureus*-Stämme vor allem für Besiedlungsmodelle sehr gut geeignet zu sein. Sie ermöglichen es, die Pathogen-Wirts-Interaktion mit einem an das Modell angepassten Stamm zu analysieren und Rückschlüsse auf relevante Pathogen- und Wirtsfaktoren zu ziehen. Des Weiteren bieten sie eine gute Möglichkeit neue Therapieansätze zur Dekolonisation sowie Vakzinierung im Tiermodell zu testen.

Aber auch für murine Infektionsmodelle scheinen einige murine Isolate besser geeignet zu sein als das humane Isolat Newman. Für diese Arbeit wurden murine *S. aureus*-Isolate im Bakteriämie- und Pneumoniemodell mit *S. aureus* Newman verglichen. Es zeigte sich, dass vor allem *S. aureus* DIP in beiden Modellen hochvirulent war. Nach kürzester Zeit starben alle Tiere, die mit diesem Stamm in der Standarddosis infiziert wurden. Eine Reduktion der Infektiosdosis von *S. aureus* DIP um 90% führte zu vergleichbaren Ergebnissen zwischen DIP und Newman hinsichtlich der bakteriellen Last, des Belastungsscores, der Zytokin- sowie Chemokinkonzentrationen.

Jedoch waren alle anderen getesteten mausadaptierten Stämme in beiden Infektionsmodellen weniger oder ähnlich virulent wie *S. aureus* Newman. Es ist zu berücksichtigen, dass sich invasive Infektionsmodelle möglicherweise nicht so gut zur Charakterisierung der Wirtsadaptation eignen, da *S. aureus* wahrscheinlich für die Kolonisation und Übertragung, nicht aber für invasive und lebensbedrohliche Erkrankungen an seinen murinen Wirt angepasst ist [220,221].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mausadaptierte *S. aureus*-Stämme sehr wohl zur Optimierung muriner Besiedlungs- und Infektionsmodelle geeignet sind. Vor allem die persistierende Besiedlung von Labormäusen sowie die Übertragung von *S. aureus* auf die Nachkommen bietet neue Möglichkeiten für *S. aureus*-Forscher. Zudem konnte mit Hilfe des mausadaptierten Stammes *S. aureus* DIP die Infektionsdosis im Pneumonie- und Bakteriämie-Modell erheblich reduziert werden, was darauf hindeutet, dass es sich hierbei um ein physiologischeres Modell für das Studium der *S. aureus*-Wirts-Interaktion handelt, welches durchaus für die Erprobung neuartiger Therapeutika geeignet ist. Ferner könnte *S. aureus* DIP möglicherweise auch zur Optimierung muriner Mastitismodelle verwendet werden, da hier das porenformende Toxin LukMF', welches von *S. aureus* DIP exprimiert wird, eine bedeutende Rolle spielt [222,223].

Es ist zu berücksichtigen, dass auch die Verwendung mausadaptierter *S. aureus*-Stämme in murinen Besiedlungs- und Infektionsmodellen lediglich ein Modell darstellt. Weitere Modelle müssen hinzugezogen werden, um erhaltene Ergebnisse zu bestätigen und deren Relevanz in Bezug auf den Menschen zu beurteilen. Dennoch ermöglichen es mausadaptierte Stämme erste Hinweise zu erhalten, welche dann z.B. in humanisierten Mäusen oder aber an freiwilligen Probanden weiter analysiert werden können.

5.3 Sind Mäuse ein geeignetes Modell für *S. aureus* Besiedlungs- und Infektionsversuche?

In der *S. aureus*-Forschung werden häufig Mäuse als Infektionsmodelle verwendet, da sie einige Vorteile aufweisen. Es ist bekannt, dass sich alle Säugetiere in ihrer Physiologie ähneln. Mäuse

stellen das kleinste Säugetier-Infektionsmodell dar [224]. Das erleichtert zum einen ihre Handhabung im Vergleich zu anderen Säugetieren, wie zum Beispiel Ratten, Kaninchen oder Schweinen, und verringert zudem den Platzbedarf und die Haltungskosten. Des Weiteren bieten die kurze Generationszeit und große Würfe den Forschern die Möglichkeit Mausexperimente schnell zu expandieren. Da Mäuse das am häufigsten verwendete Infektionsmodell darstellen, ist ihr Immunsystem äußerst gut charakterisiert und es stehen zahlreiche *knock-out*-Stämme zur Verfügung [224–228].

Die Verwendung von Mäusen bringt jedoch auch einige Nachteile mit sich. Menschen und Mäuse unterscheiden sich in ihrer Größe, der Stoffwechselrate, der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, der Ernährung sowie einigen Aspekten ihrer kardiovaskulären Physiologie [176,229]. Darüber hinaus sind die am häufigsten verwendeten Labormäuse Inzuchtstämme. Obwohl die Gesamtstruktur des Immunsystems zwischen Mäusen und Menschen relativ ähnlich ist, gibt es dennoch einige Unterschiede, zum Beispiel im Gleichgewicht von Neutrophilen und Leukozyten, in der Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren und in der Defensinexpression durch Neutrophile [230,231].

In der *S. aureus*-Forschung ging man lange Zeit davon aus, dass Mäuse keine natürlichen Wirte von *S. aureus* sind und sich demzufolge nicht als Infektionsmodell zur *S. aureus*-Forschung eignen [128,232–234]. Das konnte jedoch durch mehrere Studien aus unserer und anderen Gruppen widerlegt werden, die zeigten, dass sowohl Labor- als auch Wildmäuse mit *S. aureus* besiedelt sind [156,179,182,183]. Mäuse sind ebenso wie Menschen von Natur aus hauptsächlich in der Nasenhöhle, im unteren Verdauungstrakt und auf der Haut mit *S. aureus* besiedelt. Zudem führt *S. aureus* auch bei Mäusen häufig zu eitrigen Entzündungen mit Abszessbildung in fast jedem Organ [235–237]. Das häufigste klinische Krankheitsbild stellen eitrige Abszesse in den Präputialdrüsen dar [163,235,237]. Des Weiteren wurden einzelne Fälle von Gesichts- und Unterkieferabszessen, nekrotisierender Dermatitis, Furunkulose, Arthritis, Mastitis, Lungenentzündung und Augeninfektionen beschrieben [163,177,238,239]. Die ähnliche klinische Manifestation bei Menschen und Mäusen spricht für Mäuse als *S. aureus*-Infektionsmodell.

Es ist jedoch wichtig zu berücksichtigen, dass einige *S. aureus*-Virulenzfaktoren wirtsspezifisch sind. So sind z.B. Pantone-Valentine-Leukocidin (PVL), Superantigene, einige Staphylokokken-Superantigen-ähnliche (SSL) Proteine oder die Phagen-kodierten Immunevasionsmoleküle Staphylokinase (SAK), Chemotaxis-inhibitorisches Protein (CHIPS) und Staphylokokken-Komplement-Inhibitor (SCIN) weitestgehend humanspezifisch und erfordern hohe Dosen in murinen Infektionsmodellen oder sie zeigen gar keine Wirkung [81,194,217,218].

Eine Alternative zur Maus stellt das Kaninchen dar. Diese Tiere sind das Modell der Wahl bei der Analyse der Wirkung von SAg sowie des porenbildenden Toxins PVL, da diese Toxine bei Mäusen lediglich in sehr hohen Konzentrationen wirksam sind [173,174]. So sind SAg in Mäusen bei einer Konzentration von 4×10^6 µg/kg KG nicht lethal, während sie beim Menschen bereits ab 10^3 µg/kg KG lethal sind [173]. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Reaktion des Immunsystems und des Herz-Kreislauf-Systems von Kaninchen auf eine *S. aureus*-Infektion der Reaktion des Menschen sehr ähnelt [240,241]. Jedoch ist die Handhabung von Kaninchen nicht so einfach, teurer und Inzuchtstämme sind nicht verfügbar [173].

Weitere alternative Infektionsmodelle stellen Baumwollratten, Schweine und humanisierte Mäuse dar. Baumwollratten werden für nasale Besiedlungsmodelle mit *S. aureus* verwendet, da diese Tiere höhere und zuverlässigere Kolonisationsraten aufweisen als murine Modelle unter Verwendung human-adaptierter *S. aureus*-Stämme [132,242]. Baumwollratten konnten über mehrere Wochen mit humanen Isolaten besiedelt werden. Dies ist vergleichbar mit der Besiedlung von Mäusen mit mausadaptierten *S. aureus*-Isolaten. Jedoch nahm die bakterielle Last im Baumwollrattenmodell über einen Zeitraum von 26 Tagen stark ab, wohingegen sie im murinen Besiedlungsmodell über den gesamten Zeitraum stabil blieb [132,156]. Aufgrund des Mangels an transgenen Baumwollratten ist es zudem unmöglich, Wirtskolonisationsfaktoren zu analysieren [161].

Hausschweine (*Sus scrofa domesticus*) sind dem Menschen hinsichtlich ihrer Anatomie, Genetik und Physiologie ähnlicher als Mäuse [243–246]. Zudem sind Tierhaltung und Zucht im Vergleich zu anderen Großtieren relativ einfach. Die kurzen Generationszeiten und die saisonunabhängige Fortpflanzung mit hohen Wurfzahlen sind weitere Vorteile. Eine wiederholte Probennahme bildet die Grundlage für tiefere Einblicke in die Immunantwort auf einen eindringenden Erreger. Dies ist aufgrund der Größe der Tiere kein Problem. Jedoch ist das Immunsystem von Schweinen nicht so gut charakterisiert wie das von Mäusen und Menschen [243]. Zudem werden Studien zu molekularen Mechanismen bei Schweinen durch den Mangel an Antikörperreagenzien und die begrenzten transgenen Ressourcen erschwert [247].

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung humanisierter Mäuse. Dieses Modell hat alle bereits erwähnten Vorteile eines Mausmodells und zudem ein humanes Immunsystem, welches durch den Transfer von menschlichen CD34⁺-Stammzellen in immundefiziente Mäuse erzeugt wurde [248]. Da die Generierung humanisierter Mäuse eine technische Herausforderung darstellt, haben bisher lediglich drei Forschungsgruppen humanisierte Mäuse verwendet, um *S. aureus*-Infektionen der Atemwege, Haut und intraperitonealen *S. aureus*-Infektionen zu untersuchen [100,249,250]. Alle konnten eine erhöhte Anfälligkeit von humanisierten Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen

gegenüber *S. aureus* und eine höhere Bakterienbelastung zeigen. Zudem gab ihnen die Verwendung von humanisierten Mäusen die Möglichkeit, die Rolle von PVL in Mäusen zu analysieren [100,250]. Trotzdem hat auch dieses Modell Nachteile. Beispielsweise führt die Transplantation von reifen menschlichen T-Zellen zu einer xenogenen *Graft-versus-Host*-Reaktion, und die T-Zell-Selektion im Thymus ist aufgrund des Fehlens von humanen HLA-Molekülen beeinträchtigt. Darüber hinaus kann die Kommunikation des Immunsystems mit anderen Organsystemen wie Atemwegen, Magen-Darm-Trakt, Hormonsystem und Nervensystem beeinträchtigt werden, da viele humane Zytokine und andere Faktoren artspezifisch sind [251]. Humanisierte Mäuse zeigen auch eine verminderte Produktion von Immunglobulinen und verminderte Klassenwechsel der Immunglobuline aufgrund einer beeinträchtigten Lymphknotenentwicklung und schlecht entwickelter Keimzentren [252]. Somit ist vor allem die adaptive Immunantwort humanisierter Mäuse stark beeinträchtigt. Dies sollte bei der Wahl des Modells berücksichtigt werden.

Letztendlich scheinen humane Studien das zuverlässigste System zur Analyse der Interaktion zwischen Mensch und Pathogen darzustellen. Experimentelle Besiedlungsmodelle an gesunden Probanden führten beispielsweise zur Identifizierung von besiedlungsrelevanten Wirtsfaktoren [135,158]. Eine Alternative stellen Beobachtungsstudien an Patienten mit *S. aureus*-Infektionen dar.

Insgesamt zeigt sich, dass das Mausmodell, wie jedes andere Tiermodell, seine Vor- und Nachteile hat. Daher ist es essenziell, dass Wissenschaftler die Grenzen jedes Modellsystems kennen und das richtige Infektionsmodell (oder eine Kombination davon) auswählen, um ihre Forschungsfragen zu beantworten. Mäuse sind ein ausgezeichnetes Tiermodell für *S. aureus*-Kolonisations- und Infektionsstudien, da sie natürliche Wirte von *S. aureus* sind und ihre Immunantwort, dank *knock-out*-Stämmen, bis ins kleinste Detail charakterisiert werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Labormäuse mit mausadaptierten *S. aureus*-Stämmen dauerhaft besiedelt werden können und die Infektionsdosis in Infektionsmodellen erheblich reduziert werden kann (siehe 5.2). Das deutet darauf hin, dass die Verwendung mausadaptierter *S. aureus*-Stämme in ihrem natürlichen Wirt – der Maus – ein physiologischeres Modell für das Studium der *S. aureus*-Wirts-Interaktion darstellt und somit gut für die Erprobung neuartiger Therapeutika geeignet ist.

5.4 *S. aureus* DIP – vielversprechendes Isolat aus der Rötelmaus

Der mausadaptierte Stamm *S. aureus* DIP, welcher aus einer Rötelmaus aus Baden-Württemberg isoliert wurde, gehört zur Linie CC49, welche die dominante *S. aureus*-Linie in wilden Nagetieren zu sein scheint (Wildmäuse 35,4 %, Wildratten: 40,5 %), jedoch nicht in Labormäusen und -ratten nachgewiesen werden konnte [182,183,186]. Diese Linie konnte zudem auch in Schweinen nachgewiesen werden. Hier stellt sie die dritthäufigste *S. aureus*-Linie dar [203,204]. Bei Menschen kommt die Linie CC49 selten vor [47,165,205]. Allerdings konnten Oppliger *et al.* zeigen, dass eine Übertragung auf den Menschen grundsätzlich möglich ist, da sie zumindest bei Schweinezüchtern ebenfalls nachgewiesen werden konnte [203,204,206,207]. Vereinzelt wurde die Linie in Eichhörnchen [207], Ratten [208], Pferden [209], Wallabys [210], Wühlmäuse und Wildkatzen [211] nachgewiesen, was auf ein eher enges Wirtsspektrum hindeutet.

Unsere Arbeitsgruppe hat sechs Isolate der Linie CC49 aus Rötel- und Gelbhalsmäusen isoliert und charakterisiert. Allen Isolaten fehlten bestimmte Eigenschaften, die in humanen *S. aureus*-Stämmen häufig vorkommen. Sie waren negativ für die Methicillin-Resistenzgene *mecA* und *mecC*, hatten keine Superantigen-Gene und auch die Sa3int-Phagen, welche für das humane Immunevasionscluster kodieren, fehlten. Es ist bereits bekannt, dass das Immunevasionscluster humanspezifisch ist und deshalb im Allgemeinen eher selten in tierischen *S. aureus*-Isolaten nachgewiesen werden kann [213]. Des Weiteren konnten keine Antibiotikaresistenzgene nachgewiesen werden, mit Ausnahme von *sdrM* (*Multidrug Efflux Pump*). Allerdings waren alle CC49-Isolate positiv für Sa5int-Phagen. Zudem konnten die Leukozidin-Gene *lukF/lukS* und *lukF-PV(P83)/lukM* detektiert werden, welche in humanen Isolaten fehlen [52].

Die Analyse der Genregion zeigte, dass die Gene *lukM* und *lukF-PV(P83)* auf einem Sa5int-Phagen lokalisiert sind. Diese gehören zur Familie der *Siphoviridae* (Genus: *Caudovirales*), deren Phagen-Genom in fünf Module eingeteilt werden kann: Lysogenie, DNA-Metabolismus, DNA-Verpackung und Kapsid-Morphogenese, Phagenschwanz-Morphogenese und Lyse [197]. Sind Virulenzgene vorhanden, befinden diese sich zwischen dem Lysogenie- und dem DNA-Metabolismusmodul oder *downstream* des Lysemoduls, wie es bereits für die Gene *lukM* und *lukF-PV(P83)* boviner Isolate gezeigt wurde [197,253].

Die Sequenzierung der im Rahmen dieser Arbeit *in vivo* verwendeten *S. aureus* Stämme zeigte, dass nur *S. aureus* DIP für die Gene des Leukozidins LukMF' kodiert, was vermuten lässt, dass dieses den Grund für die gesteigerte Virulenz darstellt. Neben Rötel- und Gelbhalsmäusen wurde LukMF' bereits in *S. aureus*-Isolaten von Rindern (CC151, CC479 und CC133) nachgewiesen. Jedoch konnten die Gene nicht in humanen *S. aureus*-Isolaten, auch nicht in denen der Linie CC49, detektiert

werden [183,196,254,255]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich bei LukMF' um einen wirtsspezifischen Virulenzfaktor handelt. In der Tat konnten Fromageau *et al.* zeigen, dass LukMF' Neutrophile von Rindern und Mäusen bindet und lysiert, aber keine humanen Neutrophilen [256]. Die Ursache hierfür ist der Rezeptor, an den LukMF' bindet: CCR1. Dieser wird auf der Oberfläche von bovinen Neutrophilen exprimiert, jedoch nicht auf der von humanen Zellen [222]. In Mäusen wird CCR1 auf der Oberfläche von Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen und T-Zellen exprimiert, an die dann das Leukozidin LukMF' binden kann [256,257].

LukMF' wurde bereits als bedeutender Virulenzfaktor bei Rindermastitis beschrieben [222,223]. *S. aureus* DIP könnte somit zur Unterstützung der Entwicklung therapeutischer Ansätze gegen LukMF' zur Bekämpfung der Mastitis *S. aureus* bei Rindern im murinen Mastitismodell eingesetzt werden. Dieses hätte im Vergleich zum bovinen Modell den Vorteil, dass es wesentlich günstiger, die Haltung sowie die Handhabung der Tiere einfacher und der Aufwand deutlich geringer wäre. Ob LukMF' auch bei anderen *S. aureus*-Erkrankungen eine Rolle spielt, ist derzeit nicht bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der mausadaptierte Stamm *S. aureus* DIP sowohl im Pneumonie- als auch im Bakteriämiemodell hochvirulent ist. In beiden Modellen konnte die Infektionsdosis, im Vergleich zum standardmäßig verwendeten *S. aureus*-Stamm Newman, um 90 % reduziert werden. Trotz der Reduktion zeigten sich im Vergleich zu Newman keine Unterschiede hinsichtlich des Belastungsscores, der Überlebensrate und der bakteriellen Last in den untersuchten Organen. Auch die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen waren zwischen beiden Stämmen vergleichbar. Des Weiteren zeigte sich im Besiedlungsmodell, dass *S. aureus* DIP, ebenso wie JSNZ, Mäuse länger besiedelt als Newman. Auch hier konnte die Besiedlungsdosis reduziert werden (um 70 %).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Produktion des porenbildenden Toxins LukMF' mit hoher Aktivität auf murinen Immunzellen zur hohen Virulenz von *S. aureus* DIP im murinen Pneumonie- und Bakteriämiemodell beitragen könnte, was eine Reduktion der Infektionsdosis ermöglicht. Zudem konnten wir zeigen, dass *S. aureus* DIP Mäuse länger besiedeln kann als der üblicherweise verwendete humane Stamm *S. aureus* Newman. Durch die Anpassung von *S. aureus* DIP an den murinen Wirt könnte dieser Stamm sehr gut zur Optimierung von *S. aureus* Besiedlungs- und Infektionsmodellen geeignet sein, da es ein physiologischeres Model der Pathogen-Wirts-Interaktion darstellt. Die Verwendung eines solchen Stammes ermöglicht es ein besseres Verständnis für Infektionsprozesse und die Pathogen-Wirt-Interaktionen zu erlangen und eventuell dadurch neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

5.5 Die Besiedlung mit *S. aureus* induziert nur eine sehr milde lokale Immunantwort

Als Kommensale besiedelt *S. aureus* vorrangig die Nasenvorhöfe, aber auch die Achselhöhlen, den Rachenraum und den unteren Verdauungstrakt von Menschen und Tieren [35,36,258,259]. Bis zu 30 % der Bevölkerung sind persistent besiedelt [38]. Da die Besiedlung mit *S. aureus* einen Risikofaktor für *S. aureus*-Infektionen darstellt [36,41,42], ist es essenziell den Prozess der nasalen Besiedlung im Detail zu verstehen, um neue Therapieansätze zu entwickeln. Dafür werden geeignete Besiedlungsmodelle benötigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Besiedlung von Albino-C57BL/6-Mäuse mit den murinen *S. aureus*-Isolaten JSNZ und DIP mit dem humanen Isolat Newman verglichen. Neben der Etablierung eines geeigneten Besiedlungsmodells stand die Analyse der zellulären Immunantwort im Vordergrund. Da bekannt ist, dass IL-17 sowie IL-22 eine wesentliche Rolle bei der Besiedlung mit *S. aureus* spielen, aber die Zytokin-produzierenden Zellen noch nicht eindeutig identifiziert wurden [147,159–161], sollte nun deren Quelle näher untersucht werden. Zudem wurden auch IL-9-produzierende Zellen betrachtet. In ersten Pneumonieversuchen zeigte sich ein leichter, nicht signifikanter Anstieg der IL-9-Konzentration in den Lungen von *S. aureus*-infizierten Mäusen im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe [201]. Derzeit ist jedoch noch unklar, ob IL-9 bei der Immunantwort während einer *S. aureus*-Infektion involviert ist [260]. Es ist bekannt, dass IL-9 bei Immunreaktionen vom Typ 2 beteiligt ist [261]. Zudem weiß man, dass *S. aureus* bei allergischen Reaktionen eine Rolle spielt [262–264]. Somit wäre es zumindest denkbar, dass IL-9 auch bei *intranasaler* Besiedlung und Atemwegsinfektionen mit *S. aureus* von Bedeutung ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb eine mögliche Beteiligung von IL-9 an der Besiedlung mit *S. aureus* untersucht werden.

