Die adaptive Immunantwort gegen *Staphylococcus aureus*

–

zwischen Protektion und Allergie

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

vorgelegt von
Sebastian Stentzel
geboren am 29.10.1983
in Quedlinburg

Greifswald, 29.06.2015

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Klaus Fesser

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

2. Gutachter: Prof. Dr. Carsten Schmidt-Weber

Tag der Promotion: 29.10.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis		**VII**
1	**Einleitung**	**1**
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Das angeborene Immunsystem	1
1.1.2	Das adaptive Immunsystem	3
1.1.2.1	Aktivierung der T-Zellen – Weichenstellung für die Qualität der Immunantwort	3
1.1.2.2	Antikörperproduktion durch B-Zellen	6
1.1.2.3	Antikörperklassen	7
1.2	*Staphylococcus aureus*	9
1.2.1	Ein facettenreiches Bakterium	10
1.2.2	Wechselwirkung zwischen *S. aureus* und dem Menschen	12
1.2.2.1	Immunevasion durch *S. aureus*-Proteine	12
1.2.2.2	Eisenmangel – Ein ubiquitärer Stressor *in vivo*	16
1.2.3	Erkrankungen, bei denen *S. aureus* eine Rolle spielt	17
1.2.3.1	Atopische Dermatitis	17
1.2.3.2	Psoriasis	17
1.2.3.3	Zystische Fibrose	18
1.2.3.4	Hyper-IgE-Syndrom	18
1.2.3.5	Nasenpolypen und Asthma	19
1.2.3.6	Bakteriämie und Sepsis	21
1.3	Ziele der Arbeit	23
2	**Material**	**25**
2.1	Laborgeräte	25
2.2	Verbrauchsmaterialien	27
2.3	Chemikalien und Reagenzien	29
2.4	Antikörper und Sekundärreagenzien	33
2.5	Medien, Puffer und Lösungen	33
2.6	Kits	38

2.7	Bakterienstämme und Phagen	39
2.8	Humanblut und -seren	39
2.9	Plasmide	41
2.10	Rekombinante Proteine	42
2.11	Primer	42
2.12	Programme und Datenbanken	43
3	**Methoden**	**45**
3.1	Mikrobiologische Methoden	45
3.1.1	Isolation von *S. aureus* aus dem Nasenvorhof	45
3.1.2	Anzucht von *S. aureus* auf Blutagarplatten	45
3.1.3	Anzucht von *S. aureus* in Flüssigmedien	45
3.1.4	Koagulationstest	45
3.1.5	Anlegen von Glycerolstocks	46
3.1.6	Isolierung genomischer DNA	46
3.1.7	DNA-Konzentrationsbestimmung	47
3.1.8	Gewinnung von Bakterienüberständen	47
3.1.9	Gewinnung von Bakterienzellen und Abtöten durch UV-Licht	47
3.2	Proteinbiochemische Methoden	48
3.2.1	Präparation extrazellulärer *S. aureus*-Proteine aus dem Kulturüberstand	48
3.2.2	Proteinbestimmung nach Bradford	48
3.2.3	Eindimensionale Gelelektrophorese	49
3.2.4	Zweidimensionale Gelelektrophorese	49
3.2.4.1	Isoelektrische Fokussierung	49
3.2.4.2	Auftrennung nach molekularer Masse	52
3.2.5	Zweidimensionaler Western Blot	52
3.2.6	Proteinfärbung mit Coomassie	53
3.2.7	Proteinfärbung mit Flamingo	53
3.2.8	Ausschneiden von Proteinspots aus 2D-Gelen	53
3.2.9	Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie	54
3.2.10	Auswertung von Antikörperbindungen in 2D-Western Blots mit Delta2D	54

3.2.11	Gel-freie Proteomanalyse	55
3.2.12	ELISA	55
3.2.13	Simple Western Assay	57
3.2.14	Flexmap3D Assay	59
3.3	Molekularbiologische Methoden	60
3.3.1	Nachweis und Amplifikation von *S. aureus*-Genen mittels PCR	60
3.3.1.1	Agarose-Gelelektrophorese	60
3.3.1.2	Nachweis des ProteinA-Gens und des Erythromycin-resistenz-Gens	60
3.3.1.3	Amplifikation von Genen mittels PCR	61
3.3.1.4	Kolonie-PCR	62
3.3.1.5	Aufreinigung von PCR-Produkten	63
3.3.2	Erstellung eines *protein A*-negativen *S. aureus* (USA300Δ*spa*)	63
3.3.3	Herstellung rekombinanter *S. aureus*-Proteine	64
3.3.3.1	Plasmidisolation	64
3.3.3.2	Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli*	65
3.3.3.3	Überexpression rekombinanter Proteine in *B. subtilis*	67
3.3.4	LPS-Depletion und -Bestimmung	70
3.4	Zellbiologische Methoden	71
3.4.1	Isolation humaner PBMCs	71
3.4.2	Lebendzellzahlbestimmung	71
3.4.3	PBMC-Proliferationsassay	71
3.4.4	Stimulation von T-Zelllinien mit *S. aureus*-Proteinen	72
3.4.5	Zytokinbestimmung mittels CBA	73
3.5	Statistik	74
4	**Ergebnisse**	**75**
4.1	Vorarbeiten für die Untersuchung der Immunantwort gegen *S. aureus*	75
4.1.1	Etablierung des Simple Western Assays für die Quantifizierung *S. aureus*-spezifischer Antikörper in humanen Seren	75
4.1.2	Eisenlimitation – Optimierung des *S. aureus*-Proteoms für Antikörperstudien	79
4.2	Die Immunantwort gegen *S. aureus* – Schutz durch Antikörper?	88

4.2.1 Die Menge an *S. aureus*-spezifischem IgG zu Beginn einer *S. aureus*-Bakteriämie korreliert mit dem Verlauf der Erkrankung 88

4.2.2 Weitere Hinweise auf die mögliche protektive Rolle von *S. aureus*-spezifischem IgG 95

4.2.2.1 *S. aureus*-Träger und Nicht-Träger besitzen unterschiedliche Mengen an *S. aureus*-spezifischem IgG 95

4.2.2.2 Patienten mit zystischer Fibrose entwickeln eine starke humorale Immunantwort gegen *S. aureus* 97

4.2.2.3 Patienten mit Hyper-IgE-Syndrom profitieren von der Substitution mit *S. aureus*-spezifischem IgG 98

4.3 Modulation der Immunantwort durch *S. aureus* 101

4.3.1 *S. aureus*-Serinproteasen zeigen Auffälligkeiten bei der IgG4-Bindung 101

4.3.2 Die humorale Immunantwort auf *S. aureus*-Serinproteasen ist in Richtung Th2/Treg verschoben 105

4.3.3 *S. aureus*-Serinproteasen-spezifische T-Zellen zeigen ein Th2/Treg-Zytokinprofil 108

4.3.4 An *S. aureus*-Serinproteasen findet IgE-Bindung statt 111

5 Diskussion 113

5.1 Anpassung der Simple Western Assays an komplexe Proben 113

5.2 Effekte von Eisenlimitation auf das Immunom von *S. aureus* 114

5.2.1 Induktion der Eisenlimitation *in vitro* 115

5.2.2 Vermehrte Antikörperbindung an *S. aureus*-Proteine nach Eisenlimitation 115

5.2.3 Veränderungen der Zusammensetzung des *S. aureus*-Proteoms nach Eisenlimitation 118

5.2.4 Neue Informationen über das *S. aureus*-Immunom durch Eisenlimitation 121

5.3 Die Rolle von Antikörpern bei der Abwehr von *S. aureus*-Infektionen 121

5.3.1 *S. aureus*-spezifisches IgG – Ein Marker für die Protektion vor schweren Infektionsverläufen? 122

5.3.2 Die IgG-Bindung an acht *S. aureus*-Proteine unterscheidet Sepsis von nicht-Sepsis Patienten 125

5.3.3 Protektive Wirkung von *S. aureus*-spezifischem IgG beim Menschen 129

5.3.4 Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen auf bisherige und zukünftige Vakzinestrategien 132

5.4 Modulation der Immunantwort – Kann *S. aureus* Allergien induzieren? 136

5.4.1 Die Besonderheiten der IgG4-Bindung an *S. aureus*-Proteine 137

5.4.2 *S. aureus*-Serinproteasen sind die dominanten IgG4-bindenden Proteine 137

5.4.3 Spl-spezifische T-Zellen sezernieren Th2- und Treg-Zytokine 139

5.4.4 Spl-spezifisches IgE 140

5.4.5 Allergene von *S. aureus* – Schlussfolgerungen und Ausblick 141

6 Zusammenfassung 143

7 Literaturverzeichnis 149

8 Anhang 169

8.1 Anhang Abbildungen 169

8.2 Anhang Tabellen 183

Eigenständigkeitserklärung 199

Lebenslauf 201

Publikationsliste 203

Danksagung 207

Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensional
Abb.	Abbildung
agr	*Accessory gene* Regulator
AMP	Antimikrobielle Peptide
APC	Antigen-präsentierenden Zelle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aq. (*bi*)*dest.*	(zweifach) Destilliertes Wasser
AU	*Arbitrary units*
AUC	Fläche unter der Kurve
BcR	B-Zellrezeptor
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CA-MRSA	*Community-acquired* Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*
CFTR	*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*
CFU	Koloniebildende Einheiten
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
cpm	*Counts per minute*
CR	Komplementrezeptor
CV	Variationskoeffizient
cv	Säulenvolumen
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DOCK8	*Dedicator of cytokinesis* 8
DTT	Dithiothreitol
ec	Extrazelluläre Proteine
EDDA	2,2′-Bipyridyl und N,N'-Ethylendiglycin
ELISA	*Enzyme linked immunosorbent assay*
Fab	*Fragment of antigen binding*

Fc	*Constant fragment*
FCS	Fetales Kälberserum
FcγR	Fc-γ-Rezeptor
Fur	*Ferric-uptake regulator*
g	Mittlere Erdbeschleunigung
GATA	Transkriptionsfaktor GATA
Gy	Gray
HA-MRSA	*Hospital-acquired* Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*
HPLC	*High-performance liquid chromatography*
i. p.	*Intraperitoneal*
IAA	Iodacetamid
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IFN-γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPG	Immobilisierte pH-Gradienten
Isd	*Iron surface determinant*
IU	*International units*
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MAMP	*Microbe-associated molecular pattern*
MHC	*Major histocompatibility complex*
Mio	Million
MOWSE	*Molecular weight search*
mRNA	*Messenger* Ribonukleinsäure
MRSA	Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*
MS	Massenspektrometrie
MSCRAMM	*Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLR	*Nod-like* Rezeptoren
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	*Phosphate buffered saline*
PCA	*Principal component analysis*
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
PLS	*Partial least squares analysis*
PRR	Mustererkennungsrezeptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RHB	Rehydratisierungspuffer
RH-Lösung	Rehydratisierungslösung
rpm	Umdrehungen pro Minute
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
SAg	*S. aureus*-Superantigen
SDS	Natriumdodecyl-Sulfatpolyacrylamid
SE	Staphylokokken-Enterotoxin
SEl	Staphylokokken-Enterotoxin-ähnliches Toxin
Spls	*S. aureus serine protease-like proteins*
Ssl	Staphylokokken Superantigen-ähnliches Protein
stat	Stationäre Wachstumsphase
STAT	*Signal transducer and activator of transcription*
T-bet	Transkriptionsfaktor T-bet
TBS	*Tris buffered saline*
TCA	Trichloressigsäure
TcR	T-Zellrezeptor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFF	Tangentialflussfiltration
Th	T-Helferzelle
TLR	*Toll-like* Rezeptor
TSB	*Tryptone soya broth*
TSST	*Toxic shock syndrome toxin*

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Der menschliche Körper wird im Laufe seiner Existenz mit einer Vielzahl von Pathogenen konfrontiert. Darunter befinden sich vielzellige Organismen, die häufig parasitär in Erscheinung treten, einzellige Organismen, zu denen das große Reich der Bakterien gehört, aber auch Partikel wie Viren, die nicht zu den lebenden Organismen gezählt werden. Der Körper ist diesen Pathogenen jedoch nicht schutzlos ausgeliefert, sondern besitzt mit dem Immunsystem eine wirkungsvolle Abwehrstrategie. Bei der Abwehr des invasiven Pathogens bildet sich eine Immunantwort gegen das Pathogen aus. Diese ist das Resultat einer komplexen Interaktion des Immunsystems mit dem Pathogen und seinen Produkten [1].
In dieser Arbeit sollte die Immunantwort auf *Staphylococcus* (*S.*) *aureus* qualitativ und quantitativ untersucht werden. Zum besseren Verständnis wird daher in den folgenden Abschnitten zuerst eine Einführung in das Immunsystem gegeben. Später folgt dann die Beschreibung von *S. aureus*, seiner Bedeutung als Pathogen und der Interaktion des Mikroorganismus mit dem Immunsystem.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Der menschliche Körper wird nach außen durch Haut und Schleimhäute abgegrenzt. Sie stellen die erste Barriere für pathogene Organismen dar, die diese durchdringen müssen [1]. Dies wird erschwert indem durch mehrere Schichten von Hornzellen, leicht saurem pH-Wert und Lipide eine physische und chemische Barriere aufgebaut wird. Zusätzlich werden durch Keratinozyten und Epithelzellen antimikrobielle Peptide (AMPs) synthetisiert. Diese AMPs werden zum angeborenen Immunsystem gezählt und bestehen aus etwa 29 bis 44 Aminosäuren [2-4]. Sie wirken gegen ganz unterschiedliche Pathogene, wie Bakterien, Viren und Pilze. Dabei können sie die Zielzelle durch Porenbildung lysieren, oder sie interagieren mit der DNA im Inneren der Zelle und schalten so deren Proteinsynthese ab [5]. Wird die erste Barriere jedoch überwunden, können sich Pathogene im Körper verbreiten. Invasive Pathogene werden vom Immunsystem erkannt und in der Regel erfolgreich abgewehrt. Dabei spielt vor allem das angeborene Immunsystem eine Rolle. Zellen dieses Teils des Immunsystems sitzen direkt in den

Hautschichten und erkennen die eingedrungenen Pathogene, aber auch alle anderen körperfremden Stoffe, sofort [6].

Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems zählen dendritische Zellen (DCs), Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Monozyten gehören auch zu den Zellen des angeborenen Immunsystems, befinden sich aber als Vorläuferzellen der Makrophagen nur im Blutkreislauf und nicht im Gewebe [1]. Die Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen Mikroorganismen anhand konservierter Strukturen, den *microbe-associated molecular patterns* (MAMPs), mit Hilfe ihrer Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) [7, 8]. Diese haben sich im Laufe der Koevolution des Immunsystems mit den Mikroorganismen herausgebildet, so dass sie für die Mikroben essentielle, nicht veränderbare Strukturen binden. Zu den PRRs gehören z. B. die *toll-like* Rezeptoren (TLRs) und *nod-like* Rezeptoren (NLRs) [7, 9, 10]. Mit Hilfe von TLR2 und TLR6 kann z. B. die für Gram-positive Bakterien, wie *S. aureus*, essentielle Lipoteichonsäuren erkannt werden [4, 11]. TLR4 dagegen ist wichtig für die Bindung von LPS, welches von Gram-negativen Bakterien synthetisiert wird [12]. Durch die Bindung der PRRs an ihre Liganden werden Signalkaskaden in den Rezeptor-tragenden Zellen aktiviert, wodurch, neben zellulären Reifungsprozessen, vor allem Phagozytose der Pathogene und Synthese von Zytokinen ausgelöst wird [9, 10, 13]. Diese Botenstoffe werden in die Umgebung freigesetzt und koordinieren die weitere Immunantwort. Dadurch wird ihre Qualität bestimmt und die Immunantwort reguliert. Durch eine Gruppe von Zytokinen, den sognannten Chemokinen, werden weitere Immunzellen zum Ort der Entzündung rekrutiert und unterstützen die Beseitigung der Pathogene [1].

Neben der möglichst schnellen Abwehr von Pathogenen gehört die Aktivierung des adaptiven Immunsystems zu den Aufgaben des angeborenen Immunsystems. Hierfür sind vor allem DCs und Makrophagen, die sogenannten professionell Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), wichtig [1]. Binden Pathogene an PRRs, nehmen die APCs diese auf, prozessieren sie und präsentieren Peptidbruchstücke auf MHC- (*major histocompatibility complex*-) Molekülen auf ihrer Oberfläche. Hieran können nun Zellen des adaptiven Immunsystems binden und ihrerseits durch Zell-Zell-Kontakt, Zytokinsignale und weitere kostimulatorische Signale aktiviert werden [14].

Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle noch erwähnt, dass auch B-Zellen, die zum adaptiven Immunsystem gehören, zu den APCs gezählt werden [1]. Sie werden in einem späteren Abschnitt beschrieben.

Neben den zellulären Bestandteilen besitzt das angeborene Immunsystem auch eine humorale Komponente: das Komplementsystem. Dieses System setzt sich aus Komplementfaktoren (zum Großteil Proteasen) zusammen, die sich in einer Kaskadenreaktion nacheinander spalten und so aktivieren [1]. Zu den Komplementfaktoren zählen über 30 Proteine. Am Ende der Kaskade steht der Membran-Attacke-Komplex (Polymere aus den Proteinen C5b bis C9). Dieser Komplex bildet Poren in der Zielzelle, so dass diese lysiert wird. Außerdem verbleiben einige Spaltprodukte der Komplementfaktoren, die während der Kaskade entstehen, auf der Zielzelle und dienen als Opsonisierungsfaktoren (C3b, C4b) [1, 15]. Zellen, die entsprechende Komplementrezeptoren (CR1 bis 4) tragen, phagozytieren die opsonisierte Zelle effektiver. Andere Spaltprodukte der Komplementfaktoren werden in die Umgebung freigelassen (C3a, C5a) und wirken, ähnlich wie die Chemokine, als Chemoattraktant und rekrutieren weitere Zellen zum Ort der mikrobiellen Invasion und fördern dadurch die Entzündung. Deshalb werden sie auch Anaphylatoxine genannt [15].

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem erkennt das adaptive Immunstem neben den konservierten Strukturen von Pathogenen vor allem deren variable Strukturen. In Folge der Aktivierung des adaptiven Immunsystems bildet es ein Immungedächtnis aus, wodurch bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Pathogen dieses schneller beseitigt werden kann und die Infektion häufig symptomlos verläuft [1]. Das adaptive Immunsystem besteht aus zellulären und humoralen Bestandteilen. Zu den zellulären Bestandteilen werden B-, T-Zellen und NKT-Zellen (natürliche killer-T-Zellen) gezählt. Antikörper (Immunglobuline, Ig) bilden die humorale Komponente [1].

1.1.2.1 Aktivierung der T-Zellen – Weichenstellung für die Qualität der Immunantwort

Bei der Aktivierung des adaptiven Immungedächtnisses spielen die APCs des angeborenen Immunsystems eine entscheidende Rolle. Sie präsentieren Peptidbruchstücke der prozessierten

Pathogene und deren Produkte auf MHC I- und MHC II-Molekülen und können so naive $CD8^+$ bzw. $CD4^+$ T-Zellen aktivieren [16]. Die T-Zellrezeptoren (TcR) jeder T-Zelle binden nur eine spezifische Kombination aus MHC/Peptid-Komplex [17]. Sie sind antigenspezifisch. Nach der Aktivierung der T-Zelle proliferiert diese und bildet Klone, die wiederum nur diese eine Spezifität besitzen (klonale Expansion) [1]. Dass das adaptive Immunsystem ein breites Spektrum an MHC-Peptid-Komplexen erkennen kann wird dadurch gewährleistet, dass durch somatische Rekombination der TcR-Gene theoretisch mehr als 10^{18} verschiedenen TcR-Spezifitäten entstehen können. Davon kommen nach Schätzungen mindestens $2{,}4 \times 10^7$ im peripheren T-Zellpool vor [18-21].
Bei der Aktivierung von naiven T-Zellen sind drei Signale entscheidend (Abb. 1.1):

1. Durch Bindung des TcR an den MHC/Peptid-Komplex bekommt die T-Zelle ein Aktivierungssignal [14].
2. Kostimulationssignale über Bindung von CD80/86 auf APC-Seite und CD28 auf T-Zell-Seite sind für die vollständige Aktivierung der T-Zelle essentiell, ansonsten verfällt sie in Anergie [22].
3. Für die Differenzierung der T-Zelle in verschiedene Effektorzellen, und damit für die Qualität der folgenden Immunantwort, ist das umgebende Zytokinmilieu entscheidend [14, 23]. So favorisiert Interleukin- (IL-) 12 die Differenzierung der aktivierten $CD4^+$ T-Zelle zu einer T-Helferzelle vom Typ 1 (Th1), die Interferon γ (IFN-γ) sezernieren kann. IL-4 dagegen begünstigt die Differenzierung zur Th2-Zelle, welche dann selbst auch IL-4 sezernieren kann [24].

Die Differenzierung der T-Helferzellen wird durch die Induktion von Transkriptionsfaktoren gesteuert. Im Fall von Th1-Zellen werden die Transkriptionsfaktoren T-bet und STAT4 induziert. Dagegen werden bei Th2-Zellen STAT6 und GATA3 induziert [25]. Th1-Zellen führen zu einer pro-inflammatorischen Immunantwort. Th2-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der sogenannten Typ 2 Immunantwort, indem sie die Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 sezernieren [26]. Dadurch kommt es zur Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in das entzündete Gewebe und der Klassenwechsel zu IgE-Antikörpern wird initiiert (siehe auch 1.1.2.3) [1]. Typ 2 Immunantworten sind die für der Abwehr von Parasiten nötig. Jedoch kann

eine solche Immunantwort auch zu allergischen Erkrankungen führen, wenn sie sich gegen Umweltantigene richtet, und z. B. Asthma auslösen [1, 26]. Neben dieser klassischen Einteilung der T-Helferzellen in Th1 und Th2 wurden in den letzten Jahren noch weitere T-Helferzellen definiert [1]. An dieser Stelle sei auf Th17-Zellen hingewiesen, die vor allem bei der Abwehr von extrazellulären Bakterien, wie *S. aureus*, eine große Rolle spielen [27]. Die Differenzierung zu Th17-Zellen wird durch die Zytokine IL-6 und IL-23 gesteuert, die den Transkriptionsfaktor STAT3 induzieren [28, 29]. Th17-Zellen haben ihre Bezeichnung erhalten, da sie IL-17 sezernieren können. Durch IL-17 werden neutrophile Granulozyten zum Ort der Entzündung rekrutiert. Ihnen wird ebenso eine wichtige Rolle bei der Abwehr von *S. aureus* zugeschrieben [30, 31].

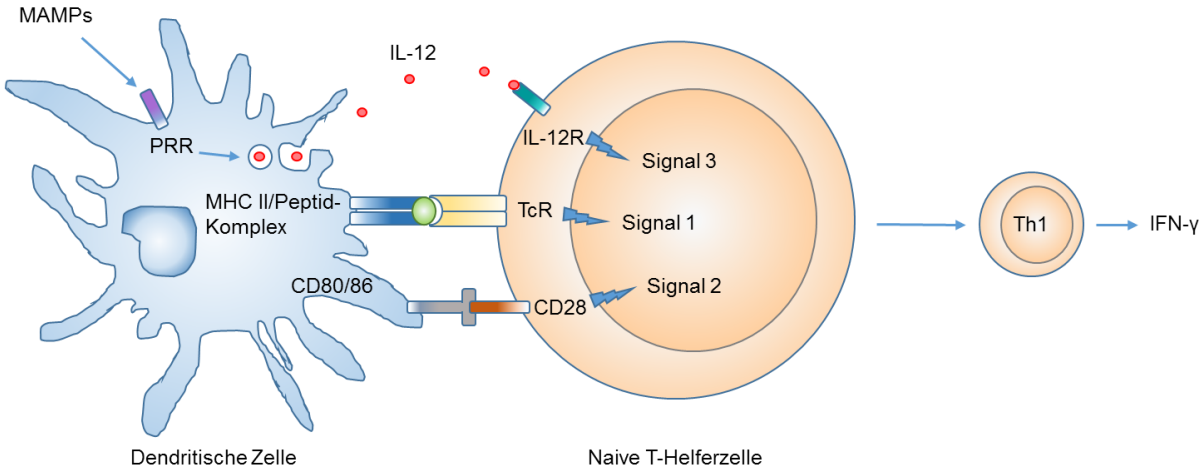


Abb. 1.1: Aktivierung naiver T-Helferzellen durch dendritische Zellen (adaptiert nach [14]). Nach der Bindung von PRR-Liganden und der Prozessierung der aufgenommenen Antigene reifen die DCs aus und Peptidbruchstücke der Antigene werden auf MHC II präsentiert. Naive T-Zellen können nun an den MHC II/Peptidkomplex binden, wenn ihr TcR die entsprechende Spezifität besitzt. Dadurch erhalten sie ein erstes Signal. Das zweite Signal bekommen die T-Zellen durch die Bindung von CD80/86 mit ihren CD28-Molekülen. Das vorherrschende Zytokinmilieu, welches von der Art des prozessierten Antigens abhängt, beeinflusst die Differenzierung der T-Zellen. In dieser Abbildung werden Th1-Zellen durch die Sekretion von IL-12 induziert. Abkürzungen: IL-12R, Interleukin-12 Rezeptor; MAMPs, *microbe-associated molecular patterns*; PRR, Mustererkennungsrezeptor; TcR, T-Zellrezeptor; Th1, T-Helferzelle Typ 1.

Welches Zytokinmilieu bei der Aktivierung der T-Zellen vorherrscht, und welcher Typ von T-Helferzelle in Folge dessen induziert wird, hängt ganz entscheidend vom Vorhandensein und von der Art des Pathogens ab [14, 27]. Ohne Stimulation ihrer PRRs reifen DCs nicht aus,

präsentieren aber körpereigene Peptidbruchstücke auf den MHC-Molekülen. Dabei werden keine pro-inflammatorischen Zytokine produziert, sondern IL-10. T-Zellen, die nun mit ihren TcRs die MHC-Peptidkomplexe binden, differenzieren zu regulatorischen T-Zellen (Tregs) aus [16, 32]. Dies ist ein Mechanismus, der die Eigentoleranz des Immunsystems aufrechterhält. Erkennen DCs jedoch Mikroorganismen mit ihren PRRs, erhalten sie dadurch sogenannte „Gefahrensignale“ und reifen aus. Abhängig von der Art des Pathogens werden dann unterschiedliche Zytokine produziert. So induzieren z. B. Bakterien die Ausreifung zu IL-12-produzierenden DCs, und Pilze favorisieren die IL-4-Freisetzung [16, 33]. Welche Zellen dabei IL-4 produzieren, wird aber noch diskutiert. Zu nennen wären z. B. NKT-Zellen und basophile Granulozyten [24, 34].
Nach der vollständigen Aktivierung der T-Zelle reguliert diese die α-Kette ihres IL-2-Rezeptors hoch, bindet autokrines IL-2 und fängt daraufhin an, klonal zu expandieren [24].

1.1.2.2 Antikörperproduktion durch B-Zellen

B-Zellen binden Antigene mit ihrem B-Zellrezeptor (BcR). Jede B-Zelle besitzt nur eine BcR-Spezifität, die, wie bei T-Zellen, durch somatische Rekombination entstanden ist [18]. Bei einer naiven B-Zelle handelt es sich beim BcR um membrangebundene Antikörper der Klasse M (IgM) [1, 35, 36]. B-Zellen gehören zu den APCs, können an den BcR gebundene Antigene aufnehmen, diese prozessieren und Peptidbruchstücke davon auf MHC-Molekülen zusammen mit kostimulatorischen Signalen präsentieren [37]. Somit können sie einerseits antigenspezifische T-Zellen aktivieren, aber andererseits selbst durch T-Helferzellen aktiviert werden. Diese T-Zellhilfe ist nötig, damit B-Zellen Klassenwechsel und somatische Hypermutation ihres BcRs durchführen können [37]. Für diesen in der Keimzentrumsreaktion stattfindenden Prozess ist die Bindung von CD40L auf der T-Zellseite mit CD40 auf der B-Zellseite essentiell [38]. Die Folge der somatischen Hypermutation kann eine Erhöhung der Affinität gegenüber dem Antigen sein [37]. B-Zellen, die das Antigen nun besser binden können, haben einen Selektionsvorteil gegenüber den B-Zellen, die das Antigen weniger affin binden, denn sie konkurrieren um die Bindung dieses Antigens miteinander. B-Zellen, die es besser binden, können es erneut den T-Helferzellen präsentieren und bekommen von diesen Überlebenssignale. So kommt es zur Affinitätsreifung der Antikörperantwort. Bei der somatischen Hypermutation, einem stochastischen Prozess, können die BcRs aber auch so

modifiziert werden, dass sie das ursprünglich gebundene Antigen nicht mehr binden. In diesem Fall können sie es auch nicht weiter den T-Helferzellen präsentieren, und sie sterben „durch Vernachlässigung“, da sie keine T-Zellhilfe erhalten [1, 39]. In der Keimzentrumsreaktion können sich die B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen differenzieren, die nun in der Lage sind, den affinitätsgereiften und klassengewechselten BcR in Form von löslichen Antikörpern zu sezernieren. Es gibt fünf Antikörperklassen (Immunglobulinklassen): IgM, IgA, IgG, IgD und IgE. Zu welcher Antikörperklasse gewechselt wird, hängt vom umgebenden Zytokinmilieu ab, welches auch durch die T-Helferzellen mitbestimmt wird. IgM nimmt hier eine besondere Rolle ein, da diese Antikörperklasse auch ohne T-Zellhilfe von aktivierten Plasmazellen sezerniert werden kann. Für die Produktion aller anderen Antikörperklassen benötigen B-Zellen T-Zellhilfe [1]. Hierbei sei noch erwähnt, dass bestimmte Antigene mit repetitiven Strukturen einen T-Zell-unabhängigen Klassenwechsel induzieren können. Dazu müssen die BcRs einer B-Zelle durch das Antigen kreuzvernetzt werden und außerdem TLRs der B-Zelle MAMPs erkennen [40].

1.1.2.3 Antikörperklassen

Antikörper bestehen aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Sie bilden einen variablen und einen konstanten Bereich. Der variable Bereich wird durch Punktmutationen bei der Affinitätsreifung in der Keimzentrumsreaktion verändert. Er bildet die Antigen-Bindungsstelle des Antikörpers (Fab-Teil). Der konstante Bereich unterscheidet die verschiedenen Antikörperklassen voneinander (Fc-Teil). Er bindet an Fc-Rezeptoren verschiedener Effektorzellen und kann so die biologische Wirkung des Antikörpers vermitteln [1].
In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf IgG- und IgE-Antikörper gelegt. Diese Antikörperklassen werden folgend genauer beschrieben.

IgG-Antikörper – Inflammation und Toleranz

IgG-Antikörper haben im Serum die höchste Konzentration (etwa 6 bis 16 mg/mL) [41]. Sie werden unterteilt in die IgG-Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4, nummeriert absteigend nach ihrem Anteil am Gesamt-IgG [42].

Die klassischen Eigenschaften, die IgG-Antikörper auszeichnen, werden vor allem durch die Subklasse IgG1 verkörpert. Diese macht 43 % bis 75 % vom Gesamt-IgG aus [42]. IgG1-Antikörper werden durch pro-inflammatorische Zytokine wie IL-17, IL-21 und IFN-γ induziert, die von Th1- und Th17-Zellen synthetisiert werden [1, 43]. Durch die Bindung an das Antigen wird dieses von den IgG1 opsonisiert, so dass das Antigen von entsprechenden Fcγ-Rezeptor tragenden Zellen phagozytiert werden kann. Auch das Komplementsystem wird durch die Bildung von Immunkomplexen aus IgG1 und Antigenen, oder nach der Bindung von IgG1 an Oberflächen aktiviert und lysiert dann Zielstrukturen. Über beide Effektormechanismen wird, wiederum durch Zytokine bzw. Anaphylatoxine, die Inflammation verstärkt [1]. Ähnliche Eigenschaften besitzen auch IgG2 und IgG3 [1].

Eine besondere Rolle nehmen IgG4-Antikörper ein. Mit einer Serumkonzentration von 0,08 mg/mL bis 1,4 mg/mL machen sie etwa 0,8 % bis 11,7 % am Gesamt-IgG aus [42]. Für die Induktion von IgG4 werden neben Zytokinen von Tregs (IL-10) auch klassische Th2-Zytokine (IL-4, IL-5 und IL-13) benötigt. Also neben eher Toleranz-vermittelnden Zytokinen auch solche, die bei der Induktion von Allergien eine Rolle spielen [42, 44]. IgG4-Antikörper besitzen nur eine sehr geringe Affinität für Fcγ-Rezeptoren, wodurch sie nur schwach opsonisierend wirken [42, 45]. Da IgG4 an Position 241 statt eines Prolins ein Serin haben, kann die Disulfidbrücke zwischen den beiden schweren Ketten der IgG4-Antikörper leicht reduziert werden [46]. So entstehen „halbe“ IgG4-Moleküle, die sich mit anderen halben IgG4-Molekülen zu einem neuen IgG4-Antikörper zusammensetzen können. Dieser IgG4-Antikörper besitzt dann zwei Antigenspezifitäten. IgG4 kann keine Immunkomplexe bilden, wodurch dieser Weg der Komplementaktivierung nicht möglich ist. Auch der klassische Weg der Komplementaktivierung nach der Bindung der Antikörper an Oberflächen ist bei IgG4 nicht möglich. Durch ihr Unvermögen Effektormechanismen zu aktivieren, werden IgG4-Antikörper als neutralisierende Antikörper betrachtet, die bei Allergien oder chronischen Entzündungen der Inflammation entgegen wirken [42, 45].

IgE-Antikörper und Allergie

IgE-Antiköper machen den geringsten Anteil aller im Serum vorkommenden Antikörperklassen bei gesunden Erwachsenen (etwa 69 IU/mL ≙ 0,16 µg/mL) aus [47]. Für ihre Induktion werden Th2-Zytokine benötigt, die bei einer Typ 2 Immunantwort produziert werden [26]. Das sind in erster Linie IL-4, IL-5 und IL-13 [42, 48]. Als einzige Antikörperklasse können IgE-Antikörper

an den für sie spezifischen Fc-Rezeptor (Fcε) binden, ohne vorher ihr Antigen gebunden zu haben. Typische Fcε-Rezeptor-tragende Zellen sind Mastzellen, basophile und eosinophile Granulozyten. Ihnen wird durch die Beladung der Fcε-Rezeptoren mit IgE eine Art Antigenspezifität geliehen. Treffen diese Zellen auf das Antigen und tragen sie relativ viel IgE mit der entsprechenden Spezifität, kommt es zu einem Brückenschlag benachbarter Fcε-Rezeptoren und in Folge dessen zur Ausschüttung vorgeformter toxischer Mediatoren durch Degranulation [1, 26, 49]. Diese Mediatoren sind z. B. Histamin, Leukotriene und Prostaglandine. Sie vermitteln Vasodilatation, Bronchokonstriktion und Inflammation [49, 50]. Im physiologischen Kontext spielen diese Reaktionen eine Rolle bei der Abwehr von multizellularen Pathogenen, wie Parasiten, die durch Phagozytose nicht beseitigt werden können. Reagiert das Immunsystem aber auf eigentlich harmlose Umweltantigene mit einer Th2/IgE-Immunantwort, kann es zur Ausbildung von einer Allergie auf das Antigen (Allergen) kommen [1, 26].

Warum das Immunsystem auf manche Umweltallergene häufig mit einer Th2-Immunantwort reagiert, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Die modifizierte Hygienehypothese geht davon aus, dass ein zu seltener Kontakt mit mikrobiellen Strukturen in der Kindheit, zu einer mangelnden Ausprägung von Toleranzmechanismen des Immunsystems führt und dass in der Folge auch gegen harmlose Antigene eine Th2-Immunantwort ausgebildet werden kann [51, 52]. Eine weitere entscheidende Komponente ist aber das Allergen selbst. So sind z. B. Allergene häufig Serinproteasen (wie z. B. von Aspergillus, Hausstaubmilben und Kakerlaken). Sie lockern Zellverbindungen (*tight junctions*), können Protease-aktivierte Rezeptoren auf Zellen aktivieren und induzieren darüber die Synthese von Th2-Zytokinen [53, 54].

1.2 *Staphylococcus aureus*

Die erste Beschreibung von *S. aureus* erfolgte vor etwa 130 Jahren von Sir Alexander Ogston. Er entdeckte Mikroorganismen im Eiter von Abszessen, die er später „*staphylococcus*“ nannte und zeigte in Tierversuchen, dass sie das auslösende Agens der Abszesse waren. 1886 arbeitete Friedrich Julius Rosenbach an der Differenzierung der „*staphylococci*“ und orientierte sich bei der Namensgebung an Ogston`s Vorschlag. Er nannte das Bakterium entsprechend der Farbe der Kolonien *Staphylococcus aureus* [55].

1.2.1 Ein facettenreiches Bakterium

S. aureus besiedelt als kommensales Gram-positives Bakterium die Nasenvorhöfe von gesunden Menschen. Sie werden als *S. aureus*-Träger bezeichnet. Der *S. aureus*-Trägerstatus hängt unter anderem vom Alter ab. So sind 40 % bis 50 % aller Neugeborenen in den ersten acht Lebenswochen mit *S. aureus* besiedelt, was sich bis zum Erwachsenenalter auf etwa 30 % reduziert [56-58]. Der Grund für die Kolonisierung der Träger ist bislang noch unbekannt. Einige *S. aureus*-Oberflächenproteine scheinen aber die Kolonisierung zu unterstützen. Sie zählen zu den *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs) [4].
Neben der Besiedlung von gesunden Individuen verursacht *S. aureus* aber auch eine Vielzahl von Erkrankungen. Das Spektrum reicht dabei von oberflächlichen Infektionen der Haut, über Bindegewebsinfektionen, Osteomyelitis und Myokarditis bis zu systemischen Infektionen des Blutes (Bakteriämie) und Sepsis [59].

Die Pathogenität von *S. aureus* hängt vor allem vom großen Repertoire an Virulenzfaktoren und Toxinen ab [60]. Auf einige wird in einem späteren Abschnitt genauer eingegangen. Die Ausstattung an Virulenzfaktoren und Toxinen unterscheidet sich zwischen verschiedenen *S. aureus*-Stämmen, so dass sie sich in ihrer Virulenz voneinander unterscheiden. Der Grund hierfür liegt in der Organisation des etwa 2,8 Mb großen Genoms von *S. aureus*. Es baut sich zum Teil aus einem *core*-Genom auf (75 %), welches unter den Stämmen hoch konserviert ist. Die zugehörigen Gene spielen vor allem beim Metabolismus von *S. aureus* und als *housekeeping*-Gene eine Rolle. Zusätzlich gibt es das *accessory*-Genom (25 %), bestehend aus *core-variable*-Genom (10 %) und mobilen genetischen Elementen (15 %). Das *core-variable*-Genom beinhaltet vor allem Gene für Oberflächenproteine, die innerhalb der klonalen Linien von *S. aureus* konserviert sind (z. B. MSCRAMMs). Mobile genetische Elemente können über horizontalen Gentransfer zwischen den *S. aureus*-Stämmen ausgetauscht werden. Dazu gehören Bakteriophagen, Pathogenitätsinseln, chromosomale Kassetten, Genominseln, Plasmide und Transposons. Auf den mobilen genetischen Elementen werden vor allem Gene von Virulenzfaktoren und Resistenzgene codiert [60, 61].

Neben dem großen Repertoire an Virulenzfaktoren taucht zunehmend ein weiteres Problem auf, das die Pathogenität von *S. aureus* erhöht: Seit der Einführung von Antibiotika bei der

Behandlung von *S. aureus*-Infektionen steigt die Anzahl resistenter Stämme. Bereits 1960 waren über 80 % aller *S. aureus*-Isolate resistent gegenüber Penicillin, das gegen Ende des zweiten Weltkrieges in die Klinik eingeführt worden war. Um Infektionen mit Penicillin-resistenten *S. aureus* zu bekämpfen, wurde 1959 Methicillin eingeführt. Auch gegen dieses Antibiotikum wurden bereits 2 Jahre später die ersten resistenten *S. aureus*-Isolate (MRSA) beschrieben [62, 63]. Das Resistenz-vermittelnde Gen *mecA* liegt auf einer chromosomalen Kassette und kann so zwischen den *S. aureus*-Stämmen horizontal weitergegeben werden [63]. Das Vorkommen der ersten MRSA war auf Krankenhäuser beschränkt (*hospital-acquired*-MRSA, HA-MRSA). Seit den 90er Jahren tauchen aber auch *community-acquired*-MRSA (CA-MRSA) außerhalb von Krankenhäusern auf, die virulenter als HA-MRSA sind und auch gesunde Menschen infizieren [64]. CA-MRSA verursachen häufig tiefgreifende Infektionen der Haut, können aber auch andere schwere Infektionen wie Pneumonien und Sepsis verursachen [65]. Zur Behandlung von MRSA-Infektionen stehen Reserveantibiotika zur Verfügung (z. B. Vancomycin, Daptomycin und Linezolid). Resistente *S. aureus*-Isolate gegen diese Antibiotika sind aber ebenfalls schon beschrieben worden [66, 67]. Auch ist die Behandlung komplizierter, langwieriger und häufiger erfolglos als die von Infektionen mit Methicillin-empfindlichen *S. aureus*-Stämmen. Insgesamt stellen *S. aureus*-Infektionen eine große wirtschaftliche Belastung der Gesundheitssysteme dar. Man schätzt, dass in Europa pro Jahr allein durch nosokomiale *S. aureus*-Infektionen eine Million zusätzliche Krankenhaustage und 380 Millionen Euro Zusatzkosten entstehen [68]. Der zunehmende Druck durch Antibiotika-resistente *S. aureus*-Stämme und Mangel an neuen Wirkstoffen, machen alternative Therapiestrategien, wie Vakzinierung, dringend notwendig.

Bisher verliefen Impfstudien bei *S. aureus* sehr ernüchternd. Während man bei Mäusen durch die Gabe von *S. aureus*-spezifischen Antikörpern oder auch durch aktive Vakzinierung mit *S. aureus*-Proteinen Impfschutz erreichen kann, sind alle bisherigen Versuche, diese Vakzinestrategien auf den Menschen zu übertragen, gescheitert [69]. Der klinische Versuch gegen ein Protein von *S. aureus* zu vakzinieren, welches bei der Eisenaufnahme von *S. aureus* eine Rolle spielt (IsdB), musste sogar gestoppt werden, da die Gruppe der immunisierten Probanden bei *S. aureus*-Infektionen eine höhere Letalität aufwiesen als die Placebo-Gruppe [70, 71]. Daher wird aktuell sogar diskutiert, ob Antikörper für die Abwehr von *S. aureus*-Infektionen beim Menschen überhaupt eine Rolle spielen. Die entscheidende Rolle bei der Abwehr von *S. aureus* wird aktuell meist den Th17-Zellen zugeschrieben. Diese rekrutieren

neutrophile Granulozyten zum Ort der Infektion und induzieren die Synthese von AMPs [72, 73].

1.2.2 Wechselwirkung zwischen *S. aureus* und dem Menschen

S. aureus kann eine Vielzahl von Erkrankungen verursachen. Die Barriere, die *S. aureus* dazu zuvor überwinden muss, ist die menschliche Haut (vgl. 1.1.1) [3]. Diese ist besiedelt von anderen Kommensalen, die die Ausbreitung von *S. aureus* reduzieren können (z. B. *S. epidermidis*). *S. aureus* besitzt aber auch MSCRAMMs, die das Anheften an Zellen und letztendlich die Besiedlung unterstützen. Sie binden Fibrinogen, Fibronektin und Zytokeratine. Keratinozyten der Epidermis besitzen PRRs, worüber sie MAMPs von eingedrungenen *S. aureus* (z. B. Lipoteichonsäure und Peptidoglycan) binden können. Dadurch kommt es zur Sezernierung von AMPs und Chemokinen. Durch AMPs kann die *S. aureus*-Vermehrung inhibiert werden und über Chemokine können neutrophile Granulozyten rekrutiert werden [4, 74]. Sie gehören zu den ersten Zellen, die bei einer *S. aureus*-Infektion rekrutiert werden. Sie können *S. aureus* phagozytieren und durch NETosis abtöten [74]. Hierbei werden *S. aureus*-Zellen durch freigesetzte DNA aus dem Kern der neutrophilen Granulozyten zusammen mit Proteasen fixiert und abgetötet [75]. Dennoch kann es zur weiteren Ausbreitung von *S. aureus* kommen. Die dabei ablaufenden Vorgänge werden geprägt durch den Erwerb von Nährstoffen und der Interaktion zwischen *S. aureus*-Oberflächenproteinen, sowie freigesetzten *S. aureus*-Proteinen und dem Immunsystem.

1.2.2.1 Immunevasion durch *S. aureus*-Proteine

Vor allem sezernierte, extrazelluläre *S. aureus*-Proteine spielen bei der Immunevasion durch *S. aureus* eine wichtige Rolle. Darunter finden sich z. B. Toxine und Enzyme. Studien mit 15 sequenzierte *S. aureus*-Stämme haben gezeigt, dass sich etwa 133 sezernierte, extrazelluläre *S. aureus*-Proteine nachweisen lassen. Im Schnitt tragen die Stämme 46 bis 72 dieser Proteine [76]. Im Folgenden sollen einige dieser Proteine vorgestellt werden, die für diese Arbeit relevant sind. *S. aureus* sezerniert aber weitaus mehr Proteine, deren vollständige Beschreibung den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde. Einen guten Überblick findet man in der Übersichtsarbeit von Grumann *et al.* [60].

Protein A

Protein A (SpA) ist ein Oberflächenprotein Protein von *S. aureus*, das auch sezerniert werden kann [77]. Es bindet die Fc-Teile von Antikörpern, so dass deren biologische Funktionen (Opsonisierung und Komplementaktivierung durch IgG-Antikörper) inhibiert werden [78, 79]. Auch Fab-Teile von IgM-Antikörpern, genauer gesagt die VH3-Region, können gebunden werden. Der BcR von etwa 30 % aller humanen B-Zellen besitzt diese VH3-Region. SpA kann deren BcRs binden und induziert Proliferation und Apoptose der B-Zellen [79, 80]. In einem Maus-Infektionsmodell konnte gezeigt werden, dass SpA-defiziente *S. aureus*-Stämme (Δ*spa*) eine stärkere Antikörperantwort induzieren als der Wildtyp *S. aureus*-Stamm [81]. SpA inhibiert also die Phagozytose von *S. aureus*, indem es die biologischen Funktionen von Antikörpern neutralisiert, und es inhibiert auch deren Produktion durch Apoptose von B-Zellen.

Superantigene

S. aureus-Superantigene (SAgs) gehören zu den potentesten bekannten T-Zellmitogenen. Sie können bereits in femtomolaren Konzentrationen T-Zellen antigenunabhängig aktivieren. Es wurden bisher 24 SAgs beschrieben, die in Staphylokokken-Enterotoxine (SE) und Staphylokokken-Enterotoxin-ähnliche Toxine (SEl) eingeteilt werden (SEA bis SEE, SEG bis SEJ, SER bis SET, SElK bis SElQ, SElU bis SElX und TSST-1) [60, 82]. Die meisten SAg-Gene sind auf mobilen genetischen Elementen codiert, außer *selx*, welches auf dem *core*-Genom liegt [83]. Eine weitere Klasse an strukturell den SAgs ähnlichen Proteinen, aber ohne T-Zellmitogen-Aktivität, stellen die Staphylokokken Superantigen-ähnlichen Proteine (Ssl) dar [84]. SAg-Gene sind innerhalb der *S. aureus*-Isolate sehr heterogen verteilt. Etwa 80 % der Isolate tragen im Schnitt fünf bis sechs SAg-Gene [60].

SAgs müssen nicht, wie konventionelle Antigene, prozessiert werden, bevor sie durch APCs den T-Zellen präsentiert werden können. Sie erreichen ihre mitogene Wirkung durch die direkte Vernetzung von TcR mit MHC II-Molekülen, unabhängig von der TcR-Spezifität. Dabei vernetzen sie bestimmte TcR Vβ-Elemente mit der α-Kette oder β-Domäne von MHC II-Molekülen [82]. So kann ein SAg bis zu 20 % aller T-Zellen aktivieren (konventionelle Antigene aktivieren etwa eine aus 10^5 bis 10^6 T-Zellen) [60].

SEs erhielten ihren Namen, da sie Nahrungsmittelvergiftungen durch kontaminierte Lebensmittel hervorrufen. SAgs verursachen aber auch lebensbedrohliche Infektionen. TSST-1 (*toxic shock syndrome toxin*) verursacht das toxische Schock-Syndrom mit hohem Fieber,

Durchfall, Erbrechen, bis hin zu Organversagen. Aber auch die anderen SAgs führen durch die massive T-Zellaktivierung zu einem pro-inflammatorischen Zytokinsturm mit ähnlichen Symptomen. Anschließend verfallen die T-Zellen in Anergie [60].

Porenbildende Toxine

S. aureus produziert verschiedene porenbildende Toxine. Darunter fallen ein-Komponenten Proteine (z. B. alpha-Hämolysin), zwei-Komponenten porenbildende Toxine (z. B. gamma-Hämolysin, Panton-Valentin Leukozidin) und porenbildende Peptide (*Phenol-soluble modulins*) [60].

Alpha-Hämolysin (Hla) ist ein Protein, das auf dem *core*-Genom von *S. aureus* codiert ist und von 95 % aller *S. aureus*-Stämme sezerniert wird [60, 85]. Es bildet nach der Bindung am Zellrezeptor ADAM10 Poren in Epithelzellen, Erythrozyten, Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten. In der Pathogenese von Hautinfektionen und Pneumonien durch den *S. aureus*-Stamm USA300 ist Hla beteiligt [60, 86].

Zwei-Komponenten porenbildende Toxine, kurz Leukotoxine, bestehen aus einer Klasse F-Untereinheit und einer Klasse S-Untereinheit. Es wurden bislang fünf Klasse F-Untereinheiten (HlgB, LukF-PV, LukD, LukF`-PV und LukG) und sechs Klasse S-Untereinheiten (HlgA, HlgC, LukS-PV, LukE, LukM und LukH) beschrieben. Die Lyse humaner Zellen wurde für Panton-Valentin Leukozidin, (PVL (LukF-PV + LukS-PV)), gamma-Hämolysin (Hlg (HlgB + HlgA, oder HlgB + HlgC)) und LukGH (LukG + LukH) beschrieben [60]. Hlg ist auf dem *core*-Genom von *S. aureus* codiert. Es lysiert Erythrozyten und Granulozyten. LukGH lysiert vor allem neutrophile Granulozyten. Die Gene für PVL sind auf Phagen codiert. Sie werden oft in CA-MRSA-Stämmen gefunden. PVL lysiert Granulozyten und spielt eine Rolle bei Haut- und Bindegewebsinfektionen [60].

Phenol-soluble modulins (PSMs) sind kleine Peptide, deren Gene auf dem *core*-Genom codiert sind (Ausnahme ist *psm-mec*, das auf einer chromosomalen Kassette liegt). Sie werden in größeren Mengen von CA-MRSA-Stämmen sezerniert. Die fünf PSMα-Peptide sind etwa 20 bis 26 Aminosäuren lang und die zwei PSMβ-Peptide etwa 43 bis 44 Aminosäuren. Sie sind in der Lage Inflammation und die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten über Chemotaxis zu induzieren, lysieren diese aber, sobald sie mit ihnen in Kontakt treten. Sie können aber auch Erythrozyten lysieren [87, 88]. Außerdem zeigen PSMs eine antimikrobielle Wirkung und es

wird vermutet, dass sie bei der Besiedlung des Menschen mit anderen kommensalen Bakterien wechselwirken [89].

S. aureus-Serinproteasen

Unter den extrazellulären Proteinen von *S. aureus* befinden sich auch Serinproteasen. Die Serinprotease V8, oder auch SspA genannt, spielt eine Rolle bei der posttranslationalen Modifikation und Aktivierung von anderen *S. aureus*-Proteinen [90, 91]. Die beiden exfoliativen Toxine ETA und ETB, ebenfalls Serinproteasen, können die großflächige Hauttoxikose *staphylococcal scalded-skin syndrome* auslösen, die mit Bläschenbildung und anschließender Ablösung der Haut verbunden ist [92].

Neben diesen *S. aureus*-Serinproteasen wurde 2001 durch Reed *et al.* ein Operon beschrieben, das sechs neue Serinprotease-ähnliche Proteine (*S. aureus serine protease-like proteins*, SplA - SplF) von *S. aureus* kodiert [93]. Das *spl*-Operon liegt zusammen mit Genen für Staphylokokken-Enterotoxin-ähnlichen Toxinen und Leukotoxinen auf der Pathogenitätsinsel SaPI3 [94]. Die Expression der Spls wird, vom *agr*-Regulator gesteuert, in der stationären Wachstumsphase induziert. Die Spl-Proteine zeigen eine 44%- bis 95%-ige Sequenzhomologie [93].

Bislang ist die physiologische Funktion der Spl-Proteine nicht aufgeklärt. Untersuchungen nach der Substratspezifität haben ergeben, dass die Spl-Proteine Aminosäure-Sequenzmotive sehr spezifisch erkennen und schneiden. SplA schneidet zwischen Tyrosin und Serin/Threonin in der Aminosäure-Sequenz Trp/Tyr-Leu-Tyr-Thr/Ser. SplB schneidet hinter der Aminosäure-Sequenz Trp-Glu-Leu-Glu. Beide Spl-Proteine sind in ihrer Proteaseaktivität inhibiert, sobald am Protein N-terminal auch nur eine weitere Aminosäure vorhanden ist. Dies lässt vermuten, dass sie ihre Proteaseaktivität erst erhalten, wenn das ebenfalls N-terminal lokalisierte Signalpeptid entfernt wird. So könnte eine intrazelluläre Proteaseaktivität vor ihrer Sezernierung verhindert werden [95-97]. Im Gegensatz dazu ist SplD auch bei ein bis zwei zusätzlichen Aminosäuren am N-Terminus noch aktiv und spaltet vor Serin in der Aminosäure-Sequenz Arg-Tyr/Trp-Pro/Leu-Thr/Leu/Ile/Val-Ser [98]. Für SplC, SplE und SplF wurden noch keine Schnittsequenzen beschrieben.

1.2.2.2 Eisenmangel – Ein ubiquitärer Stressor *in vivo*

Eisen ist als Elektronenakzeptor und -donator ein wichtiger Kofaktor für viele Proteine und ist essentiell für die meisten Organismen. Verfügbares Eisen muss im Körper streng reguliert werden, da es zum einen toxisch wirken würde (freie Radikale und Fenton-Reaktion), und zum anderen bakterielles Wachstum begünstigen würde [99, 100].

Ein Mensch besitzt etwa vier bis fünf Gramm Eisen im Körper und verliert davon täglich 0,5 mg bis ein Milligramm. Durch die Nahrung wird dieser Verlust ausgeglichen. Im proximalen Duodenum werden Eisenionen durch Enterozyten aufgenommen, gespeichert, oder basolateral in das Plasma abgegeben. Gebunden an Transferrin wird es zur Zielzelle transportiert und von dieser über Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen [99]. Im gesamten menschlichen Eisenstoffwechsel ist Eisen praktisch nie als freies Ion verfügbar, sondern wird kovalent an Proteine gebunden. So sind 99,9 % des Eisens im Körper intrazellulär lokalisiert. Davon sind etwa 80 % an Hämoproteine (z. B. Hämoglobin, Haptoglobin und Myoglobin) und etwa 20 % an das Speicherprotein Ferritin gebunden. Das verbleibende extrazelluläre Eisen wird im Plasma an Transferrin gebunden und in den Schleimhäuten an Laktoferrin [101, 102]. Daraus ergibt sich eine Eisenverfügbarkeit im Gewebe von 10^{-18} M, was für bakterielles Wachstum zu wenig ist [103]. Wie wichtig diese strenge Regulierung ist, zeigt sich bei hereditärer Hämochromatose und Thalassämie, zwei Erkrankungen bei denen das freie Eisen im Körper der Patienten erhöht ist. Ein erhöhtes Infektionsrisiko ist die Folge. Bei der Thalassämie sind Infektionen sogar die häufigste Todesursache [104, 105].

Trotz der geringen Eisenverfügbarkeit ist *S. aureus* in der Lage, den Menschen zu kolonisieren und Infektionen zu verursachen. Dafür muss sich das Bakterium Eisen verfügbar machen. Hierzu besitzt *S. aureus* porenbildende Toxine und Eisenfangproteine. Erstere können Erythrozyten lysieren und so Hämoglobin zugänglich machen. Die Expression der Eisenfangproteine steht unter der Kontrolle des Repressors Fur (*ferric uptake regulator*). Bei Eisenverfügbarkeit bindet Fur an die Fur-Box, die den eisenregulierten Genen vorgelagert ist, und inhibiert so die Expression dieser Gene. Bei Eisenmangel bindet Fur nicht mehr an die Fur-Box und die Expression der Gene wird nicht mehr inhibiert [70].

Vier Eisenaufnahme-Systeme von *S. aureus* sind bisher beschrieben worden: das Isd- (*iron-regulated surface determinant*-) Eisenaufnahmesystem, Siderophore, Xenosiderophore und ein Aufnahmesystem für Fe^{2+}- und Fe^{3+}-Ionen. Alle sind unter der Kontrolle von Fur. Das Isd-Eisenaufnahmesystem besteht aus zehn Genen (*isdA*, *isdB*, *isdCDEFsrtBisdG*, *isdH*, *orfXisdl*).

Mit Hilfe der darin codierten Proteine kann *S. aureus* Eisen aus Hämoglobin, vermutlich die Haupteisenquelle von *S. aureus*, aufnehmen und ins Zellinnere transportieren [100]. Daneben produziert *S. aureus* mit Staphyloferrin A und Staphyloferrin B zwei Siderophore mit hohen Bindungskonstanten, dem Transferrin Eisen entziehen können. Danach werden sie über Transportsysteme in *S. aureus* aufgenommen [99, 100]. *S. aureus* besitzt auch ein Transportsystem (Fhu) für Hydroxamat-Siderophore, die *S. aureus* aber nicht selber herstellen kann. Deshalb wird vermutet, dass *S. aureus* über Fhu Xenosiderophore, also Siderophore von anderen Bakterien, aufnimmt [100]. Schließlich können Fe^{2+}- und Fe^{3+}-Ionen über den Transporter Fep in *S. aureus* aufgenommen werden [106, 107].

1.2.3 Erkrankungen, bei denen *S. aureus* eine Rolle spielt

1.2.3.1 Atopische Dermatitis

Die Atopische Dermatitis (AD) ist eine chronische, ekzematöse Hauterkrankung mit einem vorherrschenden Th2-Zytokinprofil, die bei über 90 % der Betroffenen mit einer *S. aureus*-Besiedlung der Haut assoziiert ist. Sie betrifft ungefähr 20 % aller Kinder und 9 % der Erwachsenen in westlichen Industrieländern [108-110]. Die Ursache der Erkrankung konnte noch nicht aufgeklärt werden. Man konnte bislang zeigen, dass es durch die gestörte Hautbarriere zu einem Wasserverlust der Haut kommt [111]. Das vorherrschende Th2-Zytokinprofil (IL-4, IL-5, IL-13) inhibiert die Synthese von AMPs durch die Epithelzellen und erhöhte die Synthese von Fibrinogen und Fibronektin in der Haut. Beides begünstigt die Besiedlung der Haut mit *S. aureus* über Fibrinogen- und Fibronektin-bindende Proteine [74]. Auch bestimmte Varianten des TLR2-Gens, ein wichtiger PRR zur Erkennung von *S. aureus*, ist mit dem Schweregrad der AD assoziiert [74]. Hinweise, dass *S. aureus* den Schweregrad der AD vorantreiben kann, sind dadurch gegeben, dass eine hohe *S. aureus*-Besiedlungsdichte mit stärkeren Hautläsionen einhergeht und im Gegensatz dazu eine antimikrobielle Behandlung der Patienten zu einer Abschwächung der Symptome führt [108, 111].

1.2.3.2 Psoriasis

Psoriasis ist eine chronische, ekzematöse Hauterkrankung, die im Gegensatz zu AD vor allem durch pro-inflammatorische Zytokine (IFN-γ, IL-17 und IL-22) getrieben wird. Diese Zytokine

werden von Th1-, Th17- und Th22-Zellen sezerniert [112]. Die Ursache für diese nicht-ansteckende Krankheit ist bislang nicht geklärt. Man geht von genetischer Prädisposition und Autoimmungeschehen aus [113]. Auch bei Psoriasis-Patienten findet man hohe Besiedlungsraten der Haut mit *S. aureus* (60 %). Es wird vermutet, dass die Symptomatik durch *S. aureus* verstärkt wird [114]. Somit stellt Psoriasis eine Erkrankung dar, bei der die Immunantwort gegenüber *S. aureus*, im Vergleich zu AD, mit einer völlig anderen Qualität abläuft.

1.2.3.3 Zystische Fibrose

Die zystische Fibrose (CF) ist die häufigste autosomal rezessive Erbkrankheit der kaukasischen Bevölkerung. Sie wird durch Mutationen im Chlorid-Kanal CFTR verursacht, so dass dieser keine Chlorid-Ionen aus der Zelle in den extrazellulären Raum transportieren kann. Dadurch wird nur ein geringer osmotischer Gradient aufgebaut und es folgt weniger Wasser den Chlorid-Ionen. In Folge dessen produzieren die CF-Patienten einen zähflüssigen Schleim, vor allem in der Lunge. Daneben kommt es auch zu Funktionsstörungen sekretorischer Drüsen wie der Bauchspeicheldrüse, der Galle und den akzessorischen Geschlechtsdrüsen. CF-Patienten leiden vor allem unter chronischen und wiederkehrenden bakteriellen Infektionen der Lunge [115].

S. aureus ist trotz Antibiotikagabe das häufigste Pathogen in der Lunge von CF-Patienten im Kinder- und Jugendalter. Befindet sich *S. aureus* in der Lunge, findet man lokale Entzündungsreaktionen mit erhöhten neutrophilen Granulozyten-Zahlen und pro-inflammatorischen Zytokinen. Im Erwachsenenalter wird *S. aureus* häufig durch *Pseudomonas* (*P.*) *aeruginosa* verdrängt. Trotzdem tragen noch etwa 50 % der *P. aeruginosa*-positiven CF-Patienten gleichzeitig *S. aureus* in der Lunge [116, 117]. Die Kolonisierungsraten von *S. aureus* in den Lungen von CF-Patienten schwanken je nach Studie zwischen 48 % (Median Alter 19 Jahre) und 63 % (Median Alter 18 Jahre) bzw. 68 % (Median Alter 11,5 Jahre) [118-120]. Die Kolonisierungsrate der Nasenvorhöfe ist bei CF-Patienten mit 66 %, gegenüber 30 % bei Gesunden, erhöht [57, 121].

1.2.3.4 Hyper-IgE-Syndrom

Es gibt zwei Formen des Hyper-IgE-Syndroms (HIES): Beim STAT3-HIES (autosomal-dominant vererbt) ist der Transkriptionsfaktor STAT3 (*signal transducer and activator of*

transcription 3) durch Mutationen nicht mehr funktionsfähig. Beim DOCK8-HIES (autosomal-rezessiv vererbt) ist das Signalmolekül DOCK8 (*dedicator of cytokinesis* 8) durch Mutationen defekt. Beide Formen führen zu stark erhöhten IgE-Konzentrationen im Serum der Patienten (> 2000 IU/mL, normal 69 IU/mL). Das erhöhte IgE ist bei STAT3-HIES jedoch polyklonal und nicht spezifisch für einzelne bekannte Allergene erhöht. Die Patienten haben daher trotz der stark erhöhten IgE-Konzentrationen kaum Allergien. Jedoch leiden sie von früher Kindheit an unter schweren *S. aureus*-Infektionen. So führen *S. aureus*-Pneumonie meist zu Parenchymschäden, ähnlich wie bei CF. Demgegenüber haben DOCK8-HIES Patienten auch viel allergenspezifisches IgE und bilden Allergien aus. Bei ihnen dominiert *S. aureus* nicht bei Infektionen [47, 122-124]. Aus diesem Grund liegt der Fokus dieser Arbeit auf STAT3-HIES-Patienten.

STAT3 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von ungefähr 40 Zytokinen und Wachstumsfaktoren beeinflusst. Hierdurch ergibt sich bei Dysfunktion ein sehr vielseitiges klinisches Bild. Beispielsweise leiden die STAT3-HIES-Patienten unter Fehlbildungen des Knochenbaus (Osteoporose, Skoliose) und haben Probleme beim Zahnwechsel, so dass sie durch verbliebene Milchzähne ein sogenanntes Revolvergebiss ausbilden [124, 125]. Hauptursache für die schweren und häufigen *S. aureus*-Infektionen bei STAT3-HIES-Patienten sind aber die immunologischen Störungen. Bei der Entwicklung von Th17-Zellen sind die Zytokine IL-6 und IL-23 entscheidend, die während der Differenzierung der naiven T-Helferzelle STAT3 induzieren. Dieser Transkriptionsfaktor ist essentiell für die Entstehung von Th17-Zellen. Durch den STAT3-Defekt bleibt aber die Wirkung dieser Zytokine aus und die Patienten besitzen kaum Th17-Zellen [122, 124, 125]. In der aktuellen Literatur werden Th17-Zellen als eine der wichtigsten Zellpopulation bei der Abwehr von *S. aureus* diskutiert. Sie rekrutieren neutrophile Granulozyten zum Ort der Infektion, damit diese bei der Bekämpfung von *S. aureus* mitwirken. Es wird vermutet, dass das Fehlen der Th17-Zellen der Grund für die häufigen *S. aureus*-Infektionen bei STAT3-HIES-Patienten ist [72, 73, 125].

1.2.3.5 Nasenpolypen und Asthma

Etwa 4 % der Bevölkerung leiden an Nasenpolypen. Dies betrifft vor allem Erwachsene im Alter von mehr als 45 Jahren [126]. Die Polypen blockieren die Atemwege, führen zu Geruchsbeeinträchtigung und Rhinorrhoe [127]. Die Ätiologie von Nasenpolypen ist

unbekannt. In Polypengeweben findet man aber eine Th2-polarisierte Entzündung mit Einwanderung von eosinophilen Granulozyten, erhöhtem lokalem IL-5 und IgE. Man vermutet, dass durch die Aktivierung von Mastzellen, deren Fcε-Rezeptoren mit IgE beladen sind, das Polypenwachstum gefördert wird [126, 127]. Etwa 45 % aller Nasenpolypen-Patienten entwickeln Asthma und 1/3 aller Asthmapatienten besitzen Nasenpolypen [127]. Dabei ist das Auftreten von Nasenpolypen vor allem mit dem sogenannten „nicht-allergischen" (idiopathischen) Asthma assoziiert, bei dem das Allergen nicht bekannt ist. Diese Assoziation der Nasenpolypen mit der Entwicklung von Asthma hat die Diskussion angeregt, ob die Ausbreitung der Th2-polarisierten Erkrankung auf die unteren Atemwege die Entwicklung von Asthma verursacht. Die Behandlung von Nasenpolypen erfolgt mit Glukokortikoiden, um die allergischen Entzündungen zu hemmen. Ist dies nicht erfolgreich, werden die Nasenpolypen chirurgisch entfernt, wobei in schweren Fällen bis zu zehn Eingriffe aufgrund des Nachwachsens der Nasenpolypen nötig sind [126-129]. Erste Versuche, die erhöhten IgE-Mengen durch einen monoklonalen anti-IgE Antikörper (Omalizumab) zu verringern, zeigten gute Resultate und führten zur Verkleinerung der Nasenpolypen [130].

Nasenpolypen-Patienten sind häufiger mit *S. aureus* besiedelt (60 %) als Gesunde. Bei etwa 49 % bis 80 % dieser Patienten lassen sich IgE-Antikörper nachweisen, die spezifisch für SAgs sind. Demgegenüber findet man solche Antikörper nur bei etwa 13 % der Gesunden [128, 131-133]. Im Nasenpolypengewebe beobachtet man follikuläre Strukturen, die aus T- und B-Zellen bestehen. In diesen Strukturen findet man ebenfalls IgE-Antikörper [128]. Patienten mit Nasenpolypen, die SAg-spezifisches IgE besitzen, haben ein höheres Risiko idiopathisches Asthma zu entwickeln [127]. Der Schweregrad des Asthmas ist dabei assoziiert mit der Menge an SAg-spezifischem IgE der Patienten [132]. Aufgrund der erhöhten Besiedlungsrate mit *S. aureus* bei Nasenpolypen-Patienten und des Auftretens von SAg-spezifischem IgE wird *S. aureus* eine Rolle bei der Genese von Nasenpolypen, und in einem fortgeschrittenen Stadium für einen Teil der Asthmaerkrankungen, zugeschrieben. Für die Induktion der Th2-Polarisierung bei Nasenpolypen und der SAg-spezifischen IgE-Antikörper machen van Zeele *et al.* und Patou *et al.* die SAgs selbst verantwortlich. Sie konnten zeigen, dass SAgs *in vitro* zur Induktion von Th2-Zytokinen in Nasenpolypen-Geweben führt [134, 135]. Ob dies darauf beruht, dass die SAgs in der Zellkultur tatsächlich eine Th2-Polarisierung bewirken, oder ob sie vielmehr bereits vorhandene Th2-Zellen durch ihre unspezifische mitogene Wirkung zur Zytokinproduktion stimulieren, muss an dieser Stelle offen bleiben.

