

**Nekroseinduktion durch *Enterococcus faecium* in
eukaryoten Wirtszellen:
Untersuchungen zur Rolle von Lysozym, bakterieller
Adhäsion und extrazellulärer Sauerstoffradikale**

**Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Höring, Steffen**

2015

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. S.Gröbner

2. Berichterstatter: Professor Dr. V.Jendrossek

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Die Gattung <i>Enterococcus</i>	7
1.1.1	Geschichte und Taxonomie	7
1.1.2	Mikrobiologische Eigenschaften	8
1.2	Die klinische Bedeutung von Enterokokken	8
1.2.1	Enterokokken als Krankheitserreger	8
1.2.2	Pathogenese von <i>Enterococcus spp.</i> Infektionen	9
1.2.3	Virulenzfaktoren von <i>E. faecium</i>	10
1.2.4	Antibiotikaresistenzen	13
1.2.5	Die <i>E. faecium</i> CC17-Population	14
1.3	Lysozymabhängige Nekroseinduktion durch <i>E. faecium</i>	15
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	17

2. Material und Methoden

2.1	Bakterien	19
2.1.1	Verwendete Bakterienstämme	19
2.1.2	Kultivierung und Zellzahlbestimmung	20
2.2	Eukaryotische Zellen	21
2.2.1	Verwendete Primärzellen und Zelllinien	21
2.2.2	Zellkultur und Aufbereitung der Zellen am Versuchstag	22
2.2.3	Zellzahlbestimmung	23
2.2.4	Zellkulturmedien	24
2.3	Infektionsexperimente	26
2.4	Zelltodanalyse mittels Durchflusszytometrie	27
2.4.1	Positivkontrollen	27
2.4.2	Abfall des inneren mitochondrialen Transmembranpotentials	27
2.4.3	Aufnahme von Propidiumiodid	27
2.4.4	Durchflusszytometrie und Datenauswertung	27

2.5	Darstellung des Zytoskeletts infizierter Zellen	28
2.6	Adhäsion von <i>E. faecium</i> an eukaryoten Zellen	29
2.7	Statistik	30
3.	Ergebnisse	
3.1	Zelltodinduktion durch <i>E. faecium</i>	31
3.1.1	Zelltodinduktion durch <i>E. faecium</i> in Epithelzellen	33
3.1.1.1	HeLa-Zellen	34
3.1.1.2	CaCo-2-Zellen	36
3.1.1.3	CMT-93-Zellen	37
3.1.2	Zelltodinduktion durch <i>E. faecium</i> in myeloiden Zellen	38
3.1.2.1	U-937-Monozyten	39
3.1.2.2	J774A.1-Makrophagen	40
3.1.2.3	Primäre Dendritische Zellen	42
3.1.3.	Zelltodinduktion durch <i>E. faecium</i> in lymphoiden Zellen	44
3.1.3.1	Primäre Thymozyten	44
3.1.3.2	Jurkat J16-Zellen	46
3.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Zelltodinduktion	47
3.2	Zerstörung des Zytoskeletts durch <i>E. faecium</i> in HeLa-Zellen	48
3.3	Lysozymabhängige Steigerung der Adhäsion von <i>E. faecium</i> an HeLa-Zellen	50
4.	Diskussion	55
5.	Zusammenfassung	61
6.	Literaturverzeichnis	63
7.	Abkürzungen	67
8.	Veröffentlichung	68
9.	Danksagung	69
10.	Lebenslauf	70

1. Einleitung

1.1 Die Gattung *Enterococcus*

1.1.1 Geschichte und Taxonomie

Lange Zeit wurde den Enterokokken nur eine geringe klinische Bedeutung beigemessen. Sie galten als harmlose, kommensale Bakterien, die den Verdauungstrakt von Mensch und Tier besiedeln und nur selten klinisch apparente Infektionen verursachen (9). Mit den ersten Berichten über Vancomycin-resistente Enterokokken Ende der Achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurde dieses Bild zunehmend in Frage gestellt (30).

Heute ist die Rolle der Enterokokken als bedeutende nosokomiale Krankheitserreger unumstritten. In Europa sind sie derzeit der zweithäufigste Erreger von Wund- und Harnwegsinfekten und der dritthäufigste Erreger von Bakteriämien (9).

Die Bezeichnung „entérocoque“ wurde erstmals 1899 von Thiercelin verwendet und sollte das intestinale Habitat dieser damals neu beschriebenen Diplokokken betonen. Die ersten Vertreter wurden zunächst noch als Streptokokken bezeichnet, so zum Beispiel *Streptococcus faecalis* und *Streptococcus faecium*, die zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts erstmals isoliert und beschrieben wurden (31).

1937 teilte Sherman die Familie der *Streptococcaceae* in vier Untergruppen ein: Neben der Viridans-Gruppe, der Pyogenes-Gruppe und der Milchsäure-Gruppe beschrieb er die Enterokokken-Gruppe als Streptokokken faekalen Ursprungs mit hoher Temperaturtoleranz (37).

Erst 1984 konnten Schleifer und Kilpper-Bälz durch molekularbiologische Analysen *S. faecium* und *S. faecalis* ausreichend scharf von den übrigen Streptokokken abgrenzen und sie als eigenständige Gattung *Enterococcus* etablieren (36). Neben ihren wichtigsten Vertretern *E. faecium* und *E. faecalis* umfasst die Gattung *Enterococcus* derzeit 26 weitere Spezies (28).

1.1.2 Mikrobiologische Eigenschaften

Enterokokken sind gram-positive, fakultativ anaerobe Kokken, die zu den Milchsäurebakterien gezählt werden. Sie verfügen nicht über Cytochrome und sind somit katalase-negativ (31). Morphologisch unterscheiden sie sich nicht von Streptokokken. So erscheinen sie wie Streptokokken einzeln, paarweise oder in kurzen Ketten. Anhand der C-Substanz, einem immunogenen Zellwandpolysaccharid, das nach Rebecca Lancefield zur Einteilung der Streptokokken herangezogen wird, lassen sich die Enterokokken der Serogruppe D zuordnen (9).

Die Vertreter der Gattung *Enterococcus* zeichnen sich durch ihre hohe Anpassungsfähigkeit aus. Sie vermehren sich in 6,5% NaCl-Lösung, in einem pH-Wert Bereich von 4,6-9,6 und bei Temperaturen zwischen 5 und 50 °C. Anders als die nah verwandten Streptokokken überleben Enterokokken Hitze von bis zu 60 °C über 30 min hinweg und sind sehr widerstandsfähig gegenüber chemischen Desinfektionsmitteln wie beispielsweise Alkohol und Chlor (9, 28, 40).

Als wichtiger Bestandteil der Darmflora von Mensch und Tier lassen sich Enterokokken im Stuhl der meisten gesunden Erwachsenen nachweisen. Hierbei findet sich *E. faecalis* in 10 - 100fach höheren Konzentrationen in menschlichen Stuhlproben als *E. faecium*. Seltener besiedeln sie den Mund- und Rachenraum oder lassen sich als Bestandteil der Genitalflora nachweisen. Ihre robusten Eigenschaften ermöglichen es den Enterokokken, auch andere Nischen zu besiedeln. So finden sie sich sowohl in Abwasser- und Bodenproben als auch in Lebensmitteln (9).

1.2 Die klinische Bedeutung von Enterokokken

1.2.1 Enterokokken als Krankheitserreger

Als physiologischer Bestandteil der Darmflora werden Enterokokken *a priori* nur als geringfügig pathogen angesehen. Jedoch können sie als opportunistische Erreger eine Reihe von Krankheitsbildern verursachen. Dazu zählen Endokarditiden, Septikämien, Harnwegsinfekte, intraabdominale Infektionen und Wundinfektionen (31).

Während überwiegend immunsupprimierte Patienten, wie z.B. hämatologische Patienten oder Organtransplantierte, Septikämien durch Enterokokken entwickeln, treten Endokarditiden und urogenitale Infektionen auch bei immunkompetenten Patienten auf. Intraabdominale Infektionen und Harnwegsinfektionen lassen sich häufig auf invasive Therapiemaßnahmen wie chirurgische Eingriffe oder das Anlegen von Blasenverweilkathetern zurückführen (20).

Bis in die zweite Hälfte des 20. Jahrhunderts hinein verursachte *E. faecalis* zehnmal häufiger Infektionen als die restlichen Enterokokkenarten zusammen (30). Seit dem Aufkommen Vancomycin-resistenter Enterokokken lässt sich ein Wandel des Erregerspektrums hin zu *E. faecium* feststellen. 2005 waren in Deutschland 13% aller Enterokokkenisolate aus Blutkulturen Vancomycin-resistente Stämme (22). Die Tatsache, dass die Gruppe der VRE von *E. faecium* dominiert wird, begründet die hohe klinische Relevanz dieser Enterokokkenart heutzutage (30).

1.2.2 Pathogenese von *Enterococcus* spp. Infektionen

Es erscheint zunächst widersprüchlich, dass Enterokokken als Kommensalen des Menschen auch lebensbedrohliche, systemische Infektionen verursachen können. Tatsächlich sind die Mechanismen, die zur Pathogenese von Enterokokkeninfektionen beitragen, noch nicht ausreichend geklärt.

Bei einem Teil der nosokomialen Infektionen handelt es sich um sogenannte Device-assoziierte Infektionen, bei denen Enterokokken Biofilme ausbilden und entlang von Fremdmaterialien wie z.B. Kathetern in die Blutbahn oder die ableitenden Harnwege gelangen (31).

Jedoch können systemische Enterokokkeninfektionen auch von Populationen ausgehen, die zuvor lediglich den Darm des Erkrankten besiedeln. In diesem Fall verläuft die Infektion in einem zweistufigen Prozess, bei dem zunächst eine asymptomatische Kolonisation des Darms vorliegt, auf die unter bestimmten Umständen eine Translokation der Enterokokken in lymphatische Organe und in den Blutkreislauf folgt.

Voraussetzung für die erfolgreiche Besiedlung des Darms ist die Adhäsionsfähigkeit von Enterokokken. Daher kolonisieren Enterokokkenstämme, die über zusätzliche Adhäsionsfaktoren wie z.B. aggregation substance verfügen, bevorzugt den Darm (18). Auch eine Antibiotika-Resistenz kann indirekt die Besiedlung des Darms begünstigen. Werden im Rahmen einer Antibiotikatherapie Teile der physiologischen Standortflora unterdrückt, kommt es zu einer unausgewogenen Fehlbesiedlung des Darms zu Gunsten des resistenten Erregers (30).

Das alleinige Vorhandensein potentiell pathogener Enterokokkenstämme in der Intestinalflora reicht jedoch nicht aus, um eine Infektion auszulösen. Im Allgemeinen muss hierfür zusätzlich die Immunantwort des Wirtes eingeschränkt sein (4, 23).

Unter welchen Umständen und vor allem auf welche Weise Enterokokken aus dem Darm invadieren und systemische Infektionen auslösen ist nur lückenhaft beschrieben. Im Tiermodell wurde gezeigt, dass Enterokokken die intakte Darmschleimhaut überwinden und sich in mesenterialen Lymphknoten, der Milz und der Leber ansiedeln (43). Es wird angenommen, dass Darmepithelzellen, die Enterokokken phagozytieren, diese an ihrer basolateralen Seite wieder in das submuköse Gewebe und das lymphatische System entlassen (20) .

Außerdem wurde beobachtet, dass manche Enterokokkenarten nach erfolgter Phagozytose durch Makrophagen, diese als Vehikel benutzen können, um im Wirt zu disseminieren, ohne dabei Schaden zu nehmen (20). Dieses Phänomen könnte ebenfalls dazu beitragen, dass Enterokokken die Schleimhautbarriere des Darms überwinden und systemische Infektionen auslösen.

1.2.3 Virulenzfaktoren von *E. faecium*

Verschiedene Virulenzfaktoren wurden bereits bei Enterokokken beschrieben. Darunter befinden sich adhäsionsvermittelnde Zellwandproteine wie zum Beispiel AS (Aggregation Substance) und Esp (Extracellular surface protein).

Auch sezernierte bakterielle Eiweiße wie Zytolysin, Gelatinase und Hyaluronidase gelten als Virulenzfaktoren. Durch Zerstörung des umgebenden Gewebes ermöglichen sie die Invasion des Wirtsorganismus und stellen

Nährstoffe zur Verfügung (9, 18). Darüber hinaus wurde bei Enterokokken auch die Produktion extrazellulärer radikaler Sauerstoffspezies (ROS) beschrieben, eine Eigenschaft, die unter anderem mit der Entstehung von Darmkrebs in Verbindung gebracht wird (39).

Die genannten Virulenzfaktoren wurden häufig bei *E. faecalis* beschrieben, bei *E. faecium* kommen diese jedoch seltener vor. Das Spektrum der bekannten Virulenzfaktoren von *E. faecium* ist derzeit noch relativ klein und Gegenstand aktueller Forschung.

Zur Ermittlung weiterer Virulenzfaktoren wurde daher das Genom klinischer *E. faecium*-Isolate mit dem Erbgut apathogener *E. faecium*-Populationen verglichen. Hierbei fanden sich über 100 Gene, die vornehmlich in pathogenen Stämmen auftreten und somit potentielle Virulenzfaktoren darstellen (44).

Darunter befanden sich auch das *esp*- und das *sgrA*-Gen. Diese beiden Virulenzfaktoren sollen im Folgenden ausführlich besprochen werden, da sie eine zentrale Rolle in der Fragestellung dieser Arbeit einnehmen.

Bei *Esp* handelt es sich um ein Zellwandprotein, das zunächst nur bei *E. faecalis* beschrieben wurde. Dort trägt es entscheidend zur Biofilmbildung bei und begünstigt die Adhäsion von Enterokokken an Urothelzellen bei aufsteigenden Harnwegsinfekten (9).

Durch molekularbiologische Analysen wurde das *esp*-Gen auch bei klinischen *E. faecium*-Isolaten gefunden. Es zeigt eine 90%ige Übereinstimmung mit dem *esp*-Gen von *E. faecalis* und liegt ebenso wie dieses auf einer sogenannten Pathogenitätsinsel (siehe 1.2.5) (13, 21). Erste Untersuchungen zur Funktion des Proteins beschreiben eine vermehrte Biofilmbildung und eine gesteigerte initiale Adhäsion an Kunststoffoberflächen. Außerdem ermöglicht es höhere Konjugationsraten und ist mit einer gesteigerten Resistenz gegenüber Betalaktam-Antibiotika assoziiert (13).

SgrA ist ein Zellwand-assoziiertes Protein, das hauptsächlich in klinischen *E. faecium*-Stämmen zu finden ist. Das Vorliegen eines sogenannten LPXTG-Motivs in der Aminosäuresequenz lässt darauf schließen, dass es durch das Enzym Sortase geschnitten und in der Zellwand verankert wird (27).

SgrA vermittelt die Bindung an die extrazellulären Matrixmoleküle Nidogen und Fibrinogen (14). Darüber hinaus zeichnen sich SgrA-exprimierende Stämme durch eine vermehrte Biofilmbildung auf Kunststoffoberflächen aus (14). Für die Adhäsion von *E. faecium* an verschiedenen Epithelzellen scheint SgrA hingegen keine Rolle zu spielen (14).

Ein weiterer Virulenzfaktor, der im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte, ist die Produktion extrazellulärer reaktiver Sauerstoffradikale. Sie findet sich außer bei Enterokokken (39) auch bei anderen gram-positiven Bakterien wie z.B. Streptokokken (17) oder Laktobazillen (12).

Die bakterizide Wirkung von Wasserstoffperoxid verschafft diesen Spezies einen Vorteil bei der Besiedlung ihrer Nische, indem die kompetitive Standortflora gehemmt wird (34). Außerdem wurde die Produktion radikaler Sauerstoffspezies durch Enterokokken mit der Entstehung von Darmkrebs in Verbindung gebracht (39).

Darüber hinaus konnte aber auch gezeigt werden, dass extrazelluläre Sauerstoffspezies zur Pathogenese von Infektionen beitragen. Eine Schädigung des Alveolarepithels durch Wasserstoffperoxid wurde im Tiermodell bereits für Pneumokokken beschrieben (7). Auch für *E. faecium* konnte ein zytotoxischer Effekt auf Wirtszellen durch freie Sauerstoffradikale belegt werden. Hier zeigte sich in einem oralen Infektionsmodell, dass die Toxizität von *E. faecium* gegenüber dem Nematoden *C. elegans* proportional mit der Menge der produzierten Sauerstoffradikale ansteigt (29).