Die Ergebnisse der *intranasalen* Besiedlung mit humanen bzw. mausadaptierten *S. aureus*-Isolaten zeigten keine deutliche Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen und ILCs in den zervikalen Lymphknoten. Lediglich bei ein paar Tieren, die mit der hohen Dosis DIP [1×10^8 CFU] besiedelt waren und einen hohen Belastungsscore aufwiesen, konnte 7 Tage nach Besiedlung ein Anstieg an IL-17A-, IL-17F-, IL-22-produzierenden CD4⁺-T-Zellen sowie IL-17A- und IL-22-produzierenden $\gamma\delta$ -T-Zellen nachgewiesen werden. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass diese T-Zellaktivierung nur bei Tieren zu beobachten war, die auch einen hohen Belastungsscore aufwiesen. Nach 24 Stunden wurden bei einigen Tieren mit einem hohen Belastungsscore Bakterien in den Lungen nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass diese Tiere nicht nur besiedelt waren, sondern eine Atemwegsinfektion erlitten. Nach 7 Tagen waren keine Bakterien in den Lungen der Tiere

detektierbar. Dennoch ist anzunehmen, dass mit Hilfe der FACS-Färbung lediglich in Tieren, die eine Atemwegsinfektion hatten, auch Unterschiede in der Zellzusammensetzung detektiert werden konnten. Bei Tieren mit lokal begrenzter nasaler Besiedlung war mit den gewählten Analysemethoden hingegen keine Aktivierung der CD4⁺-T-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen nachweisbar. Die Analyse des prozentualen Anteils an ILCs zeigte große Schwankungen, wodurch keine Rückschlüsse zur Beteiligung der ILCs in der Besiedlung mit *S. aureus* möglich waren. Zudem konnte keine Beteiligung von IL-9 ermittelt werden. Jedoch konnte kürzlich für *S. aureus*-induzierte Pneumonien tatsächlich eine Beteiligung von IL-9 gezeigt werden. Drei Tage nach Infektion wurde vermehrt IL-9 in den Lungen, der BALF sowie im But bestimmt. Die Blockierung der IL-9-Aktivität mittels Anti-IL-9-Antikörper führte zudem zur Reduktion der bakteriellen Last in den Lungen der Tiere [260].

Das in den hier durchgeführten Experimenten keine T-Zellaktivierung nachweisbar war, könnte verschiedene Gründe haben. Eine mögliche Ursache könnte die Auswahl der Analysezeitpunkte sein. Für die Besiedlung wurden 24 Stunden sowie 7 Tage nach *intranasaler* Besiedlung gewählt. Damit sollte sowohl die innate als auch die adaptive Immunantwort charakterisiert werden. Unter Umständen waren jedoch beide Zeitpunkte nicht gut gewählt. Daten zur Charakterisierung der Immunantwort im murinen Besiedlungsmodell sind rar. Jedoch konnten Mulcahy *et al.* eine Aktivierung von T-Zellen 7 Tage nach Besiedlung nachweisen. Allerdings verwendeten sie nasopharyngiales Gewebe zur Analyse der T-Zellantwort. Die zervikalen Lymphknoten wurden nicht betrachtet [159]. Zudem konnten sie mittels FACS-Analyse IL-22-produzierende Zellen detektieren. Des Weiteren wurden auch Zytokine und Chemokine im Nasenhomogenat mittels ELISA nachgewiesen, deren Peak bereits an Tag 1 zu beobachten war. Diese Daten deuten darauf hin, dass zu den gewählten Zeitpunkten durchaus eine Immunantwort nachweisbar ist, diese jedoch vom untersuchten Gewebe abhängt.

Die Lokalisation der durch die Besiedlung aktivierten Immunzellen spielt eine entscheidende Rolle. Im Rahmen der Arbeit wurden die lokalen drainierenden Lymphknoten (zervikale Lymphknoten) untersucht. Da es sich lediglich um eine nasale Besiedlung und nicht um eine Atemwegsinfektion handelt ist anzunehmen, dass keine starke Immunreaktion in den drainierenden Lymphknoten erfolgte, so dass lediglich ein geringer Anteil der Zellen aktiviert wird. Diese minimale Änderung der Zellzusammensetzung konnte bei der FACS-Analyse im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Vermutlich wäre die Charakterisierung der Immunantwort im NALT bzw. im nasopharyngialen Gewebe vielversprechender. In Experimenten zur Besiedlung mit *Streptococcus pneumoniae* konnte jedoch bereits nach 3 Tagen sowohl in den zervikalen Lymphknoten als auch im NALT ein Anstieg an CD4⁺-T Zellen, CD8⁺ T-Zellen sowie der Gesamtzellzahl mittels FACS detektiert werden. Es zeigte sich, dass die Zellzahl im NALT 2-3 log-Stufen geringer war, aber die Unterschiede in der Zellzusammensetzung von NALT und zervikalen Lymphknoten vergleichbar

war. Diese wurden jedoch mit unbehandelten Kontrolltieren (Tag 0) verglichen, die somit weder der Anästhesie noch dem Stress der *intranasalen* Inokulation ausgesetzt waren. Statt die zytokinproduzierenden Zellen in den zervikalen Lymphknoten mittels FACS-Analyse zu betrachten, wurden diese homogenisiert und die Zytokinlevel mittels ELISA ermittelt. [265]. Auch die Expansion der Dendritischen Zellen im nasopharyngealen Gewebe sowie im NALT konnte gezeigt werden [266]. Derzeit liegen keine Ergebnisse zur detaillierten Analyse des NALT bei Besiedlung mit *S. aureus* vor.

Die meisten Fortschritte im Rahmen der Besiedlung mit *S. aureus* wurden mit Hilfe von *knock-out* Tieren gemacht, die es ermöglichen zu untersuchen, welche Auswirkungen das Fehlen bestimmter Zytokine oder ganzer Zellpopulationen auf die nasale Besiedlung hat [147,159,160,267,268]. So fand man z.B. mit Hilfe von IL-17A- und IL-17A/F-*knock-out*-Mäusen heraus, dass IL-17 eine wesentliche Rolle bei der Besiedlung mit *S. aureus* spielt [160]. Auch die Beteiligung von IL-22 konnte durch die Verwendung von *knock-out* Mäusen nachgewiesen werden [159]. Mit Hilfe von T-Zell-*knock-out*-Mäusen ließ sich auch die Beteiligung von T-Zellen bei der Dekolonisierung nachweisen [147]. Statt der Verwendung von *knock-out*-Mäusen könnte der Einfluss bzw. die Beteiligung eines bestimmten Zytokins auch mit Hilfe von neutralisierenden Antikörpern *in vivo* analysiert werden. Durch die Verwendung von *S. aureus knock-out*-Stämmen konnte zudem z.B. gezeigt werden, dass ClfB-defiziente Stämme Mäuse weniger effizient besiedeln und das für eine persistente Besiedlung SpA benötigt wird [128,156].

Für die Analyse der intrazellulären Zytokine wurde die Zellen 4 Stunden mit einem Stimulationscocktail unspezifisch stimuliert. Um den Anteil antigen-spezifischer Zellen zu erhöhen, könnten die Zellen zuvor auch spezifisch mit *S. aureus* restimuliert werden. Dies würde evtl. zu größeren Unterschieden im Vergleich zur Kontrollgruppe führen. Zudem können neben den Zellen auch die Überstände zur Analyse der Zytokin- und Chemokinkonzentrationen verwendet werden.

Des Weiteren wurde innerhalb dieser Arbeit die lokale Zytokin- und Chemokinproduktion in der Nase mit Hilfe eines CBA bestimmt. Jedoch konnten kaum Unterschiede zwischen den besiedelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert werden, da die Konzentrationen insgesamt sehr gering waren, z.T. unterhalb der Nachweisgrenze (siehe Anhang Abbildung 7.4 & Abbildung 7.5). Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen anderer Arbeitsgruppen zeigt sich, dass auch hier in den Nasenhomogenaten nur geringe Zytokin- und Chemokinkonzentrationen (maximal bis zu 150 pg/mL) ermittelt werden konnten, was eine generell geringe lokale Zytokin-/Chemokinproduktion nahelegt [147,159,267]. Jedoch wurden die Zytokinkonzentrationen nicht mit PBS-Kontrolltieren verglichen. Mulcahy *et al.* zeigten den Anstieg und Abfall verschiedener Zytokine und Chemokine über die Zeit und verglichen die Ergebnisse mit IL-22-ko-Mäusen [159]. Satorres *et al.* erreichten ebenfalls nur minimale IFN- γ Konzentrationen von lediglich

4 pg/mL. Auch hier ließen sich die Unterschiede nur im Vergleich zu ko-Mäusen nachweisen [267]. Archer *et al.* haben ihre Ergebnisse zwar mit denen von Kontrolltieren verglichen, jedoch waren diese unbehandelt, erhielten also weder eine Inhalationsnarkose noch PBS. Somit sind hier keine Rückschlüsse in Hinblick auf die Besiedlung mit *S. aureus* möglich [147]. Für zukünftige Versuche sollte deshalb die Kontrollgruppe anders gewählt werden. Zudem hat sich gezeigt, dass auf Grund der geringen Konzentrationen der Zytokine und Chemokine eine Betrachtung über die Zeit sinnvoller ist. Jedoch werden hierfür dann mehr Versuchstiere benötigt.

Auch wenn die Daten anderer Arbeitsgruppen ebenfalls zeigen, dass die Zytokin-/Chemokinkonzentrationen im Nasenhomogenat gering zu sein scheinen, so ist dennoch auch ein Fehler in der Bearbeitung der Nasen nicht auszuschließen. Da auch die bakterielle Last in den Nasen der Tiere nicht bestimmt werden konnte, ist anzunehmen, dass beim Homogenisieren der Nasen diese zu stark erhitzt wurden, wodurch ein Großteil der Bakterien abstarb. Bei der Wiederholung der Experimente zeigte sich, dass bei Verwendung eines schonenderen Homogenisierungsprogramms durchaus *S. aureus* in den Nasen der Tiere detektiert werden kann. Zytokine und Chemokine sind ebenfalls temperaturempfindlich [269,270]. Aus diesem Grunde sollten auch die Versuche zur Bestimmung der lokalen Zytokin-/Chemokinproduktion wiederholt werden, um auszuschließen das eine fehlerhafte Bearbeitung zu diesen Ergebnissen geführt hat.

Schließlich sollte noch geprüft werden, ob bereits nach 7 Tagen *S. aureus*-spezifische IgA-Antikörper im Stuhl besiedelter Mäuse detektierbar sind. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine *intranasale* Besiedlung mit *S. aureus* innerhalb von 7 Tagen noch keine sIgA-Antikörperantwort im Gastrointestinaltrakt induziert. Bei der nasalen Besiedlung mit *Streptococcus pneumoniae* konnte bereits nach 7 Tagen ein leichter, nicht signifikanter Anstieg des spezifischen IgA im Serum sowie in der nasalen Lavage nachgewiesen werden [266]. Im murinen *S. aureus*-Besiedlungsmodell konnte nach 8 Tagen ebenfalls einen Anstieg von spezifischem IgA nachgewiesen werden, jedoch im Nasenhomogenat [267]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur die Stuhlproben auf IgA getestet, da die Serumkonzentrationen von IgA meist sehr gering sind. Die Analyse der Nasenhomogenate könnte weitere Hinweise auf eine evtl. IgA-Antwort liefern.

Zusammenfassend lässt sagen, dass es im Rahmen dieser Arbeit gelungen ist Mäuse mit *S. aureus* zu besiedeln und somit das Besiedlungsmodell am Standort Greifswald zu etablieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass mausadaptierte *S. aureus*-Stämme zur Besiedlung von Mäusen besser geeignet sind als der humane Stamm Newman. Jedoch gelang es mit Hilfe der gewählten Read-outs nicht eine eindeutige Aussage zu den beteiligten Zellpopulationen zu treffen.

5.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der murine *S. aureus*-Stamm DIP isoliert und charakterisiert. Dieser Stamm erwies sich als hochvirulent im murinen Bakteriämie- sowie im Pneumoniemodell. Mit Hilfe von *S. aureus* DIP konnte die Standardinfektionsdosis von *S. aureus* Newman um 90 % reduziert werden. Die Reduktion der Infektionsdosis deutet darauf hin, dass dieses Isolat besser für murine Infektionsversuche geeignet zu sein scheint als das normalerweise verwendete Isolat *S. aureus* Newman und somit auch in weiteren murinen Infektionsmodellen verwendet werden könnte.

S. aureus DIP kodiert für das Leukozidin LukMF', ein bedeutender Virulenzfaktor bei boviner Mastitis. Die Verwendung von Mäusen im Mastitismodell ist wesentlich zeit- und kostengünstiger als die Nutzung großer Tiere. Aus diesem Grund könnte mit Hilfe des Stammes *S. aureus* DIP ein geeigneteres Mastitismodell etabliert werden. Es könnten LukMF' *knock-out*-Stämme generiert werden, welche die Charakterisierung des Virulenzfaktors LukMF' im Mastitismodell ermöglichen.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Verwendung mausadaptierter *S. aureus*-Stämme es ermöglicht, Mäuse bis zu 7 Tage mit *S. aureus* zu besiedeln ohne eine Reduktion der bakteriellen Last. Besonders der murine *S. aureus*-Stamm JSNZ scheint für eine permanente Besiedlung gut geeignet zu sein. Sun *et al.* zeigten, dass Mäuse bis zu 42 Tage mit *S. aureus* JSNZ besiedelt werden können [156]. Im Vergleich dazu zeigte sich JSNZ im murinen Pneumoniemodell nur mäßig virulent. Da Mäuse mit humanen *S. aureus*-Stämmen bisher meist nur transient besiedelt werden konnten, wurden Dekolonisierungsexperimente häufig in Baumwollratten durchgeführt [271]. Durch die Verwendung von mausadaptierten *S. aureus*-Stämmen ist es nun möglich die Tiere, ohne eine Reduktion der bakteriellen Last, länger zu besiedeln. Somit ist *S. aureus* JSNZ sehr gut zur Verwendung im murinen Besiedlungsmodell und zur Testung neuer Wirkstoffe zur Dekolonisierung geeignet.

Da Menschen bereits bei der Geburt mit *S. aureus* in Kontakt kommen und Antikörper gegen *S. aureus* ausbilden, wäre ein Modell, welches diese Situation imitiert, von Vorteil. Es konnte bereits gezeigt werden, dass natürlich besiedelte Mäuse *S. aureus* auf ihre Nachkommen übertragen [178]. Sollte es gelingen, dass experimentell besiedelte Elterntiere ebenfalls *S. aureus* auf ihre Nachkommen übertragen und sowohl die Elterntiere als auch die Nachkommen dauerhaft besiedelt werden können, können mit diesem Modell weitere Versuche durchgeführt werden. Dann kann untersucht werden, welchen Einfluss die neonatale Besiedlung bzw. der frühzeitige Kontakt mit *S. aureus* auf nachfolgende Erkrankungen, wie z.B. Pneumonien, Bakteriämien oder Abszesse hat. Als Vergleich sollten nicht besiedelte Tiere (PBS), die infiziert wurden, sowie besiedelte Tiere, die nicht infiziert wurden, verwendet werden.

Die Charakterisierung der T-Zell-Antwort stellt eine Möglichkeit zur Beurteilung der Immunantwort bei Infektionen mit *S. aureus* dar. Hierfür könnte erneut die FACS-Analyse der drainierenden Lymphknoten verwendet werden, da hier durch die Besiedlung und nachfolgende Infektion das Immunsystem stärker aktiviert werden sollte. Aber auch die Analyse des nasopharyngealen Gewebes oder lediglich des NALT könnte neue Erkenntnisse liefern. Zudem könnten, je nach Infektionsmodell, die beteiligten Organe ebenfalls untersucht werden. So bietet es sich an im Pneumoniemodell die Lungen sowie die mediastinalen Lymphknoten zu betrachten und im Bakteriämiemodell die Nieren. Diese könnten für durchflusszytometrische Analysen, aber auch für histologische Färbungen verwendet werden. Auch die *in vitro* Restimulation der Zellen oder der FluoroSpot könnten bedeutende Hinweise auf den Einfluss der neonatalen Besiedlung auf eine nachfolgende Infektion liefern. Die Analyse der Antikörperantwort im Serum könnte ebenfalls Unterschiede in der adaptiven Immunantwort aufzeigen.

Kapitel 6 Zusammenfassung

Neue Antibiotika und Präventionsmaßnahmen gegen *S. aureus* sind aufgrund der starken Ausbreitung multiresistenter *S. aureus*-Stämme dringend erforderlich. Zur Entwicklung von Therapie- und Präventionsmaßnahmen werden geeignete Infektionsmodellen benötigt, die die klinische Situation möglichst exakt widerspiegeln. Da die Spezies *S. aureus* stark wirtsspezifisch ist, könnten wirtsadaptierte *S. aureus*-Stämme hierbei äußerst hilfreich sein. In der Infektionsforschung werden vor allem Mausmodelle verwendet. Da bisher jedoch angenommen wurde, dass Mäuse keine natürlichen Wirte von *S. aureus* sind, sind *S. aureus*-Forscher davon ausgegangen, dass Mäuse kein geeignetes Modell darstellen. Das wurde durch unsere und andere Arbeitsgruppen allerdings in den letzten Jahren widerlegt. Wir konnten zeigen, dass Labor- und Wildmäuse mit *S. aureus* besiedelt sind.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob murine Infektionsmodelle durch die Verwendung von mausadaptierten *S. aureus*-Stämmen optimiert werden können. Aus über 250 *S. aureus*-Stämmen, die aus Labor und Wildmäusen isoliert wurden, wurden vier mausadaptierte *S. aureus*-Isolate ausgewählt und mit dem humanen *S. aureus*-Isolat Newman in einem Pneumonie- und Bakteriämiemodell verglichen. Diese Stämme wiesen einen repräsentativen *spa*-Typ sowie typischen Phagemuster und Virulenzgene auf. Zudem waren sie in der Lage, murines Plasma zu koagulieren und in murinem Vollblut zu replizieren.

Es zeigte sich, dass das murine Isolat *S. aureus* DIP sowohl im Pneumonie- als auch im Bakteriämiemodell deutlich virulenter war als das humane Isolat Newman und die anderen getesteten mausadaptierten Stämme. Nach kürzester Zeit starben alle Tiere, die mit *S. aureus* DIP infiziert wurden. Wurde die Infektionsdosis im Vergleich zu Newman um 90 % reduziert, waren die bakterielle Last, der Belastungsscore, sowie die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen nach Infektion mit *S. aureus* DIP bzw. *S. aureus* Newman vergleichbar. Im Besiedlungsmodell konnte gezeigt werden, dass die mausadaptierten Stämme *S. aureus* JSNZ sowie *S. aureus* DIP in der Lage sind, Mäuse über einen Zeitraum von 7 Tagen stabil zu besiedeln. Mäuse, die mit *S. aureus* Newman besiedelt waren, konnten den Stamm innerhalb dieses Zeitraums eliminieren. Die Genomsequenzierung der *in vivo* verwendeten *S. aureus* Stämme zeigte, dass lediglich *S. aureus* DIP für das Leukozidin LukMF' kodiert. Das lässt vermuten, dass die Präsenz des Virulenzfaktors für die gesteigerte Virulenz von *S. aureus* DIP verantwortlich sein könnte.