1.2.3.6 Bakteriämie und Sepsis

Eine Bakteriämie ist das Auftreten von Bakterien im Blut. Sie kann symptomfrei vorliegen (nach dem Zähneputzen) oder mit Entzündungsreaktionen des Körpers einhergehen. Man spricht von einer systemischen Entzündungsreaktion (SIRS), wenn mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt sind [136]:

- Körpertemperatur > 38 °C, oder < 36 °C
- Herzfrequenz > 90 Schläge/min
- Hyperventilation (mehr als 20 Atemzüge pro min, oder partieller CO2-Druck < 32 mmHg)
- Leukozytenzahl > 12 000 Zellen/µL, oder < 4 000 Zellen/µL

Im Fall einer Bakteriämie mit SIRS spricht man von einer Sepsis. Die Letalität der Sepsis ist sehr hoch und nimmt mit dem Schweregrad zu. Man unterscheidet (unkomplizierte) Sepsis (Letalität 5 % bis 15 %), schwere Sepsis (Letalität 25 % bis 35 %) und den septischer Schock (Letalität 40 % bis 60 %) (Tabelle 1.1) [136, 137].

Tabelle 1.1: Sepsiseinteilungen nach [136].

Sepsis	**Schwere Sepsis**	**Septischer Schock**
SIRS mit Infektion oder Verdacht auf Infektion	Sepsis mit mindestens einem der folgenden Symptomen: - Systolischer Blutdruck < 90 mmHg - Bewusstseinsstörungen - 24 h Harnproduktion < 600 mL	Sepsis mit systolischer Blutdruck < 90 mmHg mit mindestens einem der folgenden Symptomen: - Bewusstseinsstörungen - 24 h Harnproduktion < 600 mL

S. aureus ist der zweithäufigste Verursacher von Bakteriämien [72]. Die Letalität lag vor der Antibiotika-Ära bei etwa 75 % bis 85 %. Durch die Einführung von Antibiotika und bessere Behandlungsmöglichkeiten in der Intensivmedizin sank sie bis 1996 auf 21 %. Seit dem stagniert sie jedoch auf etwa diesem Wert. Vor allem das Auftreten von MRSA-Stämmen, die mit signifikant höherer Letalität verbunden sind, ist hierfür verantwortlich. Kommt es infolge bei einer *S. aureus*-Bakteriämie zu einer Sepsis, erhöht sich die Letalität mit zunehmendem Schweregrad der Erkrankung von 38 % bis auf 86 % [138].

Vergleicht man die Todesfälle von 2 bis 10 je 100 000 Bevölkerungsmitglieder pro Jahr, die durch *S. aureus*-Bakteriämien verursacht werden mit denen von Aids (3 von 100 000), viraler Hepatitis (2,2 von 100 000), oder Brustkrebs (12,5 von 100 000), wird deutlich, wie bedrohlich dieser Infektionserreger ist [138].

Die genannten Zahlen verdeutlichen, wie dringend neue Therapiestrategien gegen *S. aureus*-Infektionen benötigt werden, ob nun in Form neuer Antibiotikawirkstoffe oder Vakzinen. Die bisherigen Impfstrategien, die vor allem das Ziel hatten, beim Menschen Antikörper gegen verschiedene *S. aureus*-Proteine zu induzieren, waren nicht erfolgreich. Dadurch sind Zweifel über die protektive Wirkung von Antikörpern bei *S. aureus*-Infektionen aufgekommen [72, 73]. Es gibt jedoch Hinweise, dass ein Immungedächtnis für *S. aureus*, und hier insbesondere auch Antikörper, bei *S. aureus*-Infektionen vor schweren Krankheitsverläufen schützen kann. So besitzen *S. aureus*-Träger, deren Immunsystem vermutlich öfter mit *S. aureus* in Kontakt tritt, bei *S. aureus*-Bakteriämien eine niedrigere Letalität (18 %) als Nicht-Träger (46 %) [139]. Ähnliches zeigen auch Epidermolysis Bullosa-Patienten, die unter *S. aureus*-Hautinfektionen leiden. Sie besitzen mehr Antikörper gegen *S. aureus* als gesunde Kontrollen, und entwickeln trotz ihrer großflächigen, dicht mit *S. aureus* besiedelten Wunden in der Regel keine *S. aureus*-Sepsis [140].

1.3 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit zwei zentralen Fragestellungen:

1. Gibt es Hinweise für eine protektive Wirkung der humoralen Immunantwort bei *S. aureus*-Infektionen?
2. Kann *S. aureus* die Qualität der Immunantwort beeinflussen?

Um beide Fragestellungen bearbeiten zu können, sollte zunächst ein automatisierter 1D-Western Blot (Simple Western Assay) für die Anwendung von komplexen *S. aureus*-Proteinproben adaptiert werden. Damit sollten die Bindung humaner Serumantikörper an *S. aureus*-Proteine quantifizieren werden. Weiterhin sollten die *in vitro* Kultivierungsbedingungen von *S. aureus* optimiert werden. Sie sollten das *in vivo* vorherrschende Milieu, mit dem *S. aureus* bei Kolonisierung/Infektion konfrontiert ist, so gut wie möglich imitieren. Ein wichtiger Aspekt ist dabei die niedrige Eisenverfügbarkeit, ein ubiquitärer Stressor für invasive Bakterien. Deshalb sollten die Auswirkungen von Eisenlimitation auf das *S. aureus*-Immunom untersucht werden. Für diese Arbeiten sollte ein *protein A*-negativer *S. aureus*-Stamm (USA300Δ*spa*) erstellt werden, um unspezifische IgG-Bindung an Protein A zu vermeiden.

Die Rolle von Antikörpern bei *S. aureus*-Infektionen sollte durch die Quantifizierung von *S. aureus*-spezifischem IgG in humanen Seren untersucht werden. Dazu standen Seren aus einer prospektiven klinischen Studie von *S. aureus*-Bakteriämiepatienten zur Verfügung. Die erhaltenen Daten sollten mit dem Verlauf der Erkrankung korreliert werden.
Für die weitere Aufklärung einer möglichen protektiven Wirkung von *S. aureus*-spezifischem IgG sollten Seren von Patienten mit zystischer Fibrose untersucht werden. Diese Patienten entwickeln häufig *S. aureus*-Infektionen, sind jedoch vor einer systemischen Ausbreitung der Infektion geschützt. Zusätzlich standen Seren von Patienten mit Hyper-IgE-Syndrom zur Verfügung, die ebenfalls sehr anfällig für schwere *S. aureus*-Infektionen sind. Die Substitution dieser Patienten mit IVIG beugt solchen schweren *S. aureus*-Infektionen effizient vor.

Es gab Hinweise aus eigenen Vorarbeiten, dass manche *S. aureus*-Proteine die Ausprägung einer Immunantwort vom Typ 2 verstärken und Allergien auslösen könnten. Dazu gehören die *S. aureus*-Serinproteasen (Spls). Um diese Hypothese zu testen, sollten in dieser Arbeit die Spl-

spezifische humorale Immunantwort und die spezifische T-Zellantwort bei gesunden Probanden charakterisiert werden. Um eine mögliche allergische Reaktion gegen Spls zu untersuchen, sollte außerdem Spl-spezifisches IgE in Seren von verschiedenen Patientenkohorten bestimmt werden.

2 Material

2.1 Laborgeräte

Äkta Avant 150	GE Healthcare, München
Analysenwaage	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Äquilibrierungsschalen	Interfakultäres Institut für Funktionelle Genomforschung, Greifswald
Autoklav	Tuttnauer Systec, Wettenberg
Bakterienschüttler Certomat IS	Sartorius Stedim Biotech
Bakterienschüttler (linear) Grant OLS200	Grant, Shepreth, United Kingdom
Beta-Counter Microbeta	PerkinElmer, Waltham, USA
Bürkerzählkammer	Brand, Wertheim
CO_2-Inkubator WTB Binder	Binder GmbH, Tuttlingen
Digitalwaage	OHaus, Nänikon, Schweiz
Durchflusszytometer LSRII	BD, Heidelberg
Electrophoresis Power Supply EPS 3500 XL	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Elektroporationsküvetten	BioRad, München
ELISA Schüttler KL-2	Edmund Bühler, Hechingen
EXquest Spot Cutter	BioRad, München
Folienschweißgerät BSF 165	Alaska
Geldokumentationsanlage GenoPlex	VWR International GmbH, Darmstadt
Glasplatte mit Space 0,75 mm	BioRad, München
Glasplatte mit Space 1,0 mm	BioRad, München
Glasplatte	BioRad, München
Harvester	Inotech, Brandon, USA
IEF-Kammer Multiphor II Electrophoresis Unit	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Inkubator 37 °C	Binder GmbH, Tuttlingen
Kühlschrank GSM 1223, 4 °C	Liebherr, Ochsenhausen

Kühlungssystem DC10	Thermo Haake, Karlsruhe
Kühlungssystem Multi Temp III	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Kühlungssystem F25	Julabo, Seelbach
Laufkammer Mini-PROTEAN Dodeca Cell	BioRad, München
Laufkammer PROTEAN plus Dodeca Cell	BioRad, München
Lichtmikroskop CKX31	Olympus, Hamburg
Lichtmikroskop h 500	Hund, Wetzlar und Carl Zeiss, Jena
Magnetrührer Bibby	Bibby Sterlin LTD., Staffordshire, England
Milliblot Graphit Electroblotter II	Millipore, Schwalbach/Ts.
Multi Gel Gießkammer	BioRad, München
Nanodrop	Thermo Scientific, Rockford, USA
NanoQuant-Platte	Tecan, Männedorf, Schweiz
PCR Thermocycler T Gradient	Biometra, Göttingen
PCR-Laufkammer OWR	Thermo Scientific, Rockford, USA
Peggy Sue	ProteinSimple, Santa Clara, USA
Peristaltikpumpe MasterFlex	Cole-Parmer, Illinois, USA
pH-Meter Lab850	Schott Instruments, Mainz
Photometer GeneRay UV-Photometer	Biometra GmbH, Göttingen
Photometer Infinite M200 Pro	Tecan, Männedorf, Schweiz
Photometer Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Rehydratisierungsschalen	Interfakultäres Institut für Funktionelle Genomforschung, Greifswald
Sample Cup	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Scanner Epson Expression 1680 Pro	Epson, Meerbusch
Schnellkochtopf	WMF, Geislingen
Schüttler 3005	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Simon	ProteinSimple, Santa Clara, USA
Sterilwerkbank	Heraeus Instruments, Hanau
Stromversorgungsgerät Power Pac 200	BioRad, München
Stromversorgungsgerät Power Pac 3000	BioRad, München

Stromversorgungsgerät Power Pac HC	BioRad, München
Stromversorgungsgerät Power Pac Basis	BioRad, München
Thermo-Magnetrührer VMS-D	VWR International GmbH, Darmstadt
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank Hera freeze, -80 °C	Heraeus Instruments, Hanau
Tiefkühlschrank KT1630, -20 °C	Liebherr, Ochsenhausen
Ultraschallgerät HD 60	BANDELIN electronic, Belin
Vortex Genie 2	Scientific Industrie, New York, USA
Wasserbad Aqua Line AL5	LAUDA DR. R. WOBSER GMBH & CO. KG, Lauda-Königshofen
Western Blot Imager	Intas, Göttingen
Typhoon Scanner	GE Healthcare, München
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16R	Thermo Scientific, Rockford, USA
Zentrifuge Heraeus Multifuge X3R	Thermo Scientific, Rockford, USA
Zentrifuge Heraeus Biofuge Primo R	Thermo Scientific, Rockford, USA
Zentrifuge Heraeus Biofuge pico	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau

2.2 Verbrauchsmaterialien

3-Wege-Hahn	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
24-*Well* Mikrotiterplatten Nunc, Rundboden	Thermo Scientific, Rockford, USA
96-*Well* Mikrotiterplatten, schwarz	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
96-*Well* Mikrotiterplatten MaxiSorp Flachboden	Thermo Scientific, Rockford, USA
96-*Well* Mikrotiterplatten Nunc, Rundboden	Thermo Scientific, Rockford, USA
Abstrichbesteck	Sarstedt, Nümbrecht
Amicon Ultra-15 10 kDa und 30 kDa	Merck, Darmstadt
Columbia-Blutagarplatten	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Dialyseschläuche	Spectrum Laboratories, Los Angeles, USA
Einmalspritzen 10 mL	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Glasfilter	PerkinElmer, Waltham, USA
HiTrap SP FF Säulen	GE Healthcare, München

Immobilon Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Membran	Millipore, Bedford, USA
Impfösen	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
IPG-Streifen, pH 4-7, 7 cm Immobiline™ DryStrip	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
IPG-Streifen, pH 6-11, 7 cm Immobiline™ DryStrip	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
IPG-Streifen, pH 6-11, 11 cm Immobiline™ DryStrip	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
IPG-Streifen, pH 4-7, 11 cm Immobiline™ DryStrip	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Nylonwolle MKN-100	G. Kisker, Steinfurt
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Petrischalen, 9 cm	VWR International GmbH, Darmstadt
Pharmed-Schlauch, 6,4 mm	Roth, Karlsruhe
Pharmed-BPT, 6,4 mm	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter	Biozym, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße (0,5 mL; 1,5 mL; 2,0 mL)	Eppendorf, Hamburg
Säulen klein und groß	Profos, Regensburg
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzenfilter 0,22 µm	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter Steritop (0,22 µm)	Millipore, Bedford, USA
TFF Minimate Kapsel 10 kDa	Pall Corporation, Dreieich
Whatman Papier	Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen Nunc, T75	Thermo Scientific, Rockford, USA
Zellschaber	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (50 mL)	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA

2.3 Chemikalien und Reagenzien

[^{3}H]-Thymidin (5 mCi/185 MBq)	PerkinElmer, Waltham, USA
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
2,2´-Bipyridyl	Sigma-Aldrich, Steinheim
5× Green GoTaq Flexi Puffer	Promega, Mannheim
5× Phusion HF Puffer	Thermo Scientific, Rockford, USA
6× Loading Dye DNA	Promega, Mannheim
10× Cut Smart Puffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
Acetoin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamide 4K Lösung (40 %) Mix 37,5:1	AppliChem, Darmstadt
Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicilin	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Beschichtungspuffer, ELISA	Candor Bioscience, Wangen im Allgäu
Blocking reagent für ELISA	Roche, Basel, Schweiz
Borsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA (Bovines Serumalbumin)	AppliChem, Darmstadt
*Bsa*I	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
$CaCl_2$	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie brilliant blue G250	Merck, Darmstadt
D-Desthiobiotin	IBA, Göttingen
Dithiothreitol	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
dNTPs	Sigma-Aldrich, Steinheim

DPBS für sterile Arbeiten	PAN Biotech, Aidenbach
EDDA	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eisen-III-Chlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Erythromycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, vergällt	Merck, Darmstadt
Ethanol, unvergällt	Roth, Karlsruhe
FACS Flow	BD, Heidelberg
FastAP Puffer	Thermo Scientific, Rockford, USA
SAP Phosphatase	Thermo Scientific, Rockford, USA
FCS	Biochrom, Berlin
Ficoll, Pancoll	PAN Biotech, Aidenbach
Flamingo Fluorescent Gel Stain 10x	BioRad. München
Formaldehyd 37 %	Roth, Karlsruhe
Glycerol 87 %	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Glycin	Roth, Karlsruhe
GoTaq Polymerase	Promega, Mannheim
Größenstandard Agarosegele 100 bp Generuler	Thermo Scientific, Rockford, USA
Größenstandard Agarosegele 1 kb Generuler	Promega, Mannheim
Größenstandard SDS-Gele RotiMark Standard	Roth, Karlsruhe
HIFI Polymerase Phusion F-530S	Thermo Scientific, Rockford, USA
*Hin*dIII	Fermentas, Ontario, Kanada
HPLC-Wasser	J.T. Baker, Griesheim
IL-2, human rekombinant	Novartis, Basel, Schweiz
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
IPTG	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe

Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
LB	Sigma-Aldrich, Steinheim
LPS *E. coli*	Sigma-Aldrich, Steinheim
LPS-Depletion Säulenmaterial EndoTrap red 10	Profos, Regensburg
Lysostaphin	Genmedics, Reutlingen
Lysozym	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Roth, Karlsruhe
$MgCl_2$	Promega, Mannheim
$MgSO_4$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Milchpulver (blotting grade)	Roth, Karlsruhe
Mineralöl Dry Strip Cover Fluid	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat 100 mM	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
*Nde*I	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
NEBPuffer 2	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
NEBPuffer 3	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
Nicht-essentielle Aminosäuren 100×	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
OptEIA, ELISA Substrat	BD, Heidelberg
PCR-Wasser DNase/RNase	Life Technologies, Darmstadt
Pelikan Tinte 4001	Pelikan, Hannover
Penicillin/Streptomycin/Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Pharmalyte pH 3-10	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Pharmalyte pH 8-10,5	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Phosphorsäure (H_3PO_4)	Roth, Karlsruhe

Puffer R (Regenerationspuffer mit HABA)	IBA, Göttingen
Redsafe	iNtRON, Gyeonggi-do, Korea
RPMI 1640	Biochrom, Berlin
Roti-Quant	Roth, Karlsruhe
Salzsäure ≥ 32 %	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure 2 N	Sigma-Aldrich, Steinheim
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Sodium Dodecyl Sulfat	Merck, Darmstadt
Sorbitol	Roth, Karlsruhe
*Spe*I	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate Kit, 2D-Western Blot Substrat	Thermo Scientific, Rockford, USA
Strep-Tag Aufreinigung Regenerationspuffer	IBA, Göttingen
Strep-Tag Aufreinigung Strep-Tactin Superflow	IBA, Göttingen
Szintilationsflüssigkeit	PerkinElmer, Waltham, USA
T4 DNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
Tetramethylethylendiamin	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Tango Puffer	Fermentas, Ontario, Kanada
Thiourea	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-amineinmethan	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tryptone Soya Broth	Oxoid LTD, Cambridge, United Kingdom
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Urea, Sigma Ultra	Sigma-Aldrich, Steinheim
*Xba*I	Fermentas, Ontario, Kanada

2.4 Antikörper und Sekundärreagenzien

IVIG Intratect 50 mg/mL	Biotest Pharma GmbH, Dreieich
IVIG Privigen 100 mg/mL	CSL Behring, Marburg
Maus anti-Human IgE, Biotin-konjugiert, 0,4 mg/mL	Invitrogen, Karlsruhe Katalog-Nr.: 054740
Maus anti-Human IgG1, Peroxidase-konjugiert, 1 mg/mL	Invitrogen, Karlsruhe Katalog-Nr.: A-10648
Maus anti-Human IgG4, Peroxidase-konjugiert, 1mg/mL	Invitrogen, Karlsruhe Katalog-Nr.: A-10654
Streptavidin, Peroxidase-konjugiert, 1 mg/mL	Dianova, Hamburg Katalog-Nr.: 016-030-084
Ziege anti-Human IgG (Fc-spezifisch), Peroxidase-konjugiert, 0,8 mg/mL	Dianova, Hamburg Katalog-Nr.: 109-035-098
Ziege anti-Human IgG (H+L), Peroxidase-konjugiert, 0,8 mg/mL	Dianova, Hamburg Katalog-Nr.: 109-035-088
Ziege anti-Human IgG (Fc-spezifisch), R-Phycoerythrin-konjugiert, 0,5 mg/mL	Dianova, Hamburg Katalog-Nr.: 109-116-098

2.5 Medien, Puffer und Lösungen

10× Laufpuffer SDS-Gele	Tris	30,0 g
	Glycin	144 g
	SDS	10 g
	aq. dest.	ad 1 L
5× Ladepuffer SDS-Gele	Glycerol 50 % in *aq. dest.*	5,0 mL
	Tris 1 M, pH 6,8	0,6 mL
	SDS 10 %	2,0 mL
	β-Mercaptoethanol	0,5 mL
	Bromphenolblau	1 mL
	aq. dest.	ad 10 mL

Agarose 0,5 %	Agarose	0,5 g
	Laufpuffer 1×	100 mL
Agarosegele, 1,5 %	Agarose	3 g
	TBE 1×	200 mL
	Redsafe	5,7 µL
Äquilibrierungsgrundlösung (für	Urea	1,5 g
Äquilibrierungslösung A und B)	Tris 1,5M, pH 8,8	1,25 mL
	Glycerol 87 %	1,15 mL
	SDS 20 %	1,0 mL
	HPLC-Wasser	ad 5 mL
Äquilibrierungslösung A	Äquilibrierungsgrundlösung	2,5 mL
	DTT	0,025 g
Äquilibrierungslösung B	Äquilibrierungsgrundlösung	2,5 mL
	IAA	0,0625 g
	Bromphenolblau	Pipettenspitze
Blockpuffer, 2D-Western Blots	TBS/T	400 mL
	Milchpulver	20 g
Blockpuffer, ELISA	PBS	45 mL
	FCS	5 mL
Blockpuffer, Flexmap3D Assay	PBS	99 mL
	BSA	1 mL
Blockpuffer, Simple Western Assay	*Blocking reagent* für ELISA	0,27 g
	aq. dest.	ad 10 mL
Coomassie-Färbelösung	Methanol	400 mL
	Essigsäure	100 mL
	Coomassie brilliant blue G250	2,5 g
	aq. dest.	ad 1 L
E. coli-Aufschlusspuffer	5× Ladepuffer SDS-Gele	10 mL
	Harnstoff	3,6 g
Kompetenz-Medium	LB-Medium	1 000 mL
	Sorbitol	182,2 g

LB-Agar	LB	20,6 g
	Agar	15 g
	aq. dest.	ad 1 L
LB-Medium	LB	20,6 g
	aq. dest.	ad 1 L
PBS 1×, pH 7,4	NaCl	8,0 g
	KCl	0,2 g
	Na_2HPO_4	1,44 g
	KH_2PO_4	0,24 g
	HCl	Zum Einstellen des pH-Wertes
	aq. dest.	ad 1 L
PBS/T 0,05 %	PBS 1×	1 L
	Tween-20	0,5 mL
PBS/T 0,1 %	PBS 1×	1 L
	Tween-20	1 mL
Puffer A (Tris 0,02 M, pH 7,5)	Tris	2,42 g
	HCl	Zum Einstellen des pH-Wertes
	aq. dest.	ad 1 L
Puffer B (Tris 0,02 M, 1 M NaCl, pH 7,5)	Tris	2,42 g
	HCl	Zum Einstellen des pH-Wertes
	NaCl	58,44 g
	aq. dest.	ad 1 L
Puffer E, steril filtriert (0,22 mM; Elutionspuffer Strep-Tag)	Puffer W	200 mL
	D-Desthiobiotin	0,107 g

Puffer W, pH 8,0, steril filtriert (0,22 mM; Elutionspuffer Strep-Tag)	Tris	12,114 g
	NaCl	23,376 g
	EDTA	0,292 g
	HCl	Zum Einstellen des pH-Wertes
	aq. dest.	ad 1 L
R5H-Medium	RPMI 1640	500 mL
	Humanserumpool	27 mL
	Penicillin/Streptomycin/Glutamin	10 mL
	Nicht-essentielle Aminosäuren 100×	5,4 mL
	Natriumpyruvat 100 mM	5,4 mL
	β-Mercaptoethanol	550 µL
R10F-Medium	RPMI 1640	500 mL
	FCS	50 mL
	Penicillin/Streptomycin/Glutamin	10 mL
Rehydratisierungspuffer	Urea	4,80 g
	Thiourea	1,52 g
	CHAPS	0,20 g
	HPLC-Wasser	ad 10 mL
Sammelgel, 1D-SDS-Gele	*aq. dest.*	3,0 mL
	Tris 0,5 M, pH 6,8	1,25 mL
	Acrylamid	650 µL
	SDS 10 %	50 µL
	APS 10 %	26 µL
	TEMED	6 µL
TBE 5×	Tris	104 g
	Borsäure	27,5 g
	EDTA	3,75 g
	aq. dest.	ad 2 l

TBS 10×, pH 7,6	Tris	24,2 g
	NaCl	80 g
	HCl	Zum Einstellen des pH-Wertes
	aq. dest.	ad 1 L
TBS/T	TBS 1×	1 L
	Tween-20	1 mL
Tintenfärbelösung	Essigsäure	4 mL
	PBS/T 0,1 %	400 mL
	Pelikan Tinte 4001	0,4 mL
Transferpuffer, pH 8,5	Tris	6,05 g
	Glycin	30 g
	Methanol	400 mL
	HCl	Zum Einstellen des pH-Wertes
	aq. dest.	ad 2 l
Trenngel, 1D-SDS-Gele	Acrylamid	4,8 mL
	SDS 10 %	120 µL
	Tris 1,5 M, pH 8,8	3,0 mL
	aq. dest.	4,14 mL
	APS 10 %	70 µL
	TEMED	7 µL
Trenngel, 2D-SDS-Gele	Acrylamid	37,5 mL
	Tris 1,5 M, pH 8,8 (0,4 % SDS)	30 mL
	aq. dest.	52 mL
	APS 10 %	600 µL
	TEMED	30 µL
Trichloressigsäure 100 %	TCA	125 g
	aq. dest.	ad 125 mL

Tris 0,5 M, pH 6,8	Tris	60,6 g
	HCl	Zum Einstellen des pH-Wertes
	aq. dest.	ad 1 L
Tris 1 M, pH 6,8	Tris	121,3 g
	HCl	Zum Einstellen des pH-Wertes
	aq. dest.	ad 1 L
Tris 1,5 M, pH 8,8	Tris	182 g
	HCl	Zum Einstellen des pH-Wertes
	aq. dest.	ad 1 L
Tris 1,5 M, pH 8,8 (0,4 % SDS)	Tris	182 g
	SDS 20 %	20 mL
	HCl	Zum Einstellen des pH-Wertes
	aq. dest.	ad 1 L
TSB-Medium	TSB	15 g
	aq. dest.	ad 500 mL

2.6 Kits

CBA Human Flex Sets (IL-5, IL-8, IL-9, IL-12p70, IL-13)	BD, Heidelberg
CBA Human Th1/Th2/Th17 Kit	BD, Heidelberg
CBA Human Soluble Protein Master Buffer Kit	BD, Heidelberg
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Fast-Link DNA Ligation Kit	Epicentre Biotechnologies, Madison, USA
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche, Basel, Schweiz
Pastorex Staph Plus	BioRad, München

Peggy Simple Western Kit Molekulare Masse	ProteinSimple, Santa Clara, USA
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Simon Simple Western Kit Molekulare Masse	ProteinSimple, Santa Clara, USA

2.7 Bakterienstämme und Phagen

B. subtilis 6051HGW LS8P-D, elektrokompetent	Zur Verfügung gestellt von Jana Kumpfmüller (AG Schweder, Universität Greifswald)
E. coli DH10B, elektrokompetent	Zur Verfügung gestellt von Jana Kumpfmüller (AG Schweder, Universität Greifswald)
E. coli One Shot BL21 (DE3) pLysS	Invitrogen, Karlsruhe
E. coli One Shot DH5α T1 Phage-Resistant	Invitrogen, Karlsruhe
Phage φ11	Zur Verfügung gestellt von Dr. Marc Burian (AG Völker, Universität Greifswald)
S. aureus 302Δ*spa*	Zur Verfügung gestellt von Dr. Julia Kolata (AG Bröker, Universität Greifswald) [141]
S. aureus SA113Δ*spa*	Zur Verfügung gestellt von Dr. Christiane Görke (AG Wolz, Universität Tübingen)
S. aureus USA300	Zur Verfügung gestellt von Professor Dr. Friedrich Götz (Universität Tübingen)
S. aureus USA300Δ*spa*	In dieser Arbeit erstellt

2.8 Humanblut und -seren

buffy coats (Humanes Leukozytenkonzentrat von gesunden Spendern mit unbekanntem *S. aureus*-Trägerstatus)	Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie, Abteilung Transfusionsmedizin, Universitätsmedizin Greifswald

Humanes EDTA-Vollblut von gesunden Spendern mit bekanntem *S. aureus*-Trägerstatus (mittleres Alter: 23,1 ± 1,6 Jahre, siehe Anhang Tabelle 8.4)	Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie, Abteilung Immunologie, Universitätsmedizin Greifswald
Humanserumpool (für Zellkultur-Medium) von gesunden Spendern mit unbekanntem *S. aureus*-Trägerstatus	Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie, Abteilung Transfusionsmedizin, Universitätsmedizin Greifswald
Humanserumpool für Antikörperstudien aus Seren von 20 gesunden Spendern mit unbekanntem *S. aureus*-Trägerstatus	Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie, Abteilung Immunologie, Universitätsmedizin Greifswald
SH-Plasmen und -Seren (Humanplasmen und -seren von gesunden Spendern mit bekanntem *S. aureus*-Trägerstatus)	Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie, Abteilung Immunologie, Universitätsmedizin Greifswald [142]
AD-Seren (Humanseren von Atopische Dermatitis-Patienten mit unbekanntem *S. aureus*-Trägerstatus, mittleres Alter: 34 ± 11,1 Jahre)	Zur Verfügung gestellt von Professor Dr. Thomas Werfel (MH-Hannover)
AD-Seren und Kontroll-Seren (Humanseren von Atopische Dermatitis-Patienten (mittleres Alter: 33,4 ± 19,8 Jahre) und gesunden Spendern (mittleres Alter: 36 ± 9,6 Jahre) mit bekanntem *S. aureus*-Trägerstatus, siehe Anhang Tabelle 8.1)	Zur Verfügung gestellt von Professor Dr. Regine Gläser (Universität Kiel)
Bakteriämie-Seren (Humanseren von *S. aureus*-Bakteriämiepatienten mit unbekanntem *S. aureus*-Trägerstatus, mittleres Alter: siehe Anhang Tabelle 8.2)	Zur Verfügung gestellt von Professor Dr. Mary-Claire Roghmann (University of Maryland, USA)

CF-Seren (Humanseren von Patienten mit zystischer Fibrose und positivem *S. aureus*-Trägerstatus in der Lunge, mittleres Alter: 20 ± 8,9 Jahre)	Zur Verfügung gestellt von Professor Dr. Barbara Kahl (Universität Münster)
HIES-Seren (Humanseren von Hyper-IgE-Syndrom Patienten (STAT3) mit positivem *S. aureus*-Trägerstatus, mittleres Alter: 19,1 ± 12,1 Jahre, siehe Anhang Tabelle 8.3)	Zur Verfügung gestellt von PD Dr. Eleonore Renner (Universität München)
Asthmatiker Seren (Humanseren von Asthma-Patienten mit unbekanntem *S. aureus*-Trägerstatus, mittleres Alter: 47,1 ± 16,6)	Zur Verfügung gestellt von Professor Dr. Claus Bachert (Universität Gent, Belgien)
Psoriasis-Seren (Humanseren von Psoriasis-Patienten mit unbekanntem *S. aureus*-Trägerstatus, mittleres Alter: 44,1 ± 12,7 Jahre)	Zur Verfügung gestellt von Professor Dr. Thomas Werfel (MH-Hannover)
ssl-Seren (Humanseren von gesunden Spendern mit bekanntem *S. aureus*-Trägerstatus, mittleres Alter: 22,3 ± 2,17 Jahre, siehe Anhang Tabelle 8.4)	Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie, Abteilung Immunologie, Universitätsmedizin Greifswald

2.9 Plasmide

pPR-IBA1	Invitrogen, Karlsruhe
pJK267 (pMSE3-Derivat [143])	Zur Verfügung gestellt von Jana Kumpfmüller (AG Schweder, Universität Greifswald)
pPR-IBA1 (Hla Strep-Tag)	Zur Verfügung gestellt von Dr. Dorothee Grumann (AG Bröker, Universität Greifswald)

2.10 Rekombinante Proteine

SEB (SACOL0907), C-terminaler Strep-Tag	Zur Verfügung gestellt von Dr. Dorothee Grumann (AG Bröker, Universität Greifswald)
SplD (SAUSA300_1755), C-terminaler Strep-Tag	Zur Verfügung gestellt von Christopher Link (AG Bröker, Universität Greifswald)

2.11 Primer

splA 5‘ SLIC-Klonierung	GTG AAC CCT AAA TAG AAG GAG GAA ACA CAT ATG AAT AAA AAT GTA ATG GTT AAA G
splA 3‘ SLIC-Klonierung	GTT TAG AGG CCC CAA GGG GTT ATG CTA ACT AGT TTA TTT TTC AAT ATT ATT TTG
splB 5‘ SLIC-Klonierung	GTG AAC CCT AAA TAG AAG GAG GAA ACA CAT ATG AAC AAA AAC GTA GTC ATC AAG A
splB 3‘ SLIC-Klonierung	GTT TAG AGG CCC CAA GGG GTT ATG CTA ACT AGT TTA TTT ATC TAT GTT TTC TG
splD 5‘ SLIC-Klonierung	GTG AAC CCT AAA TAG AAG GAG GAA ACA CAT ATG AAT AAA AAT ATA ATC ATC AAA AGT ATT GCG
splD 3‘ SLIC-Klonierung	GTT TAG AGG CCC CAA GGG GTT ATG CTA ACT AGT TTA TTT ATC TAA ATT ATC TGC AAT A
splE 5‘ SLIC-Klonierung	GTG AAC CCT AAA TAG AAG GAG GAA ACA CAT ATG AAT AAA AAT ATA ATC ATC AAA AGT ATT GCA
splE 3‘ SLIC-Klonierung	GTT TAG AGG CCC CAA GGG GTT ATG CTA ACT AGT TTA TTT ATC TGT GTT ATC TG
splF 5‘ SLIC-Klonierung	GTG AAC CCT AAA TAG AAG GAG GAA ACA CAT ATG AAT AAA AAT ATA ATC ATC AAA AGT ATT GGA
splF 3‘ SLIC-Klonierung	GTT TAG AGG CCC CAA GGG GTT ATG CTA ACT AGT TTA TTT ATC TAA ATT ATC TGC AAT G

splC 5‘ Strep-Tag-Klonierung	ATG GTA GGT CTC AAA TGG TCG TTG AAG AGA CAC AAC AAA TAG
splC 3‘ Strep-Tag-Klonierung	ATG GTA GGT CTC AGC GCT TTG TTC AAT GTG CTT TTG AAT AAA ATC
eryR 5‘	ATT TTG AGG GTT GCC AGA
eryR 3‘	CGT GAT TTT GCG GTT TTA
spa 5‘	TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C
spa 3‘	CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT
pMSE3 5'	GCA AGC AGC AGA TTA CGC GC
pMSE3 3'	CTA TTC AGT TCG TTG TTT CG

2.12 Programme und Datenbanken

Compass 2.6.6	ProteinSimple, Santa Clara, USA
Delta2D 4.2	Decodon, Greifswald
Endnote X7	Thomson Reuters, New York, USA
FACS Diva Software 6.2	BD, Heidelberg
Fcap Array 3	Soft Flow, Pécs, Ungarn
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, La Jolla, USA
ImageQuant 5.2	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Microsoft Office 2010 und 2013	Microsoft, Redmond, USA
PDQuest advanced	BioRad, München
Photoshop CS5	Adobe Systems GmbH, München
Primer D`Signer 1.1	IBA, Göttingen
Swift Quant	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden

AureoWiki	http://www.protecs.uni-greifswald.de/aureowiki/Main_Page
Multalin	http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
SignalP	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
Uniprot	http://www.uniprot.org/

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Isolation von *S. aureus* aus dem Nasenvorhof

Für die Überprüfung des *S. aureus*-Trägerstatus wurde mit einem Wattestäbchen ein Nasenabstrich aus beiden Nasenvorhöfen des Probanden genommen. Dieser wurde anschließend auf einer Blutagarplatte ausgestrichen.

3.1.2 Anzucht von *S. aureus* auf Blutagarplatten

Für die Anzucht von *S. aureus* auf Blutagarplatten wurde ein Vereinzelungsausstrich eines Glycerolstocks, bzw. ein großflächiger Ausstrich eines Nasenabstriches, auf eine Blutagarplatte angefertigt. Die Blutagarplatte wurde anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.3 Anzucht von *S. aureus* in Flüssigmedien

Die Anzucht von *S. aureus* in Flüssigmedium erfolgte der Versuchsbeschreibung entsprechend in TSB- oder LB-Medium. Zunächst wurde eine Übernachtkultur angefertigt. Dazu wurde die entsprechende Menge Medium mit einer *S. aureus*-Kolonie von einer Agarplatte angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 100 rpm (linear), um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Anschließend wurde die OD bei 595 nm (OD_{595}) gemessen und eine Hauptkultur mit entsprechendem Volumen der Übernachtkultur angeimpft, so dass diese eine OD_{595} von 0,05 erreichte (GeneRay UV-Photometer). Die Hauptkultur wurde bis zum Erreichen der gewünschten Wachstumsphase bei 37 °C und 100 rpm (linear) inkubiert. Dabei wurde die OD_{595} stündlich gemessen. Als stationäre Wachstumsphase wurde der Zeitpunkt 3,5 h nach Verlassen des exponentiellen Wachstums definiert.

3.1.4 Koagulationstest

Bei der Anzucht von Nasenabstrichen auf Blutagarplatten wachsen verschiedene Bakterienkolonien. Zur Identifizierung von *S. aureus*-Kolonien wurde ein Agglutinationstest

durchgeführt (Pastorex Staph Plus). Dieser beinhaltet Latexkügelchen die mit *S. aureus*-spezifischen monoklonalen Antikörpern (anti-Kapselpolysaccharide), Fc-Fragmenten von IgG-Antikörpern und Fibrinogen beschichtet sind, wodurch *S. aureus*-Zellen mit ihnen vernetzt werden.
Die zu untersuchende Bakterienkolonie wurde mit den Latexkügelchen gemischt. Bestand die zu untersuchende Kolonie aus *S. aureus*-Zellen, wurde dies durch Agglutination sichtbar.

3.1.5 Anlegen von Glycerolstocks

Um *S. aureus*-Stämme zu verwahren, wurden Glycerolstocks angefertigt. Dazu wurde eine *S. aureus*-Kolonie von einer Blutagarplatte in 3 mL LB-Medium überführt und für 5 h bei 37 °C und 200 rpm (zirkulär) inkubiert. Anschließend wurden 800 µL der *S. aureus*-Kultur mit 200 µL Glycerol gemischt und der Glycerolstock bei -80 °C aufbewahrt.

3.1.6 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer *S. aureus*-DNA erfolgte mit dem DNeasy Blood and Tissue Kit der Firma Qiagen. Dazu wurden 2,2 mL einer *S. aureus*-Kultur (siehe 3.1.5) für 2 min bei 16 000 *g* zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 124 µL Lysepuffer resuspendiert und anschließend wurden 36 µL Lysozym und 20 µL Lysostaphin dazugegeben. Die Suspension wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 25 µL Proteinase K und 200 µL Puffer AL dazugegeben und vermischt. Nach einem weiteren Inkubationsschritt (30 min, 56 °C) wurden 200 µL 96%-iger Ethanol dazugegeben und das Lysat auf eine DNeasy Mini Spin Säule gegeben. Nach Zentrifugation (1 min, 16 000 *g*) wurde der Durchlauf verworfen und 500 µL Puffer AW1 auf die Säule gegeben. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (1 min, 16 000 *g*), der Durchlauf verworfen und 500 µL Puffer AW2 auf die Säule gegeben. Durch zwei Zentrifugationsschritte (3 min und 1 min bei jeweils 16 000 *g*) wurde die DNeasy Membran getrocknet und die Säule danach in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 100 µL PCR-Wasser und anschließendem Zentrifugieren (1 min, 16 000 *g*) wurde die in der Säule befindliche *S. aureus*-DNA eluiert.

3.1.7 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde am Gerät Infinite M200 Pro (Tecan) durchgeführt. Dazu wurden 1,5 µL der gereinigten DNA auf die NanoQuant-Platte aufgetragen und die DNA-Konzentration entsprechend der Herstelleranweisung ermittelt. Als Leerwert dienten 1,5 µL PCR-Wasser.

3.1.8 Gewinnung von Bakterienüberständen

Eine *S. aureus*-Flüssigkultur wurden wie in 3.1.3 beschrieben angelegt. Als Medium wurden 600 mL TSB eingesetzt (für Eisen-limitierende Wachstumsbedingungen zusätzlich mit 300 µM bis 2 400 µM 2,2′-Bipyridyl versetzt). Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase wurde die *S. aureus*-Kultur 10 min bei 8 000 *g* zentrifugiert, um *S. aureus*-Zellen und Überstand zu trennen. Der Überstand wurde anschließend filtriert (0,22 µm) und entweder bei -20 °C gelagert oder für die Präparation extrazellulärer *S. aureus*-Proteine weiterbenutzt (siehe 3.2.1).

3.1.9 Gewinnung von Bakterienzellen und Abtöten durch UV-Licht

Eine *S. aureus*-Flüssigkultur wurden wie in 3.1.3 beschrieben angelegt. Als Medium wurden 40 mL TSB eingesetzt (für eisenlimitierte Wachstumsbedingungen zusätzlich mit 600 µM 2,2′-Bipyridyl versetzt). Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase wurde die *S. aureus*-Kultur 10 min bei 4 °C und 1 800 *g* zentrifugiert, um *S. aureus*-Zellen und Überstand zu trennen. Die *S. aureus*-Zellen wurden anschließend zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen (10 min, 4 °C, 1 800 *g*) und nach dem letzten Waschschritt in 30 mL kaltem PBS aufgenommen. Zum Abtöten wurden sie in Petrischalen überführt und für 1 h unter der Sterilwerkbank mit UV-Licht bestrahlt. Danach wurden sie erneut gewaschen (10 min, 4 °C, 1 800 *g*) und in PBS auf die OD_{595} 1,0 eingestellt (GeneRay UV-Photometer). Zur Kontrolle der Abtötung wurden 50 µL der Suspension auf eine Blutagarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Präparation extrazellulärer *S. aureus*-Proteine aus dem Kulturüberstand

Für die Präparation von extrazellulären *S. aureus*-Proteinen aus gefilterten Bakterienüberständen wurden die darin enthaltenen *S. aureus*-Proteine mit Trichloressigsäure (TCA, Endkonzentration: 10 %) über Nacht bei 4 °C gefällt. Die ausgefällten Proteine wurden durch Schwenken resuspendiert und die Lösung 60 min bei 4 °C und 11 000 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Proteinpellet in 2 mL 70%-igem, unvergälltem Ethanol resuspendiert und danach zentrifugiert (3 min, 16 000 *g*). Anschließend wurden die Proteine fünf Mal mit jeweils 500 µL 70%-igem, unvergälltem Ethanol gewaschen. Dazu wurde der Überstand nach dem Zentrifugieren verworfen, die Proteinpellets in Ethanol aufgenommen und 20 min bei 20 °C und 700 rpm (Thermoschüttler) inkubiert und wieder zentrifugiert (3 min, 16 000 *g*). Ein sechster Waschschritt wurde abschließend mit 100%-igem, unvergälltem Ethanol durchgeführt. Nach dem möglichst vollständigen Entfernen des Ethanols wurde das Proteinpellet im offenen Reaktionsgefäß unter der Sterilwerkbank getrocknet. Je nach Pelletgröße wurden dann 100 µL bis 200 µL Rehydratisierungspuffer (RHB) dazugegeben und die Pellets 30 min bei 700 rpm (Thermoschüttler) und 20 °C aufgelöst. Nach Zentrifugation (30 min, 16 000 *g*) wurden der proteinhaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinlösung mit den enthaltenen extrazellulären *S. aureus*-Proteinen wurde 1:100 und 1:10 verdünnt. Von den Verdünnungen wurden jeweils 5 µL mit 795 µL *aq. dest.* und 200 µL Bradford gemischt. Die OD_{595} der Lösungen wurde photometrisch mit Swift Quant gemessen (Photometer Ultrospec 2100 pro). Daraus konnte mit Hilfe einer Standardkurve aus bovinem Serumalbumin (BSA) und eines Leerwerts ohne Protein die Konzentration der Proteinlösung ermittelt werden.

3.2.3 Eindimensionale Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche Natriumdodecyl-Sulfatpolyacrylamid- (SDS-)Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) dient zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse.

Vor der Auftrennung der Proteine wurde die proteinhaltige Probe mit 5× Ladepuffer versetzt, wovon nach dem Kochen (5 min, 95 °C) 10 µL in eine Geltasche überführt wurden. Durch Anlegen von 200 V wurde die Auftrennung gestartet. Sie wurde beendet, sobald die Lauffront aus dem Gel lief. Durch anschließende Färbung der Proteine mit Coomassie (siehe 3.2.6) und der Verwendung eines Größenstandards konnten die molekularen Massen der Proteinbanden ermittelt werden.

3.2.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese

In der zweidimensionalen (2D-) Gelelektrophorese werden Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und in der zweiten Dimension nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt. In der ersten Dimension werden dafür sogenannten IPG-Streifen verwendet, die aus einer Gelschicht mit vorgegebenen pH-Gradienten bestehen. Die Proteine besitzen eine Eigenladung, deren Betrag abhängig vom pH des umgebenen Milieus ist. Ist der pH gleich dem pI des Proteins, so besitzt es keine Nettoladung mehr. Durch das Anlegen einer Spannung bewegen sich die Proteine nun durch die Gelschicht bis sie den pH-Bereich der Gelschicht erreichen der ihrem pI entspricht, wodurch die Auftrennung in der ersten Dimension abgeschlossen ist. Für die zweite Dimension werden anschließend die IPG-Streifen mit SDS-haltigen Puffern inkubiert und danach auf SDS-Gele platziert. Die zweite Dimension erfolgt durch Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse, wobei beim Anlegen einer Spannung größere Proteine langsamer durch das SDS-Gel laufen als kleinere Proteine.

3.2.4.1 Isoelektrische Fokussierung

Je nach verwendetem pH-Bereich auf den IPG- (immobilisierter pH-Gradient) Streifen unterscheiden sich die Durchführungen für die Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension voneinander. Während IPG-Streifen mit dem pH-Bereich 4-7 zeitgleich bei ihrer Rehydratisierung mit den Proteinen beladen werden können, müssen IPG-Streifen mit den pH-

Bereich 6-11 zuerst rehydratisiert werden, um anschließend beim sogenannten *cuploading*-System mit den Proteinen beladen werden zu können.

Die Zusammensetzung der Rehydratisierungslösung (RH-Lösung) für IPG-Streifen verschiedener Längen und pH-Bereiche ist in Tabelle 3.1 dargestellt. Vor der Rehydratisierung wurde eine Spatelspitze Bromphenolblau der RH-Lösung beigefügt und gut gemischt. Die RH-Lösung für IPG-Streifen mit dem pH-Bereich 4-7 enthielt bereits die entsprechenden Proteine (30 µg Protein je 7 cm IPG-Streifen, 100 µg Protein je 11 cm IPG-Streifen). Nach Inkubation für 30 min bei 20 °C und 800 rpm (Thermoschüttler) wurde die RH-Lösung zentrifugiert (10 min, 16 000 *g*) und anschließend als schmaler Streifen (125 µL für 7 cm IPG-Streifen, 150 µL für 11 cm IPG-Streifen) in einer Rehydratisierungsschale vorgelegt. Die IPG-Streifen wurden blasenfrei mit der Gelseite nach unten auf die vorgelegten RH-Lösungen gelegt, mit Mineralöl überschichtet und für 24 h bei 20 °C inkubiert.

Tabelle 3.1: Übersicht der RH-Lösungen für die eingesetzten IPG-Streifen.

	7 cm IPG-Streifen		**11 cm IPG-Streifen**	
Komponente	**pH 4-7 (µL)**	**pH 6-11 (µL)**	**pH 4-7 (µL)**	**pH 6-11 (µL)**
RHB	110 (inkl. 30 µg Protein)	85	132 (inkl. 100 µg Protein)	102
10× DTT	12,5	-	15	-
25 % DTT in RHB	-	12,5	-	15
50 % Glycerol in RHB	-	12,5	-	15
Isopropanol	-	12,5	-	15
Pharmalyte pH 3-10	2,5	1,25	3,0	1,5
Pharmalyte pH 8,5-10,5	-	1,25	-	1,5
Summe	125 µL	125 µL	150 µL	150 µL

Nach erfolgter Rehydratisierung wurde die isoelektrische Fokussierung (IEF) in einer IEF-Kammer durchgeführt. Dazu wurden die IPG-Streifen zuerst mit *aq. dest.* abgespült und anschließend mit der Gelseite nach oben in einer IEF-Kammer platziert. Am Pluspol wurde ein in *aq. dest.*-getränktes Whatman-Papier zur Hälfte auf das Ende der Gele gelegt und die Elektrode aufgesetzt. Bei IPG-Streifen mit dem pH-Bereich 6-11 wurden nun die Proteine durch *cuploading* aufgebracht (Tabelle 3.2). Dazu wurde ein *cupholder* direkt unter der Elektrode auf die Gele platziert und die Dichtigkeit der *cups* zu den Gelen durch Zugabe von 100 µL Mineralöl überprüft. Anschließend wurden 100 µL der proteinhaltige Probenlösung je *cup* gegeben (30 µg Protein je 7 cm IPG-Streifen, 100 µg Protein je 11 cm IPG-Streifen).

Tabelle 3.2: Übersicht der *cuploading*-Lösungen für IPG-Streifen pH 6-11.

Schritt	***Cuploading*-Lösung**	
	7 cm IPG-Streifen (µL)	**11 cm IPG-Streifen (µL)**
RHB	68 (inkl. 30 µg Protein)	68 (inkl. 100 µg Protein)
25 % DTT in RHB	10	10
50 % Glycerol in RHB	10	10
Isopropanol	10	10
Pharmalyte pH 3-10	1	1
Pharmalyte pH 8,5-10,5	1	1
Summe	100 µL	100 µL

Die restliche Vorbereitung der IEF war ab diesem Punkt für beide pH-Bereiche gleich. Am Minuspol wurde ebenfalls ein *aq. dest.*-getränktes Whatman-Papier zur Hälfte auf das Ende der Gele gelegt und darüber ein in 15 mM DTT-Lösung getränktes Whatman-Papier auf die Gele gelegt. Die Elektrode wurde aufgesetzt, die IPG-Streifen mit Mineralöl überschichtet und das IEF-Programm entsprechend der verwendeten IPG-Streifen gestartet (Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4). Nach der IEF wurden die IPG-Streifen bis zur Auftrennung in der zweiten Dimension bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3.3: IEF-Programme für 7 cm IPG-Streifen.

	pH Bereich 4-7			**pH-Bereich 6-11**		
Schritt	**Volt**	**Voltstunde**	**Zeit (h:min)**	**Volt**	**Voltstunde**	**Zeit (h:min)**
1	200	1	00:01	200	1	00:01
2	3 500	2 800	01:30	3500	2 800	01:30
3	3 500	5 200	01:30	3500	3 700	01:05
Summe		8 001	03:01		6 501	02:36

Tabelle 3.4: IEF-Programme für 11 cm IPG-Streifen.

	pH Bereich 4-7			**pH-Bereich 6-11**		
Schritt	**Volt**	**Voltstunde**	**Zeit (h:min)**	**Volt**	**Voltstunde**	**Zeit (h:min)**
1	300	1	00:01	200	1	00:01
2	3 500	2 900	01:30	3500	2 900	01:30
3	3 500	12 100	03:30	3500	9 100	02:30
Summe		15 001	05:01		12 001	04:01

3.2.4.2 Auftrennung nach molekularer Masse

Die Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension erfolgte mittels SDS-PAGE. Dazu wurden die IPG-Streifen aufgetaut und 15 min in Äquilibrierungslösung A (2,5 mL/IPG-Streifen) und anschließend 15 min in Äquilibrierungslösung B (2,5 mL/IPG-Streifen) langsam schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die IPG-Streifen auf SDS-Gele mit 0,5%-iger Agarose fixiert. Die Auftrennung der Proteine aus 7 cm IPG-Streifen erfolgte durch Anlegen von 0,015 A je Gel bis die Lauffront begann aus den Gelen zu laufen. Für 11 cm IPG-Streifen wurden große Gele (25 cm breit) genutzt und eine konstante Leistung von 1 W eingestellt bis die gewünschte Auftrennung erreicht war.

3.2.5 Zweidimensionaler Western Blot

Für die Durchführung der zweidimensionalen (2D-) Western Blots wurden PVDF-Membranen in der Größe der 2D-Gele (Minigel) genutzt. Diese wurden zunächst aktiviert, indem sie für 15 s in 100%-igem Methanol getränkt und danach 2 min mit *aq. dest.* gewaschen wurden. Anschließend wurden sie in Transferpuffer aufbewahrt. In die Blot-Apparatur wurden die PVDF-Membranen auf jeweils drei mit Transferpuffer durchtränkte Whatman-Papiere in der Größe der PVDF-Membranen gelegt. Auf die PVDF-Membranen wurden die SDS-Gele gelegt und auf diese wieder jeweils drei mit Transferpuffer durchtränkte Whatman-Papiere. Die Übertragung der Proteine erfolgte durch das zweistündige Anlegen einer Stromstärke von 0,08 A je Western Blot.

Die Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membranen wurde durch Tintenfärbung überprüft. Dazu wurden die PVDF-Membranen 10 min in Tintenfärbelösung schüttelnd inkubiert und anschließend eingescannt. Durch Waschen in TBS/T wurden die PVDF-Membranen wieder entfärbt und danach 1 h schüttelnd in Blockpuffer inkubiert, um die freien Bindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation mit humanem Serum (1:10 000 in Blockpuffer) erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler. Danach wurden die Membranen fünf Mal für jeweils 5 min mit TBS/T gewaschen und 1 h mit einem Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper in Blockpuffer inkubiert (Ziege anti-Human IgG (H+L), Dianova, 4 ng/mL). Anschließend wurden die PVDF-Membranen fünf Mal für jeweils 5 min mit TBS/T gewaschen und 5 min mit Luminol (SuperSignal West Femto Maximum, BD) inkubiert. Die Lumineszenz wurde mit dem Western Blot Imager der Firma Intas aufgenommen (Aufnahmezeiten 1 min). Die Grauwerte der Bilder

wurden anschließend im Programm ImageQuant 5.2 (Amersham Biosciences) einheitlich eingestellt, um die Signale der Western Blots, die mit dem gleichen Sekundärantikörper inkubiert wurden, vergleichen zu können. Von jedem 2D-Western Blot wurden drei technische Replikate erstellt.

3.2.6 Proteinfärbung mit Coomassie

Für die Färbung von Proteinen in SDS-Gelen mit Coomassie wurden die Gele für 30 min in Coomassie Brilliant Blau G250 langsam schwenkend inkubiert. Anschließend wurde die Hintergrundfärbung durch mehrmaliges Aufkochen in *aq. dest.* reduziert und die Gele eingescannt.

3.2.7 Proteinfärbung mit Flamingo

Die Flamingofärbung wurde ausschließlich für 2D-Gele angewendet. Dazu wurden diese zunächst 1 h in Fixierlösung inkubiert, zwei Mal mit *aq. dest.* gewaschen und anschließend über Nacht in Flamingo-Färbelösung langsam schwenkend inkubiert. Danach wurden die Gele 15 min mit 0,1 % Tween-20 in *aq. dest.* gewaschen, mit *aq. dest.* gespült und mit 532 nm eingescannt (100 µm, Typhoon Scanner, GE Healthcare). Zur Aufbewahrung wurden die Gele mit etwas *aq. dest.* in Folien eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

3.2.8 Ausschneiden von Proteinspots aus 2D-Gelen

Das Ausschneiden von Proteinspots aus Flamingo-gefärbten 2D-Gelen wurde maschinell am EXquest Spot Cutter (BioRad) durchgeführt. Dazu wurde eine Hohlnadel mit einem Durchmesser von 1,5 mm verwendet. Mit dem Programm PDQuest Advanced (BioRad) wurde ein Bild des Gels aufgenommen und dieses in Delta2D 4.2 (Decodon) geladen. Die Proteinspots, die ausgeschnitten werden sollten, wurden markiert und eine Liste der auszuschneidenden Proteinspots erstellt. Diese Liste wurde in PDQuest advanced geladen und das Ausschneiden gestartet. Die Gelstücke wurden jeweils mit 100 µL HPLC-Wasser in eine Kavität einer 96-*Well* Mikrotiterplatte überführt.

3.2.9 Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie

Die Identifizierung der Proteine mittels Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-*time of flight* (MALDI-ToF) wurde zusammen mit der ZIK-FunGene Nachwuchsgruppe „Angewandte Proteomics“ (Greifswald) durchgeführt [144]. Deswegen wird an dieser Stelle auf die Durchführung nur kurz eingegangen.

Der Verdau der ausgeschnittenen Gelstücke (siehe 3.2.8) mit Trypsin und das Übertragen der Peptide auf den MALDI-Probenträger wurden automatisch in der Ettan Spot Handling Workstation (GE Healthcare) durchgeführt [145]. Die MALDI-ToF Analyse wurde mittels Proteome-Analyzer 4800 (AB Sciex) durchgeführt [146]. Die Datenbanksuche wurde mit dem GPS Explorer 3.6 (AB Sciex) und der MASCOT Search Engine 2.2.04 durchgeführt. Dabei wurden Carboxyamidomethylierung von Cystein und Oxidation von Methionin als variable Modifikationen mit eingeschlossen. Identifizierungen wurden nur mit einem MOWSE-**(***molecular weight search*) Wert > 47 eingeschlossen. Identifizierungen und Gelbilder wurden in PROTECS hinterlegt [147].

3.2.10 Auswertung von Antikörperbindungen in 2D-Western Blots mit Delta2D

Das Programm Delta2D 4.2 (Decodon) wurde zum einen für die Zuordnung von 2D-Western Blot Signalen zu den massenspektrometrisch identifizierten Proteinen aus 2D-Gelen genutzt. Zum anderen wurde es dazu genutzt, Unterschiede in der Antikörperbindung von mehreren 2D-Western Blots zu erkennen. Für Ersteres wurden die entsprechenden 2D-Gelbilder und 2D-Western Blot- Bilder in Delta2D geladen. Das Gelbild wurde als Masterbild verwendet, auf das dann das Western Blot-Bild überlagert wurde. Für den Vergleich von mehreren 2D-Western Blots wurden die entsprechenden Bilder ebenfalls in Delta2D geladen und eins davon als Masterbild definiert, so dass das andere Bild darauf überlagert werden konnte. Signale, die nur im Masterbild vorhanden waren wurden blau dargestellt. Signale, die nur im darauf überlagerten Bild vorhanden waren wurden orange dargestellt und Signale die in beiden Bildern vorkamen wurden schwarz dargestellt.

3.2.11 Gel-freie Proteomanalyse

Die Gel-freie Proteomanalyse wurde durch die ZIK-FunGene Nachwuchsgruppe „Angewandte Proteomics“ (Greifswald) durchgeführt [144]. Deswegen wird an dieser Stelle auf die Durchführung nur kurz eingegangen. Durch diese Methode konnten einzelne Proteine aus *S. aureus*-Überständen, gewonnen bei Eisenlimitation und bei Zugang zu Eisen, relativ zueinander quantifiziert werden. Für jede Wachstumsbedingung wurden drei biologische Replikate erstellt und untersucht.

Die extrazellulären *S. aureus*-Proteine (siehe 3.2.1) wurden 16 h bei 37 °C mit Trypsin (0,1 µg/µL) im Verhältnis 1:25 inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von Trifluoressigsäure (Endkonzentration 0,1 %) für 5 min bei 37 °C gestoppt. Nach Zentrifugation (10 min, 13 000 *g*) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteine nach Herstellerangaben mit ZipTip (Merck Millipore) aufgereinigt. Die verdauten Peptide wurden mittels Ultimate 3 000 RSLC (Thermo Scientific) in einer 15 cm Säule, gepackt mit 2 µm C18 Partikeln, aufgetrennt und mittels Q Exactive Massenspektrometer (Thermo Scientific) analysiert.

Die Massenspektrometrie-Signale der drei Peptide eines Proteins, die die größte Intensität zeigten (Top 3), wurden für die Quantifizierung des Proteins genutzt [148]. Die Medianintensität jedes quantifizierten Proteins der drei biologischen Replikate wurde ermittelt. Für die statistische Auswertung siehe 3.5.

3.2.12 ELISA

Enzyme linked immunosorbent Assays (ELISAs) wurden genutzt um Antikörperbindungen aus humanen Seren an *S. aureus*-Proteine und UV-getöteten *S. aureus*-Zellen (siehe 3.1.9) zu untersuchen. Dazu wurden 96-*Well* Mikrotiterplatten genutzt, die die Antigene gut binden können (MaxiSorp, Nunc). Für die Beschichtung der Kavitäten mit *S. aureus*-Proteinen wurden diese in Beschichtungspuffer auf eine Konzentration von 5 µg/mL eingestellt und 100 µL davon je Kavität über Nacht bei 4 °C inkubiert. Sollten die Kavitäten mit *S. aureus*-Zellen beschichtet werden, wurden diese zuvor in PBS auf OD_{595} 1,0 eingestellt und 75 µL davon je Kavität über Nacht bei 4 °C inkubiert (GeneRay UV-Photometer). Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Kavitäten wurden drei Mal mit Waschpuffer (PBS/T 0,05 %) gewaschen und 1 h bei 100 rpm mit 150 µL Blockpuffer (10 % FCS in PBS) je Kavität

inkubiert. Danach wurde der Blockpuffer entfernt und die Kavitäten mit 50 µL in Blockpuffer seriell verdünntem Serum (Tabelle 3.5 und Tabelle 3.6) 1 h bei 100 rpm inkubiert. Nachdem die Kavitäten drei Mal mit Waschpuffer gewaschen wurden, wurden 50 µL vom Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (verdünnt in Blockpuffer, Tabelle 3.5 und Tabelle 3.6) in die Kavitäten gefüllt und 1 h bei 100 rpm inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden 50 µL Substrat (OptEIA, BD) in jede Kavität gegeben und die Mikrotiterplatten 10 min im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µL 2 N H_2SO_4 je Kavität abgestoppt. Die Absorption wurde bei 450 nm am Infinite M200 Pro (Tecan) gemessen. Als interner Standard wurde humanes Serum auf jeder Mikrotiterplatte mitgeführt. Für jede Verdünnungsstufe der Seren wurden Dubletten angefertigt.

Für die Messung von IgE gegen Spls wurde das oben beschriebene Protokoll wie folgt angepasst: Alle Waschschritte wurden fünf Mal durchgeführt. Die Seren wurden 1:5 verdünnt eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter Maus anti-Human IgE Antikörper (10 µg/mL, Invitrogen) eingesetzt. Die Antikörperbindung wurde mittels Peroxidase-konjugiertem Streptavidin (3 µg/mL, Dianova) detektiert. Aufgrund von Materialmangel wurden nur Einzelwerte für jedes Serum bestimmt. Bei der Auswertung der IgE-Bindung an Spls wurde der 1,5-fache Leerwert von den gemessenen OD_{450}-Werten abgezogen.

Tabelle 3.5: Übersicht zu den eingesetzten Sekundärantikörper-Konzentrationen und Serumverdünnungen für mit *S. aureus*-Zellen beschichtete ELISAs.

Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper	Konzentration Sekundärantikörper (ng/mL)	Erste Verdünnung Serum (Faktor für serielle Verdünnung)
Ziege anti-Human IgG (Fc-spezifisch), Dianova	26,7	1:2 500 (1:5)

Tabelle 3.6: Übersicht zu den eingesetzten Sekundärantikörper-Konzentrationen und Serumverdünnungen für mit *S. aureus*-Proteinen beschichtete ELISAs.

Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper	Konzentration Sekundärantikörper (ng/mL)	Erste Verdünnung Serum (Faktor für serielle Verdünnung)
Maus anti-Human IgG1, Invitrogen	100	1:50 (1:5)
Maus anti-Human IgG4, Invitrogen	100	1:50 (1:5)

Die Auswertung der Antikörperbindung an *S. aureus*-Zellen und die IgG4-Bindung an SplC, SplD und Hla bei AD und Psoriasis (siehe 4.3.1) wurde mittels GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) für nicht-lineare Standardkurven durchgeführt. Es wurden die Mittelwerte der Dubletten (OD_{450}) gebildet und davon die *arbitrary units* (AU) im Vergleich zum mitgeführten Standardserum erstellt.

Die Auswertung aller anderen IgG1- und IgG4-Antikörperbindungen an *S. aureus*-Proteine im ELISA und Berechnung der Titer wurde mit Hilfe von Dr. rer. nat. Stephan (ZIK-FunGene Nachwuchsgruppe „Angewandte Proteomics“, Greifswald) durchgeführt. Hierbei wurde aus den Mittelwerten der Dubletten (OD_{450}) eine hyperbolische Standardkurve erstellt. Die Halbmaximale OD_{450} wurde mit der Verdünnung an diesem Punkt multipliziert. Dieser Wert wurde als Titer in AU angegeben. Diese Berechnungen wurden mit dem Programm R statistical language 3.0.1 durchgeführt [149]. Für Seren, deren spezifischer Antikörper-Gehalt zu gering war, um eine hyperbolische Standardkurve zu erstellen, wurde der niedrigste AU-Wert aller Seren für das Antigen angenommen.

3.2.13 Simple Western Assay

Der auf Glaskapillaren basierende automatisierte 1D-Western Blot (Simple Western Assay) der Firma ProteinSimple diente in dieser Arbeit zur Quantifizierung von *S. aureus*-spezifischen humanen Serumantikörpern. In diesem Assay werden die Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse, alle Inkubationsschritte und die Signaldetektion automatisch durchgeführt. Dazu werden die Proben und Lösungen in einer Mikrotiterplatte vorgelegt und vom Gerät (Simon bzw. Peggy, ProteinSimple) an entsprechender Stelle in die Glaskapillaren aufgenommen. Als Antigene dienten extrazelluläre *S. aureus*-Proteine (siehe 3.2.1). Die Antikörperbindung an die Proteine wurde mittels Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper durch Umsetzung des Substrats Luminol sichtbar gemacht.

Die Durchführung der Simple Western Assays orientierte sich an den vom Hersteller gemachten Angaben. Die folgenden Schritte wurden angepasst. Die zu untersuchenden Seren und die Sekundärantikörper wurden im *Blocking reagent* für ELISA (Roche) verdünnt (Tabelle 3.7). Für die Herstellung des Fluoreszenzstandards wurde der mitgelieferte 10× Probenpuffer in *aq. bidest.* 1:10 verdünnt. Der Fluoreszenzstandard wurde in 20 µL 1× Probenpuffer aufgenommen. Die extrazellulären *S. aureus*-Proteine wurden mit einer Konzentration von

1 µg/µL angesetzt. Die Einstellungen des Assay-Protokolls sind in Tabelle 3.8 dargestellt. Dieses unterschied sich, je nach genutztem Gerät für die Durchführung der Simple Western Assays, in einem Punkt.

Tabelle 3.7: Übersicht zu den eingesetzten Sekundärantikörper-Konzentrationen und Serumverdünnungen für Simple Western Assays.

Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper	Konzentration Sekundärantikörper (µg/mL)	Verdünnung Serum/Plasma	Aufnahmezeit (sek)
Ziege anti-Human IgG (Fc-spezifisch), Dianova	0,16	1:500 (Serum)	10
Maus anti-Human IgG4, Invitrogen	10	1:100 (Serum)	10
Maus anti-Human IgG4, Invitrogen	10	1:50 (Plasma)	30

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Compass 2.6.6 (ProteinSimple). Dazu wurden die Flächen unter den Kurven (AUC) der erhaltenen Signale eines Serums zusammenaddiert (Gesamtsignal). Je Serum wurde mindestens ein Replikat erstellt und der Mittelwert der Gesamtsignale aus diesen gebildet. Wichen die Gesamtsignale der Replikate um mehr als 30 % voneinander ab, wurde ein weiteres Replikat angefertigt und die beiden am nächsten liegenden Replikate für die Bildung des Mittelwerts genutzt.