1.2.4 Antibiotikaresistenzen

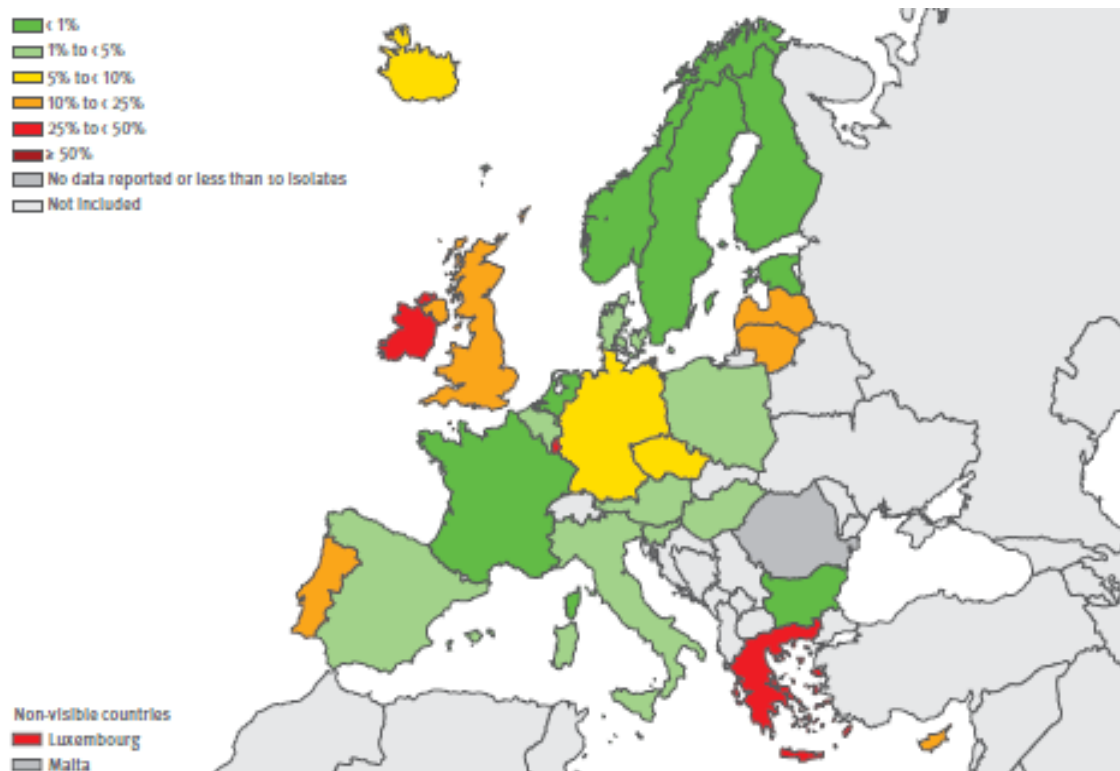


Abb. 1.1 VRE-Anteil unter klinischen *E. faecium*-Isolaten in der Europäischen Union (8)

Enterokokken sind vor allem wegen der zunehmenden Rate von Glykopeptid-resistenten Stämmen ein Problem.

Der erste Bericht über Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) stammt aus dem Jahr 1988 (2). Seither nahm die VRE-Prävalenz stetig zu, so dass im Jahr 2003 Vancomycin-resistente Enterokokken bereits 26,4% der klinischen Isolate auf Intensivstationen in den Vereinigten Staaten ausmachten (5). Wie aus Abb. 1.1 hervorgeht, liegt Deutschland bezüglich der VRE-Prävalenz im europäischen Mittelfeld. 2009 betrug der prozentuale Anteil Vancomycin-resistenter Enterokokken an allen klinischen *E. faecium*-Isolaten in Deutschland 6,1% (8).

Begünstigt wurde die Entwicklung Glykopeptid-resistenter Stämme nicht nur durch großzügige Antibiotikaverordnungen im klinischen Bereich, sondern auch durch den massiven Einsatz von Avoparcin als Wachstumsbeschleuniger in der Tierhaltung (44).

Unter den bislang bekannten sechs Genotypen, die Vancomycin-Resistenz verursachen, sind der *vanA*- und *vanB*-Typ die häufigsten (41). Die Resistenz kommt in diesem Fall durch die Synthese von Peptidoglykanen mit verminderter Glykopeptidaffinität zustande (39).

Die Synthese von Aminoglykosid-modifizierenden Acetyltransferasen oder Phosphotransferasen und der damit verbundene Phänotyp einer High-Level-Aminoglykosid-Resistenz stellt eine weitere erworbene Antibiotikaresistenz von Enterokokken dar (6).

Im Gegensatz dazu gehört die Low-Level-Resistenz gegenüber Aminoglykosiden zu den intrinsischen Antibiotikaresistenzen von Enterokokken. Sie ist darauf zurückzuführen, dass Aminoglykoside in niedriger Konzentration die Zellwand nicht passieren können, um an ihren Wirkort zu gelangen (4).

Ein weiteres Beispiel einer intrinsischen Resistenz von Enterokokken ist ihre geringe Empfindlichkeit für Betalaktam-Antibiotika, insbesondere gegenüber Cephalosporinen. Hier spricht man auch von der sogenannten Enterokokkenlücke der Cephalosporine. Sie wird durch alternative Penicillin-Bindeproteine verursacht und ist besonders bei *E. faecium* ausgeprägt (39, 46). Die häufige, erworbene High-Level-Resistenz gegenüber Ampicillin bei *E. faecium* beruht ebenfalls auf diesem Resistenzmechanismus. In diesem Fall liegt eine Überproduktion oder eine Mutation des Penicillin-Bindeproteins 5 vor (40).

1.2.5 Die *E. faecium* CC17-Population

Epidemiologische Untersuchungen zur globalen Verbreitung nosokomialer *E. faecium*-Stämme zeigen bestimmte Muster auf und lassen Schlüsse über die Evolution dieser Population zu.

In den Vereinigten Staaten ging der Phase der hohen VRE-Prävalenz eine Phase des gehäuften Auftretens Ampicillin-resistenter Enterokokken voraus. Eine ähnliche Entwicklung, jedoch mit 10 Jahren Verzögerung, zeichnet sich auch in Europa ab (40). Dies deutet daraufhin, dass krankenhausedaptierte Enterokokken in einem mehrstufigen Evolutionsprozess entstehen, bei dem sie durch horizontalen Gentransfer mehr und mehr Resistenz- bzw. Virulenzgene

anhäufen und sich dadurch einen zunehmenden Selektionsvorteil verschaffen. Dieser Effekt wird auch als genetischer Kapitalismus oder Matthew-Effekt bezeichnet (22).

Außerdem stieg in Europa die VRE-Prävalenz im klinischen Bereich, obwohl der Einsatz von Glykopeptiden in der Tiermast bereits 1997 verboten wurde. Es muss sich bei den klinischen Isolaten also um einen wirts- bzw. krankenhausspezifischen Enterokokkenstamm handeln, der sich unabhängig von Vancomycin-resistenten Stämmen aus der Tierhaltung entwickelt hat (44).

Vergleichende molekularbiologische Untersuchungen klinischer *E. faecium*-Isolate bestätigen diese beiden Annahmen. Es zeigte sich, dass eine bestimmte Subpopulation, für die sich die Bezeichnung Clonal Complex 17 (CC17) etabliert hat, für die große Mehrheit der nosokomialen Infektionen verantwortlich ist (44).

Charakteristisch für die CC17-Population ist die Resistenz gegenüber Ampicillin und Chinolonen, sowie das Vorhandensein einer sogenannten Pathogenitätsinsel (45). Hierbei handelt es sich um einen Abschnitt des bakteriellen Chromosoms mit mehreren Genen, der sich vom restlichen Chromosom durch seinen geringen Cytosin-Guanin-Anteil unterscheidet. Auf diesem Abschnitt, der wahrscheinlich *en bloque* durch horizontalen Gentransfer erworben wurde, findet sich neben anderen Virulenzgenen auch das *Esp*-Gen (21). Die meisten Vancomycin-resistenten Enterokokkenisolate in Krankenhäusern zählen zur CC17-Population (44).

In dieser Arbeit wurde neben einem apathogenen *E. faecium*-Stamm (ATCC 6057), auch ein klinisches Isolat (E1162), das zur CC17-Population gehört, verwendet.

1.3 Lysozymabhängige Nekroseinduktion durch *E. faecium*

Lysozym ist ein bakterizides Enzym, das einen wichtigen Bestandteil der humoralen, unspezifischen Infektionsabwehr bei Mensch und Tier darstellt. Es lässt sich unter anderem im Speichel, in der Tränenflüssigkeit, im Blut und im Verdauungstrakt nachweisen (26). Durch hydrolytische Spaltung des Peptidoglykans (Murein) zwischen der N-Acetylmuraminsäure und

dem N-Acetylglukosamin wirkt es lytisch auf Bakterien und wird daher auch als Muramidase bezeichnet (19).

Es wurde beobachtet, dass die Inkubation von *E. faecium* mit Lysozym dem Bakterium zytotoxische Eigenschaften verleiht, welche in Abwesenheit von Lysozym fehlen. So zeigen murine Makrophagen, die mit lysozymbehandelten *E. faecium* infiziert werden, eine perforierte Zellmembran und weitere charakteristische Zeichen des nekrotischen Zelltods, wie beispielsweise Volumenzunahme und eine Vakuolisierung des Zytoplasmas (11).

Die genaue Ursache für diesen Effekt konnte bisher nicht gefunden werden. Weitergehende Untersuchungen kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass es sich um ein bakterielles, membranständiges Protein handeln könnte, das unter Lysozymeinwirkung freigelegt wird und daraufhin Nekrose induziert (11).

In wie weit die zytotoxischen Eigenschaften von *E. faecium* zur Pathogenese von Infektionen beitragen, ist weitgehend unklar. Im Peritonitismodell der Maus konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass in Anwesenheit von Lysozym vermehrt Zelltod in Peritonealmakrophagen auftritt (11). Außerdem könnte Lysozym, welches an vielen potentiellen Infektionseintrittspforten sezerniert wird, es den Enterokokken ermöglichen, die epitheliale Barriere durch Zelltodinduktion zu überwinden und in das darunterliegende Gewebe zu invadieren.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Enterococcus faecium induziert abhängig von Lysozym Nekrose in murinen Makrophagen. Ob dieser Effekt außer bei Makrophagen auch bei weiteren eukaryoten Zellen auftritt und damit zur Pathogenese von *E. faecium* Infektionen beitragen könnte wurde bisher nicht untersucht.

Daher sollten in dieser Arbeit zunächst weitere eukaryote Zellen, die für die lysozymabhängige Zelltodinduktion durch *E. faecium* suszeptibel sind, definiert werden. Hierfür wurden verschiedene, an der Infektionsabwehr beteiligte Zellarten wie epitheliale, myeloide und lymphoide Zellen untersucht.

Darüber hinaus sollte eine mögliche Wirtsabhängigkeit des zytotoxischen Effekts durch den Vergleich humaner und muriner Zellen ermittelt werden.

Die für die Zelltodinduktion verantwortlichen bakteriellen Faktoren, konnten bislang noch nicht hinreichend aufgeklärt werden. Daher wurden in dieser Arbeit ein apathogener *E. faecium*-Stamm (ATCC 6057) und ein klinisches Isolat (E1162), welches verschiedene Pathogenitätsfaktoren aufweist, verglichen. Dadurch sollten mögliche Unterschiede hinsichtlich des zytotoxischen Potentials zwischen diesen beiden Stämmen aufgezeigt werden. Darüber hinaus gibt es in der Literatur bereits Hinweise, dass Zellwandproteine von *E. faecium* zur Zelltodinduktion in murinen Makrophagen beitragen.

Deshalb sollte in dieser Arbeit, mithilfe entsprechender *E. faecium*-Mutanten, die Bedeutung der bakteriellen Zellwandproteine SgrA und Esp für die lysozymabhängige Zelltodinduktion aufgedeckt werden.

Als weiteres potentiell zytotoxisches Agens sollte die Rolle bakterieller extrazellulärer Sauerstoffradikale geprüft werden. Auch hierfür sollten entsprechende *E. faecium*-Mutanten verwendet werden.

Schließlich sollte geklärt werden, inwiefern Lysozym die Adhäsion von *E. faecium* an Wirtszellen beeinflusst und welche Rolle die Adhärenz von Bakterien bei der lysozymabhängigen Zelltodinduktion spielt.

2. Material und Methoden

2.1 Bakterien

2.1.1 Verwendete Bakterienstämme

Tab. 2.1: Verwendete Bakterienstämme

<i>E. faecium</i> -Stamm	Beschreibung	Referenz
ATCC 6057	Isolat aus Käse, apathogen	ATCC
E1162	klinisches Isolat (CC17) aus einer Blutkultur, <i>esp</i> und <i>sgrA</i> positiv (Wildtyp)	Wildtyp und Knock-Out-Varianten wurden freundlicherweise von Rob J. Willems zur Verfügung gestellt (13, 14)
E1162 Δ <i>sgrA</i>	Knock-Out-Variante mit Insertions-Deletions-Mutation im <i>sgrA</i> -Gen und plasmidcodierter Chloramphenicol-Resistenz	
E1162 Δ <i>esp</i>	Knock-Out-Variante mit Insertions-Deletions-Mutation im <i>esp</i> -Gen und plasmidcodierter Chloramphenicol-Resistenz	
SE34	Isolat aus einer Stuhlprobe eines gesunden Freiwilligen ohne klinischen Hintergrund (32),	Wildtyp und Knock-Out-Varianten wurden freundlicherweise von Frederick M. Ausubel zur Verfügung gestellt (29)
2F22	Knock-Out-Variante des SE34-Stamms mit Insertions-Deletions-Mutation. Fehlende Produktion von extrazellulärem Wasserstoffperoxid, Erythromycin-resistent	

2.1.2 Kultivierung und Zellzahlbestimmung

Die in Tab 2.1 aufgeführten Bakterien wurden über Nacht in 5 ml Hirn-Herz-Bouillon (eigene Herstellung, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universität Tübingen) bei 37 °C unter aeroben Bedingungen auf einem Schüttelinkubator kultiviert. Die beiden E1162-Mutanten wurden unter Zusatz von 10 µg/ml Chloramphenicol (Sigma, Taufkirchen) angezüchtet, um sicherzustellen, dass sich nur die Knock-Out-Klone vermehren. Bei der *E. faecium* 2F22-Variante wurden 10 µg Erythromycin (Sigma, Taufkirchen) pro ml Medium zugegeben, um auch hier den entsprechenden Selektionsdruck auszuüben.

Am Versuchstag wurden die Bakterien zentrifugiert (5 min, 4000 g, 24 °C), der Überstand abgesaugt und anschließend das Bakterienpellet in 1ml vorgewärmtem PBS (Invitrogen, Karlsruhe) resuspendiert. Zur Ermittlung der Bakterienkonzentration ($C_{\text{Bakterien}}$) dieser Suspension wurde folgendermaßen vorgegangen:

Ein Aliquot der Suspension wurde im Verhältnis 1:20 verdünnt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm mittels eines Photometers (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg) bestimmt.

Anhand vorausgegangener Verdünnungsreihen, bei denen ebenfalls die optische Dichte gemessen wurde und die Bakterien anschließend ausplattiert wurden, um die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten zu ermitteln, wurde folgende lineare Beziehung zwischen Bakterienkonzentration und optischer Dichte ermittelt:

$$C_{\text{Bakterien}} = OD_{600 \text{ nm}} \times 6 \times 10^9 \text{ Enterokokken/ml}$$

2.2 Eukaryotische Zellen

2.2.1 Verwendete Primärzellen und Zelllinien

Tab 2.2: verwendete Primärzellen und Zelllinien

Klassifikation		Bezeichnung	Ursprung	Referenz	
Primäre Zellen	myeloid	Immature dendritische Zellen	i-DC Murine Zellen Knochenmark von BALB/c Mäusen	(25)	
	lymphoid	Thymozyten	Thymozyten Murine Zellen Thymus von BALB/c Mäusen		
Immortalisierte Zelllinien	myeloid	Makrophagen	J774A.1 Murine Zellen Tumor der BALB/c Maus	ATCC	
		Monozyten	U-937 Humane Zellen Pleurapunktat eines Lymphompatienten	(38)	
	lymphoid	T-Zellen	Jurkat J16 Humane Zellen Blut eines Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie	(1)	
	epithelial	Cervixepithelzellen	HeLa Humane Zellen Stark proliferierendes Cervixkarzinom	(24)	
		Darmepithelzellen	CaCo-2	Humane Zellen Kolorektales Karzinom	ATCC
			CMT-93	Murine Zellen Kolorektales Karzinom	(35)

2.2.2 Zellkultur und Aufbereitung der Zellen am Versuchstag

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden in der Laminar-Flow-Reinluftwerkbank (BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl) durchgeführt.