Des Weiteren sollten in dieser Arbeit ein Besiedlungsmodell mit murinen *S. aureus*-Isolaten etabliert und die beteiligten Immunzellen quantifiziert werden. Es zeigte sich, dass Mäuse mit murinen *S. aureus*-Isolaten bis zu 7 Tage besiedelt werden können wohingegen *S. aureus* Newman

zu diesem Zeitpunkt nur noch in 20 % der Tiere nachweisbar war. Zudem konnte bei der *intranasalen* Besiedlung mit einer hohen Dosis *S. aureus* DIP [1×10^8 CFU] gezeigt werden, dass sowohl Th17-Zellen als auch $\gamma\delta$ -T-Zellen nach 7 Tagen IL-17A, IL-17F und IL-22 produzieren. Jedoch konnte die Zytokinproduktion nur in Tieren nachgewiesen werden, die einen hohen Belastungsscore aufwiesen. Da nach 24 Stunden bei Tieren mit hohem Belastungsscore auch Bakterien in der Lunge detektiert wurde, ist anzunehmen, dass *S. aureus* diese Tiere nicht nur besiedelt, sondern bei ihnen auch eine Atemwegsinfektion verursacht hatte. Durch den geringen prozentualen Anteil an ILCs in den zervikalen Lymphknoten war es nicht möglich Rückschlüsse auf deren Zytokinproduktion zu ziehen. Somit gelang es zwar ein murines *S. aureus*-Besiedlungsmodell zu etablieren, jedoch kann keine Aussage zu den beteiligten Zellen des Immunsystems getroffen werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Labormäuse mit mausadaptierten *S. aureus*-Stämmen länger besiedelt werden können als mit dem humanen Referenzstamm Newman. Zudem konnte mit Hilfe des mausadaptierten Stammes *S. aureus* DIP die Infektionsdosis im Pneumonie- und Bakteriämiemodell erheblich reduziert werden. Somit gelang es Mausmodelle durch die Verwendung von mausadaptierten *S. aureus*-Stämmen zu optimieren, auch wenn das nicht auf alle getesteten Isolate zutrifft. Durch die Anpassung an den murinen Wirt stellen mausadaptierte *S. aureus*-Stämme wie DIP und JSNZ ein physiologischeres Modell der Pathogen-Wirts-Interaktion dar. Die Verwendung eines solchen Stammes ermöglicht es ein besseres Verständnis für Infektionsprozesse und die Pathogen-Wirt-Interaktionen zu erlangen und dadurch eventuell neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

Es ist zu berücksichtigen, dass auch die Verwendung mausadaptierter *S. aureus*-Stämme in murinen Besiedlungs- und Infektionsmodellen lediglich ein Modell darstellt, welches Vor- und Nachteile hat. Daher ist es essenziell, dass Wissenschaftler die Grenzen jedes Modellsystems kennen und das richtige Infektionsmodell (oder eine Kombination davon) auswählen, um ihre Forschungsfragen zu beantworten.

Kapitel 7 Anhang

A. Zusätzlich gemessene Zytokine/Chemokine (Pneumonie)

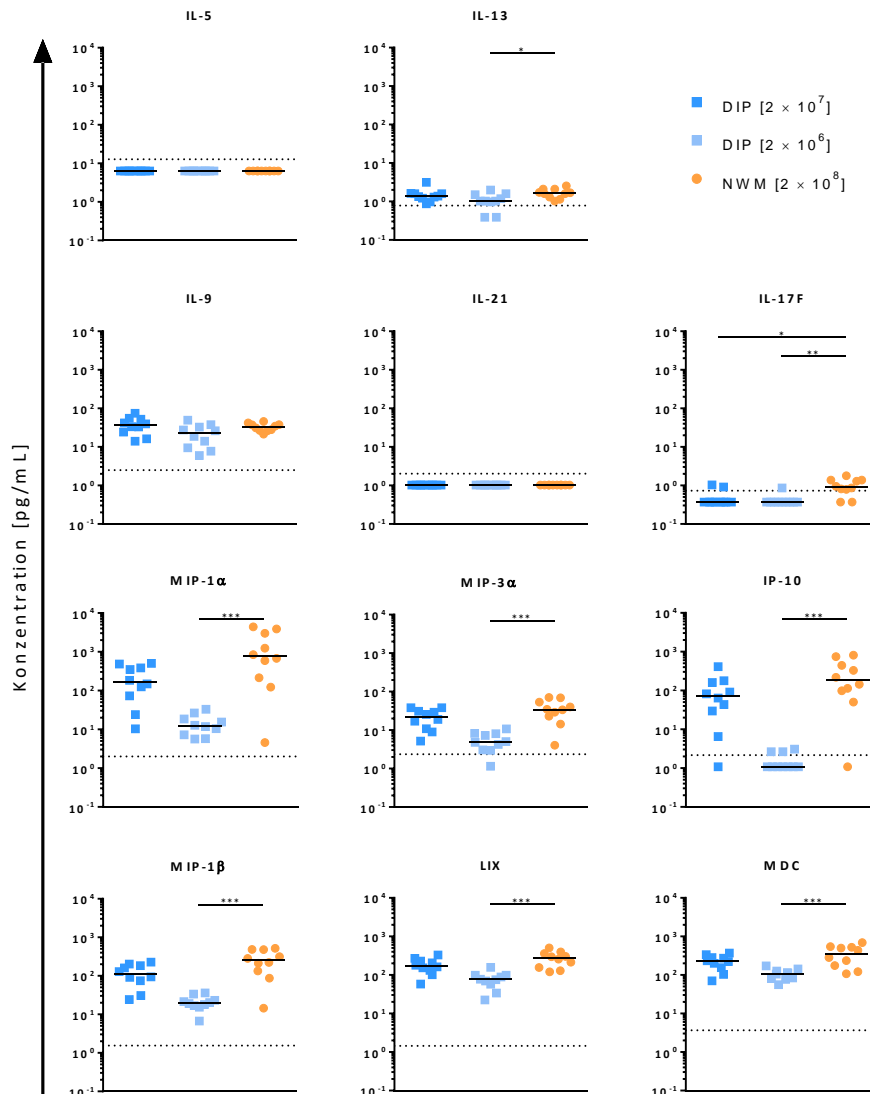


Abbildung 7.1: Vergleich der Zytokin- und Chemokinkonzentrationen im Lungenhomogenat von Mäusen nach Infektion mit *S. aureus* DIP in unterschiedlichen Infektionsdosen bzw. dem humanen Isolat Newman im Pneumoniemodell.

Weibliche BALB/c Mäuse ($n=10$) wurden *intranasal* mit $30 \mu\text{L}$ *S. aureus* DIP (2×10^7 CFU, 2×10^6 CFU) bzw. Newman (1×10^8 CFU) infiziert. Nach 47 Stunden wurden die Tiere mit einer Überdosis CO_2 getötet. Es wurden die Überstände der homogenisierten Lungen verwendet. Die Zytokinkonzentrationen wurde mit dem LEGENDplex™ Mouse Th Cytokine Panel (BioLegend), die Chemokinkonzentrationen mit dem Proinflammatory Chemokine Panel (BioLegend) ermittelt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Experiment. Jeder Punkt stellt eine Maus dar. Die durchgezogene Linie zeigt den Median, die gestrichelte Linie die Detekionsgrenze. Für die statistische Auswertung wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Post Hoc Test verwendet. Die unterschiedlichen Infektionsdosen von *S. aureus* DIP wurden mit *S. aureus* NWM verglichen. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$

B. Zusätzlich gemessene Zytokine/Chemokine (Bakteriämie)

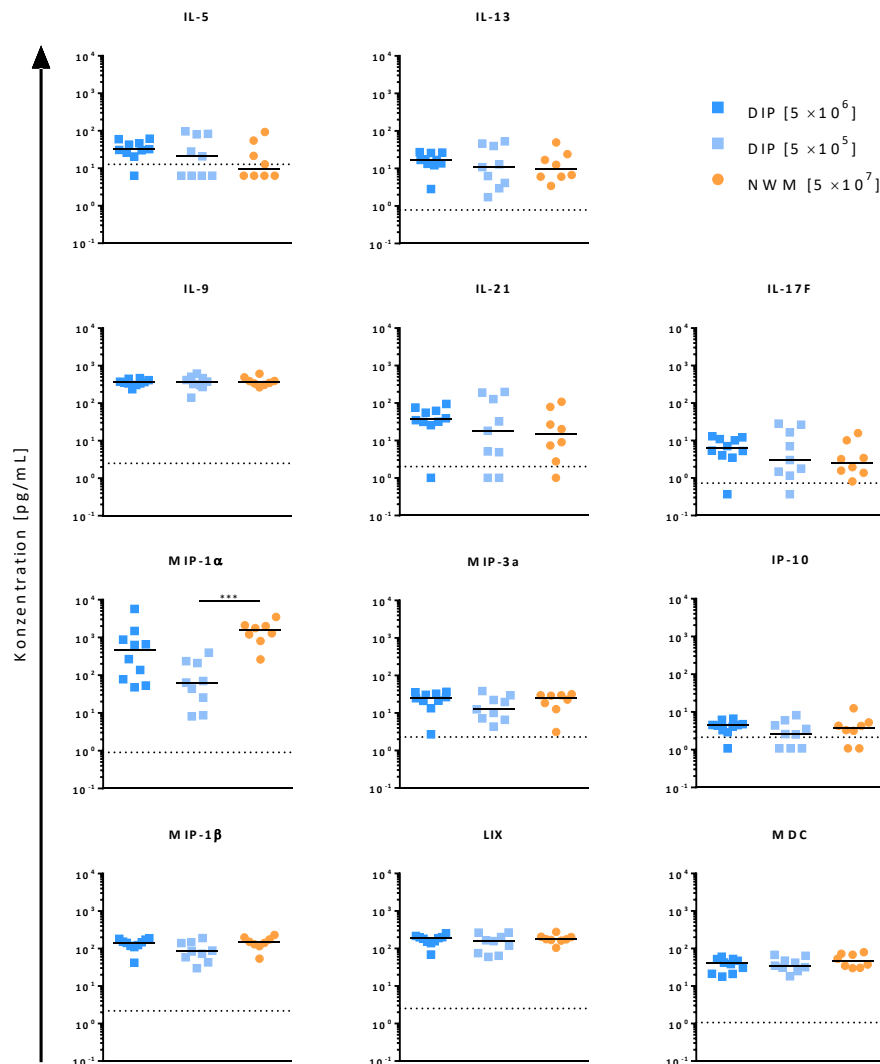


Abbildung 7.2: Vergleich der Zytokin- und Chemokinkonzentrationen im Nierenhomogenat von Mäusen mit unterschiedlicher Infektionsdosen von *S. aureus* DIP mit dem humanen Isolat Newman im Bakteriämiemodell.

Weibliche BALB/c Mäuse (n=10) wurden intravenös in die Schwanzvene mit 100 μ L *S. aureus* DIP (5×10^6 CFU, 5×10^5 CFU) bzw. Newman (5×10^7 CFU) infiziert. Nach 72 Stunden wurden die Tiere mit einer Überdosis CO₂ getötet. Es wurden die Überstände der homogenisierten Nieren verwendet. Die Zytokinkonzentrationen wurde mit dem LEGENDplex™ Mouse Th Cytokine Panel (BioLegend), die Chemokinkonzentrationen mit dem Proinflammatory Chemokine Panel (BioLegend) ermittelt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Experiment. Jeder Punkt stellt eine Maus dar. Die durchgezogene Linie zeigt den Median, die gestrichelte Linie die Detektionsgrenze. Für die statistische Auswertung wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Post Hoc Test verwendet. Die unterschiedlichen Infektionsdosen von *S. aureus* DIP wurden mit *S. aureus* NWM verglichen. ***, $p \leq 0,001$

C. Gatingstrategie für die Analyse der zervikalen Lymphknoten nach *S. aureus*-Besiedlung

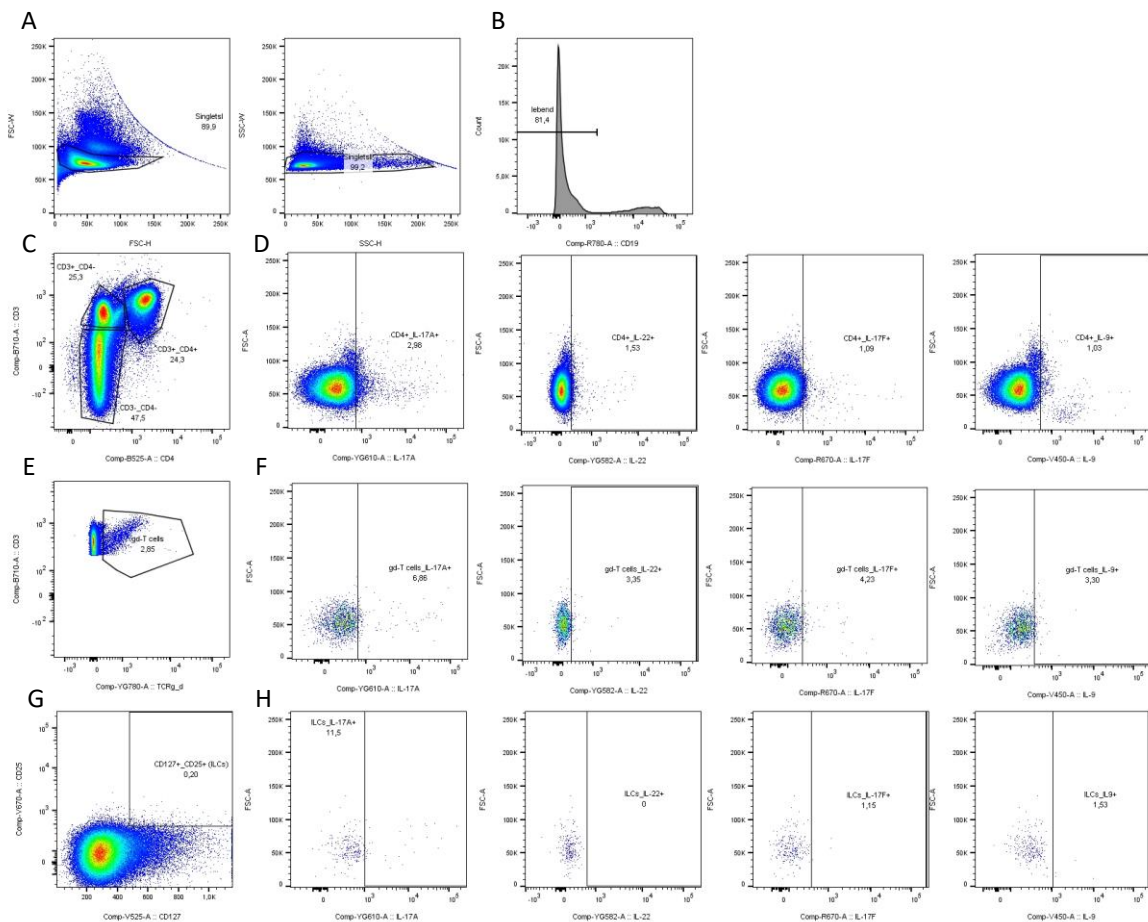


Abbildung 7.3 Gatingstrategie für die Analyse der Immunzellpopulationen in den zervikalen Lymphknoten nach *S. aureus*-Besiedlung

Für die Analyse des Zytokinprofils von CD4⁺-T-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen und ILCs in den zervikalen Lymphknoten *S. aureus*-besiedelter Albino-C57BL/6-Mäuse (n=10) wurden zunächst die Dubletten ausgeschlossen (A) und anschließend die lebenden, CD19⁻ Zellen definiert. Diese wurden nun anhand von anti-CD3- und anti-CD4-Antikörpern in in drei Gruppen unterteilt (C): CD3⁺/CD4⁺ (CD4⁺-T-Zellen); CD3⁺/CD4⁻ Zellen und CD3⁻/CD4⁻ Zellen. Mit Hilfe des anti- $\gamma\delta$ -TCR Antikörpers konnten unter den CD3⁺/CD4⁻ Zellen die $\gamma\delta$ -T-Zellen identifiziert werden (E). Die CD3⁻/CD4⁻ Zellen, die CD127⁺ und CD25⁺ waren, wurde als ILCs charakterisiert (G). Die drei Zellpopulationen wurden schließlich hinsichtlich ihrer Expression von intrazellulärem IL-17A, IL-17F, IL-22 sowie IL-9 untersucht (D, F, H).

D. Zytokine im Nasenhomogenat

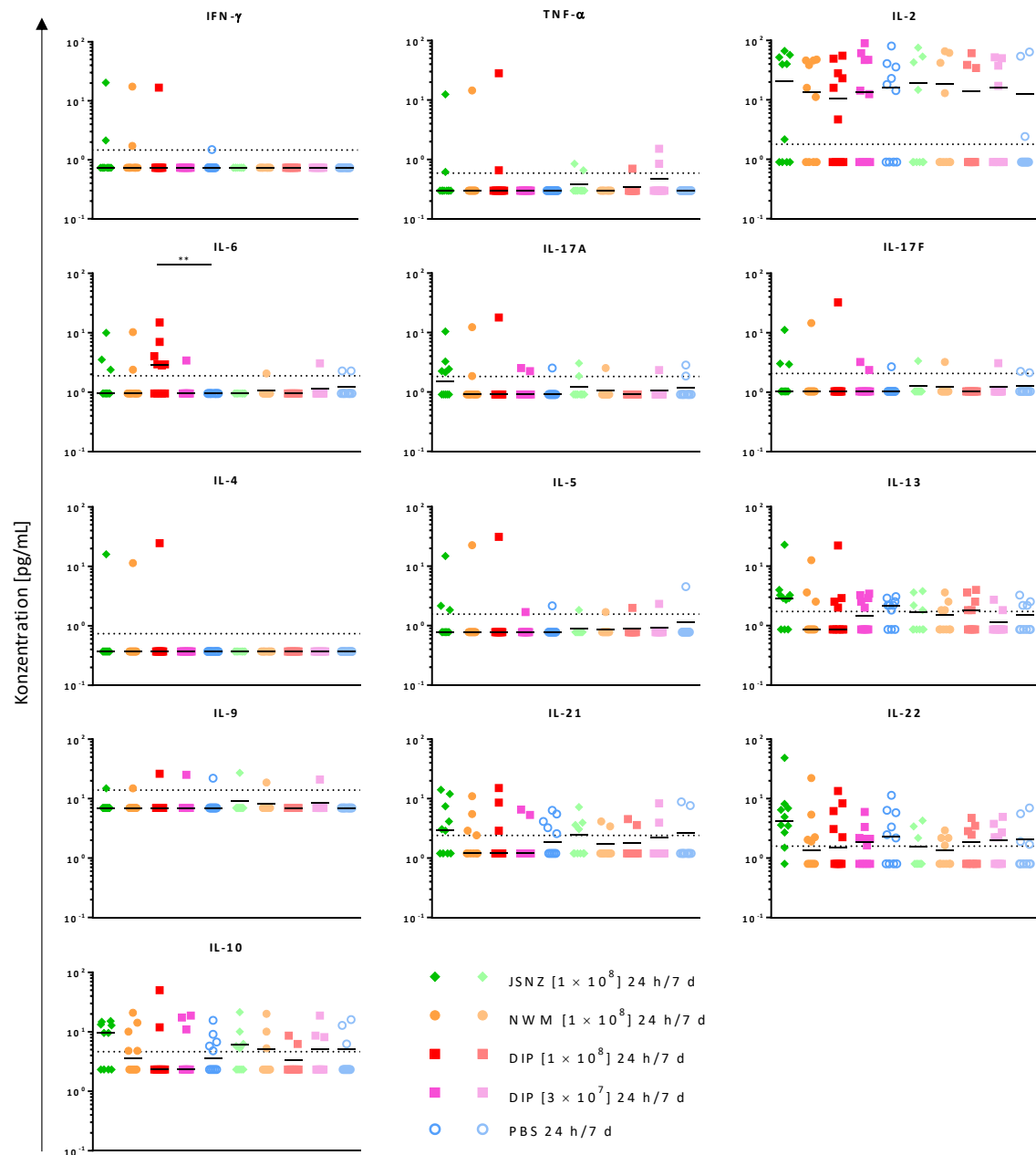


Abbildung 7.4: Vergleich der Zytokinkonzentrationen im Nasenhomogenat von *S. aureus*-besiedelten Mäusen.