Tabelle 3.8: Einstellungen der Simple Western Assay-Protokolle in Simon- und Peggy-Systemen.

Aktion	Einstellung in Simon	Einstellung in Peggy
Aufziehen Trennmatrix	100 sek	100 sek
Aufziehen Sammelmatrix	8 sek	8 sek
Aufziehen Proteine	6 sek	6 sek
Zeit für Proteinauftrennung	40 min	40 min
Spannung bei Proteinauftrennung	250 V	250 V
Belichtungszeit Standards	3 sek	5 sek
Immobilisierungszeit	200 sek	200 sek
Entfernung der Matrizes	140 sek (anschließend 3× Waschen)	140 sek (anschließend 3× Waschen)
Inkubationszeit Blocken	15 min	15 min
Inkubationszeit Seren	120 min (anschließend 2× Waschen)	120 min (anschließend 2× Waschen)
Inkubationszeit Sekundärantikörper	60 min (anschließend 2× Waschen)	60 min (anschließend 2× Waschen)
Inkubationszeit Waschschritte	150 sek	150 sek

3.2.14 Flexmap3D Assay

Eine weitere Methode Antikörperbindungen aus humanen Seren an rekombinante *S. aureus*-Proteine zu quantifizieren ist der Flexmap3D Assay. Hier werden die Proteine an *beads* gekoppelt und die Antikörperbindungen durch einen fluoreszierenden PE- (Phycoerythrin-) konjugierten Sekundärantikörper detektiert. Dabei werden unterschiedliche Proteine an *beads* einer jeweils anderen *bead*-Population gekoppelt, die sich durch ihre Fluoreszenz voneinander unterscheiden. Somit ist ein Multiplex-Ansatz möglich. Der Flexmap3D Assay wurde zusammen mit der ZIK-FunGene Nachwuchsgruppe „Angewandte Proteomics“ (Greifswald) durchgeführt. Deswegen wird an dieser Stelle auf die Durchführung nur kurz eingegangen. Es wurden 64 rekombinante *S. aureus*-Proteine eingesetzt (von zwei *S. aureus*-Proteinen jeweils der N-terminale und der C-terminale Teil, siehe Anhang Tabelle 8.5).

Die Kopplung der Proteine an die *beads* erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die *beads* wurden zuerst aktiviert, dann mit den jeweiligen Proteinen inkubiert und anschießend gewaschen. Die freien Bindungsstellen der *beads* wurden über Nacht in Blockpuffer (1 % BSA) gesättigt. Die mit verschiedenen *S. aureus*-Proteinen gekoppelten *beads* wurden gemischt. Die *bead*-Mischung wurde in die Kavitäten einer 96-*Well* Mikrotiterplatte vorgelegt, so dass später mindestens 35 *beads* je Protein gemessen werden konnten. Es wurden 50 µL Serum in jede Kavität gegeben und über Nacht bei 4 °C und 900 rpm inkubiert. Dabei wurden von jedem Serum sieben Verdünnungsstufen genutzt (1:50, 1:500, 1:1 000, 1:10 000, 1:50 000, 1: 100 000, 1:200 000). Nach einem Waschschritt mit Waschpuffer wurden 50 µL des PE-konjugierten Sekundärantikörpers (R-Phycoerythrin Ziege anti-Human IgG, 5 µg/mL, Dianova) in die Kavitäten gegeben und dieser 1 h bei Raumtemperatur und 900 rpm inkubiert. Anschließend wurde ein weiterer Waschschritt durchgeführt, die *beads* in *sheath fluid* aufgenommen und am Flexmap3D mit dem Programm xPONENT 4.1 gemessen.

Die Auswertung des Flexmap3D Assays wurde durch Dr. rer. nat. Stephan Michalik (ZIK-FunGene Nachwuchsgruppe „Angewandte Proteomics“, Greifswald) durchgeführt. Hierbei wurde aus den mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Serumverdünnungen eine hyperbolische Standardkurve erstellt. Die Halbmaximale MFI wurde mit der Serumverdünnung an diesem Punkt multipliziert. Dieser Wert (Titer) wurde als AU angegeben. Die Berechnungen wurden mit dem Programm R statistical language 3.0.1 durchgeführt [149].

Für die statistische Auswertung mittels *partial least squares analysis* (PLS) und *principal component analysis* (PCA) mit dem Programm Genedata Analyst Software Package 7.6.6 (GeneData) siehe 3.5.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Nachweis und Amplifikation von *S. aureus*-Genen mittels PCR

3.3.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA nach ihrer Größe erfolgte in 1,5%-igen Agarosegelen durch Anlegen einer Spannung. Die negativ-geladene DNA bewegt sich zum Pluspol, dabei bewegen sich kleinere DNA-Moleküle schneller durch die Poren des Agarosegels als größere DNA-Moleküle. Es wurden 10 µL der DNA-haltigen Probe mit 2 µL 6× Ladepuffer versetzt und damit eine Tasche des Agarosegels beladen. Wurden PCR-Produkte aufgetragen, deren Puffer bereits Ladepuffer enthielt (z. B. 5× Green GoTaq Flexi Puffer, Promega) wurde kein Ladepuffer zugesetzt, sondern nur 10 µL des PCR-Produkts in die Tasche geladen. Im Agarosegel und Laufpuffer befand sich RedSafe (iNtRON), ein interkalierender, fluoreszierender Farbstoff. Zur Auftrennung der DNA-Moleküle wurden 200 V angelegt. Nach Erreichen der gewünschten Auftrennung wurden die Agarosegele unter UV-Licht fotografiert. Zur Bestimmung der DNA-Molekülgrößen wurde ein Größenstandard mitgeführt.

3.3.1.2 Nachweis des ProteinA-Gens und des Erythromycin-resistenz-Gens

Beim Erstellen eines *proteinA*-negativen *S. aureus*-Stamms wurde in dieser Arbeit das ProteinA-Gen (*spa*) durch Transduktion mit einem Erythromycin-resistenz-Gen (*eryR*) ausgetauscht.

Der Nachweis beider Gene erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und anschließender Auftrennung der PCR-Produkte in einem 1,5%-igem Agarose-Gel. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze sowie das PCR-Programm sind in Tabelle 3.9 und Tabelle 3.10 dargestellt. In 98 µL PCR-Ansatz wurden 2 µL genomische DNA (10 ng/µL) gegeben. Positiv-, Negativ- sowie eine Mastermixkontrolle wurden mitgeführt.

Tabelle 3.9: Zusammensetzung der PCR-Ansätze für den Nachweis der spa- und eryR-Gene.

Komponente	*spa*-PCR (µL)	*eryR*-PCR (µL)
PCR-Wasser	47,5	47,5
5× Green GoTaq Flexi Puffer	20	20
dNTPs	20	20
$MgCl_2$	6	6
5' Primer	2	2
3' Primer	2	2
GoTaq Polymerase	0,5	0,5
Summe	98 µL + 2 µL DNA	98 µL + 2 µL DNA

Tabelle 3.10: PCR-Programme für den Nachweis der spa- und eryR-Gene.

	spa-PCR		*eryR-PCR*	
Schritt	**Zeit (min:sek)**	**Temperatur (°C)**	**Zeit (min:sek)**	**Temperatur (°C)**
1	05:00	94	05:00	94
2	00:45	94	00:45	94
3	00:45	60	00:45	48
4	01:30	72	01:30	72
(30 Zyklen zu Schritt 2)				
5	10:00	72	10:00	72
Pause	∞	4	∞	4

3.3.1.3 Amplifikation von Genen mittels PCR

Für die Amplifikation von Genen wurde eine Präparative-PCR mit einer DNA-Polymerase durchgeführt, die eine Korrektur-Lesefunktion besaß (HIFI Polymerase Phusion F-530S, Finnzymes). Dadurch sollten Punktmutationen, die während der DNA-Synthese am Matrizenstrang entstehen können, weitgehend verhindert werden.

Nach der PCR erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte in einem 1,5%-igen Agarose-Gel. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze sowie das PCR-Programm sind in Tabelle 3.11 und Tabelle 3.12 dargestellt. In 95 µL PCR-Ansatz wurden 5 µL genomische DNA (10 ng/µL) gegeben. Eine Positiv- und Mastermixkontrolle wurden mitgeführt.

Tabelle 3.11: Zusammensetzung der präparativen PCR.

Komponente	Präparative-PCR (µL)
PCR-Wasser	62
5× Phusion HF Puffer	20
dNTPs	2
5' Primer	5
3' Primer	5
HIFI Polymerase Phusion	1
Summe	95 µL + 5 µL DNA

Tabelle 3.12: PCR-Programm der präparativen PCR.

	Präparative-PCR	
Schritt	**Zeit (min:sek)**	**Temperatur (°C)**
1	10:00	98
2	00:30	98
3	00:30	58,2
4	01:00	72
(30 Zyklen zu Schritt 2)		
5	05:00	72
Pause	∞	4

3.3.1.4 Kolonie-PCR

Der Nachweis von Genen direkt aus einer Bakterienkolonie wurde mittels Kolonie-PCR durchgeführt.

Eine Bakterienkolonie wurde in 4,5 µL PCR-Wasser aufgenommen und in den PCR-Ansatz gegeben. Nach der PCR erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte in einem 1,5%-igen Agarose-Gel. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze sowie das PCR-Programm sind in Tabelle 3.13 und Tabelle 3.14 dargestellt. Positiv-, Negativ- und Mastermixkontrollen wurden mitgeführt.

Tabelle 3.13: Zusammensetzung der Kolonie-PCR.

Komponente	Kolonie-PCR (µL)
PCR-Wasser	5,3
5× Green GoTaq Flexi Puffer	5
dNTPs	2,5
$MgCl_2$	5
5' Primer	1
3' Primer	1
GoTaq Polymerase	0,7
Summe	24 µL + 4,5 µL Kolonie

Tabelle 3.14: PCR-Programm der Kolonie-PCR.

	Kolonie-PCR	
Schritt	**Zeit (min:sek)**	**Temperatur (°C)**
1	05:00	95
2	00:30	95
3	00:30	50
4	01:00	72
(25 Zyklen zu Schritt 2)		
5	05:00	72
Pause	∞	4

3.3.1.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde nach Herstellerangaben mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) durchgeführt. Die DNA wurde mit 50 µL PCR-Wasser eluiert (1 min, 16 000 *g*).

3.3.2 Erstellung eines *protein A*-negativen *S. aureus* (USA300Δ*spa*)

Für die Untersuchung der humanen Antikörperbindung an *S. aureus*-Proteine können *S. aureus*-Zellen und extrazelluläre *S. aureus*-Proteine eingesetzt werden (Präparationen siehe 3.1.9 und 3.2.1). Dabei ist es notwendig, dass der verwendete *S. aureus*-Stamm kein Protein A exprimiert, da dieses z. B. humanes IgG unspezifisch binden würde und somit die Messung der IgG-Bindung an *S. aureus*-Proteine verfälschen würde. In dieser Arbeit sollte die IgG-Bindung von verschiedenen humanen Seren an *S. aureus*-Proteine untersucht werden. Dafür sollte der *S. aureus*-Stamm USA300 verwendet werden, von dem keine *protein A*-negative Mutante vorhanden war. Deshalb wurde für diese Arbeit ein *protein A*-negativer USA300-Stamm (USA300Δ*spa*) erstellt. Dies erfolgte mittels Transduktion. Ein Phage (φ11) wurde in einem *S. aureus*-Donorstamm (SA113Δ*spa*), bei dem das ProteinA-Gen (*spa*) durch ein Erythromycin-resistzenz-Gen (*eryR*) ausgetauscht war, vermehrt. Die daraus resultierenden Phagen wurden anschließend für die Infektion des *S. aureus*-Akzeptorstamms (USA300) genutzt. Haben die Phagen das EryR-Gen übertragen und wurde es durch homologe Rekombination in das Genom eingebaut, konnten die erfolgreich transduzierten USA300-Bakterien durch Zugabe von Erythromycin in das Medium selektioniert werden.

Für die Vermehrung des Phagen φ11 im Donorstamm wurde eine 10 mL LB-Übernachtkultur (20 µg/mL Erythromycin) SA113Δ*spa* angefertigt (vgl. 3.1.3). Daraus wurde eine frische Kultur 10 mL LB (20 µg/mL Erythromycin, 10 mM $MgSO_4$ und $CaCl_2$) auf OD_{595} 0,05 angeimpft und bis zum Erreichen der OD_{595} 0,2 bei 37 °C und 200 rpm (zirkulär) inkubiert (GeneRay UV-Photometer). Anschließend wurden in 500 µL der Kultur die Phagen φ11 zugegeben. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 200 rpm (zirkulär) weiter inkubiert, bis alle SA113Δ*spa*-Zellen in der Phagen-haltigen Kultur lysiert waren. Die Kultur wurde 10 min mit 3 300 *g* zentrifugiert und der Phagen-haltige Überstand filtriert (0,22 µm). Der Phagenstock wurde bei 4 °C gelagert. Eine 10 mL LB-Übernachtkultur des Akzeptorstamms USA300 wurde für die Transduktion erstellt. Diese wurde 10 min mit 3 300 *g* zentrifugiert und das Bakterienpellet in 0,5 mL LB-Medium resuspendiert. Davon wurden 100 µL Aliquots abgefüllt, die 2 min bei 55 °C inkubiert wurden, um die Aufnahme fremder DNA zu verbessern. Zu den Aliquots wurden dann 0,2 mL LB-Medium (10 mM $CaCl_2$) und 10 µL Phagenstock gegeben. Die Bakterien wurden 25 min bei 37 °C ohne schütteln inkubiert. Anschließend wurden 0,5 mL eiskaltes 0,02 M Natriumcitrat (in *aq. dest.*) dazugegeben, das die Bindung der Phagen an die Bakterienzellen und somit Sekundärinfektionen verhindern sollte. Die Aliquots wurden zentrifugiert (10 min, 4 °C, 9 600 *g*), die Pellets in 0,5 mL eiskaltem 0,02 M Natriumcitrat resuspendiert und 3 h auf Eis inkubiert. Es wurden je 100 µL der Aliquots auf LB-Agarplatten (1 000 µg/mL Erythromycin, 2 mM Natriumcitrat) ausgestrichen und 3 Tage bei 37 °C inkubiert. Bei erfolgreicher Transduktion sind *S. aureus* USA300Δ*spa* Kolonien gewachsen die noch zwei Mal auf neue LB-Agarplatten (1 000 µg/mL Erythromycin, 2 mM Natriumcitrat) ausgestrichen wurden, um verbliebende Phagen zu eliminieren. Die Transduktion wurde mittels *spa*- und *eryR*-PCR überprüft (siehe 3.3.1.2 und Anhang Abb. 8.1). Es wurde ein Glycerolstock des *S. aureus* USA300Δ*spa* angefertigt (siehe 3.1.5).

3.3.3 Herstellung rekombinanter *S. aureus*-Proteine

3.3.3.1 Plasmidisolation

Für die Plasmidisolation wurde das High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) genutzt. Aus einer 3 mL Flüssigkultur wurden die Bakterienzellen gewonnen, indem sie 1 min mit 13 000 *g* zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Die Pellets wurden in 250 µL

Suspensionspuffer mit RNAse resuspendiert. Dazu wurden 250 µL Lysepuffer gegeben und die Zellen 5 min inkubiert. Nachdem 350 µL Bindungspuffer dazugegeben wurden, wurden die Suspensionen 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 16 000 *g* wurden die Überstände auf die mitgelieferten Säulen gegeben, 1 min bei 16 000 g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die Säulen wurden mit 700 µL Waschpuffer II gewaschen (1 min, 16 000 *g*) und anschließend noch einmal trocken zentrifugiert. Mit 100 µL PCR-Wasser wurden die Plasmide eluiert (1 min, 16 000 *g*) und bei -20 °C gelagert.

3.3.3.2 Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Die Expression rekombinanter *S. aureus*-Proteine in *Escherichia* (*E.*) *coli* erfolgte mittels Ligation des gewünschten Gens in die multiple Klonierungsschnittstelle des Plasmids (pPR-IBA1, IBA) und der Transformation in den *E. coli*-Stamm BL21. Das Plasmid codierte für eine Ampicilin-Resistenz. Das rekombinante Protein besaß einen C-terminalen Strep-Tag und konnte dadurch mittels *Strep*-Tactin-Säule aufgereinigt werden.

Zunächst wurde das Gen des zu überexprimierenden Proteins amplifiziert. Dazu wurden 5' und 3' Primer mit dem Programm Primer D`Signer 1.1 (IBA) erstellt (hergestellt von Invitrogen). Diese enthielten zu den Enden des Gens homologe Bereiche und die Erkennungsschnittstelle des später verwendeten Restriktionsenzyms *Bsa*I. Mittels PCR wurde das Gen amplifiziert (siehe 3.3.1.3). Als Vorlage diente die genomische DNA des *S. aureus*-Stamms USA300. Das PCR-Produkt wurde anschließend aufgereinigt (siehe 3.3.1.5).
Für die Vorbereitung der Ligation von aufgereinigtem PCR-Produkt und Plasmid pPR-IBA1 (IBA) mussten beide zuvor mit *Bsa*I verdaut werden. Dazu wurden 43 µL des PCR-Produkts, 5 µL NEBuffer 3 und 2 µL *Bsa*I 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Temperatur für 20 min auf 65 °C erhöht, um *Bsa*I zu inaktivieren. Beim Plasmid wurde analog vorgegangen. 20 µL Plasmid wurden mit 5 µL NEBuffer 3 und 2 µL *Bsa*I bei den entsprechenden Temperaturen verdaut. Zusätzlich wurde die Relegierung des Plasmids verhindert, indem es dephosphoryliert wurde. Dazu wurden 50 µL des geschnittenen Plasmids mit 6,11 µL Puffer FastAP und 5 µL SAP Phosphatase 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte für 15 min bei 65 °C. Das geschnittene und dephosphorylierte Plasmid wurde anschließend aufgereinigt (siehe 3.3.1.5). Die Ligation wurde mit dem Fast Link DNA

Ligation Kit (Epicentre Biotechnologies) durchgeführt. Das molare Verhältnis PCR-Produkt:Plasmid betrug 2:1. Der Ligationsansatz wurde bis zur Transformation in *E. coli* DH5α (Invitrogen) auf Eis gelagert.

Die Amplifikation der Plasmide erfolgte in *E. coli* DH5α. Für die Transformation wurde ein Aliquot kompetenter *E. coli* DH5α auf Eis aufgetaut und anschließend 1 µL des Ligationsansatzes dazugegeben. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert und anschließend genau 30 s in einem 42 °C warmen Wasserbad inkubiert, danach 3 min auf Eis gelagert und mit 250 µL SOC-Medium aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellen 1 h bei 37 °C und 225 rpm (zirkulär) inkubiert. Es wurden 20 und 200 µL der Zellen auf LB-Agar-Platten (100 µg/mL Ampicilin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Plasmide der gewachsenen Kolonien wurden auf Punktmutationen untersucht. Dazu wurden 3 mL LB-Kulturen (100 µg/mL Ampicilin) über Nacht bei 37 °C und 225 rpm (zirkulär) inkubiert und anschließend die Plasmide isoliert (siehe 3.3.3.1).
Bevor die Plasmide zur Sequenzierung gesendet wurden, wurde durch Restriktionsverdau untersucht, ob die isolierten Plasmide das ligierte *Insert* besaßen. Dazu wurden 17 µL Plasmid mit 2 µL Tango Puffer, 0,5 µL *Hind*III und 0,5 µL *Xba*I 1,5 h bei 37 °C inkubiert und in einem 1,5%-igen Agarosegel aufgetrennt (siehe 3.3.1.1). Besaß das Plasmid ein *Insert* war eine zweite DNA-Bande zu sehen.
Die Untersuchung auf Punktmutationen erfolgte durch die Sequenzierung der Firma Invitrogen mit den zuvor erstellten 5' und 3' Primern.

Plasmide ohne Punktmutationen wurden für die Transformation in *E. coli* BL21 verwendet. Dies wurde analog zur Transformation in *E. coli* DH5α durchgeführt, allerdings wurden LB-Agar-Platten mit Ampicilin (100 µg/mL) und Chloramphenicol (20 µg/mL) verwendet. Es wurden Glycerolstocks angelegt (vgl. 3.1.5).

Für die Überexpression der rekombinanten Proteine wurde eine 40 mL Übernachtkultur von *E. coli* BL21 mit LB-Medium (100 µg/mL Ampicilin, 20 µg/mL Chloramphenicol) angeimpft und daraus am nächsten Tag eine 600 mL Hauptkultur (100 µg/mL Ampicilin, 20 µg/mL Chloramphenicol) auf OD_{595} 0,05 angeimpft (vgl. 3.1.3). Die Induktion der Expression erfolgte

bei OD_{595} 0,5 durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM). Nach weiteren 3 h Inkubation wurde eine 1 mL Probe entnommen und der Rest der Hauptkultur zentrifugiert (10 min, 4 °C, 15 000 *g*), die Pellets in je 5 mL Puffer W resuspendiert und bei -20 °C gelagert. Die Probe wurde zur Überprüfung der Überexpression mit *E. coli*-Aufschlusspuffer in einem SDS-Gel aufgetrennt (vgl. 3.2.3).

Für die Aufreinigung der rekombinanten Proteine mussten die *E. coli* BL21 Zellen zunächst mittels Ultraschall lysiert werden (6× 3 min höchste Stufe, dazwischen 30 s Pause). Das Lysat wurde auf 50 mL mit Puffer W aufgefüllt und der Zelldebris 20 min bei 4 °C und 15 000 *g* abzentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert (20 µm).
Auf die vorbereitete *Strep*-Tactin-Säule wurden 10 mL des Überstands gegeben, der Durchlauf gesammelt und auf Eis gelagert. Anschließend wurde die Säule mit 15 mL Puffer W gewaschen und 2 mL Waschfraktionen auf Eis gelagert. Durch Zugabe von 10 mL Puffer E (beinhaltete Desthiobiotin) wurde das rekombinante Protein eluiert und in 2 mL Eluationsfraktionen aufgefangen. Zuletzt wurde die *Strep*-Tactin-Säule mit 30 mL Puffer R regeneriert, mit Puffer W äquilibriert und bei 4 °C gelagert. Durch Mischen von 10 µL Elutionsfraktion mit 40 µL Rotiquant wurden die proteinhaltigen Fraktionen identifiziert und diese im SDS-Gel aufgetrennt (siehe 3.2.3). Die Elutionsfraktionen, die das rekombinante Protein enthielten, wurden vereint und gegen ½ PBS dialysiert (Porengröße 6000 Da bis 8000 Da). Die Proteinkonzentration wurde mit dem Nanodrop gemessen und die Proteine bei -80 °C gelagert.

3.3.3.3 Überexpression rekombinanter Proteine in *B. subtilis*

Die Überexpression rekombinanter *S. aureus*-Proteine in *Bacillus* (*B.*) *subtilis* erfolgte durch s*equence and ligation independent cloning* (SLIC). Diese Methode beruht auf der 3'-5'-Exonukleaseaktivität der T4-DNA-Polymerase. Die zu legierende DNA wird an ihren Enden mit zum geschnittenen Plasmid homologen DNA-Sequenzen ausgestattet. Die T4-Polymerase dient nun dazu die Enden der DNA und des geschnittenen Vektors enzymatisch zu Einzelsträngen abzubauen. Durch die so entstandenen überlappenden und homologen DNA-Sequenzen kann die DNA in den geschnittenen Vektor eingebracht werden. Bei der Überexpression in *B. subtilis* 6051HGW LS8P-D wurden die Tag-freien Proteine in das Medium sezerniert. Sie wurden mittels Äkta und Filtersystemen isoliert.

Zunächst wurde das Gen des zu überexprimierenden Proteins amplifiziert. Dazu wurden 5' und 3' Primer mit jeweils 30 und 33 zu den Enden des geschnittenen Plasmids homologen Basen erstellt (hergestellt von Invitrogen). Die Primer enthielten auch Basen die homolog zum zu klonierenden Gen waren. Mittels PCR wurde das Gen amplifiziert. Als Vorlage diente die genomische DNA des *S. aureus*-Stamms USA300 (20 ng/µL). Die verwendete *annealing*-Temperatur (Schritt 3) betrug 57 °C (vgl. 3.3.1.3). Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt (siehe 3.3.1.5).
Das verwendete Plasmid (pJK267) wurde mit den Restriktionsenzymen *Spe*I und *Nde*I geschnitten. Dazu wurden jeweils 1 µL der Restriktionsenzyme mit 5 µL 10× Cut Smart Puffer, 1 µg Plasmid mit PCR-Wasser auf 50 µL aufgefüllt und 20 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Temperatur für 15 min auf 80 °C erhöht, um die Enzyme zu inaktivieren.
Für den Verdau wurden 3,8 µL des geschnittenen Plasmids mit 4 µL aufgereinigtem PCR-Produkt, 1 µL NEB Puffer 2, 1 µL 10× BSA und 0,17 µL T4 DNA Polymerase inkubiert (40 min bei 21 °C, 15 min bei 75 °C und 30 min bei 37 °C). Anschließend wurde der Verdau-Ansatz bis zur Transformation auf Eis gelagert.

Die Ligation der verdauten Plasmide und PCR-Produkte und die Amplifikation der Plasmide erfolgten in elektrokompetente *E. coli* DH10B. Dazu wurden 5 µL des Verdau-Ansatzes zu 40 µL *E. coli* gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und die Elektroporation 5 ms bei 2,5 kV durchgeführt. Die Bakterien wurden in 1 mL Kompetenz-Medium überführt und 70 min bei 37 °C und 250 rpm (zirkulär) inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 min mit 16 000 *g* wurde der Überstand dekantiert und die Bakterien im verbleibenden Medium resuspendiert. Danach wurden sie auf LB-Agarplatten (30 µg/mL Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Plasmid codierte ein Kanamycinresistenz-Gen.

Die Plasmide der gewachsenen Kolonien wurden auf Punktmutationen untersucht. Dazu wurde zuerst eine Kolonie-PCR mit den zur Amplifikation des ligierten Gens benutzten Primern durchgeführt, um zu untersuchen welche Kolonie ein Plasmid mit *Insert* trug (siehe 3.3.1.4).

Aus Kolonien die ein *Insert* im Plasmid trugen wurden die Plasmide aus einer 3 mL LB-Kultur (20 µg/mL Kanamycin) isoliert und Glycerolstocks angelegt (siehe 3.3.3.1 und 3.1.5).

Die Untersuchung auf Punktmutationen erfolgte durch die Sequenzierung der Firma Invitrogen mit den Primern pMSE3 5' und pMSE3 3'.

Plasmide die keine Punktmutationen in den *Inserts* enthielten wurden für die Transformation in elektrokompetente *B. subtilis* 6051HGW LS8P-D verwendet. Es wurden 10 µL des Plasmids mit 70 µL *B. subtilis* in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und die Elektroporation 5 ms bei 2,1 kV durchgeführt. Die Bakterien wurden in 1 mL Kompetenz-Medium überführt und 3 h bei 37 °C und 250 rpm (zirkulär) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten (10 µg/mL Kanamycin) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Es wurden Glycerolstocks angelegt (vgl. 3.1.5).

Für die Überexpression der rekombinanten Proteine wurde eine 40 mL Übernachtkultur von *B. subtilis* 6051HGW LS8P-D mit LB-Medium (10 µg/mL Kanamycin) angeimpft und daraus am nächsten Tag eine 600 mL Hauptkultur (10 µg/mL Kanamycin, 0,5 % Acetoin) auf OD_{595} 0,05 angeimpft (vgl. 3.1.3). Die Überexpression der rekombinanten Proteine wurde durch Acetoin induziert. Die Hauptkultur wurde 24 h bei 37 °C und 100 rpm (linear) inkubiert. Dann wurde sie zentrifugiert (10 min, 4 °C, 15 300 g) und der Überstand filtriert (0,22 µm).

Für die Isolation der rekombinanten Proteine aus dem Überstand wurde dieser zunächst mittels Tangentialflussfiltration (TFF) eingeengt. Es wurde das Minimate TFF Capsule System mit einem *cut off* von 10 kDa (Pall) nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurde der Überstand von 1 200 mL auf 60 mL eingeengt und in Puffer A (20 mM Tris, pH 7,5) umgepuffert.
Neben den gewünschten rekombinanten Proteinen enthielt der umgepufferte Überstand auch *B. subtilis* Proteine. Deshalb waren weitere Aufreinigungsschritte notwendig. Zuerst wurde der Überstand mittels Äkta Avant 150 (GE Healthcare) und der Verwendung einer Kationenaustausch-Säule (5 mL Säulenvolumen (*cv*)) aufgereinigt. Die Säule wurde entsprechend der Herstellerangaben mit Puffer A und Puffer B äquilibriert. Der Überstand wurde 1:5 in Puffer A verdünnt und auf die Säule gegeben. Für die Elution wurde mit 15 *cv* Puffer B ein linearer Gradient aufgebaut, bis der Endanteil von Puffer B 50 % betrug. Dabei wurden 4 mL Fraktionen aufgefangen. Mittels Chromatogramm wurden die proteinhaltigen Fraktionen identifiziert und diese im SDS-Gel auf das Vorhandensein der rekombinanten

Proteine untersucht (siehe 3.2.3). Fraktionen die die rekombinanten Proteine enthielten wurden vereint.

Um weitere *B. subtilis*-Proteine zu entfernen wurden die vereinten Fraktionen als Nächstes durch eine 30 kDa Membran für 15 min bei 4 °C und 4 000 *g* filtriert (rekombinante Proteine waren < 30 kDa), um noch verbliebene größere *B. subtilis*-Proteine zu entfernen. Anschließend wurden sie mit einer 10 kDa Membran aufkonzentriert (rekombinante Proteine waren > 10 kDa). Dabei wurden sie auch umgepuffert, indem die Filter nach der Zentrifugation (7 min bei 4 °C und 4 000 *g*) mit PBS aufgefüllt wurden und nochmals zentrifugiert wurden. Dies wurde drei Mal durchgeführt. Die Konzentration der aufgereinigten und aufkonzentrierten Proteine wurde am Nanodrop gemessen und diese bei -80 °C gelagert.

3.3.4 LPS-Depletion und -Bestimmung

Bei der Herstellung rekombinanter Proteine mit *E. coli* befindet sich Lipopolysaccharid (LPS) in den Proteinpräparationen. LPS kann in der Zellkultur Einfluss auf die Stimulation von Zellen nehmen und muss daher vor dem Einsatz der rekombinanten Proteine in Zellkulturen entfernt werden.

Die Depletion von LPS erfolgte mittels EndoTrap Säule (Profos). Diese wurde nach Herstellerangaben vorbereitet. Die Säule wurde mit sechs *cv* Regenerationspuffer gespült. Anschließend wurden sechs *cv* ½ PBS durch die Säule laufen gelassen. Die in ½ PBS aufgenommenen rekombinanten Proteine (siehe 3.3.3.2) wurden auf die Säule gegeben und gleich wieder aufgefangen. Die Säule wurde mit sechs *cv* ½ PBS regeneriert und sechs *cv* Regenerationspuffer durch die Säule laufen gelassen. Bei Bedarf wurde die LPS-Depletion der rekombinanten Proteine wiederholt.

Die LPS-Bestimmung erfolgte mittels Endosafe-PTS (Charles River) nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die Konzentration der rekombinanten Proteine am Nanodrop gemessen und diese bei -80 °C gelagert.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Isolation humaner PBMCs

Für die Isolation humaner peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs) wurden humanes EDTA-Vollblut oder *buffy coats* (Transfusionsmedizin, Universitätsmedizin Greifswald) von gesunden Spendern verwendet. Diese wurden 1:3 mit PBS verdünnt. Es wurden 8 mL Ficoll in 50 mL Zentrifugenröhrchen vorgelegt und das verdünnte Blut darüber geschichtet. Nach Zentrifugation (15 min, 1 580 *g* ohne Bremse) wurde der Leukozyten-Ring abgesaugt, in ein neues 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und mit PBS aufgefüllt. Die Zellen wurden drei Mal mit PBS gewaschen (1× 6 min, 609 *g* und 2× 6 min, 152 *g*). Nach dem letzten Waschschritt wurden die Zellen in R10F aufgenommen, gezählt und auf 1×10^6 Zellen/mL eingestellt.

3.4.2 Lebendzellzahlbestimmung

Die Lebendzellzahlbestimmung erfolgte mittels Bürker-Zählkammer. Es wurden 10 µL der Zellsuspension mit 90 µL Trypanblau gemischt, um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können. Anschließend wurden die Zellen auf die Bürker-Zählkammer gegeben und 25 Kleinquadrate ausgezählt. Dabei wurden blau angefärbte Zellen nicht mitgezählt. Die Lebendzellzahl je mL ergab sich aus dem Produkt der gezählten Zellen multipliziert mit 10^5.

3.4.3 PBMC-Proliferationsassay

Die Proliferation humaner PBMCs wurde mittels Einbau des β-Strahlers Tritium-Thymidin ([^{3}H]-Thymidin) in die Zell-DNA ermittelt. Als Analogon zu Thymidin wird [^{3}H]-Thymidin bei Zellteilungen in die DNA der Zelle eingebaut. Je mehr Zellen [^{3}H]-Thymidin in ihre DNA eingebaut haben, desto höher ist die messbare Strahlung. Zur Stimulation wurden filtrierte (0,22 µm) *S. aureus*-Überstände (USA300Δ*spa*) mit und ohne Zugabe von 600 µM 2,2′-Bipyridyl aus der stationären Wachstumsphase verwendet (vgl. 3.1.8).

In eine 96-*Well* Mikrotiterplatten (Flachboden) wurden 100 000 PBMCs je Kavität ausgesät. Die *S. aureus*-Überstände wurden seriell in R10F verdünnt und 100 µL der verdünnten Überstände in jede Kavität gegeben. Die Endkonzentrationen der *S. aureus*-Überstände betrugen in Zehnerschritten 1:10, 1:100, 1:1 000, …, 1×10^{-7}. Die Zellen wurden 3 d bei 37 °C,

5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach wurden 20 µL [^{3}H]-Thymidin (1:40 verdünnt in R10F) je Kavität dazugegeben und die Zellen weitere 17 h bei 37 °C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden sie bei -20 °C eingefroren. Von jedem Ansatz wurden Triplikate angefertigt. Zur Messung der β-Strahlung wurden die Zellen aufgetaut und mittels Harvester (Inotech) auf Glasfilterpapier übertragen. Diese wurden getrocknet und mit 10 mL Szintilationsflüssigkeit je Glasfilterpapier in Folien eingeschweißt. Die Messung erfolgte am Beta-Counter (PerkinElmer). Jede Kavität wurde 5 min gescannt. Die Ergebnisse wurden in *counts per minute* (cpm) ausgegeben.

Von den gemessenen Triplikaten wurden die Mediane gebildet. Es wurden die Daten von sechs gesunden *buffy coat* Blutspendern erhoben (Transfusionsmedizin, Universitätsmedizin Greifswald). Zum Vergleich der Proliferationsdaten beider Stimulationsansätze wurden sie auf die gleiche CFU (Koloniebildende Einheiten) normalisiert. Die höchste Proliferation wurde auf 100 % gesetzt. Als Kontrollen dienten rekombinantes SEB (Stammkonzentration: 1 µg/mL) und TSB-Medium mit 600 mM 2,2′-Bipyridyl.

3.4.4 Stimulation von T-Zelllinien mit *S. aureus*-Proteinen

Für die Untersuchung der Reaktion von T-Zelllinien auf *S. aureus*-Proteine mussten diese zuvor angereichert werden. Zuerst wurden die nicht-adhärenten Lymphozyten von adhärenten Zellen (*feeder*-Zellen) getrennt. Dazu wurden aus 100 mL EDTA-Vollblut isolierte PBMCs in 10 mL R5H aufgenommen und in T75er-Zellkulturflaschen 45 min bei 37 °C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Der Überstand mit den Lymphozyten wurde in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Die *feeder*-Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und ebenfalls in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Beide Zellsuspensionen wurden 10 min mit 317 *g* zentrifugiert und die Zellpellets in je 2 mL R5H resuspendiert und die Lebendzellzahl bestimmt (siehe 3.4.2). Die *feeder*-Zellen wurden auf 200 000 Zellen/mL eingestellt 1× mit 30 Gy bestrahlt (Transfusionsmedizin, Universitätsmedizin Greifswald). Dadurch wurde die weitere Proliferation dieser Zellen verhindert, ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation blieb aber erhalten.

Die T-Zellen wurden aus den Lymphozyten angereichert. Dazu wurde eine Einwegspritze am Tag zuvor mit 1 g Nylonwolle und anschließend mit 5 mL R5H gefüllt. Die Säule wurde mit 35 mL R5H äquilibriert und über Nacht bei 37 °C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit

inkubiert. Die 2 mL Lymphozytensuspension wurden auf die Säule gegeben, 0,5 mL frisches R5H dazugegeben und 0,5 mL R5H abgelassen. Danach wurden weitere 2 mL R5H in die Säule gegeben und diese 1 h bei 37 °C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Dabei adhärieren B-Zellen und möglicherweise verbliebene adhärente Zellen an der Nylonwolle. Die T-Zellen hingegen nicht. Nach der Inkubation wurden die T-Zellen mit 15 mL R5H eluiert und in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation (10 min, 317 *g*) wurde der Überstand abgenommen, so dass 2 mL Restvolumen im Zentrifugenröhrchen verblieben. Darin wurde das T-Zellpellet resuspendiert und die Lebendzellzahl bestimmt (siehe 3.4.2).
Die Stimulation der T-Zelllinien mit *S. aureus*-Proteinen erfolgte in einer 24-*Well* Platte. In einem Volumen von 1,5 mL R5H je Kavität wurden 2×10^6 T-Zellen und 200 000 *feeder*-Zellen mit 5 µg/mL hitzeinaktiviertem (30 min, 65 °C) *S. aureus*-Protein 5 d bei 37 °C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am Tag fünf wurden 750 µL R5H je Kavität abgenommen und durch 750 µL neues R5H mit 20 IU/mL IL-2 ersetzt. Nach Inkubation für weitere 4 d bei 37 °C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit wurden 150 µL Überstand je Kavität für die Zytokinbestimmung mittels CBA entnommen und bei -80 °C gelagert.
Je Spender und Antigen wurden zwei T-Zelllinien angefertigt. Als Kontrollen dienten *feeder*-Zellen die mit *S. aureus*-Protein inkubiert wurden und eine LPS-Kontrolle mit der jeweiligen LPS-Konzentration des eingesetzten rekombinanten Proteins.

3.4.5 Zytokinbestimmung mittels CBA

Zur Quantifizierung von Zytokinen aus Zellüberständen wurde ein *Cytometric Bead Array* (CBA, BD) durchgeführt. Hier werden *beads* eingesetzt die mit Antikörpern gekoppelt sind, die spezifisch Zytokine binden. Jede *bead*-Population trägt dabei Antikörper einer Spezifität und kann von den anderen *bead*-Populationen mit Hilfe ihrer Floreszenzen unterschieden werden. Die Bindung von Zytokinen durch die Antikörper wird durch PE- (Phycoerythrin-) konjugierte, polyklonale Sekundärantikörper detektiert. Durch Mitführen von Zytokinstandards können die Zytokine in den Zellüberständen quantifiziert werden.
Die Durchführung orientierte sich an den Herstellerangaben. Die Volumina aller Proben und Reagenzien wurden um 60 % reduziert, um Material zu sparen. Die Auswertung erfolgte am Durchflusszytometer LSR-II. Die Rohdaten wurden mit dem Programm FCAP Array 3 ausgewertet.

3.5 Statistik

Wenn nicht anders beschrieben, wurde der statistische Vergleich von zwei oder mehr Gruppen mit GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software) durchgeführt. Die Gruppen wurden auf Normalverteilung mittels D`Agostino-Pearson untersucht. Die statistischen Tests wurden mit einem Konfidenzintervall von 95 % durchgeführt. Bei nicht-normalverteilten Gruppen wurde der Mann-Whitney Test für zwei statistisch zu vergleichende Gruppen angewandt und der Kruskal-Wallis Test beim statistischen Vergleich von mehr als zwei Gruppen. Bei Letzterem diente Dunns als Signifikanztest. Als signifikant wurden Signifikanzniveaus < 0,05 (*, $p < 0,05$), als sehr signifikant Signifikanzniveaus < 0,01 (**, $p < 0,01$) und als hochsignifikant Signifikanzniveaus < 0,001 (***, $p < 0,001$) angesehen.

Die statistische Auswertung der Gel-freien Proteomanalyse, sowie des Flexmap3D Assays der *S. aureus*-Bakteriämiepatienten erfolgte durch Dr. rer. medic. Frank Schmidt (ZIK-FunGene Nachwuchsgruppe „Angewandte Proteomics“, Greifswald) mit dem Programm Genedata Analyst Software Package 7.6.6 (GeneData). Deswegen wird an dieser Stelle auf die Durchführung nur kurz eingegangen.

Gel-freie Proteomanalyse: Die quantifizierten *S. aureus*-Proteine aus eisenlimitierter Wachstumsbedingung und bei Zugang zu Eisen (= TSB-Kontrolle) wurden normalisiert und der Quotient der Expression jedes Proteins errechnet. Die Expression eines Proteins wurde als signifikant reguliert angesehen, wenn der Quotient der log2-Effektgrößen ungleich 1 war, die Effektgrößen im t-Test signifikant unterschiedlich waren und die Benjamini-Hochberg-Statistik < 0,05 betrug.

Für die *partial least squares analysis* (PLS) wurden die IgG-Bindungsdaten aus den Seren der *S. aureus*-Bakteriämiepatienten an die 64 rekombinanten *S. aureus*-Proteine, sowie der Krankheitsverlauf (Sepsis und keine Sepsis) in das Genedata Analyst Software Package 7.6.6 eingepflegt. Mittels linearer Diskriminanzanalyse nach Fisher wurden die *S. aureus*-Proteine identifiziert, durch die beide Verlaufsformen in der PLS am besten voneinander getrennt werden konnten. Die Information über die IgG-Bindung aus den Seren der Patienten an diese Proteine reichte aus, um Patienten nach ihrem Krankheitsverlauf in einer *principal component analysis* (PCA) zu diskriminieren.

4 Ergebnisse

4.1 Vorarbeiten für die Untersuchung der Immunantwort gegen *S. aureus*

4.1.1 Etablierung des Simple Western Assays für die Quantifizierung *S. aureus*-spezifischer Antikörper in humanen Seren

Für die Untersuchung *Staphylococcus* (*S.*) *aureus*-spezifischer Antikörper werden neben rekombinanten *S. aureus*-Proteinen auch Proteine aus den Kulturüberständen von *S. aureus* verwendet. Diese extrazellulären Proteine wurden in unserer Arbeitsgruppe bisher für Antikörperstudien mit 2D-Western Blots eingesetzt. Die Entwicklung von Western Blots, insbesondere 2D-Western Blots, gestaltet sich aber sehr zeitintensiv, die Technik hat einen kleinen linearen Messbereich, was die Quantifizierung der Signale limitiert, und die Reproduzierbarkeit ist aufgrund von vielen manuellen Arbeitsschritten eingeschränkt [150, 151]. Aus diesen Gründen sollte in der vorliegenden Arbeit für die Quantifizierung von *S. aureus*-spezifischen humanen Antikörpern der auf Glaskapillaren basierende, automatisierte 1D-Western Blot (Simple Western Assay) der Firma ProteinSimple genutzt werden (Abb. 4.1).

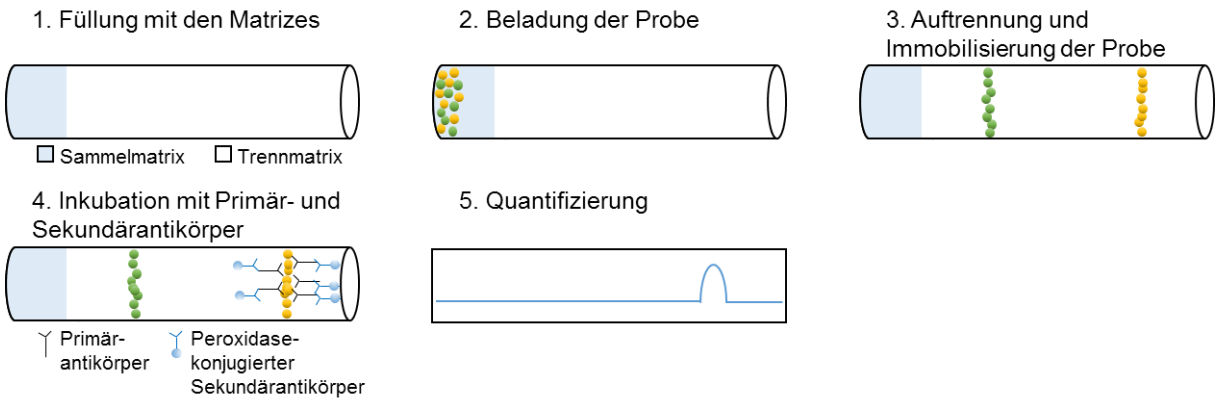


Abb. 4.1: Die automatisierten Arbeitsschritte des Simple Western Assays. Glaskapillaren werden mit Trenn- und Sammelmatrix gefüllt, die Proteinprobe wird aufgenommen. Nach der Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse, werden diese durch UV-Licht immobilisiert. Die Matrizes werden entfernt, freie Bindungsstellen mit Blockpuffer gesättigt und die Glaskapillaren mit dem Primärantikörper und anschließend dem Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert. Die Antikörperbindung wird durch Umsetzen des Substrats Luminol sichtbar gemacht, und die Lumineszenzsignale werden mit dem Programm Compass (ProteinSimple) ausgewertet. Grafik adaptiert nach [152].

Dieser Assay hat die Vorteile, dass er gegenüber konventionellen Western Blots deutlich weniger Zeit für die Entwicklung benötigt, die Inkubationsschritte automatisiert ablaufen, der lineare Messbereich größer ist, und dass nur sehr geringe Mengen von Proteinen, Seren und Antikörpern eingesetzt werden müssen (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Gegenüberstellung von 2D-Western Blots und Simple Western Assays. Die angegebenen Mengen beziehen sich auf die Entwicklung eines 2D-Western Blots bzw. einer Glaskapillare im Simple Western Assay. Die angegebenen Zeiten beinhalten Arbeitszeit und Gerätelaufzeiten.

	2D-Western Blots	**Simple Western Assay**
Proteinprobe (Antigene)	30 µg	5 µg
Primärantikörper (z. B. Serum-verdünnung)	3 µL (für 30 mL Verdünnung)	0,02 µL (für eine Glaskapillare)
Sekundärantikörper (Ziege anti-Human IgG (Fc-spezifisch)	120 ng	1,6 ng
Zeit	18 h	6 h
Linearer Bereich[a]	2,5 log-Stufen	3,3 log-Stufen

[a] Herstellerangaben ProteinSimple [153].

Der Simple Western Assay wurde ursprünglich für die Untersuchung von definierten Proteinproben und Antikörperpräparationen (z. B. monoklonale Antikörper) entwickelt. Daher musste er zunächst für die Quantifizierung von Antikörperbindungen aus komplexen Körperflüssigkeiten (humane Seren) an komplexe Proteingemische (extrazelluläre *S. aureus*-Proteine aus dem Kulturüberstand) angepasst werden. Dazu wurden Proteine eines *proteinA* (*spa*-)-negativen *S. aureus*-Stamms (USA300Δ*spa*) genutzt, um unspezifische Bindungen von IgG-Antikörpern zu vermeiden. Die Proteine wurden in einer Konzentration von 1 mg/mL eingesetzt. Für die Berechnung des Gesamtsignals eines Serums wurden die AUCs aller Signale des Serums aus der Auswertesoftware (Compass, ProteinSimple) addiert. Es wurden mindestens zwei technische Replikate je Serum angefertigt. Wichen die beiden Gesamtsignale mehr als 30 % voneinander ab, wurde eine dritte Messung durchgeführt. Aus den Gesamtsignalen der beiden am besten übereinstimmenden Messungen wurde der Mittelwert gebildet. Dieser war das Maß für die Menge an *S. aureus*-spezifischen Antikörpern des Serums. Die Signale können als Diagramm und als virtueller 1D-Western Blot dargestellt werden (Abb. 4.2 A und B).

Bauartbedingt kann in den Kapillaren nur eine begrenzte Menge Luminol aufgenommen werden (Länge 5 cm, Durchmesser 100 µm). Bei der Aufzeichnung der Lumineszenz kann es deshalb bei besonders starken Signalen zu sogenannten „Ausbrenneffekten“ kommen, wenn das

vorhandene Substrat aufgebraucht ist und infolgedessen das Lumineszenzsignal über die Zeit abnimmt. Bei der Messung von Serum-Antikörperbindungen an ein Gemisch aus extrazellulären *S. aureus*-Proteinen verstärkt sich der beschriebene Effekt des „Ausbrennens“ durch unterschiedlich starke Antikörperantworten an die verschieden immunogenen Proteine nochmals. Um dem entgegen zu wirken, mussten die Serum- und Antikörperkonzentrationen entsprechend angepasst werden. Dafür wurden fünf Seren von gesunden *S. aureus*-Trägern verwendet. Die Seren wurden 1:500 verdünnt und der Sekundärantikörper (Ziege anti-Human IgG (Fc-spezifisch), Dianova) mit einer Konzentration von 0,8 µg/mL und 0,16 µg/mL eingesetzt. Als Aufnahmezeiten wurden 5 s, 10 s und 15 s ausgewählt.
Als optimal erwiesen sich eine Sekundärantikörper-Konzentration von 0,16 µg/mL und eine Aufnahmezeit von 10 s. Unter diesen Bedingungen ließen sich stark und schwach reaktive Seren am besten diskriminieren und die Ausbrenneffekte waren minimal (siehe Anhang Abb. 8.2).

In einer Pilotstudie wurden Seren von Atopische Dermatitis (AD-) Patienten und gesunden Kontrollpersonen (AD-Seren, AG Gläser und jeweils drei *S. aureus*-Träger und Nicht-Träger von ssl-Seren) mit dem angepassten Simple Western Assay untersucht, und *S. aureus*-spezifische IgG-Antikörper wurden quantifiziert. Bei allen 23 Seren wichen die Ergebnisse der technischen Replikate um maximal 30 % voneinander ab (Tabelle 4.2). Die Gesamtsignale der Seren unterschieden sich vom Serum mit den wenigsten *S. aureus*-spezifischen IgG-Antikörpern (68 816,5 AUC) zum Serum mit den meisten spezifischen IgG-Antikörpern (1 125 486,5 AUC) um einen Faktor von etwa 16. Da sich die Seren in der Menge an *S. aureus*-spezifischem IgG stark unterschieden, wurde der absolute Wert des Variationskoeffizienten (CV) genutzt, um die Streuung der Replikate für jedes Serum zu beurteilen. Im Mittel betrug der absolute Wert des CV 5,8 %.

Tabelle 4.2: Übersicht der eingesetzten Seren und zugehörigen *S. aureus*-spezifischen IgG-Signalen im Simple Western Assay.

Serum	Erstes Replikat	Zweites Replikat	Gesamtsignal[a]	Absoluter CV
AD 1	371 983	403 060	387 521,5	4,01
AD 2	909 349	853 409	881 379	3,17
AD 3	1 079 004	1 114 394	1 096 699	1,61
AD 4	990 291	1 260 682	1 125 486,5	12,01
AD 5	1 049 887	1 200 849	1 125 368	6,71
AD 6	780 892	797 772	789 332	1,07
AD 7	386 501	361 551	374 026	3,34
AD 8	292 208	402 533	347 370,5	15,88
AD 9	735 328	570 141	652 734,5	12,65
AD 10	122 002	132 043	127 022,5	3,95
AD 11	336 582	273 737	305 159,5	10,30
H 12	335 311	441 617	388 464	13,68
H 13	331 392	266 196	298 794	10,91
H 15	427 608	472 852	450 230	5,02
H 16	362 940	371 869	367 404,5	1,22
H 17	300 344	302 167	301 255,5	0,30
H 18	415 748	445 190	430 469	3,42
H19 (ssl001)	399 844	448 060	423 952	5,69
H20 (ssl002)	200 871	230 450	215 660,5	6,86
H21 (ssl005)	252 215	308 364	280 289,5	10,02
H22 (ssl009)	158 057	154 955	156 506	0,99
H23 (ssl010)	296 917	290 405	293 661	1,11
H24 (ssl011)	68 520	69 113	68 816,5	0,43
				Mittlerer absoluter CV: 5,84 %

Abkürzungen: AD, Atopische Dermatitis; CV, Variationskoeffizient; H, gesunde Kontrollen.
[a] Mittelwert von zwei technischen Replikaten.

In der Pilotstudie zeigten sechs der elf AD-Patientenseren eine erhöhte IgG-Bindung an die eingesetzten extrazellulären *S. aureus*-Proteine (Abb. 4.2 C). Die Gruppe der AD-Patienten besaß signifikant mehr *S. aureus*-spezifisches IgG im Serum als die Kontrollgruppe ($p = 0{,}0225$, Mann-Whitney Test).

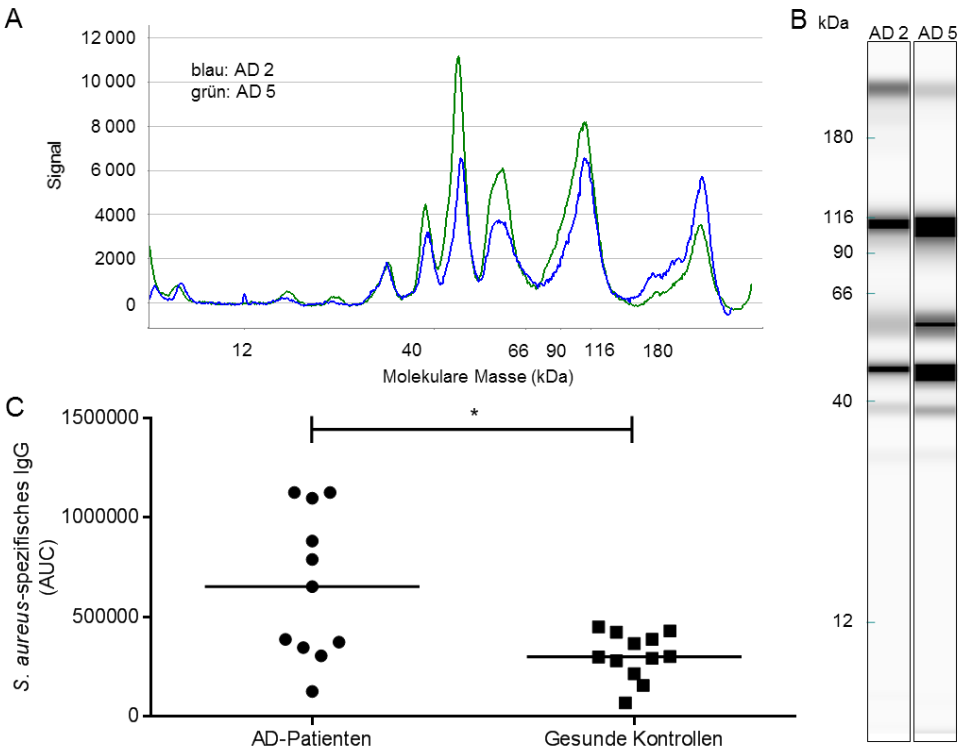


Abb. 4.2: Quantifizierung von *S. aureus*-spezifischem IgG in Seren von elf AD-Patienten und zwölf gesunden Kontrollen mit dem Simple Western Assay (ProteinSimple). Extrazelluläre Proteine aus dem Kulturüberstand von *S. aureus* USA300Δ*spa* (stationäre Wachstumsphase, 600 µM 2,2′-Bipyridyl) wurden in Glaskapillaren nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt und mit humanen Seren (1:500) inkubiert. Die IgG-Bindung an die *S. aureus*-Proteine wurde mittels Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (Ziege anti-human IgG (Fc-spezifisch), Dianova, 0,16 µg/mL) detektiert (10 s Aufnahmezeit). Beispiele für moderate (blau) und stärkere (grün) Antikörperantwort sind als Diagramm (A) und als virtueller 1D-Western Blot (B) dargestellt. Die eingesetzten Seren unterschieden sich stark in ihrer Menge an *S. aureus*-spezifischem IgG. Seren von AD-Patienten besaßen signifikant mehr *S. aureus*-spezifisches IgG als Seren von gesunden Kontrollen (C; p = 0,0225, Mann-Whitney Test; jeder Punkt repräsentiert das mittlere Ergebnis von zwei technischen Replikaten eines Serums). Waagerechte Linien zeigen den Median.

Abkürzungen: AUC, Fläche unter der Kurve.

4.1.2 Eisenlimitation – Optimierung des *S. aureus*-Proteoms für Antikörperstudien

Bei der Präparation extrazellulärer *S. aureus*-Proteine für die Quantifizierung spezifischer Antikörper werden meist Standard-Laborbedingungen bei der Kultivierung von *S. aureus* verwendet. Das heißt *S. aureus* hat Zugang zu allen notwendigen Nährstoffen, gute Sauerstoffversorgung und eine optimale Temperatur. Diese Kultivierungsbedingungen spiegeln jedoch nicht die Situation wider, mit der *S. aureus in vivo* bei einer Infektion konfrontiert wird.

Vor allem freies Eisen ist *in vivo* nur in äußerst geringen Mengen vorhanden und für *S. aureus* nur schwer zu akquirieren. Solche Stressoren führen zur Anpassung der Protein-Expressionsmuster von *S. aureus* und somit auch zur Veränderung des *S. aureus*-Antigenspektrums mit dem das Immunsystem konfrontiert wird [154]. Deshalb postulierten wir, dass Wachstum in Zellkultur bei Eisenmangel das Mikromilieu von *S. aureus* bei Kolonisierung und Infektion besser imitiert, und verglichen das Verhalten der Bakterien unter Standardbedingungen und Eisenmangel.

Um zu untersuchen, ob Eisenlimitation während der Kultivierung Einfluss auf das Wachstum von *S. aureus* hat, wurden zunächst zwei Eisenchelatoren (2,2′-Bipyridyl und N,N'-Ethylendiglycin (EDDA)) in unterschiedlichen Konzentrationen dem TSB-Medium zugesetzt und die optische Dichte (OD) über einen Zeitraum von 24 h gemessen. Als Kontrolle diente eine TSB-Kultur ohne Zusatz von 2,2′-Bipyridyl oder EDDA. Es wurde ein klinisches *S. aureus*-Isolat (302Δ*spa*) eingesetzt.
Durch Zugabe von EDDA konnte mit den eingesetzten Konzentrationen (300 µM bis 2 400 µM) keine Inhibition des *S. aureus*-Wachstums im Vergleich zur TSB-Kontrolle festgestellt werden (Abb. 4.3 A). Dagegen wurde das Wachstum durch 2,2′-Bipyridyl bereits ab einer Konzentration von 300 µM gehemmt. Diese Hemmung war konzentrationsabhängig. Durch den Einsatz von 2,2′-Bipyridyl kam es zu einem früheren Eintritt in die stationäre Wachstumsphase (Abb. 4.3 B).

Da das Wachstum des *S. aureus*-Stamms 302Δ*spa* durch den Einsatz von 2,2′-Bipyridyl gehemmt werden konnte, wurde als nächstes untersucht, ob dieser Effekt auch mit einem anderen *S. aureus*-Stamm reproduziert werden konnte. Dazu wurde der für diese Arbeit erstellte *S. aureus*-Stamm USA300Δ*spa* eingesetzt. Außerdem wurde analysiert, ob die Wachstumshemmung durch Supplementierung von Eisen wieder aufgehoben werden konnte. Dazu wurde das durch 2,2′-Bipyridyl gebundene Eisen nach fünf Stunden Kultivierung supplementiert.
Auch USA300Δ*spa* zeigte eine konzentrationsabhängige Hemmung des Wachstums (Abb. 4.3 C). Diese war im Gegensatz zu 302Δ*spa* erst ab einer Konzentration von 600 µM 2,2′-Bipyridyl deutlich von der TSB-Kontrolle zu unterscheiden. Durch Supplementierung mit freiem Eisen (Eisen-III-Chlorid-Hexahydrat) begann die OD der USA300Δ*spa*-Kultur wieder

zuzunehmen, so dass die *S. aureus*-Kultur nach 24 h OD-Werte erreicht, die mit der TSB-Kontrolle vergleichbar waren (Abb. 4.3 D).

Für die weiteren Untersuchungen der extrazellulären Proteine aus dem Kulturüberstand wurde der *S. aureus*-Stamm USA300Δ*spa* eingesetzt und 2,2′-Bipyridyl in einer Konzentration von 600 µM verwendet, da hier einerseits eine deutliche Wachstumshemmung zu beobachten war und andererseits genügend *S. aureus*-Zellen für die Produktion von extrazellulären Proteinen zu erwarten waren. Es wurden die extrazellulären *S. aureus*-Proteine aus der stationären Wachstumsphase genutzt, da eigene Vorarbeiten gezeigt haben, dass sich die Antikörperantwort vor allem gegen dieses Subproteom richtet (siehe Anhang Abb. 8.3 und [155]).

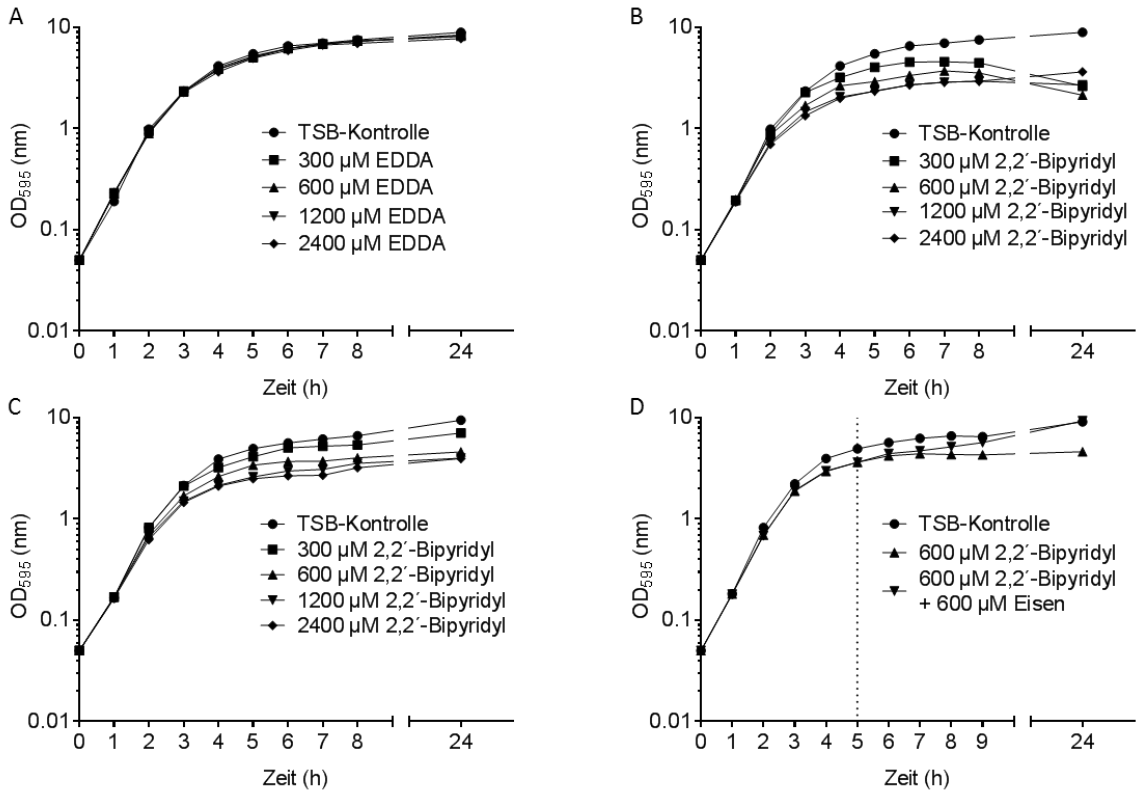


Abb. 4.3: Einfluss von Eisenchelatoren auf das *S. aureus*-Wachstum. *S. aureus* 302Δ*spa* wurde in Anwesenheit der Eisenchelatoren EDDA (A) und 2,2′-Bipyridyl (B) kultiviert. Eine konzentrationsabhängige Wachstumsinhibition konnte ab einer Konzentration von 300 µM 2,2′-Bipyridyl erzielt werden. Dies war ebenso der Fall beim *S. aureus*-Stamm USA300Δ*spa*, allerding erst ab 600 µM 2,2′-Bipyridyl (C). Nach Supplementierung mit freiem Eisen begann USA300Δ*spa* wieder zu wachsen (D).

Um zu untersuchen, ob Eisenlimitation Einfluss auf die Proteinexpression und in Folge dessen auf die Antikörperbindung an die extrazellulären *S. aureus*-Proteine aus dem Kulturüberstand hatte, wurde der quantitative Simple Western Assay eingesetzt. Es wurden Seren von vier gesunden *S. aureus*-Trägern (SH-Seren) eingesetzt und die Antikörperbindung an die extrazellulären *S. aureus*-Proteine aus der stationären Wachstumsphase bei eisenlimitierenden Wachstumsbedingungen und bei Zugang zu Eisen (TSB-Kontrolle) verglichen. Es wurde ein Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper eingesetzt, der hauptsächlich IgG-Antikörper bindet, aber auch die leichte Kette anderer Antikörperklassen binden kann (Ziege anti-human IgG (H+L), Dianova), so dass möglichst viele *in vivo* relevanten Antikörperspezifitäten abgedeckt werden konnten.

Alle vier Seren zeigten, verglichen mit der TSB-Kontrolle, eine erhöhte Antikörperbindung an die extrazellulären Proteine aus der eisenlimitierten *S. aureus*-Kultur. Dieser Unterschied betrug je nach Serum das 2,0- bis 6,2-Fache (Abb. 4.4).

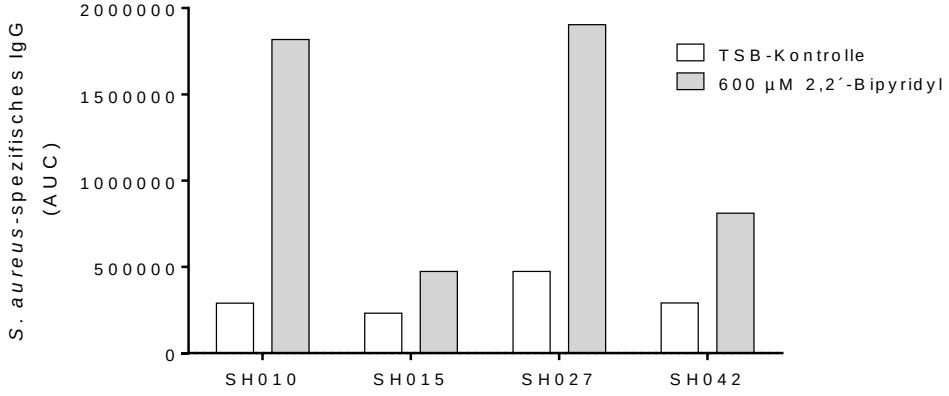


Abb. 4.4: Veränderung der Antikörperbindung an extrazelluläre *S. aureus*-Proteine durch eisenlimitierende Wachstumsbedingungen. Die Antikörperbindung aus vier humanen Seren (1:1 000) an extrazelluläre Proteine aus dem Kulturüberstand von USA300Δ*spa* (stationäre Wachstumsphase), kultiviert bei eisenlimitierten Wachstumsbedingungen (600 µM 2,2′-Bipyridyl) und mit Zugang zu Eisen (TSB-Kontrolle), wurde mittels Simple Western Assay quantifiziert (Sekundärantikörper Ziege anti-human IgG (H+L), Dianova, 0,16 µg/mL). Diese war an Proteinen, die bei Eisenlimitation freigesetzt wurden, um das 2,0- bis 6,2-Fache höher als an Proteinen, die im TSB-Kontrollmedium gebildet wurden.

Abkürzungen: AUC, Fläche unter der Kurve.

Um die Gründe für die unterschiedlich starke Antikörperbindung an die extrazellulären *S. aureus*-Proteine aus dem Kulturüberstand (stationäre Wachstumsphase) herauszufinden, wurden die Proteine aus eisenlimitierten Wachstumsbedingungen (600 µM 2,2′-Bipyridyl) und bei Zugang zu Eisen (TSB-Kontrolle) in 2D-Gelen aufgetrennt und die Proteinspots mittels Massenspektrometrie (MS) identifiziert. Die MS-Analyse wurde zusammen mit der ZIK-FunGene Nachwuchsgruppe „Angewandte Proteomics", Greifswald durchgeführt. Es wurden außerdem 2D-Western Blots mit den aufgetrennten *S. aureus*-Proteinen als Antigene angefertigt und die Antikörperbindung (Ziege anti-human IgG (H+L), Dianova) eines Pools aus humanen Seren (20 gesunde Spender mit unbekanntem *S. aureus*-Trägerstatus) an die *S. aureus*-Proteine nachgewiesen. Der Serumpool wurde verwendet, um möglichst viele Antikörperspezifitäten abdecken zu können.