Sekundäre Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ in 20 ml antibiotikahaltigem Medium (siehe 2.2.4) kultiviert. Dabei wurden für adhärenente Zellen Schräghalsflaschen mit 175 cm² (Nunc, Langenselbold) bzw. 75 cm² Grundfläche (Greiner BIO-ONE, Frickenhausen) verwendet, nicht-adhärenente Zellen wurden in Einweg-Petrischalen (Greiner BIO-ONE) gezüchtet.

Je nach Zelldichte wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:5 bis 1:10 gesplittet. Hierfür mussten adhärenente Zellen zunächst vom Flaschenboden gelöst werden. Zu diesem Zweck wurden sie für 5 min im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) mit 5 ml Trypsin/EDTA (Invitrogen) inkubiert. Die Zellen konnten nun zur Weiterführung der Kultur verdünnt und erneut ausgesät werden.

Am Versuchstag wurden die Zellen in antibiotikafreies Medium überführt. Um adhärenente Zellen besonders schonend zu lösen, wurde hierfür statt Trypsin/EDTA der Enzymkomplex Accutase (Invitrogen) (5-15 min bei 37 °C im Brutschrank) verwendet. Nach Zentrifugation der Zellsuspension (400 g, 5 min, 24 °C), wurde das alte Medium abgesaugt und durch 10 ml antibiotikafreies Medium ersetzt.

Immature dendritischen Zellen (i-DC) wurden aus femoralen und tibialen Knochenmarkszellen von BALB/c-Mäusen gewonnen. Hierbei wurde nach dem Protokoll von Lutz et al. (25) vorgegangen. Die Zellen wurden in 10 ml DC-Medium in Petrischalen bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Am dritten Tag wurde 10 ml frisches Medium zugegeben. An Tag 6 und 8 wurden jeweils 10 ml der Zellkultur abgenommen, zentrifugiert (400 g, 5 min, 27 °C), in frischem DC-Medium resuspendiert und der Zellkultur wieder zugeführt.

Die Infektionsexperimente wurden an den Tagen 7, 8 und 9 in antibiotikafreiem Medium durchgeführt.

Primäre Thymozyten wurden am Versuchstag gewonnen. Hierfür wurde der Thymus aus BALB/c-Mäusen (Charles River, Sulzfeld) auf einem Zellsieb (BD Falcon, Franklin Lake) mithilfe eines Stempels einer 10ml Spritze (Braun, Melsungen) sanft zerrieben. Durch anschließendes Spülen des Siebs mit PBS konnten die Zellen von Bindegewebe getrennt und in einem Gefäß aufgefangen werden. Danach wurde die Zellsuspension zentrifugiert (400 g, 5 min, 27 °C), der Überstand abgesaugt und die Zellen in antibiotikafreiem Medium resuspendiert.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Nach Resuspension der Zellen in antibiotikafreiem Medium, wurde ein Aliquot dieser Lösung mit Trypanblau (Sigma-Aldrich, Steinheim) im Verhältnis 1:5 verdünnt. Die verdünnte Suspension wurde in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Anschließend wurden die lebenden, nicht blaugefärbten Zellen in 4 Gruppenquadranten gezählt und das arithmetische Mittel berechnet. Die Zellkonzentration der ursprünglichen Suspension ergab sich aus dem Mittelwert multipliziert mit dem Kammerfaktor (1×10^4 Zellen/ml) und dem Verdünnungsfaktor.

2.2.4 Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt und bei +4 °C gelagert. Verwendetes Fetales Kälberserum (FCS) wurde zuvor 30 min im Wasserbad bei 56 °C inaktiviert. Die Infektions- bzw. Adhäsionsversuche wurden in antibiotikafreiem Medium durchgeführt.

Tab 2.3: Kulturmedium für Jurkat-J16-Lymphozyten, J774A.1 Zellen und murine Thymozyten*

Substanz	Menge bzw. Konzentration	Hersteller
RPMI-1640	500 ml	Biochrom, Berlin
FCS	10%	Sigma, Taufkirchen
L-Glutamin 200 mM	1%	Invitrogen, Karlsruhe
Nicht-Essentielle Aminosäuren 1%	1%	Biochrom, Berlin
Natriumpyruvat 100 mM	1%	Biochrom, Berlin
β-Mercaptoethanol 0,08%	0,5%	AppliChem, Darmstadt
Pen-Strep 10 ⁴ U/ml Penicillin 10 ⁴ µg/ml Streptomycin	1%	Invitrogen, Karlsruhe

* Für murine Thymozyten wurde lediglich ein antibiotikafreies Versuchsmedium benötigt

Tab 2.4: Kulturmedium für HeLa-Zellen

Substanz	Menge bzw. Konzentration	Hersteller
RPMI-1640	500 ml	Biochrom, Berlin
FCS	10%	Sigma, Taufkirchen
L-Glutamin 200 mM	1%	Invitrogen, Karlsruhe
Pen-Strep 10 ⁴ U/ml Penicillin 10 ⁴ µg/ml Streptomycin	1%	Invitrogen, Karlsruhe

Tab 2.5: Kulturmedium für CMT-93 Zellen

Substanz	Menge bzw. Konzentration	Hersteller
DMEM-Medium	500 ml	PAA, Pasching
FCS	10%	Sigma, Taufkirchen
L-Glutamin 200 mM	1%	Invitrogen, Karlsruhe
Pen-Strep 10 ⁴ U/ml Penicillin 10 ⁴ µg/ml Streptomycin	1%	Invitrogen, Karlsruhe

Tab 2.6: Kulturmedium für CaCo-2 Zellen

Substanz	Menge bzw. Konzentration	Hersteller
DMEM-Medium	500 ml	PAA, Pasching
FCS	20%	Sigma, Taufkirchen
Nicht-Essentielle Aminosäuren 1%	1%	Biochrom, Berlin
Pen-Strep 10 ⁴ U/ml Penicillin 10 ⁴ µg/ml Streptomycin	1%	Invitrogen, Karlsruhe

Tab 2.7: Kulturmedium von U-937 Zellen

Substanz	Menge bzw. Konzentration	Hersteller
RPMI 1640	500 ml	Biochrom, Berlin
FCS	10%	Sigma, Taufkirchen

Tab 2.8: Kulturmedium für dendritische Zellen

Substanz	Menge bzw. Konzentration	Hersteller
RPMI 1640	500 ml	Biochrom, Berlin
FCS	10%	Sigma, Taufkirchen
Nicht-Essentielle Aminosäuren 1%	1%	Biochrom, Berlin
Natriumpyruvat 100 mM	1%	Biochrom, Berlin
L-Glutamin 200 mM	1%	Invitrogen, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	50 μ M	AppliChem, Darmstadt
GM-CSF	200 U/ml	Zellkulturüberstand der murinen Myelomzelllinie P3X63
Pen-Strep 10 ⁴ U/ml Penicillin 10 ⁴ μ g/ml Streptomycin	1%	Invitrogen, Karlsruhe

2.3 Infektionsexperimente

Für die Infektionsexperimente wurden 48-well Platten (BD Falcon, Franklin Lakes, USA) verwendet. Pro Vertiefung wurden 5×10^5 eukaryotische Zellen in 500 μ l antibiotikafreiem, vorgewärmtem Zellmedium ausgesät. Unmittelbar danach wurden die Zellen mit den verschiedenen *E. faecium*-Stämmen im Verhältnis 1:20 (MOI 20 [Multiplicity of Infection]) infiziert. Die Bakteriensuspension wurde dazu entsprechend mit PBS verdünnt, so dass 33 μ l der verdünnten Suspension einer Bakterienzahl von 1×10^7 entsprechen. Um zu gewährleisten, dass eukaryotische Zellen und Bakterien in Kontakt kommen, wurde die Platte zentrifugiert (5 min, 400 g, 24 °C) und anschließend während der gesamten Versuchsdauer (4 h) im Zell-Brutschrank (HeraCell, Haereus, Hanau) bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Lysozym aus Hühnereiweiß (Sigma) wurde 2,5 h nach Infektion in verschiedenen Konzentrationen (10 mg/ml und 1 mg/ml) zugegeben und die Zellen anschließend für 1,5 h weiterinkubiert.

2.4 Zelltodanalyse mittels Durchflusszytometrie

2.4.1 Positivkontrollen

Folgende Substanzen bzw. Methoden wurden als Kontrolle für die Induktion apoptotischen bzw. nekrotischen Zelltodes verwendet.

1. Staurosporin: Ein Alkaloid, das 1977 erstmalig aus *Streptomyces staurosporeus* isoliert wurde. Staurosporin ist ein nicht-selektiver Inhibitor der Proteinkinasen. Neben anderen Effekten wird die proteolytische Aktivität von Caspase-3 erhöht und apoptotischer Zelltod ausgelöst (3). Staurosporin (AppliChem) wurde in einer Konzentration von 4 μM eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 4 h.

2. Um Nekrose auszulösen, wurden eukaryotische Zellen für 10 min auf 60 °C erhitzt.

2.4.2 Abfall des inneren mitochondrialen Transmembranpotentials

Ein Merkmal der frühen Phase der Apoptose ist der Zusammenbruch des inneren mitochondrialen Transmembranpotentials $\Delta\Psi_m$. Um dieses Phänomen darzustellen, wurden die infizierten Zellen 15 min vor Versuchsende mit TMRE (40nM) (Invitrogen, Karlsruhe) inkubiert. TMRE ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich abhängig von $\Delta\Psi_m$ in Mitochondrien anreichert.

2.4.3 Aufnahme von Propidiumiodid

Propidiumiodid ist ein Farbstoff, der mit Nukleinsäuren interkaliert. Die Aufnahme von Propidiumiodid ins Zytosol setzt eine perforierte Zellmembran voraus, wie sie spät-apoptotisch oder beim nekrotischen Zelltod zu finden ist. Propidiumiod (PI) (Sigma) wurde am Versuchsende in einer Konzentration von 50 ng/ml zugegeben.

2.4.4 Durchflusszytometrie und Datenauswertung

Die gefärbten Zellen wurden im Durchflusszytometer (LSR Fortessa, BD Bioscience, Heidelberg) analysiert. Die gewonnenen Daten wurden mit der

Software BD FACSDiva 6.1.3 (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA) ausgewertet.

2.5 Darstellung des Zytoskeletts infizierter Zellen

Zusätzlich zur quantitativen Analyse des Zelltods mittels Durchflusszytometrie sollte die Reaktion des epithelialen Zytoskeletts auf die Infektion mit *E. faecium* untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Aktinfilamente infizierter Zellen mit Phalloidin gefärbt.

Dazu wurden Coverslips in einer 24-Well-Platte ausgelegt. Anschließend wurden pro Well 3×10^5 HeLa- bzw. CaCo-2-Zellen in antibiotikahaltigem Medium ausgesät und über Nacht bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das antibiotikahaltige Medium abgesaugt und der inzwischen dichte Zellrasen auf den Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen um nicht-adhärenente Zellen abzuspielen. Im Anschluss wurden beide Zellarten in antibiotikafreiem HeLa-Medium weiterinkubiert, um ein Ausfallen von Lysozymkristallen in CaCo-2-Medium zu verhindern.

Die Zellen wurden nun mit zwei verschiedenen *E. faecium*-Stämmen (ATCC 6057, E1162) im Verhältnis 1:100 (MOI 100) infiziert und die Multiwellplatte anschließend zentrifugiert (400 g, 24 °C, 5 min).

Nach einstündiger Inkubation in Medium bzw. mit *E. faecium* wurde Lysozym (10 mg/ml) in die Infektionsansätze zugegeben. Um das Zytoskelett im Verlauf darzustellen, wurden die infizierten Zellen 30 min bzw. 120 min mit Lysozym inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen zunächst bei 37°C für 60 min mit 4% Paraformaldehydlösung fixiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden dann für 5 min in 0,1% Triton X-100 Lösung (AppliChem) inkubiert, um die Zellen zu permeabilisieren. Nach weiteren Waschsritten (2 x mit PBS) wurden die Zellen für 20 min mit Phalloidin-TRITC 0,2% (Sigma) in einer dunklen, feuchten Kammer gefärbt.

Anschließend wurden die Deckgläschen mit PBS gewaschen, die Rückseite sorgfältig mit einem Präzisionswischtuch abgetrocknet und dann mit einem Tropfen Mowiol (Calbiochem, Darmstadt) auf einem Objektträger fixiert.

Die Präparate wurden über Nacht bei 4°C dunkel gelagert. Die Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgte am darauffolgenden Tag an einem DMRE Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar) bei 64facher Vergrößerung.

2.6 Adhäsion von *E. faecium* an eukaryoten Zellen

Um die Adhäsion der verschiedenen *E. faecium*-Stämme an Epithelzellen zu untersuchen, wurden Coverslips in einer 24-Well-Platte (Greiner BIO-ONE) ausgelegt. Am Vortag des Versuchs wurden pro Well 3×10^5 HeLa- bzw. CaCo2-Zellen in antibiotikahaltigem Medium ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Am Versuchstag wurde der nun dichte Zellrasen auf den Deckgläschen einmal mit PBS gewaschen und anschließend frisches, antibiotikafreies HeLa-Medium bei beiden Zellarten zugegeben. Dadurch sollte vermieden werden, dass im CaCo-2-Medium Lysozymkristalle ausfallen.

Zwei unterschiedliche *E. faecium*-Stämme (ATCC 6057, E1162) wurden entsprechend einer MOI 100 zugegeben und die Platte anschließend zentrifugiert (400 g, 24 °C, 5 min).

Nach Inkubation für 1 h im Brutschrank wurde ein Teil der Coverslips dreimal mit PBS gewaschen, um nicht-adhärenente Bakterien abzuspülen. Anschließend wurden die Zellen für 10 min mit vorgewärmten Paraformaldehyd 4% (Merck, Darmstadt) fixiert. Die übrigen Coverslips wurden für eine halbe Stunde in lysozymhaltigem Medium (10 mg/ml) weiterinkubiert und erst dann gewaschen und fixiert.

Um Bakterien und eukaryotische Zellen anzufärben, wurden die fixierten Coverslips nach dreimaligem Waschen mit PBS für 30 s mit Fuchsinlösung (Oxoid, Hampshire, U.K.) bedeckt und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Nach Lufttrocknung der Präparate wurden sie mit Roti-Histokit (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) auf einem Objektträger fixiert und erneut luftgetrocknet.

Die lichtmikroskopische Analyse der Präparate erfolgte mithilfe eines Olympus BX 51 Mikroskops (100x Objektiv). Hierzu wurden pro Präparat 8 zufällige Bildausschnitte eingestellt und digital fotografiert. Bakterien und Zellen konnten

anschließend mit Hilfe der Software ImageJ 1.42q (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) am Monitor ausgezählt werden.

2.7 Statistik

Es wurden jeweils mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Abweichungen davon sind im Ergebnisteil bei den jeweiligen Experimenten vermerkt. Um Unterschiede zwischen den Mittelwerten zweier Gruppen zu berechnen, wurde der ungepaarte, zweiseitige Student-t-Test verwendet. Eine Differenz von mindestens $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Zelltodinduktion durch *E. faecium*

E. faecium löst nach Inkubation mit Lysozym nekrotischen Zelltod in murinen Makrophagen aus (11). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass bestimmte bakterielle Zellwandproteine zur Nekroseinduktion beitragen (11).

Eines der Ziele dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob *E. faecium* unter Lysozymeinfluss in verschiedenen anderen Zellarten ebenfalls Zelltod auslöst. Hierzu wurden myeloide, lymphoide und epitheliale Zellen untersucht. Um mögliche wirtsabhängige Effekte zu erfassen, wurden sowohl murine als auch humane Zelllinien verwendet. Des Weiteren sollte durch die Verwendung zweier *E. faecium*-Mutanten untersucht werden, in wie weit die LPXTG-verankerten Zellwandproteine SgrA und Esp für den zytotoxischen Effekt von *E. faecium* verantwortlich sind.

Eukaryote Zellen wurden hierzu mit verschiedenen *E. faecium*-Stämmen (siehe Tab. 2.1, Seite 17) im Verhältnis 1:20 (MOI 20) infiziert. Nach 2,5 Stunden wurde Lysozym (10 mg/ml bzw. 1 mg/ml) zugegeben. Insgesamt 4 Stunden nach Infektion, wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) und TMRE gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Als Positivkontrollen dienten Zellen, die mit dem Apoptoseinduktor Staurosporin behandelt wurden und sich durch einen Abfall des inneren mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_m$ low) auszeichnen. Um eine Membranschädigung (PI positive Zellen) und damit einhergehend nekrotischen Zelltod zu verursachen, wurden die Zellen für 10 min bei 60 °C inkubiert.

Als Negativkontrollen wurden Zellen verwendet, die in Zellkulturmedium mit bzw. ohne Lysozym inkubiert worden waren.