Weibliche Albino-C57BL/6-Mäuse ($n=10$) wurden *intranasal* mit $10 \mu\text{L}$ *S. aureus* (1×10^8 CFU bzw. 3×10^7 CFU) besiedelt. Kontrolltieren wurden $10 \mu\text{L}$ PBS *intranasal* appliziert. Nach 24 Stunden bzw. 7 Tagen wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Es wurden die Überstände der homogenisierten Nasen verwendet. Die Chemokinkonzentrationen wurden mit dem Proinflammatory Chemokine Panel (BioLegend) ermittelt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Experiment. Jeder Punkt stellt eine Maus dar. Die durchgezogene Linie zeigt den Median, die gestrichelte Linie die Detektionsgrenze. Für die statistische Auswertung wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Post Hoc Test verwendet. Die *S. aureus*-besiedelten Tiere wurden mit PBS-applizierten Tieren des gleichen Tages verglichen. **, $p \leq 0,01$

E. Chemokine im Nasenhomogenat

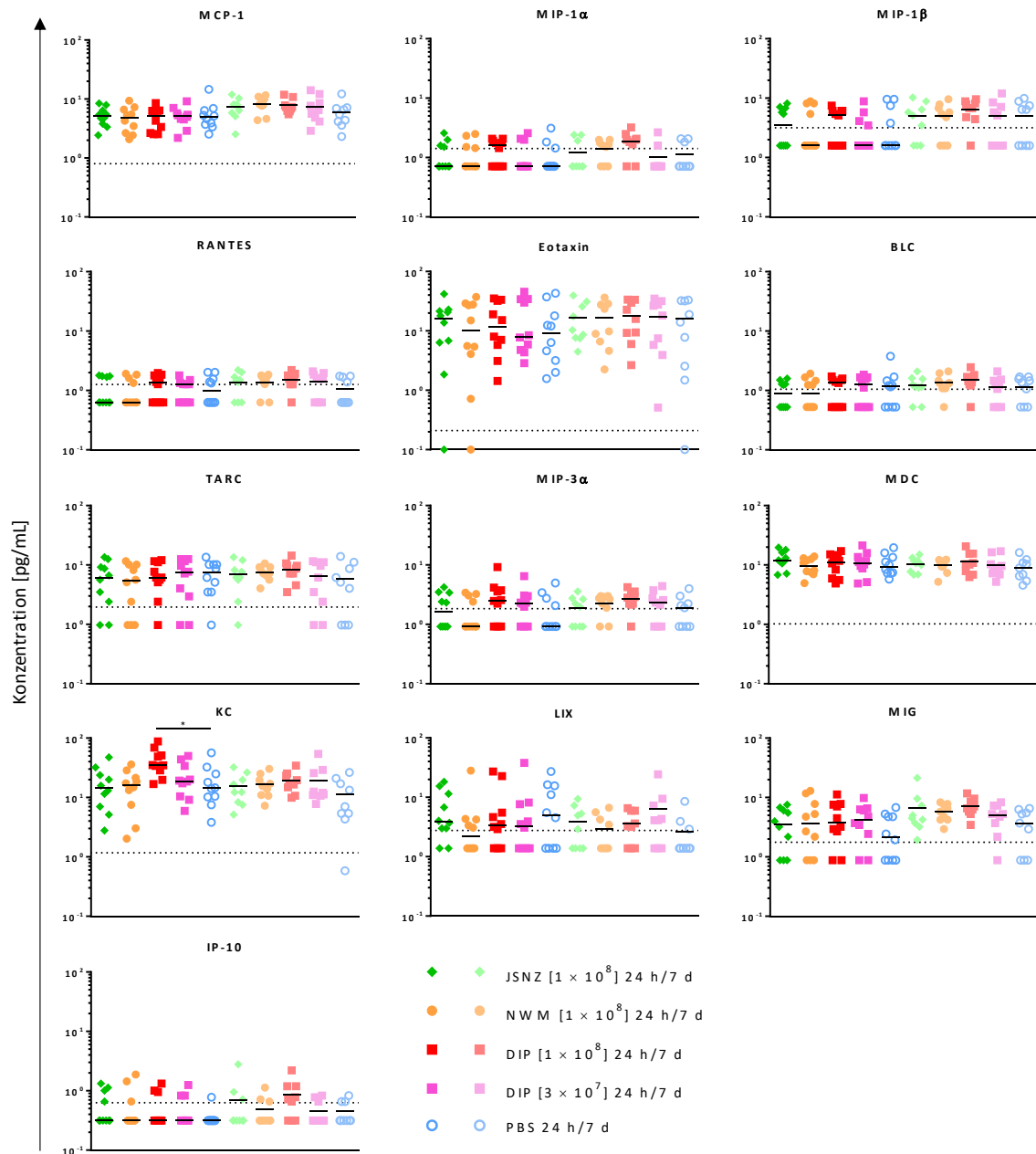


Abbildung 7.5: Vergleich der Chemokinkonzentrationen im Nasenhomogenat von *S. aureus*-besiedelten Mäusen.

Weibliche Albino-C57BL/6-Mäuse (n=10) wurden *intranasal* mit 10 μ L *S. aureus* (1×10^8 CFU bzw. 3×10^7 CFU) besiedelt. Kontrolltieren wurden 10 μ L PBS *intranasal* appliziert. Nach 24 Stunden bzw. 7 Tagen wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Es wurden die Überstände der homogenisierten Nasen verwendet. Die Chemokinkonzentrationen wurden mit dem Proinflammatory Chemokine Panel (BioLegend) ermittelt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Experiment. Jeder Punkt stellt eine Maus dar. Die durchgezogene Linie zeigt den Median, die gestrichelte Linie die Detektionsgrenze. Für die statistische Auswertung wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Post Hoc Test verwendet. Die *S. aureus*-besiedelten Tiere wurden mit PBS-applizierten Tieren des gleichen Tages verglichen. *, $p \leq 0,05$

F. Vergleich der *in vitro*-Ergebnisse der *in vivo* verwendeten *S. aureus*-Isolate

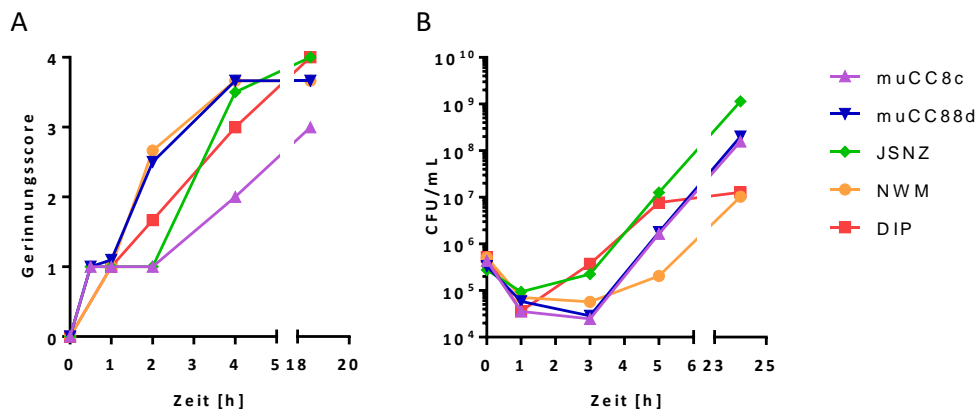


Abbildung 7.6: Vergleich der *in vivo* verwendeten *S. aureus*-Isolate hinsichtlich ihres Koagulations- und Replikationsverhaltens

A) Koagulationsassay zur Analyse der Wirtsanpassung: Die murinen *S. aureus*-Stämme mucc8c, muCC88d, JSNZ und DIP sowie das humane Isolat Newman wurden in 500 µL murinem Plasma inkubiert und bezüglich ihre Koagulationsfähigkeit verglichen. Die Koagulation wurde nach 1 h, 2 h, 4 h und 18,5 h visuell durch einen verblindeten Experimentator bewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier technischer Replikate.

B) Replikationsfähigkeit in murinem Vollblut: 1 × 10⁶ CFU/mL einer Bakterienkultur wurden mit frischem murinem Vollblut im Verhältnis 1:4 gemischt. Für die Bestimmung der CFU/mL wurde nach 0 h, 1 h, 3 h, 5 h und 24 h eine dekadische Verdünnungsreihe hergestellt, drei technische Replikate auf LB-Agar-Platten ausplattiert und für ca. 16 h bei 37 °C inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der ermittelten CFU von drei technischen Replikaten. Abkürzungen: NWM, Newman.

G. Chemokine

Tabelle 7.1 Übersicht Chemokine

Nomenklatur	Name	Rezeptor	Zielzelle
CCL2	MCP-1	CCR2	Mo, iDC, T (Th ₂ >Th ₁), Bs
CCL3	MIP-1α	CCR1, 5	Mo/Mφ, iDC, Eo, Bs, T (Th ₁ >Th ₂), N, NK
CCL4	MIP-1β	CCR5	Mo/Mφ, DC, T (Th ₁ >Th ₂), NK
CCL5	RANTES	CCR1, 3, 5	Mo/Mφ, iDC, Eo, Bs, T (T _{mem} >T; Th ₁ >Th ₂), NK
CCL11	Eotaxin	CCR3	Eo, Bs, Th ₂
CCL17	TARC	CCR4	iDC, T (Th ₂ >Th ₁), T _{reg}
CCL20	MIP-3α	CCR6	iDC, T (T _{mem} , Th17), B
CCL22	MDC	CCR4	iDC, T (Th ₂ >Th ₁), T _{reg} , Bs, NK, Mo
CXCL1	KC/GRO-α	CXCR2	N
CXCL5	LIX/ENA-78	CXCR2	N
CXCL9	MIG	CXCR3	T (Th ₁ >Th ₂), NK, B, pDC
CXCL10	IP-10	CXCR3	T (Th ₁ >Th ₂), NK, B
CXCL13	BLC/BCA-1	CXCR5	B, Tfh

Abkürzungen: B: B-Zellen; Bs: basophile Granulozyten; iDC: unreife (*immature*) dendritische Zellen; pDC: plasmacytoide dendritische Zelle; Eo: eosinophile Granulozyten; Mφ: Makrophagen; Mo: Monozyten; NK: natürliche Killerzellen; N: neutrophile Granulozyten; T: T-Zelle, T_{fh}: folliculäre T-Helferzellen; T_{mem}: Memory T-Zellen; T_{reg}: regulatorische T-Zellen

H. Phagentransduktion zur Generierung von *S. aureus* DIP Δ *spa*

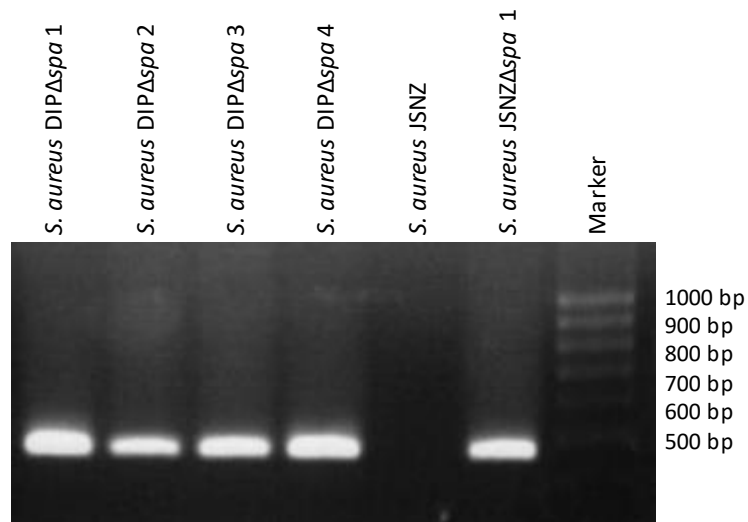


Abbildung 7.7 Bestätigung der erfolgreichen Phagentransduktion zur Herstellung einer Protein A-Mutante von *S. aureus* DIP.

Mittels Phagentransduktion wurde die Δ *spa*::*eryR*-Deletion vom Donorstamm *S. aureus* 113 Δ *spa*::*eryR* auf *S. aureus* DIP übertragen. Zur Überprüfung der mittels Kolonie-PCR wurde überprüft, ob die Transduktion erfolgreich war. Der verwendete 5'-Primer bindet innerhalb des *eryR*-Gens, der 3'-Primer *downstream* des *spa*-Gens. Die Insertion des *eryR*-Gens und die damit verbundene Deletion des *spa*-Gens führt zu einer Bande bei ca. 450 bp. Als Kontrollen wurden *S. aureus* JSNZ und *S. aureus* JSNZ Δ *spa* mitgeführt.

Kapitel 8 Literaturverzeichnis

- [1] F. van Wijk and H. Cheroutre, *Intestinal T Cells: Facing the Mucosal Immune Dilemma with Synergy and Diversity*, *Seminars in immunology* 21 (2009), pp. 130–138.
- [2] Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S., *Cellular and Molecular Immunology*, 8th edn. Elsevier Saunders, 2015.
- [3] T. Ganz, *Defensins: Antimicrobial Peptides of Innate Immunity*, *Nat Rev Immunol* 3 (2003), pp. 710–720.
- [4] B. Agerberth and G.H. Gudmundsson, *Host Antimicrobial Defence Peptides in Human Disease*, *Current topics in microbiology and immunology* 306 (2006), pp. 67–90.
- [5] Murphy, K.M., Travers, P. & Walport, M., *Janeway Immunology*, 8th edn.
- [6] T. Tschernig and R. Pabst, *Bronchus-Associated Lymphoid Tissue (BALT) Is Not Present in the Normal Adult Lung but in Different Diseases*, *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 68 (2000), pp. 1–8.
- [7] Christine Schütt and Barbara Bröker, *Grundwissen Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009.
- [8] S.C. Corr, C.C.G.M. Gahan, and C. Hill, *M-Cells: Origin, Morphology and Role in Mucosal Immunity and Microbial Pathogenesis*, *FEMS immunology and medical microbiology* 52 (2008), pp. 2–12.
- [9] M.E. Kotas and R.M. Locksley, *Why Innate Lymphoid Cells?*, *Immunity* 48 (2018), pp. 1081–1090.
- [10] E. Vivier, D. Artis, M. Colonna, A. Diefenbach, J.P. Di Santo, G. Eberl, S. Koyasu, R.M. Locksley, A.N.J. McKenzie, R.E. Mebius, F. Powrie, and H. Spits, *Innate Lymphoid Cells: 10 Years on*, *Cell* 174 (2018), pp. 1054–1066.
- [11] G.F. Sonnenberg and D. Artis, *Innate Lymphoid Cell Interactions with Microbiota: Implications for Intestinal Health and Disease*, *Immunity* 37 (2012), pp. 601–610.
- [12] H. Spits, D. Artis, M. Colonna, A. Diefenbach, J.P. Di Santo, G. Eberl, S. Koyasu, R.M. Locksley, A.N.J. McKenzie, R.E. Mebius, F. Powrie, and E. Vivier, *Innate Lymphoid Cells--a Proposal for Uniform Nomenclature*, *Nature reviews. Immunology* 13 (2013), pp. 145–149.
- [13] J.A. Walker, J.L. Barlow, and A.N.J. McKenzie, *Innate Lymphoid Cells--How Did We Miss Them?*, *Nature reviews. Immunology* 13 (2013), pp. 75–87.
- [14] J.G. Borger, M. Lau, and M.L. Hibbs, *The Influence of Innate Lymphoid Cells and Unconventional T Cells in Chronic Inflammatory Lung Disease*, *Frontiers in immunology* 10 (2019), p. 1597.

- [15] L.A. Monticelli, L.C. Osborne, M. Noti, S.V. Tran, D.M.W. Zaiss, and D. Artis, *IL-33 Promotes an Innate Immune Pathway of Intestinal Tissue Protection Dependent on Amphiregulin-EGFR Interactions*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (2015), pp. 10762–10767.
- [16] G.F. Sonnenberg, L.A. Fouser, and D. Artis, *Border Patrol: Regulation of Immunity, Inflammation and Tissue Homeostasis at Barrier Surfaces by IL-22*, *Nature immunology* 12 (2011), pp. 383–390.
- [17] G.F. Sonnenberg, *Regulation of Intestinal Health and Disease by Innate Lymphoid Cells*, *International immunology* 26 (2014), pp. 501–507.
- [18] P. Cheng, T. Liu, W.-Y. Zhou, Y. Zhuang, L.-s. Peng, J.-Y. Zhang, Z.-N. Yin, X.-h. Mao, G. Guo, Y. Shi, and Q.-m. Zou, *Role of Gamma-Delta T Cells in Host Response Against Staphylococcus aureus-Induced Pneumonia*, *BMC immunology* 13 (2012), pp. 28–38.
- [19] A.C. Kirby, D.J. Newton, S.R. Carding, and P.M. Kaye, *Pulmonary Dendritic Cells and Alveolar Macrophages Are Regulated by Gammadelta T Cells During the Resolution of S. pneumoniae-Induced Inflammation*, *The Journal of pathology* 212 (2007), pp. 29–37.
- [20] H. Yang, P.A. Antony, B.E. Wildhaber, and D.H. Teitelbaum, *Intestinal Intraepithelial Lymphocyte Gamma Delta-T Cell-Derived Keratinocyte Growth Factor Modulates Epithelial Growth in the Mouse*, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172 (2004), pp. 4151–4158.
- [21] C. Dong and R.A. Flavell, *Control of T Helper Cell Differentiation--in Search of Master Genes*, *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2000 (2000), pe1.
- [22] J.J. O'Shea and W.E. Paul, *Mechanisms Underlying Lineage Commitment and Plasticity of Helper CD4⁺ T Cells*, *Science (New York, N.Y.)* 327 (2010), pp. 1098–1102.
- [23] P. Brandtzaeg and R. Pabst, *Let's Go Mucosal: Communication on Slippery Ground*, *Trends in immunology* 25 (2004), pp. 570–577.
- [24] M.K. Anderson, *Changing Course by Lymphocyte Lineage Redirection*, *Nature immunology* 14 (2013), pp. 199–201.
- [25] C.M. Lloyd and E.M. Hessel, *Functions of T Cells in Asthma: More Than Just T(H)2 Cells*, *Nature reviews. Immunology* 10 (2010), pp. 838–848.
- [26] L. Guglani and S.A. Khader, *Th17 Cytokines in Mucosal Immunity and Inflammation*, *Current opinion in HIV and AIDS* 5 (2010), pp. 120–127.
- [27] W. Chen, *Tregs in Immunotherapy: Opportunities and Challenges*, *Immunotherapy* 3 (2011), pp. 911–914.
- [28] S. Sakaguchi, *Regulatory T Cells: Key Controllers of Immunologic Self-Tolerance*, *Cell* 101 (2000), pp. 455–458.

- [29] A.J. Macpherson, K.D. McCoy, F.-E. Johansen, and P. Brandtzaeg, *The Immune Geography of IgA Induction and Function*, *Mucosal immunology* 1 (2008), pp. 11–22.
- [30] P. Brandtzaeg, *Mucosal Immunity: Induction, Dissemination, and Effector Functions*, *Scandinavian journal of immunology* 70 (2009), pp. 505–515.
- [31] R.A. Strugnell and O.L.C. Wijburg, *The Role of Secretory Antibodies in Infection Immunity*, *Nature reviews. Microbiology* 8 (2010), pp. 656–667.
- [32] C. Perrier, N. Sprenger, and B. Corthésy, *Glycans on Secretory Component Participate in Innate Protection Against Mucosal Pathogens*, *J. Biol. Chem.* 281 (2006), pp. 14280–14287.
- [33] R.H. Deurenberg and E.E. Stobberingh, *The Evolution of Staphylococcus aureus*, *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 8 (2008), pp. 747–763.
- [34] F.D. Lowy, *Staphylococcus aureus Infections*, *The New England journal of medicine* 339 (1998), pp. 520–532.
- [35] D. Grumann, U. Nübel, and B.M. Bröker, *Staphylococcus aureus Toxins--Their Functions and Genetics*, *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 21 (2014), pp. 583–592.
- [36] H.F.L. Wertheim, D.C. Melles, M.C. Vos, W. van Leeuwen, A. van Belkum, H.A. Verbrugh, and J.L. Nouwen, *The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections*, *The Lancet Infectious Diseases* 5 (2005), pp. 751–762.
- [37] K.Y.L. Chua, B.P. Howden, J.-H. Jiang, T. Stinear, and A.Y. Peleg, *Population Genetics and the Evolution of Virulence in Staphylococcus aureus*, *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 21 (2014), pp. 554–562.
- [38] A. Sakr, F. Brégeon, J.-L. Mège, J.-M. Rolain, and O. Blin, *Staphylococcus aureus Nasal Colonization: an Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections*, *Frontiers in microbiology* 9 (2018), p. 2419.
- [39] S.Y.C. Tong, J.S. Davis, E. Eichenberger, T.L. Holland, and V.G. Fowler, *Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management*, *Clinical microbiology reviews* 28 (2015), pp. 603–661.
- [40] World Health Organization, *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report: Early Implementation 2016-17* Vol. 2018.
- [41] K.A. Davis, J.J. Stewart, H.K. Crouch, C.E. Florez, and D.R. Hospenthal, *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Nares Colonization at Hospital Admission and Its Effect on Subsequent MRSA Infection*, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 39 (2004), pp. 776–782.