Durch die Eisenlimitation veränderten sich die Proteinmuster der 2D-Gele in beiden untersuchten pI-Bereichen. Die Signalintensität einiger Proteinspots veränderte sich und neue Proteinspots kamen hinzu. Zu den prominenten neuen Proteinspots im pI-Bereich 6-11 gehörten Proteine des *S. aureus*-Häm-Akquisitions-Systems (IsdA, IsdB und IsdC) (Abb. 4.5 A, sowie in der PROTECS Datenbank als öffentlicher Nutzer [147]).

Um die Antikörpersignale den mit Massenspektrometrie identifizierten Proteinen zuzuordnen, wurden die 2D-Western Blots auf das entsprechende 2D-Gelbild überlagert.

Es wurde Antikörperbindung an 36 *S. aureus*-Proteine detektiert. Bei Eisenlimitation befanden sich darunter IsdA und IsdB. Außerdem wurde mehr Antikörperbindung an eine Amidase (Sle1) und eine putative Häm-abhängige Peroxidase (SAUSA300_0569) im pI-Bereich 4-7 beobachtet (Abb. 4.5 B und Anhang Tabelle 8.6). Weitere neue Antikörpersignale bei Eisenlimitation ließen sich keinem Protein zuordnen, da deren Menge in den 2D-Gelen für eindeutige Zuordnungen zu gering war.

Für eine Wachstumsinhibition von USA300Δ*spa in vitro* musste mehr 2,2′-Bipyridyl eingesetzt werden als beim klinischen *S. aureus*-Isolat 302Δ*spa* (siehe Abb. 4.3 B und C). Um dies auch auf Ebene der *S. aureus*-Proteine zu untersuchen, wurden, zusätzlich zu den vorher beschriebenen 2D-Western Blots, 2D-Western Blots mit extrazellulären Proteinen aus dem *S. aureus*-Kulturüberstand bei Zugabe von 300 µM 2,2′-Bipyridyl angerfertigt (siehe Anhang Abb. 8.4). Dazu wurden die Proteine vom *S. aureus*-Isolat 302Δ*spa* und *S. aureus*-Stamm USA300Δ*spa* präpariert.

Neue Antikörperbindungen waren bei 302Δ*spa* bereits ab einer 2,2′-Bipyridyl-Konzentration von 300 µM zu detektieren. Bei USA300Δ*spa* wurde dies erst ab einer 2,2′-Bipyridyl-Konzentration von 600 µM detektierbar.

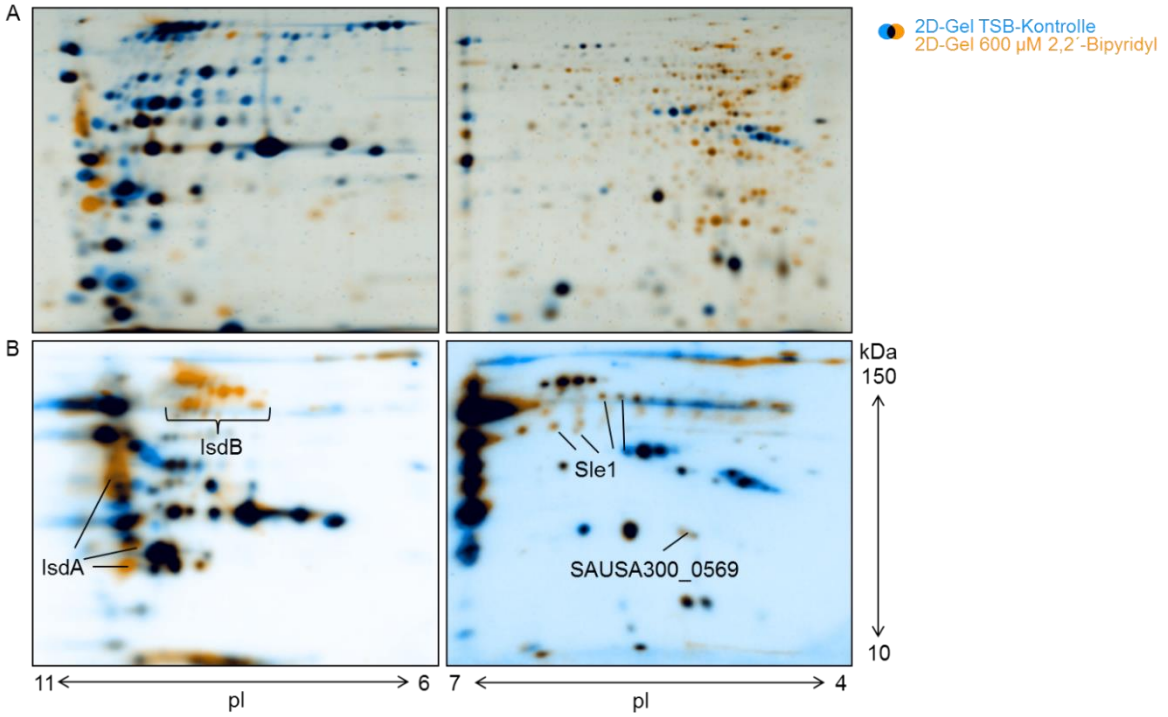


Abb. 4.5: Einfluss von Eisenlimitation auf die Zusammensetzung des extrazellulären *S. aureus*-Proteoms und die spezifischen Antikörperbindungsmuster. Die extrazellulären Proteine aus dem Kulturüberstand von USA300Δ*spa* (stationäre Wachstumsphase), kultiviert bei eisenlimitierten Wachstumsbedingungen (600 µM 2,2′-Bipyridyl) und mit Zugang zu Eisen (TSB-Kontrolle), wurden in 2D-Gelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen. Ein Serumpool (20 humane Seren, 1:10 000) diente als Primärantikörper für die Entwicklung der 2D-Western Blots. Antikörperbindung an die *S. aureus*-Proteine wurde mittels Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper detektiert (Ziege anti-human IgG (H+L), Dianova, 4 ng/mL). Nach Eisenlimitation wurden neue Proteinspots detektiert (A, orange). An einige der neuen Proteine wurde Antikörperbindung festgestellt (B, orange).
Abkürzungen: pI, isoelektrischer Punkt.

Antikörperbindung findet vor allem gegen exponierte (dem Immunsystem zugängliche) *S. aureus*-Proteine statt [155, 156]. Um den Einfluss der Eisenlimitation auf die Expression dieser Proteine zu analysieren, wurden in einem weiteren Ansatz die Mengen der Proteine bei beiden Kultivierungsbedingungen relativ zueinander quantifiziert.

Die Quantifizierung der exponierten (SignalP-positiven [157]) *S. aureus*-Proteine aus dem Kulturüberstand wurde mittels Gel-freier Proteomanalyse durch die ZIK-FunGene

Nachwuchsgruppe „Angewandte Proteomics“ (Greifswald) durchgeführt. Von beiden Kultivierungsbedingungen wurden jeweils drei biologische Replikate untersucht.

Beim Vergleich von Proteinextrakten aus eisenlimitierenden Wachstumsbedingungen mit solchen aus der TSB-Kontrolle waren 78 *S. aureus*-Proteine in signifikant unterschiedlichen Mengen ($p < 0,05$) nachweisbar (siehe Anhang Tabelle 8.7). Bei Eisenlimitation kamen sechs Proteine in höheren Mengen und 72 Proteine in niedrigeren Mengen vor. Fünf der durch Eisenmangel vermehrt freigesetzten Proteine spielen bei der Eisenakquise von *S. aureus* eine Rolle (IsdA, IsdB, IsdC, SirA und ein SstD-homologes Protein (SAUSA300_0721)). Beim sechsten handelt es sich um ein Superantigen-ähnliches Protein (Ssl11). Im Gegensatz dazu waren die Mengen anderer Proteine, wie Virulenzfaktoren und Immunevasoren (Hla, PVL, Luk), Superantigenen (SEK, SEQ), Lipasen (GlpQ, Geh) und extrazellulären Proteasen (Spls, V8-Protease) geringer bei eisenlimitierenden Wachstumsbedingungen. Bei der funktionellen Einteilung der Proteine bestätigte sich, dass der Anteil von Proteinen, die beim Eisenmetabolismus eine Rolle spielen, von 0,3 % in der TSB-Kontrolle auf 23,9 % bei Eisenlimitation gestiegen ist. Demgegenüber ist der Anteil von Hämolysinen (20,4 % auf 15,5 %), Proteasen (20,8 % auf 12,3 %) und Lipasen (18,3 % auf 4,4 %) deutlich gesunken (Abb. 4.6).

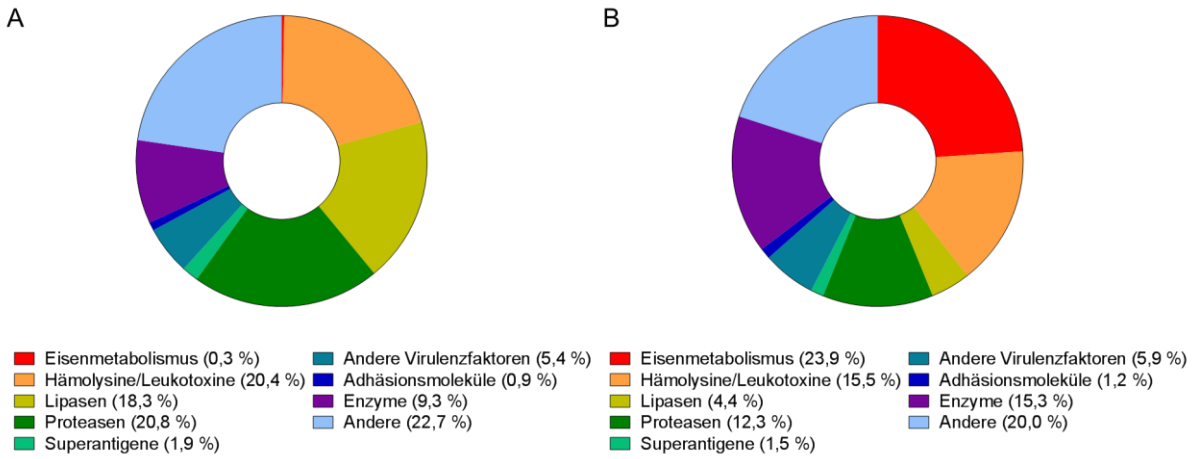


Abb. 4.6: Einfluss von Eisenlimitation auf die Zusammensetzung exponierter (SignalP-positiver) *S. aureus*-Proteine. Die extrazellulären Proteine aus dem Kulturüberstand von USA300Δ*spa* (stationäre Wachstumsphase), kultiviert mit Zugang zu Eisen (A, TSB-Kontrolle) und bei eisenlimitierenden Wachstumsbedingungen (B, 600 µM 2,2′-Bipyridyl), wurden in jeweils drei biologischen Replikaten mit Gel-freier Proteomanalyse quantifiziert und nach ihren Funktionen eingeteilt (Anhang Tabelle 8.7). Während der Anteil von Hämolysinen/Leukotoxinen, Proteasen und Lipasen bei Eisenlimitation deutlich abnahm, stieg der Anteil von Proteinen aus dem Eisenmetabolismus stark an.

Superantigene (SAgs) führen zu unspezifischer Stimulation und Proliferation von T-Zellen [83]. Demgegenüber bewirken Hämolysine die Lyse von Zellen [60]. Bei der Quantifizierung der exponierten Proteine stellte sich heraus, dass sich der Anteil beider Proteinklassen bei der Kultivierung von *S. aureus* bei Eisenlimitation verringerte. Um dies funktionell zu überprüfen, wurden PBMC-Proliferationsassays durchgeführt. Die PBMCs wurden aus *buffy coats* von sechs gesunden Blutspendern isoliert und drei Tage mit verschiedenen Konzentrationen der filtrierten (0,22 µm) *S. aureus*-Überstände aus eisenlimitierenden Wachstumsbedingungen (600 µM 2,2′-Bipyridyl) und TSB-Kontrolle (beides stationäre Wachstumsphase) inkubiert. Die Proliferation wurde durch den Einbau von [^{3}H]-Thymidin in Triplikaten gemessen. Die Daten von beiden Stimulationsansätzen wurden auf die gleiche CFU normalisiert und Mittelwerte von allen sechs Spendern gebildet. Die höchste Proliferation wurde auf 100 % gesetzt. Als Kontrollen dienten das rekombinante SAg SEB (Stammkonzentration: 1 µg/mL) und TSB-Medium mit 600 µM 2,2′-Bipyridyl.

Nach dreitägiger Inkubation mit *S. aureus*-Überstand aus der TSB-Kontrolle war bis zur 10^{-2}-Verdünnung des Überstandes eine Lyse der PBMCs unter dem Mikroskop zu erkennen. Der *S. aureus*-Überstand aus eisenlimitierenden Wachstumsbedingungen zeigte diesen Effekt nur bei einer 10^{-1}-Verdünnung. Durch Inkubation der PBMCs mit den *S. aureus*-Überständen (10^{-3}-Verdünnungen und höher) kam es zur messbaren Proliferation der T-Zellen. Diese war aber bei der Inkubation mit dem *S. aureus*-Überstand aus der Eisenlimitation weniger stark ausgeprägt als bei der Inkubation mit dem Überstand aus der TSB-Kontrolle (Abb. 4.7).

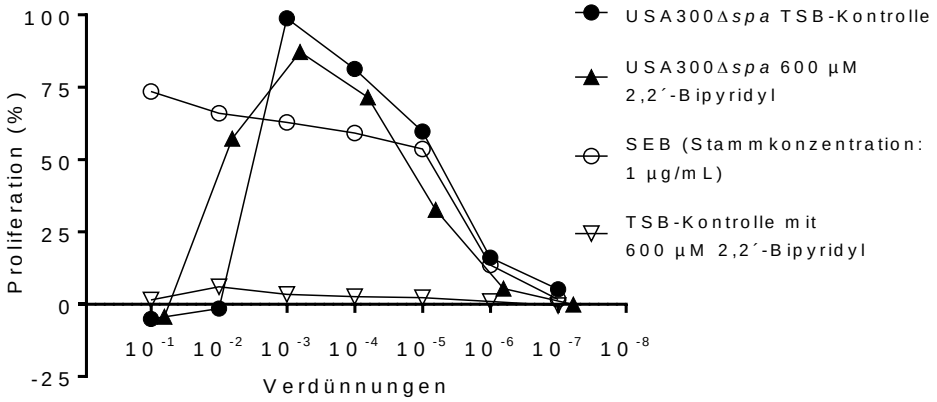


Abb. 4.7: Proliferation von PBMCs bei Inkubation mit *S. aureus*-Kulturüberständen aus eisenlimitierenden Wachstumsbedingungen und mit Zugang zu Eisen. PBMCs von sechs gesunden Blutspendern wurden drei Tage mit Überständen von USA300Δ*spa* (stationäre Wachstumsphase) inkubiert, die von Bakterien bei eisenlimitierenden Wachstumsbedingungen (USA300Δ*spa* 600 µM 2,2′-Bipyridyl) oder bei Zugang zu Eisen (USA300Δ*spa* TSB-Kontrolle) freigesetzt worden waren. Die Proliferation wurde durch den Einbau von [^{3}H]-Thymidin nachgewiesen. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert aller sechs Spender ausgedrückt in Prozent der höchsten Proliferation (100 %). Der *S. aureus*-Überstand aus eisenlimitierenden Wachstumsbedingungen war weniger potent bei der Proliferationsinduktion als die TSB-Kontrolle.

4.2 Die Immunantwort gegen *S. aureus* – Schutz durch Antikörper?

Bisher konnte durch Vakzinierung beim Menschen noch kein Schutz vor *S. aureus*-Infektionen induziert werden. Einige Forschungsgruppen berichten, dass Antikörper für die Protektion keine Rolle spielen, aber Th17-Zellen entscheidend dafür sein sollen. Aufgrund dieser Ergebnisse wird in aktuellen Übersichtsartikeln die Schutzfunktion von Antikörpern bei *S. aureus*-Infektionen angezweifelt [69, 72, 73]. Die in den beiden vorherigen Abschnitten dieser Arbeit beschrieben Methoden zur Untersuchung von *S. aureus*-spezifischen Antikörpern wurden nun für die Untersuchung der Protektion durch Antikörper in klinischen Studien angewandt.

4.2.1 Die Menge an *S. aureus*-spezifischem IgG zu Beginn einer *S. aureus*-Bakteriämie korreliert mit dem Verlauf der Erkrankung

In dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, ob die Menge von *S. aureus*-spezifischem IgG im Serum von *S. aureus*-Bakteriämiepatienten Aussagen zum Verlauf der Erkrankung zulässt. Dazu wurden in einer prospektiven Studie 46 immunkompetenten *S. aureus*-Bakteriämiepatienten (AG Roghmann, siehe Anhang Tabelle 8.2) untersucht. Ihnen wurde zu Beginn der Erkrankung, nicht später als vier Tage nach Beginn der Symptome, Blut entnommen und daraus Serum gewonnen. Das *S. aureus*-spezifische IgG wurde mittels Simple Western Assay (Ziege anti-human IgG (Fc-spezifisch), Dianova) bestimmt. Dabei wurden extrazelluläre *S. aureus*-Proteine aus dem Kulturüberstand (USA300Δ*spa*, stationäre Wachstumsphase, 600 µM 2,2′-Bipyridyl) als Antigene eingesetzt. Die Ergebnisse wurden mit dem Verlauf der Bakteriämie korreliert. Mögliche Krankheitsverläufe der *S. aureus*-Bakteriämiepatienten waren dabei keine Sepsis (24 Patienten), Sepsis (10 Patienten) und schwere Sepsis (12 Patienten). Der *S. aureus*-Stamm USA300Δ*spa* wurde verwendet, da er ein komplexes extrazelluläres Proteom mit vielen für IgG-Bindung relevanten Toxinen besitzt, und weil USA300-Isolate in den Patienten die häufigsten infektionsauslösenden *S. aureus* waren (35 %) [76, 158]. Alter, Geschlecht, Methicillin-Resistenz des infizierenden *S. aureus*-Stamms und weitere Parameter waren nicht mit dem Verlauf der Bakteriämie korreliert (siehe Anhang Tabelle 8.8). Die Seren der drei Verlaufsgruppen unterschieden sich im Mittel auch nicht in ihren Gesamt-IgG-Konzentrationen (siehe Abb. 8.5).

Die Messungen zeigten, dass es eine große Varianz in der Menge des *S. aureus*-spezifischen IgGs im Serum der Patienten gab (Abb. 4.8 A). Der Faktor zwischen dem Serum mit den

höchsten spezifischen IgG-Mengen und den niedrigsten betrug 27. Die Patienten wurden nun nach dem Krankheitsverlauf in Gruppen eingeteilt. Sepsis und schwere Sepsis wurden dabei zu einer Gruppe zusammengefasst (Abb. 4.8 B). Patienten, die im späteren Verlauf der Bakteriämie keine Sepsis entwickelten, besaßen zu Beginn der Erkrankung mehr *S. aureus*-spezifisches IgG (Median: 560 543 AUC) als Patienten, die eine Sepsis entwickelten (Median: 396 261 AUC). Dieser Unterschied war signifikant (p = 0,0481, Mann-Whitney Test).

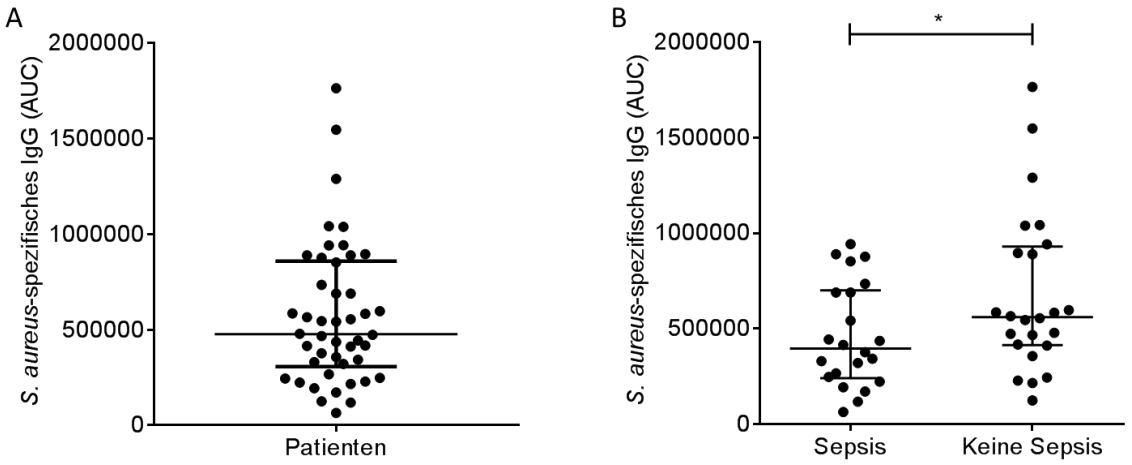


Abb. 4.8: Assoziation zwischen spezifischem IgG gegen extrazelluläre *S. aureus*-Proteine im Serum von *S. aureus*-Bakteriämiepatienten zu Beginn der Erkrankung mit dem Verlauf der Erkrankung. Die IgG-Bindung aus 46 Patientenseren (1:500) an extrazelluläre Proteine aus dem Kulturüberstand von USA300Δ*spa* (stationäre Wachstumsphase, 600 µM 2,2′-Bipyridyl) wurde mittels Simple Western Assay quantifiziert (Sekundärantikörper Ziege anti-human IgG (Fc-spezifisch), Dianova, 0,16 µg/mL). Spezifisches IgG variierte stark zwischen den Patientenseren (A, Faktor 27). Patienten, die im Verlauf der Erkrankung keine Sepsis entwickelten, besaßen signifikant mehr spezifisches IgG zu Beginn der Erkrankung als Patienten die eine Sepsis entwickelten (B, p = 0,0481, Mann-Whitney Test).
Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Patientenserums. Gezeigt werden Mediane und Interquartilsabstände. Abkürzungen: AUC, Fläche unter der Kurve.

Da die Gruppe der Patienten, die im Verlauf der Bakteriämie keine Sepsis entwickelten, signifikant mehr spezifisches IgG gegen extrazelluläre *S. aureus*-Proteine aus dem Kulturüberstand besaß als die Sepsisgruppe, wurde als nächstes untersucht, ob sich dies auch im Schweregrad der Sepsis widerspiegelt. Dazu wurde die Gruppe Sepsis nach dem Schweregrad der Erkrankung in Sepsis und schwere Sepsis unterteilt.

Je mehr *S. aureus*-spezifisches IgG zu Beginn der Bakteriämie im Serum vorhanden war, desto milder war der Verlauf der Erkrankung (Abb. 4.9 A). Dies zeigte sich auch bei der Einteilung der Patienten nach ihrer *S. aureus*-spezifischen IgG-Menge im Serum in Quartile (Abb. 4.9 B). So entwickelten drei von elf Patienten mit viel spezifischem IgG eine Sepsis und sieben von elf Patienten mit wenig spezifischem IgG.

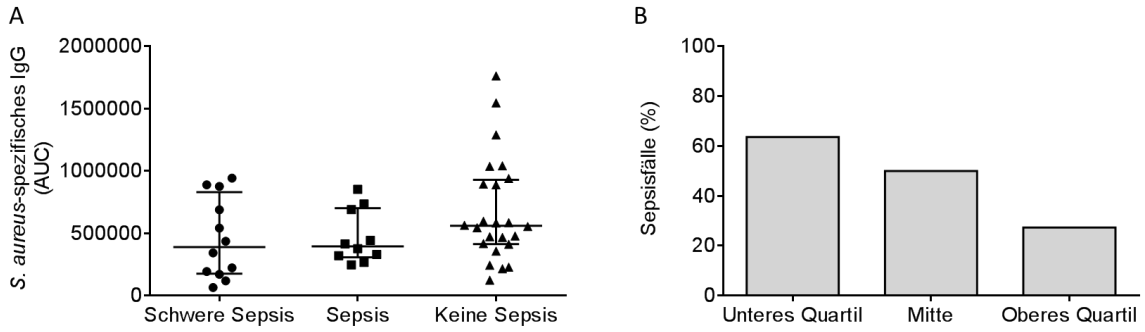


Abb. 4.9: Korrelation des Schweregrads des Krankheitsverlaufs mit der spezifischen IgG-Menge gegen extrazelluläre *S. aureus*-Proteine. Die IgG-Bindung aus 46 Patientenseren (1:500) an extrazelluläre Proteine aus dem Kulturüberstand von USA300Δ*spa* (stationäre Wachstumsphase, 600 µM 2,2′-Bipyridyl) wurde mittels Simple Western Assay quantifiziert (Sekundärantikörper Ziege anti-human IgG (Fc-spezifisch), Dianova, 0,16 µg/mL). Tendenziell besaßen Patienten, die im Verlauf keine Sepsis entwickelten, zu Beginn der Erkrankung mehr spezifisches IgG als Patienten mit Sepsis oder schwerer Sepsis (A). Die Einteilung der Patienten in Quartile nach ihrer spezifischen IgG-Menge zeigte, dass 63 % aus dem unteren Quartil und 27 % aus dem oberen Quartil eine Sepsis entwickelten.
Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Patientenserums. Gezeigt werden Mediane und Interquartilsabstände (A). Abkürzungen: AUC, Fläche unter der Kurve.

Die Untersuchung von spezifischem IgG gegen extrazelluläre *S. aureus*-Proteine zeigte einen Zusammenhang zwischen der Menge des IgGs zu Beginn der Bakteriämie und dem Verlauf der Erkrankung. Als nächstes sollte untersucht werden, ob es diesen Zusammenhang auch in der Menge des spezifischen-IgGs gegen die *S. aureus*-Zelloberfläche gab. Dazu wurden UV-getötete USA300Δ*spa*-Zellen als Antigen in einem ELISA genutzt und die IgG-Bindung aus den Patientenseren an die *S. aureus*-Zelloberfläche mittels Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (Ziege anti-human IgG (Fc-spezifisch), Dianova) quantifiziert.
Zunächst wurden, analog zum vorherigen Versuch, alle Sepsispatienten in eine Gruppe zusammengefasst. Auch hier zeigte sich, dass Patienten mit unkomplizierten Verlauf der Bakteriämie zu Beginn der Erkrankung signifikant ($p = 0{,}0409$, Mann-Whitney Test) mehr

S. aureus-spezifisches IgG im Serum besaßen (Median: 15 241 AU) als Patienten, die eine Sepsis (Sepsis oder schwere Sepsis) entwickelten (Median: 7 991 AU; Abb. 4.10 A). Aufgeteilt nach ihrem Sepsisverlauf besaßen Patienten, die eine „einfache“ Sepsis entwickelten, im Mittel 9 274 AU und Patienten, die eine schwere Sepsis entwickelten, dagegen im Mittel nur 5 601 AU *S. aureus*-spezifisches IgG. (Abb. 4.10 B). Die Einteilung der Patienten nach ihrem spezifischen IgG-Menge in ein oberes und unteres Quartil ergab, dass sieben Patienten aus dem unteren Quartil und vier Patienten aus dem oberen Quartil eine Sepsis entwickelten (siehe Anhang Abb. 8.6).

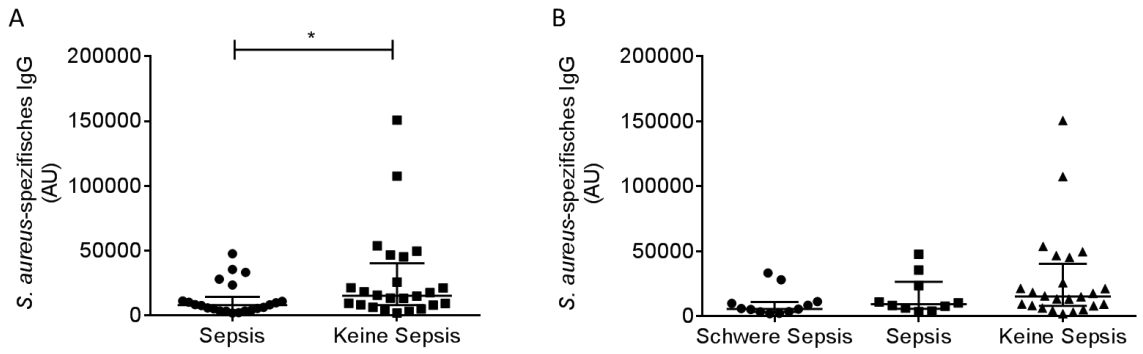


Abb. 4.10: Korrelation des Krankheitsverlaufs mit der spezifischen IgG-Menge gegen die *S. aureus*-Zelloberfläche. Die IgG-Bindung aus 46 Patientenseren (ab 1:2 500, seriell 1:5 verdünnt) an USA300Δ*spa*-Zellen (stationäre Wachstumsphase, 600 µM 2,2′-Bipyridyl) wurde mittels ELISA quantifiziert (Sekundärantikörper Ziege anti-human IgG (Fc-spezifisch), Dianova, 26,7 ng/mL). Patienten, die im Verlauf der Erkrankung keine Sepsis entwickelten, besaßen signifikant mehr spezifisches IgG zu Beginn der Erkrankung als Patienten, die eine Sepsis entwickelten (A, p = 0,0409, Mann-Whitney Test). Je schwerer der Verlauf der Erkrankung war, desto weniger spezifisches IgG war zu Beginn der Bakteriämie im Serum enthalten (B).
Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Patientenserums. Gezeigt werden Mediane und Interquartilsabstände. Abkürzungen: AU, *arbitrary units*.

Um zu überprüfen, ob die Qualität der Immunantwort gegen *S. aureus* mit dem Verlauf der Bakteriämie korrelierte, wurde die Bindung der IgG-Subklasse 4 (IgG4) an die extrazellulären *S. aureus*-Proteine aus dem Kulturüberstand (USA300Δ*spa*, stationäre Wachstumsphase, 600 µM 2,2′-Bipyridyl) mittels Simple Western Assay quantifiziert.
Es gab keinen Zusammenhang zwischen dem Serumgehalt an *S. aureus*-spezifischem IgG4 zu Beginn der Erkrankung und dem Verlauf der Erkrankung (Abb. 4.11 A). Auch der Quotient von spezifischem IgG4/IgG korrelierte nicht mit dem Krankheitsverlauf (Abb. 4.11 B).

Da *S. aureus*-spezifisches Serum-Gesamt-IgG, nicht aber IgG4, mit dem weiteren Verlauf korrelierte, wurde in den folgenden Versuchen auf die Bestimmung von IgG4 verzichtet.

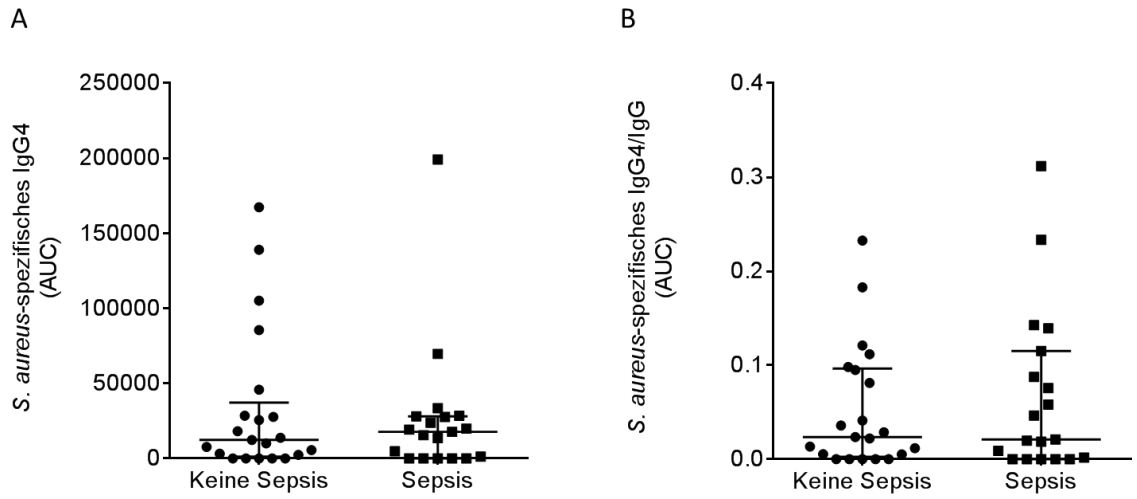


Abb. 4.11: Kein Zusammenhang zwischen spezifischem IgG4 gegen extrazelluläre *S. aureus*-Proteine im Serum von *S. aureus*-Bakteriämiepatienten zu Beginn der Erkrankung mit dem Verlauf der Erkrankung. Die IgG4-Bindung aus 40 Patientenseren (1:100) an extrazelluläre Proteine aus dem Kulturüberstand von USA300Δ*spa* (stationäre Wachstumsphase, 600 µM 2,2′-Bipyridyl) wurde mittels Simple Western Assay quantifiziert (Maus anti-human IgG4, 10 µg/mL). Patienten, die im Verlauf der Erkrankung keine Sepsis entwickelten, besaßen nicht mehr spezifisches IgG4 zu Beginn der Erkrankung als Patienten, die eine Sepsis entwickelten (A). Dies war ebenso der Fall für den Anteil an spezifischem IgG4 am *S. aureus*-spezifischem IgG (B). Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Patientenserums. Gezeigt werden Mediane und Interquartilsabstände. Abkürzungen: AUC, Fläche unter der Kurve.

Die erhobenen Daten bezogen sich bis hier auf komplexe *S. aureus*-Proteinproben (extrazelluläre Proteine aus dem Kulturüberstand und Oberflächenproteine). Um die Antikörperbindung an *S. aureus* molekular zu definieren wurde ein Flexmap3D Assay genutzt, mit dem die IgG-Bindung an 64 rekombinante *S. aureus*-Proteine simultan gemessen werden konnte. Der Flexmap3D Assay wurde zusammen mit der ZIK-FunGene Nachwuchsgruppe „Angewandte Proteomics“ (Greifswald) durchgeführt. In der prospektiven Studie wurden 44 Patientenseren (Serumentnahme nicht später als Diagnose Bakteriämie, siehe Anhang Tabelle 8.2) eingeschlossen. Die *S. aureus*-Bakteriämiepatienten wurden nach ihrem Krankheitsverlauf in drei Gruppen klassifiziert: keine Sepsis (23 Patienten), Sepsis (10 Patienten) und schwere Sepsis (11 Patienten). Die Seren der drei Gruppen unterschieden sich nicht in ihren mittleren Gesamt-IgG-Konzentrationen (siehe Abb. 8.5).

Bei 21 der 64 untersuchten *S. aureus*-Proteine ließ sich bei Patienten, die im Krankheitsverlauf keine Sepsis entwickelten, zu Beginn der Erkrankung signifikant mehr spezifisches IgG nachweisen als bei den anderen beiden Gruppen. Bei diesen 21 Proteinen fiel der große Anteil extrazellulärer bzw. an der Oberfläche exponierter *S. aureus*-Proteine auf. Eingeteilt nach ihrer Lokalisation befanden sich unter den 21 Proteinen 14 sezernierte Proteine, vier Oberflächenproteine, ein intrazelluläres Protein und zwei bisher nicht näher charakterisierte Proteine mit Signalpeptid (siehe Tabelle 4.3 und Anhang Tabelle 8.5, sowie Abb. 8.7 und Abb. 8.8).

Tabelle 4.3: Übersicht der 21 im Flexmap3D Assay eingesetzten *S. aureus*-Proteine, gegen die *S. aureus*-Bakteriämiepatienten, die im Krankheitsverlauf keine Sepsis entwickelten, zu Krankheitsbeginn signifikant mehr IgG besaßen als Patienten, die später eine Sepsis entwickelten. Geordnet nach p-Werten.

Abkürzung	**Beschreibung**	**Funktion**	**p = [a]**
Plc	1-Phosphatidylinositol Phosphodiesterase	Lipase	0,0002
SspB	Staphopain B	Protease	0,0011
SEM	Staphylokokken Enterotoxin M	Superantigen	0,0018
IsaA	Transglycosylase	Virulenzfaktor	0,0027
GlpQ	Glycerolphosphoryldiester-Phosphodiesterase	Lipase	0,0029
SplB	Serin-Protease SplB	Protease	0,0037
SACOL0985	Oberflächenprotein, putativ	-	0,0045
HlgC	Gamma-Hämolysin Komponente C	Hämolysin/Leukotoxin	0,0054
SACOL0444	Uncharakterisiertes Protein	-	0,0088
Sak	Staphylokinase	Protease	0,0108
Efb-c	Fibrinogen-bindendes Protein	Adhäsionsmolekül	0,0149
LukF-PV	Panton-Valentin Leukozidin	Hämolysin/Leukotoxin	0,0170
SACOL0480	Uncharakterisiertes Protein	-	0,0192
HlgB	Gamma-Hämolysin Komponente B	Hämolysin/Leukotoxin	0,0204
Atl[b]	Bifunktionales Autolysin	Protease	0,0217
TSST-1	Toxisches-Schock-Syndrom-Toxin-1	Superantigen	0,0231
Coa	Koagulase	Adhäsionsmolekül	0,0242
SplC	Serin-Protease SplC	Protease	0,0366
CHIPS	Chemotaxis-inhibierendes Protein	Virulenzfaktor	0,0432
SEI	Staphylokokken Enterotoxin I	Superantigen	0,0435
GreA	Trankriptions-Elongationsfaktor	Proteinsynthese und -faltung	0,0495

[a] p-Werte des Vergleichs der Protein-spezifischen IgG-Mengen in den Seren beider Patientengruppen (keine Sepsis und Sepsis); Mann-Whitney Test.

[b] N-terminaler Teil des Proteins.

Als nächstes sollte versucht werden, die Patienten nach ihrem Bakteriämieverlauf anhand der IgG-Bindungsdaten an die 64 rekombinanten *S. aureus*-Proteine zu stratifizieren. Zuerst wurden die Bakteriämiepatienten gemäß ihres Krankheitsverlaufs in die drei Gruppen keine Sepsis, Sepsis und schwere Sepsis eingeteilt. Die IgG-Bindungsdaten an die 64 rekombinanten *S. aureus*-Proteine wurde mit Genedata Analyst ausgewertet. Eine *partial least squares analysis* (PLS) ergab, dass die Gruppen Sepsis und schwere Sepsis zusammen segregierten (Abb. 4.12 A).

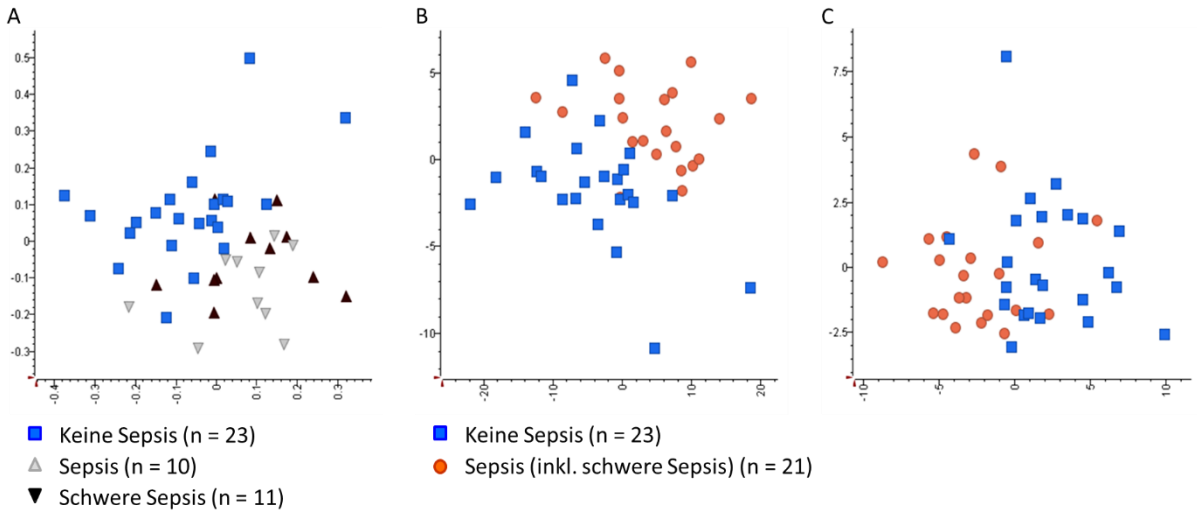


Abb. 4.12: IgG Bindung an rekombinante *S. aureus*-Proteine bei Patienten mit *S. aureus*-Bakteriämie. Die IgG-Bindung an 64 rekombinante *S. aureus*-Proteine wurde in 44 Patientenseren (sieben Verdünnungsstufen, 1:50 bis 1:200 000) mittels Flexmap3D Assay quantifiziert (Sekundärantikörper Ziege anti-Human IgG (Fc-spezifisch), Dianova, 5 µg/mL) und mit Genedata Analyst ausgewertet. Patienten, die im späteren Krankheitsverlauf eine Sepsis oder schwere Sepsis entwickelten, fielen bei der Analyse mittels *partial least squares analysis* (PLS) in den gleichen Bereich (A). Wurden alle Sepsispatienten in eine Gruppe zusammengefasst, ließen sie sich mittels PLS von Patienten, die keine Sepsis entwickelten, gut unterscheiden (B). Dafür waren die IgG-Bindungsdaten an acht der 64 rekombinanten Proteine ausschlaggebend (Tabelle 4.4). Auf Basis der IgG-Bindung an diese acht Proteine konnten Patienten, die im Krankheitsverlauf eine Sepsis entwickelten, von denen, die keine Sepsis entwickelten, mit einer *principal component analysis* unterschieden werden (C).
Jeder Punkt repräsentiert einen Patienten. Die Abbildung wurde von Dr. rer. medic. Frank Schmidt zur Verfügung gestellt.

Deshalb wurden sie zu einer Gruppe „Sepsis“ zusammengefasst und die PLS erneut durchgeführt (Abb. 4.12 B). Nun ließen sich Patienten, die keine Sepsis entwickelten, und die Sepsis entwickelten, gut voneinander trennen. Die 20 Proteine, die für diese Diskriminierung

beider Gruppen entscheidend waren, sind in Tabelle 4.4 aufgelistet. Mittels linearer Diskriminanzanalyse nach Fisher stellte sich heraus, dass die IgG-Bindungsdaten der ersten acht Proteine aus dieser Liste am besten diskriminierten (Tabelle 4.4, grau unterlegt). Diese Daten wurden für eine *principal component analysis* (PCA) genutzt. In der PCA konnten die beiden Patientengruppen (Sepsis und keine Sepsis) voneinander getrennt werden (Abb. 4.12 C). „Sepsis“ wurde bei 16 von 21 Patienten richtig vorhergesagt, „keine Sepsis“ bei 17 von 23 Patienten. Die Vorhersage war in 75 % der Fälle mit einer Sensitivität von 76 % und einer Spezifität von 74 % richtig.

4.2.2 Weitere Hinweise auf die mögliche protektive Rolle von *S. aureus*-spezifischem IgG

4.2.2.1 *S. aureus*-Träger und Nicht-Träger besitzen unterschiedliche Mengen an *S. aureus*-spezifischem IgG

S. aureus-Träger haben ein höheres Risiko, eine Infektion des Blutkreislaufes mit *S. aureus* zu bekommen als Nicht-Träger. Kommt es aber zu einer solchen Infektion, ist der Verlauf der Erkrankung bei *S. aureus*-Trägern milder als bei Nicht-Trägern [139]. Dieses als *Carrierparadoxon* bezeichnete Phänomen könnte sich dadurch erklären lassen, dass *S. aureus*-Träger im Laufe ihrer Kolonisierung mit dem Bakterium ein schützendes Immungedächtnis aufgebaut haben. Um dies zu prüfen, wurden die Seren von 17 gesunden *S. aureus*-Trägern und neun Nicht-Trägern (ssl-Seren) verglichen. Gemessen wurde die IgG-Bindung an extrazelluläre *S. aureus*-Proteine aus dem Kulturüberstand (Antigene: USA300Δ*spa*, stationäre Wachstumsphase, 600 µM 2,2′-Bipyridyl), und an die *S. aureus*-Zelloberfläche. Dafür wurden Simple Western Assays bzw. ELISA-Verfahren genutzt. Als Sekundärantikörper wurde ein Peroxidase-konjugierter Ziege anti-human (Fc-spezifisch) Antikörper (Dianova) eingesetzt.

Serum von *S. aureus*-Trägern beinhaltete signifikant mehr *S. aureus*-spezifisches IgG als Serum von Nicht-Trägern, sowohl gegen extrazelluläre *S. aureus*-Proteine ($p = 0{,}018$, Mann-Whitney Test) als auch gegen die *S. aureus*-Zelloberfläche ($p = 0{,}0043$, Mann-Whitney Test; Abb. 4.13).

Tabelle 4.4: Übersicht der 20 rekombinanten *S. aureus*-Proteine, die im Flexmap3D Assay die Patienten am besten nach Bakteriämieverlauf stratifizieren konnten. Die acht Proteine, die die Patienten bei der *principal component analysis* am besten diskriminierten, sind grau hinterlegt.

Abkürzung	**Beschreibung**	**Funktion**	**Genort**	**Protein Lokalisation[a]**			
				Psortb	**LocateP**	**SignalP**	**TM-Domäne**
Plc	1-Phosphatidylinositol Phosphodiesterase	Lipase	SAUSA300_0099	extrazellulär	membrangebunden	ja	1
SspB	Staphopain B	Protease	SA0900	extrazellulär	extrazellulär	ja	1
IsaA	Transglycosylase	Virulenzfaktor	SAOUHSC_02887	extrazellulär	membrangebunden	ja	0
-	Uncharakterisiertes Protein	-	SACOL0444	membrangebunden	extrazellulär	ja	0
SEM	Staphylokokken Enterotoxin M	Superantigen	SA1647	extrazellulär	membrangebunden	ja	0
-	Oberflächenprotein, putativ	-	SACOL0985	membrangebunden	membrangebunden	ja	0
GlpQ	Glycerolphosphoryldiester-Phosphodiesterase	Lipase	SAUSA300_0862	extrazellulär	membrangebunden	ja	0
HlgC	Gamma-Hämolysin Komponente C	Hämolysin/Leukotoxin	SACOL2421	extrazellulär	extrazellulär	ja	0
SplB	Serin-Protease SplB	Protease	SAOUHSC_01941	extrazellulär	membrangebunden	ja	1
Sak	Staphylokinase	Protease	SAOUHSC_02171	extrazellulär	extrazellulär	ja	0
Atl	Bifunktionales Autolysin	Protease	SAOUHSC_00994[b]	extrazellulär	extrazellulär	ja	0
Efb-c	Fibrinogen-bindendes Protein	Adhäsionsmolekül	SAOUHSC_01114	extrazellulär	membrangebunden	ja	0
-	Uncharakterisiertes Protein	-	SACOL0480	membrangebunden	membrangebunden	ja	1
GreA	Trankriptions-Elongationsfaktor	Proteinsynthese/-faltung	SA1438	zytoplasmatisch	zytoplasmatisch	nein	0
LukF-PV	Panton-Valentin Leukozidin	Hämolysin/Leukotoxin	SAUSA300_1381	-	-	-	-
TSST-1	Toxisches-Schock-Syndrom-Toxin-1	Superantigen	SA1819	extrazellulär	extrazellulär	ja	1
HlgB	Gamma-Hämolysin Komponente B	Hämolysin/Leukotoxin	SACOL2422	extrazellulär	extrazellulär	ja	0
Coa	Koagulase	Adhäsionsmolekül	SAOUHSC_00192	extrazellulär	extrazellulär	ja	0
Lip	Triacylglycerol Lipase 1	Lipase	SAUSA300_2603	extrazellulär	membrangebunden	ja	1
-	Uncharakterisiertes Protein	-	SACOL0908	membrangebunden	membrangebunden	ja	0

Abkürzungen: TM, Transmembran.

[a] Die Protein Lokalisation wurde in AureoWiki abgefragt [159].

[b] N-terminaler Teil des Proteins.

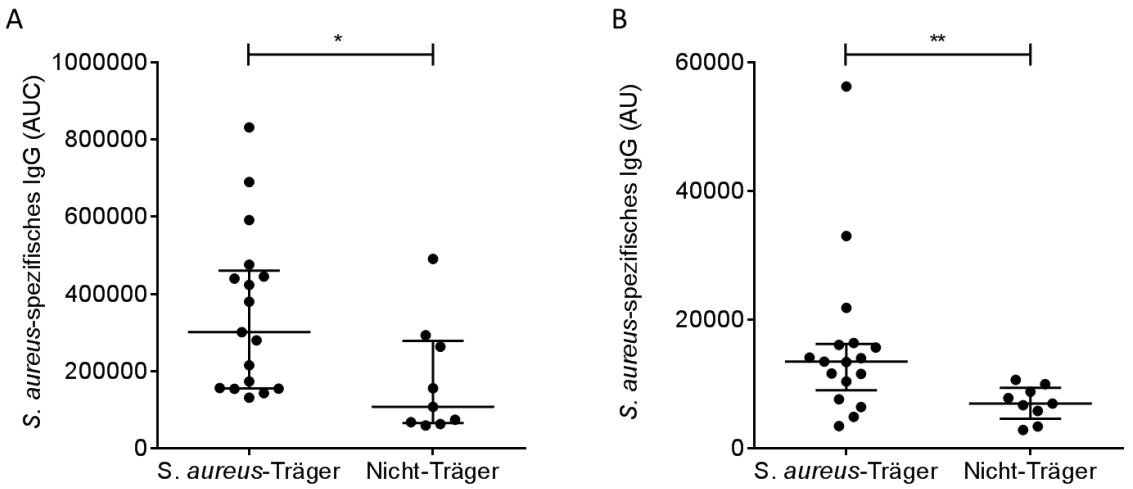


Abb. 4.13: *S. aureus*-spezifisches IgG in den Seren von 17 gesunden *S. aureus*-Trägern und neun Nicht-Trägern. Die IgG-Bindung an extrazelluläre Proteine aus dem Kulturüberstand von USA300Δ*spa* (A), sowie an die *S. aureus*-Zelloberfläche (B) (stationäre Wachstumsphase, 600 µM 2,2′-Bipyridyl) wurde mittels Simple Western Assay bzw. ELISA (Sekundärantikörper Ziege anti-human IgG (Fc-spezifisch), Dianova) quantifiziert. *S. aureus*-Träger besaßen signifikant mehr spezifisches IgG gegen beide *S. aureus*-Proteinpräparationen (A, p = 0,018; B, p = 0,0043, Mann-Whitney Test).
Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Serums. Gezeigt werden Mediane und Interquartilsabstände. Abkürzungen: AUC, Fläche unter der Kurve; AU, *arbitrary units*.

4.2.2.2 Patienten mit zystischer Fibrose entwickeln eine starke humorale Immunantwort gegen *S. aureus*

Die Lunge von Patienten mit zystischer Fibrose (CF) wird häufig durch *S. aureus* infiziert [116, 117]. Trotz dieser manchmal schweren *S. aureus*-Infektionen entwickeln CF-Patienten jedoch keine *S. aureus*-Sepsis (persönliche Mitteilung Professor Dr. Barbara Kahl, Universität Münster). Der Grund hierfür ist noch nicht geklärt.

Der Vergleich von 20 CF-Patienten mit Seren von gesunden 17 *S. aureus*-Trägern ergab, dass Serum von CF-Patienten signifikant mehr spezifisches IgG gegen extrazelluläre *S. aureus*-Proteine enthielt (p = 0,014, Mann-Whitney Test; Abb. 4.14 A). Die Serum-IgG-Bindung an die *S. aureus*-Zelloberfläche unterschied sich dagegen nicht zwischen CF-Patienten und *S. aureus*-Trägern (Abb. 4.14 B).

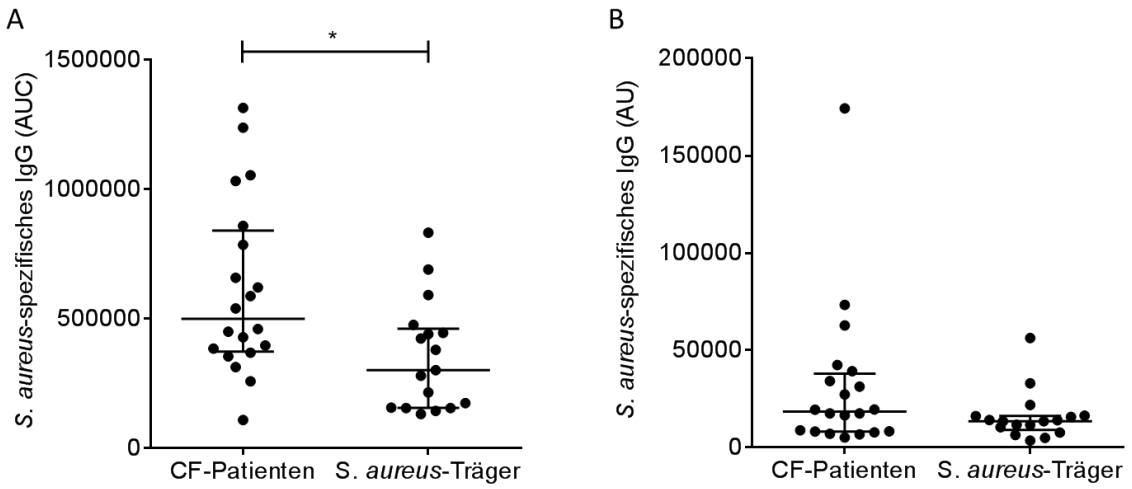


Abb. 4.14: *S. aureus*-spezifisches IgG in den Seren von 20 CF-Patienten und 17 gesunden *S. aureus*-Trägern. Die IgG-Bindung an extrazelluläre Proteine aus dem Kulturüberstand von USA300Δ*spa* (A), sowie an die *S. aureus*-Zelloberfläche (B) (stationäre Wachstumsphase, 600 µM 2,2′-Bipyridyl) wurde mittels Simple Western Assay bzw. ELISA (Sekundärantikörper Ziege anti-human IgG (Fc-spezifisch), Dianova) quantifiziert. CF-Patienten besaßen signifikant mehr spezifisches IgG gegen extrazelluläre *S. aureus*-Proteine (A, p = 0,014, Mann-Whitney Test), nicht aber gegen die *S. aureus*-Zelloberfläche (B).
Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Serums. Gezeigt werden Mediane und Interquartilsabstände. Abkürzungen: AUC, Fläche unter der Kurve; AU, *arbitrary units*.

4.2.2.3 Patienten mit Hyper-IgE-Syndrom profitieren von der Substitution mit *S. aureus*-spezifischem IgG

Patienten mit einer Mutation im Transkriptionsfaktor STAT3 (STAT3-HIES) haben einen Defekt bei der Bildung von Th17-Zellen und bilden ein Hyper-IgE-Syndrom aus. Sie leiden bereits kurz nach der Geburt an schweren *S. aureus*-Infektionen der Lunge und der Haut. Die Ursache dafür wird im Th17-Zelldefekt vermutet. Dieser könnte dazu führen, dass neutrophile Granulozyten nicht ausreichend gut rekrutiert werden können, so dass die Patienten *S. aureus* nicht effektiv abwehren können [72, 73]. Über die *S. aureus*-spezifische IgG-Antwort bei diesen Patienten war dagegen wenig bekannt [160]. Deshalb wurde in dieser Arbeit die *S. aureus*-spezifische IgG-Antwort bei 15 STAT3-HIES-Patienten untersucht und mit der von 17 gesunden *S. aureus*-Trägern und 20 CF-Patienten verglichen. Letztere leiden ähnlich häufig wie STAT3-HIES-Patienten an *S. aureus*-Lungeninfektionen, besitzen allerdings keinen Immundefekt und erscheinen vor der Entwicklung einer *S. aureus*-Sepsis geschützt (persönliche Mitteilung Professor Dr. Barbara Kahl, Universität Münster).

Seren von STAT3-HIES-Patienten beinhalteten signifikant weniger *S. aureus*-spezifisches IgG als Serum von CF-Patienten, sowohl gegen extrazelluläre *S. aureus*-Proteine ($p < 0{,}001$, Dunns) als auch gegen die *S. aureus*-Zelloberfläche ($p < 0{,}001$, Dunns; Abb. 4.15). Auch gesunde *S. aureus*-Träger hatten mehr spezifisches IgG im Serum als STAT3-HIES-Patienten, jedoch war dieser Unterschied beim statistischen Vergleich der drei Gruppen nicht signifikant.

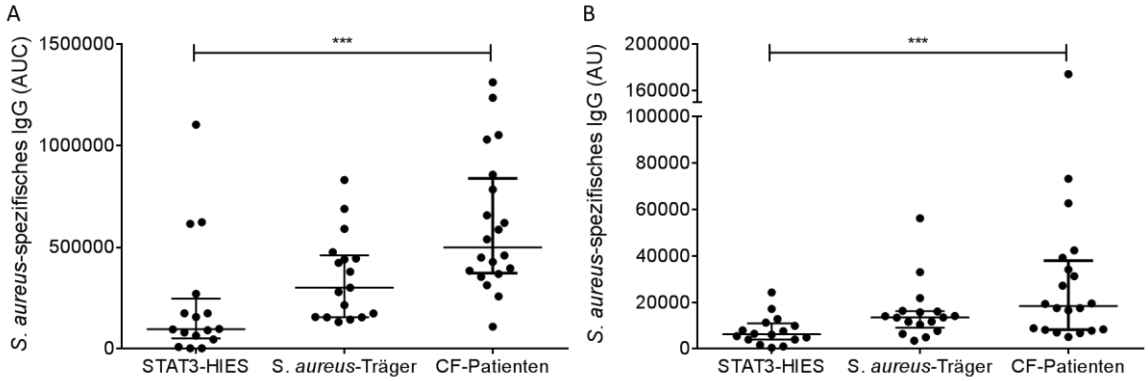


Abb. 4.15: *S. aureus*-spezifisches IgG in den Seren von 15 STAT3-HIES-Patienten, 17 gesunden *S. aureus*-Trägern und 20 CF-Patienten. Die IgG-Bindung an extrazelluläre Proteine aus dem Kulturüberstand von USA300Δ*spa* (A), sowie an die *S. aureus*-Zelloberfläche (B) (stationäre Wachstumsphase, 600 µM 2,2′-Bipyridyl) wurde mittels Simple Western Assay bzw. ELISA (Sekundärantikörper Ziege anti-human IgG (Fc-spezifisch), Dianova) quantifiziert. STAT3-HIES-Patienten besaßen, im Vergleich zu CF-Patienten, signifikant weniger spezifisches IgG gegen beide *S. aureus*-Proteinpräparationen (A und B, $p < 0{,}001$, Dunns). Tendenziell zeigte sich dies auch im Vergleich zu gesunden *S. aureus*-Trägern.
Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Serums. Gezeigt werden Mediane und Interquartilsabstände. Abkürzungen: AUC, Fläche unter der Kurve; AU, *arbitrary units*.

STAT3-HIES-Patienten werden unter anderem durch die Substitution mit IVIG behandelt, wodurch die *S. aureus*-Infektionen zurückgehen [161-164]. IVIG beinhaltete *S. aureus*-spezifisches IgG (vgl. Abb. 8.9). Um zu untersuchen, ob durch IVIG-Substitution die Menge an *S. aureus*-spezifischem IgG in den Seren der STAT3-HIES-Patienten ansteigt, wurde *S. aureus*-spezifisches IgG in den Patientenseren vor und nach IVIG-Substitution mit den beschriebenen Verfahren gemessen. In dieser Pilotstudie wurden die Seren nach IVIG-Substitution allerdings erst kurz vor einer erneuten IVIG-Substitution entnommen, d. h. im Nadir der Konzentration. Deshalb können keine Aussagen über einen Anstieg kurz nach Substitution gemacht werden.

Selbst im Nadir der IVIG-Konzentration im Serum war eine Erhöhung der *S. aureus*-spezifischen IgG-Bindung durch die Substitutionstherapie nachweisebar: gegen extrazelluläre

S. aureus-Proteine in drei von vier Seren (jeweils um den Faktor 7,5; 6,1 und 1,7) und gegen die *S. aureus*-Zelloberfläche in zwei von vier Seren (jeweils um den Faktor 2 und 1,2; Abb. 4.16).

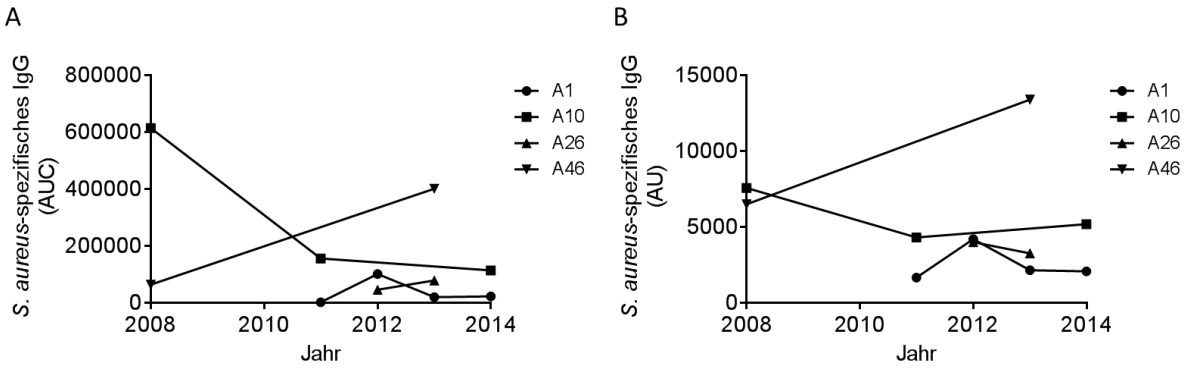


Abb. 4.16: *S. aureus*-spezifisches IgG in den Seren von vier STAT3-HIES-Patienten vor und nach der IVIG-Substitutionsbehandlung. Die IgG-Bindung an extrazelluläre Proteine aus dem Kulturüberstand von USA300Δ*spa* (A), sowie an die *S. aureus*-Zelloberfläche (B) (stationäre Wachstumsphase, 600 µM 2,2′-Bipyridyl) wurde mittels Simple Western Assay bzw. ELISA (Sekundärantikörper Ziege anti-human IgG (Fc-spezifisch), Dianova) quantifiziert. Der früheste Messerwert jedes Patienten stellt das Serum vor erstmaliger IVIG-Gabe dar. Alle weiteren Messerwerte entstammen Seren unter IVIG-Substitutionstherapie. Unter IVIG-Substitution erhöhte sich das *S. aureus*-spezifische IgG gegen extrazelluläre *S. aureus*-Proteine in drei von vier Seren (A) und gegen die *S. aureus*-Zelloberfläche in zwei von vier Seren (B).
Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Serums. Gezeigt werden Mediane und Interquartilsabstände. Abkürzungen: AUC, Fläche unter der Kurve; AU, *arbitrary units*.

4.3 Modulation der Immunantwort durch *S. aureus*

4.3.1 *S. aureus*-Serinproteasen zeigen Auffälligkeiten bei der IgG4-Bindung

S. aureus ist mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert. Für diesen Abschnitt der Arbeit sind vor allem solche von Interesse, die die durch eine Th2-dominierte Entzündung charakterisiert sind, wie Atopische Dermatitis (AD), Nasenpolypen oder auch Asthma. Patienten mit diesen Erkrankungen sind wesentlich häufiger mit *S. aureus* besiedelt als Gesunde [109, 127, 128]. Möglicherweise ist *S. aureus* bei diesen Erkrankungen so häufig zu finden, weil das Bakterium durch die anti-inflammatorischen Bedingungen in einem Th2-Millieu besser kolonisieren kann. *S. aureus* könnte sogar in der Lage sein, die Immunreaktion in Richtung eines Th2-Profils zu verschieben und sich so Vorteile verschaffen [108, 129]. Bei einer Immunantwort, die Th2- bzw. Treg-Zellen dominiert ist, kann es zur Produktion von antigenspezifischen IgG4 kommen [42, 44]. Eigene Vorarbeiten (Diplomarbeit Sebastian Stentzel) nutzen deshalb IgG4 als Surrogatmarker für eine Th2- oder Treg-getriebene Immunantwort. Sie haben gezeigt, dass die Qualität der Immunantwort bei gesunden *S. aureus*-Trägern sehr heterogen ausfallen kann (siehe Anhang Abb. 8.10) [155]. Einige Träger besitzen relativ viel *S. aureus*-spezifisches IgG4 gegen extrazelluläre Proteine ihres korrespondierenden *S. aureus*-Stamms und andere weniger oder gar kein IgG4.

Um diese Beobachtung auf eine breitere Basis zu stellen, wurde die Plasma-IgG4-Bindung an extrazelluläre *S. aureus*-Proteine bei 16 *S. aureus*-Trägern und 16 Nicht-Trägern (SH-Plasmen) untersucht. Dazu wurde der Simple Western Assay unter Verwendung von extrazellulären *S. aureus*-Proteinen aus dem Kulturüberstand (USA300Δ*spa*, stationäre Wachstumsphase, 600 µM 2,2′-Bipyridyl) genutzt. Die IgG4-Bindung wurde durch einen Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper detektiert.

Es bestätigte sich in der größeren Kohorte, dass *S. aureus*-spezifisches IgG4 im Plasma von gesunden Spendern eine große Varianz aufweist (Abb. 4.17 A). *S. aureus*-Träger und Nicht-Träger unterschieden sich dabei nicht. Bei drei der 16 *S. aureus*-Träger und vier der 16 Nicht-Träger ließ sich kein *S. aureus*-spezifisches IgG4 nachweisen. Der Faktor zwischen den Plasmen mit der geringsten nachweisbaren und der höchsten spezifischen IgG4-Menge betrug 20,4.

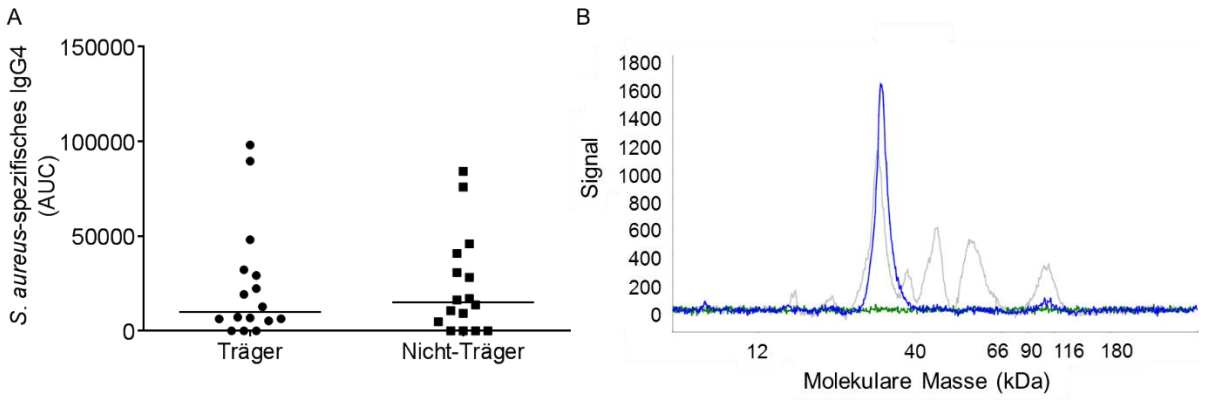


Abb. 4.17: IgG4-Bindung an extrazelluläre *S. aureus*-Proteine in Plasmen gesunder Spender. Die IgG4-Bindung aus 32 Plasmen (1:50) an extrazelluläre Proteine aus dem Kulturüberstand von USA300Δ*spa* (stationäre Wachstumsphase, 600 µM 2,2′-Bipyridyl) wurde mittels Simple Western Assay quantifiziert (Maus anti-Human IgG4, 10 µg/mL). *S. aureus*-Träger und Nicht-Träger unterschieden sich nicht in der Menge des *S. aureus*-spezifischen IgG4. Die Menge des spezifischen IgG4 war aber zwischen den Spendern in beiden Gruppen sehr variabel (A). Bei der Analyse der Bindungsmuster an die *S. aureus*-Proteine zeigte sich, dass es Spender gab, die kein *S. aureus*-spezifisches IgG4 besaßen (grün), solche, die Proteine unterschiedlicher molekularer Massen erkannten (grau), und schließlich Spender, die nur ein *S. aureus*-spezifisches Signal im Bereich von 32 kDa bis 34 kDa besaßen (blau) (B).
Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Plasmas. Gezeigt werden die Mediane. Abkürzungen: AUC, Fläche unter der Kurve.