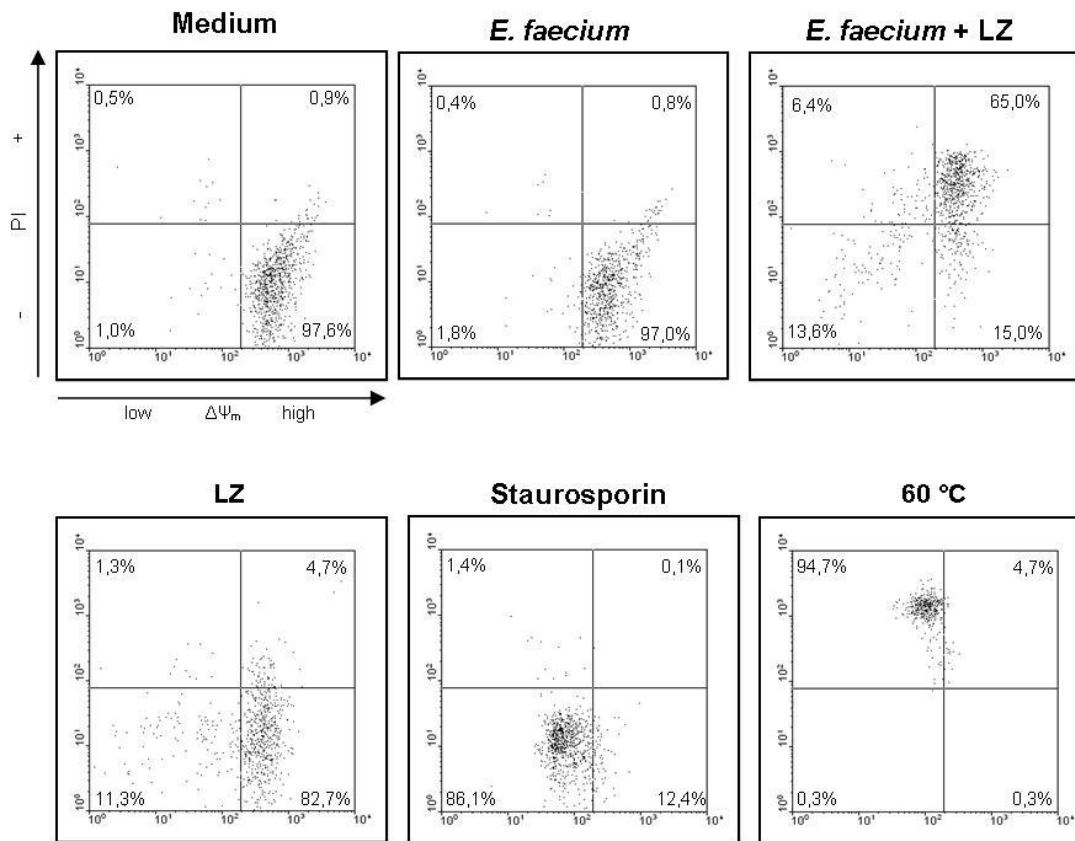


Abb. 3.1. Durchflusszytometrische Zelltodanalyse von U-937-Zellen. U-937-Zellen wurden mit *E. faecium* (MOI 20) infiziert. 2,5 h nach Infektion wurde Lysozym (LZ, 10 mg/ml) zugegeben. Insgesamt 4 h nach Infektion wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) und TMRE gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Positivkontrollen dienten Staurosporin-behandelte Zellen und Zellen, die für 10 min bei 60°C erhitzt wurden. Als Negativkontrollen wurden Zellen verwendet, die in Zellkulturmedium mit bzw. ohne Lysozym inkubiert worden waren. Dargestellt sind die Ergebnisse eines Versuchs von insgesamt n = 3 unabhängigen Versuchen.

In Abb 3.1 ist die durchflusszytometrische Zelltodanalyse exemplarisch für U-937-Zellen, einer humanen monozytären Zelllinie, dargestellt.

Im Vergleich mit Zellen, die in Medium inkubiert wurden, löste die Zugabe von Lysozym nahezu keinen Zelltod aus (82,7% versus 94% $\Delta\Psi_m$ high / PI negative Zellen).

Staurosporin-behandelte, frühapoptotische Zellen zeichneten sich durch einen Abfall des inneren transmembranären Potentials bei erhaltener Zellmembranintegrität aus (86,1% $\Delta\Psi_m$ low / PI negative Zellen). Bei

nekrotischen Zellen (60°C) waren die Mitochondrien depolarisiert und PI gelangte über die zerstörte Zellmembran ins Zellinnere (94,2 $\Delta\Psi_m$ low / PI positive Zellen).

U-937 Zellen, die mit *E. faecium* infiziert wurden, waren in Abwesenheit von Lysozym viabel (97,0% $\Delta\Psi_m$ high / PI negative Zellen), wohingegen die Zugabe von Lysozym eine Zerstörung der eukaryoten Zellmembran bei erhaltenem transmitochondrialen Membranpotential bewirkte (65% $\Delta\Psi_m$ high / PI positive Zellen).

3.1.1 Zelltodinduktion durch *E. faecium* in Epithelzellen

Enterokokken besiedeln als Kommensalen den Darm und andere Körperoberflächen. Im Folgenden wurde untersucht, ob Enterokokken unter dem Einfluss von Lysozym Zelltod in Epithelzellen auslösen und so möglicherweise zur Überwindung der epithelialen Barriere beitragen könnten. Darüber hinaus sollten durch den Vergleich verschiedener Darmepithelzelllinien und einer extraintestinalen Epithelzelllinie mögliche Unterschiede zwischen dem physiologischen Habitat und fehlbesiedelten Regionen analysiert werden.

3.1.1.1 HeLa-Zellen

HeLa-Zellen sind eine humane Zelllinie, die von einem Cervixkarzinom abstammt.

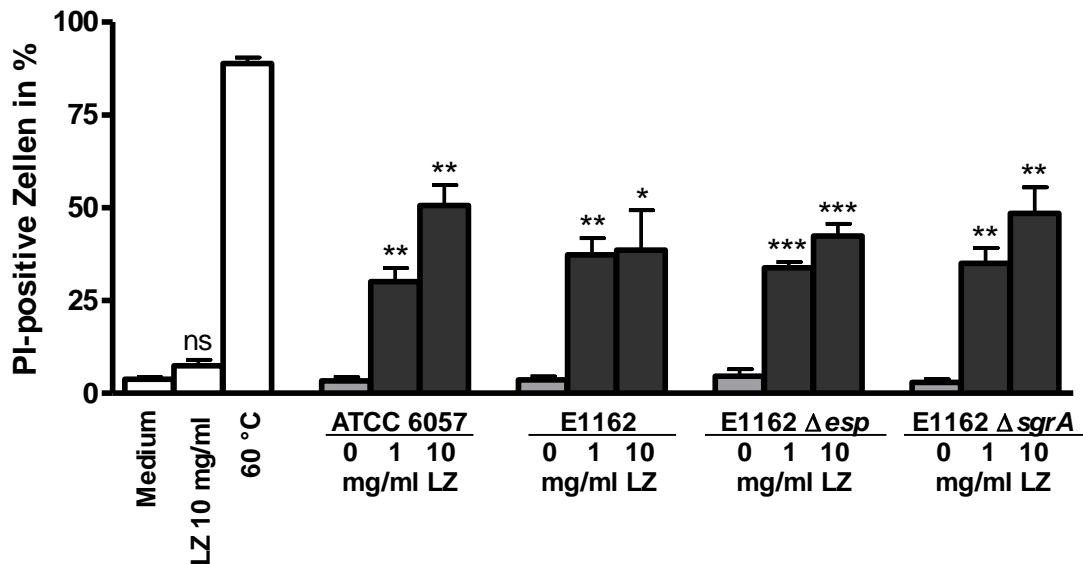


Abb. 3.1.1.1a Zelltodinduktion durch *E. faecium* in HeLa-Zellen Infektion von HeLa-Zellen mit unterschiedlichen *E. faecium*-Stämmen (MOI 20). 2,5 h nach Infektion wurde Lysozym (LZ, 1 mg/ml bzw. 10 mg/ml) zugegeben. Insgesamt 4 h nach Infektion wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) und TMRE gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Positivkontrolle wurden hitzebehandelte Zellen (60°C, 10 min) verwendet. Zellen, die in Zellkulturmedium ohne bzw. mit Lysozym (10 mg/ml) inkubiert wurden, dienen als Negativkontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen. Unterschiede zur entsprechenden infizierten Kontrolle ohne Lysozym bzw. zwischen den nicht-infizierten Kontrollen wurden wie folgt dargestellt: ns = nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Wie in Abb 3.1.1.1a gezeigt, hatte die Infektion mit verschiedenen *E. faecium*-Stämmen (ATCC, E1162 wt, E1162Δesp, E1162ΔsgrA) in Abwesenheit von Lysozym keinen zytotoxischen Einfluss auf HeLa-Zellen.

Im Gegensatz dazu führte die Infektion mit *E. faecium* in Anwesenheit von Lysozym zu einer deutlichen Zellschädigung. So waren unter dieser Bedingung (Lysozym 10 mg/ml) bis zu 50,6% (ATCC 6057) der HeLa-Zellen PI-positiv, was auf nekrotischen Zelltod bei perforierter Zellmembran hindeutet.

Verglichen mit dem Wildtyp-Stamm (E1162) induzierten die beiden Mutanten (E1162 Δ esp, E1162 Δ sgrA) gleichermaßen Zelltod. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die beiden Adhäsionsproteine Esp und SgrA nicht ursächlich für die lysozymabhängige Zelltodinduktion durch *E. faecium* in HeLa-Zellen sind.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der durch Lysozym hervorgerufene zytotoxische Effekt von *E. faecium* abhängig von der Lysozymkonzentration ist. So wurde der zytotoxische Effekt von *E. faecium* durch zehnfache Erhöhung der Lysozymkonzentration von 1 mg/ml auf 10 mg/ml gesteigert. Diese Dosisabhängigkeit deutet darauf hin, dass es sich um einen lysozymspezifischen Effekt handelt.

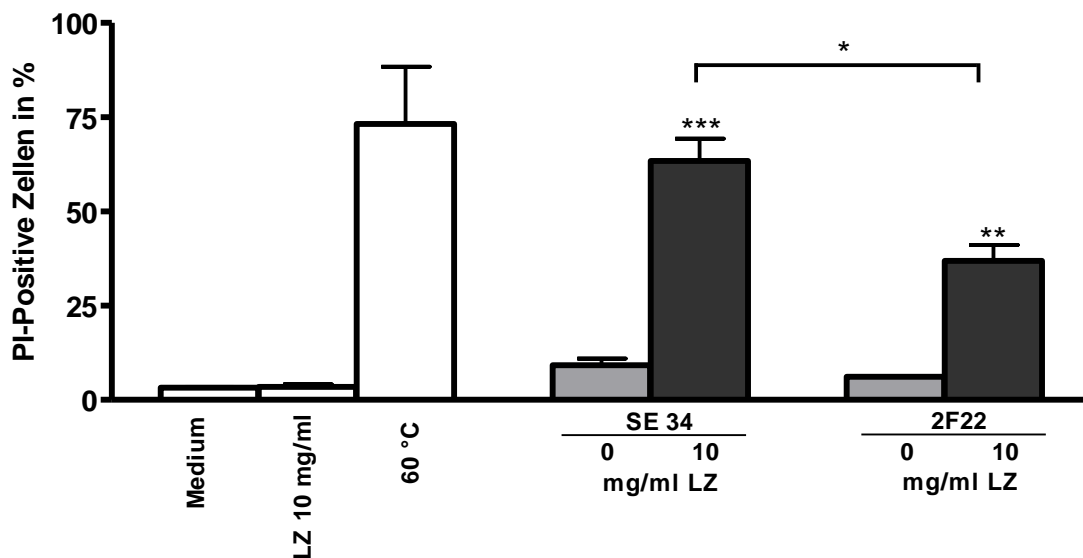


Abb. 3.1.1.1b ROS-abhängige Zelltodinduktion durch *E. faecium* in HeLa-Zellen Infektion (MOI 20) von HeLa-Zellen mit *E. faecium* SE34 (Wildtyp) und einer Mutante (2F22) mit fehlender ROS-Produktion. 2,5 h nach Infektion wurde Lysozym (LZ10 mg/ml) zugegeben. Insgesamt 4 h nach Infektion wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) und TMRE gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Positivkontrolle wurden hitzebehandelte Zellen (60°C, 10 min) verwendet. Zellen, die in Zellkulturmedium ohne bzw. mit Lysozym (10 mg/ml) inkubiert wurden, dienten als Negativkontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen. Unterschiede zur entsprechenden infizierten Kontrolle ohne Lysozym bzw. zwischen den nicht-infizierten Kontrollen wurden wie folgt dargestellt: ns = nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Des Weiteren wurde bei HeLa-Zellen der Beitrag extrazellulär produzierter Sauerstoffradikale zur lysozymabhängigen Zelltodinduktion untersucht. Abbildung 3.1.1.1b zeigt, dass die Zelltodrate verglichen mit dem Wildtyp-Stamm SE34 signifikant niedriger war, wenn HeLa-Zellen mit der ROS-defizienten *E. faecium*-Mutante 2F22 infiziert wurden. Daher könnte die Produktion extrazellulärer freier Sauerstoffradikale durch *E. faecium* zumindest teilweise zur lysozymabhängigen Nekroseinduktion in dieser Zelllinie beitragen.

3.1.1.2 CaCo-2-Zellen

CaCo-2-Zellen leiten sich von einem humanen, kolorektalen Karzinom ab.

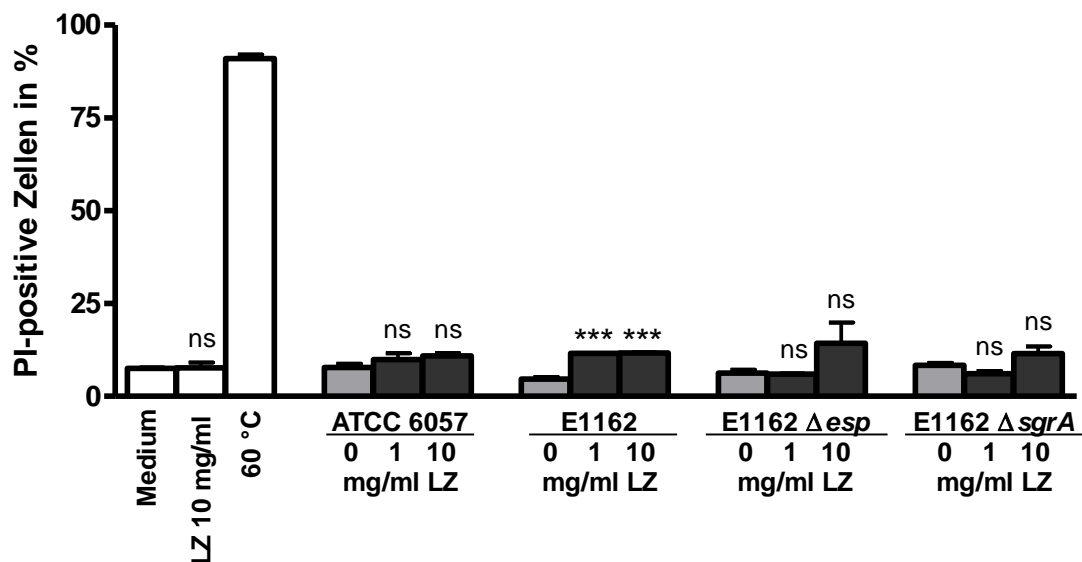


Abb. 3.1.1.2 Zelltodinduktion durch *E. faecium* in CaCo-2-Zellen Infektion von CaCo-2-Zellen mit unterschiedlichen *E. faecium*-Stämmen (MOI 20). 2,5 h nach Infektion wurde Lysozym (LZ, 1 mg/ml bzw. 10 mg/ml) zugegeben. Insgesamt 4 h nach Infektion wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) und TMRE gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Positivkontrolle wurden hitzebehandelte Zellen (60°C, 10 min) verwendet. Zellen, die in Zellkulturmedium ohne bzw. mit Lysozym (10 mg/ml) inkubiert wurden, dienen als Negativkontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen. Unterschiede zur entsprechenden infizierten Kontrolle ohne Lysozym bzw. zwischen den nicht-infizierten Kontrollen wurden wie folgt dargestellt: ns = nicht signifikant; *** $p < 0,005$.

Wie aus Abb. 3.1.1.2 hervorgeht, induzierten die verschiedenen *E. faecium*-Stämme (ATCC, E1162, E1162 Δ esp, E1162 Δ sgrA) in Abwesenheit von Lysozym keinen Zelltod in CaCo-2-Zellen.

Die Infektion mit *E. faecium* unter Zugabe von Lysozym verursachte nur eine sehr geringe Zunahme der PI-positiven Zellen (maximal 15%). Diese Zunahme war mit Ausnahme des E1162-Stamms jedoch nicht signifikant.