- [42] C. von Eiff, K. Becker, K. Machka, H. Stammer, and G. Peters, *Nasal Carriage as a Source of Staphylococcus aureus Bacteremia. Study Group*, *The New England journal of medicine* 344 (2001), pp. 11–16.
- [43] H.F.L. Wertheim, M.C. Vos, A. Ott, A. van Belkum, A. Voss, J.A. Kluytmans, P.H.J. van Keulen, C.M. Vandenbroucke-Grauls, M.H.M. Meester, and H.A. Verbrugh, *Risk and outcome of nosocomial Staphylococcus aureus bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers*, *The Lancet* 364 (2004), pp. 703–705.
- [44] A.F. Brown, J.M. Leech, T.R. Rogers, and R.M. McLoughlin, *Staphylococcus Aureus Colonization: Modulation of Host Immune Response and Impact on Human Vaccine Design*, *Frontiers in immunology* 4 (2014), p. 507.
- [45] G. Ippolito, S. Leone, F.N. Lauria, E. Nicastrì, and R.P. Wenzel, *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: the Superbug*, *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 14 Suppl 4 (2010), S7-11.
- [46] Aghdassi S., Behnke M., Gastmeier P., Gropmann A., Hansen S., Diaz L. A., Piening B., Rosenbusch M., Schröder C., Schwab F., *Deutsche nationale Punkt-Prävalenzerhebung zu nosokomialen Infektionen und Antibiotika-Anwendung 2016: Abschlussbericht 2016*.
- [47] S. Holtfreter, D. Grumann, V. Balau, A. Barwich, J. Kolata, A. Goehler, S. Weiss, B. Holtfreter, S.S. Bauerfeind, P. Döring, E. Friebe, N. Haasler, K. Henselin, K. Kühn, S. Nowotny, D. Radke, K. Schulz, S.R. Schulz, P. Trübe, C.H. Vu, B. Walther, S. Westphal, C. Cuny, W. Witte, H. Völzke, H.J. Grabe, T. Kocher, I. Steinmetz, and B.M. Bröker, *Molecular Epidemiology of Staphylococcus aureus in the General Population in Northeast Germany: Results of the Study of Health in Pomerania (SHIP-TREND-0)*, *Journal of clinical microbiology* 54 (2016), pp. 2774–2785.
- [48] D. Bhowmik, S. Chetri, D. Paul, D.D. Chanda, and A. Bhattacharjee, *Detection and Molecular Typing of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus from Northeastern Part of India*, *Medical journal, Armed Forces India* 75 (2019), pp. 86–89.
- [49] K. Hiramatsu, *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus: a new model of antibiotic resistance*, *The Lancet Infectious Diseases* 1 (2001), pp. 147–155.
- [50] L.M. Weigel, D.B. Clewell, S.R. Gill, N.C. Clark, L.K. McDougal, S.E. Flannagan, J.F. Kolonay, J. Shetty, G.E. Killgore, and F.C. Tenover, *Genetic Analysis of a High-Level Vancomycin-Resistant Isolate of Staphylococcus aureus*, *Science (New York, N.Y.)* 302 (2003), pp. 1569–1571.
- [51] S.M. Mandal, A.K. Ghosh, and B.R. Pati, *Dissemination of Antibiotic Resistance in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus and Vancomycin-Resistant S. aureus Strains Isolated from Hospital Effluents*, *American journal of infection control* 43 (2015), e87-8.

- [52] C. Goerke, R. Pantucek, S. Holtfreter, B. Schulte, M. Zink, D. Grumann, B.M. Bröker, J. Doskar, and C. Wolz, *Diversity of Prophages in Dominant Staphylococcus aureus Clonal Lineages*, *Journal of bacteriology* 191 (2009), pp. 3462–3468.
- [53] J.A. Lindsay and M.T.G. Holden, *Understanding the Rise of the Superbug: Investigation of the Evolution and Genomic Variation of Staphylococcus aureus*, *Functional & integrative genomics* 6 (2006), pp. 186–201.
- [54] J.A. Lindsay, C.E. Moore, N.P. Day, S.J. Peacock, A.A. Witney, R.A. Stabler, S.E. Husain, P.D. Butcher, and J. Hinds, *Microarrays Reveal That Each of the Ten Dominant Lineages of Staphylococcus aureus Has a Unique Combination of Surface-Associated and Regulatory Genes*, *Journal of bacteriology* 188 (2006), pp. 669–676.
- [55] J.A. Lindsay and M.T.G. Holden, *Staphylococcus aureus: Superbug, Super Genome?*, *Trends in microbiology* 12 (2004), pp. 378–385.
- [56] M.C. Enright, N.P.J. Day, C.E. Davies, S.J. Peacock, and B.G. Spratt, *Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of Staphylococcus aureus*, *Journal of clinical microbiology* 38 (2000), pp. 1008–1015.
- [57] H.M.E. Frénay, A.E. Bunschoten, L.M. Schouls, W.J. Leeuwen, C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls, J. Verhoef, and F.R. Mooi, *Molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus on the basis of protein A gene polymorphism*, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15 (1996), pp. 60–64.
- [58] World Health Organization, *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*, 2014.
- [59] R.A. Proctor, *Challenges for a Universal Staphylococcus aureus Vaccine*, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 54 (2012), pp. 1179–1186.
- [60] V.G. Fowler and R.A. Proctor, *Where Does a Staphylococcus aureus Vaccine Stand?*, *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20 Suppl 5 (2014), pp. 66–75.
- [61] F. Bagnoli, S. Bertholet, and G. Grandi, *Inferring Reasons for the Failure of Staphylococcus aureus Vaccines in Clinical Trials*, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2 (2012), p. 16.
- [62] B. Spellberg and R. Daum, *Development of a Vaccine Against Staphylococcus aureus*, *Seminars in immunopathology* 34 (2012), pp. 335–348.
- [63] B.K. Giersing, S.S. Dastgheyb, K. Modjarrad, and V. Moorthy, *Status of Vaccine Research and Development of Vaccines for Staphylococcus aureus*, *Vaccine* 34 (2016), pp. 2962–2966.
- [64] D. Parker, *A Live Vaccine to Staphylococcus aureus Infection*, *Virulence* (2018), p. 0.

- [65] T.J. Foster, *Immune Evasion by Staphylococci*, Nature reviews. Microbiology 3 (2005), pp. 948–958.
- [66] A.N. Spaan, B.G.J. Surewaard, R. Nijland, and J.A.G. van Strijp, *Neutrophils Versus Staphylococcus aureus: a Biological Tug of War*, annual review of Microbiology 67 (2013), pp. 629–650.
- [67] V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D.S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky, *Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria*, Science (New York, N.Y.) 303 (2004), pp. 1532–1535.
- [68] J. Fernebro, *Fighting Bacterial Infections-Future Treatment Options*, Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy 14 (2011), pp. 125–139.
- [69] A. Izadpanah and R.L. Gallo, *Antimicrobial Peptides*, Journal of the American Academy of Dermatology 52 (2005), 381-90; quiz 391-2.
- [70] B.A. Diep, L. Chan, P. Tattevin, O. Kajikawa, T.R. Martin, L. Basuino, T.T. Mai, H. Marbach, K.R. Braughton, A.R. Whitney, D.J. Gardner, X. Fan, C.W. Tseng, G.Y. Liu, C. Badiou, J. Etienne, G. Lina, M.A. Matthay, F.R. Deleo, and H.F. Chambers, *Polymorphonuclear Leukocytes Mediate Staphylococcus aureus Panton-Valentine Leukocidin-Induced Lung Inflammation and Injury*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107 (2010), pp. 5587–5592.
- [71] K.M. Rigby and F.R. Deleo, *Neutrophils in Innate Host Defense Against Staphylococcus aureus Infections*, Seminars in immunopathology 34 (2012), pp. 237–259.
- [72] K. O’Riordan and J.C. Lee, *Staphylococcus aureus Capsular Polysaccharides*, Clinical microbiology reviews 17 (2004), pp. 218–234.
- [73] T.J. Foster, *Colonization and Infection of the Human Host by Staphylococci: Adhesion, Survival and Immune Evasion*, Veterinary dermatology 20 (2009), pp. 456–470.
- [74] G.E. Thwaites and V. Gant, *Are Bloodstream Leukocytes Trojan Horses for the Metastasis of Staphylococcus aureus?*, Nature reviews. Microbiology 9 (2011), pp. 215–222.
- [75] M. Li, D.J. Cha, Y. Lai, A.E. Villaruz, D.E. Sturdevant, and M. Otto, *The Antimicrobial Peptide-Sensing System Aps of Staphylococcus aureus*, Molecular microbiology 66 (2007), pp. 1136–1147.
- [76] M. Sieprawska-Lupa, P. Mydel, K. Krawczyk, K. Wójcik, M. Puklo, B. Lupa, P. Suder, J. Silberring, M. Reed, J. Pohl, W. Shafer, F. McAleese, T. Foster, J. Travis, and J. Potempa, *Degradation of Human Antimicrobial Peptide LL-37 by Staphylococcus aureus-Derived Proteinases*, Antimicrobial agents and chemotherapy 48 (2004), pp. 4673–4679.

- [77] A.J. Laarman, M. Ruyken, C.L. Malone, J.A.G. van Strijp, A.R. Horswill, and S.H.M. Rooijackers, *Staphylococcus aureus Metalloprotease Aureolysin Cleaves Complement C3 to Mediate Immune Evasion*, *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 186 (2011), pp. 6445–6453.
- [78] E.T.M. Berends, A.R. Horswill, N.M. Haste, M. Monestier, V. Nizet, and M. von Köckritz-Blickwede, *Nuclease Expression by Staphylococcus aureus Facilitates Escape from Neutrophil Extracellular Traps*, *Journal of innate immunity* 2 (2010), pp. 576–586.
- [79] A.J. McCarthy, A.A. Witney, and J.A. Lindsay, *Staphylococcus aureus Temperate Bacteriophage: Carriage and Horizontal Gene Transfer Is Lineage Associated*, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2 (2012).
- [80] W.J.B. van Wamel, S.H.M. Rooijackers, M. Ruyken, K.P.M. van Kessel, and J.A.G. van Strijp, *The Innate Immune Modulators Staphylococcal Complement Inhibitor and Chemotaxis Inhibitory Protein of Staphylococcus aureus Are Located on B-Hemolysin-Converting Bacteriophages*, *Journal of bacteriology* 188 (2006), pp. 1310–1315.
- [81] S.H.M. Rooijackers, M. Ruyken, A. Roos, M.R. Daha, J.S. Presanis, R.B. Sim, W.J.B. van Wamel, K.P.M. van Kessel, and J.A.G. van Strijp, *Immune Evasion by a Staphylococcal Complement Inhibitor That Acts on C3 Convertases*, *Nature immunology* 6 (2005), pp. 920–927.
- [82] A. Laarman, F. Milder, J. van Strijp, and S. Rooijackers, *Complement Inhibition by Gram-Positive Pathogens: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications*, *Journal of molecular medicine* (Berlin, Germany) 88 (2010), pp. 115–120.
- [83] S.H.M. Rooijackers and J.A.G. van Strijp, *Bacterial Complement Evasion*, *Molecular Immunology* 44 (2007), pp. 23–32.
- [84] B.M. Bröker, S. Holtfreter, and I. Bekeredjian-Ding, *Immune Control of Staphylococcus aureus - Regulation and Counter-Regulation of the Adaptive Immune Response*, *International journal of medical microbiology : IJMM* 304 (2014), pp. 204–214.
- [85] F. Zhao, A.S. Chong, and C.P. Montgomery, *Importance of B Lymphocytes and the IgG-Binding Protein Sbi in Staphylococcus aureus Skin Infection*, *Pathogens* (Basel, Switzerland) 5 (2016).
- [86] T. Chavakis, K.T. Preissner, and M. Herrmann, *The Anti-Inflammatory Activities of Staphylococcus aureus*, *Trends in immunology* 28 (2007), pp. 408–418.
- [87] L. Lan, A. Cheng, P.M. Dunman, D. Missiakas, and C. He, *Golden Pigment Production and Virulence Gene Expression Are Affected by Metabolisms in Staphylococcus aureus*, *Journal of bacteriology* 192 (2010), pp. 3068–3077.
- [88] I. Jongerius, J. Köhl, M.K. Pandey, M. Ruyken, K.P.M. van Kessel, J.A.G. van Strijp, and S.H.M. Rooijackers, *Staphylococcal Complement Evasion by Various Convertase-Blocking Molecules*, *The Journal of experimental medicine* 204 (2007), pp. 2461–2471.

- [89] I. Jongerius, B.L. Garcia, B.V. Geisbrecht, J.A.G. van Strijp, and S.H.M. Rooijackers, *Convertase Inhibitory Properties of Staphylococcal Extracellular Complement-Binding Protein*, *The Journal of biological chemistry* 285 (2010), pp. 14973–14979.
- [90] A. Zecconi and F. Scali, *Staphylococcus aureus Virulence Factors in Evasion from Innate Immune Defenses in Human and Animal Diseases*, *Immunology letters* 150 (2013), pp. 12–22.
- [91] S. Holtfreter, K. Roschack, P. Eichler, K. Eske, B. Holtfreter, C. Kohler, S. Engelmann, M. Hecker, A. Greinacher, and B.M. Bröker, *Staphylococcus aureus Carriers Neutralize Superantigens by Antibodies Specific for Their Colonizing Strain: a Potential Explanation for Their Improved Prognosis in Severe Sepsis*, *The Journal of infectious diseases* 193 (2006), pp. 1275–1278.
- [92] S. Holtfreter, J. Kolata, and B.M. Bröker, *Towards the Immune Proteome of Staphylococcus aureus - the Anti-S. aureus Antibody Response*, *International journal of medical microbiology : IJMM* 300 (2010), pp. 176–192.
- [93] J. Kolata, L.G.M. Bode, S. Holtfreter, L. Steil, H. Kusch, B. Holtfreter, D. Albrecht, M. Hecker, S. Engelmann, A. van Belkum, U. Völker, and B.M. Bröker, *Distinctive Patterns in the Human Antibody Response to Staphylococcus aureus Bacteremia in Carriers and Non-Carriers*, *Proteomics* 11 (2011), pp. 3914–3927.
- [94] N.J. Verkaik, C.P. de Vogel, H.A. Boelens, D. Grumann, T. Hoogenboezem, C. Vink, H. Hooijkaas, T.J. Foster, H.A. Verbrugh, A. van Belkum, and W.J.B. van Wamel, *Anti-Staphylococcal Humoral Immune Response in Persistent Nasal Carriers and Noncarriers of Staphylococcus aureus*, *The Journal of infectious diseases* 199 (2009), pp. 625–632.
- [95] B.M. Bröker, D. Mrochen, and V. Péton, *The T Cell Response to Staphylococcus aureus*, *Pathogens (Basel, Switzerland)* 5 (2016).
- [96] J.B. Kolata, I. Kühbandner, C. Link, N. Normann, C.H. Vu, L. Steil, C. Weidenmaier, and B.M. Bröker, *The Fall of a Dogma? Unexpected High T-Cell Memory Response to Staphylococcus aureus in Humans*, *The Journal of infectious diseases* 212 (2015), pp. 830–838.
- [97] M. von Köckritz-Blickwede, M. Rohde, S. Oehmcke, L.S. Miller, A.L. Cheung, H. Herwald, S. Foster, and E. Medina, *Immunological Mechanisms Underlying the Genetic Predisposition to Severe Staphylococcus aureus Infection in the Mouse Model*, *The American journal of pathology* 173 (2008), pp. 1657–1668.
- [98] C. Ziegler, O. Goldmann, E. Hobeika, R. Geffers, G. Peters, and E. Medina, *The Dynamics of T Cells During Persistent Staphylococcus aureus Infection: from Antigen-Reactivity to in Vivo Anergy*, *EMBO molecular medicine* 3 (2011), pp. 652–666.

- [99] D. Parker, C.L. Ryan, F. Alonzo, V.J. Torres, P.J. Planet, and A.S. Prince, *CD4⁺ T Cells Promote the Pathogenesis of Staphylococcus aureus Pneumonia*, *The Journal of infectious diseases* 211 (2015), pp. 835–845.
- [100] A. Prince, H. Wang, K. Kitur, and D. Parker, *Humanized Mice Exhibit Increased Susceptibility to Staphylococcus aureus Pneumonia*, *The Journal of infectious diseases* 215 (2017), pp. 1386–1395.
- [101] A.O. Tzianabos, A. Chandraker, W. Kalka-Moll, F. Stingele, V.M. Dong, R.W. Finberg, R. Peach, and M.H. Sayegh, *Bacterial Pathogens Induce Abscess Formation by CD4⁺ T-Cell Activation via the CD28-B7-2 Costimulatory Pathway*, *Infection and Immunity* 68 (2000), pp. 6650–6655.
- [102] M. Schmalzer, N.J. Jann, F. Ferracin, and R. Landmann, *T and B Cells Are Not Required for Clearing Staphylococcus aureus in Systemic Infection Despite a Strong TLR2-MyD88-Dependent T Cell Activation*, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186 (2011), pp. 443–452.
- [103] R.M. McLoughlin, R.M. Solinga, J. Rich, K.J. Zaleski, J.L. Cocchiario, A. Risley, A.O. Tzianabos, and J.C. Lee, *CD4⁺ T Cells and CXC Chemokines Modulate the Pathogenesis of Staphylococcus aureus Wound Infections*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006), pp. 10408–10413.
- [104] J.S. Cho, E.M. Pietras, N.C. Garcia, R.I. Ramos, D.M. Farzam, H.R. Monroe, J.E. Magorien, A. Blauvelt, J.K. Kolls, A.L. Cheung, G. Cheng, R.L. Modlin, and L.S. Miller, *IL-17 Is Essential for Host Defense Against Cutaneous Staphylococcus aureus Infection in Mice*, *The Journal of clinical investigation* 120 (2010), pp. 1762–1773.
- [105] B.M. Maher, M.E. Mulcahy, A.G. Murphy, M. Wilk, K.M. O’Keeffe, J.A. Geoghegan, E.C. Lavelle, and R.M. McLoughlin, *Nlrp-3-Driven Interleukin 17 Production by $\gamma\delta$ T Cells Controls Infection Outcomes During Staphylococcus aureus Surgical Site Infection*, *Infection and Immunity* 81 (2013), pp. 4478–4489.
- [106] C.P. Montgomery, M. Daniels, F. Zhao, M.-L. Alegre, A.S. Chong, and R.S. Daum, *Protective Immunity Against Recurrent Staphylococcus aureus Skin Infection Requires Antibody and Interleukin-17A*, *Infection and Immunity* 82 (2014), pp. 2125–2134.
- [107] L. Mölne, Corthay A., R. Holmdahl, and A. Tarkowski, *Role of gamma/delta T cell receptor-expressing lymphocytes in cutaneous infection caused by Staphylococcus aureus*, *Clin Exp Immunol* 132 (2003), pp. 209–215.
- [108] A. Kudva, E.V. Scheller, K.M. Robinson, C.R. Crowe, S.M. Choi, S.R. Slight, S.A. Khader, P.J. Dubin, R.I. Enelow, J.K. Kolls, and J.F. Alcorn, *Influenza a Inhibits Th17-Mediated Host Defense*

- Against Bacterial Pneumonia in Mice*, Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 186 (2011), pp. 1666–1674.
- [109] M.-O. Chandesris, I. Melki, A. Natividad, A. Puel, C. Fieschi, L. Yun, C. Thumerelle, E. Oksenhendler, D. Boutboul, C. Thomas, C. Hoarau, Y. Lebranchu, J.-L. Stephan, C. Cazorla, N. Aladjidi, M. Micheau, F. Tron, A. Baruchel, V. Barlogis, G. Palenzuela, C. Mathey, S. Dominique, G. Body, M. Munzer, F. Fouyssac, R. Jaussaud, B. Bader-Meunier, N. Mahlaoui, S. Blanche, M. Debré, M. Le Bourgeois, V. Gandemer, N. Lambert, V. Grandin, S. Ndaga, C. Jacques, C. Harre, M. Forveille, M.-A. Alyanakian, A. Durandy, C. Bodemer, F. Suarez, O. Hermine, O. Lortholary, J.-L. Casanova, A. Fischer, and C. Picard, *Autosomal Dominant STAT3 Deficiency and Hyper-IgE Syndrome: Molecular, Cellular, and Clinical Features from a French National Survey*, Medicine 91 (2012), e1-19.
- [110] M.C. Cook and S.G. Tangye, *Primary Immune Deficiencies Affecting Lymphocyte Differentiation: Lessons from the Spectrum of Resulting Infections*, International immunology 21 (2009), pp. 1003–1011.
- [111] J.D. Milner, J.M. Brenchley, A. Laurence, A.F. Freeman, B.J. Hill, K.M. Elias, Y. Kanno, C. Spalding, H.Z. Elloumi, M.L. Paulson, J. Davis, A. Hsu, A.I. Asher, J. O'Shea, S.M. Holland, W.E. Paul, and D.C. Douek, *Impaired T(H)17 Cell Differentiation in Subjects with Autosomal Dominant Hyper-IgE Syndrome*, Nature 452 (2008), pp. 773–776.
- [112] L. Lin, A.S. Ibrahim, X. Xu, J.M. Farber, V. Avanesian, B. Baquir, Y. Fu, S.W. French, J.E. Edwards, and B. Spellberg, *Th1-Th17 Cells Mediate Protective Adaptive Immunity Against Staphylococcus aureus and Candida albicans Infection in Mice*, PLoS pathogens 5 (2009), e1000703.
- [113] K. Narita, D.-L. Hu, F. Mori, K. Wakabayashi, Y. Iwakura, and A. Nakane, *Role of Interleukin-17A in Cell-Mediated Protection Against Staphylococcus aureus Infection in Mice Immunized with the Fibrinogen-Binding Domain of Clumping Factor a*, Infection and Immunity 78 (2010), pp. 4234–4242.
- [114] C.E. Zielinski, D. Corti, F. Mele, D. Pinto, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, *Dissecting the Human Immunologic Memory for Pathogens*, Immunological reviews 240 (2011), pp. 40–51.
- [115] M. Parcina, M.A. Miranda-Garcia, S. Durlanik, S. Ziegler, B. Over, P. Georg, S. Foermer, S. Ammann, D. Hilmi, K.-J. Weber, M. Schiller, K. Heeg, W. Schneider-Brachert, F. Götz, and I. Bekeredjian-Ding, *Pathogen-Triggered Activation of Plasmacytoid Dendritic Cells Induces IL-10-Producing B Cells in Response to Staphylococcus aureus*, Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 190 (2013), pp. 1591–1602.
- [116] M. Graille, E.A. Stura, A.L. Corper, B.J. Sutton, M.J. Taussig, J.-B. Charbonnier, and G.J. Silverman, *Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein A domain complexed with the*

- Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity*, Proceedings of the National Academy of Sciences 97 (2000), pp. 5399–5404.
- [117] Prokesova L., potuznikova B., Potempa J., Zikan J., Radl J., Hachova L., Baran K., Porwit-Bobr Z., John C., *Cleavage of human immunoglobulins by serine proteinase from Staphylococcus aureus* 1992.
- [118] G. Dubin, *Extracellular Proteases of Staphylococcus Spp*, Biological chemistry 383 (2002), pp. 1075–1086.
- [119] S.W. Tuffs, D.B.A. James, J. Bestebroer, A.C. Richards, M.I. Goncheva, M. O'Shea, B.A. Wee, K.S. Seo, P.M. Schlievert, A. Lengeling, J.A. van Strijp, V.J. Torres, and J.R. Fitzgerald, *The Staphylococcus aureus Superantigen SEIX Is a Bifunctional Toxin That Inhibits Neutrophil Function*, PLoS pathogens 13 (2017), e1006461.
- [120] D.-F. Zhang, X.-Y. Yang, J. Zhang, X. Qin, X. Huang, Y. Cui, M. Zhou, C. Shi, N.P. French, and X. Shi, *Identification and Characterization of Two Novel Superantigens Among Staphylococcus aureus Complex*, International journal of medical microbiology : IJMM 308 (2018), pp. 438–446.
- [121] H.K. Ono, Y. Sato'o, K. Narita, I. Naito, S. Hirose, J. Hisatsune, K. Asano, D.-L. Hu, K. Omoe, M. Sugai, and A. Nakane, *Identification and Characterization of a Novel Staphylococcal Emetic Toxin*, Applied and environmental microbiology 81 (2015), pp. 7034–7040.
- [122] G. Arad, R. Levy, I. Nasie, D. Hillman, Z. Rotfogel, U. Barash, E. Supper, T. Shpilka, A. Minis, and R. Kaempfer, *Binding of Superantigen Toxins into the CD28 Homodimer Interface Is Essential for Induction of Cytokine Genes That Mediate Lethal Shock*, PLoS biology 9 (2011), e1001149.
- [123] T. Proft and J.D. Fraser, *Bacterial Superantigens*, Clin Exp Immunol 133 (2003), pp. 299–306.
- [124] B. Fleischer and H. Schrezenmeier, *T Cell Stimulation by Staphylococcal Enterotoxins. Clonally Variable Response and Requirement for Major Histocompatibility Complex Class II Molecules on Accessory or Target Cells*, The Journal of experimental medicine 167 (1988), pp. 1697–1707.
- [125] J.D. Fraser and T. Proft, *The Bacterial Superantigen and Superantigen-Like Proteins*, Immunological reviews 225 (2008), pp. 226–243.
- [126] S. Holtfreter and B.M. Bröker, *Staphylococcal superantigens: Do they play a Role in Sepsis?*, Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis (2005), pp. 13–27.
- [127] B.L. Rellahan, *In vivo induction of anergy in peripheral V beta 8⁺ T cells by staphylococcal enterotoxin B*, Journal of Experimental Medicine 172 (1990), pp. 1091–1100.

- [128] M.E. Mulcahy, J.A. Geoghegan, I.R. Monk, K.M. O'Keeffe, E.J. Walsh, T.J. Foster, and R.M. McLoughlin, *Nasal Colonisation by Staphylococcus aureus Depends Upon Clumping Factor B Binding to the Squamous Epithelial Cell Envelope Protein Loricrin*, *PLoS pathogens* 8 (2012), e1003092.
- [129] U. Kaspar, A. Kriegeskorte, T. Schubert, G. Peters, C. Rudack, D.H. Pieper, M. Wos-Oxley, and K. Becker, *The Culturome of the Human Nose Habitats Reveals Individual Bacterial Fingerprint Patterns*, *Environmental microbiology* 18 (2016), pp. 2130–2142.
- [130] S. Baur, M. Rautenberg, M. Faulstich, M. Faulstich, T. Grau, Y. Severin, C. Unger, W.H. Hoffmann, T. Rudel, I.B. Autenrieth, and C. Weidenmaier, *A Nasal Epithelial Receptor for Staphylococcus aureus WTA Governs Adhesion to Epithelial Cells and Modulates Nasal Colonization*, *PLoS pathogens* 10 (2014), e1004089.
- [131] L. Eckhart, S. Lippens, E. Tschachler, and W. Declercq, *Cell Death by Cornification*, *Biochimica et biophysica acta* 1833 (2013), pp. 3471–3480.
- [132] S.R. Clarke, K.J. Brummell, M.J. Horsburgh, P.W. McDowell, S.A.S. Mohamad, M.R. Stapleton, J. Acevedo, R.C. Read, N.P.J. Day, S.J. Peacock, J.J. Mond, J.F. Kokai-Kun, and S.J. Foster, *Identification of in Vivo-Expressed Antigens of Staphylococcus aureus and Their Use in Vaccinations for Protection Against Nasal Carriage*, *The Journal of infectious diseases* 193 (2006), pp. 1098–1108.
- [133] S.R. Clarke, M.D. Wiltshire, and S.J. Foster, *IsdA of Staphylococcus aureus Is a Broad Spectrum, Iron-Regulated Adhesin*, *Molecular microbiology* 51 (2004), pp. 1509–1519.
- [134] A.C. Schaffer, R.M. Solinga, J. Cocchiario, M. Portoles, K.B. Kiser, A. Risley, S.M. Randall, V. Valtulina, P. Speziale, E. Walsh, T. Foster, and J.C. Lee, *Immunization with Staphylococcus aureus Clumping Factor B, a Major Determinant in Nasal Carriage, Reduces Nasal Colonization in a Murine Model*, *Infection and Immunity* 74 (2006), pp. 2145–2153.
- [135] H.F.L. Wertheim, E. Walsh, R. Choudhury, D.C. Melles, H.A.M. Boelens, H. Miajlovic, H.A. Verbrugh, T. Foster, and A. van Belkum, *Key Role for Clumping Factor B in Staphylococcus aureus Nasal Colonization of Humans*, *PloS medicine* 5 (2008), e17.
- [136] E.D. Son, H.-J. Kim, T. Park, K. Shin, I.-H. Bae, K.-M. Lim, E.-G. Cho, and T.R. Lee, *Staphylococcus aureus Inhibits Terminal Differentiation of Normal Human Keratinocytes by Stimulating Interleukin-6 Secretion*, *Journal of dermatological science* 74 (2014), pp. 64–71.
- [137] K. Boniface, F.-X. Bernard, M. Garcia, A.L. Gurney, J.-C. Lecron, and F. Morel, *IL-22 Inhibits Epidermal Differentiation and Induces Proinflammatory Gene Expression and Migration of Human Keratinocytes*, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174 (2005), pp. 3695–3702.

- [138] K. Wolk, E. Witte, E. Wallace, W.-D. Döcke, S. Kunz, K. Asadullah, H.-D. Volk, W. Sterry, and R. Sabat, *IL-22 Regulates the Expression of Genes Responsible for Antimicrobial Defense, Cellular Differentiation, and Mobility in Keratinocytes: a Potential Role in Psoriasis*, *European journal of immunology* 36 (2006), pp. 1309–1323.
- [139] C.E. Rolle, J. Chen, I. Pastar, T.C.P. Cardenas, R. Perez, S. Hower, F. Ferracci, R. Snyder, M. Tomic-Canic, and L.R.W. Plano, *Keratinocytes Produce IL-6 in Response to Desmoglein 1 Cleavage by Staphylococcus aureus Exfoliative Toxin a*, *Immunologic research* 57 (2013), pp. 258–267.
- [140] K. Midorikawa, K. Ouhara, H. Komatsuzawa, T. Kawai, S. Yamada, T. Fujiwara, K. Yamazaki, K. Sayama, M.A. Taubman, H. Kurihara, K. Hashimoto, and M. Sugai, *Staphylococcus aureus Susceptibility to Innate Antimicrobial Peptides, Beta-Defensins and CAP18, Expressed by Human Keratinocytes*, *Infection and Immunity* 71 (2003), pp. 3730–3739.
- [141] M. Simanski, F. Rademacher, L. Schröder, H.M. Schumacher, R. Gläser, and J. Harder, *IL-17A and IFN- γ Synergistically Induce RNase 7 Expression via STAT3 in Primary Keratinocytes*, *PLoS one* 8 (2013), e59531.
- [142] A.M. Cole, P. Dewan, and T. Ganz, *Innate Antimicrobial Activity of Nasal Secretions*, *Infection and Immunity* 67 (1999), pp. 3267–3275.
- [143] A. Gröne, *Keratinocytes and Cytokines*, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 88 (2002), pp. 1–12.
- [144] C. Burgey, W.V. Kern, W. Römer, and S. Rieg, *Differential Induction of Innate Defense Antimicrobial Peptides in Primary Nasal Epithelial Cells Upon Stimulation with Inflammatory Cytokines, Th17 Cytokines or Bacterial Conditioned Medium from Staphylococcus aureus Isolates*, *Microbial pathogenesis* 90 (2016), pp. 69–77.
- [145] D. Nurjadi, E. Herrmann, I. Hinderberger, and P. Zanger, *Impaired B-Defensin Expression in Human Skin Links DEFB1 Promoter Polymorphisms with Persistent Staphylococcus aureus Nasal Carriage*, *The Journal of infectious diseases* 207 (2013), pp. 666–674.
- [146] P. Zanger, D. Nurjadi, B. Vath, and P.G. Kremsner, *Persistent Nasal Carriage of Staphylococcus aureus Is Associated with Deficient Induction of Human B-Defensin 3 After Sterile Wounding of Healthy Skin in Vivo* ∇ , *Infection and Immunity* 79 (2011), pp. 2658–2662.
- [147] N.K. Archer, J.M. Harro, and M.E. Shirtliff, *Clearance of Staphylococcus aureus Nasal Carriage Is T Cell Dependent and Mediated Through Interleukin-17A Expression and Neutrophil Influx*, *Infection and Immunity* 81 (2013), pp. 2070–2075.
- [148] N. Kamada, G.Y. Chen, N. Inohara, and G. Núñez, *Control of Pathogens and Pathobionts by the Gut Microbiota*, *Nature immunology* 14 (2013), pp. 685–690.

- [149] F. Guarner and J.-R. Malagelada, *Gut flora in health and disease*, *The Lancet* 361 (2003), pp. 512–519.
- [150] A.J. Macpherson and N.L. Harris, *Interactions Between Commensal Intestinal Bacteria and the Immune System*, *Nat Rev Immunol* 4 (2004), pp. 478–485.
- [151] A. Dobson, P.D. Cotter, R.P. Ross, and C. Hill, *Bacteriocin Production: a Probiotic Trait?*, *Applied and environmental microbiology* 78 (2012), pp. 1–6.
- [152] S. Kommineni, D.J. Bretl, V. Lam, R. Chakraborty, M. Hayward, P. Simpson, Y. Cao, P. Bousounis, C.J. Kristich, and N.H. Salzman, *Bacteriocin Production Augments Niche Competition by Enterococci in the Mammalian Gastrointestinal Tract*, *Nature* 526 (2015), pp. 719–722.
- [153] A. Zipperer, M.C. Konnerth, C. Laux, A. Berscheid, D. Janek, C. Weidenmaier, M. Burian, N.A. Schilling, C. Slavetinsky, M. Marschal, M. Willmann, H. Kalbacher, B. Schitteck, H. Brötz-Oesterhelt, S. Grond, A. Peschel, and B. Krismer, *Human Commensals Producing a Novel Antibiotic Impair Pathogen Colonization*, *Nature* 535 (2016), pp. 511–516.
- [154] P. Piewngam, Y. Zheng, T.H. Nguyen, S.W. Dickey, H.-S. Joo, A.E. Villaruz, K.A. Glose, E.L. Fisher, R.L. Hunt, B. Li, J. Chiou, S. Pharkjaksu, S. Khongthong, G.Y.C. Cheung, P. Kiratisin, and M. Otto, *Pathogen Elimination by Probiotic Bacillus via Signalling Interference* preprint (2018).
- [155] S. Holtfreter, T.T.H. Nguyen, H. Wertheim, L. Steil, H. Kusch, Q.P. Truong, S. Engelmann, M. Hecker, U. Völker, A. van Belkum, and B.M. Bröker, *Human Immune Proteome in Experimental Colonization with Staphylococcus aureus*, *Clinical and vaccine immunology : CVI* 16 (2009), pp. 1607–1614.
- [156] Y. Sun, C. Emolo, S. Holtfreter, S. Wiles, B. Kreiswirth, D. Missiakas, and O. Schneewind, *Staphylococcal Protein a Contributes to Persistent Colonization of Mice with Staphylococcus aureus* preprint (2018).
- [157] G. Muthukrishnan, G.A. Quinn, R.P. Lamers, C. Diaz, A.L. Cole, S. Chen, and A.M. Cole, *Exoproteome of Staphylococcus aureus Reveals Putative Determinants of Nasal Carriage*, *Journal of proteome research* 10 (2011), pp. 2064–2078.
- [158] A.L. Cole, G. Muthukrishnan, C. Chong, A. Beavis, C.R. Eade, M.P. Wood, M.G. Deichen, and A.M. Cole, *Host Innate Inflammatory Factors and Staphylococcal Protein a Influence the Duration of Human Staphylococcus aureus Nasal Carriage*, *Mucosal immunology* 9 (2016), pp. 1537–1548.
- [159] M.E. Mulcahy, J.M. Leech, J.-C. Renauld, K.H. Mills, and R.M. McLoughlin, *Interleukin-22 Regulates Antimicrobial Peptide Expression and Keratinocyte Differentiation to Control Staphylococcus aureus Colonization of the Nasal Mucosa*, *Mucosal immunology* 9 (2016), pp. 1429–1441.

- [160] N.K. Archer, N.D. Adappa, J.N. Palmer, N.A. Cohen, J.M. Harro, S.K. Lee, L.S. Miller, and M.E. Shirtliff, *Interleukin-17A (IL-17A) and IL-17F Are Critical for Antimicrobial Peptide Production and Clearance of Staphylococcus aureus Nasal Colonization*, *Infection and Immunity* 84 (2016), pp. 3575–3583.
- [161] M.E. Mulcahy and R.M. McLoughlin, *Host-Bacterial Crosstalk Determines Staphylococcus aureus Nasal Colonization*, *Trends in microbiology* 24 (2016), pp. 872–886.
- [162] D. Nurjadi, M. Kain, P. Marcinek, M. Gaile, K. Heeg, and P. Zanger, *Ratio of T-Helper Type 1 (Th1) to Th17 Cytokines in Whole Blood Is Associated with Human B-Defensin 3 Expression in Skin and Persistent Staphylococcus aureus Nasal Carriage*, *The Journal of infectious diseases* 214 (2016), pp. 1744–1751.
- [163] S. Holtfreter, F.J. Radcliff, D. Grumann, H. Read, S. Johnson, S. Monecke, S. Ritchie, F. Clow, C. Goerke, B.M. Bröker, J.D. Fraser, and S. Wiles, *Characterization of a Mouse-Adapted Staphylococcus aureus Strain*, *PloS one* 8 (2013), e71142.
- [164] E.J. Feil, J.E. Cooper, H. Grundmann, D.A. Robinson, M.C. Enright, T. Berendt, S.J. Peacock, J.M. Smith, M. Murphy, B.G. Spratt, C.E. Moore, and N.P.J. Day, *How Clonal Is Staphylococcus aureus?*, *Journal of bacteriology* 185 (2003), pp. 3307–3316.
- [165] J.M.-L. Sung, D.H. Lloyd, and J.A. Lindsay, *Staphylococcus aureus Host Specificity: Comparative Genomics of Human Versus Animal Isolates by Multi-Strain Microarray*, *Microbiology (Reading, England)* 154 (2008), pp. 1949–1959.
- [166] L. Herron-Olson, J.R. Fitzgerald, J.M. Musser, and V. Kapur, *Molecular Correlates of Host Specialization in Staphylococcus aureus*, *PloS one* 2 (2007), e1120.
- [167] C.M. Guinane, N.L. Ben Zakour, M.A. Tormo-Mas, L.A. Weinert, B.V. Lowder, R.A. Cartwright, D.S. Smyth, C.J. Smyth, J.A. Lindsay, K.A. Gould, A. Witney, J. Hinds, J.P. Bollback, A. Rambaut, J.R. Penadés, and J.R. Fitzgerald, *Evolutionary Genomics of Staphylococcus aureus Reveals Insights into the Origin and Molecular Basis of Ruminant Host Adaptation*, *Genome biology and evolution* 2 (2010), pp. 454–466.
- [168] B.V. Lowder, C.M. Guinane, N.L. Ben Zakour, L.A. Weinert, A. Conway-Morris, R.A. Cartwright, A.J. Simpson, A. Rambaut, U. Nübel, and J.R. Fitzgerald, *Recent Human-to-Poultry Host Jump, Adaptation, and Pandemic Spread of Staphylococcus aureus*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (2009), pp. 19545–19550.
- [169] A.J. de Neeling, M.J.M. van den Broek, E.C. Spalburg, M.G. van Santen-Verheuevel, W.D.C. Dam-Deisz, H.C. Boshuizen, A.W. van de Giessen, E. van Duijkeren, and X.W. Huijsdens, *High Prevalence of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus in Pigs*, *Veterinary microbiology* 122 (2007), pp. 366–372.