Bei der Betrachtung der IgG4-Bindungsmuster der Spenderseren an die extrazellulären *S. aureus*-Proteine im Simple Western Assay stellte sich heraus, dass es drei Typen von Spendern gab: Spender, die kein IgG4 besaßen (7/32), Spender, die mehr als ein IgG4-Signal besaßen (20/32) und Spender, die ein distinktes Signal zeigten (5/32). Dieses eine Signal befand sich stets im Bereich zwischen 32 kDa und 34 kDa (Abb. 4.17 B).

Um die bakteriellen Antigene mit einer molekularen Masse zwischen 32 kDa bis 34 kDa zu identifizieren, die für diese auffälligen singulären IgG4-Signale verantwortlich waren, wurden die Ergebnisse der massenspektrometrischen Protein-Identifikation aus eigenen Vorarbeiten (Diplomarbeit Sebastian Stentzel) unter diesem Aspekt neu gesichtet [155]. Prominente IgG4-Signale auf den 2D-Western Blots der fünf *S. aureus*-Träger befanden sich in einem Bereich, in dem auch die Serinproteasen (Spls) von *S. aureus* in den 2D-Gelen lokalisiert waren (siehe Anhang Abb. 8.10). Bis zu sechs Spls sind bei *S. aureus* in wechselnden Kombinationen auf einem Operon kodiert: SplA, SplB, SplC, SplD, SplE und SplF [93].

Zur Überprüfung, ob die Spls die dominanten IgG4-bindenden Proteine sind, wurden zwei rekombinante Spls mit C-terminalem Strep-Tag (SplC und SplD) hergestellt, im Protein Simple Assay aufgetrennt und auf IgG4-Bindung getestet. Dazu wurde ein Plasma eingesetzt, welches nur ein IgG4-Signal gegen extrazelluläre *S. aureus*-Proteine gezeigt hatte, und eines mit mehreren IgG4-Signalen gegen extrazelluläre *S. aureus*-Proteine. Die IgG4-Bindung wurde durch einen Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (Maus anti-Human IgG4, Invitrogen) detektiert.
Beide Plasmen zeigten IgG4-Bindung an SplC und SplD im Bereich von 34 kDa bis 35 kDa (siehe Anhang Abb. 8.11). Vermutlich bedingt durch die Methode entsprach die molekulare Laufweite beider Spls nicht ihrer theoretischen molekularen Masse von ca. 26 kDa.
Die Daten der 2D-Western Blots und die Analyse extrazellulärer Proteine und rekombinanter Spls im Simple Western Assay legten nahe, dass es sich bei den Spls um die dominanten IgG4-bindenen Proteine von *S. aureus* handeln könnte. In diesem Fall lässt sich vermuten, dass Spls die Immunantwort in Richtung eines Th2- bzw. eines anti-inflammatorischen Reaktionsprofil modifizieren können.

Um dies weiter zu prüfen, wurde in einem Pilotexperiment die Antikörperantwort von zwei Erkrankungen untersucht, die stellvertretend zwei Polarisierungen der Ausrichtung der Immunantwort repräsentieren: Die Th2-dominierte AD und die Th1-dominierte Psoriasis. Dafür gab es folgende Gründe:
S. aureus wird eine Rolle bei einer Vielzahl von Erkrankungen zugeschrieben. Neben Th2-dominierten Erkrankungen wie AD, findet sich der Erreger häufig auch bei Psoriasis, einer Th1-dominierten chronischen Entzündung der Haut [114]. Um zu untersuchen, ob die Ausrichtung der Immunantwort gegen *S. aureus* in beiden Erkrankungen diese Th1- bzw. Th2-Profile reflektiert, wurde im Serum von Patienten (AD- ($n = 37$) und Psoriasis-Seren ($n = 20$), AG Werfel) *S. aureus*-spezifisches IgG4 mittels Simple Western Assay bestimmt wie oben mehrfach beschrieben (USA300Δ*spa*, stationäre Wachstumsphase, 600 µM 2,2′-Bipyridyl). Außerdem wurde die IgG4-Bindung an rekombinantes alpha-Hämolysin (Hla), SplC und SplD im ELISA quantifiziert. Hla wurde als Kontrollprotein ausgewählt, da dieses *S. aureus*-Protein eine Immunantwort mit Th1/Th17-Profil auslöst [60]. Es sollte untersucht werden, ob Spls auch bei den Patienten im Vergleich mit Hla bevorzugt IgG4 binden.

Die Ergebnisse des Simple Western Assays zeigten, dass bei AD generell hochsignifikant mehr *S. aureus*-spezifisches IgG4 gebildet wird als bei Psoriasis-Patienten (Abb. 4.18 A; p = 0,0003, Mann-Whitney Test). Von den AD-Patienten besaßen 5,4 % kein *S. aureus*-spezifisches IgG4 und von den Psoriasis-Patienten 10 %. Die Intensität der IgG4-Bindung an SplC und SplD war ebenfalls signifikant höher bei AD-Patienten (Abb. 4.18 B und C; p = 0,0155 und p = 0,0039, Mann-Whitney Test). Demgegenüber unterschied sich die IgG4-Bindung an Hla bei AD- und Psoriasis-Patienten nicht signifikant (Abb. 4.18 D). Sie war, wie bei Hla erwartet, in beiden Gruppen sehr niedrig.

Die Ausrichtung der Immunantwort auf extrazelluläre *S. aureus*-Proteine war also insgesamt entsprechend der Erkrankung in Richtung Th2 bzw. Th1 verschoben. Außerdem zeigten die Daten, dass selbst vor dem Hintergrund einer Th2-dominierten Immunantwort bei AD-Patienten die Immunantwort gegen Hla nicht signifikant in diese Richtung verschoben ist. Umgekehrt zeigten viele Psoriasis-Patienten mit ausgeprägtem *S. aureus*-spezifischen Th1-Profil eine IgG4-Bindung an Spls. Dies verdeutlicht, dass die Spls mit einer Immunreaktion besonderer Qualität beantwortet werden. Möglicherweise sind sie sogar in der Lage, die Immunantwort zu modulieren.

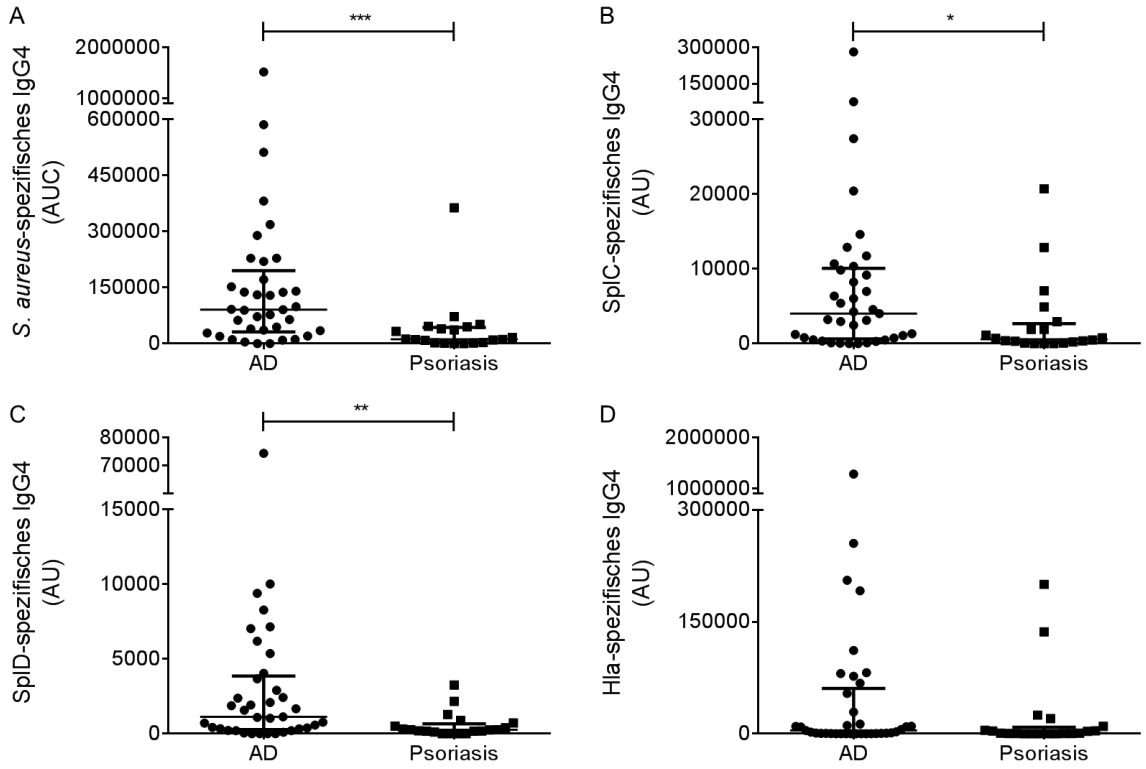


Abb. 4.18: Vergleich von *S. aureus*-spezifischem IgG4 in AD- und Psoriasis-Patienten. Die IgG4-Bindung aus 37 AD-Patientenseren und 20 Psoriasis-Patientenseren (beide 1:100) an extrazelluläre Proteine aus dem Kulturüberstand von USA300Δ*spa* (stationäre Wachstumsphase, 600 µM 2,2′-Bipyridyl) wurde mittels Simple Western Assay quantifiziert (Maus anti-human IgG4, 10 µg/mL). Die IgG4-Bindung an rekombinante *S. aureus*-Proteine wurde mittels ELISA ermittelt (Seren ab 1:50 seriell verdünnt, Sekundärantikörper 0,1 µg/mL). AD-Patienten besaßen mehr *S. aureus*-spezifisches IgG4 als Psoriasis-Patienten (A, p = 0,0003, Mann-Whitney Test). Dies war auch der Fall bei den beiden *S. aureus*-Serinproteasen SplC (B, p = 0,0155, Mann-Whitney Test) und SplD (C; p = 0,0039, Mann-Whitney Test). Hla-spezifisches IgG4 war bei AD im Vergleich zu Psoriasis nicht erhöht (D).
Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Patientenserums. Gezeigt werden Mediane und Interquartilsabstände. Abkürzungen: AUC, Fläche unter der Kurve; AU, *arbitrary units*.

4.3.2 Die humorale Immunantwort auf *S. aureus*-Serinproteasen ist in Richtung Th2/Treg verschoben

Um zu überprüfen, ob die humorale Immunantwort gegen Spls in Richtung Th2/Treg verschoben ist, wurden ELISAs für die Testung von Seren gesunder Spender (ssl-Seren) entwickelt. Dazu wurden fünf rekombinanten Spls (Tag-frei) hergestellt und die IgG1- und IgG4-Bindung gesunder *S. aureus*-Träger (n = 19) und Nicht-Träger (n = 27) an diese Proteine und Hla gemessen. Einzig SplC ließ sich mit dem Tag-freien Expressionssystem nicht

rekombinant herstellen. Aus diesem Grund konnte SplC in den folgenden Experimenten nicht untersucht werden. Die Messungen wurden unter meiner Anleitung in Zusammenarbeit mit Maria Nordengrün durchgeführt. Damit die Ergebnisse zwischen den verschiedenen Proteinen vergleichbar sind, wurden die Antikörper-Titer errechnet. Dies wurde zusammen mit Dr. rer. nat. Stephan Michalik (ZIK-FunGene Nachwuchsgruppe „Angewandte Proteomics“, Greifswald) durchgeführt.

Die gesunden Spender besaßen, verglichen mit Hla, signifikant mehr IgG4-Bindung an SplB, SplD und SplF ($p < 0{,}001$, Dunns; Abb. 4.19 A). Für SplA und SplE besaßen sie tendenziell mehr spezifisches IgG4 als für Hla. Im Gegensatz dazu dominierte bei Hla die spezifische IgG1-Bindung im Vergleich zu SplA signifikant ($p < 0{,}001$, Dunns; Abb. 4.19 B).

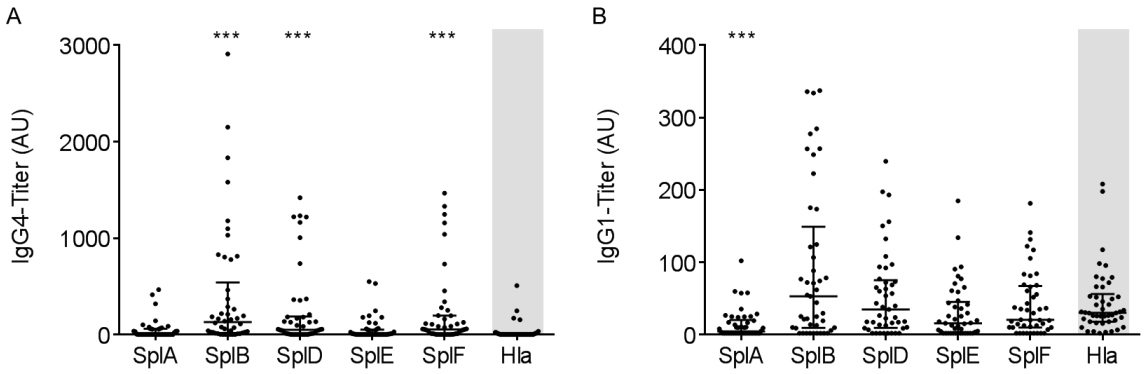


Abb. 4.19: IgG4- und IgG1-Bindung an *S. aureus*-Serinproteasen und Hla in Seren von gesunden *S. aureus*-Trägern (n = 19) und Nicht-Trägern (n = 27). Die Seren wurden im ELISA seriell verdünnt, die IgG4- bzw. IgG1-Bindung mit Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern (100 ng/mL) detektiert und die halbmaximale OD_{450} mit der Verdünnung an diesem Punkt multipliziert, um den spezifischen Antikörpertiter zu errechnen. Die Spender besaßen, im Vergleich zu Hla, signifikant mehr IgG4 gegen SplB, SplD und SplF (A, $p < 0{,}001$, Dunns, Vergleich mit Hla). Demgegenüber war die Menge an SplA-spezifischem IgG1 signifikant kleiner als gegen Hla (B, $p < 0{,}001$, Dunns, Vergleich mit Hla).
Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Serums. Gezeigt werden Mediane und Interquartilsabstände. Abkürzungen: AU, *arbitrary units*.

Die Qualität der Immunantwort gegen ein Protein kann besser beurteilt werden, wenn man sich das Verhältnis der spezifischen IgG4- zur spezifischen IgG1-Bindung veranschaulicht. Daher wurde nun der Quotient von IgG4 zu IgG1 gebildet.

Bei allen fünf getesteten Spls war der IgG4/IgG1-Quotient im Vergleich zu Hla hochsignifikant größer ($p < 0{,}001$, Dunns; Abb. 4.20).

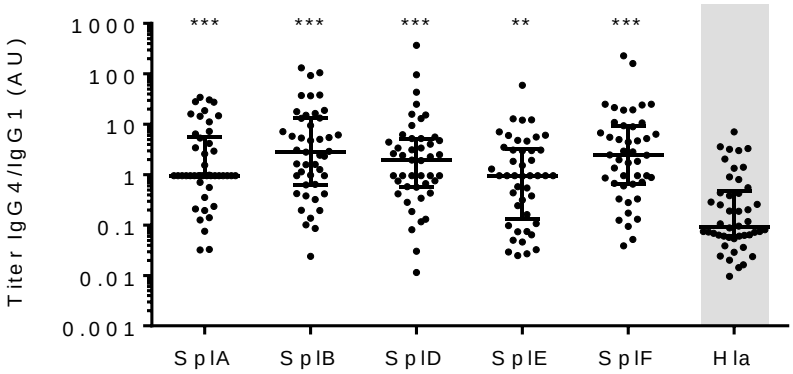


Abb. 4.20: Verhältnis von *S. aureus*-Serinproteasen- und Hla-spezifischem IgG4 zum spezifischen IgG1 in Seren von gesunden *S. aureus*-Trägern (n = 19) und Nicht-Trägern (n = 27). Die IgG4/IgG1-Quotienten aus den quantifizierten Antikörpermengen gegen Spls und Hla aus Abb. 4.19 wurde gebildet. Der IgG4/IgG1-Quotient war bei allen Spls im Vergleich zu Hla signifikant größer ($p < 0{,}001$, Dunns, Vergleich mit Hla).
Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Serums. Gezeigt werden Mediane und Interquartilsabstände. Abkürzungen: AU, *arbitrary units*.

S. aureus-Träger besaßen tendenziell mehr IgG1 gegen SplB, SplD, SplE und SplF als Nicht-Träger (siehe Anhang Abb. 8.12). In ihrer IgG4-Menge unterschieden sich beide Gruppen bei SplE. Hier besaßen *S. aureus*-Träger signifikant mehr IgG4 als Nicht-Träger (0,0192, Mann-Whitney Test; siehe Anhang Abb. 8.13). Der Quotient von Spl-spezifischem IgG4/IgG1 zeigte, dass *S. aureus*-Träger tendenziell mehr IgG4 gegen SplB, SplD und SplF bildeten als Nicht-Träger. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 4.21 A und siehe Anhang Abb. 8.14).

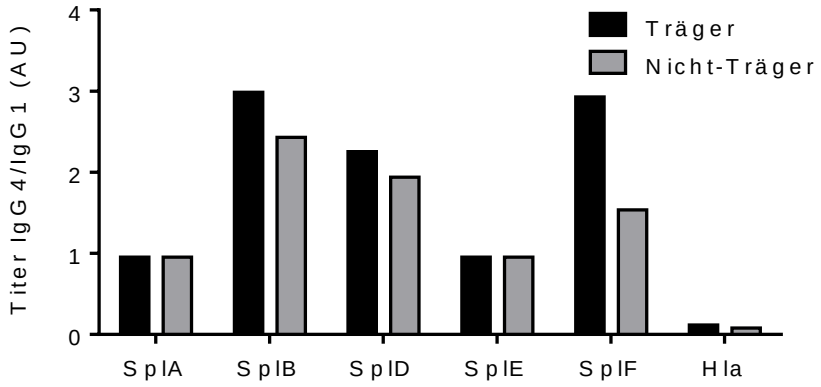


Abb. 4.21: Unterschiede im Verhältnis von Spl-spezifischem IgG4 zum spezifischen IgG1 zwischen gesunden *S. aureus*-Trägern (n = 19) und Nicht-Trägern (n = 27). Die IgG4/IgG1-Quotienten aus Abb. 4.20 wurden nach dem *S. aureus*-Trägerstatus der Spender eingeteilt. *S. aureus*-Träger besaßen tendenziell verhältnismäßig mehr spezifisches IgG4 gegen SplB, SplD und SplF als Nicht-Träger. Diese Tendenzen waren nicht signifikant.
Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Serums. Gezeigt werden Mediane. Abkürzungen: AU, *arbitrary units*.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse deutlich und reproduzierbar eine Verschiebung der humoralen Immunantwort gegen Spls zugunsten einer spezifischen IgG4-Bildung. Da der Klassenwechsel zu IgG4 Th2/Treg-Zytokine erfordert, stellte sich nun die Frage nach der Qualität der spezifischen T-Zellantwort.

4.3.3 *S. aureus*-Serinproteasen-spezifische T-Zellen zeigen ein Th2/Treg-Zytokinprofil

Für die Charakterisierung Spl- und Hla-spezifischer T-Zellen wurden T-Zellen aus EDTA-Vollblut gesunder Spender (n = 9) isoliert und zusammen mit *feeder*-Zellen und dem jeweiligen Antigen inkubiert. Je Antigen wurden für jeden Spender zwei Replikate angefertigt. Am Tag neun wurden die Überstände entnommen und darin mittels CBA pro-inflammatorische Zytokine (IFN-γ, TNF, IL-6, IL-17) und anti-inflammatorische (IL-10), sowie Th2-Zytokine (IL-4, IL-5, IL-13) bestimmt. Die Ergebnisse der Replikate wurden gemittelt und Kontrollwerte nicht stimulierter T-Zellen wurden abgezogen. Die Versuche wurden unter meiner Anleitung in Zusammenarbeit mit Maria Nordengrün durchgeführt.
Pro-inflammatorische Zytokine wurden vor allem bei der Stimulation der T-Zellen mit Hla induziert und in weit geringeren Mengen mit den Spls (Abb. 4.22 A). Dieser Unterschied war bei IL-6 am größten (Hla Median: 4 995 pg/mL; Spls Median: 32 pg/mL) und bei TNF am niedrigsten (Hla Median: 89 pg/mL; Spls Median: 12 pg/mL).

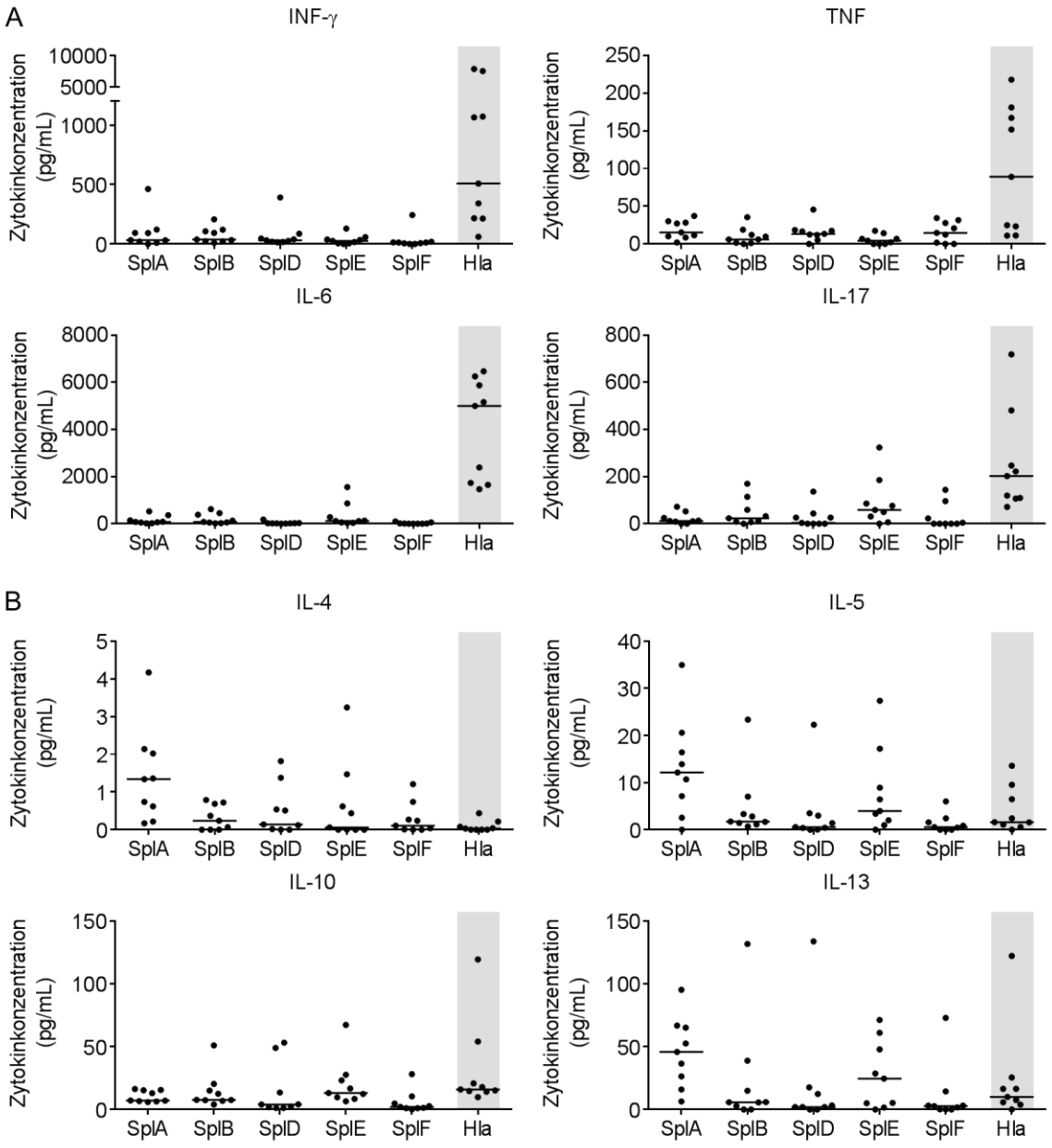


Abb. 4.22: Zytokinfreisetzung nach Stimulation von T-Zellen gesunder Spender mit *S. aureus*-Serinproteasen oder Hla. Die T-Zellen von neun Spendern wurden mit 5 µg/mL rekombinanten *S. aureus*-Protein (Spls bzw. Hla) und *feeder*-Zellen inkubiert. Am Tag neun wurden die Überstände entnommen und die Zytokinkonzentration mittels CBA bestimmt. Verglichen mit Spls, wurden durch die Inkubation mit Hla große Mengen pro-inflammatorischer Zytokine induziert (A). Dagegen wurden, verglichen mit Hla, durch die Inkubation mit Spls zum Teil relativ große Mengen anti-inflammatorischer und Th2-Zytokine induziert (B).
Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert zweier Replikate eines Spenders. Gezeigt werden Mediane.

Das umgekehrte Bild zeigte die Untersuchung der anti-inflammatorischen (IL-10) und Th2-Zytokine (IL-4, IL-5 und IL-13) (Abb. 4.22 B). Th2-Zytokine wurden vor allem durch die Inkubation der T-Zellen mit den Spls induziert. Durch Hla wurden dagegen, bis auf IL-10, vergleichsweise geringe Mengen von Th2-Zytokinen induziert.
Die Zahl der antigenspezifischen T-Zellen im Blut gesunder Spender ist je nach *S. aureus*-Antigen sehr variabel [165]. Aus diesem Grund wurde an dieser Stelle auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Da die Menge an produzierten Zytokinen neben dem Antigen auch davon abhängig ist, wie viele antigenspezifische T-Zellen reagieren, wurden in einem nächsten Schritt die relativen Anteile der anti-inflammatorischen und Th2-Zytokine an allen gemessenen Zytokinen berechnet. So konnte eine Aussage über die Qualität der Immunantwort auf die jeweiligen Antigene unabhängig von der Anzahl spezifischer T-Zellen getroffen werden.
In dieser Darstellung wird sehr deutlich, dass Spls mehr Th2-Zytokine und signifikant mehr anti-inflammatorisches IL-10 induzieren als Hla (Abb. 4.23).

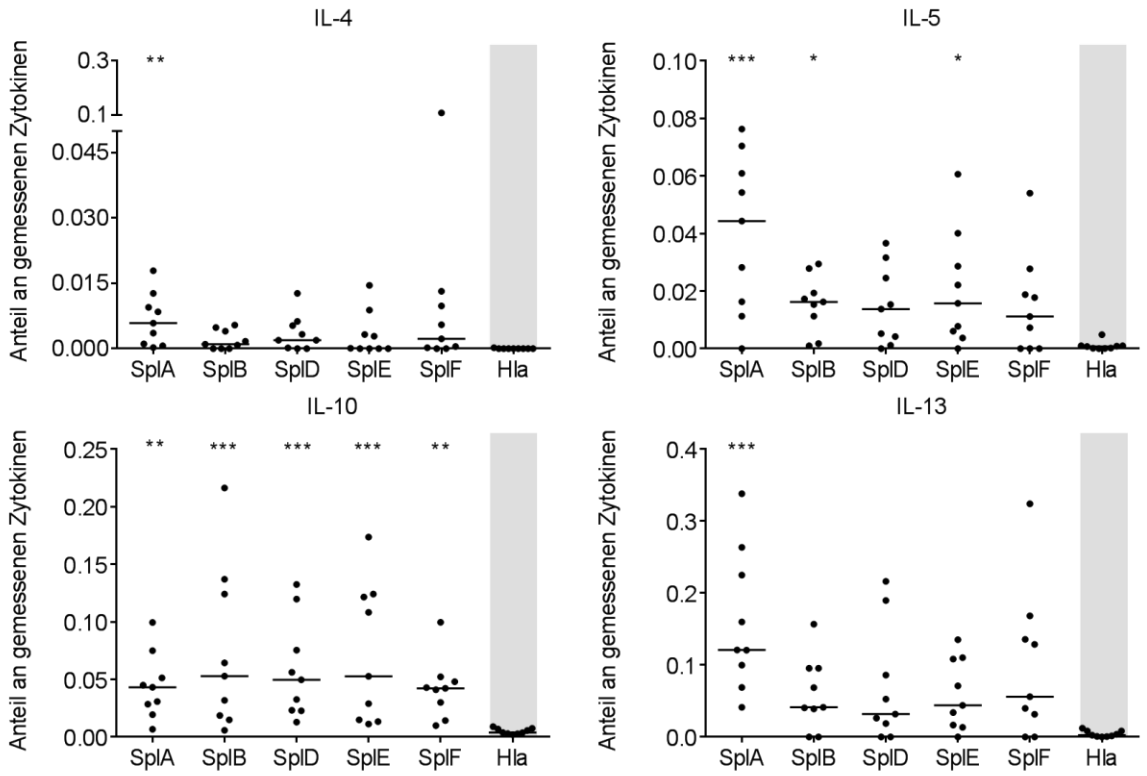


Abb. 4.23: Anteil anti-inflammatorischer und Th2-Zytokine an allen gemessenen Zytokinen aus Kulturüberständen von T-Zellen nach Inkubation mit *S. aureus*-Serinproteasen und Hla. Die T-Zellen von neun gesunden Spendern wurden mit 5 µg/mL rekombinanten *S. aureus*-Protein (Spls bzw. Hla) und *feeder*-Zellen inkubiert. Am Tag neun wurden die Überstände entnommen und die Zytokinkonzentration mittels CBA bestimmt. Der Anteil anti-inflammatorischer und Th2-Zytokine war bei der Inkubation der T-Zellen mit Spls höher als bei der Inkubation mit Hla.

Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert zweier Replikate eines Spenders. Gezeigt werden Mediane (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Dunns, Vergleich mit Hla).

4.3.4 An *S. aureus*-Serinproteasen findet IgE-Bindung statt

Nach den Hinweisen auf eine zum Teil Th2-verschobene Immunantwort auf Spls wurde nun nach Spl-spezifischen IgE-Antikörpern im Serum gesucht. Dazu wurden Seren von gesunden *S. aureus*-Trägern (n = 23) und Nicht-Trägern (n = 23) (ssl-Seren), Asthma-Patienten (n = 50, AG Bachert), CF-Patienten (n = 20, AG Kahl) und AD-Patienten (n = 12, AG Gläser) untersucht. Wegen des hohen Proben- und Materialverbrauchs in diesen Versuchen konnte jeweils nur eine Messung durchgeführt werden. Von den ermittelten OD-Werten wurde der 1,5-fache Leerwert abgezogen.

Die IgE-Bindung an Spls unterschied sich nicht zwischen gesunden *S. aureus*-Trägern und Nicht-Trägern (siehe Anhang Abb. 8.15). Beide Gruppen wurden daher zusammengefasst. Verglichen mit gesunden Spendern, enthielten die Seren von Asthma-Patienten und vor allem CF-Patienten signifikant mehr Spl-spezifisches IgE, die der AD-Patienten dagegen nicht (Abb. 4.24).

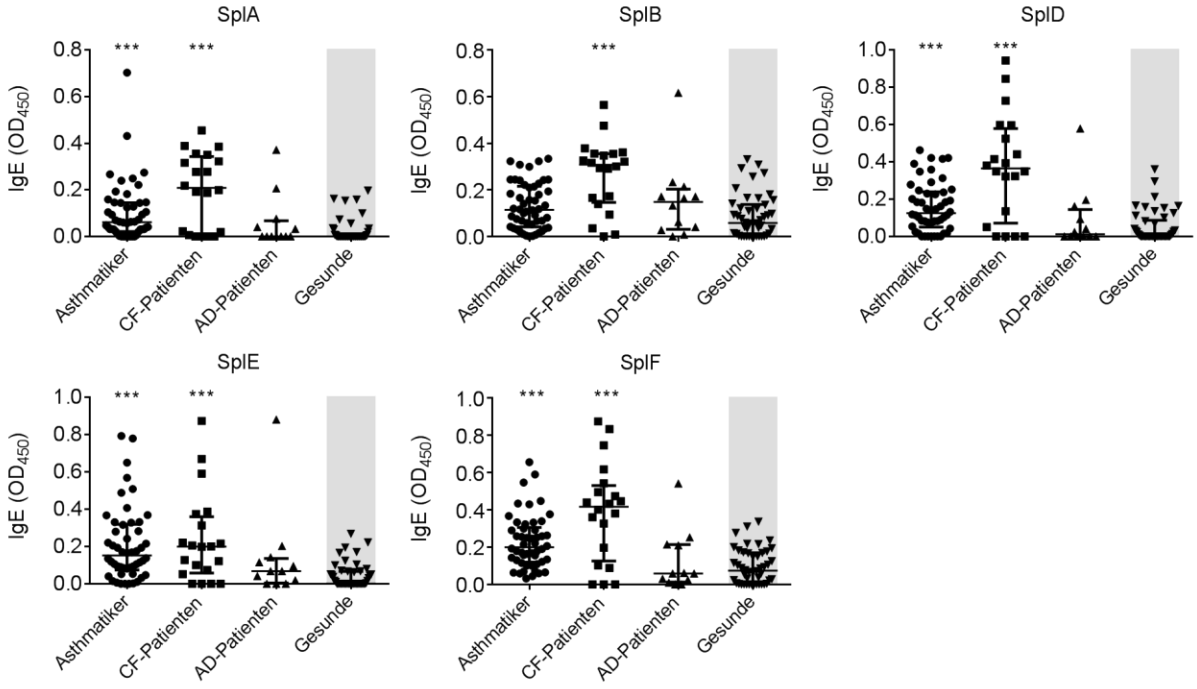


Abb. 4.24: IgE-Bindung an *S. aureus*-Serinproteasen in Seren verschiedener Patienten-Kohorten verglichen mit Seren gesunder Spender (n = 46). Die IgE-Bindung wurde mittels ELISA in 1:5 verdünnten Seren ermittelt (Biotin-konjugierter Sekundärantikörper Maus anti-human IgE, 10 µg/mL; Peroxidase-konjugiertes Streptavidin 3 µg/mL). Seren von Asthmatikern (n = 50) und vor allem CF-Patienten (n = 20) enthielten signifikant mehr Spl-spezifisches IgE als die gesunder Blutspender. Seren von AD-Patienten (n = 12) dagegen nicht.
Jeder Punkt repräsentiert einen gemessenen Wert eines Spenders bei OD. Gezeigt werden Mediane (*** $p < 0{,}001$, Dunns, Vergleich mit Gesunde).

5 Diskussion

5.1 Anpassung der Simple Western Assays an komplexe Proben

Für die Untersuchung von Antiköperbindung an Proteine haben sich Western Blots bewährt. Jedoch ist die Technik, besonders bei 2D-Western Blots, sehr arbeitszeitintensiv, und die reproduzierbare Quantifizierung der Antikörperbindung wird durch zwei Faktoren eingeschränkt: die zahlreichen manuellen Arbeitsschritte und der kleine lineare Bereich der üblichen Detektionsmethoden [150, 151]. Simple Western Assays (ProteinSimple) ermöglichen dagegen durch die Automatisierung von 1D-Western Blots sowie durch Einsatz von Chemilumineszenz als Detektionssystem eine valide Quantifizierung von Antikörperbindungen an Proteine über einen breiten linearen Bereich (3,3 log-Stufen). Im Vergleich zu konventionellen Western Blots sparen sie außerdem viel Arbeitszeit. Ein weiterer Vorteil ist, dass nur geringe Mengen von Proteinen und Antikörpern eingesetzt werden müssen [153, 166]. Da die Simple Western Assays bisher nur für definierte Proteine in Kombination mit ausgewählten monoklonalen Antikörpern etabliert waren, mussten sie in dieser Arbeit für die Messung von Antikörperbindungen in Seren an extrazelluläre *S. aureus*-Proteine aus dem Kulturüberstand angepasst werden [166, 167]. Dazu wurde ein *protein A*- (*spa*-) negativer *S. aureus*-Stamm eingesetzt, um unspezifische Antikörperbindungen an Spa zu verhindern [79].

Nach der Optimierung der Konzentrationen von Serum- und Sekundärantikörper-Präparationen wurde die Reproduzierbarkeit des Simple Western Assays in einer Pilotstudie mit Seren von Atopische Dermatitis (AD-) Patienten und gesunden Kontrollen (*S. aureus*-Träger und Nicht-Träger) getestet. Bei den insgesamt 23 Seren waren bei zwei Durchläufen im Simple Western Assay die Abweichungen maximal 30 %. Dabei betrug der Faktor zwischen den Seren mit der höchsten und der niedrigsten IgG-Bindung an die *S. aureus*-Proteine etwa 16. Alle Replikate eingeschlossen, betrug der absolute Variationskoeffizient (CV) 5,8 %. Der Vergleich von *S. aureus*-spezifischem IgG zwischen AD-Patienten und den gesunden Kontrollen ergab, dass die AD-Patienten signifikant mehr spezifisches IgG besaßen ($p = 0{,}0225$).
ProteinSimple gibt einen intra-Assay CV von < 20 % für seine Simple Western Assays an [168]. Mit einem CV-Wert von < 6 % konnte er mit dem in dieser Arbeit etablierten System deutlich unterboten werden. Die Quantifizierungen der *S. aureus*-spezifischen IgG-Mengen in den Seren

lassen sich folglich mit diesem System gut reproduzieren, ein wichtiger Fortschritt gegenüber konventionellen Western Blots.

Es war zu erwarten, dass AD-Patienten aufgrund ihrer hohen Besiedlungsraten der Haut mit *S. aureus* (90 %) und den mit der Erkrankung einhergehenden Hautläsionen höhere Mengen an spezifischem IgG besitzen [111]. In dieser Pilotstudie ließ sich dies bestätigen.

Mit den genannten Kenndaten sind Simple Western Assays konventionellen Western Blots deutlich überlegen. Dabei ist besonders die verbesserte Quantifizierbarkeit der Signale von Bedeutung. Zusammen mit ihrer guten Reproduzierbarkeit und den geringen Mengen an benötigten Patientenmaterial und Antigenen eignen sich die Simple Western Assays besonders für klinische Studien. Jedoch ist es mit dem hier vorgestellten Assay nicht möglich die Antikörper-bindenden *S. aureus*-Proteine zu identifizieren. Für diesen Zweck bieten sich Assays wie ELISAs und Flexmap-basierende Systeme an.

5.2 Effekte von Eisenlimitation auf das Immunom von *S. aureus*

S. aureus besiedelt etwa 30 % der gesunden Erwachsenen im Nasenvorhof und kann als Pathogen ein breites Spektrum von Infektionen hervorrufen [57]. Bei der Besiedlung und Infektion wird *S. aureus* mit verschiedenen Stressoren konfrontiert, die unter dem Konzept „*nutritional immunity*“ zusammengefasst werden. Dies beinhaltet unter anderem die Limitation von Nährstoffen durch den Wirt, die *S. aureus* zum Wachstum braucht [154]. Besonders freies Eisen wird stark limitiert. Tatsächlich liegt in den Körperflüssigkeiten des Menschen freies Eisen nur in einer Konzentration von 10^{-18} M vor. Diese ist zu gering, um bakterielles Wachstum zu ermöglichen [103]. Erreicht wird diese Eisenlimitation dadurch, dass der Großteil des Eisens intrazellulär an Hämoproteine sequestriert ist (Hämoglobin, Myoglobin) und extrazellulär an hochaffine Eisentransportproteine wie Transferrin und Laktoferrin gebunden wird [101, 102]. Wie entscheidend die Limitation freien Eisens für die Abwehr von bakteriellen Infektionen ist, zeigt sich am Beispiel genetischer Erkrankungen mit erhöhten Konzentrationen von freiem Eisen wie der Thalassämie. Bakterielle Infektionen gehören hier zu den Haupttodesursachen [104]. Damit *S. aureus* auch gesunde Individuen besiedeln bzw. Infektionen bei Ihnen verursachen kann, muss sich das Bakterium also an die *in vivo* extrem niedrige Konzentration

freien Eisens adaptieren und die Expression von Proteinen der Eisenaufnahmesysteme stark erhöhen [154].

5.2.1 Induktion der Eisenlimitation *in vitro*

Bei der Untersuchung der Antikörperbindung an *S. aureus*-Proteine werden in unserer Arbeitsgruppe vor allem extrazelluläre Proteine aus dem Kulturüberstand aus der stationären Wachstumsphase eingesetzt, da sich dieses Subproteom als besonders immunogen erwiesen hat (siehe Anhang Abb. 8.3, [155, 156]). Um diese Untersuchungen an die *in vivo* vorherrschende Eisenlimitation und die daraus resultierenden Veränderungen der bakteriellen Proteinexpression anzupassen, wurde bei der Kultivierung von *S. aureus* die Konzentration des freien Eisens reduziert. Durch den Einsatz des Eisenchelators 2,2′-Bipyridyl im Kulturmedium ließ sich das Wachstum der Bakterien konzentrationsabhängig hemmen. Die Größe des Effekts war dabei auch abhängig vom getesteten *S. aureus*-Stamm. Bei einem klinischen Bakteriämie-Isolat (302Δ*spa* [141]) wurde das Wachstum bereits durch 300 µM 2,2′-Bipyridyl deutlich gehemmt. Für eine vergleichbare Wachstumsinhibition des *S. aureus*-Stamms USA300Δ*spa* war die doppelte Konzentration von 2,2′-Bipyridyl notwendig. Ursache hierfür könnten Unterschiede in der Expression und Affinität der Eisenaufnahmesysteme sein.

Bei *Escherichia coli* wird von einer Toxizität von 2,2′-Bipyridyl berichtet [169]. Um auszuschließen, dass die Wachstumsinhibition durch nicht-spezifische toxische Effekte von 2,2′-Bipyridyl auf *S. aureus* ausgelöst wurde, wurde Eisen supplementiert, sobald Wachstumshemmung eingetreten war. Dadurch wurde die Wachstumsinhibition wieder aufgehoben, und USA300Δ*spa* erreichte die gleiche optische Dichte wie die Kontrollkultur ohne Eisenlimitation. Dies spricht dafür, dass die Wachstumsinhibition tatsächlich durch den Eisenmangel ausgelöst wurde.

5.2.2 Vermehrte Antikörperbindung an *S. aureus*-Proteine nach Eisenlimitation

Für die Analyse der Wirkung von Eisenlimitation wurde der *S. aureus*-Stamm USA300Δ*spa* verwendet, da dieser als weltweit bedeutender Infektionserreger gut charakterisiert ist und ein komplexes Exoproteom besitzt [76, 170]. Somit ist er für Untersuchungen von Antikörperbindungen an *S. aureus*-Proteine gut geeignet.

Zunächst wurde die Antikörperbindung mittels Simple Western Assay quantifiziert. Als Antigene dienten die isolierten extrazellulären *S. aureus*-Proteine aus dem Kulturüberstand der stationären Wachstumsphase. Zur Detektion wurde ein Sekundärantikörper verwendet, der hauptsächlich humane Antikörper der Klasse IgG bindet, jedoch auch andere humane Antikörperklassen binden kann. So wurde sichergestellt, dass möglichst viele Antikörperspezifitäten erfasst werden konnten. Die Untersuchung der Seren von vier gesunden *S. aureus*-Trägern ergab, dass in jedem Fall mehr Antikörper an *S. aureus*-Proteine aus eisenlimitierenden Wachstumsbedingungen gebunden haben als an *S. aureus*-Proteine ohne Eisenlimitation (Faktor 2,0 bis 6,2). Die Kultivierung von USA300Δ*spa* bei eisenlimitierenden Wachstumsbedingungen führte also vermutlich zu Veränderungen in der Zusammensetzung der extrazellulären Proteine aus dem Kulturüberstand und dadurch zu einer erhöhten Bindung der Antikörper aus humanen Seren.
Dass Eisenlimitation *in vitro* und *in vivo* bei *S. aureus* die Transkription und Proteinexpression verändert, wurde bereits gezeigt [171-174]. Neu war der Aspekt ob und an welche durch Eisenlimitation-induzierten *S. aureus*-Proteine Antikörperbindung stattfand.

Proteine, deren Expression während Eisenlimitation hochreguliert werden, gehören zu den Eisenaufnahmesystemen von *S. aureus* [70, 100, 175]. Die Expression der zugehörigen Gene steht unter der Kontrolle des Repressors Fur (*ferric uptake regulator*), der bei Eisenmangel nicht mehr an seine Erkennungssequenz (Fur-Box) bindet und die Transkription der Gene somit nicht mehr reprimiert [70]. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die nach Eisenlimitation stark erhöhte Antikörperbindung an diese Proteine stattfand.
S. aureus besitzt vier Eisenaufnahmesysteme: i) Das Isd- (*iron-regulated surface determinant*-) Eisenaufnahmesystem, welches Eisen aus Hämoglobin, der Haupteisenquelle von *S. aureus*, akquiriert. Es besteht aus zehn Proteinen, die zum Großteil Zellwand-verankert sind [100]. ii) Siderophore, niedermolekulare, hochaffine Eisen-bindende Proteine, die Eisen von Eisentransportproteinen wie Transferrin und Laktoferrin binden und anschließend über Transporter in die *S. aureus*-Zelle transportieren [99, 100]. iii) Transportsysteme für Xenosiderophore, also Siderophore anderer Spezies [100], und schließlich iv) den Transporter Fep, der für die Aufnahme Fe^{2+}- und Fe^{3+}-Ionen sorgt [106, 107].
i) Die löslichen Faktoren IsdB und IsdH binden Hämoglobin mit *NEAr iron transporter*- (NEAT-) Domänen und degradieren es. Man vermutet, dass IsdH Hämoglobin destabilisiert, so

dass Häm abgespalten wird [176]. Häm wird anschließend auf IsdA übertragen, welches danach Häm auf IsdC überträgt. Der Transport von Häm durch die bakterielle Membran wird durch IsdD, IsdE und IsdF vollzogen. Im Zellinneren wird Häm schließlich durch die Häm-Oxygenasen IsdI und IsdG degradiert und so das darin enthaltene Eisen für *S. aureus* verfügbar gemacht [100].
ii) *S. aureus* synthetisiert zwei Siderophore (Staphyloferrin A und B). Beide werden, nachdem sie Eisen gebunden haben, über ABC-Transporter in das Zellinnere transportiert. Staphyloferrin A wird dabei von HtsABC transportiert und Staphyloferrin B durch den Transporter SirABC [70]. iii) Daneben synthetisiert *S. aureus* mit FhuCBG und SstABCD auch ein Transportsystem für Hydroxamat-Siderophore bzw. Catechol-Siderophore, die das Bakterium selber nicht synthetisieren kann. Deshalb wird vermutet, dass *S. aureus* darüber Siderophore anderer Spezies, sogenannte Xenosiderophore, aufnehmen kann [100, 177, 178].

Um die Veränderungen der Zusammensetzung extrazellulärer *S. aureus*-Proteine durch Eisenlimitation zu untersuchen und zu ermitteln, an welche *S. aureus*-Proteine Antikörperbindung stattfand, wurden 2D-Gele, massenspektrometrische Analysen und 2D-Western Blots durchgeführt.
Es zeigte sich, dass in Folge von Eisenlimitation neue Proteine exprimiert wurden und in den 2D-Gelen nachweisbar waren. Dabei handelte es sich um drei Proteine des Isd-Eisenaufnahmesystems: IsdA, IsdB und IsdC. Bei der Auswertung der zugehörigen 2D-Western Blots, die mit einem Pool aus humanen Seren gesunder Spender entwickelt wurden, konnte Antikörperbindung an IsdA und IsdB festgestellt werden. Außerdem wurden bei eisenlimitierenden Wachstumsbedingungen der Bakterien stärkere Antikörpersignale im Bereich einer *S. aureus* Amidase (Sle1) und einer putativen Häm-abhängigen Peroxidase (SAUSA300_0569) beobachtet. Daneben gab es auf diesen 2D-Western Blots aber auch noch zahlreiche neue Antikörpersignale, die keinem Protein zugeordnet werden konnten, vermutlich weil die Proteinmenge in den 2D-Gelen für eine Identifikation nicht ausreichte.
IgG-Bindung an IsdA und IsdB wurden im Menschen und der Maus bereits beschrieben [172, 179-181]. Spezifische anti-IsdB Antikörper haben eine Schutzwirkung in murinen *S. aureus*-Sepsis- und -Abszessmodellen. Die bakterielle Last in den Organen vermindert sich, Abszesse werden kleiner und mehr Tiere überleben. Der Schutz wird vermutlich durch eine Blockade von IsdB vermittelt, wodurch *S. aureus* weniger Eisen aus Hämoglobin akquirieren kann [180, 181].

Gestützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass eine *S. aureus*-Mutante, die kein IsdB synthetisieren kann, im Mausinfektionsmodell stark attenuiert ist [182].

Obwohl IsdC in den 2D-Gelen nach Eisenlimitation neu identifiziert wurde, ließ sich keine Antikörperbindung an dieses Molekül nachweisen. Möglicherweise ist IsdC so tief in die *S. aureus*-Zellwand eingebettet, dass es auf der Oberfläche nicht exponiert ist und so vom Immunsystem, bzw. den B-Zellen, nur schwer erkannt werden kann. Dagegen ist IsdH als Hämoglobin-bindendes Molekül auf der Oberfläche von *S. aureus* exponiert, IsdH-spezifische Antikörper sollten also generiert werden können und wurden auch bereits beschrieben [100, 172]. Da IsdH in dieser Arbeit in den 2D-Gelen nicht identifiziert werden konnte, sind Aussagen über Antikörperbindung an dieses Protein nicht möglich. Man kann spekulieren, dass sich die IsdH-spezifischen Antikörpersignale unter den Spots auf den 2D-Western Blots befinden, bei denen die korrespondierenden Proteine nicht identifiziert werden konnten. Um diese Antikörpersignale eindeutig einem Protein zuordnen zu können, müssten weitere Untersuchungen, mit z. B. größeren *S. aureus*-Proteinmengen in den Gelen durchgeführt werden.

Am Rande sei hier noch erwähnt, dass die *S. aureus*-Stamm-abhängige Empfindlichkeit gegenüber Eisenlimitation durch 2,2′-Bipyridyl auch in den 2D-Western Blots zu erkennen war. Während mit dem *S. aureus*-Isolat 302Δ*spa* bereits durch den Einsatz von 300 µM 2,2′-Bipyridyl neue Antikörpersignale erzeugt werden konnten, war dies beim *S. aureus*-Stamm USA300Δ*spa* erst ab einer 2,2′-Bipyridyl-Konzentration von 600 µM der Fall. Dieser Unterschied wurde aber in dieser Arbeit nicht weiter thematisiert. Da die Aufnahme von Eisen essentiell für das Überleben und die Virulenz von *S. aureus* ist, postulieren wir, dass *S. aureus*-Stämme, die weniger empfindlich auf Eisenmangel reagieren, virulenter sind als hoch empfindliche.

5.2.3 Veränderungen der Zusammensetzung des *S. aureus*-Proteoms nach Eisenlimitation

Nicht alle Antikörpersignale, welche bei Eisenmangel neu auftraten, ließen sich bakteriellen Proteinen zuordnen. Um Hinweise auf die Identität dieser Proteine zu erhalten, sollten im nächsten Schritt die durch Eisenmangel bewirkten Veränderungen der Proteinexpression möglichst vollständig erfasst werden. Die Proteine wurden mit Gel-freier Proteomanalyse

quantifiziert. Dabei wurde der Fokus auf die exponierten (SignalP-positiven) Proteine gelegt, da hier eine Antikörperbindung mit höchster Wahrscheinlichkeit zu erwarten ist [155-157].

Die Ergebnisse bestätigten, dass bei Eisenmangel mehr IsdA, IsdB und IsdC gebildet wurden. Zusätzlich waren die Mengen von SirA (Siderophor B-Transporter), SAUSA300_0721 (SstD-homologes Protein, Xenosiderophor-Transporter) und eines Superantigen-ähnlichen Proteins (Ssl11) erhöht. Die Mengen aller anderen exponierten Proteine, darunter vor allem Enzyme, Lipasen, Proteasen, Hämolysine/Leukotoxine und andere Virulenzfaktoren, waren hingegen erniedrigt. In der Konsequenz stieg der Anteil von Proteinen für die Eisenakquise von 0,3 % bei nicht-eisenlimitierenden Wachstumsbedingungen fast um den Faktor Hundert auf 23,9 % bei Eisenmangel an, während die Anteile von Virulenzfaktoren wie z. B. Hämolysinen/Leukotoxinen und Proteasen im extrazellulären Proteom von 20,4 % bzw. 20,8 % auf 15,5 % bzw. 12,3 % sanken.

In dieser Arbeit ließ sich nach der Kultivierung mit Eisenmangel die Induktion von drei Eisenaufnahmesystemen in *S. aureus* nachweisen: Dem Isd-Eisenaufnahmesystem, dem Transporter für Staphyloferrin B und einem Xenosiderophor-Transporter. Im Gegensatz zu Staphyloferrin B konnten keine Komponenten des Transporters für Staphyloferrin A nachgewiesen werden. Beasley *et al.* berichteten, dass *S. aureus*-Mutanten mit Defekten in der Staphyloferrin A-Synthese oder in den zugehörigen Transportproteinen *in vitro* keine Wachstumsdefekte haben. Im Falle eines Staphyloferrin B-Defekts kann Staphyloferrin A die daraus resultierenden Wachstumsdefekte jedoch ausgleichen [183]. Das System weist also Redundanzen auf, wobei Staphyloferrin A offenbar als Reserve für das wichtigere Staphyloferrin B fungiert. Dies könnte der Grund dafür sein, dass nur Transportproteine für Staphyloferrin B in der vorliegenden Arbeit hochreguliert waren. Die Siderophore Staphyloferrin A und B selbst konnten in dieser Arbeit nicht erfasst werden, vermutlich aufgrund ihrer niedrigen molekularen Massen von 479 Da bzw. 448 Da [154].

Malachowa *et al.* zeigten, dass es bei der Kultivierung von *S. aureus* in humanem Blut zu einer starken Hochregulation der mRNA der Isd-Gene, Siderophor-Transporter-Gene und Siderophorsynthese-Gene kommt. Aber auch Hämolysin/Leukotoxin-Gene (gamma-Hämolysin (*hlg*)) werden hochreguliert [174]. In eine ähnliche Richtung weisen *in vivo* Transkriptomdaten von *S. aureus* aus murinen Nierenabszessen und aus humanen Hautabszessen. Sie zeigen im Vergleich zu einer *S. aureus*-TSB-Kultur eine Hochregulation von *isdA, isdB, isdC,* Panton-Valentin-Leukozidin (*pvl*) und *hlg* [184]. Diese Befunde über die Regulation der

Hämolysin/Leukotoxin-Gene stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, die gezeigt haben, dass bei eisenlimitierenden Wachstumsbedingungen Hämolysine/Leukotoxine herunterreguliert wurden. Eine mögliche Erklärung ist, dass in den zitierten Studien weitere Faktoren, z. B. aus Wirtszellen, für die starke Hochregulation von *hlg* (z. B. 154× bei *hlgA*) verantwortlich waren. In humanem Serum, also in Abwesenheit von zellulären Bestandteilen, war *hlg* auch bei Malachowa *et al.* nur leicht erhöht (3×) [174]. In der vorliegenden Arbeit wurde TSB-Medium mit 2,2′-Bipyridyl versetzt, um eisenlimitierende Wachstumsbedingungen zu simulieren. Bestandteile von Wirtszellen wie das in den Erythrozyten gespeicherte Hämoglobin, die Haupteisenquelle von *S. aureus*, spielten hier folglich keine Rolle [100]. Möglicherweise hat sich *S. aureus* in den beschriebenen Studien diese Eisenquelle erschlossen und konnte daraufhin weitere Toxine produzieren. Dagegen musste der Mikroorganismus bei der anhaltenden Eisenlimitation in der vorliegenden Arbeit die Expression stärker auf Eisenaufnahmesysteme fokussieren. Außerdem ist zu beachten, dass sich die vorliegende Arbeit auf die Veränderungen auf Proteinebene bezieht. Die Ergebnisse können nicht mit der Regulation auf Transkriptomebene gleichgesetzt werden. Mit der vorliegenden Arbeit vergleichbare Analysen auf Proteomebene zeigen ebenfalls, dass zwei Stunden nach Zugabe von 750 µM 2,2′-Bipyridyl IsdA, IsdB und IsdC im Vergleich zur TSB-Kontrolle in höheren Mengen im Überstand zu finden sind, nicht aber Hlg-Komponenten und andere Toxine [175].

Es sollte die funktionelle Bedeutung der geringeren Mengen an Superantigenen (SAgs) und Hämolysinen/Leukotoxinen im *S. aureus*-Überstand aus eisenlimitierten Wachstumsbedingungen überprüft werden. Hierfür wurden PBMC-Proliferationsassays mit Zellen von sechs gesunden Blutspendern durchgeführt. SAgs führen zur antigenunabhängigen Proliferation von bis zu 20 % aller T-Zellen [60]. Diese Proliferation kann mittels Einbau von [^{3}H]-Thymidin in die T-Zell-DNA nachgewiesen werden [185].
Im Vergleich zum *S. aureus*-Kulturüberstand ohne Eisenlimitation, war der *S. aureus*-Kulturüberstand mit Eisenlimitation etwa um den Faktor 10 weniger potent bei der Proliferationsinduktion der T-Zellen. Bei höheren Konzentrationen der *S. aureus*-Kulturüberstände wurde Lyse der PBMCs beobachtet, die allgemein auf porenbildende Toxine zurückgeführt wird. Auch dieser Effekt war wie erwartet bei Eisenmangel vermindert.

Diese Daten bestätigten die in den vorangegangen Untersuchungen ermittelten Ergebnisse auf funktioneller Ebene.

5.2.4 Neue Informationen über das *S. aureus*-Immunom durch Eisenlimitation

Zusammenfassend kann man sagen, dass die bakterielle Anpassung an Eisenlimitation *in vitro* zu einer starken Veränderung des *S. aureus*-Proteoms im Kulturüberstand führte. Die neu induzierten Proteine waren immunogen, ablesbar an der vermehrten Antikörperbindung. Spezifische Antikörper findet man nur, wenn das Immunsystem zuvor mit dem zugehörigen Antigen in Kontakt getreten ist [1]. Daraus lässt sich schließen, dass die *in vitro* durch Eisenmangel neu induzierten *S. aureus*-Proteine auch *in vivo* exprimiert werden. Durch die Kultivierung von *S. aureus* mit Eisenlimitation konnten folglich Informationen über das Verhalten von *S. aureus in vivo* und über Antikörperbindung an *S. aureus*-Proteine gewonnen werden. Eine Übertragung dieser experimentellen Strategie auf andere Stressoren wäre nun interessant. Faktoren mit Relevanz für die Erreger-Wirt-Interaktion sind beispielsweise erhöhte Temperatur, Sauerstoffmangel oder auch Antibiotika.

5.3 Die Rolle von Antikörpern bei der Abwehr von *S. aureus*-Infektionen

Infektionen, die durch *S. aureus* ausgelöst werden können, umfassen ein breites Spektrum, welches von lokalen Entzündungen wie Haut- und Bindegewebsinfektionen, Myokarditis und Osteomyelitis bis hin zu systemischen Infektionen wie Bakteriämie und Sepsis reicht [59]. Dabei ist *S. aureus* der häufigste Erreger von Haut- und Bindegewebsinfektionen sowie von Endokarditis und der zweithäufigste Verursacher von Bakteriämien. Nach aktuellen Schätzungen erkranken allein in den USA jährlich 1,8 Mio Menschen an *S. aureus*-Infektionen [72]. Die Behandlung wird durch das vermehrte Auftreten Antibiotika-resistenter *S. aureus*-Stämme (z. B. Methicillin-resistente *S. aureus*, MRSA) zunehmend erschwert. Selbst gegen Reserveantibiotika wie Vancomycin wurden bereits Resistenzen beobachtet, und es mangelt an neuen Wirkstoffen [66, 67].

MRSA kommt vor allem in Krankenhäusern endemisch vor (*hospital-acquired*-MRSA, HA-MRSA) und verursacht etwa 20 % bis 25 % aller HA-Infektionen. In der letzten Dekade sind jedoch zusätzlich *community-acquired*-MRSA (CA-MRSA) außerhalb von Krankenhäusern

aufgetreten, die durch eine erhöhte Virulenz eine besondere Infektionsgefahr darstellen [64, 186]. Neben schwereren Krankheitsverläufen als bei Methicillin-sensitiven *S. aureus* (MSSA), stellen die durch MRSA verursachten Infektionen auch eine große finanzielle Belastung der Gesundheitssysteme dar, da sie komplizierter zu behandeln sind und den Krankenhausaufenthalt verlängern [187].

Eine mögliche Alternative für die Prävention und/oder Behandlung von *S. aureus*-Infektionen wäre eine anti-*S. aureus*-Vakzine. Jedoch konnte die protektive Wirkung von in Tiermodellen entwickelten und erfolgreich getesteten Vakzinen bisher nicht auf den Menschen übertragen werden [69, 72, 73]. So scheiterte vor kurzem eine erfolgversprechende Vakzine bei der Anwendung bei Patienten mit geplanter Herz-Operation. Die Vakzine beinhaltete das für die Eisenaufnahme wichtige *S. aureus*-Protein IsdB. Es konnte jedoch keine protektive Wirkung durch die Vakzinierung festgestellt werden. Im Gegenteil: Vakzinierte Patienten, die postoperativ eine *S. aureus*-Infektion erlitten, hatten eine im Vergleich zur Placebo-Gruppe deutlich erhöhte Sterblichkeit [71, 180]. Die Gründe hierfür sind bislang unbekannt.

Bisher sind alle Versuche gescheitert einen Schutz vor *S. aureus*-Infektionen durch Vakzinierung zu erreichen. Das Ziel bisheriger Vakzinierungen war die Induktion protektiver *S. aureus*-spezifischen Antikörper. Als Schlussfolgerung daraus und auf der Grundlage neuerer Daten, die die protektive Rolle von T-Zellen (Th17-Zellen) und neutrophilen Granulozyten bei *S. aureus*-Infektionen betonen, wird nun von einigen Experten die protektive Wirkung von *S. aureus*-spezifischen Antikörpern angezweifelt [69, 72]. Ob diese generelle Skepsis gerechtfertigt ist, soll in den folgenden Abschnitten anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten diskutiert werden.

5.3.1 *S. aureus*-spezifisches IgG – Ein Marker für die Protektion vor schweren Infektionsverläufen?

Etwa 20 % aller Bakteriämien werden durch *S. aureus* verursacht [188]. Der Anteil der *S. aureus*-Bakteriämien, die durch MRSA ausgelöst werden, schwankt je nach untersuchtem Land zwischen 12 % (Deutschland) und 54,7 % (USA) [189]. Die Letalität einer *S. aureus*-Bakteriämie bewegt sich zwischen 20 % und 30 %, wobei höhere Letalitäten, verbunden mit längeren Krankenhausaufenthalten und Kosten für das Gesundheitssystem, bei MRSA-

Bakteriämien beobachtet werden [187-189]. Bakteriämische Patienten können im weiteren Krankheitsverlauf als Komplikationen eine Sepsis oder sogar schwere Sepsis entwickeln [136]. Um zu prüfen, ob *S. aureus*-spezifisches IgG ein Marker für die Protektion vor den septischen Komplikationen einer *S. aureus*-Bakteriämie ist, wurde dieser Parameter in dieser Arbeit gemessen. In einer prospektiven Studie wurden Seren von 46 Bakteriämiepatienten akquiriert. Den Patienten wurde zu Beginn der Bakteriämie, jedoch nicht später als vier Tage nach Symptombeginn, Serum entnommen. Mittels Simple Western Assay, der für diesen Zweck optimiert worden war (siehe Abschnitt 5.1), wurde die IgG-Bindung aus den Seren an extrazelluläre *S. aureus*-Proteine quantifiziert und mit dem Verlauf der Erkrankung (keine Sepsis (n = 24), Sepsis (n = 10), schwere Sepsis (n = 12)) korreliert. Die Seren der drei Verlaufsgruppen unterschieden sich nicht in ihren Gesamt-IgG-Mengen. Um bei der Quantifizierung spezifischer Antikörper möglichst viele *S. aureus*-Proteine abzudecken, wurden als Antigene extrazelluläre *S. aureus*-Proteine aus dem Kulturüberstand des Stamms USA300Δ*spa* eingesetzt. Denn dieser besitzt ein komplexes extrazelluläres Proteom, und es war bereits bekannt, dass die extrazellulären Proteine besonders immunogen sind (siehe Anhang Abb. 8.3 und Abb. 8.4) [76]. Die *S. aureus*-Proteine wurden nach Erreichen der stationären Wachstumsphase bei eisenlimitierenden Wachstumsbedingungen (siehe Abschnitt 5.2) isoliert. Außerdem wurden UV-getötete USA300Δ*spa*-Zellen zur Quantifizierung der gegen die *S. aureus*-Zelloberfläche gerichteten IgG-Antikörper im ELISA eingesetzt.

Die Menge des spezifischen IgGs mit Bindung an extrazelluläre *S. aureus*-Proteine variierte zu Beginn der *S. aureus*-Bakteriämie stark zwischen den Patienten (Faktor 27). Sie korrelierte positiv mit klinischem Schutz: Patienten mit einem unkomplizierten Krankheitsverlauf hatten bei Diagnose signifikant höhere *S. aureus*-spezifische IgG-Mengen im Serum als Patienten, die eine Sepsis (Sepsis oder schwere Sepsis) entwickelten. Umgekehrt waren die Patienten mit den höchsten spezifischen IgG-Mengen vor einer Sepsis geschützt. Auch die Menge von IgG mit Spezifität für die *S. aureus*-Zelloberfläche war bei Patienten mit unkompliziertem Krankheitsverlauf höher als bei denen mit späterer Sepsis.

Diese Daten stehen im Einklang mit Befunden zum Verlauf der *S. aureus*-Bakteriämie bei *S. aureus*-Trägern und Nicht-Trägern. Erstere haben zwar ein höheres Risiko, eine (endogene) *S. aureus*-Bakteriämie zu entwickeln als Nicht-Träger, besitzen dann aber ein geringeres Risiko daran zu sterben [139]. In der vorliegenden Arbeit konnte in einer weiteren Untersuchung

gezeigt werden, dass *S. aureus*-Träger mehr spezifisches IgG gegen extrazelluläre *S. aureus*-Proteine aus dem Kulturüberstand und gegen die *S. aureus*-Zelloberfläche besaßen als Nicht-Träger.
Folglich hatten *S. aureus*-Träger eine stärkere humorale Immunantwort gegen *S. aureus* ausgebildet als Nicht-Träger, die zum Schutz vor schweren Bakteriämieverläufen beitragen könnte [139, 190]. Dass *S. aureus*-Träger mehr *S. aureus*-spezifisches IgG besitzen als Nicht-Träger, wurde in der Vergangenheit bereits für einzelne *S. aureus*-Proteine gezeigt, wie z. B. Fibrinogen-bindendes Protein, IsdH und den SAgs [190, 191]. Es wurde auch dokumentiert, dass Antikörper in der Lage sind, SAgs, Eisentransporter (IsdA, IsdB) und Hämolysine/Leukotoxine (Hla, PVL, usw.) von *S. aureus* zu neutralisieren [181, 185, 192, 193].

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Patienten, die besonders stark gegenüber *S. aureus* exponiert sind, wie zystische Fibrose (CF-) Patienten, signifikant mehr spezifisches IgG gegen extrazelluläre *S. aureus*-Proteine besaßen als gesunde *S. aureus*-Träger. Allerdings gab es zwischen diesen beiden Gruppen keinen Unterschied in der IgG-Bindung an die *S. aureus*-Zelloberfläche.
Durch ihre chronische Exposition gegenüber *S. aureus* hatten CF-Patienten demnach ein besonders starkes Immungedächtnis gegen extrazelluläre *S. aureus*-Proteine aufgebaut. Interessant hierbei ist, dass CF-Patienten, trotz ihrer häufigen *S. aureus*-Lungeninfektionen, so gut wie nie eine *S. aureus*-Sepsis entwickeln, also vor schweren Infektionsverläufen geschützt sind (persönliche Mitteilung Professor Dr. Barbara Kahl, Universität Münster) [116, 117]. Ähnliches wurde bereits für Patienten mit Epidermolysis Bullosa (EB) gezeigt, die ebenfalls stark gegenüber *S. aureus* exponiert sind, aber nur selten *S. aureus*-Bakteriämien entwickeln. Sie besitzen besonders hohe Mengen von *S. aureus*-spezifischen IgG-Antikörpern im Serum [140].