Zusammenfassend lassen diese Beobachtungen den Schluss zu, dass CaCo-2-Zellen für die lysozymabhängige Zelltodinduktion durch *E. faecium* nicht empfänglich sind.

3.1.1.3 CMT-93-Zellen

CMT-93-Zellen stammen von einem murinen, kolorektalen Karzinom ab.

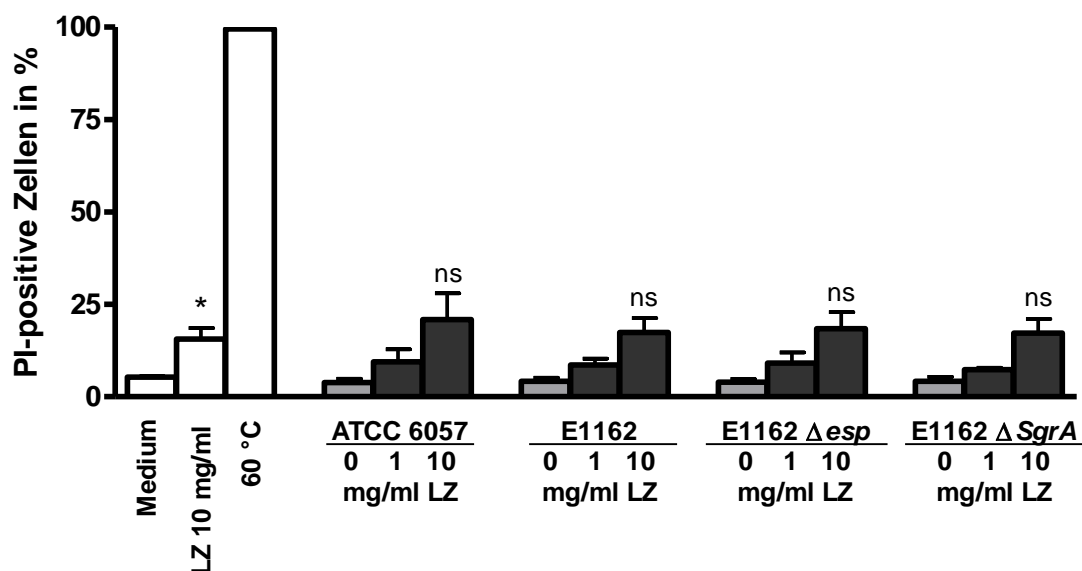


Abb. 3.1.1.3 Zelltodinduktion durch *E. faecium* in CMT-93-Zellen Infektion von CMT-93-Zellen mit unterschiedlichen *E. faecium*-Stämmen (MOI 20). 2,5 h nach Infektion wurde Lysozym (LZ, 1 mg/ml bzw. 10 mg/ml) zugegeben. Insgesamt 4 h nach Infektion wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) und TMRE gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Positivkontrolle wurden hitzebehandelte Zellen (60°C, 10 min) verwendet. Zellen, die in Zellkulturmedium ohne bzw. mit Lysozym (10 mg/ml) inkubiert wurden, dienten als Negativkontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen. Die Unterschiede zu nicht-infizierten, mit Lysozym (LZ, 10 mg/ml) behandelten Zellen waren nicht signifikant (ns). Die Zelltodrate lysozymbehandelter Zellen war gegenüber unbehandelten Zellen signifikant erhöht (* $p < 0,05$).

Abb. 3.1.1.3 zeigt, dass CMT-93-Zellen durch die Infektion mit verschiedenen *E. faecium*-Stämmen (ATCC, E1162, E1162 Δ esp, E1162 Δ sgrA) in Abwesenheit von Lysozym nicht geschädigt wurden.

Im Vergleich dazu zeigte die Infektion mit *E. faecium* nach Zugabe von Lysozym (1 mg/ml bzw. 10 mg/ml) deutlich höhere Zelltodraten. So wiesen unter diesen Bedingungen bis zu 20% (ATCC 6057, LZ 10 mg/ml) der Zellen eine perforierte Zellmembran auf, die das Eindringen von Propidiumiodid in das zytosolische Kompartiment zuließ.

Allerdings bewirkte bereits die Inkubation von CMT-93-Zellen mit Lysozym (10 mg/ml) alleine eine gesteigerte Propidiumiodidaufnahme (15,6% PI positive Zellen). So waren die Unterschiede zwischen der Negativkontrolle (LZ 10 mg/ml) und der Infektionsbedingung mit Lysozym (10 mg/ml) nicht signifikant. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass die Zelltodinduktion in der Infektionsbedingung mit Lysozym nicht auf *E. faecium* zurückzuführen ist, sondern vielmehr auf die zytotoxische Wirkung von Lysozym auf CMT-93-Zellen.

3.1.2 Zelltodinduktion durch *E. faecium* in myeloiden Zellen

Nachdem Enterokokken die mechanische Barriere der Haut bzw. der Schleimhäute überwunden haben, werden sie zunächst durch eine unspezifische Abwehrreaktion des Wirtsorganismus bekämpft. Myeloide Zellen repräsentieren die zelluläre Komponente der unspezifischen Immunantwort. Als Zellen, die zur Phagozytose und zur Antigenpräsentation fähig sind, können sie eingedrungene Erreger eliminieren und stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen unspezifischer und gerichteter Infektionsabwehr dar.

Nachdem gezeigt wurde, dass *E. faecium* in HeLa-Epithelzellen Zelltod induziert, sollte nun geklärt werden, ob Zellen der unspezifischen Abwehr ebenfalls für diesen Effekt empfänglich sind.

3.1.2.1 U-937-Monozyten

Humane U-937 Monozyten wurden ursprünglich aus einem Pleurapunktat eines Lymphompatienten gewonnen. Bei Monozyten handelt es sich um im Blut zirkulierende Vorläuferzellen der Gewebsmakrophagen.

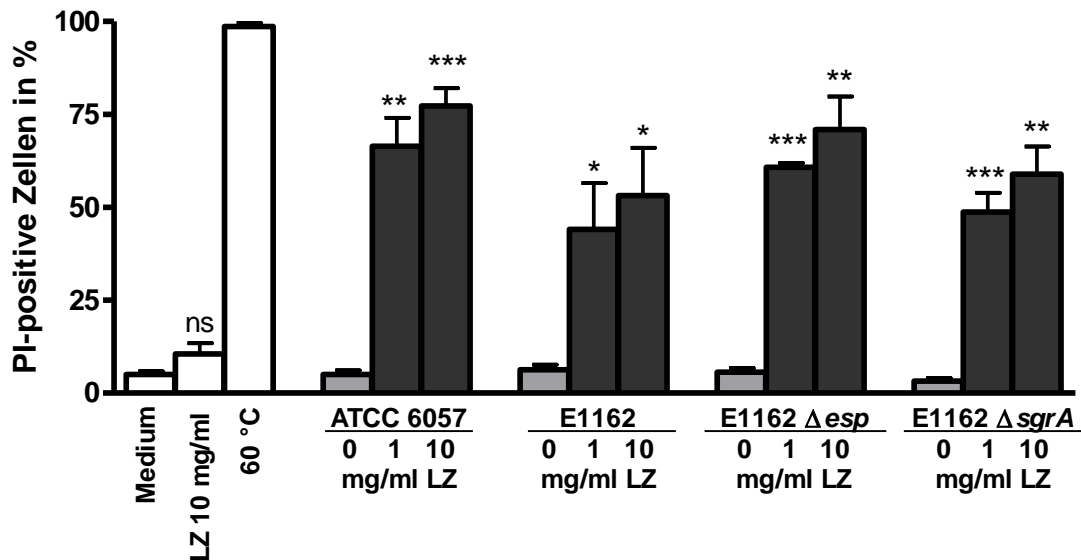


Abb. 3.1.2.1 Zelltodinduktion durch *E. faecium* in U-937-Zellen Infektion von U-937-Zellen mit unterschiedlichen *E. faecium*-Stämmen (MOI 20). 2,5 h nach Infektion wurde Lysozym (LZ, 1 mg/ml bzw. 10 mg/ml) zugegeben. Insgesamt 4 h nach Infektion wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) und TMRE gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Positivkontrolle wurden hitzebehandelte Zellen (60°C, 10 min) verwendet. Zellen, die in Zellkulturmedium ohne bzw. mit Lysozym (10 mg/ml) inkubiert wurden, dienen als Negativkontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen. Unterschiede zur entsprechenden infizierten Kontrolle ohne Lysozym bzw. zwischen den nicht-infizierten Kontrollen wurden wie folgt dargestellt: ns = nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Wie in Abb 3.1.2.1 dargestellt, induzierte die Infektion mit unterschiedlichen *E. faecium*-Stämmen (ATCC, E1162, E1162 Δ esp, E1162 Δ sgrA) keinen Zelltod in U-937-Zellen.

Wurde die Infektion der U-937-Zellen jedoch unter Zugabe von Lysozym (1 mg/ml bzw. 10 mg/ml) durchgeführt, zeigten sich bis zu 77,3% der Zellen PI-positiv (ATCC 6057) bei gleichzeitig erhaltenem mitochondrialen Transmembranpotential (siehe Abb. 3.1.1.1). Dieser Aspekt spricht dafür, dass

E. faecium in Anwesenheit von Lysozym die Membran von U-937-Zellen perforiert und dadurch Nekrose auslöst. Entsprechend führte die Erhöhung der Lysozymkonzentration von 1 mg/ml auf 10 mg/ml zu einer Steigerung der Zelltodinduktion durch *E. faecium*.

Der apathogene *E. faecium*-Stamm (ATCC 6057) zeigte gegenüber dem CC17-Isolat (E1162) eine stärkere Ausprägung des zytotoxischen Effekts.

Verglichen mit den beiden Knock-Out-Varianten (Δesp , $\Delta sgrA$) des E1162-Stammes, fiel die Nekroseinduktion beim Wildtyp sogar eher geringer aus. Es ist daher auszuschließen, dass die Adhäsionsproteine SgrA und Esp zur lysozymabhängigen Zelltodinduktion in U-937-Zellen beitragen.

3.1.2.2 J774A.1-Makrophagen

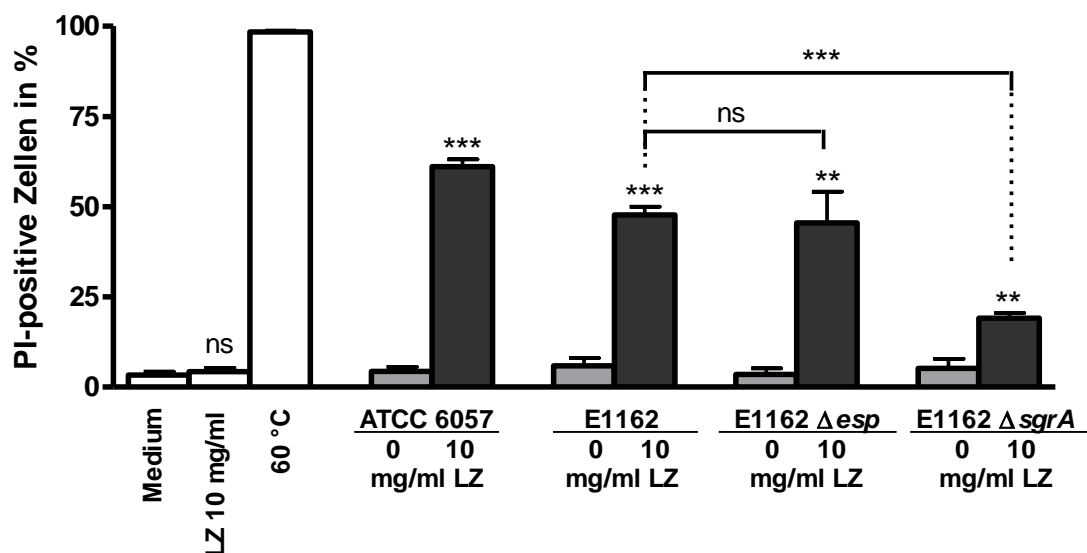


Abb. 3.1.2.2a Zelltodinduktion durch *E. faecium* in J774A.1-Zellen Infektion von J774A.1-Zellen mit unterschiedlichen *E. faecium*-Stämmen (MOI 20). 2,5 h nach Infektion wurde Lysozym (LZ, 1 mg/ml bzw. 10 mg/ml) zugegeben. Insgesamt 4 h nach Infektion wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) und TMRE gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Positivkontrolle wurden hitzebehandelte Zellen (60°C, 10 min) verwendet. Zellen, die in Zellkulturmedium ohne bzw. mit Lysozym (10 mg/ml) inkubiert wurden, dienten als Negativkontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen. In Abwesenheit von Lysozym waren die Unterschiede zwischen der Infektion mit dem E1162-Wildtyp und den E1162-Mutanten nicht signifikant. Unterschiede zur entsprechenden infizierten Kontrolle ohne Lysozym bzw. zwischen den Negativkontrollen wurden wie folgt dargestellt: ns = nicht signifikant; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Diese myeloide Zelllinie stammt von einem Tumor der BALB/c Maus ab.

Wie in Abb 3.1.2.2a zu sehen ist, wurden J774A.1-Makrophagen nach Infektion mit verschiedenen *E. faecium*-Stämmen (ATCC, E1162, E1162 Δ esp, E1162 Δ sgrA) nicht geschädigt.

Im Gegensatz dazu zeigte *E. faecium* zytotoxische Eigenschaften gegenüber J774A.1-Zellen, wenn die Infektion unter Zugabe von Lysozym (10 mg/ml) erfolgte. So zeigten sich unter dieser Bedingung, bei Verwendung des apathogenen *E. faecium*-Stamms (ATCC 6057) bis zu 61,1% der Zellen PI-positiv. Im Vergleich dazu fiel die Zelltodrate bei der Infektion mit einem nosokomialen *E. faecium*-Stamm (E1162) unter Lysozymeinfluss etwas geringer aus.

Um die Bedeutung der Adhäsionsproteine Esp und SgrA für den lysozymabhängigen zytotoxischen Effekt von *E. faecium* auf J774A.1-Zellen zu untersuchen, wurden die beiden E1162-Mutanten (Δ esp, Δ sgrA) mit dem Wildtyp verglichen. Hierbei zeigte sich, dass bei Verwendung des Esp-defizienten Stamms, der Anteil PI-positiver Zellen annähernd auf demselben Niveau lag wie bei Verwendung des Wildtyps. Aus diesem Ergebnis lässt sich ableiten, dass Esp nicht zur Zelltodinduktion durch *E. faecium* beiträgt. Abweichend davon ließ sich nach der Infektion mit der SgrA-defizienten *E. faecium*-Mutante eine um ca. 60% verminderte Zelltodrate gegenüber dem Wildtyp beobachten. Diese Resultate deuten darauf hin, dass das Adhäsionsprotein SgrA im Gegensatz zu Esp zumindest teilweise zur lysozymabhängigen Zelltodinduktion in J774A.1-Makrophagen beiträgt.

Außerdem wurde bei dieser Zelllinie der Beitrag extrazellulär produzierter Sauerstoffradikale zur lysozymabhängigen Zelltodinduktion analysiert. Aus Abbildung 3.1.2.2b geht hervor, dass nach Infektion mit dem ROS-produzierenden *E. faecium*-Stamms SE34 65,3% nekrotische Zellen auftraten. Im Gegensatz dazu wurde nach Infektion mit der ROS-defizienten Mutante 2F22 nur in 42,4% der Zellen Nekrose induziert. Somit ist es wahrscheinlich, dass zumindest ein Teil der beobachteten lysozymabhängigen Zelltodinduktion sich auf die extrazelluläre Produktion freier Sauerstoffradikale durch *E. faecium* zurückführen lässt.