- [170] V. Peton and Y. Le Loir, *Staphylococcus aureus in Veterinary Medicine*, Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 21 (2014), pp. 602–615.
- [171] G. Prévost, D.A. Colin, L. Staali, L. Baba Moussa, A. Gravet, S. Werner, A. Sanni, O. Meunier, and H. Monteil, *Les leucotoxines formant des pores de Staphylococcus aureus: variabilité des cellules-cible et deux processus pharmacologiques*, Pathologie-biologie 46 (1998), pp. 435–441.
- [172] S. Szmigielski, G. Prévost, H. Monteil, D.A. Colin, and J. Jeljaszewicz, *Leukocidal Toxins of Staphylococci*, Zentralblatt für Bakteriologie 289 (1999), pp. 185–201.
- [173] W. Salgado-Pabón and P.M. Schlievert, *Models Matter: the Search for an Effective Staphylococcus aureus Vaccine*, Nature reviews. Microbiology 12 (2014), pp. 585–591.
- [174] P.M. Schlievert, *Cytolysins, Superantigens, and Pneumonia Due to Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*, The Journal of infectious diseases 200 (2009), pp. 676–678.
- [175] M.F. Osuchowski, D.G. Remick, J.A. Lederer, C.H. Lang, A.O. Aasen, M. Aibiki, L.C. Azevedo, S. Bahrami, M. Boros, R. Cooney, S. Cuzzocrea, Y. Jiang, W.G. Junger, H. Hirasawa, R.S. Hotchkiss, X.-A. Li, P. Radermacher, H. Redl, R. Salomao, A. Soebandrio, C. Thiernemann, J.-L. Vincent, P. Ward, Y.-M. Yao, H.-P. Yu, B. Zingarelli, and I.H. Chaudry, *Abandon the Mouse Research Ship? Not Just yet!*, Shock (Augusta, Ga.) 41 (2014), pp. 463–475.
- [176] J. Seok, H.S. Warren, A.G. Cuenca, M.N. Mindrinos, H.V. Baker, W. Xu, D.R. Richards, G.P. McDonald-Smith, H. Gao, L. Hennessy, C.C. Finnerty, C.M. López, S. Honari, E.E. Moore, J.P. Minei, J. Cuschieri, P.E. Bankey, J.L. Johnson, J. Sperry, A.B. Nathens, T.R. Billiar, M.A. West, M.G. Jeschke, M.B. Klein, R.L. Gamelli, N.S. Gibran, B.H. Brownstein, C. Miller-Graziano, S.E. Calvano, P.H. Mason, J.P. Cobb, L.G. Rahme, S.F. Lowry, R.V. Maier, L.L. Moldawer, D.N. Herndon, R.W. Davis, W. Xiao, and R.G. Tompkins, *Genomic Responses in Mouse Models Poorly Mimic Human Inflammatory Diseases*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110 (2013), pp. 3507–3512.
- [177] K.B. Kiser, J.M. Cantey-Kiser, and J.C. Lee, *Development and Characterization of a Staphylococcus aureus Nasal Colonization Model in Mice*, Infection and Immunity 67 (1999), pp. 5001–5006.
- [178] D. Schulz, D. Grumann, P. Trübe, K. Pritchett-Corning, S. Johnson, K. Reppschläger, J. Gumz, N. Sundaramoorthy, S. Michalik, S. Berg, J. van den Brandt, R. Fister, S. Monecke, B. Uy, F. Schmidt, B.M. Bröker, S. Wiles, and S. Holtfreter, *Laboratory Mice Are Frequently Colonized with Staphylococcus aureus and Mount a Systemic Immune Response—Note of*

- Caution for in Vivo Infection Experiments*, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (2017).
- [179] A. Flaxman, P.M. van Diemen, Y. Yamaguchi, E. Allen, C. Lindemann, C.S. Rollier, A. Milicic, and D.H. Wyllie, *Development of Persistent Gastrointestinal S. aureus Carriage in Mice*, *Scientific reports* 7 (2017), p. 12415.
- [180] D.G. Baker, *Natural Pathogens of Laboratory Animals: Their Effects on Research*. ASM Press, Washington, D.C, 2003.
- [181] D.H. Percy, S.W. Barthold, and S.M. Griffey, *Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits*. John Wiley & Sons Inc, Ames, Iowa, 2016.
- [182] D.M. Mrochen, D. Grumann, D. Schulz, J. Gumz, P. Trübe, K. Pritchett-Corning, S. Johnson, W. Nicklas, P. Kirsch, K. Martelet, J. van den Brandt, S. Berg, B.M. Bröker, S. Wiles, and S. Holtfreter, *Global Spread of Mouse-Adapted Staphylococcus aureus Lineages CC1, CC15, and CC88 Among Mouse Breeding Facilities* preprint (2017).
- [183] D.M. Mrochen, D. Schulz, S. Fischer, K. Jeske, H. El Gohary, D. Reil, C. Imholt, P. Trübe, J. Suchomel, E. Tricaud, J. Jacob, M. Heroldová, B.M. Bröker, B. Strommenger, B. Walther, R.G. Ulrich, and S. Holtfreter, *Wild Rodents and Shrews Are Natural Hosts of Staphylococcus Aureus*.
- [184] D.M. Mrochen, *Molekularepidemiologie und Wirtsanpassung von Staphylococcus aureus-Stämmen aus Wildmäusen*, Masterarbeit, Universität Greifswald, 2015.
- [185] J. Gumz, *Funktionelle Charakterisierung des Maus-adaptierten Staphylococcus aureus-Stammes JSNZ*, Diplomarbeit, Universität Greifswald, 2013.
- [186] D. Raafat, D.M. Mrochen, F. Al'Sholui, E. Heuser, R. Ryll, K.R. Pritchett-Corning, J. Jacob, B. Walther, F.-R. Matuschka, D. Richter, U. Westerhüs, J. Pikula, J. van den Brandt, W. Nicklas, S. Monecke, B. Strommenger, S. van Alen, K. Becker, R.G. Ulrich, and S. Holtfreter, *Molecular Epidemiology of Methicillin-Susceptible and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Wild, Captive and Laboratory Rats: Effect of Habitat on the Nasal S. Aureus Population*, *Toxins* 12 (2020).
- [187] C.G. Himsworth, R.R. Miller, V. Montoya, L. Hoang, M.G. Romney, G.N. Al-Rawahi, T. Kerr, C.M. Jardine, D.M. Patrick, P. Tang, and J.S. Weese, *Carriage of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus by Wild Urban Norway Rats (Rattus Norvegicus)*, *PloS one* 9 (2014), e87983.
- [188] M. Schlegel, K. Baumann, A. Breithaupt, A. Binder, U. Schotte, S. Ruhl, C. Krohmann, S. Eßbauer, D. Frangoulidis, P. Kayßer, H. Meyer, J. Riehm, M. Faulde, J. Lewitzki, S. Sauer, R.G. Ulrich, and J.P. Teifke, *SPIELEN NAGETIERE ALS ÜBERTRÄGER VON ZOONOSEERREGERN IM EINSATZGEBIET DER BUNDESWEHR IN AFGANISTAN EINE ROLLE?**. Available at

- <https://wehrmed.de/article/2145-spielen-nagetiere-als-uebertraeger-von-zoonoseerregern-im-einsatzgebiet-der-bundeswehr-in-afghanistan-eine-rolle.html>.
- [189] K.E. Traber, E. Lee, S. Benson, R. Corrigan, M. Cantera, B. Shopsin, and R.P. Novick, *Agr Function in Clinical Staphylococcus aureus Isolates*, Microbiology (Reading, England) 154 (2008), pp. 2265–2274.
- [190] D. Viana, J. Blanco, M.Á. Tormo-Más, L. Selva, C.M. Guinane, R. Baselga, J.M. Corpa, Í. Lasa, R.P. Novick, J.R. Fitzgerald, and J.R. Penadés, *Adaptation of Staphylococcus aureus to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein*, Molecular microbiology 77 (2010), pp. 1583–1594.
- [191] W.H. Sperber and S.R. Tatini, *Interpretation of the Tube Coagulase Test for Identification of Staphylococcus aureus*, Applied Microbiology 29 (1975), pp. 502–505.
- [192] A. Bankevich, S. Nurk, D. Antipov, A.A. Gurevich, M. Dvorkin, A.S. Kulikov, V.M. Lesin, S.I. Nikolenko, S. Pham, A. d. Prjibelski, A. v. Pyskin, A. v. Sirotkin, N. Vyahhi, G. Tesler, M.A. Alekseyev, and P.A. Pevzner, *SPAdes: a New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing*, Journal of Computational Biology 19 (2012), pp. 455–477.
- [193] T. Seemann, *Prokka: Rapid Prokaryotic Genome Annotation*, Bioinformatics (Oxford, England) 30 (2014), pp. 2068–2069.
- [194] S.H.M. Rooijackers, K.P.M. van Kessel, and J.A.G. van Strijp, *Staphylococcal Innate Immune Evasion*, Trends in microbiology 13 (2005), pp. 596–601.
- [195] M.B. Barrio, P. Rainard, and G. Prévost, *LukM/LukF'-PV Is the Most Active Staphylococcus aureus Leukotoxin on Bovine Neutrophils*, Microbes and infection 8 (2006), pp. 2068–2074.
- [196] K. Schlotter, R. Ehricht, H. Hotzel, S. Monecke, M. Pfeffer, and K. Donat, *Leukocidin Genes LukF-P83 and LukM Are Associated with Staphylococcus aureus Clonal Complexes 151, 479 and 133 Isolated from Bovine Udder Infections in Thuringia, Germany*, Veterinary research 43 (2012), p. 42.
- [197] T. Yamada, N. Tochimaru, S. Nakasuji, E. Hata, H. Kobayashi, M. Eguchi, J. Kaneko, Y. Kamio, T. Kaidoh, and S. Takeuchi, *Leukotoxin Family Genes in Staphylococcus aureus Isolated from Domestic Animals and Prevalence of LukM-LukF-PV Genes by Bacteriophages in Bovine Isolates*, Veterinary microbiology 110 (2005), pp. 97–103.
- [198] R.P. Novick, H.F. Ross, S.J. Projan, J. Kornblum, B. Kreiswirth, and S. Moghazeh, *Synthesis of Staphylococcal Virulence Factors Is Controlled by a Regulatory RNA Molecule*, The EMBO Journal 12 (1993), pp. 3967–3975.
- [199] E. Morfeldt, D. Taylor, A. von Gabain, and S. Arvidson, *Activation of Alpha-Toxin Translation in Staphylococcus aureus by the Trans-Encoded Antisense RNA, RNAIII*, The EMBO Journal 14 (1995), pp. 4569–4577.

- [200] Y. Benito, F.A. Kolb, P. Romby, G. Lina, J. Etienne, and F. Vandenesch, *Probing the Structure of RNAIII, the Staphylococcus aureus Agr Regulatory RNA, and Identification of the RNA Domain Involved in Repression of Protein a Expression*, RNA 6 (2000), pp. 668–679.
- [201] I. Jorde, *Vergleich muriner und humaner Staphylococcus aureus-Stämme im murinen Besiedlungs- und Pneumoniemodell*, Masterarbeit, Universität Greifswald, Juni 2018.
- [202] P. Colque-Navarro, G. Jacobsson, R. Andersson, J.-I. Flock, and R. Möllby, *Levels of Antibody Against 11 Staphylococcus aureus Antigens in a Healthy Population*, Clinical and vaccine immunology : CVI 17 (2010), pp. 1117–1123.
- [203] A. Oppliger, P. Moreillon, N. Charrière, M. Giddey, D. Morisset, and O. Sakwinska, *Antimicrobial Resistance of Staphylococcus aureus Strains Acquired by Pig Farmers from Pigs*, Applied and environmental microbiology 78 (2012), pp. 8010–8014.
- [204] G. Overesch, S. Büttner, A. Rossano, and V. Perreten, *The Increase of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and the Presence of an Unusual Sequence Type ST49 in Slaughter Pigs in Switzerland*, BMC veterinary research 7 (2011), p. 30.
- [205] S. Monecke, L. Jatzwauk, S. Weber, P. Slickers, and R. Ehricht, *DNA Microarray-Based Genotyping of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strains from Eastern Saxony*, Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 14 (2008), pp. 534–545.
- [206] A. Deplano, S. Vandendriessche, C. Nonhoff, and O. Denis, *Genetic Diversity Among Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolates Carrying the MecC Gene in Belgium*, The Journal of antimicrobial chemotherapy 69 (2014), pp. 1457–1460.
- [207] V.R. Simpson, N.J. Davison, A.M. Kearns, B. Pichon, L.O. Hudson, M. Koylass, T. Blackett, H. Butler, J.P. Rasigade, and A.M. Whatmore, *Association of a LukM-Positive Clone of Staphylococcus aureus with Fatal Exudative Dermatitis in Red Squirrels (Sciurus Vulgaris)*, Veterinary microbiology 162 (2013), pp. 987–991.
- [208] G.K. Paterson, A.R. Larsen, A. Robb, G.E. Edwards, T.W. Pennycott, G. Foster, D. Mot, K. Hermans, K. Baert, S.J. Peacock, J. Parkhill, R.N. Zadoks, and M.A. Holmes, *The Newly Described MecA Homologue, MecALGA251, Is Present in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolates from a Diverse Range of Host Species*, The Journal of antimicrobial chemotherapy 67 (2012), pp. 2809–2813.
- [209] M. Haenni, P. Châtre, C. Dupieux, V. Métayer, K. Maillard, M. Bes, J.-Y. Madec, and F. Laurent, *MecC-Positive MRSA in Horses*, The Journal of antimicrobial chemotherapy 70 (2015), pp. 3401–3402.

- [210] M.M.S. Chen, S. Monecke, and M.H. Brown, *Clonal Diversity of Methicillin-Sensitive Staphylococcus aureus from South Australian Wallabies*, *One health* (Amsterdam, Netherlands) 2 (2016), pp. 31–32.
- [211] S. Monecke, D. Gavier-Widén, H. Hotzel, M. Peters, S. Guenther, A. Lazaris, I. Loncaric, E. Müller, A. Reissig, A. Ruppelt-Lorz, A.C. Shore, B. Walter, D.C. Coleman, and R. Ehricht, *Diversity of Staphylococcus aureus Isolates in European Wildlife*, *PloS one* 11 (2016), e0168433.
- [212] B. Walther, S. Monecke, C. Ruscher, A.W. Friedrich, R. Ehricht, P. Slickers, A. Soba, C.-G. Wleklinski, L.H. Wieler, and A. Lübke-Becker, *Comparative Molecular Analysis Substantiates Zoonotic Potential of Equine Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*, *Journal of clinical microbiology* 47 (2009), pp. 704–710.
- [213] N.J. Verkaik, M. Benard, H.A. Boelens, C.P. de Vogel, J.L. Nouwen, H.A. Verbrugh, D.C. Melles, A. van Belkum, and W.J.B. van Wamel, *Immune evasion cluster-positive bacteriophages are highly prevalent among human Staphylococcus aureus strains, but they are not essential in the first stages of nasal colonization*, *Clinical Microbiology and Infection* 17 (2011), pp. 343–348.
- [214] Y. Katayama, T. Baba, M. Sekine, M. Fukuda, and K. Hiramatsu, *Beta-Hemolysin Promotes Skin Colonization by Staphylococcus aureus*, *Journal of bacteriology* 195 (2013), pp. 1194–1203.
- [215] I.P. Gladysheva, R.B. Turner, I.Y. Sazonova, L. Liu, and G.L. Reed, *Coevolutionary Patterns in Plasminogen Activation*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (2003), pp. 9168–9172.
- [216] C.J.C. de Haas, K.E. Veldkamp, A. Peschel, F. Weerkamp, W.J.B. van Wamel, E.C.J.M. Heezius, M.J.J.G. Poppelier, K.P.M. van Kessel, and J.A.G. van Strijp, *Chemotaxis Inhibitory Protein of Staphylococcus aureus, a Bacterial Antiinflammatory Agent*, *The Journal of experimental medicine* 199 (2004), pp. 687–695.
- [217] B. Löffler, M. Hussain, M. Grundmeier, M. Brück, D. Holzinger, G. Varga, J. Roth, B.C. Kahl, R.A. Proctor, and G. Peters, *Staphylococcus aureus Panton-Valentine Leukocidin Is a Very Potent Cytotoxic Factor for Human Neutrophils*, *PLoS pathogens* 6 (2010), e1000715.
- [218] R. Langley, B. Wines, N. Willoughby, I. Basu, T. Proft, and J.D. Fraser, *The Staphylococcal Superantigen-Like Protein 7 Binds IgA and Complement C5 and Inhibits IgA-Fc RI Binding and Serum Killing of Bacteria*, *The Journal of Immunology* 174 (2005), pp. 2926–2933.
- [219] A.L.A. Bloemendaal, M.R. Vriens, W.T.M. Jansen, I.H.M. Borel Rinkes, J. Verhoef, and A.C. Fluit, *Colonization and Transmission of Meticillin-Susceptible and Meticillin-Resistant*

- Staphylococcus aureus in a Murine Nasal Colonization Model*, *Journal of medical microbiology* 60 (2011), pp. 812–816.
- [220] R.C. Massey, M.J. Horsburgh, G. Lina, M. Höök, and M. Recker, *The evolution and maintenance of virulence in Staphylococcus aureus: a role for host-to-host transmission?*, *Nat Rev Micro* 4 (2006), pp. 953–958.
- [221] W.J.B. van Wamel, *Staphylococcus aureus infections, some second thoughts*, *Current opinion in infectious diseases* 30 (2017), pp. 303–308.
- [222] M. Vrieling, K.J. Koymans, D.A.C. Heesterbeek, P.C. Aerts, V.P.M.G. Rutten, C.J.C. de Haas, K.P.M. van Kessel, A.P. Koets, R. Nijland, and J.A.G. van Strijp, *Bovine Staphylococcus aureus Secretes the Leukocidin LukMF' to Kill Migrating Neutrophils Through CCR1*, *mBio* 6 (2015), e00335.
- [223] M. Vrieling, E.M. Boerhout, G.F. van Wigcheren, K.J. Koymans, T.G. Mols-Vorstermans, C.J.C. de Haas, P.C. Aerts, I.J.J.M. Daemen, K.P.M. van Kessel, A.P. Koets, V.P.M.G. Rutten, P.J.M. Nuijten, J.A.G. van Strijp, and L. Benedictus, *LukMF' is the major secreted leukocidin of bovine Staphylococcus aureus and is produced in vivo during bovine mastitis*, *Sci Rep* 6 (2016), p. 520.
- [224] K. Paigen, *A Miracle Enough: the Power of Mice*, *Nature medicine* 1 (1995), pp. 215–220.
- [225] J. Buer and R. Balling, *Mice, Microbes and Models of Infection*, *Nature reviews. Genetics* 4 (2003), pp. 195–205.
- [226] P.J. Haley, *Species Differences in the Structure and Function of the Immune System*, *Toxicology* 188 (2003), pp. 49–71.
- [227] R.L. Perlman, *Mouse Models of Human Disease: an Evolutionary Perspective*, *Evolution, medicine, and public health* 2016 (2016), pp. 170–176.
- [228] N. Rosenthal and S. Brown, *The Mouse Ascending: Perspectives for Human-Disease Models*, *Nature cell biology* 9 (2007), pp. 993–999.
- [229] L. Xiao, Q. Feng, S. Liang, S.B. Sonne, Z. Xia, X. Qiu, X. Li, H. Long, J. Zhang, D. Zhang, C. Liu, Z. Fang, J. Chou, J. Glanville, Q. Hao, D. Kotowska, C. Colding, T.R. Licht, D. Wu, J. Yu, J.J.Y. Sung, Q. Liang, J. Li, H. Jia, Z. Lan, V. Tremaroli, P. Dworzynski, H.B. Nielsen, F. Bäckhed, J. Doré, E. Le Chatelier, S.D. Ehrlich, J.C. Lin, M. Arumugam, J. Wang, L. Madsen, and K. Kristiansen, *A Catalog of the Mouse Gut Metagenome*, *Nature biotechnology* 33 (2015), pp. 1103–1108.
- [230] J. Mestas and C.C.W. Hughes, *Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology*, *The Journal of Immunology* 172 (2004), pp. 2731–2738.
- [231] J. Zschaler, D. Schlorke, and J. Arnhold, *Differences in innate immune response between man and mouse* preprint (2014).