Die aktuelle Datenlage zeigt klar, dass *S. aureus*-spezifisches IgG im Serum mit Schutz vor schweren Krankheitsverläufen einhergeht. An dieser Stelle sei aber dennoch deutlich herausgestellt, dass dies keine Aussage über den protektiven Wirkmechanismus erlaubt. Denn das Vorhandensein von großen Mengen *S. aureus*-spezifischer IgG-Antikörper könnte auch ein Biomarker für ein robustes Immungedächtnis für *S. aureus* sein, welches in seiner Gesamtheit an zellulären und humoralen Bestandteilen protektiv gegen *S. aureus* wirken kann. Welchen

Anteil Antikörper daran haben, ist hier nicht beurteilbar. Doch selbst wenn die spezifischen Antikörper zum Schutz nichts beitragen würden, wäre ihre Konzentration ein Marker für die Protektion vor schweren *S. aureus*-Bakteriämieverläufen und deshalb von diagnostischem Nutzen.

5.3.2 Die IgG-Bindung an acht *S. aureus*-Proteine unterscheidet Sepsis von nicht-Sepsis Patienten

Zunächst beruhte die Quantifizierung des spezifischen IgGs in dieser Arbeit auf komplexen *S. aureus*-Antigenproben (extrazelluläre *S. aureus*-Proteine aus dem Kulturüberstand und *S. aureus*-Zellen). Um die IgG-Bindung auf Einzelproteinebene zu untersuchen, wurde ein Flexmap3D Assay mit 64 rekombinanten *S. aureus*-Proteinen eingesetzt. Damit sollten anti-*S. aureus*-Spezifitäten ermittelt werden, die ein Marker für die Protektion vor schweren *S. aureus*-Bakteriämieverläufen sind. Es wurden Seren aus derselben Kohorte eingesetzt wie in der vorangegangen Analyse (siehe 5.3.1). Jedoch wurden nur Seren eingeschlossen, die vor Bakteriämiediagnose entnommen wurden. Die IgG-Bindung an die *S. aureus*-Proteine wurde mit dem Verlauf der Bakteriämie korreliert ((keine Sepsis (n = 23), Sepsis (n = 10), schwere Sepsis (n = 11)). Die Seren der drei Verlaufsgruppen unterschieden sich nicht in ihren Gesamt-IgG-Mengen.

Ein signifikanter Unterschied in der Menge spezifischen IgGs zwischen den Gruppen fand sich bei 21 *S. aureus*-Proteinen. Sie war zu Beginn der *S. aureus*-Bakteriämie in den Patienten größer, die keine Sepsis entwickelten als bei denen, die eine Sepsis (Sepsis oder schwere Sepsis) entwickelten. Dabei handelte es sich überwiegend um extrazelluläre (n = 14) und Oberflächen-assoziierte (n = 4) Proteine, die dem Immunsystem, besonders den B-Zellen und Antikörpern zugänglich sind. Daneben unterschied sich die spezifische IgG-Menge zwischen den Patientengruppen noch bei einem intrazellulären *S. aureus*-Protein und bei zwei bisher nicht charakterisierten *S. aureus*-Proteinen, die ein Signalpeptid besitzen. Eine Übersicht mit Angaben zur Literatur, in der eine Protektion vor *S. aureus*-Infektionen durch Antikörper gegen diese Proteine zum Teil bereits beschrieben wird, befindet sich in Tabelle 5.1.

Tabelle 5.1: Übersicht der 21 im Flexmap3D Assay eingesetzten *S. aureus*-Proteine, gegen die *S. aureus*-Bakteriämiepatienten, die im Krankheitsverlauf keine Sepsis entwickelten, zu deren Beginn mehr IgG besaßen als spätere Sepsispatienten. In der angegeben Literatur wird eine protektive Wirkung bei *S. aureus*-Infektionen durch spezifische Antikörper gegen diese Proteine beschrieben. Proteine sind geordnet nach ihren p-Werten.

Abkürzung	**Beschreibung**	**Funktion**	**p = [a]**	**Literatur**
Plc	1-Phosphatidylinositol Phosphodiesterase	Lipase	0,0002	
SspB	Staphopain B	Protease	0,0011	
SEM	Staphylokokken Enterotoxin M	Superantigen	0,0018	
IsaA	Transglycosylase	Virulenzfaktor	0,0027	[194]
GlpQ	Glycerolphosphoryldiester-Phosphodiesterase	Lipase	0,0029	
SplB	Serin-Protease SplB	Protease	0,0037	
SACOL0985	Oberflächenprotein, putativ	-	0,0045	
HlgC	Gamma-Hämolysin Komponente C	Hämolysin/Leukotoxin	0,0054	[195], [196], [197]
SACOL0444	Uncharakterisiertes Protein	-	0,0088	
Sak	Staphylokinase	Protease	0,0108	
Efb-c	Fibrinogen-bindendes Protein	Adhäsionsmolekül	0,0149	[198], [199]
LukF-PV	Panton-Valentin Leukozidin	Hämolysin/Leukotoxin	0,0170	[200], [201], [202], [203]
SACOL0480	Uncharakterisiertes Protein	-	0,0192	
HlgB	Gamma-Hämolysin Komponente B	Hämolysin/Leukotoxin	0,0204	[195], [196], [197]
Atl[b]	Bifunktionales Autolysin	Protease	0,0217	
TSST-1	Toxisches-Schock-Syndrom-Toxin-1	Superantigen	0,0231	[195], [204], [196]
Coa	Koagulase	Adhäsionsmolekül	0,0242	[205], [206]
SplC	Serin-Protease SplC	Protease	0,0366	
CHIPS	Chemotaxis-inhibierendes Protein	Virulenzfaktor	0,0432	
SEI	Staphylokokken Enterotoxin I	Superantigen	0,0435	[195]
GreA	Trankriptions-Elongationsfaktor	Proteinsynthese und -faltung	0,0495	

[a] p-Werte des Vergleichs der Protein-spezifischen IgG-Mengen in den Seren beider Patientengruppen (keine Sepsis und Sepsis); Mann-Whitney Test.

[b] N-terminaler Teil des Proteins.

Dass sich die Antikörperantwort vor allem gegen exponierte *S. aureus*-Proteine richtet, konnten bereits Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen [155, 156]. Sie werden von Untersuchungen anderer Autoren untermauert, die ebenfalls ergaben, dass bei *S. aureus*-Infektionen von Meerschweinchen und Menschen der spezifische IgG-Anstieg vor allem gegen extrazelluläre *S. aureus*-Proteine gerichtet ist, nicht aber gegen intrazelluläre *S. aureus*-Proteine [207, 208]. Eine neue Erkenntnis aus der vorliegenden Arbeit ist, dass Unterschiede in der spezifischen IgG-Antwort zwischen Patienten mit und ohne Sepsis ganz überwiegend bei extrazellulären

S. aureus-Proteinen gefunden wurden. Als prognostische Marker für einen milderen Krankheitsverlauf scheinen demnach extrazelluläre und evtl. *S. aureus*-Oberflächenproteine am geeignetsten.

Eine Studie von Jacobsson *et al.* zeigt in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit einen milderen Krankheitsverlauf bei *S. aureus*-Bakteriämiepatienten, wenn diese zu Beginn der Erkrankung höhere IgG-Mengen gegen die *S. aureus*-Antigene SEA, Lipase, Exfoliative Toxine und Teichonsäuren im Serum aufweisen [208]. Die Assoziation der Menge *S. aureus*-spezifischer Antikörpern mit dem Verlauf von *S. aureus*-Infektionen wurde in der Literatur bereits für weitere IgG-Spezifitäten beschrieben. *S. aureus*-Bakteriämiepatienten mit hohen IgG-Mengen mit Spezifität für PVL (LukF-PV und LukS-PV) haben ein geringeres Risiko, eine Sepsis in Folge der Bakteriämie zu entwickeln als Patienten mit wenig spezifischem IgG [200]. Mäuse, bei denen man durch Vakzinierung spezifische Antikörper induziert oder passiv überträgt (spezifisch für PVL, IsaA oder Coa), haben eine geringere Letalität bei einer folgenden *S. aureus*-Bakteriämie als die unbehandelten Kontrolltiere [194, 201, 205, 206]. Gleiches kann man im Fall von Hlg und TSST bei Kaninchen beobachten [196]. Einige der in der Literatur beschriebenen IgG-Spezifitäten finden sich auch in der vorliegenden Arbeit wieder (Tabelle 5.1).

Die Studie von Jacobsson *et al.* zeigt ferner, dass zwar im Verlauf der *S. aureus*-Bakteriämie das *S. aureus*-spezifische IgG bei allen immunkompetenten Patienten ansteigt, als Prädiktor für den unkomplizierten Verlauf der Erkrankung jedoch die zu Beginn vorhandenen spezifischen IgG-Mengen entscheidend sind [208]. Auch Mäuse, denen man vor der Infektion mit *S. aureus* (*i. p.*) *S. aureus*-spezifische IgG-Antikörper injiziert, haben einen milderen Verlauf der Infektion als Mäuse, die diese Antikörper erst während oder nach der Infektion erhalten [209]. Demnach spielt nicht nur die Menge der spezifischen IgG-Antikörper eine Rolle für den Verlauf der *S. aureus*-Infektion, sondern auch der Zeitpunkt ihres Vorhandenseins ist entscheidend. Nur zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion wirken Antikörper bzw. die mit ihnen assoziierten Schutzmechanismen mildernd auf den Verlauf der Infektion.

Diese Arbeit bestätigte einige in der Literatur bereits beschriebene Antikörperspezifitäten und identifizierte neue Antikörperspezifitäten, die mit einem protektiven Einfluss auf *S. aureus*-Infektionen assoziiert waren (z. B. Plc, SspB, SplB und Sak). Möglicherweise können die spezifischen Antikörper *S. aureus*-Proteine, wie z. B. Toxine und Enzyme, binden und neutralisieren und somit den Krankheitsverlauf abschwächen. Eine direkte Schutzwirkung ist

folglich für einige der identifizierten IgG-Spezifitäten plausibel, müsste jedoch in Tierversuchen durch Vakzinierungen und passive Immunisierungen mit anschließenden *S. aureus*-Infektionen getestet werden.

Als nächstes sollten die Patienten anhand der IgG-Bindungsmuster an die 64 rekombinanten *S. aureus*-Proteine nach ihrem Krankheitsverlauf stratifiziert werden. Dazu wurde eine *partial least squares analysis* (PLS) angefertigt. Patienten, die keine Sepsis entwickelten, konnten von der Sepsisgruppe gut abgegrenzt werden. Dies gelang am besten bei der Benutzung der IgG-Bindungsdaten an acht *S. aureus*-Proteine (Plc, SspB, IsaA, SACOL0444, SEM, SACOL0985, GlpQ, HlgC). Diese reichten aus, um mit einer *principal component analysis* (PCA) beide Patientengruppen voneinander zu unterscheiden. Die Vorhersage des Krankheitsverlaufs war in 75 % der Fälle richtig mit einer Sensitivität von 76 % und einer Spezifität von 74 %.
Für die Patientenstratifikation waren exponierte *S. aureus*-Proteine ausschlaggebend. Alle acht *S. aureus*-Proteine der prädiktiven Antigen-Signatur sind Enzyme oder Toxine von *S. aureus*. Sie erscheinen prädestiniert für die Neutralisation durch Antikörperbindung, wie dies für IsaA und HlgC bereits gezeigt werden konnte [194, 197]. Wieder drängt sich die Vermutung auf, dass es sich nicht nur um eine Marker-Signatur handelt, sondern dass die identifizierten Antikörperspezifitäten selbst zur anti-bakteriellen Abwehr beitragen, da sie an Virulenzfaktoren von *S. aureus* binden. Dadurch können Ausbreitung und Evasionsmechanismen von *S. aureus* während einer Infektion gehemmt werden. Plc und SspB können z. B. die Abtötung von *S. aureus* durch neutrophile Granulozyten behindern und SspB spielt zusätzlich noch eine Rolle bei der Gewebszerstörung [210-212]. SEM, das zu den SAgs gehört, kann unspezifisch T-Zellen aktivieren und so zu einer Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen führen [185]. SEM wird im sogenannten *enterotoxin gene cluster* kodiert und gehört somit zu den *egc*-Superantigenen. Im Gegensatz zu den „klassischen“ Superantigenen, wie z. B. SEA, SEB, lösen *egc*-Superantigene nur selten eine neutralisierende Antikörperantwort aus [185, 213, 214]. Die Funktionen der Lipase GlpQ und der Proteine SACOL0444 und SACOL0985 sind bisher noch nicht genauer charakterisiert.

Fast man die Ergebnisse zusammen, so kann eine *S. aureus*-Bakteriämie auch dann entstehen, wenn bereits spezifische Antikörper vorhanden sind. Hat der Patient jedoch bereits zu Beginn der Infektion bestimmte Spezifitäten in großen Mengen gebildet, könnte dies den

Krankheitsverlauf abmildern. Antikörper, die an extrazelluläre *S. aureus*-Proteine binden, erscheinen für den klinischen Schutz besonders bedeutsam.

5.3.3 Protektive Wirkung von *S. aureus*-spezifischem IgG beim Menschen

Die Studien zu *S. aureus*-spezifischen Antikörpern in der Literatur und die Daten aus der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass die IgG-Bindung an *S. aureus*-Proteine Schutz vor, bzw. eine Abschwächung von *S. aureus*-Infektionen vermitteln könnte (siehe 5.3.2). Trotzdem ist es bisher noch nicht gelungen, eine anti-*S. aureus*-Vakzine zu entwickeln, die, basierend auf der Induktion von spezifischen Antikörpern, den Menschen vor *S. aureus*-Infektionen schützt [69, 72, 73]. Es wird deshalb diskutiert, dass bei der Abwehr von *S. aureus* nicht die spezifischen Antikörper entscheidend seien, sondern die zelluläre Immunantwort, besonders Th17-Zellen und neutrophile Granulozyten [69, 72]. Gestützt wird diese These von Infektionsversuchen in Tiermodellen, bei denen man zeigen konnte, dass immunisierte Mäuse mit B-Zelldefekten nicht empfänglicher für *S. aureus*-Infektionen sind, wohl hingegen Mäuse mit T-Zelldefekten [72, 215]. Daneben wird auch eine Erbkrankheit im Stat3-Gen (*signal transducer and activator of transcription* 3) des Menschen angeführt, bei der die betroffenen Patienten fast keine Th17-Zellen ausbilden können und hochempfänglich für schwere *S. aureus*-Infektionen sind: das Hyper-IgE-Syndrom (STAT3-HIES) [69, 72]. Bei der Entwicklung von Th17-Zellen sind die Zytokine IL-6 und IL-23 entscheidend, die bei den STAT3-HIES-Patienten wegen einer Mutation im Stat3-Gen nicht wirken können. Deshalb besitzen diese Patienten nur sehr wenige Th17-Zellen [122, 124, 125, 216]. STAT3-HIES-Patienten leiden bereits als Neugeborene an schweren *S. aureus*-Infektionen der Haut und der Lunge [125]. Typisch dabei sind durch *S. aureus* ausgelöste sogenannte „kalte Abszesse“, also Abszesse ohne die Entwicklung des Entzündungszeichens Wärme [217]. Auch Bakteriämien und Sepsis wurden bei HIES beschrieben, sind aber bei diesen Patienten weniger typisch [161]. Es wird vermutet, dass diese hohe Empfänglichkeit der STAT3-HIES-Patienten für *S. aureus*-Infektionen alleine durch den Th17-Zelldefekt bedingt ist, doch wurde dies bisher nicht im Detail untersucht. Man weiß jedoch, dass STAT3-HIES-Patienten auch einen Defekt im B-Zellgedächtnis haben und bei experimenteller Vakzinierung mit einem Phagen nur geringe, nicht-schützende Antikörpermengen produzieren [218]. Die Antikörperantwort gegen *S. aureus* wurde in diesen Patienten bisher kaum untersucht und deshalb in der vorliegenden Arbeit näher betrachtet.

Der *S. aureus*-spezifische IgG-Gehalt in Seren von STAT3-HIES-Patienten wurde mit dem in Seren gesunder *S. aureus*-Träger und CF-Patienten verglichen. CF-Patienten wurden aufgrund ihrer ähnlich hohen Belastung durch *S. aureus* ausgewählt [116, 117]. Neben der IgG-Bindung an die extrazellulären *S. aureus*-Proteine aus dem Kulturüberstand wurde die IgG-Bindung an UV-getötete USA300Δ*spa*-Zellen untersucht.

Im Vergleich zu CF-Patienten besaßen STAT3-HIES-Patienten signifikant weniger *S. aureus*-spezifisches IgG gegen extrazelluläre *S. aureus*-Proteine und *S. aureus*-Zellen. Sie hatten auch weniger spezifisches IgG als gesunde *S. aureus*-Träger. Dieser Unterschied war, bedingt durch das multiple Testen, nicht signifikant aber im Trend deutlich zu erkennen.

Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass STAT3-HIES-Patienten, neben ihrem in der Literatur beschriebenen Th17-Zelldefekt, nur wenig *S. aureus*-spezifisches IgG besitzen. Die niedrigen anti-*S. aureus*-IgG-Mengen sind allerdings nicht darauf zurückzuführen, dass STAT3-HIES-Patienten grundsätzlich weniger IgG bilden könnten, denn ihre Gesamt-IgG-Menge im Serum unterscheidet sich nicht von Gesunden [124]. Messungen von *S. aureus*-spezifischem IgG in Seren von STAT3-HIES-Patienten in der Literatur beschränkten sich bisher auf IgG-Bindung an *S. aureus*-Zellen. Diese ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen STAT3-HIES-Seren und Seren von gesunden Kontrollen [160]. Allerdings ist in der Studie von Dreskin *et al*. die Zahl der untersuchten Patienten recht klein, und es wird nicht thematisiert, ob es sich bei den gesunden Probanden um *S. aureus*-Träger oder Nicht-Träger handelt [160]. Der Mangel an *S. aureus*-spezifischem IgG in Seren von STAT3-HIES-Patienten wurde durch den in dieser Arbeit durchgeführten Vergleich mit Seren von CF-Patienten, die ebenso wie STAT3-HIES-Patienten häufig an *S. aureus*-Lungeninfektionen leiden, noch deutlicher [116, 117]. Bei CF-Patienten ist bisher kein Immundefekt beschrieben worden, und sie eignen sich damit gut dazu festzustellen, wie hoch eine IgG-Immunantwort gegen *S. aureus* bei häufigen Lungeninfektionen ausfallen kann. Demzufolge können STAT3-HIES-Patienten keine adäquate IgG-Antwort auf *S. aureus* ausprägen.

Die aktuelle Therapie von STAT3-HIES-Patienten schließt neben antimikrobiellen Behandlungen (Antibiotika und Bäder mit Desinfektionsmitteln) auch die Gabe von *i. v.* IgG (IVIG) ein [164]. Nach der Gabe von IVIG verschwinden in den meisten Fällen die Anzeichen der *S. aureus*-Infektionen [161-164]. Entscheidend für diesen Therapieerfolg ist aber die

vorherige Entfernung von *S. aureus* beim Patienten (persönliche Mitteilung PD Dr. Eleonore Renner, Universität München).

Trotz des Th17-Zelldefekts kann eine IVIG-Substitution *S. aureus*-Infektionen bei STAT3-HIES-Patienten verhindern. Ähnlich wie im Maus-Infektionsmodell mit *S. aureus* ist es dabei wichtig, dass die spezifischen IgG-Antikörper bereits vor der Infektion mit *S. aureus* vorhanden sind [209]. In den IVIG-Präparaten war das *S. aureus*-spezifische IgG deutlich messbar. Alle gesunden Menschen besitzen *S. aureus*-spezifisches IgG (Daten dieser Arbeit und [209]). IVIG-Präparate werden aus Plasmaspenden von gesunden Spendern hergestellt und können Virulenzfaktoren von *S. aureus* inhibieren [209].

Gleichwohl zeigten Messungen von Seren von STAT3-HIES-Patienten nach IVIG-Therapie in der vorliegenden Arbeit nur einen moderaten Anstieg des *S. aureus*-spezifischen IgGs gegen extrazelluläre *S. aureus*-Proteine und gegen *S. aureus*-Zellen. Dies könnte daran gelegen haben, dass die Seren erst kurz vor einer erneuten IVIG-Substitution, d. h. im Nadir der IVIG-Serumkonzentration, abgenommen wurden. Darenberg *et al.* zeigten, dass die SAg-neutralisierende Wirkung von Serum aus IVIG-substituierten Probanden 25 Tage nach IVIG-Substitution nicht mehr messbar ist [219]. In der Zukunft sollten deshalb Seren von STAT3-HIES-Patienten kurz nach der IVIG-Substitution untersucht werden.

Die dargestellten Befunde beruhen auf der Untersuchung weniger STAT3-HIES-Patienten, doch lassen sich von ihnen Erkenntnisse von grundlegender Bedeutung ableiten: Bisher gelten STAT3-HIES-Patienten als Beleg dafür, dass Th17-Zellen und nicht Antikörper beim Menschen entscheidend für die Protektion vor *S. aureus*-Infektionen seien. Dies ist offenbar falsch, denn die alleinige Substitution *S. aureus*-spezifischer IgG-Antikörper verhindert *S. aureus*-Infektionen beim STAT3-HIES, obwohl es keinen Grund gibt anzunehmen, dass durch die IVIG-Substitution der Th17-Defekt beeinflusst würde. Dies stellt die Bedeutung von T-Zellen für die Abwehr von *S. aureus* nicht infrage. Nur mit Hilfe von T-Zellen kann sich eine protektive humorale Immunantwort entwickeln [1]. Außerdem sind Th17-Zellen auch wichtig für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, welche *S. aureus* beseitigen können [30, 31]. Jedoch sind die Ergebnisse dieser Arbeit ein starkes Argument für eine direkte Schutzwirkung von Antikörpern bei der Immunabwehr von *S. aureus*.

5.3.4 Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen auf bisherige und zukünftige Vakzinestrategien

Vakzinen gegen Bakterien sind bereits erfolgreich entwickelt worden. Sie wirken über die Induktion spezifischer Antikörper, die entweder die Bakterien selbst binden, und somit die Phagozytose der Bakterien verstärken, oder die krankheitsauslösenden Virulenzfaktoren binden und neutralisieren [72, 220]. Grundlage für die Entwicklung solcher Vakzinen ist die vorherige Aufklärung der krankheitsauslösenden Pathomechanismen sowie umgekehrt der immunologischen Schutzmechanismen, um geeignete Vakzinekandidaten zu identifizieren. Im Fall von *S. aureus* ist dies bisher noch nicht gelungen. Gründe dafür sind die Vielzahl unterschiedlicher *S. aureus*-Virulenzfaktoren, die hohe Diversität innerhalb der Spezies *S. aureus* und die unterschiedlichen Krankheiten, die *S. aureus* auslösen kann [73, 76]. Antibiotika-resistente *S. aureus*-Stämme (MRSA), die schwerere Krankheitsverläufe mit höherer Letalität auslösen, unterstreichen jedoch, wie wichtig eine Vakzine wäre [66, 67, 187-189].

Die bisher in den klinischen Studien getesteten anti-*S. aureus*-Vakzinen konzentrierten sich vor allem auf Oberflächenbestandteile von *S. aureus* [73, 221]. Es wurde z. B. eine anti-Kapsel-Vakzine entwickelt, die die häufigsten *S. aureus* Kapselvarianten (CP5 und CP8) beinhaltete. Jedoch ließ sich keine protektive Wirkung vor *S. aureus*-Infektionen beim Menschen feststellen. Man vermutet, dass diese Vakzine scheiterte, da nur etwa 80 % aller *S. aureus*-Isolate durch die beiden Kapselvarianten abgedeckt wurden und die in den USA häufig Infektionen verursachenden USA300-Isolate vermutlich keine Kapsel ausbilden [72]. Weiterhin scheiterten anti-*S. aureus*-Vakzinen, die sich gegen Clumpingfaktor A, Lipoteichonsäure und einen ABC-Transporter (YkpA) richteten [73, 221].
Eine weitere Vakzine, die das Oberflächenprotein IsdB von *S. aureus* beinhaltete, soll ausführlicher betrachtet werden. Sie wurde bei Risikopatienten für postoperative *S. aureus*-Infektionen eingesetzt, jedoch ohne Erfolg. Im Falle einer *S. aureus*-Infektion hatten vakzinierte Patienten sogar eine höhere Letalität als die Placebo-Gruppe [71]. Aktuell wird vor dem Hintergrund der gescheiterten IsdB-Vakzine diskutiert, ob es durch die Induktion von Antikörpern, die an die *S. aureus*-Zelloberfläche binden, zu vernetzten Aggregaten von *S. aureus*-Zellen kommt, die sich dann im Körper ausbreiten und die Infektion verstärken [195, 220].

Doch warum scheiterten alle anti-*S. aureus*-Vakzine, die im Tiermodell erfolgversprechende Resultate lieferten, bei der klinischen Erprobung am Menschen?

Eine Ursache könnte darin liegen, dass *S. aureus*-spezifische Antikörper beim Menschen grundsätzlich keine Protektion vor *S. aureus*-Infektionen vermitteln können. Bei der Diskussion darüber wird vor allem ein Tiermodell angeführt, das zeigt, dass immunisierte B-Zell-defiziente Mäuse keine höhere Anfälligkeit für *S. aureus*-Infektionen aufweisen, immunisierte T-Zell-defiziente Mäuse jedoch sehr wohl [72, 215]. Ebenso wird in einigen Studien berichtet, dass Menschen mit einem B-Zelldefekt (X-chromosomal vererbte Agammaglobulinämie) keine höhere Anfälligkeit für *S. aureus*-Infektionen besitzen [73]. Dagegen sind Menschen mit T-Zelldefekten (HIV-Patienten), und hier vor allem mit Th17-Zelldefekten (STAT3-HIES-Patienten), überaus anfällig für *S. aureus*-Infektionen [69, 72, 125]. Aus diesen Gründen wird von einigen Autoren die protektive Wirkung von spezifischen Antikörpern bei der Abwehr von *S. aureus* angezweifelt [69, 72]. Dies muss aber kritisch betrachtet werden. So zeigt das oben erwähnte Mausmodell, dass T-Zell-defiziente Mäuse noch anfälliger für *S. aureus*-Infektionen sind als B-Zell-defiziente Mäuse, jedoch impliziert der T-Zell-Defekt auch einen Defekt bei der T-Zell-abhängigen B-Zellaktivierung [215]. Ähnliches gilt für die angeführten HIV-Patienten [186]. Auch die Daten über X-chromosomal vererbter Agammaglobulinämie sind nicht immer eindeutig. Diese Patienten leiden vor allem im Alter von sechs Monaten, wenn die maternalen Antikörper aufgebraucht sind, an pyrogenen *S. aureus*-Infektionen [186].

Dass spezifische Antikörper vor *S. aureus*-Infektionen schützen können, haben Daten aus der vorliegenden Arbeit bei STAT3-HIES-Patienten gezeigt. Sie hatten neben dem Th17-Zelldefekt auch einen *S. aureus*-spezifischen IgG-Mangel, der, trotz des weiterhin bestehenden Th17-Zelldefekts, durch Substitution *S. aureus*-spezifischer Antikörper behandelt werden kann [161-164]. Auch in der Literatur wird von der protektiven Wirkung spezifischer IgG-Antikörper berichtet. So schützen TSST-1- oder Hla-spezifische Antikörper vor dem toxischen Schock-Syndrom bzw. vor *S. aureus*-Infektionen. Das Vorhandensein großer Antikörpermengen gegen PVL oder SAgs ist mit einem milderen Verlauf von *S. aureus*-Pneumonie bzw. *S. aureus*-Bakteriämie assoziiert [196, 200, 222, 223].

Es gibt also durchaus Ergebnisse, die zeigen, dass spezifische Antikörper vor *S. aureus*-Infektionen schützen. Das Scheitern der bisherigen anti-*S. aureus*-Vakzinen könnte eine ganz andere Ursache haben. Für die Auswahl und Erprobung von *S. aureus*-Proteinen als

Vakzinekandidaten werden Tiermodelle genutzt. Dabei werden Mäuse am häufigsten verwendet. Jedoch gibt es Argumente, die gegen die Maus als Modell für *S. aureus*-Infektionen sprechen [220]. *S. aureus* und seine Virulenzfaktoren sind sehr an den Wirt Mensch angepasst: Für die Eisenakquise verfügt IsdB über eine höhere Affinität gegenüber humanem Hämoglobin als gegenüber murinem Hämoglobin [224]. Die Chemotaxis-inhibierenden Proteine CHIPS und SCIN sind humanspezifisch [225, 226]. Das Leukotoxin PVL wirkt vor allem auf humane neutrophile Granulozyten zytotoxisch, jedoch im Vergleich dazu kaum zytotoxisch auf murine neutrophile Granulozyten [227]. Bereits 0,001 µg/kg des SAgs SEA induzieren beim Menschen Anzeichen eines toxischen Schock-Syndroms, während sogar 4×10^6 µg/kg des SAgs TSST-1 bei der Maus noch nicht letal sind [220]. Ähnliches wird auch bei der Hla-Letalität vermutet [220]. Außerdem reagieren Mäuse je nach genetischem Hintergrund unterschiedlich auf Vakzinierungen gegen *S. aureus*. So sind BALB/c-Mäuse nach einer *S. aureus*-Hautinfektion durch Antikörper und T-Zellen vor erneuten *S. aureus*-Hautinfektionen geschützt, C57BL/6-Mäuse dagegen nicht [31]. Es wäre durchaus denkbar, dass die auf der Basis von Mausmodellen ausgewählten Vakzinekandidaten nicht geeignet sind, um beim Menschen Schutz vor *S. aureus*-Infektionen zu generieren. Der Suche nach geeigneten Tiermodellen wird in der aktuellen Diskussion deshalb eine hohe Priorität eingeräumt. Es kämen z. B. Großtiere wie Rinder und Schafe infrage, die natürliche Wirte für *S. aureus* sind [228]. Dennoch wird allein schon aus Kostengründen das Mausmodell für die Erprobung ausgewählter Vakzinekandidaten unentbehrlich bleiben.

Um für den Menschen geeignete Vakzinekandidaten zu finden, sollte als Alternative bzw. in Ergänzung zu Tiermodellen die Antikörperantwort bei Menschen im Detail untersucht werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten zeigen, dass bakteriämische Patienten mit besonders viel *S. aureus*-spezifischem IgG vor einem schweren Infektionsverlauf geschützt waren. Es wurde eine IgG-Signatur spezifisch für acht *S. aureus*-Proteinen ermittelt, die mit einem milderen Krankheitsverlauf assoziiert war. Zudem konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem geringeren Risiko an einer *S. aureus*-Infektion zu erkranken, viel *S. aureus*-spezifisches IgG besaßen. Dagegen besaßen die sehr infektionsanfälligen STAT3-HIES-Patienten sehr wenig *S. aureus*-spezifisches IgG [161-164].

Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine anti-*S. aureus*-Vakzine möglichst gegen viele (extrazelluläre) Proteine von *S. aureus* gerichtet sein sollte. Dies würde auch die hohe Diversität

innerhalb der Spezies *S. aureus* berücksichtigen [76]. Experimentelle anti-*S. aureus*-Vakzinen, die mehrere *S. aureus*-Proteine beinhalten, zeigen in Tiermodellen vielversprechende Ergebnisse. So überleben mehr Mäuse eine *S. aureus*-Infektion (*i. p.*), wenn sie vorher mit vier *S. aureus*-Oberflächenproteinen (IsdA, IsdB, SdrD und SdrE) immunisiert werden, als wenn sie nur mit einzelnen Proteinen daraus immunisiert werden [229]. In einem Kaninchenmodell schützt eine multivalente anti-*S. aureus*-Vakzine, bestehend aus SAgs (SEB, SEC, TSST-1 und SElX) sowie aus Hämolysinen/Leukotoxinen (α-, β- und γ-Hämolysine) vor *S. aureus*-Pneumonien, sogar bei Infektionen mit verschiedenen *S. aureus*-Stämmen [195]. Auch die Kombination von *S. aureus*-Oberflächenproteinen (IsdB) und extrazellulären Proteinen (α-Hämolysin) in einer Vakzine vermittelte in der Maus einen besseren Schutz bei *S. aureus*-Bakteriämie als die Nutzung der einzelnen Proteine [230].
Mittlerweile sind die ersten multivalenten anti-*S. aureus*-Vakzinen in der klinischen Erprobung. Pfizer erprobt eine aus vier *S. aureus*-Oberflächenproteinen bestehende Vakzine (ClfA, MntC, CP5 und CP8; NCT01643941). Biota Pharmaceuticals testet eine Vakzine, die aus zwei extrazellulären *S. aureus*-Proteinen besteht (PVL, Hla; NCT01011335). GSK (NCT01160172) sowie Novartis (keine NCT-Nummer) haben jeweils eine tetravalente Vakzine entwickelt, deren Inhalt nicht bekannt gegeben wurde [221].

Aus den Daten in der vorliegenden Arbeit und der aktuellen Literatur kann man eine anti-*S. aureus*-Vakzinestrategie ableiten. Für eine protektive Wirkung von IgG bei *S. aureus*-Infektionen müssen große Mengen an spezifischem IgG induziert werden. Diese sollten vor allem extrazelluläre *S. aureus*-Proteine binden. So können diese z. B. neutralisiert werden. Es sollte eine multivalente Vakzine in Betracht gezogen werden, da die Spezies *S. aureus* sehr divers ist [76]. Acht Kandidatenproteine wurden in dieser Arbeit aus einem humanen Kontext herausgearbeitet.
Bei der Überprüfung des Erfolgs einer anti-*S. aureus*-Vakzine sollte das Ziel auch nicht das Erreichen einer sterilen Immunität sein, da diese durch IgG vermutlich nicht möglich sein wird [201]. Dies kann vom Vorhandensein spezifischer IgG-Antikörpern in Gesunden und bei Patienten (CF und EB) nach überstandener *S. aureus*-Infektion abgeleitet werden: Trotz der Antikörper sind sie nicht vor Besiedlung bzw. erneuter Infektion geschützt. Sie haben aber durch die generierten Antikörper bei einer erneuten *S. aureus*-Infektion einen milderen Infektionsverlauf [139, 140, 190, 222]. Die Erfolge der Therapie von HIES-Patienten mit IVIG

belegen die direkte Schutzfunktion von IgG [161-164]. Ein erreichbares Ziel für eine anti-*S. aureus*-Vakzine würde daher ein milderer und unkomplizierterer Verlauf von *S. aureus*-Infektionen darstellen, d. h. ein klinischer Schutz im Gegensatz zu einer sterilen Immunität [201].

Dass *S. aureus*-spezifisches IgG nicht alleine entscheidend für den Verlauf von *S. aureus*-Infektionen ist, lässt sich ebenfalls aus den Ergebnissen dieser Arbeit ableiten. Bei der Menge des *S. aureus*-spezifischen IgGs gab es nämlich einen relativ großen Überlappungsbereich, in dem einige *S. aureus*-Bakteriämiepatienten vor einem schweren Verlauf geschützt waren, jedoch andere eine Sepsis entwickelten. Hier zeigte sich, dass neben Antikörpern auch andere Faktoren bei der Abwehr von *S. aureus* ausschlaggebend sind. Dies könnten z. B. Th17-Zellen und neutrophilen Granulozyten sein.

5.4 Modulation der Immunantwort – Kann *S. aureus* Allergien induzieren?

S. aureus ist mit allergischen Erkrankungen assoziiert. Etwa 90 % aller AD-Patienten, 60 % aller Patienten mit chronischer Rhinosinusitis mit Nasenpolypen (CRSwNP) und 87 % der CRSwNP-Patienten, die zusätzlich an Asthma leiden, sind mit *S. aureus* besiedelt [111, 133]. Allergien sind durch chronische Entzündungen vom Typ 2 gekennzeichnet. Es ist nicht bekannt ob *S. aureus* diese Patienten aufgrund ihrer Th2-dominierten Immunantworten so häufig besiedelt, oder ob *S. aureus* in der Lage ist diese Th2-Immunantworten auszulösen. Dies wird im Zusammenhang mit dem Auftreten von SAg-spezifischem IgE bei CRSwNP in Kombination mit Asthma diskutiert [133]. Der Vorteil, den eine Th2-dominierte Immunantwort *S. aureus* bieten würde, wäre eine Schwächung der Effektormechanismen für die Abwehr des Bakteriums, wie z. B. eine verminderte Produktion antimikrobieller Peptide [74].

Th2-Immunantworten und Allergien sind durch das Auftreten von allergenspezifischem IgE gekennzeichnet. Bedingt durch die sehr geringen Konzentrationen von IgE im Serum von Gesunden (0,16 µg/mL) ist es mit sehr viel Aufwand verbunden IgE-Bindung an Antigene bzw. Allergene nachzuweisen, und es werden große Mengen Probenmaterial benötigt [47, 231]. Jedoch kann hier durch die Verwendung von IgG4 als Surrogatmarker für eine Th2-Immunantwort Abhilfe geschaffen werden. Der Klassenwechsels zu IgG4 benötigt ebenfalls

klassische Th2-Zytokine (IL-4, IL-5 und IL-13) [42, 48]. Allergenspezifische IgG4-Antikörper lassen sich typischerweise bei Allergien nachweisen [45].

5.4.1 Die Besonderheiten der IgG4-Bindung an *S. aureus*-Proteine

In eigenen Vorarbeiten stellte sich heraus, dass die IgG4-Bindung in Seren von fünf *S. aureus*-Trägern an extrazelluläre *S. aureus*-Proteine aus dem Kulturüberstand sehr heterogen war. Einige Träger zeigten viele IgG4-Bindungsspezifitäten und bei anderen fehlte eine IgG4-Bindung an die *S. aureus*-Proteine fast vollständig [155].

Diese initiale Beobachtung wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer größeren Kohorte verfolgt. Die Analyse der IgG4-Bindung aus Plasmen von 16 *S. aureus*-Trägern und 16 Nicht-Trägern zeigte, dass sich diese zwischen beiden Gruppen nicht unterschied, jedoch zwischen den Spendern sehr heterogen ausfiel. In beiden Gruppen gab es Spender mit und ohne *S. aureus*-spezifischem IgG4. Auffallend war ein IgG4-Signal um 32 kDa bis 34 kDa, welches bei allen Spendern mit *S. aureus*-spezifischem IgG4 vorkam und bei einigen das einzige IgG4-Signal darstellte.

Auf 2D-Western Blots zeigte sich, dass die dominanteste IgG4-Bindung an die *S. aureus*-Proteine vor allem in Bereichen auftrat, in denen auch die *S. aureus*-Serinproteasen Spls (*S. aureus serine protease-like proteins*) vorlagen [155]. Das IgG4 bevorzugt an Spls bindet, bestätigte sich bei der Untersuchung der Antikörperbindung an rekombinante Spl-Proteine. Spls bilden eine Gruppe aus sechs Proteinen (SplA bis SplF), die auf einem Operon codiert sind. 84 % aller *S. aureus*-Stämme besitzen mindestens eins der sechs Spl-Gene [232]. Ihre physiologische Bedeutung ist noch nicht aufgeklärt [93, 95-97]. Sie besitzen eine theoretische molekulare Masse von etwa 26 kDa. Diese wich aufgrund des Laufverhaltens der Spls in der eingesetzten Trennungsmethode von den theoretischen Werten ab, wie man es bei SDS-Gelen häufig beobachtet.

5.4.2 *S. aureus*-Serinproteasen sind die dominanten IgG4-bindenden Proteine

Die IgG4-Bindung an SplC und SplD wurde in Seren von Patienten mit zwei immunologisch gegensätzlichen Erkrankungen untersucht, die beide mit hohen *S. aureus*-Besiedlungsraten verbunden sind: auf der einen Seite die AD, die durch ein Th2-Zytokinprofil geprägt ist, und auf der anderen Seite Psoriasis, bei der ein Th1-Zytokinprofil dominiert [108-112, 114].

Wie aufgrund des Zytokinprofils zu erwarten war, hatten AD-Patienten eine ausgeprägtere IgG4-Bindung an *S. aureus*-Proteine und Spls als Psoriasis-Patienten. Die Menge von Hla-spezifischem IgG4 war bei beiden Erkrankungen gleich niedrig.
Es wurde bereits gezeigt, dass AD-Patienten SAg-spezifisches IgG4 bilden. Dies findet man jedoch bei Psoriasis-Patienten nicht [233]. Das Spl-spezifische IgG4, das in dieser Arbeit bei einigen Psoriasis-Patienten gemessen wurde, könnte bedeuten, dass die Spls die Qualität der Immunantwort beeinflussen können.

Viel antigenspezifisches IgG4 kann auch die Folge einer starken humoralen Immunantwort auf das Antigen sein. Um eine mögliche Verschiebung der Immunantwort zeigen zu können, wurde in dieser Arbeit die spezifische IgG1- und IgG4-Bindung in Seren von gesunden *S. aureus*-Trägern und Nicht-Trägern an die Spls und an Hla ermittelt.
Das Verhältnis von spezifischem IgG4 zu spezifischem IgG1 war bei den Spls größer als bei Hla. Die Unterschiede waren statistisch hochsignifikant.
Die Qualität der Immunantwort auf die Spls im Vergleich zum Hla war folglich zum IgG4 verschoben. Da für den IgG4-Klassenwechsel Th2-Zytokine und Treg-Zytokine benötigt werden, könnten die Spls bei der Initiierung von Immunantworten vom Typ 2 eine Rolle spielen [42, 44, 48]. Der zugrunde liegende Mechanismus oder die physiologischen Enzymsubstrate der Spls sind aber noch nicht bekannt. Es wurde bislang nur gezeigt, dass im Fall von SplA, SplB und SplD bestimmte Aminosäuresequenzen als Schnittstelle für die Proteaseaktivität der Spls essentiell sind [95-97]. Für SplC, SplE und SplF hat man dagegen noch keine Schnittstellen identifizieren können.

Interessant ist die Beobachtung, dass *S. aureus*-Träger bei SplB, SplD und SplF tendenziell eine stärkere Verschiebung zum IgG4 besaßen als Nicht-Träger. IgG4 wird antigenspezifisch unter anderem bei chronischer Antigen-Exposition gebildet [42, 45]. Die dauerhafte Besiedlung könnte die vermehrte Produktion von *S. aureus*-spezifischem IgG4 bei *S. aureus*-Trägern erklären [234].

5.4.3 Spl-spezifische T-Zellen sezernieren Th2- und Treg-Zytokine

Spls sind die dominanten IgG4-bindenden *S. aureus*-Proteine. Für den Klassenwechsel zu IgG4 sind vor allem Th2- (IL-4, IL-5, IL-13) und Treg-Zytokine (IL-10) nötig [42, 44]. Demnach müsste es auch spezifische Th2-Zellen und Tregs geben.

Um dies zu untersuchen, wurden T-Zelllinien von neun gesunden Spendern angefertigt und mit Spls (außer SplC) oder Hla stimuliert. Die freigesetzten Zytokine wurden in den Zellüberständen bestimmt. Pro-inflammatorischen Zytokine wurden bei Stimulation der T-Zellen mit Spls in geringeren Mengen sezerniert als bei Stimulation mit Hla. Jedoch sezernierten Spl- im Vergleich zu Hla-stimulierten T-Zellen größere Mengen von Th2-Zytokinen. Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 befand sich bei mit Spl- und Hla-stimulierten T-Zellen in etwa gleichen Mengen in den Überständen.

Diese Daten legen nahe, dass die Immunantwort der T-Zellen gesunder Spender bei Spls in Richtung Th2 verschoben ist. Jedoch sind die produzierten Zytokinmengen abhängig von der Anzahl der Antigen-spezifischen T-Zellen, die diese sezernieren. Im Blut gesunder Spender hängt diese Zahl der antigenspezifischen T-Zellen vom jeweiligen *S. aureus*-Antigen ab und ist interindividuell sehr variabel [165]. Deshalb wurden die Mengenanteile der anti-inflammatorischen und Th2-Zytokine an allen gemessenen Zytokinen ermittelt und verglichen. Dies ergab, dass der Anteil von IL-4, IL-5, IL-13 und IL-10 an allen gemessenen Zytokinen in den Überständen der mit SplA stimulierten T-Zellen verglichen mit Hla signifikant größer war. Dieselbe Tendenz wurde auch bei den anderen Spls ermittelt. Der Anteil von IL-10 war bei allen fünf getesteten Spls signifikant größer als bei Stimulation der T-Zellen mit Hla.

Antigen-spezifische T-Zellen entstehen beim Kontakt des Immunsystems mit dem Antigen. Sie können in verschiedene Phänotypen (z. B. Th1, Th2 und Treg) ausdifferenzieren. Dabei nimmt das Zytokinmilieu Einfluss auf die Ausbildung des T-Zellphänotyps [14, 23]. Bei der Stimulation von T-Zellen aus humanem Blut mit Antigenen *in vitro* werden bevorzugt die bereits differenzierten Antigen-spezifischen T-Gedächtniszellen aktiviert und sezernieren je nach T-Zellphänotyp unterschiedliche Effektorzytokine [1]. *Ex vivo* Stimulationsexperimente mit Spls ergaben, dass die Spl-spezifischen T-Zellen IL-4, IL-5, IL-13 und IL-10 freisetzten. IL-4, IL-5 und IL-13 werden von Th2-Zellen sezerniert und IL-10 von Tregs [235]. Demnach befanden sich Spl-spezifische Th2-Zellen und Tregs im Blut gesunder Spender. Dies passt zur Beobachtung von Spl-spezifischen IgG4-Antikörpern, für deren Bildung Th2- und Treg-Zytokine nötig sind [42, 44]. IL-4, IL-5 und IL-13 führen zur Aktivierung von Mastzellen,

eosinophilen und basophilen Granulozyten, sowie zum IgE-Klassenwechsel [236]. Im Gegensatz zu den Spls führte die Stimulation der T-Zellen mit Hla eher zur Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie sie von Th17-Zellen (IL-17) und Th1-Zellen (IFN-γ) gebildet werden [235]. Besonders hohe Werte von IL-6 und zum Teil TNF wurden in diesen Überständen ebenfalls gefunden. IL-6 wirkt zusammen mit TNF antagonistisch auf Tregs und IL-6 ist außerdem für die Induktion von Th17-Zellen wichtig [28, 29, 237]. Hla kann demnach die Immunantwort in Richtung Th1- und Th17-Zellen vorantreiben, was für die Abwehr von *S. aureus* wichtig ist [69, 72].

Was könnte der Grund für die Produktion von Spls sein? Möglicherweise kann *S. aureus* durch Spls die Qualität der Immunantwort am Ort der Besiedlung bzw. Infektion beeinflussen. Th2 Zytokine führen zur Schwächung von Effektormechanismen für die Abwehr von *S. aureus* [74]. Deshalb ergeben sich durchaus Überlebensvorteile für den Mikroorganismus, wenn solche Zytokine freigesetzt werden.

5.4.4 Spl-spezifisches IgE

Wie zu Beginn erwähnt, kann IgG4 als Surrogatmarker für eine Th2-Antwort herangezogen werden. So findet man typischerweise bei Pollen- und Hausstaubmilbenallergikern allergenspezifisches IgG4 und IgE [45]. Viele Allergene sind Proteasen (vor allem Serinproteasen), die durch ihre enzymatische Aktivität Zellverbindungen lockern und/oder Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs) auf Zellen aktivieren können. Die Auflösung der epithelialen Barriere erleichtert das Eindringen von Allergenen in den Organismus, die Aktivierung von PARs induziert die Expression von Th2-Zytokinen [53, 54, 238-241]. Da die Spls zu dieser Klasse von Proteinen gehören, könnten sie klassische Allergene darstellen. Um diese Hypothese zu untermauern, musste Spl-spezifisches IgE nachgewiesen werden.

Um Spl-spezifisches IgE zu detektieren, wurde ein ELISA entwickelt. Die IgE-Bindung an den Spls (außer SplC) und an Hla wurde in Seren von gesunden *S. aureus*-Trägern und Nicht-Trägern, Asthma-Patienten, CF-Patienten und AD-Patienten ermittelt. CF-Patienten besaßen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen mehr IgE mit Spezifität für alle fünf getesteten Spls. Bei Asthma-Patienten ließ sich vermehrte spezifische IgE-Bindung an SplA, SplD, SplE und SplF messen.

Bereits gesunde *S. aureus*-Träger und Nicht-Träger prägen also eine Th2- und Treg-getriebene Immunantwort gegen die Spls aus. Die Spl-spezifischen IgE-Werte von Patienten, die mit *S. aureus* in der Lunge kolonisiert/infiziert sind, waren darüber hinaus noch hochsignifikant erhöht. Dagegen zeigten AD-Patienten, deren Hautläsionen regelmäßig mit *S. aureus* kolonisiert oder infiziert sind, keine erhöhten Spl-spezifischen IgE-Werte im Serum, obwohl sie viel *S. aureus*-spezifisches IgG4 besaßen. Entweder bilden AD-Patienten kein Spl-spezifisches IgE, oder es ist nur lokal vorhanden. In der Tat deckt das IgE-Repertoire im Serum nicht alle vorhandenen Spezifitäten im Körper ab [231]. Dies wurde auch bei CRSwNP-Patienten gezeigt, von denen viele lokal im Nasenpolypengewebe SAg-spezifisches IgE besitzen, während dieses im Serum nicht messbar ist [242]. SAg-spezifisches IgE ist bei CRSwNP mit der Entwicklung von Asthma assoziiert [127]. Bei asthmatischen CRSwNP-Patienten kommt SAg-spezifisches IgE vermehrt lokal im Polypengewebe vor und lässt sich auch systemisch im Serum der Patienten messen (etwa 50 % der Seren aller Asthmatiker, 13 % Seren gesunder Kontrollen) [243, 244]. Möglicherweise gibt es ein ähnliches Phänomen bei den Spls. Es könnte auch sein, dass sich das physiologische Substrat der Spls bevorzugt in der Lunge befindet. Wenn z. B. spezifische Zellrezeptoren in der Lunge durch die Spls aktiviert werden, könnte dies eine Th2-getriebene Immunantwort auslösen. Dies würde erklären, weshalb Patienten, die mit *S. aureus* in der Lunge infiziert sind, so große Mengen Spl-spezifisches IgE im Serum haben.

5.4.5 Allergene von *S. aureus* – Schlussfolgerungen und Ausblick

Eine Veränderung der Immunantwort in Richtung anti-Inflammation und weg von einer schützenden Th1/Th17-Antwort ist für das Überleben von *S. aureus* bei der Besiedlung bzw. Infektion des humanen Wirts von Vorteil. Eine solche Immunmodulation wäre ein Wirksamer *Immunescape*-Mechanismus. Hinweise darauf, dass *S. aureus* Proteine mit entsprechender Funktion besitzt, sind die IgE-Bindung an SAgs bei CRSwNP- und Asthma-Patienten sowie IgE-Bindung an das Fibronektin-bindende Protein bei AD-Patienten. Bei Asthma und AD korrelieren die spezifischen IgE-Mengen mit dem Schweregrad der Erkrankung. Neben den genannten *S. aureus*-Proteinen wird auch Protein A als „Superallergen“ ein Th2-treibendes Potenzial zugeschrieben. Es kreuzvernetzt IgE-Antikörper auf Mastzellen und führt so zu deren Degranulation [245]. Eine Antikörper-unabhängige Aktivierung von Mastzellen durch das

S. aureus-Protein delta-Toxin wurde auch beschrieben [246]. Dadurch kann sich ein Mikromilieu bilden, das eine Entzündung vom Typ 2 auslöst oder vorantreibt.

Im Fall von SAgs kann nicht unterschieden werden, ob sie eine Th2-Antwort initiieren können, oder lediglich eine bereits vorherrschende lokale Th2-Antwort durch ihre antigenunabhängige T-Zellaktivierung verstärken. Dagegen postulieren wir, dass die in dieser Arbeit vorgestellten Spls Allergien verursachen können. Das stärkste Argument dafür ist ihre Fähigkeit, bei Mäusen Entzündungen vom Typ 2 in der Lunge und den lokalen Lymphknoten auszulösen, wenn sie wiederholt *intratracheal* appliziert wurden. Adjuvanzien waren dafür nicht notwendig (persönliche Mitteilung Dr. Olga Krysko). Aber auch die Tatsache, dass bereits gesunde Erwachsene Spl-spezifische Immunantworten vom Typ 2 entwickeln, ist ein starker Hinweis auf eine Schrittmacherfunktion dieser bakteriellen Proteasen bei der Entwicklung von Allergien. Falls sich bestätigt, dass *S. aureus* in den Atemwegen Allergien auslösen und unterhalten kann, muss diese neue Erkenntnis auch in die Therapieansätze für die betroffenen Patienten einfließen. Es leuchtet ein, dass Allergien gegen Bakterien, die die Atemwege besiedeln, refraktär gegenüber der etablierten Asthmatherapie sein werden.

Angesichts der Bedeutung der allergischen Atemwegserkrankungen muss die Fragestellung dieser Arbeit in der Zukunft intensiv weiterverfolgt werden. Die Aufklärung der möglichen ursächlichen Beteiligung von *S. aureus* an der Pathogenese von Allergien muss höchste Priorität haben. Dafür sollte die Charakterisierung der Spl-spezifischen Antikörper- und vor allem der T-Zellantworten auf (weitere) Patientenkohorten ausgeweitet werden. Als erster Schritt bieten sich CF- und Asthma-Patienten an, die besonders viel Spl-spezifisches IgE besitzen. Die T-Zellantwort dieser Patienten auf Spls wird sich wahrscheinlich von der T-Zellantwort gesunder Probanden deutlich unterscheiden. Auch die funktionelle Charakterisierung Spl-spezifischer IgE-Antikörper, beispielsweise durch Mastzell-Degranulationsassays *in vitro*, wäre dazu geeignet, die mögliche Rolle von Spls als *S. aureus*-Allergene zu beleuchten. Des Weiteren müssen die physiologischen Substrate der Spls gefunden werden. Hierbei sollte die Lunge in den Fokus gerückt werden.

6 Zusammenfassung

Staphylococcus (*S.*) *aureus* besiedelt etwa 30 % aller gesunden Menschen. Jedoch ist das Bakterium auch als Infektionserreger gefürchtet und kann, besonders bei immunkompromittierten Patienten im Krankenhaus, viele unterschiedliche Infektionstypen verursachen. Infektionen mit *S. aureus* können sowohl lokal auftreten, wie z. B. Haut- und Bindegewebsinfektionen oder Osteomyelitis, als auch systemisch und dann zu Bakteriämien oder sogar Sepsis führen. *S. aureus* ist der zweithäufigste Verursacher von Bakteriämien. Durch die Einführung von Antibiotika und durch bessere intensivmedizinische Behandlungsmöglichkeiten sank die Letalität der *S. aureus*-Bakteriämie von 80 % in der prä-Antibiotika-Ära auf heute 20 %. Entsteht jedoch eine Sepsis, steigt die Letalität mit zunehmenden Schweregrad auf bis zu 86 % an.

S. aureus ist ein prominentes Beispiel für die aktuelle Antibiotika-Krise, die von der WHO als eine große Gefahr für die Weltgesundheit im 21. Jahrhundert eingeschätzt wird. Resistenzen gegenüber zahlreichen Antibiotika erfordern neue Präventions- und Therapieansätze gegen *S. aureus*-Infektionen. Ideal wäre eine anti-*S. aureus*-Vakzine, bisher sind jedoch alle Vakzinekandidaten in der klinischen Prüfung gescheitert. Da alle getesteten Vakzinen eine starke Antikörperantwort zum Ziel hatten und dieses Ziel auch meist erreicht wurde, wird aktuell von einigen Experten bezweifelt, dass *S. aureus*-spezifische Antikörper überhaupt protektiv wirken können. Dagegen werden nun Th17-Zellen als entscheidende Komponente des Immunsystems bei der Abwehr von *S. aureus* angesehen.

Um die Rolle von Antikörpern bei *S. aureus*-Infektionen zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein Verfahren entwickelt, um die IgG-Bindung an *S. aureus*-Proteine zu quantifizieren. Als Antigene standen Bakterienzellen und extrazelluläre Proteine aus dem bakteriellen Kulturüberstand sowie rekombinante *S. aureus*-Proteine zur Verfügung. Eigens für diesen Zweck wurde eine Protein A-negative Mutante des *S. aureus*-Stamms USA300 (USA300Δ*spa*) hergestellt. Diese Bakterien wurden unter Eisenlimitation kultiviert, da sich herausgestellt hat, dass sich dadurch mehr Informationen über die IgG-Bindung an *S. aureus*-Proteine erhalten ließen. Es wurden Seren von gesunden Probanden und von verschiedenen Patienten-Kohorten getestet. Seren von Patienten mit *S. aureus*-Bakteriämie aus einer prospektiven klinischen Studie wurden von Kooperationspartnern in den USA zur Verfügung gestellt. Außerdem

wurden Seren von Patienten mit zystischer Fibrose (CF) und Hyper-IgE-Syndrom (HIES) untersucht. Beide Patientengruppen entwickeln häufig *S. aureus*-Infektionen der Lunge. Jedoch sind CF-Patienten aus bisher unbekannten Gründen vor systemischen *S. aureus*-Infektionen geschützt. HIES-Patienten dagegen leiden unter wiederholten generalisierten Infektionen mit *S. aureus*, die nicht selten das Leben der Patienten bedrohen und aggressive anti-mikrobielle Therapie erfordern. Bei HIES-Patienten wird der bestehende Th17-Zelldefekt als Ursache für die schweren Infektionen angesehen. Die IgG-Antwort von HIES-Patienten auf *S. aureus* wurde jedoch noch nicht genauer untersucht.

In der Studie mit den *S. aureus*-Bakteriämiepatienten stellte sich heraus, dass die Patienten, die zu Beginn der Erkrankung viel *S. aureus*-spezifisches IgG im Serum besaßen, ein geringeres Risiko hatten, im Krankheitsverlauf eine Sepsis zu entwickeln. Mit einem Multiplex-Assay mit der auf dem Luminex-System beruhenden Flexmap3D-Technik wurde in den Seren der Patienten die IgG-Bindung an 64 rekombinante *S. aureus*-Proteine quantifiziert. Dieser Test mit molekular definierten *S. aureus*-Antigenen bestätigte, dass Patienten, die sich ohne septische Komplikation von ihrer Bakteriämie erholten, mehr spezifisches IgG gegen 21 der untersuchten rekombinanten *S. aureus*-Proteine im Serum aufwiesen als spätere Sepsispatienten. Vor allem die IgG-Bindung an extrazelluläre *S. aureus*-Proteine war informativ und ermöglichte die Stratifizierung der Patienten nach ihrem Sepsisrisiko. Dafür genügte die Information über die IgG-Bindung an acht der rekombinanten *S. aureus*-Proteine (Plc, SspB, IsaA, SACOL0444, SEM, SACOL0985, GlpQ, HlgC). Die Sensitivität betrug dabei 76 % und die Spezifität 74 %. In den Seren von CF-Patienten fand sich mehr *S. aureus*-spezifisches IgG als in Seren von Gesunden. Dagegen besaßen HIES-Patienten weniger spezifisches IgG als gesunde Kontrollen. Nach IVIG-Substitution kam es zu einem Anstieg des spezifischen IgGs im Serum von HIES-Patienten.

Die Daten zeigen, dass Erreger-spezifische Antikörper bei *S. aureus*-Bakteriämie zumindest als Marker für die Protektion vor einem schweren Verlauf angesehen werden können. Denn Patienten, die viel *S. aureus*-spezifisches IgG gegen extrazelluläre *S. aureus*-Proteine im Serum hatten, waren vor der Entwicklung einer *S. aureus*-Sepsis besser geschützt als solche mit geringen Mengen spezifischer Antikörper. Hinweise, dass die spezifischen Antikörper sogar protektiv wirken, zeigten Untersuchungen der Seren von HIES-Patienten. Neben ihrem Th17-Zelldefekt mangelte es ihnen auch an *S. aureus*-spezifischen IgG-Antikörpern. Neue Therapiestrategien bei HIES setzen neben der Antibiotikatherapie auf die Substitution mit

humanem IgG. Damit gelingt es, bei diesen immunkompromittierten Patienten *S. aureus*-Infektionen vorzubeugen. Das heißt, dass diese Patienten trotz ihres Th17-Zelldefekts *S. aureus* besser abwehren können, wenn ihnen IgG-Präparationen zugeführt werden, die aus dem Plasma gesunder Blutspender gewonnen werden und große Mengen von anti-*S. aureus*-Antikörpern enthalten. Diese Daten verdeutlichen das mögliche Potenzial von IgG bei der Protektion vor *S. aureus*-Infektionen. Sie zeigen, dass es für eine Protektion entscheidend ist, dass bereits zu Beginn der systemischen Infektion IgG-Antikörper in möglichst großen Mengen vorhanden sind und dass diese sich gegen möglichst viele extrazelluläre *S. aureus*-Proteine richten. Es deutet alles darauf hin, dass nur eine multivalente Vakzine Erfolg verspricht. Eine solche Vakzinestrategie entspräche auch der Heterogenität der Spezies *S. aureus* in der Ausstattung einzelner Stämme mit Virulenzfaktoren. Acht bakterielle Kandidatenproteine für eine zukünftige anti-*S. aureus*-Vakzine wurden in dieser Arbeit identifiziert.

Neben den beiden Rollen als Kommensale und als Pathogen, wird über eine dritte Rolle von *S. aureus* diskutiert: *S. aureus* als Allergen. Die Empfänglichkeit für eine *S. aureus*-Besiedlung ist bei Th2-dominierten Erkrankungen erhöht. So sind Patienten mit atopischer Dermatitis (AD) oder chronischer Rhinosinusitis mit Nasenpolypen (CRSwNP) wesentlich häufiger mit *S. aureus*-kolonisiert als gesunde Individuen. *S. aureus*-spezifisches IgE gegen Superantigene (SAgs) wurde bei beiden Erkrankungen bereits beschrieben. Die Menge des SAg-spezifischen IgEs im Serum korreliert positiv mit dem Schweregrad der Erkrankungen. SAg-IgE ist bei CRSwNP mit der Entstehung von Asthma assoziiert. Deswegen werden SAgs als *S. aureus*-Allergene diskutiert. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass SAgs aufgrund ihrer Fähigkeit T-Zellen antigenunabhängig zu aktivieren, lediglich bestehende lokale Th2-Immunantworten verstärken. Deshalb sollte in dieser Arbeit nach klassischen *S. aureus*-Allergenen gesucht werden.

Allergene können eine Entzündungsreaktion vom Typ 2 auslösen; charakteristisch sind Allergen-spezifische Th2-Zellen und vor allem spezifisches IgE. Die Identifizierung der Spezifitäten von IgE ist jedoch anspruchsvoll, bedingt durch die sehr geringen Konzentrationen von Serum-IgE. Jedoch wird ein ähnliches Zytokinprofil wie beim IgE-Klassenwechsel auch beim Klassenwechsel zu IgG4 benötigt. Diese IgG-Subklasse wird bei klassischen Th2-Immunantworten parallel mit allergenspezifischem IgE gebildet. Deshalb wurde IgG4 in dieser Arbeit als Surrogatmarker für eine Th2-Immunantwort herangezogen. In eigenen Vorarbeiten

konnte gezeigt werden, dass sowohl Spezifitäten des *S. aureus*-spezifischen IgG4s als auch deren Mengen bei gesunden Spendern sehr variabel ist.

Bei der Untersuchung der IgG4-Bindung aus Plasmen gesunder Kontrollen an extrazelluläre *S. aureus*-Proteine stellten sich *S. aureus*-Serinproteasen (SplA bis SplF) als die dominanten IgG4-bindenden Proteine heraus. Fünf Spls wurden kloniert und als Tag-freie rekombinante Proteine hergestellt. SplC ließ sich in diesem Expressionssystem nicht rekombinant herstellen. Zum Vergleich diente das *S. aureus*-Protein alpha-Hämolysin (Hla). Das Verhältnis des spezifischen IgG4 zu IgG1 im Serum war bei den Spls im Vergleich zu Hla signifikant erhöht. Die Analyse von Spl- und Hla-spezifischen T-Zellen aus Vollblut zeigte dann, dass Hla-spezifische T-Zellen vor allem pro-inflammatorische Zytokine (IFN-γ, TNF, IL-6, IL-17) sezernierten, Spl-spezifische T-Zellen dagegen eher Th2-Zytokine (IL-4, IL-5, IL-13) und das anti-inflammatorische Zytokin IL-10. Entsprechend groß war der Anteil von Th2-Zytokinen und vor allem IL-10 an den gemessenen Zytokinen im Überstand von Spl-spezifischen T-Zellen, im Vergleich zu Hla-spezifischen T-Zellen derselben Blutspender. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Spls eine Immunreaktion vom Typ 2 auslösen können. Dies ist bemerkenswert, weil die meisten *S. aureus*-Antigene eine Th1/Th17-Antwort auslösen, welche einer Th2-Antwort entgegenwirken sollte. Hauptmerkmal einer Typ 2-Reaktion ist jedoch die Bildung von spezifischem IgE. Deshalb wurde in dieser Arbeit ein ELISA-System für den Nachweis von Spl-spezifischem IgE etabliert. Mit diesem Test ließ sich tatsächlich Spl-spezifisches IgE im Serum messen. Die Mengen des spezifischen IgEs waren bei Asthma- und CF-Patienten signifikant höher als bei gesunden Personen.

Insgesamt zeigen die Daten, dass bereits bei gesunden Probanden die Immunantwort gegenüber Spls in Richtung einer Typ 2 Inflammation verschoben ist. Spls scheinen in der Lage zu sein, durch die Induktion eines entsprechenden Zytokinprofils die Qualität der Immunantwort auf *S. aureus* zu modulieren. Dies wäre vorteilhaft für das Überleben von *S. aureus* in seinem (menschlichen) Wirt. IgG4-Antikörper können beispielsweise keine pro-inflammatorischen Effektormechanismen aktivieren, und Th2-Zytokine vermindern die Synthese von antimikrobiellen Peptiden. Bei entsprechend prädisponierten Menschen könnte die Immunantwort durch Spls in Richtung Th2 entgleisen. Dann würde allergenspezifisches IgE synthetisiert und eine Allergie ausgelöst werden. Patienten, deren Lunge mit *S. aureus* besiedelt/infiziert war, besaßen besonders viel Spl-spezifisches IgE.

Eine adäquate Immunreaktion gegen *S. aureus* ist essentiell für die Abwehr des Mikroorganismus. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen heraus, dass *S. aureus*-spezifische Antikörper – entgegen der Meinung einiger Experten – einen positiven Beitrag leisten können, indem sie vor schweren Infektionsverläufen schützen. Es werden Vorschläge für die Zusammensetzung einer auf Antikörpern basierenden anti-*S. aureus*-Vakzine aufgezeigt. In Anbetracht der zunehmenden Antibiotikaresistenzen, muss der weiteren Entwicklung einer solchen Vakzine eine hohe Priorität als alternative Präventions- und/oder Behandlungsmöglichkeit bei *S. aureus*-Infektionen zugeschrieben werden.

Aber die Immunreaktion gegen *S. aureus* kann auch pathologische Folgen haben. Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die Hypothese, dass *S. aureus* Allergien verursachen kann. Sie liefern außerdem starke Hinweise darauf, dass Spls dabei als Allergene eine Schlüsselrolle einnehmen. Diese Erkenntnis ist neu und unerwartet. Angesichts der weltweiten Bedeutung von Allergien, besonders von Asthma, muss die mögliche Rolle der Spls bei deren Pathogenese mit hoher Priorität weiter aufgeklärt werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Janeway Immunologie*. Vol. 7. 2009: Spektrum Akademischer Verlag.
2. Ali, R.S., et al., *Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin.* J Invest Dermatol, 2001. **117**(1): p. 106-11.
3. Proksch, E., J.M. Brandner, and J.M. Jensen, *The skin: an indispensable barrier.* Exp Dermatol, 2008. **17**(12): p. 1063-72.
4. Krishna, S. and L.S. Miller, *Host-pathogen interactions between the skin and Staphylococcus aureus.* Curr Opin Microbiol, 2012. **15**(1): p. 28-35.
5. Wang, G., *Human antimicrobial peptides and proteins.* Pharmaceuticals (Basel), 2014. **7**(5): p. 545-94.
6. Malissen, B., S. Tamoutounour, and S. Henri, *The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin.* Nat Rev Immunol, 2014. **14**(6): p. 417-28.
7. Oh, J.E. and H.K. Lee, *Pattern recognition receptors and autophagy.* Front Immunol, 2014. **5**: p. 300.
8. Gayed, P.M., *Toward a modern synthesis of immunity: Charles A. Janeway Jr. and the immunologist's dirty little secret.* Yale J Biol Med, 2011. **84**(2): p. 131-8.
9. Janssens, S. and R. Beyaert, *Role of Toll-like receptors in pathogen recognition.* Clin Microbiol Rev, 2003. **16**(4): p. 637-46.
10. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses.* Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
11. Schwandner, R., et al., *Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2.* J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 17406-9.
12. Lu, Y.C., W.C. Yeh, and P.S. Ohashi, *LPS/TLR4 signal transduction pathway.* Cytokine, 2008. **42**(2): p. 145-51.
13. Fournier, B., *The function of TLR2 during staphylococcal diseases.* Front Cell Infect Microbiol, 2012. **2**: p. 167.
14. Kapsenberg, M.L., *Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 984-93.