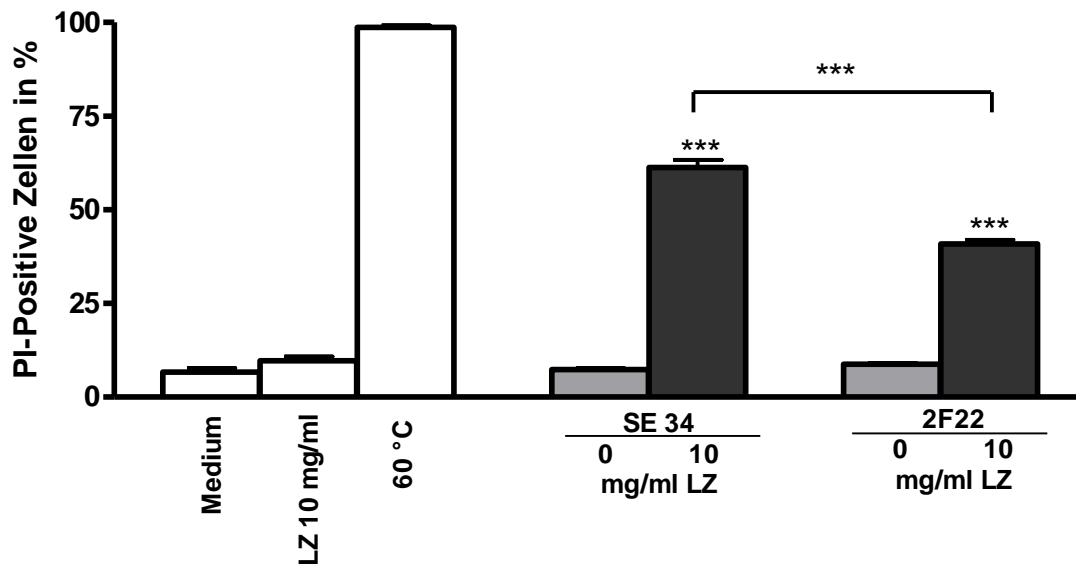


Abb. 3.1.2.2b ROS-abhängige Zelltodinduktion durch *E. faecium* in J774A.1-Zellen Infektion (MOI 20) von J774A.1-Zellen mit *E. faecium* SE34 (Wildtyp) und einer Mutante (2F22) mit fehlender ROS-Produktion. 2,5 h nach Infektion wurde Lysozym (LZ 10 mg/ml) zugegeben. Insgesamt 4 h nach Infektion wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) und TMRE gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Positivkontrolle wurden hitzebehandelte Zellen (60°C, 10 min) verwendet. Zellen, die in Zellkulturmedium ohne bzw. mit Lysozym (10 mg/ml) inkubiert wurden, dienten als Negativkontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen. Unterschiede zur entsprechenden infizierten Kontrolle ohne Lysozym bzw. zwischen den nicht-infizierten Kontrollen wurden wie folgt dargestellt: ns = nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Die Versuche zur Zelltodinduktion bei J774A.1-Makrophagen mit dem ATCC- bzw. den E1162-Stämmen wurden bereits im Vorfeld dieser Arbeit von Sabine Gröbner (Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universität Tübingen) durchgeführt.

3.1.2.3 Primäre dendritische Zellen

Vorläuferzellen der dendritischen Zellen wurden aus dem Knochenmark von BALB/c-Mäusen gewonnen und nach mehrtägiger Inkubation als unreife, dendritische Zellen für die Infektionsversuche verwendet.

Dendritische Zellen sind im Körper an potentiellen Eintrittspforten lokalisiert. Sie prozessieren aufgenommene Antigene, um diese in benachbarten Lymphknoten zu präsentieren.

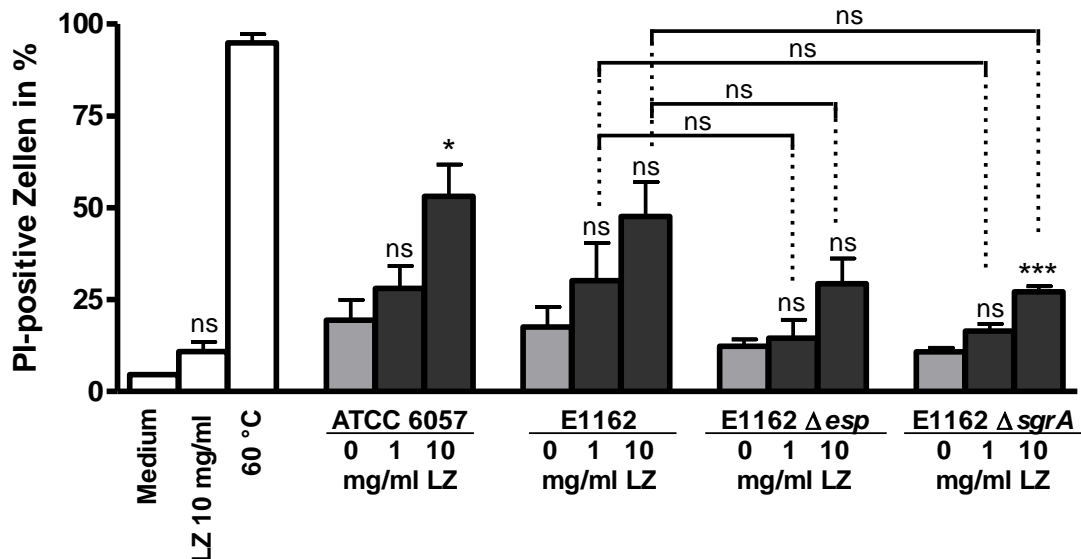


Abb. 3.1.2.3 Zelltodinduktion durch *E. faecium* in dendritischen Zellen. Infektion von dendritischen Zellen mit unterschiedlichen *E. faecium*-Stämmen (MOI 20). 2,5 h nach Infektion wurde Lysozym (LZ, 1 mg/ml bzw. 10 mg/ml) zugegeben. Insgesamt 4 h nach Infektion wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) und TMRE gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Positivkontrolle wurden hitzebehandelte Zellen (60°C, 10 min) verwendet. Zellen, die in Zellkulturmedium ohne bzw. mit Lysozym (10 mg/ml) inkubiert wurden, dienen als Negativkontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen. In Abwesenheit von Lysozym waren die Unterschiede zwischen der Infektion mit dem E1162-Wildtyp und den E1162-Mutanten nicht signifikant. Unterschiede zur entsprechenden infizierten Kontrolle ohne Lysozym bzw. zwischen den nicht-infizierten Kontrollen wurden wie folgt dargestellt: ns = nicht signifikant; * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$.

Im Vergleich zur Mediumkontrolle verursachte die Infektion mit unterschiedlichen *E. faecium*-Stämmen (ATCC, E1162, E1162Δesp, E1162ΔsgrA) nur eine geringfügige Schädigung dendritischer Zellen (Abb 3.1.2.3).

Jedoch zeigte *E. faecium* zytotoxische Eigenschaften gegenüber dendritischen Zellen, wenn 2,5 h nach der Infektion Lysozym zugegeben wurde. Eine

Steigerung der Lysozymkonzentration um das Zehnfache hatte eine deutliche Zunahme der Zelltodrate bei dendritischen Zellen zur Folge.

Statistisch signifikant war dieser Effekt bei Verwendung des apathogenen *E. faecium*-Stammes (ATCC 6057). Hier konnte eine Zunahme PI-positiver Zellen von 19% auf 53% in Anwesenheit von Lysozym (10 mg/ml) beobachtet werden.

Verglichen mit dem Wildtyp, lösten die beiden E1162-Mutanten (Δesp , $\Delta sgrA$) sowohl ohne als auch mit Lysozym weniger Zelltod aus. Dieser Unterschied erwies sich jedoch nicht als statistisch signifikant.

Somit ist eine Beteiligung der Zellwandproteine SgrA und Esp an der lysozymabhängigen Zelltodinduktion durch *E. faecium* in dendritische Zellen unwahrscheinlich.

3.1.3 Zelltodinduktion durch *E. faecium* in lymphoiden Zellen

Eine gerichtete Immunantwort des Wirtes gegen pathogene Enterokokken erfolgt erst, nachdem bakterielle Eiweiße durch Antigen-präsentierende Zellen, wie z.B. dendritische Zellen oder Makrophagen prozessiert und präsentiert wurden. Der zelluläre Anteil der spezifischen Immunantwort besteht aus der Reaktion von T-Lymphozyten, sowie der Sekretion humoraler Antikörper durch B-Lymphozyten. Diese Vorgänge sind wiederum eng mit unspezifischen Abwehrmechanismen verflochten. In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob sich T-Zellen für die lysozymabhängige Zelltodinduktion durch *E. faecium* empfänglich zeigen.

3.1.3.1 Primäre Thymozyten

Die verwendeten primären Thymozyten stammen aus dem Thymus von BALB/c Mäusen. Sie sind die Vorläuferzellen der reifen, immunkompetenten T-Lymphozyten, die sich in der Peripherie finden.

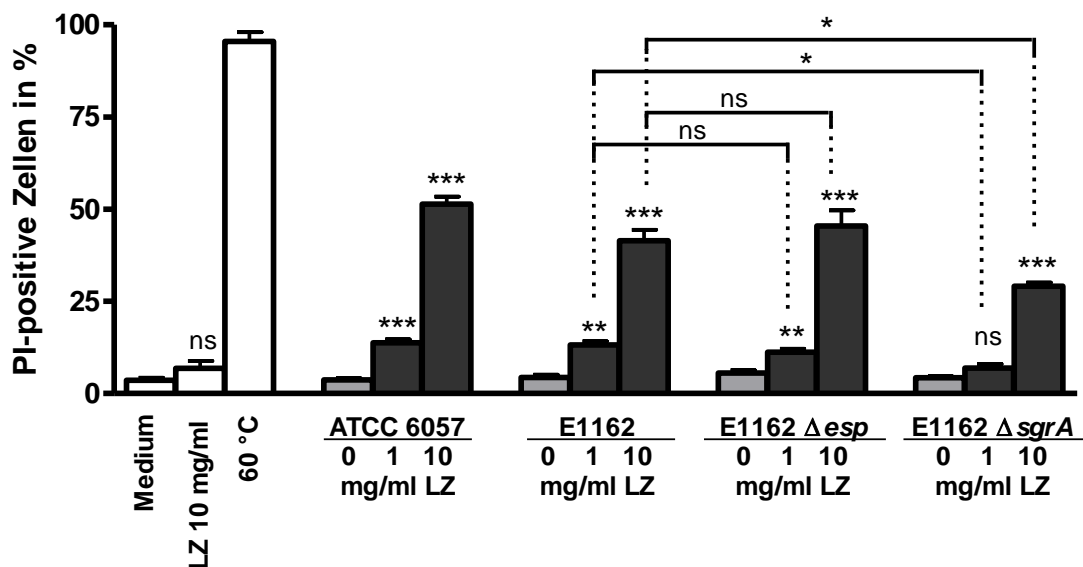


Abb. 3.1.3.1 Zelltodinduktion durch *E. faecium* in primären Thymozyten von BALB/c Mäusen Infektion von primären Thymozyten mit unterschiedlichen *E. faecium*-Stämmen (MOI 20). 2,5 h nach Infektion wurde Lysozym (LZ, 1 mg/ml bzw. 10 mg/ml) zugegeben. Insgesamt 4 h nach Infektion wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) und TMRE gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Positivkontrolle wurden hitzebehandelte Zellen (60°C, 10 min) verwendet. Zellen, die in Zellkulturmedium ohne bzw. mit Lysozym (10 mg/ml) inkubiert wurden, dienten als Negativkontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen. In Abwesenheit von Lysozym waren die Unterschiede zwischen der Infektion mit dem E1162-Wildtyp und den E1162-Mutanten nicht signifikant. Unterschiede zur entsprechenden infizierten Kontrolle ohne Lysozym bzw. zwischen den Negativkontrollen wurden wie folgt dargestellt: ns = nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

In Abb. 3.1.3.1. ist dargestellt, dass die verwendeten *E. faecium*-Stämme (ATCC, E1162, E1162 Δesp , E1162 $\Delta sgrA$) keinen Zelltod in primären Thymozyten induzierten. Die Zelltodrate stieg jedoch um das bis zu 13fache (ATCC 6057), nachdem zu den Infektionsansätzen Lysozym (10 mg/ml) zugegeben wurde. Im Vergleich zu ATCC 6057 zeigte das *E. faecium*-Isolat E1162 einen geringfügig schwächeren zytotoxischen Effekt.

Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass die SgrA-defiziente *E. faecium*- Variante unter Lysozymeinfluss (10 mg/ml) ca. 25% weniger Zelltod in Thymozyten auslöst als der Wildtyp bzw. die Esp-defiziente Mutante. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Adhäsionsprotein SgrA zumindest

teilweise ursächlich für den lysozymabhängigen Zelltod durch *E. faecium* in Thymozyten ist.

Bei allen untersuchten *E. faecium*-Stämmen ließ sich der zytotoxische Effekt auf Thymozyten durch eine Steigerung der Lysozymkonzentration von 1 mg/ml auf 10 mg/ml verstärken. Dieses Ergebnis hebt die entscheidende Rolle von Lysozym für die Zelltodinduktion durch *E. faecium* hervor.

3.1.3.2 Jurkat J16-Zellen

Bei Jurkat J16-Zellen handelt es sich um eine humane, immortalisierte T-Zelllinie, die aus dem Blut eines Patienten mit lymphatischer Leukämie isoliert wurde.

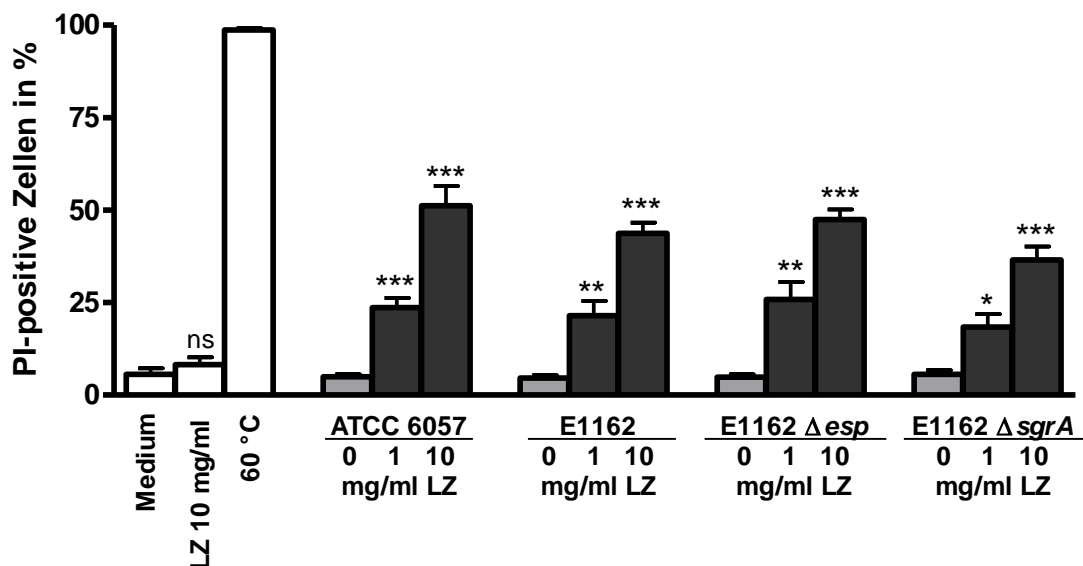


Abb. 3.1.3.2 Zelltodinduktion durch *E. faecium* in Jurkat J16-Zellen Infektion von Jurkat J16 Zellen mit unterschiedlichen *E. faecium*-Stämmen (MOI 20). 2,5 h nach Infektion wurde Lysozym (LZ, 1 mg/ml bzw. 10 mg/ml) zugegeben. Insgesamt 4 h nach Infektion wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) und TMRE gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Positivkontrolle wurden hitzebehandelte Zellen (60°C, 10 min) verwendet. Zellen, die in Zellkulturmedium ohne bzw. mit Lysozym (10 mg/ml) inkubiert wurden, dienten als Negativkontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Versuchen. Unterschiede zur entsprechenden infizierten Kontrolle ohne Lysozym bzw. zwischen den Negativkontrollen wurden wie folgt dargestellt: ns = nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Abb. 3.1.3.2 stellt die Ergebnisse, der an Jurkat J16-Zellen mit unterschiedlichen *E. faecium*-Stämmen (ATCC, E1162, E1162 Δ esp, E1162 Δ sgrA) durchgeführten Infektionsversuche dar. Es zeigte sich, dass keiner der *E. faecium*-Stämme in Abwesenheit von Lysozym eine zellschädigende Wirkung hatte.

Wurden die Zellen jedoch mit *E. faecium* infiziert und anschließend Lysozym (10 mg/ml bzw. 1 mg/ml) zugegeben, zeigte sich ein signifikant größerer Anteil PI-positiver Zellen der bei bis zu 50,1% (ATCC 6057) lag. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass unter dieser Bedingung die eukaryote Zellmembran perforiert wurde und dadurch Nekrose in Jurkat J16-Zellen ausgelöst wurde.

Der apathogene *E. faecium*-Stamm ATCC 6057 zeigte hierbei ein geringfügig stärkeres zytotoxisches Potential als der nosokomiale Stamm der CC17-Linie (E1162).

Bei beiden Knock-Out-Varianten des E1162-Stamms führte die Infektion von Jurkat J16-Zellen in Anwesenheit von Lysozym gleichermaßen wie beim Wildtyp zu einer Steigerung der Zelltodrate. Dieses Ergebnis spricht gegen eine kausale Rolle der beiden Adhäsionsproteine SgrA und Esp bei der lysozymabhängigen Zelltodinduktion durch *E. faecium* in Jurkat J16-Zellen.