- [232] R. Capparelli, N. Nocerino, C. Medaglia, G. Blaiotta, P. Bonelli, and D. Iannelli, *The Staphylococcus aureus Peptidoglycan Protects Mice Against the Pathogen and Eradicates Experimentally Induced Infection*, PloS one 6 (2011), e28377.
- [233] A.J. McCarthy and J.A. Lindsay, *Genetic Variation in Staphylococcus aureus Surface and Immune Evasion Genes Is Lineage Associated: Implications for Vaccine Design and Host-Pathogen Interactions*, BMC microbiology 10 (2010), p. 173.
- [234] C. Cuny, A. Friedrich, S. Kozytska, F. Layer, U. Nübel, K. Ohlsen, B. Strommenger, B. Walther, L. Wieler, and W. Witte, *Emergence of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Different Animal Species*, International journal of medical microbiology : IJMM 300 (2010), pp. 109–117.
- [235] D.G. Baker, *Natural Pathogens of Laboratory Mice, Rats, and Rabbits and Their Effects on Research*, Clinical microbiology reviews 11 (1998), pp. 231–266.
- [236] D.H. Percy and S.W. Barthold, *Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits*. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA, 2007.
- [237] D.K. Blackmore and R.A. Francis, *The apparent transmission of staphylococci of human origin to laboratory animals*, Journal of Comparative Pathology 80 (1970), pp. 645–651.
- [238] M.C. Clarke, R.J. Taylor, G.A. Hall, and P.W. Jones, *The Occurrence in Mice of Facial and Mandibular Abscesses Associated with Staphylococcus aureus*, Laboratory animals 12 (1978), pp. 121–123.
- [239] T. Bremell, S. Lange, L. Svensson, E. Jennische, K. Gröndahl, H. Carlsten, and A. Tarkowski, *Outbreak of spontaneous staphylococcal arthritis and osteitis in mice*, Arthritis & Rheumatism 33 (1990), pp. 1739–1744.
- [240] V. Duranthon, N. Beaujean, M. Brunner, K.E. Odening, A.N. Santos, I. Kacs Kovics, L. Hiripi, E.J. Weinstein, and Z. Bosze, *On the Emerging Role of Rabbit as Human Disease Model and the Instrumental Role of Novel Transgenic Tools*, Transgenic research 21 (2012), pp. 699–713.
- [241] X. Peng, *Transgenic Rabbit Models for Studying Human Cardiovascular Diseases*, Comparative medicine 62 (2012), pp. 472–479.
- [242] C. Weidenmaier, J.F. Kokai-Kun, E. Kulauzovic, T. Kohler, G. Thumm, H. Stoll, F. Götz, and A. Peschel, *Differential Roles of Sortase-Anchored Surface Proteins and Wall Teichoic Acid in Staphylococcus aureus Nasal Colonization*, International journal of medical microbiology : IJMM 298 (2008), pp. 505–513.
- [243] F. Meurens, A. Summerfield, H. Nauwynck, L. Saif, and V. Gerdt, *The Pig: a Model for Human Infectious Diseases*, Trends in microbiology 20 (2012), pp. 50–57.
- [244] E.A. Hart, M. Caccamo, J.L. Harrow, S.J. Humphray, J.G.R. Gilbert, S. Trevanion, T. Hubbard, J. Rogers, and M.F. Rothschild, *Lessons Learned from the Initial Sequencing of the*

- Pig Genome: Comparative Analysis of an 8 Mb Region of Pig Chromosome 17*, Genome biology 8 (2007), R168.
- [245] M.M. Swindle, A. Makin, A.J. Herron, F.J. Clubb, and K.S. Frazier, *Swine as Models in Biomedical Research and Toxicology Testing*, Veterinary pathology 49 (2012), pp. 344–356.
- [246] K.M. Dyce, *Textbook of veterinary anatomy: Pageburst retail*. Elsevier Saunders, [Place of publication not identified], 2009.
- [247] H. Dawson, *A Comparative Assessment of the Pig, Mouse and Human Genomes*, in: *The Minipig in Biomedical Research*, P.A. McAnulty, ed. CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, 2012, pp. 323–342.
- [248] P. Lan, N. Tonomura, A. Shimizu, S. Wang, and Y.-G. Yang, *Reconstitution of a Functional Human Immune System in Immunodeficient Mice Through Combined Human Fetal Thymus/liver and CD34⁺ Cell Transplantation*, Blood 108 (2006), pp. 487–492.
- [249] J. Knop, F. Hanses, T. Leist, N.M. Archin, S. Buchholz, J. Gläsner, A. Gessner, and A.K. Wege, *Staphylococcus aureus Infection in Humanized Mice: a New Model to Study Pathogenicity Associated with Human Immune Response*, The Journal of infectious diseases 212 (2015), pp. 435–444.
- [250] C.W. Tseng, J.C. Biancotti, B.L. Berg, D. Gate, S.L. Kolar, S. Müller, M.D. Rodriguez, K. Rezai-Zadeh, X. Fan, D.O. Beenhouwer, T. Town, and G.Y. Liu, *Increased Susceptibility of Humanized NSG Mice to Panton-Valentine Leukocidin and Staphylococcus aureus Skin Infection*, PLoS pathogens 11 (2015), e1005292.
- [251] M.A. Brehm, L.D. Shultz, J. Luban, and D.L. Greiner, *Overcoming Current Limitations in Humanized Mouse Research*, The Journal of infectious diseases 208 Suppl 2 (2013), S125-30.
- [252] R. Akkina, A. Allam, A.B. Balazs, J.N. Blankson, J.C. Burnett, S. Casares, J.V. Garcia, K.J. Hasenkrug, F. Kashanchi, S.G. Kitchen, F. Klein, P. Kumar, A.D. Luster, L.Y. Poluektova, M. Rao, B.E. Sanders-Ber, L.D. Shultz, and J.A. Zack, *Improvements and Limitations of Humanized Mouse Models for HIV Research: NIH/NIAID "Meet the Experts" 2015 Workshop Summary*, AIDS research and human retroviruses 32 (2016), pp. 109–119.
- [253] M. Deghorain and L. van Melderen, *The Staphylococci Phages Family: an Overview*, Viruses 4 (2012), pp. 3316–3335.
- [254] G.K. Bar-Gal, S.E. Blum, L. Hadas, R. Ehricht, S. Monecke, and G. Leitner, *Host-specificity of Staphylococcus aureus causing intramammary infections in dairy animals assessed by genotyping and virulence genes*, Veterinary microbiology 176 (2015), pp. 143–154.
- [255] C. von Eiff, A.W. Friedrich, G. Peters, and K. Becker, *Prevalence of Genes Encoding for Members of the Staphylococcal Leukotoxin Family Among Clinical Isolates of Staphylococcus aureus*, Diagnostic microbiology and infectious disease 49 (2004), pp. 157–162.

- [256] A. Fromageau, F.B. Gilbert, G. Prévost, and P. Rainard, *Binding of the Staphylococcus aureus leucotoxin LukM to its leucocyte targets*, *Microbial pathogenesis* 49 (2010), pp. 354–362.
- [257] K. Furuichi, J.-L. Gao, R. Horuk, T. Wada, S. Kaneko, and P.M. Murphy, *Chemokine Receptor CCR1 Regulates Inflammatory Cell Infiltration After Renal Ischemia-Reperfusion Injury*, *The Journal of Immunology* 181 (2008), pp. 8670–8676.
- [258] R.H. Deurenberg and E.E. Stobberingh, *The Evolution of Staphylococcus aureus*, *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 8 (2008), pp. 747–763.
- [259] K.Y.L. Chua, B.P. Howden, J.-H. Jiang, T. Stinear, and A.Y. Peleg, *Population Genetics and the Evolution of Virulence in Staphylococcus aureus*, *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 21 (2014), pp. 554–562.
- [260] W. Xu, K. Tian, X. Li, and S. Zhang, *IL-9 Blockade Attenuates Inflammation in a Murine Model of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Pneumonia* preprint (2020).
- [261] J. Chen, L. Guan, L. Tang, S. Liu, Y. Zhou, C. Chen, Z. He, and L. Xu, *T Helper 9 Cells: a New Player in Immune-Related Diseases*, *DNA and cell biology* 38 (2019), pp. 1040–1047.
- [262] A.R. Teufelberger, B.M. Bröker, D.V. Krysko, C. Bachert, and O. Krysko, *Staphylococcus aureus Orchestrates Type 2 Airway Diseases*, *Trends in molecular medicine* 25 (2019), pp. 696–707.
- [263] A.R. Teufelberger, M. Nordengrün, H. Braun, T. Maes, K. de Grove, G. Holtappels, C. O'Brien, S. Provoost, H. Hammad, A. Gonçalves, R. Beyaert, W. Declercq, P. Vandenabeele, D.V. Krysko, B.M. Bröker, C. Bachert, and O. Krysko, *The IL-33/ST2 Axis Is Crucial in Type 2 Airway Responses Induced by Staphylococcus aureus-Derived Serine Protease-Like Protein D*, *The Journal of allergy and clinical immunology* 141 (2018), 549-559.e7.
- [264] S. Stentzel, A. Teufelberger, M. Nordengrün, J. Kolata, F. Schmidt, K. van Crombruggen, S. Michalik, J. Kumpfmüller, S. Tischer, T. Schweder, M. Hecker, S. Engelmann, U. Völker, O. Krysko, C. Bachert, and B.M. Bröker, *Staphylococcal Serine Protease-Like Proteins Are Pacemakers of Allergic Airway Reactions to Staphylococcus aureus*, *The Journal of allergy and clinical immunology* 139 (2017), 492-500.e8.
- [265] A. Dommaschk, L.F. Lang, R. Maus, J. Stolper, T. Welte, and U.A. Maus, *Colonization-Induced Protection Against Invasive Pneumococcal Disease in Mice Is Independent of CD103 Driven Adaptive Immune Responses*, *European journal of immunology* 48 (2018), pp. 965–974.

- [266] A. Dommaschk, N. Ding, M. Tort Tarres, L.F. Bittersohl, R. Maus, J. Stolper, D. Jonigk, P. Braubach, T. Lippmann, T. Welte, and U.A. Maus, *Nasopharyngeal Colonization with Streptococcus pneumoniae Triggers Dendritic Cell Dependent Antibody Responses Against Invasive Disease in Mice*, *European journal of immunology* 47 (2017), pp. 540–551.
- [267] S.E. Satorres, L.E. Alcaráz, E. Cargnelutti, and M.S. Di Genaro, *IFN-Gamma Plays a Detrimental Role in Murine Defense Against Nasal Colonization of Staphylococcus aureus*, *Immunology letters* 123 (2009), pp. 185–188.
- [268] J.G. Barin, M.V. Talor, J.A. Schaub, N.L. Diny, X. Hou, M. Hoyer, N.K. Archer, E.S. Gebremariam, M.F. Davis, L.S. Miller, N.R. Rose, and D. Čiháková, *Collaborative Interferon- γ and Interleukin-17 Signaling Protects the Oral Mucosa from Staphylococcus aureus*, *The American journal of pathology* 186 (2016), pp. 2337–2352.
- [269] S. Simpson, J. Kaislasuo, S. Guller, and L. Pal, *Thermal Stability of Cytokines: a Review*, *Cytokine* 125 (2019), p. 154829.
- [270] K. Skogstrand, C.K. Ekelund, P. Thorsen, I. Vogel, B. Jacobsson, B. Nørgaard-Pedersen, and D.M. Hougaard, *Effects of Blood Sample Handling Procedures on Measurable Inflammatory Markers in Plasma, Serum and Dried Blood Spot Samples*, *Journal of immunological methods* 336 (2008), pp. 78–84.
- [271] John F. Kokai-Kun, Scott M. Walsh, Tanya Chanturiya, and James J. Mond, *Lysostaphin Cream Eradicates Staphylococcus aureus Nasal Colonization in a Cotton Rat Model*, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47 (2003), pp. 1589–1597.

Kapitel 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Übersicht über die verschiedenen Gruppen von <i>Innate Lymphoid Cells</i> (ILCs).....	2
Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Seren & Bakterienstämme	24
Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Primer	25
Tabelle 2.3: Für ELISA verwendete Antikörper	25
Tabelle 2.4: Für die durchflusszytometrischen Analysen verwendete Antikörper	25
Tabelle 3.1: Parameter zur Beurteilung der Schwere der Infektion (adaptiert nach AG Ohlsen, Würzburg)	35
Tabelle 3.2: Übersicht über die verwendete Verdünnungsstufen	36
Tabelle 3.3: Übersicht über die verwendeten Antikörper zum Nachweis intrazellulärer Zytokine.	40
Tabelle 3.4: Präparation des Standards zur Erstellung der Eichgraden zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	41
Tabelle 4.1: Übersicht über Genotyp, Virulenzgene und Phagenmuster der ausgewählten maus-adaptierten <i>S. aureus</i> -Stämme	44
Tabelle 4.2: Vergleich der Konservierung von Proteinprodukten ausgewählter <i>open reading frames</i> in den Genomen von <i>S. aureus</i> DIP, JSNZ, muCC88d und muCC8c mit Newman.....	57
Tabelle 7.1 Übersicht Chemokine	93

Kapitel 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Besiedlung mit <i>S. aureus</i> sowie der Beseitigung von <i>S. aureus</i> durch das Immunsystem (modifiziert nach Mulcahy <i>et al.</i> , 2016)	11
Abbildung 3.1: Schema des Versuchsaufbaus der Besiedlung.....	34
Abbildung 4.1: Auswahl geeigneter mausadaptierter <i>S. aureus</i> -Stämmen für murine Infektionsversuche.....	45
Abbildung 4.2 Murine <i>S. aureus</i> -Isolate unterscheiden sich bezüglich ihrer Virulenz im murinen Pneumoniemodell.....	47
Abbildung 4.3: Murine <i>S. aureus</i> -Isolate unterscheiden sich bezüglich ihrer Virulenz im murinen Bakteriämiemodell.....	49
Abbildung 4.4: Das murine <i>S. aureus</i> -Isolat DIP induziert trotz reduzierter Infektionsdosis kaum Unterschiede in der Überlebensrate sowie der bakteriellen Last im Vergleich zum humanen <i>S. aureus</i> -Isolat Newman im murinen Pneumoniemodell.....	51
Abbildung 4.5: Das murine <i>S. aureus</i> Isolat DIP induziert trotz 10-fach reduzierter Infektionsdosis ein vergleichbares Zytokin- und Chemokinprofil wie das humane Isolat <i>S. aureus</i> Newman im murinen Pneumoniemodell	52
Abbildung 4.6: Das murine <i>S. aureus</i> -Isolat DIP induziert trotz 10-fach reduzierter Infektionsdosis kaum Unterschiede in der Überlebensrate sowie der bakteriellen Last im Vergleich zum humanen <i>S. aureus</i> -Isolat Newman im murinen Bakteriämiemodell.....	54
Abbildung 4.7: Das murine <i>S. aureus</i> Isolat DIP und das humane Isolat Newman induzieren vergleichbare Zytokin- und Chemokinkonzentrationen im murinen Bakteriämiemodell.	55
Abbildung 4.8: Die Nucleotidinsertion in <i>S. aureus</i> DIP hat keinen Einfluss auf dessen Hla-Expression.	58
Abbildung 4.9: Murine <i>S. aureus</i> -Isolate können Mäuse länger besiedeln als das humane Isolat Newman.	60
Abbildung 4.10: Der murine Stamm <i>S. aureus</i> DIP ist nach 24 Stunden auch in den Lungen besiedelter Tiere nachweisbar.....	61
Abbildung 4.11: Nur CD4 ⁺ -T-Zellen in den zervikalen Lymphknoten von <i>S. aureus</i> DIP besiedelten Mäusen produzieren nach 7 Tagen IL-17A/F sowie IL-22.	63
Abbildung 4.12: $\gamma\delta$ -T-Zellen in den zervikalen Lymphknoten von <i>S. aureus</i> DIP-besiedelten Mäusen produzieren nach 7 Tagen vor allem IL-17A.....	64
Abbildung 4.13: <i>Innate lymphoid cells</i> in den zervikalen Lymphknoten zeigen nach <i>intranasaler</i> Besiedlung mit <i>S. aureus</i> keine Zytokinproduktion.....	66

Abbildung 4.14: 7 Tage nach <i>intranasaler</i> Besiedlung mit <i>S. aureus</i> konnte keine Änderung der IgA-Level im Stuhl der Mäuse nachgewiesen werden.....	67
Abbildung 7.1: Vergleich der Zytokin- und Chemokinkonzentrationen im Lungenhomogenat von Mäusen nach Infektion mit <i>S. aureus</i> DIP in unterschiedlichen Infektionsdosen bzw. dem humanen Isolat Newman im Pneumoniemodell.....	88
Abbildung 7.2: Vergleich der Zytokin- und Chemokinkonzentrationen im Nierenhomogenat von Mäusen mit unterschiedlicher Infektionsdosen von <i>S. aureus</i> DIP mit dem humanen Isolat Newman im Bakteriämiemodell.....	89
Abbildung 7.3 Gatingstrategie für die Analyse der Immunzellpopulationen in den zervikalen Lymphknoten nach <i>S. aureus</i> -Besiedlung.....	90
Abbildung 7.4: Vergleich der Zytokinkonzentrationen im Nasenhomogenat von <i>S. aureus</i> -besiedelten Mäusen.....	91
Abbildung 7.5: Vergleich der Chemokinkonzentrationen im Nasenhomogenat von <i>S. aureus</i> -besiedelten Mäusen.....	92
Abbildung 7.6: Vergleich der <i>in vivo</i> verwendeten <i>S. aureus</i> -Isolate hinsichtlich ihres Koagulations- und Replikationsverhaltens.....	93
Abbildung 7.7 Bestätigung der erfolgreichen Phagentransduktion zur Herstellung einer Protein A-Mutante von <i>S. aureus</i> DIP.....	94

Kapitel 11 Publikationen

Trübe, P., Hertlein, T., Mrochen, D.M., Schulz, D., Jorde, I., Krause, B., Zeun, J., Fischer, S., Wolf, S.A., Walther, B., Semmler, T., Bröker, B.M., Ulrich, R.G., Ohlsen, K., Holtfreter, S., (2018). Bringing together what belongs together: Optimizing murine infection models by using mouse-adapted *Staphylococcus aureus* strains. International journal of medical microbiology: IJMM.

Mrochen, D.M., Grumann, D., Schulz, D., Gumz, J., **Trübe, P.**, Pritchett-Corning, K., Johnson, S., Nicklas, W., Kirsch, P., Martelet, K., van den Brandt, J., Berg, S., Bröker, B.M., Wiles, S., Holtfreter, S., (2018). Global spread of mouse-adapted *Staphylococcus aureus* lineages CC1, CC15, and CC88 among mouse breeding facilities. International journal of medical microbiology: IJMM 308 (6), 598–606.

Mrochen, D.M., Schulz, D., Fischer, S., Jeske, K., El Gohary, H., Reil, D., Imholt, C., **Trübe, P.**, Suchomel, J., Tricaud, E., Jacob, J., Heroldová, M., Bröker, B.M., Strommenger, B., Walther, B., Ulrich, R.G., Holtfreter, S., (2018). Wild rodents and shrews are natural hosts of *Staphylococcus aureus*. International journal of medical microbiology: IJMM 308 (6), 590–597.

Schulz, D., Grumann, D., **Trübe, P.**, Pritchett-Corning, K., Johnson, S., Reppschläger, K., Gumz, J., Sundaramoorthy, N., Michalik, S., Berg, S., van den Brandt, J., Fister, R., Monecke, S., Uy, B., Schmidt, F., Bröker, B.M., Wiles, S., Holtfreter, S., (2017). Laboratory Mice Are Frequently Colonized with *Staphylococcus aureus* and Mount a Systemic Immune Response-Note of Caution for In vivo Infection Experiments. Frontiers in cellular and infection microbiology 7, 152.

Holtfreter, S., Grumann, D., Balau, V., Barwich, A., Kolata, J., Goehler, A., Weiss, S., Holtfreter, B., Bauerfeind, S.S., Döring, P., Friebe, E., Haasler, N., Henselin, K., Kühn, K., Nowotny, S., Radke, D., Schulz, K., Schulz, S.R., **Trübe, P.**, Vu, C.H., Walther, B., Westphal, S., Cuny, C., Witte, W., Völzke, H., Grabe, H.J., Kocher, T., Steinmetz, I., Bröker, B.M., (2016). Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* in the General Population in Northeast Germany: Results of the Study of Health in Pomerania (SHIP-TREND-0). Journal of clinical microbiology 54 (11), 2774–2785.

Paßvogel, L., **Trübe, P.**, Schuster, F., Klupp, B.G., Mettenleiter, T.C., (2013). Mapping of sequences in Pseudorabies virus pUL34 that are required for formation and function of the nuclear egress complex. Journal of virology 87 (8), 4475–4485.

Kapitel 12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

Als erstes möchte ich mich bei Frau Prof. Bröker bedanken, die mit ihren spannenden Vorlesungen mein Interesse an der Immunologie geweckt hat und es mir ermöglichte, nach meiner Masterarbeit auch meine Promotion am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin anzufertigen.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Dr. Silva Holtfreter für die anregenden Gespräch und hilfreichen Ratschläge sowie die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Bei dem Graduiertenkolleg 1870 „Bakterielle Atemwegsinfektionen – allgemeine und spezifische Mechanismen der Pathogenadaptation und Immunabwehr“ möchte ich mich für die Finanzierung der ersten drei Jahre meiner Promotion und der Tierversuche bedanken.

Ein großer Dank geht an Dr. Tobias Hertlein und Dr. Knut Ohlsen, die mich so herzlich in Würzburg aufgenommen haben und mich bei der Durchführung meiner ersten Pneumonie- und Bakteriämieexperimente unterstützt haben.

Für die Sequenzierung der *S. aureus*-Isolate möchte ich mich bei Birgit Walther und Torsten Semmler bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich Ilka Jorde und Daniel Mrochen für die gemeinsame Realisierung der *in-vivo*-Experimente in Greifswald bedanken. Dank eurer positiven Art waren auch die Organentnahmen und die ewig langen Abende am FACS leicht zu bewältigen. Ohne eure Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Dankeschön!

Bei Susanne Neumeister, Sabine Prettin, Erika Friebe und Fawaz Al Sholui bedanke ich mich herzlich für die Unterstützung im Labor und mit den Mäusen, bei den Vorbereitungen der Read-Outs und die Durchführung der zahlreichen PCRs.

Bei Bettina Krüger und Julia Zeun möchte ich mich für die Unterstützung bei der Aufarbeitung der Organe bedanken.

Zudem möchte ich mich auch bei meinen Mitstreitern Maria Nordengrün, Nicole Normann und Jörn Steinke bedanken. Vielen Dank für die gemeinsame Zeit im Labor, aber auch nach Feierabend auf der Couch, beim Griechen oder beim Sport. Ihr habt mir die Zeit in Greifswald verschönert. Danke!

Ein herzlicher Dank geht an alle anderen Mitarbeiter der Immunologie für die tolle Arbeitsatmosphäre. Die gemeinsame Arbeit im Labor und die vielen wissenschaftlichen

Diskussionen haben wesentlich zur Anfertigung dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank für die gemeinsame Zeit und eure Unterstützung.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich in dieser nicht immer einfachen Zeit unterstützt und immer wieder motiviert haben. Danke für euer Verständnis, eure Geduld und vor allem eure Liebe.