15. Noris, M. and G. Remuzzi, *Overview of complement activation and regulation.* Semin Nephrol, 2013. **33**(6): p. 479-92.
16. Guermonprez, P., et al., *Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells.* Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 621-67.
17. Bjorkman, P.J., *MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions.* Cell, 1997. **89**(2): p. 167-70.
18. Tonegawa, S., *Somatic generation of antibody diversity.* Nature, 1983. **302**(5909): p. 575-81.
19. Arstila, T.P., et al., *A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity.* Science, 1999. **286**(5441): p. 958-61.
20. Arstila, T.P., et al., *Diversity of human alpha beta T cell receptors.* Science, 2000. **288**(5469): p. 1135.
21. Venturi, V., et al., *A mechanism for TCR sharing between T cell subsets and individuals revealed by pyrosequencing.* J Immunol, 2011. **186**(7): p. 4285-94.
22. Schwartz, R.H., *A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy.* Science, 1990. **248**(4961): p. 1349-56.
23. Shakhar, G., et al., *Stable T cell-dendritic cell interactions precede the development of both tolerance and immunity in vivo.* Nat Immunol, 2005. **6**(7): p. 707-14.
24. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto, *Regulation of T cell immunity by dendritic cells.* Cell, 2001. **106**(3): p. 263-6.
25. Szabo, S.J., et al., *Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses.* Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 713-58.
26. Pulendran, B. and D. Artis, *New paradigms in type 2 immunity.* Science, 2012. **337**(6093): p. 431-5.
27. Romagnani, S., *Regulation of the T cell response.* Clin Exp Allergy, 2006. **36**(11): p. 1357-66.
28. Yang, X.O., et al., *STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells.* J Biol Chem, 2007. **282**(13): p. 9358-63.
29. Nishihara, M., et al., *IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state.* Int Immunol, 2007. **19**(6): p. 695-702.

30. Archer, N.K., 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.* Infect Immun, 2013. **81**(6): p. 2070-5.
31. Montgomery, C.P., et al., *Protective immunity against recurrent Staphylococcus aureus skin infection requires antibody and interleukin-17A.* Infect Immun, 2014. **82**(5): p. 2125-34.
32. Jonuleit, H., et al., *Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells.* Trends Immunol, 2001. **22**(7): p. 394-400.
33. Mellman, I. and R.M. Steinman, *Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines.* Cell, 2001. **106**(3): p. 255-8.
34. Kim, B.S., et al., *Basophils promote innate lymphoid cell responses in inflamed skin.* J Immunol, 2014. **193**(7): p. 3717-25.
35. Xu, Z., et al., *Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond.* Nat Rev Immunol, 2012. **12**(7): p. 517-31.
36. Cambier, J.C., C.M. Pleiman, and M.R. Clark, *Signal transduction by the B cell antigen receptor and its coreceptors.* Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 457-86.
37. Friedl, P., A.T. den Boer, and M. Gunzer, *Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse.* Nat Rev Immunol, 2005. **5**(7): p. 532-45.
38. Durandy, A. and S. Kracker, *Immunoglobulin class-switch recombination deficiencies.* Arthritis Res Ther, 2012. **14**(4): p. 218.
39. Victora, G.D. and M.C. Nussenzweig, *Germinal centers.* Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 429-57.
40. Pone, E.J., et al., *Toll-like receptors and B-cell receptors synergize to induce immunoglobulin class-switch DNA recombination: relevance to microbial antibody responses.* Crit Rev Immunol, 2010. **30**(1): p. 1-29.
41. Stoop, J.W., et al., *Serum immunoglobulin levels in healthy children and adults.* Clin Exp Immunol, 1969. **4**(1): p. 101-12.
42. Nirula, A., et al., *What is IgG4? A review of the biology of a unique immunoglobulin subtype.* Curr Opin Rheumatol, 2011. **23**(1): p. 119-24.
43. Mitsdoerffer, M., et al., *Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(32): p. 14292-7.

44. Stone, J.H., Y. Zen, and V. Deshpande, *IgG4-related disease.* N Engl J Med, 2012. **366**(6): p. 539-51.
45. Aalberse, R.C., et al., *Immunoglobulin G4: an odd antibody.* Clin Exp Allergy, 2009. **39**(4): p. 469-77.
46. Angal, S., et al., *A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody.* Mol Immunol, 1993. **30**(1): p. 105-8.
47. Ahmad Al Obaidi, A.H., et al., *The predictive value of IgE as biomarker in asthma.* J Asthma, 2008. **45**(8): p. 654-63.
48. Oettgen, H.C., *Regulation of the IgE isotype switch: new insights on cytokine signals and the functions of epsilon germline transcripts.* Curr Opin Immunol, 2000. **12**(6): p. 618-23.
49. Salazar, F. and A.M. Ghaemmaghami, *Allergen recognition by innate immune cells: critical role of dendritic and epithelial cells.* Front Immunol, 2013. **4**: p. 356.
50. He, S.H., et al., *Mast cells and basophils are essential for allergies: mechanisms of allergic inflammation and a proposed procedure for diagnosis.* Acta Pharmacol Sin, 2013. **34**(10): p. 1270-83.
51. von Mutius, E., *Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence.* Immunobiology, 2007. **212**(6): p. 433-9.
52. Garn, H. and H. Renz, *Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis.* Immunobiology, 2007. **212**(6): p. 441-52.
53. Shpacovitch, V., et al., *Protease-activated receptors: novel PARtners in innate immunity.* Trends Immunol, 2007. **28**(12): p. 541-50.
54. Goel, C., et al., *Serine protease Per a 10 from Periplaneta americana bias dendritic cells towards type 2 by upregulating CD86 and low IL-12 secretions.* Clin Exp Allergy, 2012. **42**(3): p. 412-22.
55. Newsom, S.W., *Ogston's coccus.* J Hosp Infect, 2008. **70**(4): p. 369-72.
56. Peacock, S.J., et al., *Determinants of acquisition and carriage of Staphylococcus aureus in infancy.* J Clin Microbiol, 2003. **41**(12): p. 5718-25.
57. Wertheim, H.F., et al., *The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections.* Lancet Infect Dis, 2005. **5**(12): p. 751-62.
58. Laverde, D., et al., *Synthetic Teichoic Acid Conjugate Vaccine against Nosocomial Gram-Positive Bacteria.* PLoS One, 2014. **9**(10): p. e110953.

59. Jarraud, S., et al., *Relationships between Staphylococcus aureus genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease.* Infect Immun, 2002. **70**(2): p. 631-41.
60. Grumann, D., U. Nubel, and B.M. Broker, *Staphylococcus aureus toxins--their functions and genetics.* Infect Genet Evol, 2014. **21**: p. 583-92.
61. Lindsay, J.A. and M.T. Holden, *Staphylococcus aureus: superbug, super genome?* Trends Microbiol, 2004. **12**(8): p. 378-85.
62. Eriksen, K.R., *["Celbenin"-resistant staphylococci].* Ugeskr Laeger, 1961. **123**: p. 384-6.
63. Goss, C.H. and M.S. Muhlebach, *Review: Staphylococcus aureus and MRSA in cystic fibrosis.* J Cyst Fibros, 2011. **10**(5): p. 298-306.
64. Lo, W.T. and C.C. Wang, *Panton-Valentine leukocidin in the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection.* Pediatr Neonatol, 2011. **52**(2): p. 59-65.
65. Boyle-Vavra, S. and R.S. Daum, *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the role of Panton-Valentine leukocidin.* Lab Invest, 2007. **87**(1): p. 3-9.
66. Centers for Disease, C. and Prevention, *Staphylococcus aureus resistant to vancomycin--United States, 2002.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2002. **51**(26): p. 565-7.
67. Bradley, J.S., *Which antibiotic for resistant Gram-positives, and why?* J Infect, 2014. **68 Suppl 1**: p. S63-75.
68. Kock, R., et al., *Systematic literature analysis and review of targeted preventive measures to limit healthcare-associated infections by meticillin-resistant Staphylococcus aureus.* Euro Surveill, 2014. **19**(29).
69. Fowler, V.G., Jr. and R.A. Proctor, *Where does a Staphylococcus aureus vaccine stand?* Clin Microbiol Infect, 2014. **20 Suppl 5**: p. 66-75.
70. Haley, K.P. and E.P. Skaar, *A battle for iron: host sequestration and Staphylococcus aureus acquisition.* Microbes Infect, 2012. **14**(3): p. 217-27.
71. Fowler, V.G., et al., *Effect of an investigational vaccine for preventing Staphylococcus aureus infections after cardiothoracic surgery: a randomized trial.* JAMA, 2013. **309**(13): p. 1368-78.

72. Spellberg, B. and R. Daum, *Development of a vaccine against Staphylococcus aureus.* Semin Immunopathol, 2012. **34**(2): p. 335-48.
73. Proctor, R.A., *Challenges for a universal Staphylococcus aureus vaccine.* Clin Infect Dis, 2012. **54**(8): p. 1179-86.
74. Krishna, S. and L.S. Miller, *Innate and adaptive immune responses against Staphylococcus aureus skin infections.* Semin Immunopathol, 2012. **34**(2): p. 261-80.
75. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria.* Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
76. Kusch, H. and S. Engelmann, *Secrets of the secretome in Staphylococcus aureus.* Int J Med Microbiol, 2014. **304**(2): p. 133-41.
77. Kobayashi, S.D. and F.R. DeLeo, *Staphylococcus aureus protein A promotes immune suppression.* MBio, 2013. **4**(5): p. e00764-13.
78. Dossett, J.H., et al., *Antiphagocytic effects of staphylococcal protein A.* J Immunol, 1969. **103**(6): p. 1405-10.
79. Kim, H.K., et al., *Recurrent infections and immune evasion strategies of Staphylococcus aureus.* Curr Opin Microbiol, 2012. **15**(1): p. 92-9.
80. Goodyear, C.S. and G.J. Silverman, *Staphylococcal toxin induced preferential and prolonged in vivo deletion of innate-like B lymphocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(31): p. 11392-7.
81. Falugi, F., et al., *Role of protein A in the evasion of host adaptive immune responses by Staphylococcus aureus.* MBio, 2013. **4**(5): p. e00575-13.
82. Sharma, P., N. Wang, and D.M. Kranz, *Soluble T cell receptor Vbeta domains engineered for high-affinity binding to staphylococcal or streptococcal superantigens.* Toxins (Basel), 2014. **6**(2): p. 556-74.
83. Wilson, G.J., et al., *A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia.* PLoS Pathog, 2011. **7**(10): p. e1002271.
84. Williams, R.J., et al., *Identification of a novel gene cluster encoding staphylococcal exotoxin-like proteins: characterization of the prototypic gene and its protein product, SET1.* Infect Immun, 2000. **68**(8): p. 4407-15.

85. Tavares, A., et al., *Insights into alpha-hemolysin (Hla) evolution and expression among Staphylococcus aureus clones with hospital and community origin.* PLoS One, 2014. **9**(7): p. e98634.
86. Inoshima, I., et al., *A Staphylococcus aureus pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice.* Nat Med, 2011. **17**(10): p. 1310-4.
87. Queck, S.Y., et al., *Mobile genetic element-encoded cytolysin connects virulence to methicillin resistance in MRSA.* PLoS Pathog, 2009. **5**(7): p. e1000533.
88. Wang, R., et al., *Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA.* Nat Med, 2007. **13**(12): p. 1510-4.
89. Joo, H.S., G.Y. Cheung, and M. Otto, *Antimicrobial activity of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus is caused by phenol-soluble modulin derivatives.* J Biol Chem, 2011. **286**(11): p. 8933-40.
90. Rice, K., et al., *Description of staphylococcus serine protease (ssp) operon in Staphylococcus aureus and nonpolar inactivation of sspA-encoded serine protease.* Infect Immun, 2001. **69**(1): p. 159-69.
91. McGavin, M.J., et al., *Modification of the Staphylococcus aureus fibronectin binding phenotype by V8 protease.* Infect Immun, 1997. **65**(7): p. 2621-8.
92. Ladhani, S., et al., *Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome.* Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(2): p. 224-42.
93. Reed, S.B., et al., *Molecular characterization of a novel Staphylococcus aureus serine protease operon.* Infect Immun, 2001. **69**(3): p. 1521-7.
94. Kuroda, M., et al., *Whole genome sequencing of meticillin-resistant Staphylococcus aureus.* Lancet, 2001. **357**(9264): p. 1225-40.
95. Dubin, G., et al., *Enzymatic activity of the Staphylococcus aureus SplB serine protease is induced by substrates containing the sequence Trp-Glu-Leu-Gln.* J Mol Biol, 2008. **379**(2): p. 343-56.
96. Stec-Niemczyk, J., et al., *Structural and functional characterization of SplA, an exclusively specific protease of Staphylococcus aureus.* Biochem J, 2009. **419**(3): p. 555-64.
97. Popowicz, G.M., et al., *Functional and structural characterization of Spl proteases from Staphylococcus aureus.* J Mol Biol, 2006. **358**(1): p. 270-9.

98. Zdzalik, M., et al., *Biochemical and structural characterization of SplD protease from Staphylococcus aureus.* PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76812.

99. Cassat, J.E. and E.P. Skaar, *Iron in infection and immunity.* Cell Host Microbe, 2013. **13**(5): p. 509-19.

100. Hammer, N.D. and E.P. Skaar, *Molecular mechanisms of Staphylococcus aureus iron acquisition.* Annu Rev Microbiol, 2011. **65**: p. 129-47.

101. DeDent, A., et al., *Exploring Staphylococcus aureus pathways to disease for vaccine development.* Semin Immunopathol, 2012. **34**(2): p. 317-33.

102. Grigg, J.C., et al., *Structural biology of heme binding in the Staphylococcus aureus Isd system.* J Inorg Biochem, 2010. **104**(3): p. 341-8.

103. Bullen, J.J., H.J. Rogers, and E. Griffiths, *Role of iron in bacterial infection.* Curr Top Microbiol Immunol, 1978. **80**: p. 1-35.

104. Rahav, G., et al., *Severe infections in thalassaemic patients: prevalence and predisposing factors.* Br J Haematol, 2006. **133**(6): p. 667-74.

105. Khan, F.A., M.A. Fisher, and R.A. Khakoo, *Association of hemochromatosis with infectious diseases: expanding spectrum.* Int J Infect Dis, 2007. **11**(6): p. 482-7.

106. Turlin, E., et al., *Staphylococcus aureus FepA and FepB proteins drive heme iron utilization in Escherichia coli.* PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56529.

107. Miethke, M., et al., *The Bacillus subtilis EfeUOB transporter is essential for high-affinity acquisition of ferrous and ferric iron.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(10): p. 2267-78.

108. Reginald, K., et al., *Immunoglobulin E antibody reactivity to bacterial antigens in atopic dermatitis patients.* Clin Exp Allergy, 2011. **41**(3): p. 357-69.

109. Bozek, A., et al., *Clinical features and immunological markers of atopic dermatitis in elderly patients.* Int Arch Allergy Immunol, 2012. **157**(4): p. 372-8.

110. Reginald, K., et al., *Staphylococcus aureus fibronectin-binding protein specifically binds IgE from patients with atopic dermatitis and requires antigen presentation for cellular immune responses.* J Allergy Clin Immunol, 2011. **128**(1): p. 82-91 e8.

111. Ong, P.Y. and D.Y. Leung, *The infectious aspects of atopic dermatitis.* Immunol Allergy Clin North Am, 2010. **30**(3): p. 309-21.

112. Kagami, S., et al., *Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis.* J Invest Dermatol, 2010. **130**(5): p. 1373-83.

113. Ni, C. and M.W. Chiu, *Psoriasis and comorbidities: links and risks.* Clin Cosmet Investig Dermatol, 2014. **7**: p. 119-32.
114. Fry, L. and B.S. Baker, *Triggering psoriasis: the role of infections and medications.* Clin Dermatol, 2007. **25**(6): p. 606-15.
115. Bell, S.C., K. De Boeck, and M.D. Amaral, *New pharmacological approaches for cystic fibrosis: Promises, progress, pitfalls.* Pharmacol Ther, 2014.
116. Hirschhausen, N., et al., *Extended Staphylococcus aureus persistence in cystic fibrosis is associated with bacterial adaptation.* Int J Med Microbiol, 2013. **303**(8): p. 685-92.
117. Kahl, B.C., *Impact of Staphylococcus aureus on the pathogenesis of chronic cystic fibrosis lung disease.* Int J Med Microbiol, 2010. **300**(8): p. 514-9.
118. Besier, S., et al., *Prevalence and clinical significance of Staphylococcus aureus small-colony variants in cystic fibrosis lung disease.* J Clin Microbiol, 2007. **45**(1): p. 168-72.
119. Valenza, G., et al., *Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis.* J Cyst Fibros, 2008. **7**(2): p. 123-7.
120. Kahl, B., et al., *Persistent infection with small colony variant strains of Staphylococcus aureus in patients with cystic fibrosis.* J Infect Dis, 1998. **177**(4): p. 1023-9.
121. Goerke, C., et al., *Molecular epidemiology of community-acquired Staphylococcus aureus in families with and without cystic fibrosis patients.* J Infect Dis, 2000. **181**(3): p. 984-9.
122. Boos, A.C., et al., *Atopic dermatitis, STAT3- and DOCK8-hyper-IgE syndromes differ in IgE-based sensitization pattern.* Allergy, 2014. **69**(7): p. 943-53.
123. Freeman, A.F. and S.M. Holland, *Clinical manifestations of hyper IgE syndromes.* Dis Markers, 2010. **29**(3-4): p. 123-30.
124. Sowerwine, K.J., S.M. Holland, and A.F. Freeman, *Hyper-IgE syndrome update.* Ann N Y Acad Sci, 2012. **1250**: p. 25-32.
125. Minegishi, Y. and M. Saito, *Molecular mechanisms of the immunological abnormalities in hyper-IgE syndrome.* Ann N Y Acad Sci, 2011. **1246**: p. 34-40.
126. Verbruggen, K., P. Van Cauwenberge, and C. Bachert, *Anti-IgE for the treatment of allergic rhinitis--and eventually nasal polyps?* Int Arch Allergy Immunol, 2009. **148**(2): p. 87-98.

127. Tantilipikorn, P., et al., *Staphylococcus aureus superantigens and their role in eosinophilic nasal polyp disease.* Asian Pac J Allergy Immunol, 2012. **30**(3): p. 171-6.
128. Gevaert, P., et al., *Organization of secondary lymphoid tissue and local IgE formation to Staphylococcus aureus enterotoxins in nasal polyp tissue.* Allergy, 2005. **60**(1): p. 71-9.
129. Bachert, C., et al., *Role of staphylococcal superantigens in upper airway disease.* Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2008. **8**(1): p. 34-8.
130. Gevaert, P., et al., *Omalizumab is effective in allergic and nonallergic patients with nasal polyps and asthma.* J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(1): p. 110-6 e1.
131. Stuck, B.A., et al., *[Rhinosinusitis guidelines--unabridged version: S2 guidelines from the German Society of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery]*. HNO, 2012. **60**(2): p. 141-62.
132. Bachert, C., et al., *IgE to Staphylococcus aureus enterotoxins in serum is related to severity of asthma.* J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(5): p. 1131-2.
133. Huvenne, W., P.W. Hellings, and C. Bachert, *Role of staphylococcal superantigens in airway disease.* Int Arch Allergy Immunol, 2013. **161**(4): p. 304-14.
134. Van Zele, T., et al., *Local immunoglobulin production in nasal polyposis is modulated by superantigens.* Clin Exp Allergy, 2007. **37**(12): p. 1840-7.
135. Patou, J., et al., *Staphylococcus aureus enterotoxin B, protein A, and lipoteichoic acid stimulations in nasal polyps.* J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(1): p. 110-5.
136. Levy, M.M., et al., *2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference.* Intensive Care Med, 2003. **29**(4): p. 530-8.
137. Hagel, S., et al., *[Bacteremia and sepsis]*. Internist (Berl), 2013. **54**(4): p. 399-407.
138. van Hal, S.J., et al., *Predictors of mortality in Staphylococcus aureus Bacteremia.* Clin Microbiol Rev, 2012. **25**(2): p. 362-86.
139. Wertheim, H.F., et al., *Risk and outcome of nosocomial Staphylococcus aureus bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers.* Lancet, 2004. **364**(9435): p. 703-5.
140. van der Kooi-Pol, M.M., et al., *High anti-staphylococcal antibody titers in patients with epidermolysis bullosa relate to long-term colonization with alternating types of Staphylococcus aureus.* J Invest Dermatol, 2013. **133**(3): p. 847-50.

141. Kolata, J., et al., *Distinctive patterns in the human antibody response to Staphylococcus aureus bacteremia in carriers and non-carriers.* Proteomics, 2011. **11**(19): p. 3914-27.
142. Holtfreter, S., et al., *Clonal distribution of superantigen genes in clinical Staphylococcus aureus isolates.* J Clin Microbiol, 2007. **45**(8): p. 2669-80.
143. Silbersack, J., et al., *An acetoin-regulated expression system of Bacillus subtilis.* Appl Microbiol Biotechnol, 2006. **73**(4): p. 895-903.
144. Stentzel, S., et al., *Altered immune proteome of Staphylococcus aureus under iron-restricted growth conditions.* Proteomics, 2014. **14**(16): p. 1857-67.
145. Eymann, C., et al., *A comprehensive proteome map of growing Bacillus subtilis cells.* Proteomics, 2004. **4**(10): p. 2849-76.
146. Karanam, N.K., et al., *Proteome analysis reveals new mechanisms of Bcl11b-loss driven apoptosis.* J Proteome Res, 2010. **9**(8): p. 3799-811.
147. *PROTECS, Altered immune proteome of Staphylococcus aureus under iron-restricted growth conditions*. http://microbio1.biologie.uni-greifswald.de/csp/bio/login.csp?JumpURL=showcollection.csp?OBJID=54.
148. Silva, J.C., et al., *Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition.* Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(1): p. 144-56.
149. *R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical Computing, Vienna, Austria*. 2013.
150. Bjerrum, O.J., and Heegaard, Niels HH, *Western Blotting: Immunoblotting.* eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2009.
151. Gassmann, M., et al., *Quantifying Western blots: pitfalls of densitometry.* Electrophoresis, 2009. **30**(11): p. 1845-55.
152. ProteinSimple. *Simple Western™ Assays*. 23.09.2014; Available from: http://www.proteinsimple.com/simple_western_assays.html.
153. Nguyen, U., et al., *The Simple Western: a gel-free, blot-free, hands-free Western blotting reinvention.* Nature Methods, 2011. **8**(11): p. v-vi.
154. Cassat, J.E. and E.P. Skaar, *Metal ion acquisition in Staphylococcus aureus: overcoming nutritional immunity.* Semin Immunopathol, 2012. **34**(2): p. 215-35.

155. Stentzel, S., *Charakterisierung der individuellen Immunantwort auf Staphylococcus aureus durch immune proteomics von Ig-Subklassen*, in *Institut für Immunologie*. 24. Juni 2011, Universität Greifswald: Greifswald.

156. Holtfreter, S., J. Kolata, and B.M. Broker, *Towards the immune proteome of Staphylococcus aureus - The anti-S. aureus antibody response.* Int J Med Microbiol, 2010. **300**(2-3): p. 176-92.

157. Petersen, T.N., et al., *SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions.* Nat Methods, 2011. **8**(10): p. 785-6.

158. Schulz, S., *Bakteriämie durch Staphylococcus aureus - molekulare Charakterisierung der bakteriellen Isolate und Korrelation mit dem klinischen Verlauf*, in *Institut für Immunologie*. Februar 2012, Universität Greifswald: Greifswald.

159. AureoWiki. *http://www.protecs.uni-greifswald.de/aureowiki/Main_Page*. November, 2014.

160. Dreskin, S.C., P.K. Goldsmith, and J.I. Gallin, *Immunoglobulins in the hyperimmunoglobulin E and recurrent infection (Job's) syndrome. Deficiency of anti-Staphylococcus aureus immunoglobulin A.* J Clin Invest, 1985. **75**(1): p. 26-34.

161. DeWitt, C.A., et al., *Hyperimmunoglobulin E syndrome: two cases and a review of the literature.* J Am Acad Dermatol, 2006. **54**(5): p. 855-65.

162. Farmand, S. and M. Sundin, *Hyper-IgE syndromes: recent advances in pathogenesis, diagnostics and clinical care.* Curr Opin Hematol, 2015. **22**(1): p. 12-22.

163. Kimata, H., *High-dose intravenous gamma-globulin treatment for hyperimmunoglobulinemia E syndrome.* J Allergy Clin Immunol, 1995. **95**(3): p. 771-4.

164. Yong, P.F., et al., *An update on the hyper-IgE syndromes.* Arthritis Res Ther, 2012. **14**(6): p. 228.

165. Kolata, J., et al., *The fall of a dogma? Unexpected high T cell memory response to S. aureus in humans.* J Infect Dis, 2015.

166. Rustandi, R.R., et al., *Qualitative and quantitative evaluation of Simon, a new CE-based automated Western blot system as applied to vaccine development.* Electrophoresis, 2012. **33**(17): p. 2790-7.

167. O'Neill, R.A., et al., *Isoelectric focusing technology quantifies protein signaling in 25 cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(44): p. 16153-8.

168. ProteinSimple. *Simple Western Systems Comparison Chart*. 09.12.2014 09.12.2014]; Available from: http://www.proteinsimple.com/simple_western_comparison.html.

169. Neilands, J.B., *Microbial envelope proteins related to iron.* Annu Rev Microbiol, 1982. **36**: p. 285-309.

170. Diep, B.A., et al., *Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired meticillin-resistant Staphylococcus aureus.* Lancet, 2006. **367**(9512): p. 731-9.

171. Mishra, R.P., et al., *Staphylococcus aureus FhuD2 is involved in the early phase of staphylococcal dissemination and generates protective immunity in mice.* J Infect Dis, 2012. **206**(7): p. 1041-9.

172. den Reijer, P.M., et al., *Characterization of the humoral immune response during Staphylococcus aureus bacteremia and global gene expression by Staphylococcus aureus in human blood.* PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53391.

173. Oogai, Y., et al., *Expression of virulence factors by Staphylococcus aureus grown in serum.* Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(22): p. 8097-105.

174. Malachowa, N., et al., *Global changes in Staphylococcus aureus gene expression in human blood.* PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18617.

175. Hempel, K., et al., *Quantitative proteomic view on secreted, cell surface-associated, and cytoplasmic proteins of the methicillin-resistant human pathogen Staphylococcus aureus under iron-limited conditions.* J Proteome Res, 2011. **10**(4): p. 1657-66.

176. Spirig, T., et al., *Staphylococcus aureus uses a novel multidomain receptor to break apart human hemoglobin and steal its heme.* J Biol Chem, 2013. **288**(2): p. 1065-78.

177. Beasley, F.C., et al., *Staphylococcus aureus transporters Hts, Sir, and Sst capture iron liberated from human transferrin by Staphyloferrin A, Staphyloferrin B, and catecholamine stress hormones, respectively, and contribute to virulence.* Infect Immun, 2011. **79**(6): p. 2345-55.

178. Mariotti, P., et al., *Structural and functional characterization of the Staphylococcus aureus virulence factor and vaccine candidate FhuD2.* Biochem J, 2013. **449**(3): p. 683-93.

179. Zorman, J.K., et al., *Naturally occurring IgG antibody levels to the Staphylococcus aureus protein IsdB in humans.* Hum Vaccin Immunother, 2013. **9**(9): p. 1857-64.

180. Kuklin, N.A., et al., *A novel Staphylococcus aureus vaccine: iron surface determinant B induces rapid antibody responses in rhesus macaques and specific increased survival in a murine S. aureus sepsis model.* Infect Immun, 2006. **74**(4): p. 2215-23.

181. Kim, H.K., et al., *IsdA and IsdB antibodies protect mice against Staphylococcus aureus abscess formation and lethal challenge.* Vaccine, 2010. **28**(38): p. 6382-92.

182. Pishchany, G., et al., *IsdB-dependent hemoglobin binding is required for acquisition of heme by Staphylococcus aureus.* J Infect Dis, 2014. **209**(11): p. 1764-72.

183. Beasley, F.C., et al., *Characterization of staphyloferrin A biosynthetic and transport mutants in Staphylococcus aureus.* Mol Microbiol, 2009. **72**(4): p. 947-63.

184. Date, S.V., et al., *Global gene expression of methicillin-resistant Staphylococcus aureus USA300 during human and mouse infection.* J Infect Dis, 2014. **209**(10): p. 1542-50.

185. Holtfreter, S., et al., *egc-Encoded superantigens from Staphylococcus aureus are neutralized by human sera much less efficiently than are classical staphylococcal enterotoxins or toxic shock syndrome toxin.* Infect Immun, 2004. **72**(7): p. 4061-71.

186. Anderson, A.S., et al., *Development of a multicomponent Staphylococcus aureus vaccine designed to counter multiple bacterial virulence factors.* Hum Vaccin Immunother, 2012. **8**(11): p. 1585-94.

187. Cosgrove, S.E., et al., *The impact of methicillin resistance in Staphylococcus aureus bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges.* Infect Control Hosp Epidemiol, 2005. **26**(2): p. 166-74.

188. Yaw, L.K., J.O. Robinson, and K.M. Ho, *A comparison of long-term outcomes after meticillin-resistant and meticillin-sensitive Staphylococcus aureus bacteraemia: an observational cohort study.* Lancet Infect Dis, 2014. **14**(10): p. 967-75.

189. Kaasch, A.J., et al., *Staphylococcus aureus bloodstream infection: a pooled analysis of five prospective, observational studies.* J Infect, 2014. **68**(3): p. 242-51.

190. Verkaik, N.J., et al., *Anti-staphylococcal humoral immune response in persistent nasal carriers and noncarriers of Staphylococcus aureus.* J Infect Dis, 2009. **199**(5): p. 625-32.

191. Verkaik, N.J., et al., *Induction of antibodies by Staphylococcus aureus nasal colonization in young children.* Clin Microbiol Infect, 2010. **16**(8): p. 1312-7.

192. Bubeck Wardenburg, J. and O. Schneewind, *Vaccine protection against Staphylococcus aureus pneumonia.* J Exp Med, 2008. **205**(2): p. 287-94.
193. Aman, M.J. and R.P. Adhikari, *Staphylococcal bicomponent pore-forming toxins: targets for prophylaxis and immunotherapy.* Toxins (Basel), 2014. **6**(3): p. 950-72.
194. van den Berg, S., et al., *A human monoclonal antibody targeting the conserved staphylococcal antigen IsaA protects mice against Staphylococcus aureus bacteremia.* Int J Med Microbiol, 2014.
195. Spaulding, A.R., et al., *Vaccination against Staphylococcus aureus pneumonia.* J Infect Dis, 2014. **209**(12): p. 1955-62.
196. Spaulding, A.R., et al., *Immunity to Staphylococcus aureus secreted proteins protects rabbits from serious illnesses.* Vaccine, 2012. **30**(34): p. 5099-109.
197. Laventie, B.J., et al., *Heavy chain-only antibodies and tetravalent bispecific antibody neutralizing Staphylococcus aureus leukotoxins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(39): p. 16404-9.
198. Shannon, O., A. Uekotter, and J.I. Flock, *The neutralizing effects of hyperimmune antibodies against extracellular fibrinogen-binding protein, Efb, from Staphylococcus aureus.* Scand J Immunol, 2006. **63**(3): p. 184-90.
199. Schennings, T., et al., *Protective immunization against Staphylococcus aureus infection in a novel experimental wound model in mice.* APMIS, 2012. **120**(10): p. 786-93.
200. Adhikari, R.P., et al., *Lower antibody levels to Staphylococcus aureus exotoxins are associated with sepsis in hospitalized adults with invasive S. aureus infections.* J Infect Dis, 2012. **206**(6): p. 915-23.
201. Karauzum, H., et al., *Structurally designed attenuated subunit vaccines for S. aureus LukS-PV and LukF-PV confer protection in a mouse bacteremia model.* PLoS One, 2013. **8**(6): p. e65384.
202. Brown, E.L., et al., *The Panton-Valentine leukocidin vaccine protects mice against lung and skin infections caused by Staphylococcus aureus USA300.* Clin Microbiol Infect, 2009. **15**(2): p. 156-64.
203. Zaidi, T., et al., *Staphylococcus aureus corneal infections: effect of the Panton-Valentine leukocidin (PVL) and antibody to PVL on virulence and pathology.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. **54**(7): p. 4430-8.

204. Stich, N., et al., *Toxic shock syndrome toxin-1-mediated toxicity inhibited by neutralizing antibodies late in the course of continual in vivo and in vitro exposure.* Toxins (Basel), 2014. **6**(6): p. 1724-41.

205. Cheng, A.G., et al., *Contribution of coagulases towards Staphylococcus aureus disease and protective immunity.* PLoS Pathog, 2010. **6**(8): p. e1001036.

206. McAdow, M., et al., *Coagulases as determinants of protective immune responses against Staphylococcus aureus.* Infect Immun, 2012. **80**(10): p. 3389-98.

207. Wang, X., et al., *A comparative study of antibodies against proteins extracted from staphylococcal biofilm for the diagnosis of orthopedic prosthesis-related infections in an animal model and in humans.* Diagn Microbiol Infect Dis, 2013. **75**(2): p. 124-9.

208. Jacobsson, G., et al., *Antibody responses in patients with invasive Staphylococcus aureus infections.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010. **29**(6): p. 715-25.

209. Farag, N., et al., *Assessment of the efficacy of polyclonal intravenous immunoglobulin G (IVIG) against the infectivity of clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in vitro and in vivo.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2013. **32**(9): p. 1149-60.

210. White, M.J., et al., *Phosphatidylinositol-specific phospholipase C contributes to survival of Staphylococcus aureus USA300 in human blood and neutrophils.* Infect Immun, 2014. **82**(4): p. 1559-71.

211. Smagur, J., et al., *A new pathway of staphylococcal pathogenesis: apoptosis-like death induced by Staphopain B in human neutrophils and monocytes.* J Innate Immun, 2009. **1**(2): p. 98-108.

212. Ohbayashi, T., et al., *Degradation of fibrinogen and collagen by staphopains, cysteine proteases released from Staphylococcus aureus.* Microbiology, 2011. **157**(Pt 3): p. 786-92.

213. Grumann, D., et al., *Characterization of infecting strains and superantigen-neutralizing antibodies in Staphylococcus aureus bacteremia.* Clin Vaccine Immunol, 2011. **18**(3): p. 487-93.

214. Grumann, D., et al., *Immune cell activation by enterotoxin gene cluster (egc)-encoded and non-egc superantigens from Staphylococcus aureus.* J Immunol, 2008. **181**(7): p. 5054-61.

215. Spellberg, B., et al., *The antifungal vaccine derived from the recombinant N terminus of Als3p protects mice against the bacterium Staphylococcus aureus.* Infect Immun, 2008. **76**(10): p. 4574-80.

216. Renner, E.D., et al., *Novel signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations, reduced T(H)17 cell numbers, and variably defective STAT3 phosphorylation in hyper-IgE syndrome.* J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(1): p. 181-7.

217. Minegishi, Y. and M. Saito, *Cutaneous manifestations of Hyper IgE syndrome.* Allergol Int, 2012. **61**(2): p. 191-6.

218. Meyer-Bahlburg, A., et al., *Heterozygous signal transducer and activator of transcription 3 mutations in hyper-IgE syndrome result in altered B-cell maturation.* J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(2): p. 559-62, 562 e1-2.

219. Darenberg, J., et al., *Intravenous immunoglobulin G therapy in streptococcal toxic shock syndrome: a European randomized, double-blind, placebo-controlled trial.* Clin Infect Dis, 2003. **37**(3): p. 333-40.

220. Salgado-Pabon, W. and P.M. Schlievert, *Models matter: the search for an effective Staphylococcus aureus vaccine.* Nat Rev Microbiol, 2014. **12**(8): p. 585-91.

221. Jansen, K.U., et al., *Vaccine review: "Staphyloccocus aureus vaccines: problems and prospects".* Vaccine, 2013. **31**(25): p. 2723-30.

222. Fritz, S.A., et al., *A serologic correlate of protective immunity against community-onset Staphylococcus aureus infection.* Clin Infect Dis, 2013. **56**(11): p. 1554-61.

223. Rasigade, J.P., et al., *A history of Panton-Valentine leukocidin (PVL)-associated infection protects against death in PVL-associated pneumonia.* Vaccine, 2011. **29**(25): p. 4185-6.

224. Pishchany, G., et al., *Specificity for human hemoglobin enhances Staphylococcus aureus infection.* Cell Host Microbe, 2010. **8**(6): p. 544-50.

225. Rooijakkers, S.H., K.P. van Kessel, and J.A. van Strijp, *Staphylococcal innate immune evasion.* Trends Microbiol, 2005. **13**(12): p. 596-601.

226. Bagnoli, F., S. Bertholet, and G. Grandi, *Inferring reasons for the failure of Staphylococcus aureus vaccines in clinical trials.* Front Cell Infect Microbiol, 2012. **2**: p. 16.

227. Loffler, B., et al., *Staphylococcus aureus panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils.* PLoS Pathog, 2010. **6**(1): p. e1000715.

228. Peton, V. and Y. Le Loir, *Staphylococcus aureus in veterinary medicine.* Infect Genet Evol, 2014. **21**: p. 602-15.

229. Stranger-Jones, Y.K., T. Bae, and O. Schneewind, *Vaccine assembly from surface proteins of Staphylococcus aureus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(45): p. 16942-7.

230. Zuo, Q.F., et al., *Evaluation of the protective immunity of a novel subunit fusion vaccine in a murine model of systemic MRSA infection.* PLoS One, 2013. **8**(12): p. e81212.

231. Gadermaier, E., et al., *The human IgE repertoire.* Int Arch Allergy Immunol, 2014. **163**(2): p. 77-91.

232. Zdzalik, M., et al., *Prevalence of genes encoding extracellular proteases in Staphylococcus aureus - important targets triggering immune response in vivo.* FEMS Immunol Med Microbiol, 2012. **66**(2): p. 220-9.

233. Leung, D.Y., et al., *Presence of IgE antibodies to staphylococcal exotoxins on the skin of patients with atopic dermatitis. Evidence for a new group of allergens.* J Clin Invest, 1993. **92**(3): p. 1374-80.

234. Swierstra, J., et al., *IgG4 subclass-specific responses to Staphylococcus aureus antigens shed new light on host-pathogen interaction.* Infect Immun, 2014.

235. Geginat, J., et al., *Plasticity of human CD4 T cell subsets.* Front Immunol, 2014. **5**: p. 630.

236. Annunziato, F., C. Romagnani, and S. Romagnani, *The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity.* J Allergy Clin Immunol, 2014.

237. Robinson, D.S., *Regulatory T cells and asthma.* Clin Exp Allergy, 2009. **39**(9): p. 1314-23.

238. Almonte, A.G. and J.D. Sweatt, *Serine proteases, serine protease inhibitors, and protease-activated receptors: roles in synaptic function and behavior.* Brain Res, 2011. **1407**: p. 107-22.

239. Day, S.B., et al., *German cockroach proteases and protease-activated receptor-2 regulate chemokine production and dendritic cell recruitment.* J Innate Immun, 2012. **4**(1): p. 100-10.

240. Jacquet, A., *The role of innate immunity activation in house dust mite allergy.* Trends Mol Med, 2011. **17**(10): p. 604-11.

241. Takai, T. and S. Ikeda, *Barrier dysfunction caused by environmental proteases in the pathogenesis of allergic diseases.* Allergol Int, 2011. **60**(1): p. 25-35.

242. Zhang, N., et al., *Mucosal tissue polyclonal IgE is functional in response to allergen and SEB.* Allergy, 2011. **66**(1): p. 141-8.

243. Bachert, C., et al., *Specific IgE against Staphylococcus aureus enterotoxins: an independent risk factor for asthma.* J Allergy Clin Immunol, 2012. **130**(2): p. 376-81 e8.

244. Van Zele, T., et al., *Staphylococcus aureus colonization and IgE antibody formation to enterotoxins is increased in nasal polyposis.* J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(4): p. 981-3.

245. Marone, G., et al., *Role of superallergens in allergic disorders.* Chem Immunol Allergy, 2007. **93**: p. 195-213.

246. Nakamura, Y., et al., *Staphylococcus delta-toxin induces allergic skin disease by activating mast cells.* Nature, 2013. **503**(7476): p. 397-401.

8 Anhang

8.1 Anhang Abbildungen

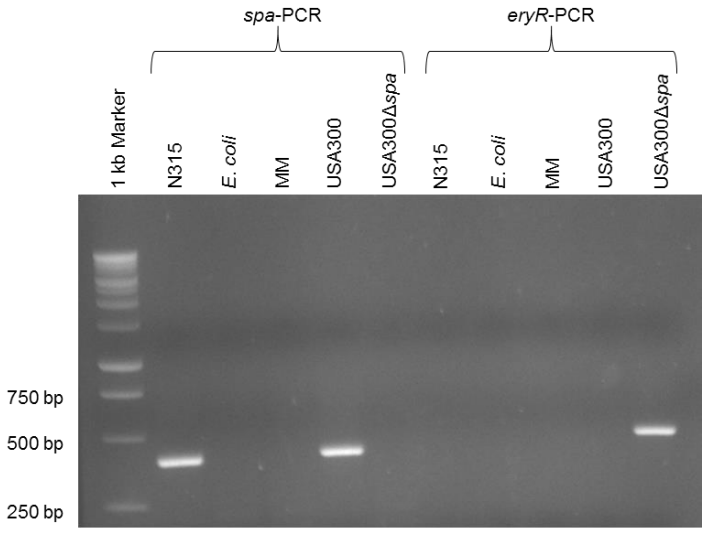


Abb. 8.1: Austausch des Spa-Gens mit dem EryR-Gen im *S. aureus*-Stamm USA300 durch Transduktion. Nach erfolgter Transduktion wurde mittels PCR das Spa-Gen bzw. das EryR-Gen amplifiziert und die Produkte in einem 1,5%-igem Agarosegel aufgetrennt. Der Stamm USA300 besaß eine *spa*-Bande, aber keine *eryR*-Bande. Demgegenüber besaß der transduzierte USA300Δ*spa*-Stamm keine *spa*-Bande, aber eine *eryR*-Bande. Demnach wurde hier das Spa-Gen durch homologe Rekombination mit dem EryR-Gen erfolgreich ausgetauscht. Kontrollen: Mastermixkontrolle (MM), *S. aureus* N315 (spa^+, $eryR^-$), *E. coli* BL21 (spa^-, $eryR^-$).

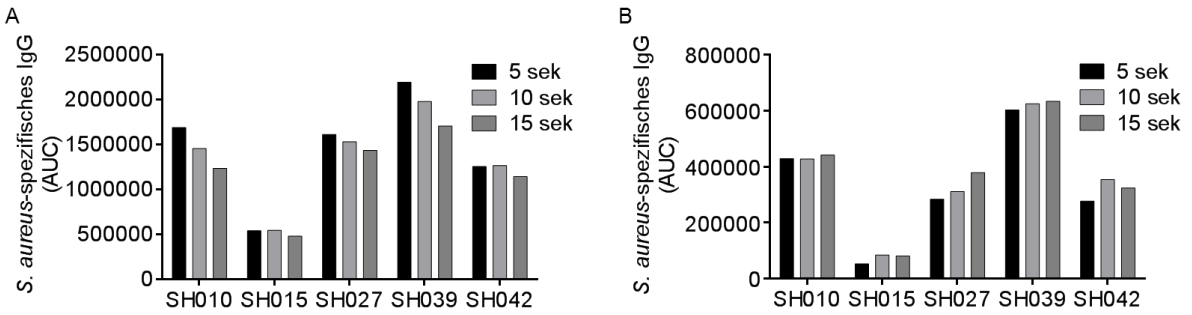


Abb. 8.2: Etablierung des Simple Western Assays. Extrazelluläre Proteine aus dem Kulturüberstand von *S. aureus* USA300Δ*spa* (stationäre Wachstumsphase, 600 µM 2,2′-Bipyridyl) wurden in Glaskapillaren nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt und mit humanen Seren (1:500) inkubiert. Die IgG-Bindung an die *S. aureus*-Proteine wurde mittels Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (Ziege anti-human IgG (Fc-spezifisch), Dianova) detektiert. Dieser wurde für die Etablierung in zwei Konzentrationen eingesetzt (0,8 µg/mL A; 0,16 µg/mL B). Die Konzentration von 0,16 µg/mL diskriminierte dabei die Antikörperbindung der Seren an die *S. aureus*-Proteine am besten. Hierbei wurde mit 10 s ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis ohne „Ausbrenneffekte“ erreicht.

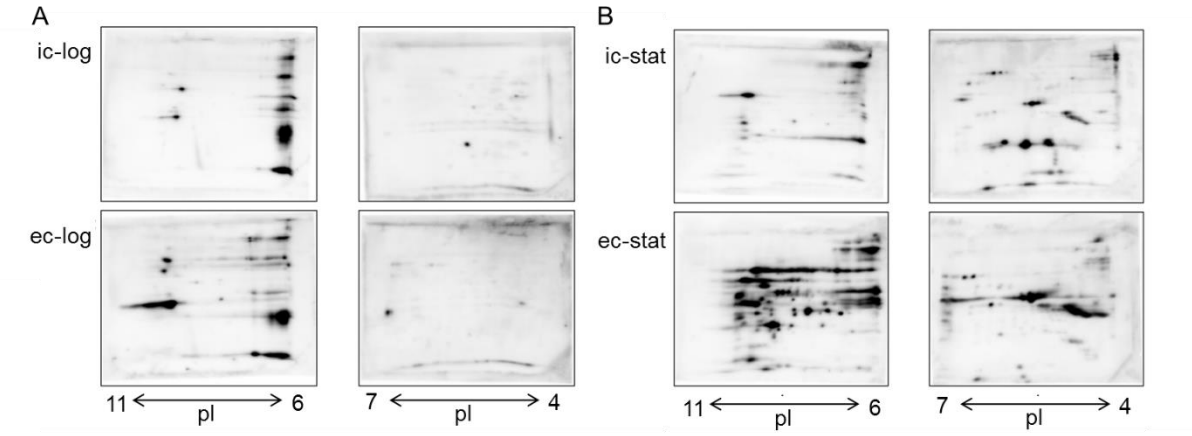


Abb. 8.3: Antikörperbindungsmuster an verschiedene *S. aureus*-Proteome, adaptiert nach [155]. Die extrazellulären Proteine aus dem Kulturüberstand und die intrazellulären Proteine von *S. aureus* 8325Δ*spa* wurden in 2D-Gelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen. Ein Serumpool (20 humane Seren, 1:10 000) diente als Primärantikörper für die Entwicklung der 2D-Western Blots. Antikörperbindung an die *S. aureus*-Proteine wurde mittels Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper detektiert (Ziege anti-human IgG (H+L), Dianova, 8 ng/mL). Die meisten Antikörperbindungen wurden an extrazelluläre *S. aureus*-Proteine aus der stationären Wachstumsphase detektiert.

Abkürzungen: ec, extrazellulär; log, logarithmische Wachstumsphase; ic, intrazellulär; stat, stationäre Wachstumsphase.

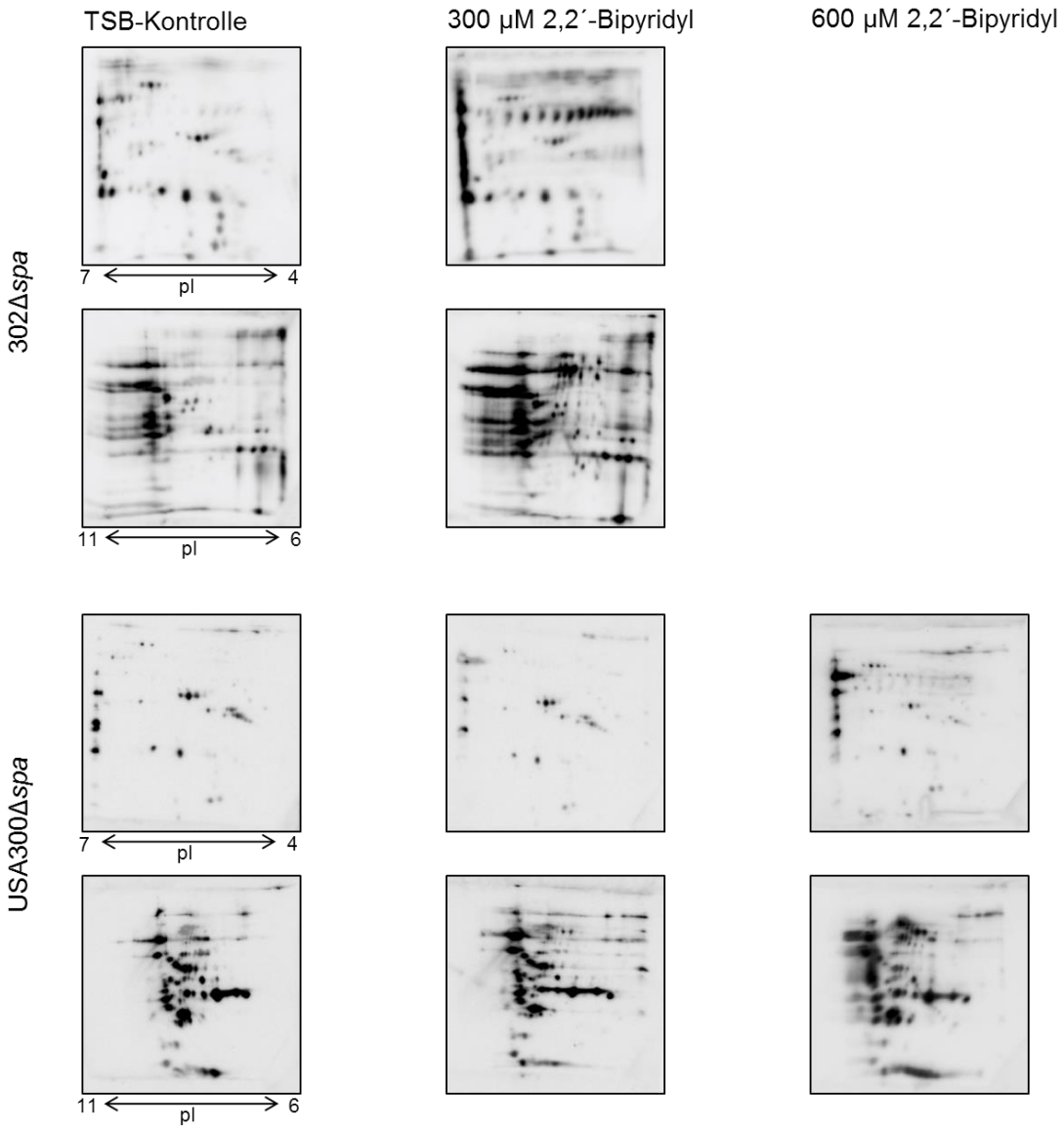


Abb. 8.4: *S. aureus*-Stamm-abhängiger Einfluss verschiedener 2,2′-Bipyridyl-Konzentrationen auf die Antikörperbindungsmuster in 2D-Western Blots. Die extrazellulären Proteine aus dem Kulturüberstand von 302Δ*spa* und USA300Δ*spa* (stationäre Wachstumsphase), kultiviert bei eisenlimitierenden Wachstumsbedingungen (300 µM bzw. 600 µM 2,2′-Bipyridyl) und mit Zugang zu Eisen (TSB-Kontrolle), wurden in 2D-Gelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen. Ein Serumpool (20 humane Seren, 1:10 000) diente als Primärantikörper für die Entwicklung der 2D-Western Blots. Antikörperbindung an die *S. aureus*-Proteine wurde mittels Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper detektiert (Ziege anti-human IgG (H+L), Dianova, 4 ng/mL). Während bei 302Δ*spa* bereits ab einer 2,2′-Bipyridyl-Konzentration von 300 µM neue Antikörperbindungen detektiert wurden, war dies bei USA300Δ*spa* erst mit 600 µM 2,2′-Bipyridyl möglich.

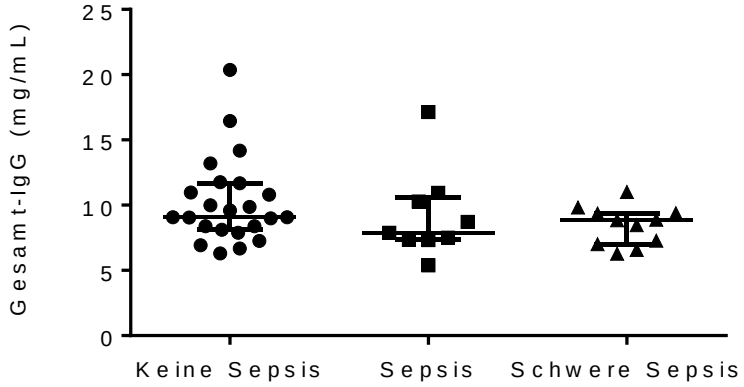


Abb. 8.5: Korrelation des Krankheitsverlaufs mit den Gesamt-IgG-Mengen im Serum der Patienten. Dargestellt sind die Daten der Patienten aus den Simple Western Assays und der Flexmap3D Analysen. Die Menge an Serum-IgG war, unabhängig vom Verlauf der Erkrankung, in allen Patienten gleich verteilt. Die Daten wurden von Professor Dr. Mary-Claire Roghmann (University of Maryland, USA) zur Verfügung gestellt.
Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Serums. Gezeigt werden Mediane und Interquartilsabstände.

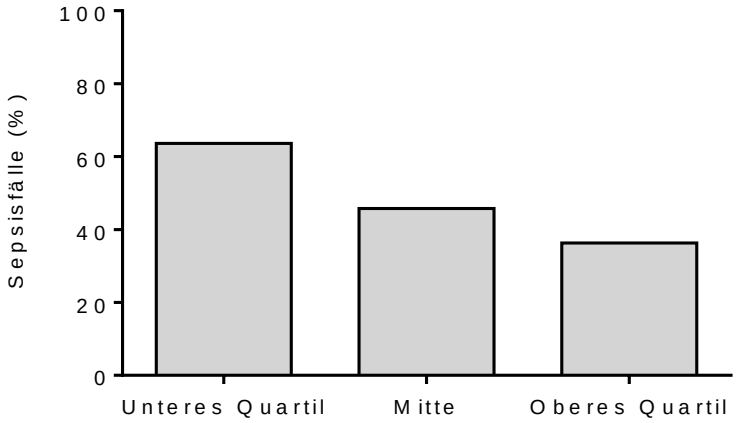


Abb. 8.6: Korrelation des Krankheitsverlaufs mit den spezifischen IgG-Mengen gegen die *S. aureus*-Zelloberfläche. Die IgG-Bindung aus 46 Patientenseren (ab 1:2 500, seriell 1:5 verdünnt) an USA300Δ*spa*-Zellen (stationäre Wachstumsphase, 600 µM 2,2′-Bipyridyl) wurde mittels ELISA quantifiziert (Sekundärantikörper Ziege anti-human IgG (Fc-spezifisch), Dianova, 26,7 ng/mL). Die Einteilung der Patienten in Quartile nach ihren spezifischen IgG-Mengen zeigte, dass 63 % aus dem unteren Quartil und 36 % aus dem oberen Quartil eine Sepsis entwickelten.

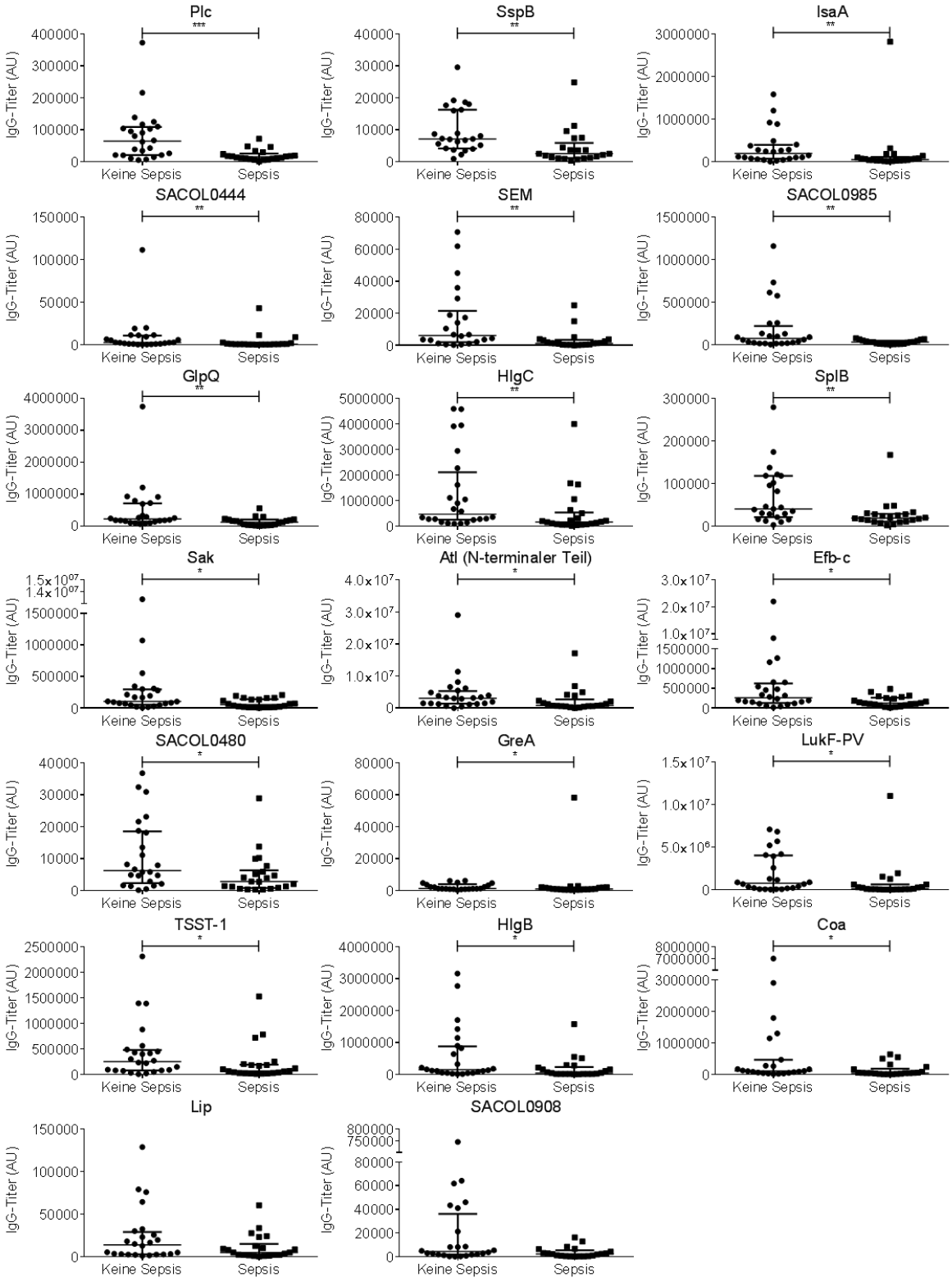


Abb. 8.7: IgG-Bindung an die 20 rekombinanten *S. aureus*-Proteine, die im Flexmap3D Assay die Patienten am besten nach ihrem *S. aureus*-Bakteriämieverlauf stratifizieren konnten. Spezifisches IgG als Titer (AU) angegeben (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; Mann-Whitney Test). Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Serums. Gezeigt werden Mediane und Interquartilsabstände. Abkürzungen: AU, *arbitrary units*.

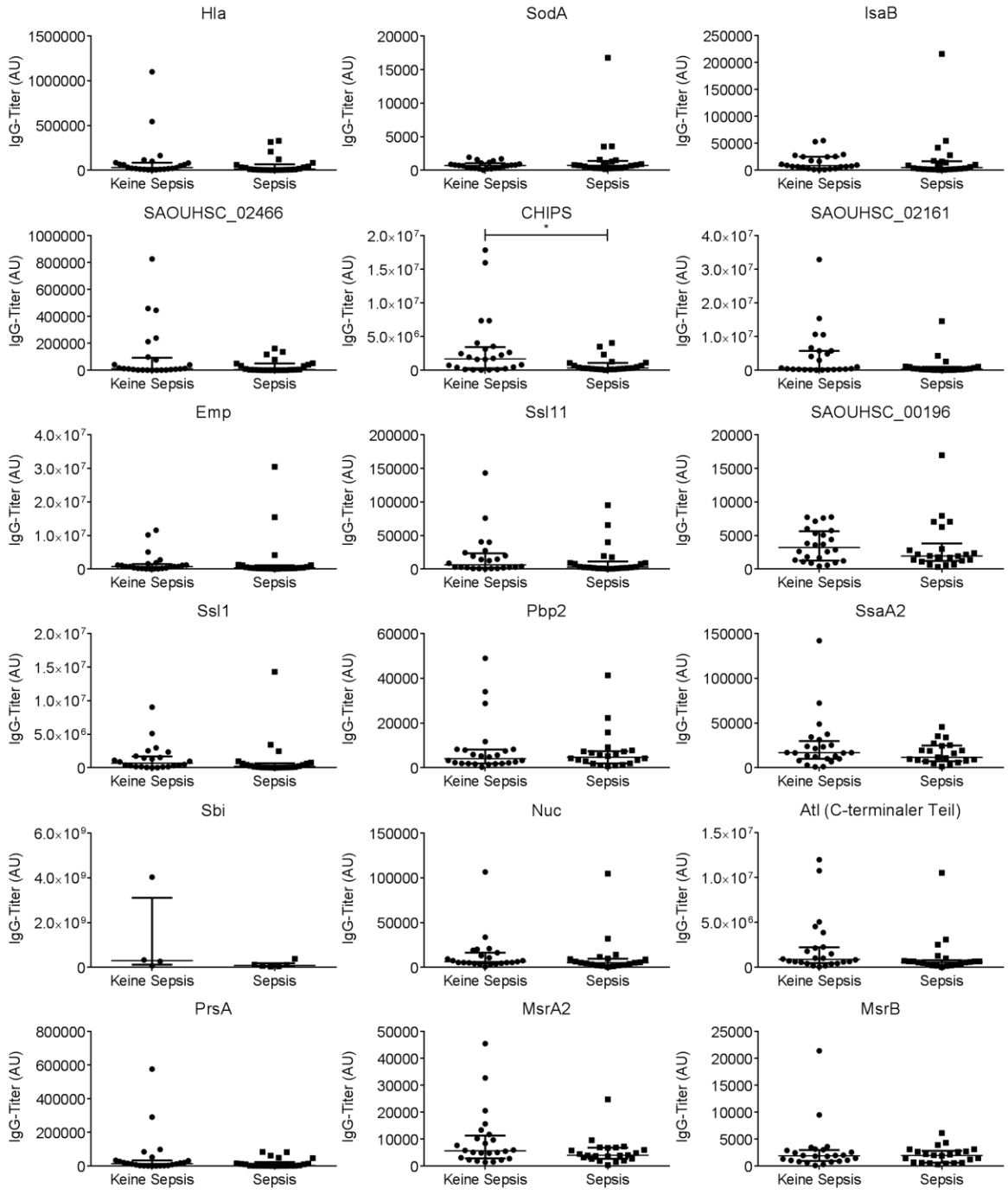
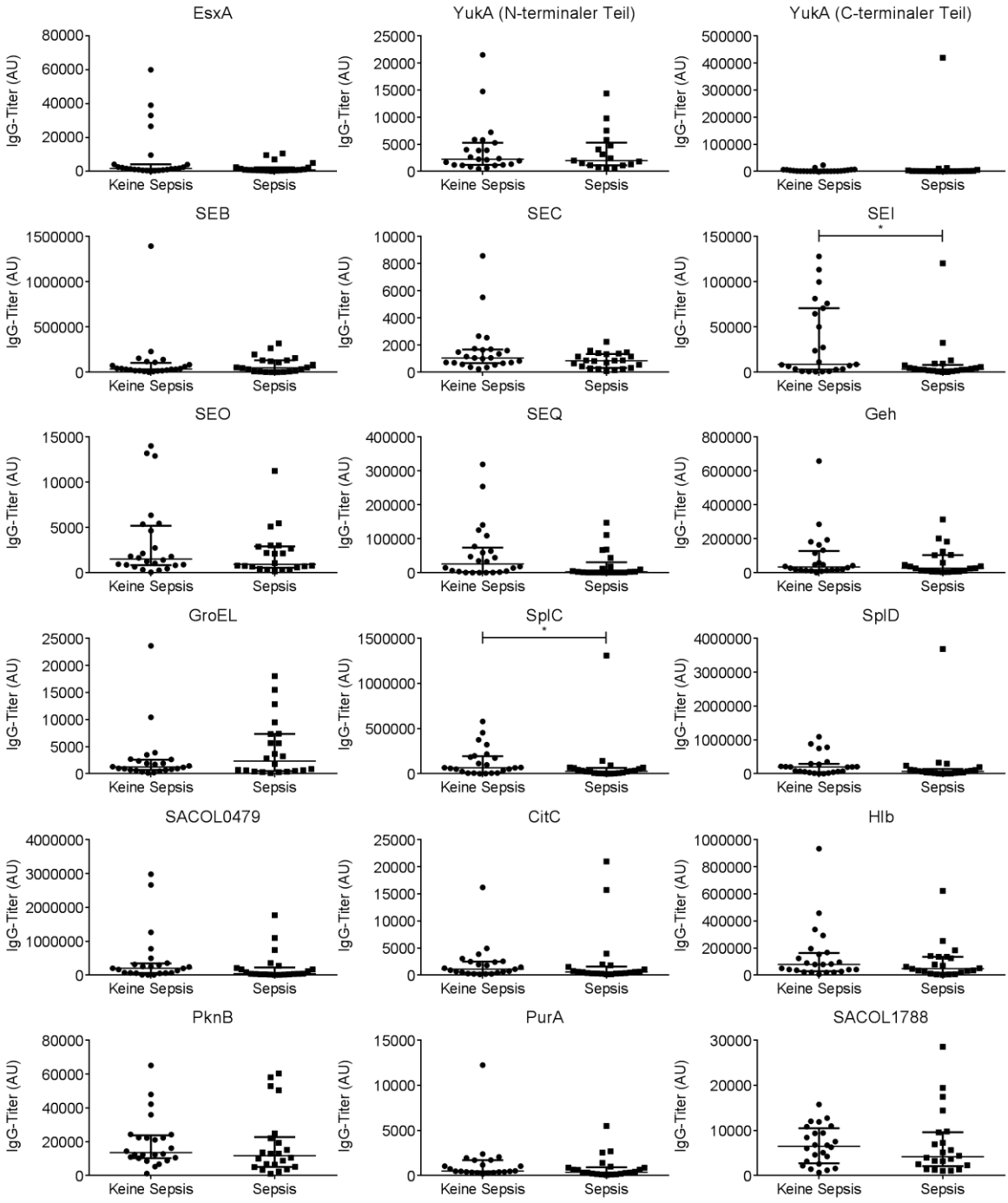
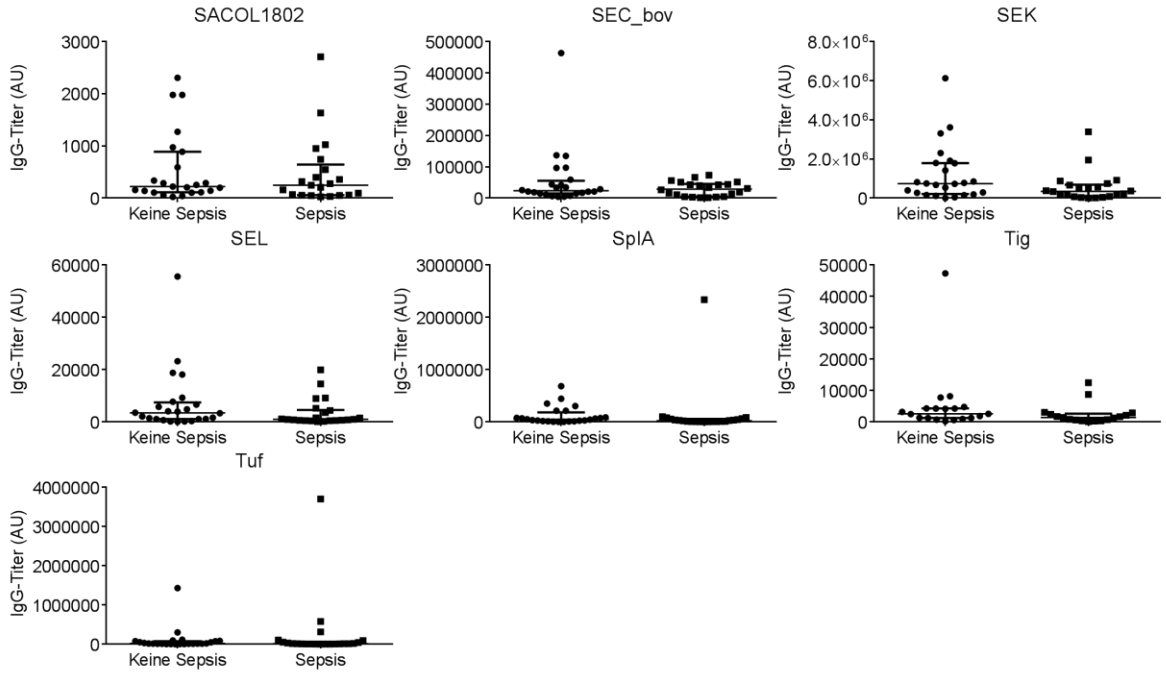


Abb. 8.8: Fortsetzung der Abbildung auf den nächsten Seiten.