Darüber hinaus konnte auch bei dieser Zelllinie eine Dosisabhängigkeit des zytotoxischen Effekts von *E. faecium* beobachtet werden. So verursachte die zehnfache Erhöhung der Lysozymkonzentration auch eine deutliche Steigerung der Zelltodrate von Jurkat J16-Zellen.

3.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Zelltodinduktion

In der Gesamtschau erwiesen sich beinahe alle untersuchten Zelllinien als suszeptibel gegenüber der lysozymabhängigen Zelltodinduktion durch *E. faecium*. Bei allen empfänglichen Zelllinien war 4 h nach Infektion eine Perforation der Zellmembran (PI positiv) bei erhaltenem innerem mitochondrialen Transmembranpotential ($\Delta\Psi_m$ high) festzustellen. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass durch die Infektion mit *E. faecium* in Anwesenheit von Lysozym nekrotischer Zelltod in den untersuchten Zelllinien ausgelöst wird. Eine Ausnahme hiervon bildeten die beiden Darmepithelzelllinien CaCo-2

(human) und CMT-93 (murin), bei denen kein zytotoxischer Effekt durch *E. faecium* in Anwesenheit von Lysozym nachweisbar war.

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten *E. faecium*-Stämmen konnte nicht festgestellt werden. Jedoch fielen die Zelltodraten bei Verwendung des *E. faecium* Käse-Isolats (ATCC 6057) geringfügig höher aus als dies bei Infektion mit dem klinischen *E. faecium*-Isolat der Fall war. Daher ist es wahrscheinlich, dass der zytotoxische Effekt weniger durch spezielle Pathogenitätsfaktoren von klinischen Isolaten verursacht wird, sondern eher auf eine generelle Eigenschaft von *E. faecium* zurückzuführen ist.

So wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass freie Sauerstoffradikale, die von *E. faecium* produziert werden, zumindest teilweise zur lysozymabhängigen Zelltodinduktion durch *E. faecium* beitragen könnten. Entsprechend fiel die Zelltodrate in HeLa- und J774A.1-Zellen geringer aus, wenn statt den ROS-produzierenden *E. faecium*-Stamm SE34 die ROS-defiziente Mutante 2F22 verwendet wurde.

Darüber hinaus ließen die Ergebnisse den Schluss zu, dass bei zwei untersuchten murinen Zelllinien (J774A.1, primäre Thymozyten) ein Zusammenhang zwischen der Expression des Oberflächenproteins SgrA, eines Proteins welches in klinischen Isolaten beschrieben wurde, und der lysozymabhängigen Zelltodinduktion besteht. Entsprechend zeigte sich im Vergleich zum E1162-Wildtyp eine signifikante Verminderung der Zelltodrate dieser Zellen bei Infektion mit der *sgrA*-defizienten Mutante.

3.2 Zerstörung des Zytoskeletts durch *E. faecium* in HeLa-Zellen

Bei der durchflusszytometrischen, quantitativen Analyse der lysozymabhängigen Zelltodinduktion durch *E. faecium* konnten teilweise starke Unterschiede zwischen einzelnen Zelllinien festgestellt werden. Besonders ausgeprägt war dieser Unterschied innerhalb der Epithelzelllinien. Hier erwiesen sich HeLa-Zellen als empfänglich für den lysozymabhängigen, zytotoxischen Effekt von *E. faecium*, während bei CaCo-2-Zellen keine Zelltodinduktion zu beobachten war.

Durch die Darstellung des Zytoskeletts infizierter Zellen, sollten morphologische Unterschiede zwischen diesen beiden Zelllinien im zeitlichen Verlauf der Infektion dargestellt werden.

Zu diesem Zweck wurden am Vorabend des Versuchs HeLa- bzw. CaCo-2-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und am nächsten Tag mit *E. faecium* (E1162, MOI 100) infiziert. Nach 1 h wurde Lysozym (10 mg/ml) zugegeben und für weitere 30 min bzw. 120 min inkubiert. Als Negativkontrollen dienten Zellen die 1 h in Zellkulturmedium und dann 2 weitere Stunden mit bzw. ohne Lysozym weiterinkubiert wurden, sowie Zellen, die nach einstündiger Infektion fixiert wurden. Nach Permeabilisation der Zellen wurde das Zytoskelett mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phalloidin angefärbt.

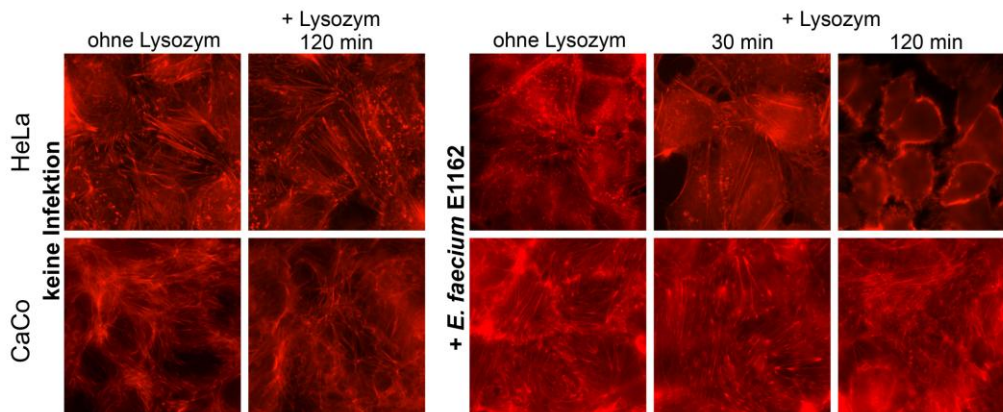


Abb. 3.2.1 Darstellung des Zytoskeletts infizierter Zellen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bei 64x Vergrößerung, Phalloidinfärbung. Infektion von auf Deckgläschen angezüchteten HeLa- bzw. CaCo-2-Zellen mit *E. faecium* (E1162, MOI 100). 1 h nach Infektion wurden die Präparate ohne Lysozym erstellt. Zu weiteren Präparaten wurde Lysozym (10 mg/ml) zugegeben und 30 min bzw. 120 min weiterinkubiert (rechts). Als Negativkontrollen dienten Zellen, die 1h in Zellkulturmedium und dann 2 weitere Stunden ohne bzw. mit Lysozym inkubiert wurden (links). Dargestellt sind repräsentative Bildausschnitte der Präparate. Die Präparate wurden von Monika Schütz und Sabine Gröbner (beide Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universität Tübingen) erstellt.

Aus Abb. 3.2.1 geht hervor, dass die Inkubation mit Lysozym alleine weder in HeLa- noch in CaCo-2-Zellen Zytoskelettveränderungen hervorrief. Auch Zellen die 1 h mit *E. faecium* (E1162) infiziert wurden und Zellen, die nach der

einstündigen Infektion für 30 min mit Lysozym weiterinkubiert wurden, wiesen ein intaktes Zytoskelett auf.

Das Aktinfilamentnetzwerk und der intakte Zellverband wurde bei infizierten CaCo-2-Zellen auch durch 120 minütige Inkubation mit Lysozym nicht beeinflusst.

Im Gegensatz dazu zeigten infizierte HeLa-Zellen nach 120-minütiger Inkubation mit Lysozym eine Auflösung der Zytoskelettstruktur, eine deutliche Abnahme der Zellgröße und eine Auflösung des Zellverbands mit nur noch vereinzelt Zell-Zell-Kontakten.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass CaCo-2-Zellen im Gegensatz zu HeLa-Zellen gegenüber dem zytotoxischen Effekt von *E. faecium* empfänglich sind. Damit bestätigen diese Ergebnisse die in Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.2 gezeigten durchflusszytometrischen Analysen.

3.3 Lysozymabhängige Steigerung der Adhäsion von *E. faecium* an HeLa-Zellen

Die Adhäsion an Wirtszellen stellt eine Grundvoraussetzung für die Invasion eines bakteriellen Krankheitserregers dar und trägt somit auch entscheidend zu dessen Infektiosität bei. Es bestehen Hinweise darauf, dass die lysozymabhängige Zelltodinduktion durch *E. faecium* mit einer gesteigerten Adhäsion von Enterokokken einhergeht (11).

Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welche Wirkung Lysozym auf die Adhäsion von zwei verschiedenen *E. faecium*-Stämmen (ATCC 6057, E1162) an Epithelzellen hat. Verglichen werden sollte dabei eine Epithelzelllinie, die sich für die lysozymabhängige Zelltodinduktion als empfänglich erwiesen hat (HeLa) und eine Zelllinie, die diesem Effekt gegenüber resistent ist (CaCo-2).

Hierfür wurden am Vorabend des Versuchs Epithelzellen auf Deckgläschen ausgesät, damit diese über Nacht einen dichten Zellrasen ausbilden konnten. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den beiden *E. faecium*-Stämmen ATCC 6057 oder E1162 entsprechend einer MOI 100 infiziert. Nach einstündiger Inkubation wurde ein Teil der Präparate mit Paraformaldehyd

fixiert, die restlichen Deckgläschen wurden für eine weitere halbe Stunde in Lysozym (10 mg/ml) inkubiert und danach fixiert.

Abschließend erfolgte die Färbung der Präparate mit Fuchsinlösung.

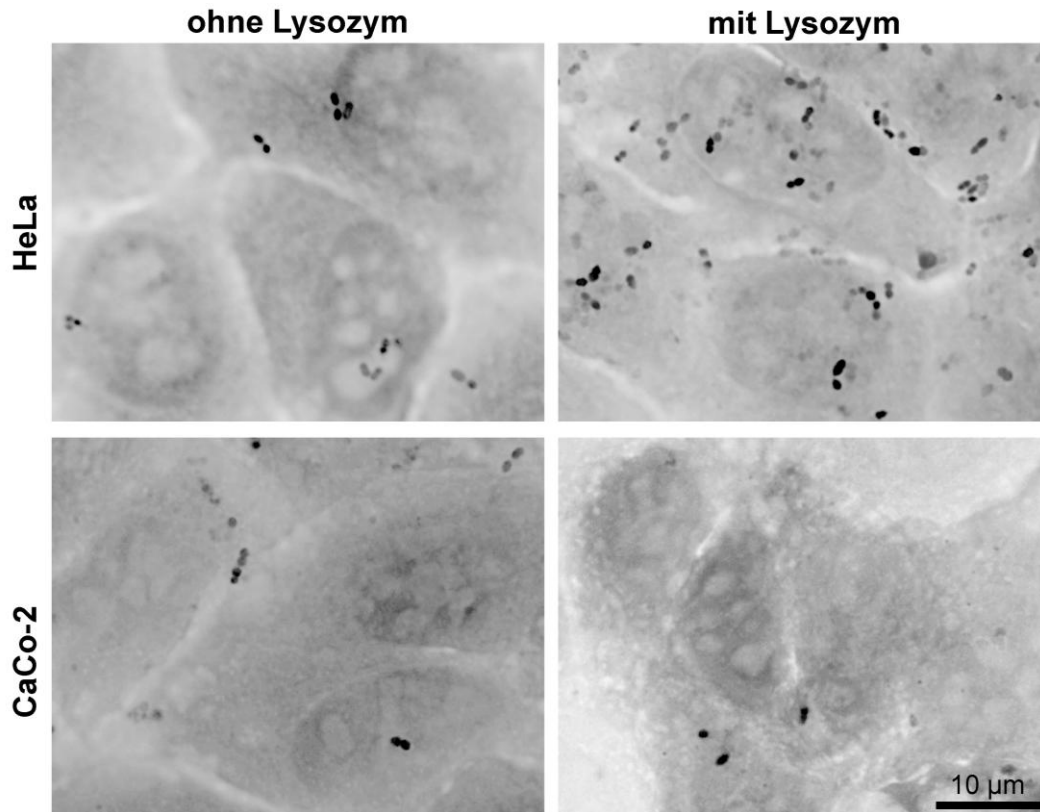


Abb. 3.3.1 Adhäsion von *E. faecium* E1162 an HeLa- und CaCo-2-Zellen. Lichtmikroskopische Aufnahme bei 100x Vergrößerung, Fuchsinfärbung. 1 h nach Infektion (MOI 100) wurden die Präparate ohne Lysozym erstellt. Zu weiteren Präparaten wurde Lysozym (10 mg/ml) für 30 min zugegeben. Nach Fixierung der Präparate wurden diese mit Fuchsinlösung gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Bildausschnitte der Präparate.

Zur Auswertung wurden digitale Fotografien der Präparate (siehe Abb. 3.3.1) unter dem Lichtmikroskop bei 100x Vergrößerung erstellt und die Anzahl der adhärenen Bakterien pro Zelle anschließend am Monitor analysiert.

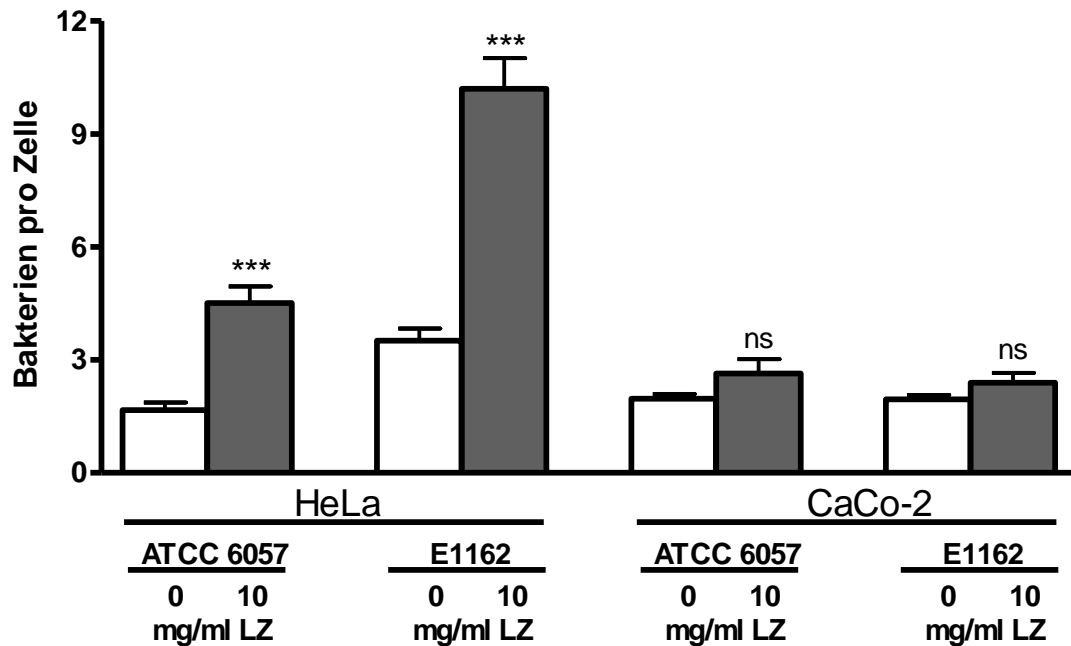


Abb. 3.3.2 Adhäsion von *E. faecium* an eukaryoten Zellen Infektion von auf Deckgläschen angezüchteten HeLa- bzw. CaCo-2-Zellen mit unterschiedlichen *E. faecium*-Stämmen (ATCC 6057, E1162) (MOI 100). 1 h nach Infektion wurden die Präparate ohne Lysozym erstellt. Zu weiteren Präparaten wurde Lysozym (10 mg/ml) für 30 min zugegeben. Nach Fixierung der Präparate und Färbung mit Fuchsinlösung erfolgte die Auswertung lichtmikroskopisch unter Zuhilfenahme einer Bildanalyse-Software. Die Abbildung zeigt die durchschnittliche Zahl adhärrierender Bakterien pro Zelle. Dargestellt ist die Auswertung eines repräsentativen Versuchs von insgesamt 3 unabhängigen Versuchen. Die Mittelwerte mit Standardabweichungen ergeben sich aus der Analyse von jeweils 8 zufällig gewählten Bildausschnitten. Unterschiede zur entsprechenden infizierten Kontrolle ohne Lysozym wurden wie folgt dargestellt: ns = nicht signifikant; *** $p < 0,005$.

In Abwesenheit von Lysozym zeigte das klinische Enterokokken-Isolat E1162 gegenüber HeLa-Zellen ein stärkeres Adhäsionspotential als der apathogene *E. faecium*-Stamm ATCC 6057. Es fanden sich durchschnittlich 1,7 (ATCC 6057) bzw. 3,5 (E1162) Enterokokken pro HeLa-Zelle.