Fortsetzung Abb. 8.8



Fortsetzung Abb. 8.8: IgG-Bindung an die rekombinanten *S. aureus*-Proteine, die im Flexmap3D Assay (*S. aureus*-Bakteriämiepatienten) eingesetzt wurden. Spezifisches IgG als Titer (AU) angegeben (*, $p < 0,05$; Mann-Whitney Test).
Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Serums. Gezeigt werden Mediane und Interquartilsabstände.
Abkürzungen: AU, *arbitrary units*.

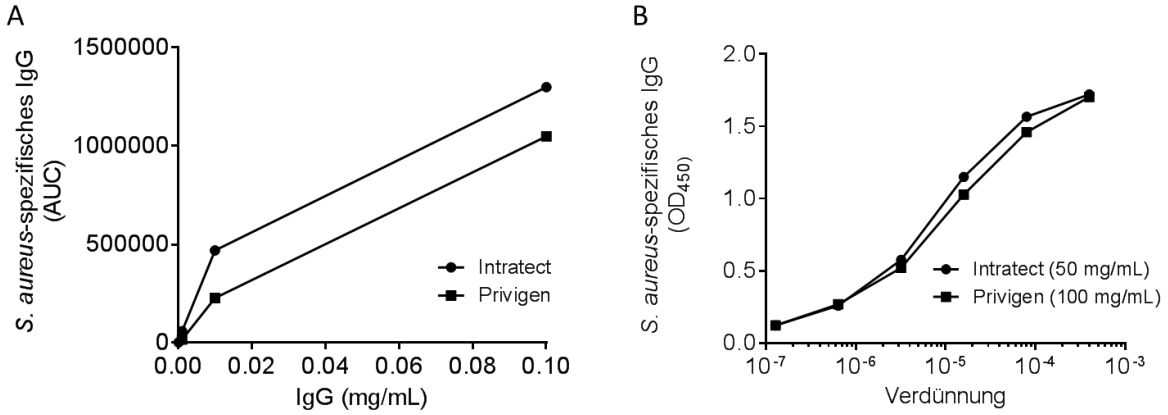


Abb. 8.9: *S. aureus*-spezifisches IgG in IVIG-Präparaten. Die IgG-Bindung aus zwei IVIG-Präparaten an extrazelluläre Proteine aus dem Kulturüberstand von USA300Δ*spa* (A) und *S. aureus*-Zellen (B) (stationäre Wachstumsphase, 600 µM 2,2′-Bipyridyl) wurde mittels Simple Western Assay, bzw. ELISA quantifiziert (Sekundärantikörper Ziege anti-human IgG (Fc-spezifisch), Dianova, 0,16 µg/mL, bzw. 26,7 ng/mL). In beiden IVIG-Präparaten war *S. aureus*-spezifisches IgG nachweisbar. Die Präparate mussten für die Messung entsprechend verdünnt werden, um „Ausbrenneffekte“ im Simple Western Assay zu vermeiden (vgl. 4.1.1).
Abkürzungen: AUC, Fläche unter der Kurve.

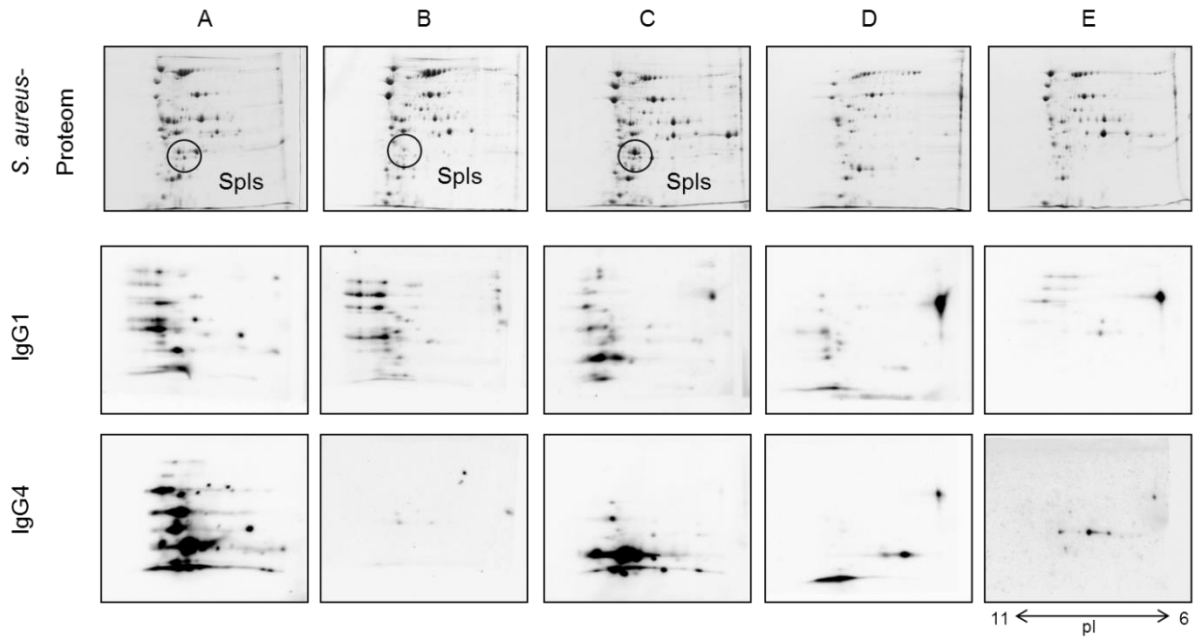


Abb. 8.10: *S. aureus*-spezifisches IgG1 und IgG4 in Seren gesunder *S. aureus*-Träger, adaptiert nach [155].
Die extrazellulären Proteine aus dem Kulturüberstand der *S. aureus*-Stämme (stationäre Wachstumsphase), wurden in 2D-Gelen aufgetrennt (*S. aureus*-Proteom) und auf PVDF-Membranen übertragen. Die Seren (1:10 000) der *S. aureus*-Träger (A bis E) dienten als Primärantikörper auf den 2D-Western Blots. IgG1- bzw. IgG4-Bindung an die *S. aureus*-Proteine wurde mittels Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörpern nachgewiesen (0,1 µg/mL). Während die IgG1-Bindung relativ homogen ausfiel, unterschieden sich die *S. aureus*-Träger stark in ihrer spezifischen IgG4-Bindung (z. B. *S. aureus*-Träger A und B).
Abkürzungen: Spls, *S. aureus*-Serinproteasen.

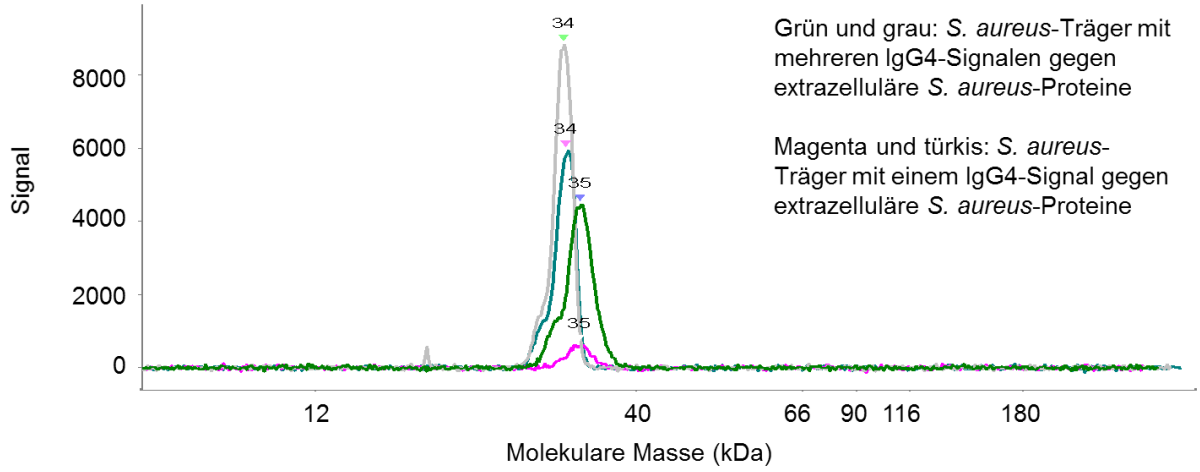


Abb. 8.11: IgG4-Bindung an *S. aureus*-Serinproteasen (Spls). Die IgG4-Bindung aus zwei Plasmen (1:50) an rekombinante Spls (SplC (35 kDa) und SplD (34 kDa)) wurde mittels Simple Western Assay detektiert (Maus anti-human IgG4, 10 µg/mL). Ein Plasma mit welchem gegen extrazelluläre *S. aureus*-Proteine aus dem Kulturüberstand mehrere IgG4-Signale detektierbar waren und ein Plasma mit welchem nur ein IgG4-Signal gegen extrazelluläre *S. aureus*-Proteine aus dem Kulturüberstand detektierbar war, zeigten beide IgG4-Bindung an die Spls.

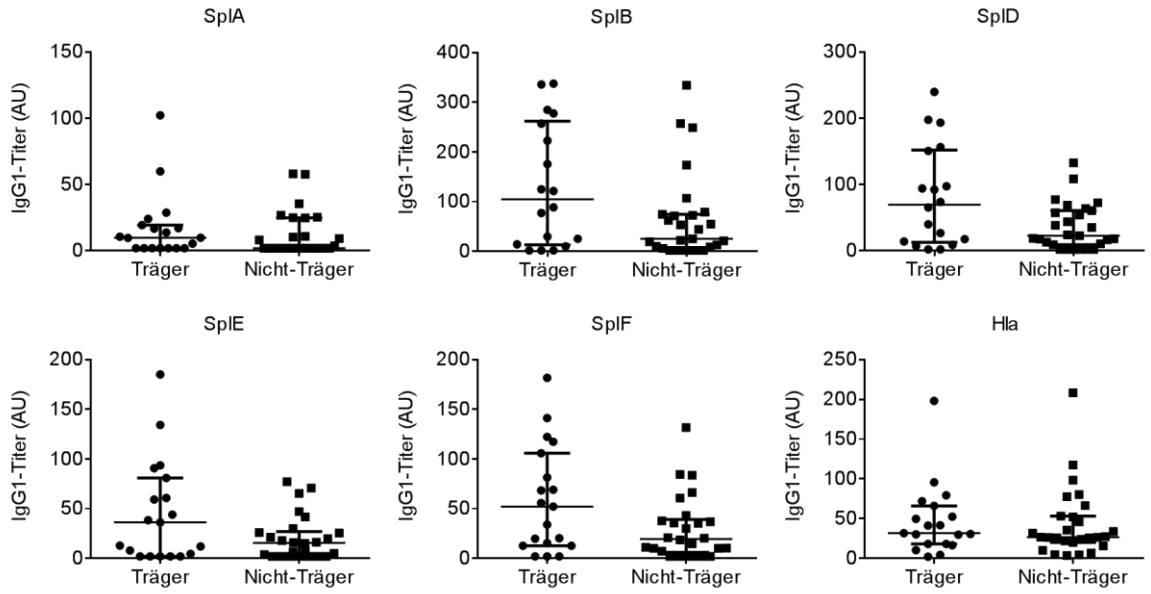


Abb. 8.12: Spezifisches IgG1 gegen *S. aureus*-Serinproteasen und Hla in gesunden *S. aureus*-Trägern (n = 19) und Nicht-Trägern (n = 27). Die Seren wurden im ELISA seriell verdünnt, die IgG1-Bindung mit Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (Maus anti-human IgG1, 100 ng/mL) detektiert und die Halbmaximale OD_{450} mit der Verdünnung an diesem Punkt multipliziert. *S. aureus*-Träger besaßen tendenziell mehr IgG1 gegen SplB, SplD, SplE und SplF als Nicht-Träger.

Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Serums. Gezeigt werden Mediane und Interquartilsabstände. Abkürzungen: AU, *arbitrary units*.

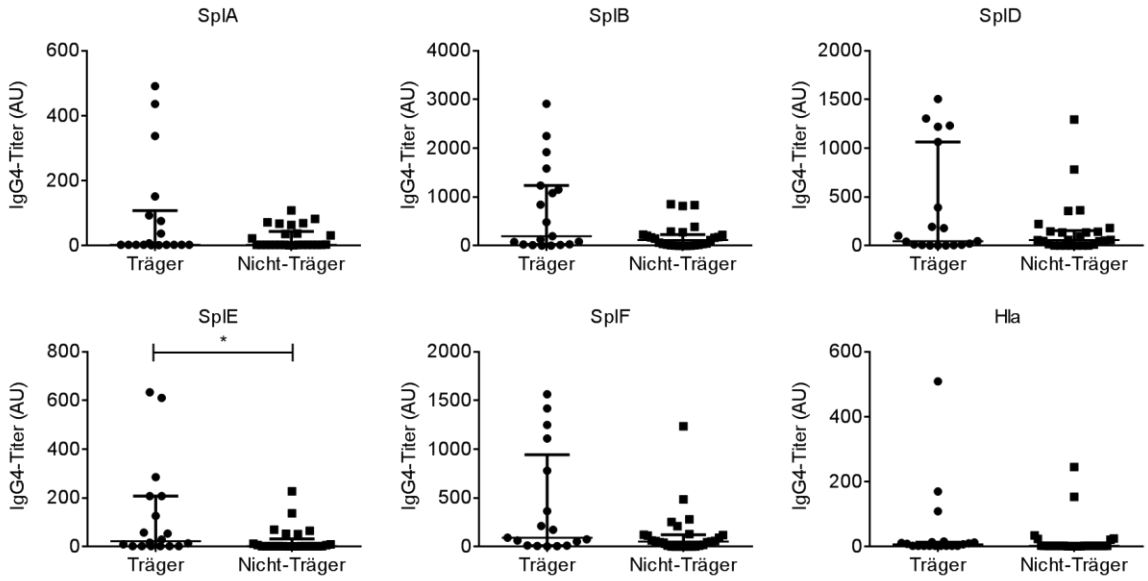


Abb. 8.13: Spezifisches IgG4 gegen *S. aureus*-Serinproteasen und Hla in gesunden *S. aureus*-Trägern (n = 19) und Nicht-Trägern (n = 27). Die Seren wurden im ELISA seriell verdünnt, die IgG4-Bindung mit Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (Maus anti-human IgG4, 100 ng/mL) detektiert und die Halbmaximale OD_{450} mit der Verdünnung an diesem Punkt multipliziert. *S. aureus*-Träger besaßen signifikant mehr IgG4 SplE (p = 0,0192, Mann-Whitney Test) als Nicht-Träger.

Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Serums. Gezeigt werden Mediane und Interquartilsabstände. Abkürzungen: AU, *arbitrary units*.

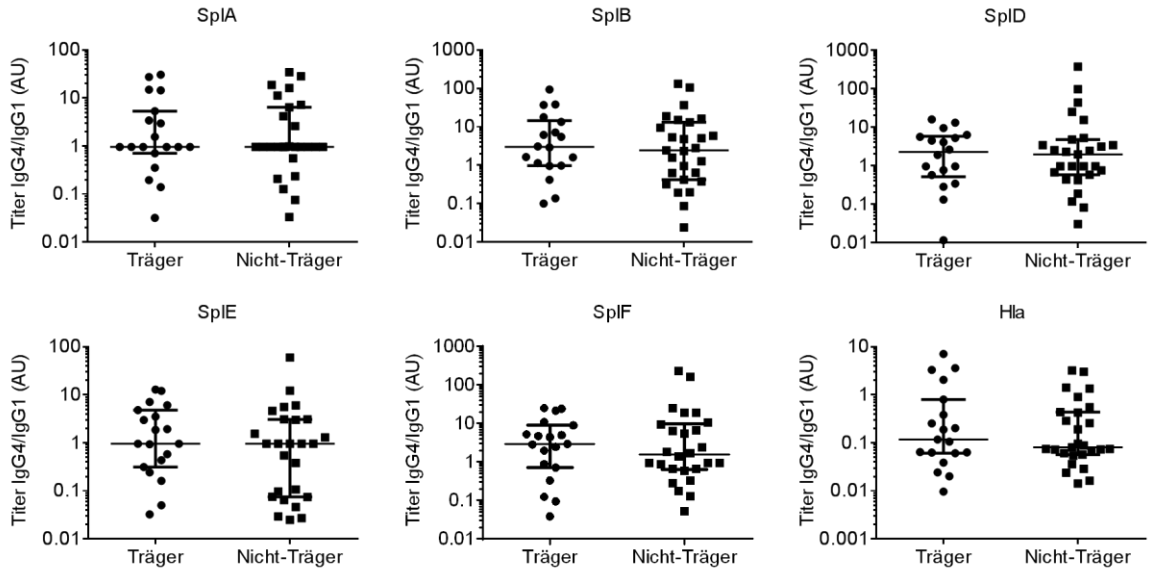


Abb. 8.14: IgG4/IgG1-Quotienten gegen *S. aureus*-Serinproteasen und Hla in gesunden *S. aureus*-Trägern (n = 19) und Nicht-Trägern (n = 27). Die Seren wurden im ELISA seriell verdünnt, die IgG4- bzw. IgG1-Bindung mit Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern (100 ng/mL) detektiert und die Halbmaximale OD_{450} mit der Verdünnung an diesem Punkt multipliziert. Beide Gruppen unterschieden sich nicht in ihren IgG4/IgG1-Quotienten.

Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis eines Serums. Gezeigt werden Mediane und Interquartilsabstände. Abkürzungen: AU, *arbitrary units*.

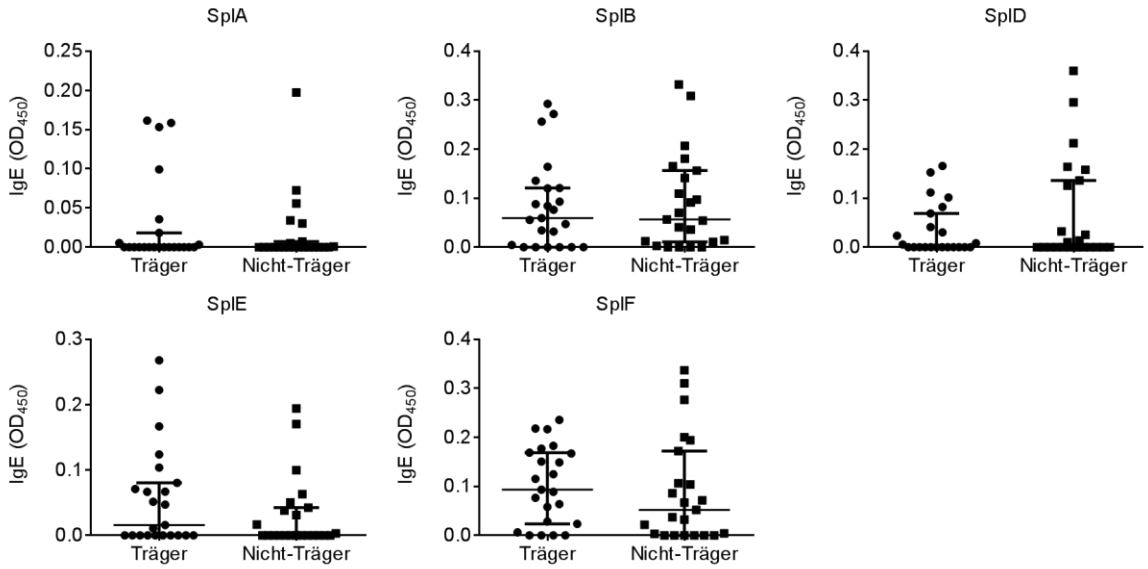


Abb. 8.15: IgE-Bindung an *S. aureus*-Serinproteasen in Seren *S. aureus*-Trägern (n = 19) und Nicht-Trägern (n = 27). Die IgE-Bindung wurde mittels ELISA mit 1:5 verdünnten Seren ermittelt (Biotin-konjugierter Sekundärantikörper Maus anti-human IgE, 10 µg/mL; Peroxidase-konjugiertes Streptavidin 3 µg/mL). Seren von *S. aureus*-Trägern und Nicht-Trägern unterschieden sich nicht in den Spl-spezifischen IgE-Mengen.
Jeder Punkt repräsentiert einen gemessenen Wert eines Spenders. Gezeigt werden Mediane und Interquartilsabstände.

8.2 Anhang Tabellen

Tabelle 8.1: Übersicht zu den AD-Patienten und Kontroll-Probanden (AG Gläser).

Proband	**Geschlecht**	**Alter (Jahre)**	***S. aureus*-Trägerstatus**
AD 1	m	44	Nicht-Träger
AD 2	w	72	Träger
AD 3	w	60	Träger
AD 4	w	17	Träger
AD 5	m	43	Träger
AD 6	w	38	Träger
AD 7	w	20	Träger
AD 8	w	19	Träger
AD 9	w	35	Träger
AD 10	m	2	Träger
AD 11	w	17	Träger
H 12	m	37	Nicht-Träger
H 13	w	43	Nicht-Träger
H 15	w	53	Nicht-Träger
H 16	w	23	Träger
H 17	w	32	Nicht-Träger
H 18	m	30	Träger

Abkürzungen: AD, Atopische Dermatitis; H, gesunde Kontrollen; m, männlich; w, weiblich.

Tabelle 8.2: Übersicht zu den *S. aureus*-Bakteriämiepatienten (AG Roghmann). *S. aureus*-Trägerstatus ist nicht bekannt.

Patient	**Geschlecht**	**Altersgruppe (Jahre)**	**Serumentnahme x Tage nach Diagnose Bakteriämie[a]**	**Simple Western Assay/ELISA[a]**	**Flexmap3D Assay[b]**	**Verlauf**
1003	w	20-29	0	ja	ja	Keine Sepsis
1014	m	60-69	-1	ja	ja	Keine Sepsis
1021	w	30-39	-2	ja	ja	Keine Sepsis
1028	m	70-79	0	ja	ja	Keine Sepsis
1034	m	50-59	-1	ja	ja	Keine Sepsis
1035	m	50-59	-1	ja	ja	Keine Sepsis
1037	m	50-59	-3	ja	ja	Keine Sepsis
1049	m	40-49	0	ja	ja	Keine Sepsis
1050	w	20-29	-3	ja	ja	Keine Sepsis
1063	m	60-69	-1	ja	ja	Keine Sepsis
1069	w	40-49	0	ja	ja	Keine Sepsis
1076	m	80-89	-2	ja	ja	Keine Sepsis
1078	w	60-69	1	ja	nein	Keine Sepsis
1082	w	80-89	0	ja	ja	Keine Sepsis
1095	m	50-59	-3	ja	ja	Keine Sepsis
1115	m	50-59	-4	ja	ja	Keine Sepsis
1117	m	40-49	-1	ja	ja	Keine Sepsis
1137	w	80-89	0	ja	ja	Keine Sepsis
1138	w	50-59	-3	ja	ja	Keine Sepsis
1158	w	50-59	-2	ja	ja	Keine Sepsis
1159	w	80-89	-1	ja	ja	Keine Sepsis
1205	m	50-59	-1	ja	ja	Keine Sepsis
1216	m	30-39	-2	ja	ja	Keine Sepsis
1220	w	40-49	0	ja	ja	Keine Sepsis
1010	w	80-89	0	ja	ja	Sepsis
1080	m	80-89	0	ja	ja	Sepsis

Fortsetzung Tabelle 8.2

Serum	Geschlecht	Altersgruppe (Jahre)	Serumentnahme x Tage nach Diagnose Bakteriämie[a]	Simple Western Assay/ELISA[b]	Flexmap3D Assay[c]	Verlauf
1087	m	40-49	-2	ja	ja	Sepsis
1102	m	60-69	0	ja	ja	Sepsis
1109	w	50-59	0	ja	ja	Sepsis
1152	w	30-39	-2	ja	ja	Sepsis
1161	m	50-59	0	ja	ja	Sepsis
1183	w	60-69	-1	ja	ja	Sepsis
1208	w	40-49	-1	ja	ja	Sepsis
1213	m	-	0	ja	ja	Sepsis
1047	w	70-79	-1	ja	ja	Schwere Sepsis/ Septischer Schock
1051	m	50-59	0	ja	ja	Schwere Sepsis/ Septischer Schock
1106	m	70-79	0	ja	ja	Schwere Sepsis/ Septischer Schock
1212	w	60-69	-2	ja	ja	Schwere Sepsis/ Septischer Schock
1030	m	50-59	0	ja	ja	Schwere Sepsis/ Septischer Schock
1045	m	40-49	0	ja	ja	Schwere Sepsis/ Septischer Schock
1058	m	50-59	-3	ja	ja	Schwere Sepsis/ Septischer Schock
1060	w	50-59	-4	ja	ja	Schwere Sepsis/ Septischer Schock
1065	w	50-59	0	ja	ja	Schwere Sepsis/ Septischer Schock
1071	w	60-69	- (nicht später als 4 Tage)	ja	nein	Schwere Sepsis/ Septischer Schock
1074	w	40-49	-2	ja	ja	Schwere Sepsis/ Septischer Schock
1119	m	60-69	-1	ja	ja	Schwere Sepsis/ Septischer Schock

Abkürzungen: m, männlich; w, weiblich.

[a] Bei negativen Werten erfolgte die Serumentnahme vor der Diagnose.

[b] Nur Patienten deren Seren maximal vier Tage nach Diagnose entnommen wurden, wurden für Simple Western Assays und ELISA berücksichtigt.

[c] Nur Patienten deren Seren nicht später als am Tag der Diagnose entnommen wurden, wurden für den Flexmap3D Assays berücksichtigt.

Tabelle 8.3: Übersicht zu den HIES-Patienten (AG Renner).

Patient	Geschlecht	Serum 1 (Datum; Alter)[a]	Serum 2 (Datum)[b]	Serum 3 (Datum)[b]	Serum 4 (Datum)[b]
A1	m	17.10.2011; 12	16.07.2012	17.12.2013	04.02.2014
A6	w	01.04.2008; 9			
A7	m	29.04.2008; 41			
A10	w	27.05.2008; 30	12.12.2011	15.01.2014	
A16	m	03.07.2008; 7			
A20	m	19.03.2012; 29			
A21	w	05.05.2009; 22			
A26	w	06.08.2012; 10	13.05.2013		
A27	w	14.10.2008; 3			
A33	w	15.07.2008; 12			
A35	m	15.04.2008; 49			
A37	m	01.07.2008; 11			
A40	w	18.02.2009; 17			
A41	m	19.05.2008; 18			
A45	m	25.08.2009; 20			
A46	w	22.07.2008; 17	08.07.2013		

Abkürzungen: m, männlich; n. v., Serum nicht verfügbar; w, weiblich.

[a] Serum vor IVIG-Substitution.

[b] Serum nach IVIG-Substitution.

Tabelle 8.4: Übersicht zu Probanden der ssl-Seren. Grau markiert sind die Spender des EDTA-Vollbluts.

Proband	Geschlecht	Alter (Jahre)	*S. aureus*-Trägerstatus
ssl001	m	20	Träger
ssl002	w	20	Träger
ssl003	w	23	Nicht-Träger
ssl004	m	19	Nicht-Träger
ssl005	w	20	Träger
ssl006	w	19	Träger
ssl007	w	25	Träger
ssl008	w	22	Träger
ssl009	w	22	Nicht-Träger
ssl010	w	22	Nicht-Träger
ssl011	m	25	Nicht-Träger
ssl012	w	19	Nicht-Träger
ssl013	w	25	Träger
ssl014	m	26	Träger
ssl015	w	25	Träger
ssl016	m	22	Träger
ssl018	m	22	Nicht-Träger
ssl019	w	23	Nicht-Träger

Fortsetzung Tabelle 8.4

Proband	**Geschlecht**	**Alter (Jahre)**	***S. aureus*-Trägerstatus**
ssl020	m	21	Nicht-Träger
ssl021	w	21	Träger
ssl022	m	21	Nicht-Träger
ssl023	w	20	Träger
ssl024	w	27	Nicht-Träger
ssl025	m	20	Träger
ssl026	m	25	Nicht-Träger
ssl027	w	22	Träger
ssl028	w	20	Nicht-Träger
ssl029	m	20	Träger
ssl030	w	24	Träger
ssl031	w	20	Nicht-Träger
ssl032	w	24	Träger
ssl033	w	20	Träger
ssl034	w	19	Träger
ssl035	w	21	Träger
ssl036	m	26	Nicht-Träger
ssl037	w	23	Nicht-Träger
ssl038	w	23	Nicht-Träger
ssl039	w	24	Nicht-Träger
ssl040	m	23	Träger
ssl041	w	25	Träger
ssl042	w	23	Nicht-Träger
ssl043	w	26	Nicht-Träger
ssl044	w	23	Träger
ssl045	w	24	Nicht-Träger
ssl046	w	24	Nicht-Träger
ssl047	w	23	Nicht-Träger
ssl048	w	21	Nicht-Träger
ssl049	w	21	Träger

Abkürzungen: m, männlich; w, weiblich.

Tabelle 8.5: Übersicht der 64 eingesetzten rekombinanten *S. aureus*-Proteine zur Quantifizierung von spezfischem IgG im Flexmap3D Assay.

Extrazelluläre Toxine

Abkürzung	**Beschreibung**	**Funktion**	**Genort**	**Protein Lokalisation[a]**			
				Psortb	**LocateP**	**SignalP**	**TM-Domäne**
Hla	Alpha-Hämolysin	Hämolysin/Leukotoxin	SAOUHSC_01121	extrazellulär	sekretiert	ja	0
Hlb	Phospholipase C	Hämolysin/Leukotoxin	SACOL2003	extrazellulär	sekretiert	ja	0
HlgB	Gamma-Hämolysin Komponente B	Hämolysin/Leukotoxin	SACOL2422	extrazellulär	sekretiert	ja	0
HlgC	Gamma-Hämolysin Komponente C	Hämolysin/Leukotoxin	SACOL2421	extrazellulär	sekretiert	ja	0
LukF-PV	Panton-Valentin Leukozidin	Hämolysin/Leukotoxin	SAUSA300_1381	-	-	-	-
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B	Superantigen	SACOL0907	extrazellulär	sekretiert	ja	1
SEC_bov	Staphylokokken Enterotoxin C, bovin	Superantigen	SAB0363	-	-	-	-
SEC	Staphylokokken Enterotoxin C	Superantigen	SA1817	extrazellulär	sekretiert	ja	1
SEI	Staphylokokken Enterotoxin I	Superantigen	SA1646	extrazellulär	N-terminal verankert	nein	0
SEK	Staphylokokken Enterotoxin K	Superantigen	SACOL0886	extrazellulär	sekretiert	ja	0
SEL	Staphylokokken Enterotoxin L	Superantigen	SA1816	extrazellulär	N-terminal verankert	ja	1
SEM	Staphylokokken Enterotoxin M	Superantigen	SA1647	extrazellulär	N-terminal verankert	ja	0
SEO	Staphylokokken Enterotoxin O	Superantigen	SA1648	extrazellulär	sekretiert	ja	1
SEQ	Staphylokokken Enterotoxin Q	Superantigen	SACOL0887	extrazellulär	N-terminal verankert	ja	1
TSST-1	Toxisches-Schock-Syndrom-Toxin-1	Superantigen	SA1819	extrazellulär	sekretiert	ja	1

Fortsetzung Tabelle 8.5

Extrazelluläre Enzyme

Abkürzung	Beschreibung	Funktion	Genort	Protein Lokalisation[a]			
				Psortb	LocateP	SignalP	TM-Domäne
Atl	Bifunktionales Autolysin	Protease	SAOUHSC_00994[b]	extrazellulär	sekretiert	ja	0
Atl	Bifunktionales Autolysin	Protease	SAOUHSC_00994[c]	extrazellulär	sekretiert	ja	0
Coa	Koagulase	Adhäsionsmolekül	SAOUHSC_00192	extrazellulär	sekretiert	ja	0
Geh	Triacylglycerol Lipase 2	Lipase	SAUSA300_0320	extrazellulär	N-terminal verankert	ja	0
GlpQ	Glycerolphosphoryldiester-Phosphodiesterase	Lipase	SAUSA300_0862	extrazellulär	N-terminal verankert	ja	0
Lip	Triacylglycerol Lipase 1	Lipase	SAUSA300_2603	extrazellulär	N-terminal verankert	ja	1
Nuc	Thermonuklease	Nuklease	SAOUHSC_01316	extrazellulär	N-terminal verankert	nein	1
Plc	1-Phosphatidylinositol Phosphodiesterase	Lipase	SAUSA300_0099	extrazellulär	N-terminal verankert	ja	1
Sak	Staphylokinase	Protease	SAOUHSC_02171	extrazellulär	sekretiert	ja	0
SplA	Serin-Protease SplA	Protease	SACOL1869	extrazellulär	N-terminal verankert	ja	0
SplB	Serin-Protease SplB	Protease	SAOUHSC_01941	extrazellulär	N-terminal verankert	ja	1
SplC	Serin-Protease SplC	Protease	SAUSA300_1756	extrazellulär	sekretiert	ja	0
SplD	Serin-Protease SplD	Protease	SAUSA300_1755	membran-gebunden	N-terminal verankert	ja	1
Ssl1	Superantigen-ähnliches Protein	Virulenzfaktor	SAOUHSC_00383	extrazellulär	N-terminal verankert	ja	0
Ssl11	Superantigen-ähnliches Protein	Virulenzfaktor	SAOUHSC_00399 und SA0393	extrazellulär	N-terminal verankert	ja	0
SspB	Staphopain B	Protease	SA0900	extrazellulär	sekretiert	ja	1

Fortsetzung Tabelle 8.5

Andere extrazelluläre Virulenzfaktoren

Abkürzung	Beschreibung	Funktion	Genort	Protein Lokalisation[a]			
				Psortb	LocateP	SignalP	TM-Domäne
CHIPS	Chemotaxis-inhibierendes Protein	Virulenzfaktor	SAOUHSC_02169	keine Vorhersage	sekretiert	ja	0
Efb-c	Fibrinogen-bindendes Protein	Adhäsionsmolekül	SAOUHSC_01114	extrazellulär	N-terminal verankert	ja	0
Emp	Extrazelluläre Matrix-bindendes Protein	Adhäsionsmolekül	SAOUHSC_00816	zellwandgebunden	N-terminal verankert	ja	0
EsxA	ESAT-6 Familie Virulenzprotein	Virulenzfaktor	SAOUHSC_00257	extrazellulär	intrazellulär	nein	0
IsaA	Transglycosylase	Virulenzfaktor	SAOUHSC_02887	extrazellulär	N-terminal verankert	ja	0
Sbi	Immunglobulin-bindendes Protein	Virulenzfaktor	SAOUHSC_02706	keine Vorhersage	sekretiert	ja	0
SsaA2	Staphylokokken sekretiertes Antigen	Virulenzfaktor	SAOUHSC_02571	extrazellulär	sekretiert	ja	0

Proteine mit unbekannter Funktion, Oberflächen-assoziiert oder extrazellulär

Abkürzung	Beschreibung	Funktion	Genort	Protein Lokalisation[a]			
				Psortb	LocateP	SignalP	TM-Domäne
-	Uncharakterisiertes Protein	-	SACOL0444	keine Vorhersage	Lipidanker	ja	0
-	Oberflächenprotein, putativ	-	SACOL0479	keine Vorhersage	N-terminal verankert	ja	0
-	Uncharakterisiertes Protein	-	SACOL0480	keine Vorhersage	N-terminal verankert	ja	1
-	Uncharakterisiertes Protein	-	SACOL0908	keine Vorhersage	N-terminal verankert	ja	0
-	Oberflächenprotein, putativ	-	SACOL0985	membrangebunden	N-terminal verankert	ja	0
-	Uncharakterisiertes Protein	-	SACOL1788	zellwandgebunden	N-terminal verankert	nein	1
-	Uncharakterisiertes Protein	-	SACOL1802	keine Vorhersage	N-terminal verankert	nein	0
-	MHC Klasse II-analoges Protein	-	SAOUHSC_02161	membrangebunden	sekretiert	ja	0
-	verkürztes MHC Klasse II-analoges Protein	-	SAOUHSC_02466	membrangebunden	sekretiert	ja	0

Fortsetzung Tabelle 8.5

Membrantransport-Proteine

Abkürzung	Beschreibung	Funktion	Genort	Protein Lokalisation[a]			
				Psortb	LocateP	SignalP	TM-Domäne
IsaB	Immundominantes Staphylokokken Antigen B	Virulenzfaktor	SAOUHSC_02972	extrazellulär	Multitrans-membran	ja	2
YukA	DNA ATPase	-	SAOUHSC_00262[b]	membrangebunden	Multitrans-membran	nein	2
YukA	DNA ATPase	-	SAOUHSC_00262[c]	membrangebunden	Multitrans-membran	nein	2

Oberflächenassoziierte Proteine mit anderen Funktionen

Abkürzung	Beschreibung	Funktion	Genort	Protein Lokalisation[a]			
				Psortb	LocateP	SignalP	TM-Domäne
Pbp2	Penicillin-bindendes Protein 2	Virulenzfaktor	SAOUHSC_01467	membrangebunden	N-terminal verankert	nein	1
PrsA	Foldase Protein	Virulenzfaktor	SAOUHSC_01972	membrangebunden	Lipidanker	ja	0

Intrazelluläre Enzyme

Abkürzung	Beschreibung	Funktion	Genort	Protein Lokalisation[a]			
				Psortb	LocateP	SignalP	TM-Domäne
CitC	Isocitrat-Dehydrogenase	-	SA1517	zytoplasmatisch	zytoplasmatisch	nein	0
MsrA2	Peptide-Methionine-Sulfoxid-Reduktase A	-	SAOUHSC_01432	keine Vorhersage	zytoplasmatisch	nein	0
MsrB	Peptide-Methionine-Sulfoxid-Reduktase B	-	SAOUHSC_01431	zytoplasmatisch	zytoplasmatisch	nein	0
PknB	Serine/Threonin-Protein-Kinase	-	SA1063	membrangebunden	zytoplasmatisch	nein	1
PurA	Adenylosuccinat-Synthetase	-	SA0016	zytoplasmatisch	zytoplasmatisch	nein	0
SodA	Superoxid-Dismutase	-	SAOUHSC_01653	extrazellulär	zytoplasmatisch	nein	0
-	3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase	-	SAOUHSC_00196	keine Vorhersage	zytoplasmatisch	nein	0

Fortsetzung Tabelle 8.5

Intrazelluläre Proteine mit anderen Funktionen

Abkürzung	Beschreibung	Funktion	Genort	Protein Lokalisation[a]			
				Psortb	LocateP	SignalP	TM-Domäne
GreA	Trankriptions-Elongationsfaktor	Proteinsynthese und -faltung	SA1438	zytoplasmatisch	zytoplasmatisch	nein	0
GroEL	60 kDa Chaperon	Chaperon	SAUSA300_1982	zytoplasmatisch	zytoplasmatisch	nein	0
Tig	Trigger Faktor	Proteinsynthese und -faltung	SA1499	zytoplasmatisch	zytoplasmatisch	nein	0
Tuf	Elongationsfaktor Tu	Proteinsynthese und -faltung	SA0506	zytoplasmatisch	zytoplasmatisch	nein	0

Abkürzungen: TM, Transmembran.

[a] Die Protein-Lokalisation wurde in AureoWiki abgefragt [159]. War keine Information über die Lokalisation hinterlegt, wurde das entsprechende Protein des *S. aureus*-Stamms COL für die Vorhersage genutzt.

[b] C-terminaler Teil des Proteins.

[c] N-terminaler Teil des Proteins.

Tabelle 8.6: Übersicht der *S. aureus*-Proteine die in 2D-Western Blots bei Eisenlimitation (600 µM 2,2`-Bipyridyl) und in der TSB-Kontrolle durch humane Antikörper aus einem Serumpool gebunden wurden.

Abkürzung	**Beschreibung**	**Funktionelle Einteilung**	**Genort**	**Antikörper-bindung TSB-Kontrolle**	**Antikörper-bindung 600 µM 2,2`-Bipyridyl**
-	N-Acetylmuramoyl-L-Alanine Amidase	Enzym	SAUSA300_2579	+	+
-	5'-Nukleotidase	Enzym	SAUSA300_0307	+	n.i.
-	Putative Häm-abhängige Peroxidase	Eisenmetabolismus	SAUSA300_0569	n.i.	+
-	Protein der CHAP-Domänen Familie	Andere	SAUSA300_0651	+	+
Atl	Bifunktionales Autolysin	Protease	SAUSA300_0955	+	+
Aur	Zink Metalloproteinase Aureolysin	Protease	SAUSA300_2572	+	+
CHIPS	Chemotaxis-inhibierendes Protein	Virulenzfaktor	SAUSA300_1920	+	n.i.
ClfB	Clumpingfaktor B	Adhäsionsmolekül	SAUSA300_2565	n.i.	+
Geh	Triacylglycerol Lipase 2	Lipase	SAUSA300_0320	+	+
Hla	Alpha-Hämolysin	Hämolysin/Leukotoxin	SAUSA300_1058	+	+
HlgB	Gamma-Hämolysin Komponente B	Hämolysin/Leukotoxin	SAUSA300_2367	+	+
IsdA	Eisen-reguliertes Oberflächendeterminanten Protein A	Eisenmetabolismus	SAUSA300_1029	-	+
IsdB	Eisen-reguliertes Oberflächendeterminanten Protein B	Eisenmetabolismus	SAUSA300_1028	-	+
Lip	Triacylglycerol Lipase 1	Lipase	SAUSA300_2603	+	+
LtaS	Lipoteichonsäure-Synthase	Enzym	SAUSA300_0703	+	+
LukD	Leukotoxin	Hämolysin/Leukotoxin	SAUSA300_1768	+	+
LukE	Leukotoxin	Hämolysin/Leukotoxin	SAUSA300_1769	+	+
LukF-PV	Panton-Valentin Leukozidin	Hämolysin/Leukotoxin	SAUSA300_1381	+	+
LukL1	Leukotoxin-ähnliches Protein 1	Hämolysin/Leukotoxin	SAUSA300_1974	+	+
LukL2	Leukotoxin-ähnliches Protein 2	Hämolysin/Leukotoxin	SAUSA300_1975	+	-
LukS-PV	Panton-Valentin Leukozidin	Hämolysin/Leukotoxin	SAUSA300_1382	+	+
LytM	Peptidoglycan-Hydrolase	Enzym	SAUSA300_0270	n.i.	+
Nuc	Thermonuklease	Enzym	SAUSA300_0776	+	+
Pgk	Phosphoglycerat-Kinase	Enzym	SAUSA300_0757	n.i.	+
Plc	1-Phosphatidylinositol-Phosphodiesterase	Lipase	SAUSA300_0099	+	+

Fortsetzung Tabelle 8.6

Abkürzung	Beschreibung	Funktionelle Einteilung	Genort	Antikörper-bindung TSB-Kontrolle	Antikörper-bindung 600 µM 2,2`-Bipyridyl
Sle1	N-Acetylmuramoyl-L-Alanine Amidase	Enzym	SAUSA300_0438	n.i.	+
SplA	Serin-Protease SplA	Protease	SAUSA300_1758	+	+
SplB	Serin-Protease SplB	Protease	SAUSA300_1757	+	+
SplC	Serin-Protease SplC	Protease	SAUSA300_1756	n.i.	+
SplD	Serin-Protease SplD	Protease	SAUSA300_1755	+	+
SplE	Serin-Protease SplE	Protease	SAUSA300_1754	+	+
SplF	Serin-Protease SplF	Protease	SAUSA300_1753	+	+
SsaA	Staphylokokken sekretiertes Antigen Vorläufer-Protein	Virulenzfaktor	SAUSA300_2253	+	+
SspA	V8 Protease	Protease	SAUSA300_0951	+	+
SspB	Staphopain B	Protease	SAUSA300_0950	n.i.	+
SspP	Staphopain A	Protease	HMPREF0776_0069	+	+

Abkürzungen: n.i., IgG-Bindung im korrespondierenden Bereich zur anderen Kultivierungsbedingung fand statt, Protein war aber nicht identifizierbar.
+ Wurde durch IgG gebunden.
- Wurde nicht durch IgG gebunden.

Tabelle 8.7: Übersicht der SignalP-positiven *S. aureus*-Proteine die sich in ihrer Menge signifikant bei Eisenlimitation im Vergleich zur TSB-Kontrolle verändert haben [157]. Geordnet nach funktioneller Einteilung.

Abkürzung	**Beschreibung**	**Funktionelle Einteilung**	**Genort**	**log2-Effektgrößen Eisen-limitation/TSB-Kontrolle[a]**	**BH Q-Value**
ClfA	Clumpingfaktor A	Adhäsionsmolekül	SAUSA300_0772	-1,87	0,0234
Ebh	Extrazelluläre Matrix-bindendes Protein	Adhäsionsmolekül	SAUSA300_1327	-2,96	0,0068
Emp	Extrazelluläre Matrix-bindendes Protein	Adhäsionsmolekül	SAUSA300_0774	-2,51	0,0208
FnbA	Fibronektin-bindendes Protein A	Adhäsionsmolekül	SAUSA300_2441	-2,22	0,0126
FnbB	Fibronektin-bindendes Protein B	Adhäsionsmolekül	SAUSA300_2440	-0,81	0,0484
-	Lipoprotein	Andere	SAUSA300_0798	-3,03	0,0027
-	Putatives lipoprotein	Andere	SAUSA300_2403	-2,07	0,0484
-	Putativer Transkriptionaler Regulator	Andere	SAUSA300_2259	-2,49	0,0135
-	Uncharakterisiertes Protein	Andere	SAUSA300_2164	-3,65	0,0031
-	Uncharakterisiertes Protein	Andere	SAUSA300_2112	-2,94	0,0053
-	Phi77 ORF006-ähnliches Protein, putatives Kapselprotein	Andere	SAUSA300_1938	-0,57	0,0149
-	Phi77 ORF044-ähnliches Protein	Andere	SAUSA300_1926	-5,97	0,0218
-	Uncharakterisiertes Protein	Andere	SAUSA300_1729	-3,78	0,0050
-	PhiSLT ORF191-ähnliches Protein	Andere	SAUSA300_1392	-1,81	0,0315
-	Transkriptionaler Regulator	Andere	SAUSA300_0958	-2,51	0,0063
-	Putatives Oberflächenprotein	Andere	SAUSA300_0883	-2,57	0,0134
-	Putatives Lipoprotein	Andere	SAUSA300_0769	-2,81	0,0182
-	Putatives Lipoprotein	Andere	SAUSA300_0693	-1,42	0,0256
-	Protein der CHAP-Domänen Familie	Andere	SAUSA300_0651	-1,91	0,0285
-	Uncharakterisiertes Protein	Andere	SAUSA300_0602	-2,82	0,0222
-	Putatives Oberflächenprotein	Andere	SAUSA300_0408	-2,63	0,0051
-	ABC-Transporter, Substrat-binde Protein	Andere	SAUSA300_0231	-4,83	0,0455
-	Putatives Lipoprotein	Andere	SAUSA300_0203	-5,37	0,0116
-	Uncharakterisiertes Protein	Andere	SAUSA300_0146	-1,77	0,0504
Ear	Ear Protein	Andere	SAUSA300_0815	-1,60	0,0243
FmtB	Gekürztes FmtB-Protein	Andere	SAUSA300_2110	-2,97	0,0090

Fortsetzung Tabelle 8.7

Abkürzung	Beschreibung	Funktionelle Einteilung	Genort	log2-Effektgrößen Eisen-limitation/TSB-Kontrolle[a]	BH Q-Value
ModA	Molybdenum-bindendes Protein	Andere	SAUSA300_2230	-2,68	0,0160
-	Putatives Staphyloxanthin-Biosynthese Protein	Andere Virulenzfaktoren	SAUSA300_0277	-2,15	0,0354
CHIPS	Chemotaxis-inhibierendes Protein	Andere Virulenzfaktoren	SAUSA300_1920	-1,04	0,0466
IsaB	Immundominantes Staphylokokken Antigen B	Andere Virulenzfaktoren	SAUSA300_2573	-5,80	0,0062
PrsA	Foldase Protein	Andere Virulenzfaktoren	SAUSA300_1790	-1,16	0,0182
Sbi	Immunglobulin-bindendes Protein	Andere Virulenzfaktoren	SAUSA300_2364	-1,47	0,0354
SsaA	Staphylokokken sekretiertes Antigen	Andere Virulenzfaktoren	SAUSA300_2249	-1,57	0,0455
SsaA	Staphylokokken sekretiertes Antigen Vorläufer-Protein	Andere Virulenzfaktoren	SAUSA300_2253	-0,87	0,0167
Ssl1	Superantigen-like protein	Andere Virulenzfaktoren	SAUSA300_0395	-1,05	0,0429
Ssl10	Superantigen-like protein	Andere Virulenzfaktoren	SAUSA300_0404	-6,88	0,0026
Ssl11	Superantigen-like protein	Andere Virulenzfaktoren	SAUSA300_0407	2,67	0,0216
Ssl7	Superantigen-like protein	Andere Virulenzfaktoren	SAUSA300_0401	-2,42	0,0086
Ssl8	Superantigen-like protein	Andere Virulenzfaktoren	SAUSA300_0402	-4,58	0,0363
Ssl9	Superantigen-like protein	Andere Virulenzfaktoren	SAUSA300_0403	-2,56	0,0121
-	Transferrin Rezeptor	Eisenmetabolismus	SAUSA300_0721	1,81	0,0099
IsdA	Eisen-reguliertes Oberflächendeterminanten Protein A	Eisenmetabolismus	SAUSA300_1029	4,65	0,0126
IsdB	Eisen-reguliertes Oberflächendeterminanten Protein B	Eisenmetabolismus	SAUSA300_1028	5,51	0,0086
IsdC	Eisen-reguliertes Oberflächendeterminanten Protein C	Eisenmetabolismus	SAUSA300_1030	2,64	0,0228
SirA	ABC-Transporter, Eisen-bindendes Protein	Eisenmetabolismus	SAUSA300_0117	4,21	0,0222
-	N-Acetylmuramoyl-L-Alanine Amidase	Enzym	SAUSA300_2579	-1,42	0,0285
-	5'-Nucleotidase	Enzym	SAUSA300_0307	-6,85	0,0012
-	5'-Nucleotidase-Famile Protein	Enzym	SAUSA300_0025	-2,34	0,0120
LytH	Puatative Zellwand-Amidase	Enzym	SAUSA300_1588	-2,60	0,0414
Nuc	Thermonuklease	Enzym	SAUSA300_0776	-1,30	0,0429
PhoB	Alkaline Phosphatase	Enzym	SAUSA300_2561	-7,92	0,0334

Fortsetzung Tabelle 8.7

Abkürzung	Beschreibung	Funktionelle Einteilung	Genort	log2-Effektgrößen Eisen-limitation/TSB-Kontrolle[a]	BH Q-Value
Sle1	N-Acetylmuramoyl-L-Alanine Amidase	Enzym	SAUSA300_0438	-2,51	0,0225
Hla	Alpha-Hämolysin	Hämolysin/Leukotoxin	SAUSA300_1058	-4,39	0,0014
LukD	Leukotoxin	Hämolysin/Leukotoxin	SAUSA300_1768	-2,01	0,0126
LukE	Leukotoxin	Hämolysin/Leukotoxin	SAUSA300_1769	-1,68	0,0182
LukF-PV	Panton-Valentin Leukozidin	Hämolysin/Leukotoxin	SAUSA300_1381	-1,47	0,0214
LukL1	Leukotoxin-ähnliches Protein 1	Hämolysin/Leukotoxin	SAUSA300_1974	-2,43	0,0057
LukL2	Leukotoxin-ähnliches Protein 2	Hämolysin/Leukotoxin	SAUSA300_1975	-3,46	0,0152
LukS-PV	Panton-Valentin Leukozidin	Hämolysin/Leukotoxin	SAUSA300_1382	-1,81	0,0234
Geh	Triacylglycerol Lipase 2	Lipase	SAUSA300_0320	-5,15	0,0126
GlpQ	Glycerolphosphoryldiester-Phosphodiesterase	Lipase	SAUSA300_0862	-6,16	0,0077
Lip	Triacylglycerol Lipase 1	Lipase	SAUSA300_2603	-4,29	0,0204
Plc	1-Phosphatidylinositol Phosphodiesterase	Lipase	SAUSA300_0099	-2,60	0,0089
Atl	Bifunktionales Autolysin	Protease	SAUSA300_0955	-4,11	0,0234
Aur	Zink Metalloproteinase Aureolysin	Protease	SAUSA300_2572	-1,92	0,0230
EpiP	Lantibiotisches Protein	Protease	SAUSA300_1763	-3,63	0,0136
Sak	Staphylokinase, putativ	Protease	SAUSA300_1922	-1,66	0,0075
SplA	Serin-Protease SplA	Protease	SAUSA300_1758	-3,81	0,0136
SplB	Serin-Protease SplB	Protease	SAUSA300_1757	-3,30	0,0160
SplC	Serin-Protease SplC	Protease	SAUSA300_1756	-1,02	0,0232
SplD	Serin-Protease SplD	Protease	SAUSA300_1755	-1,65	0,0357
SplE	Serin-Protease SplE	Protease	SAUSA300_1754	-3,23	0,0109
SplF	Serin-Protease SplF	Protease	SAUSA300_1753	-1,35	0,0063
SspA	V8 Protease	Protease	SAUSA300_0951	-4,84	0,0182
SspB	Staphopain B	Protease	SAUSA300_0950	-3,01	0,0120
SspP	Staphopain A	Protease	SAUSA300_1890	-2,62	0,0121
SEK	Staphylokokken Enterotoxin K	Superantigen	SAUSA300_0800	-2,53	0,0243
SEQ	Staphylokokken Enterotoxin Q	Superantigen	SAUSA300_0801	-3,04	0,0317

Abkürzungen: BH, Benjamini-Hochberg.

[a] Bei positiven Werten Protein in Eisenlimitation erhöht, bei negativen Werten Protein in TSB-Kontrolle erhöht.

Tabelle 8.8: Übersicht der Charakteristika der *S. aureus*-Bakteriämiepatienten.

	Sepsis (n = 19)	**Keine Sepsis (n = 21)**	**Odds Ratio[a] (CI)**	**p**
Alter (± SD)[b]	59 ± 13	57 ± 18		0,75
Geschlecht			0,99 (0,29 - 3,43)	1,0
Weiblich	9	10		
Männlich	10	10		
Vorherige *S. aureus*-Infektionen			1,52 (0,34 bis 6,76)	0,71
Ja	5	4		
Nein	14	17		
Dialyse			0,48 (0,12 bis 1,81)	0,33
Ja	5	9		
Nein	14	12		
Diabetes mellitus			0,53 (0,13 bis 2,23)	0,49
Ja	4	7		
Nein	15	14		
Nosokomiale Infektion			2,31 (0,56 bis 9,47)	0,31
Ja	15	13		
Nein	4	8		
MRSA[c]			0,46 (0,12 bis 1,79)	0,32
Ja	11	15		
Nein	8	5		

Abkürzungen: CI, Konfidenzintervall; SD, Standardabweichung

[a] Odds Ratio für Sepsisentwicklung.

b Genaues Alter der Patienten bei Serumentnahme nicht bekannt, daher aus Altersgruppe gemittelt (siehe Anhang Tabelle 8.2).

[c] Betrifft das infizierende *S. aureus*-Isolat.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.
Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel und Hilfen benutzt und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen habe.

Sebastian Stentzel

Lebenslauf

Name, Vorname:	Stentzel, Sebastian
Geburtsdatum, -ort:	29.10.1983 in Quedlinburg
PLZ, Wohnort:	17491, Greifswald

Seit 07/2014	Assoziiertes Mitglied GRK1870 „*Bacterial Respiratory Infections – Common and Specific Mechanisms of Pathogen Adaptation and Immune Defence*“; Universität Greifswald
Seit 09/2012	Mitglied der Graduiertenakademie; Universität Greifswald
Seit 07/2011	Promotion zum Thema „Die adaptive Immunantwort gegen *Staphylococcus aureus* – zwischen Protektion und Allergie“ unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Bröker am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin; Abteilung Immunologie; Universität Greifswald
10/2009 – 09/2010	Studentische Hilfskraft; Institut für Anatomie und Zellbiologie; Universität Greifswald
08/2009 – 10/2009	Betriebspraktikum unter der Betreuung von Herrn Dr. M. Ernst am Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften Borstel; Abteilung Immunologie und Zellbiologie
03/2004 – 04/2004	Krankenpflegepraktikum; Klinikum Dorothea Christiane Erxleben; Quedlinburg
10/2006 – 06/2011	Studium der Humanbiologie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald; Abschluss als Diplom Humanbiologe
04/2004 – 09/2006	Diverse Tätigkeiten in Minijobs
07/2003 – 03/2004	Grundwehrdienst
07/2003	Abitur; GutsMuths-Gymnasium; Quedlinburg

Publikationsliste

Publikationen

Lupinek, C., Wollmann, E., Baar, A., Banerjee, S., Breiteneder, H., Bröker, B. M., Bublin, M., Curin, M., Flicker, S., Garmatiuk, T., Hochwallner, H., Mittermann, I., Pahr, S., Resch, Y., Roux, K. H., Srinivasan, B., **Stentzel, S.**, Vrtala, S., Willison, L. N., Wickman, M., Lodrup-Carlsen, K. C., Anto, J. M., Bousquet, J., Bachert, C., Ebner, D., Schlederer, T., Harwanegg, C., Valenta, R. (2014). Advances in allergen-microarray technology for diagnosis and monitoring of allergy: the MeDALL allergen-chip. *Methods*, 66(1), 106-119. doi: 10.1016/j.ymeth.2013.10.008.

Stentzel, S., Vu, H. C., Weyrich, A. M., Jehmlich, N., Schmidt, F., Salazar, M. G., Steil, L., Völker, U., Bröker, B. M. (2014). Altered immune proteome of *Staphylococcus aureus* under iron-restricted growth conditions. *Proteomics, 14*(16), 1857-1867. doi: 10.1002/pmic.201300512.

Kloppot, P., Selle, M., Kohler, C., **Stentzel, S.**, Fuchs S., Liebscher, V., Müller, E., Kale, D., Ohlsen, K., Bröker, B. M., Zipfel, P. F., Kahl, B. C., Ehricht, R., Hecker, M., Engelmann, S. (2015). Microarray based identification of human antibodies against *Staphylococcus aureus* antigens. *Proteomics Clin Appl*. doi: 10.1002/prca.201400123.

Stentzel S., Sundaramoorthy N., Michalik S., Nordengrün M., Schulz S., Kolata J., Kloppot P., Engelmann S., Steil L., Hecker M., Schmidt F., Völker U., Roghmann M.-C., Bröker B. M. (**unter Review**). Specific serum IgG at diagnosis of *Staphylococcus aureus* bloodstream invasion is correlated with disease progression.

Stentzel S., Teufelberger A., Nordengrün M., Kolata J., Schmidt F., Crombruggen K., Michalik S., Kumpfmüller J., Tischer S., Schweder T., Hecker M., Engelmann S., Völker V., Krysko O., Bachert C., Bröker B. M. (**eingereicht 2015**). Staphylococcal serine protease-like proteins (Spl) are pacemakers of allergic reactions to *Staphylococcus aureus* in the airways.

Beiträge auf Tagungen

Vorträge

Stentzel, S., Gesell Salazar, M., Kolata, J., Burian, M., Holtfreter, S., Steil, S., Völker, U., Bröker, B.. Altered immune proteome of *Staphylococcus aureus* under iron-restricted growth conditions. World Allergy and Asthma Congress, Mailand, 2013.

Posterpräsentationen

Stentzel, S., Kolata J., Bluhm, F., Fuchs, S., Bode L., Engelmann, S., Hecker, M., van Belkum, A., Völker U., van Wamel, W., Bröker, B.. Distinct profiles of the human immune response to *Staphylococcus aureus* revealed by immune proteomics of Ig subclasses. Annual Meeting of the German Society for Hygiene and Microbiology, Essen, 2011.

Stentzel, S., Kolata J., Bluhm, F., Fuchs, S., Bode L., Engelmann, S., Hecker, M., van Belkum, A., Völker U., van Wamel, W., Bröker, B.. Distinct profiles of the human immune response to *Staphylococcus aureus* revealed by immune proteomics of Ig subclasses. European Conference on Prokaryotic and Fungal Genomics, Göttingen, 2011.

Stentzel, S., Kolata J., Bluhm, F., Fuchs, S., Bode L., Engelmann, S., Hecker, M., van Belkum, A., Völker U., van Wamel, W., Bröker, B.. Distinct profiles of the human immune response to *Staphylococcus aureus* revealed by immune proteomics of Ig subclasses. Spring School on Immunology, Ettal, 2012.

Stentzel, S., Burian, M., Holtfreter, S., Steil, L., Kolata, J., Engelmann, S., Völker, U., Hecker, M., Bröker, B. M.. Analysis of the human humoral immune response to *Staphylococcus aureus* proteins, Jahrestagung des Graduiertenkollegs GRK 840, Insel Vilm, 2012.

Stentzel, S., Gesell Salazar, M., Kolata, J., Burian, M., Holtfreter, S., Steil, S., Völker, U., Bröker, B.. Altered immune proteome of *Staphylococcus aureus* under iron-restricted growth conditions. SFB/Transregio 34 International Conference on the Pathophysiology of Staphylococci in the Post-Genomic Era, Kloster Banz, 2012.

Stentzel, S., Gesell Salazar, M., Kolata, J., Burian, M., Holtfreter, S., Steil, S., Völker, U., Bröker, B.. Altered immune proteome of *Staphylococcus aureus* under iron-restricted growth conditions. Annual Meeting of the German Society for Hygiene and Microbiology, Hamburg, 2012.

Vu, H. C., **Stentzel, S.**, Kolata, J., Steil, S., Zautner, A., Classen, C. F., Völker, U., Bröker, B.. Human IgG Response to *Staphylococcus aureus*-Induced Furunculosis. Annual Meeting of the German Society for Hygiene and Microbiology, Hamburg, 2012.

Stentzel, S., Sundaramoorthy, N., Michalik, S., Nordengrün, M., Schulz, S., Kolata, J., Kloppot, P., Engelmann, S., Steil, L., Hecker, M., Schmidt, F., Völker, U., Roghmann, M.-C., Bröker, B.. Specific serum IgG levels at diagnosis of *Staphylococcus aureus* bacteremia are correlated with disease progression. Annual Meeting of the German Society for Immunology, Bonn, 2014.

Stentzel, S., Sundaramoorthy, N., Michalik, S., Nordengrün, M., Schulz, S., Kolata, J., Kloppot, P., Engelmann, S., Steil, L., Hecker, M., Schmidt, F., Völker, U., Roghmann, M.-C., Bröker, B. Correlation of *S. aureus*-specific IgG with disease outcome in *S. aureus* bacteremia patients. World Immune Regulation Meeting, Davos, 2015.

Drittmittelanträge

Stentzel, S., Bröker, M. B.. Ein automatisiertes Verfahren für die Quantifizierung der Antikörperbindung an Antigenextrakte von *Staphylococcus aureus* mittels 1D-Immunoblot, Forschungsverbund Molekulare Medizin, Universität Greifswald, 2012.

Patentanträge

European Patent Application EP 13 169 686.6: Diagnosis and/or treatment of diseases which are related to allergic reactions to *Staphylococcus aureus*, Bröker, B. M., **Stentzel, S.**, and co-authors, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald; 2013.

Danksagung

Ich bedanke mich bei allen die zu dieser Arbeit beigetragen haben.
Zuerst möchte ich mich bei Barbara Bröker für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung meiner Promotion, die Unterstützung meiner Ideen und das große Vertrauen in meine Arbeit in Forschung und Lehre bedanken.

Während meiner Promotion haben mich viele Bachelor-, Master- und Diplomstudenten begleitet, mit denen ich gemeinsam einen Teil der Experimente durchgeführt habe. Hierbei möchte ich mich besonders bei Maria Nordengrün bedanken, deren Arbeitskraft vor allem bei der Untersuchung der Immunantwort auf *S. aureus*-Serinproteasen eingeflossen ist.
Ich danke allen Mitarbeitern unseres Instituts für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Vu Hai Chi hat mir bei der Auswertung der MS-Daten durch sein Excel-Talent enorm geholfen. Julia Kolata danke ich für die Unterstützung in der Anfangszeit, ohne die der Übergang in das selbstständige Forschen nicht so reibungslos verlaufen wäre. Susanne Neumeister, Erika Friebe und Grazyna Domanska danke ich für die vielen aufmunternden Unterhaltungen und Unterstützung im Laboralltag. Und natürlich bin ich auch meinen „Zimmerkollegen“ Katrin Schmoeckel und Oliver Nicolai überaus dankbar für ihre konstruktiven Vorschläge zu meiner Arbeit, die mir viele neuen Denkweisen und Ideen eröffnet haben.

Auch Mitarbeiter anderer Institute haben einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet. Ich möchte mich bei Herrn Professor Uwe Völker für die Kooperationen mit dem interfakultären Institut für Funktionelle Genomforschung und der Nutzung der Laborräume, sowie für viele konstruktive Gespräche und Anmerkungen zu den Manuskripten bedanken. Viel Zeit und Geduld haben auch Frank Schmidt und Leif Steil aufgebracht. Ich danke euch dafür, dass ihr mir bei der Auswertung der vielen Proteomdaten und der Datenbanken geholfen habt und immer offen für neue Ideen und Projekte wart. Manuela Gesell Salazar danke ich für die Auswertung der MS-Daten. Stephan Michalik und Nandakumar Sundaramoorthy möchte ich für die Messungen am Flexmap3D danken. Diese Daten stellen zusammen mit den Proteomdaten einen der Kernpunkte meiner Arbeit dar. Marc Burian danke ich für die Zurverfügungstellung des Bakteriophagen für die Erstellung des *protein A*-negativen USA300.

Jana Kumpfmüller führte mich mit ihrer großen Erfahrung in die Methodik der SLIC-Klonierung ein und stellte das Plasmid und die Bakterienstämme zur Verfügung. Ein Dank dafür geht an dieser Stelle auch an Herrn Professor Thomas Schweder. Für die Aufreinigung der rekombinanten Proteine haben Erik Richter und Falko Hochgräfe ihre Äkta zur Verfügung gestellt. Ein herzliches Dankeschön auch an euch beide.
Die umfangreichen Untersuchungen der Immunantwort auf *S. aureus*-Proteine wäre ohne die verschiedenen Patienten- und Kontroll-Kohorten nicht möglich gewesen. Ich danke allen Spendern für ihre Bereitschaft Blut zu spenden. Herrn Professor Claus Bachert danke ich für die Proben der Asthma-Patienten und die vielen konstruktiven Gespräche. Ebenso möchte ich Ellen Renner und Frau Professor Barbara Kahl für die Seren der HIES-Patienten bzw. CF-Patienten danken. Mary-Claire Roghmann ermöglichte mit den Seren der *S. aureus*-Bakteriämiepatienten das initiale Experiment für die Untersuchungen zum Schutz durch Antikörper bei *S. aureus*-Infektionen. Und Herrn Professor Thomas Werfel und Frau Professor Regine Gläser möchte ich für die Zurverfügungstellung der AD- und Psoriasis-Seren danken.

Aus den hier vorgestellten Untersuchungen sind auch Veröffentlichungen und Manuskripte entstanden. Ich danke allen Co-Autoren für die zahlreichen Tipps und Anregungen beim Schreiben der Manuskripte.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer auf meinem Weg unterstützt haben.