Deutlich gesteigert wurde die Adhäsion von *E. faecium* durch die Inkubation mit Lysozym (10 mg/ml). Bei beiden Stämmen war, in Relation zu den Ausgangswerten, eine vergleichbare Zunahme der Bakterienzahl pro HeLa-Zelle um den Faktor 2,7 (ATCC) bzw. 2,9 zu beobachten. Somit konnte gezeigt

werden, dass sich die beiden *E. faecium*-Stämme in ihrem Adhäsionspotential unterscheiden. Lysozym verstärkte die Adhäsion der *E. faecium*-Stämme ATCC 6057 und E1162 an HeLa-Zellen gleichermaßen.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Infektion von CaCo-2-Zellen kein Unterschied zwischen den beiden *E. faecium*-Stämmen. Bei beiden Stämmen fanden sich in Abwesenheit von Lysozym jeweils ca. zwei Bakterien pro CaCo-2-Zelle. Hier erfolgte im Unterschied zu HeLa-Zellen keine signifikante Steigerung der bakteriellen Adhäsionsrate unter Lysozymeinfluss.

4. Diskussion

Enterokokken besiedeln als Kommensalen den Darm und verursachen vor allem bei abwehrgeschwächten Patienten klinisch apparente Infektionen. Bedingt durch die zunehmende Rate Glykopeptid-resistenter Stämme hat insbesondere *E. faecium* als nosokomialer Keim an Bedeutung gewonnen.

Bereits beschrieben wurde, dass *E. faecium* in Anwesenheit von Lysozym nekrotischen Zelltod in murinen Makrophagen induziert (11). Die ursächlichen Mechanismen des zytotoxischen Effekts sowie dessen Beitrag zur Pathogenese von *Enterococcus spp.* Infektionen sind jedoch bislang noch weitgehend ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *E. faecium* in Anwesenheit von Lysozym in epithelialen, myeloiden und lymphoiden Zellen Zelltod auslöst. Bei allen suszeptiblen eukaryoten Zellen ließ sich 4h nach Infektion eine hohe Rate an Zellen mit perforierter Zellmembran feststellen. Dies ist ein Hinweis dafür, dass im Rahmen der lysozymabhängigen Zelltodinduktion durch *E. faecium* Nekrose ausgelöst wird. Übereinstimmend mit dieser Vermutung zeigen Makrophagen, die mit *E. faecium* in Anwesenheit von Lysozym infiziert werden nekrosetypische Veränderungen wie beispielsweise fehlende Zellschrumpfung und eine erhöhte LDH-Freisetzung (11).

Der zytotoxische Effekt von *E. faecium* war sowohl bei murinen, als auch bei humanen Zelllinien zu beobachten. Beim Menschen kommen klinisch apparente Infektionen durch *E. faecium* vor (31). Darüber hinaus hat sich das Mausinfektionsmodell zur Untersuchung von Enterokokkeninfektionen etabliert (39). Somit sind für beide Wirte, Mensch und Maus, systemische Infektionen durch Enterokokken beschrieben. Es ist denkbar, dass Infektionen mit *E. faecium*, sowohl beim Mensch als auch bei der Maus durch lysozymabhängige Zelltodinduktion begünstigt werden. So konnte im murinen Infektionsmodell bereits gezeigt werden, dass *E. faecium* in Anwesenheit von Lysozym Zelltod in Peritonealmakrophagen auslöst (11).

Die Darmepithelzelllinien CaCo-2 (human) und CMT-93 (murin) bildeten unter den hier untersuchten Zellarten insofern eine Ausnahme, dass bei beiden Zelllinien keine lysozymabhängige Nekroseinduktion durch *E. faecium* nachzuweisen war. Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben der Nekroseinduktion durch *E. faecium* in Darmepithelzellen könnte darin bestehen, dass die bakterielle Adhäsion durch die apikale Oberflächendifferenzierung der Enterozyten beeinträchtigt wird. Diesbezüglich konnten Frey et al. demonstrieren, dass der enterozytäre Bürstensaum und die apikale Glykokalix die Adhäsion bakteriengroßer Partikel an CaCo-2-Zellen verhindern (10). Entsprechend wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass bei CaCo-2-Zellen keine Steigerung der bakteriellen Adhäsion in Anwesenheit von Lysozym zu beobachten war. Im Gegensatz dazu war bei HeLa-Zellen, in denen *E. faecium* Zelltod induzierte, die bakterielle Adhäsion unter Lysozymeinfluss gesteigert (Abb. 3.3.2). Diese Ergebnisse sind ein Beleg dafür, dass verstärkte Adhäsion von *E. faecium* eine wichtige Voraussetzung für die lysozymbedingte Zelltodinduktion darstellt.

Um den zeitlichen Zusammenhang zwischen bakterieller Adhäsion und Zelltod zu erfassen, wurden Zytoskelettfärbungen durchgeführt. In HeLa-Zellen war 30 min nach Infektion, also zu dem Zeitpunkt, als bereits eine deutlich gesteigerte Adhäsion von *E. faecium* zu beobachten war, das Zytoskelett der Zellen noch vollständig intakt. Eine deutliche Schädigung des Aktinfilamentnetzwerks trat erst im weiteren Verlauf der Infektion nach 2h auf (Abb. 3.3.1).

Diese Beobachtungen deuten auf einen zweizeitigen Verlauf der Zelltodinduktion hin, bei dem zunächst die bakterielle Adhäsion durch Lysozym gesteigert wird und erst daraufhin, mit zeitlicher Verzögerung, der eigentliche zytotoxische Effekt auftritt. Entsprechend waren bei CaCo-2-Zellen, bei denen keine gesteigerte Adhäsion von Enterokokken zu beobachten war, auch 2h nach Infektion keine Zytoskelettschädigung nachzuweisen.

Wie die Adhäsionsversuche zeigten, kommt es unter Einfluss von Lysozym zu einer gesteigerten Adhäsion von *E. faecium* an suszeptiblen Zelllinien. Lysozym ist ein kationisch geladenes Enzym, das die Peptidoglykane des bakteriellen Mureinsacculus spaltet (16). Es ist naheliegend, dass im Zusammenhang mit der enzymatischen Aktivität von Lysozym, vermehrt positive Ladungen in der negativ geladenen bakteriellen Zellwand auftreten. Dies führte zu der Vermutung, dass Lysozym durch eine Änderung der Nettogesamtladung der Enterokokken zu einer gesteigerten Adhäsion führen könnte.

Entscheidend hierbei ist jedoch vermutlich nicht die resultierende Nettoladung eines einzelnen Bakteriums, sondern vielmehr die voneinander abweichenden Nettoladungen aller Bakterien im untersuchten Infektionsansatz. Für *E. faecalis* konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass Heterogenität der Oberflächenladungen innerhalb einer *E. faecalis*-Population die initiale Adhäsion und die Biofilmbildung an einer negativ geladenen Kunststoffoberfläche begünstigt (42).

Somit könnte Lysozym eine Heterogenisierung der Oberflächenladungen innerhalb einer *E. faecium*-Population bewirken und dadurch die bakterielle Adhäsion an negativ geladenen Wirtszelloberflächen erleichtern.

Bislang ist der Mechanismus der durch *E. faecium* ausgelösten Nekroseinduktion in Wirtszellen noch unklar. In einer früheren Arbeit wurde diskutiert, ob möglicherweise Zellwandproteine, die durch Lysozym freigelegt bzw. aktiviert werden den zellschädigenden Effekt verursachen (11). Dafür spricht die Tatsache, dass Enterokokken, die zunächst mit Lysozym inkubiert wurden und anschließend mit Protease behandelt wurden, keine Nekrose in Makrophagen auslösen (11). Außerdem war der zytotoxische Effekt von *E. faecium* um ca. die Hälfte reduziert, wenn hitzegetötete Bakterien verwendet wurden (11).

Um den Einfluss der bakteriellen Oberflächenproteine SgrA und Esp zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Infektionsversuche mit Knock-Out-Varianten des klinischen *E. faecium*-Stamms E1162 durchgeführt. Bei den

meisten der untersuchten Zelllinien ergaben sich keine Unterschiede zwischen der Infektion mit einer der beiden Mutanten und dem Wildtyp (z.B. Abb. 3.1.1.1a). Dies spricht gegen die Annahme, dass eines der beiden Zellwandproteine SgrA und Esp den zytotoxischen Effekt bei diesen Zelllinien kausal bedingt.

Bei murinen Makrophagen und Thymozyten hingegen fiel die Zelltodrate signifikant geringer aus, wenn die Zellen mit dem $\Delta sgrA$ -Stamm infiziert wurden (Abb. 3.1.2.2a und Abb. 3.1.3.1). Dies ist ein Hinweis dafür, dass SgrA an der lysozymabhängigen Zelltodinduktion in diesen Zellen zumindest teilweise beteiligt ist.

SgrA wurde bisher lediglich als Adhäsionsprotein beschrieben (14). Von daher ist es wahrscheinlich, dass SgrA indirekt zur Zelltodinduktion durch *E. faecium* beiträgt, indem es die bakterielle Adhäsion an murinen Makrophagen und Thymozyten fördert und dadurch die Zelltodinduktion durch *E. faecium* begünstigt.

Eine bei nur wenigen gram-positiven Bakterien zu findende Eigenschaft der Enterokokken ist die Produktion großer Mengen an extrazellulärem, hoch flüchtigem Superoxid (15). Dies führt zu der Vermutung, dass der in dieser Arbeit beobachtete, zellmembranschädigende Effekt durch reaktive Sauerstoffspezies, die zu Lipidperoxidation führen, verursacht werden könnte. Unterstützt wird diese Erwägung durch eine 2004 erschienene Veröffentlichung, in der beschrieben wird, dass *E. faecium* durch Produktion von extrazellulärem Wasserstoffperoxid den Fadenwurm *C. elegans* tötet (29).

Passend zu dieser Hypothese zeigte sich in den durchgeführten Versuchen, dass bei der Infektion von HeLa- und J774A.1-Zellen mit einer ROS-defizienten *E. faecium*-Mutante der lysozymabhängige Zelltod signifikant vermindert wurde (Abb. 3.1.1.1b und Abb. 3.1.2.2b). Diese Beobachtung erlaubt den Schluss, dass freie Sauerstoffradikale die Zytotoxizität von *E. faecium* zumindest teilweise bedingen könnten. Darüber hinaus müssen jedoch noch weitere, bislang nicht identifizierte bakterielle Faktoren, wie z.B. Eiweißmoleküle oder

Kohlenhydratverbindungen als potentiell toxische Agenzien in Betracht gezogen werden.

Abb. 4.1 zeigt ein hypothetisches Modell, wie die lysozymabhängige Zelltodinduktion in Zusammenhang mit der extrazellulären Produktion reaktiver Sauerstoffspezies stehen könnte. Dabei wird ein zweiphasiger Verlauf angenommen. Lysozym bewirkt zunächst eine verstärkte Adhäsion von *E. faecium* an Wirtszellen. Dies führt dazu, dass hochflüchtige reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die in der unmittelbaren Umgebung der Enterokokken in hoher Konzentration vorkommen, in direkten Kontakt mit der Wirtszellmembran kommen und dort mittels Lipidperoxidation ihre zellschädigende Wirkung entfalten.

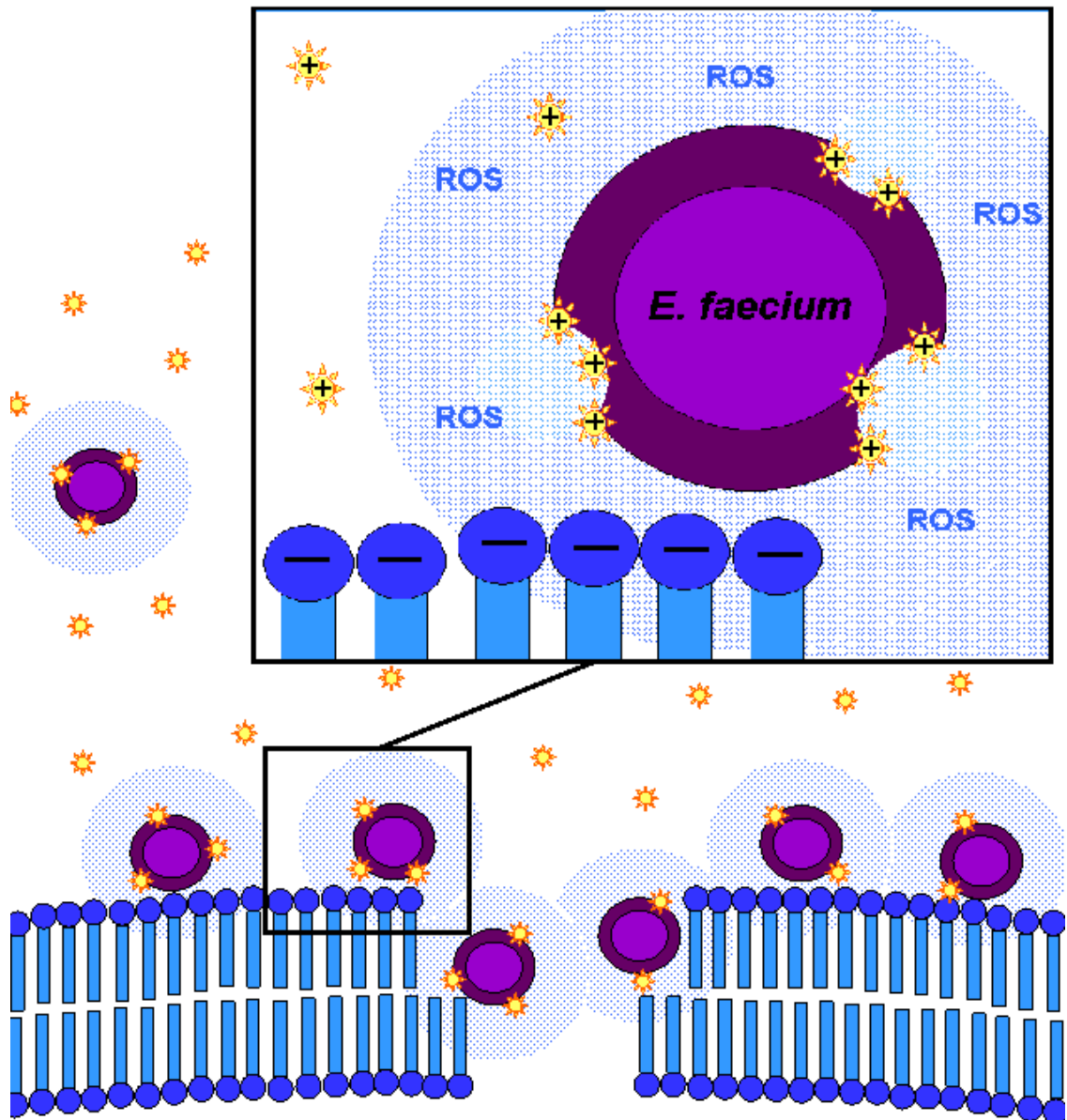


Abb 4.1 Hypothetisches Modell der lysozymabhängigen Zelltodinduktion durch *E. faecium*. Zunächst greift Lysozym (als gelbe Kristalle dargestellt) enzymatisch die bakterielle Zellwand an. Durch seine kationische Ladung verändert sich die Nettogesamtladung der Bakterien. Die nun stärker von einander abweichenden Nettogesamtladungen der einzelnen Bakterien begünstigen die Adhäsion von *E. faecium* an der negativ geladenen eukaryoten Zellmembran. Mit zeitlicher Verzögerung setzt nun eine Schädigung der eukaryoten Zelle ein, die durch von *E. faecium* produzierte, extrazelluläre, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verursacht sein könnte.

4. Zusammenfassung

Enterokokken kommen als Kommensalen im Intestinaltrakt des Menschen vor. Als opportunistische Krankheitserreger verursachen sie vor allem bei abwehrgeschwächten Patienten Infektionen. Besonders *E. faecium* gilt aufgrund häufig auftretender Antibiotikaresistenzen als nosokomialer Problemkeim.

Die genauen Mechanismen der Pathogenese von Enterokokkeninfektionen sind bisher noch weitgehend unverstanden. Ein möglicher Invasionsmechanismus könnte die lysozymabhängige Zelltodinduktion darstellen, wie sie bereits für *E. faecium* in murinen Makrophagen beschrieben wurde.

In dieser Arbeit sollten weitere eukaryote Zellen definiert werden, die für den lysozymabhängigen zytotoxischen Effekt von *E. faecium* empfänglich sind. Weiterhin sollte geklärt werden, welche Rolle bakterielle Oberflächenproteine und reaktive Sauerstoffspezies bei der lysozymabhängigen Zelltodinduktion spielen und ob Lysozym die bakterielle Adhäsion beeinflusst.

Die an murinen und humanen Zelllinien durchgeführten Infektionsversuche ergaben, dass *E. faecium* in Anwesenheit von Lysozym in myeloiden, lymphoiden und epithelialen Zellen Nekrose auslöst. Die Ausprägung des zytotoxischen Effekts war dabei abhängig von der verwendeten Lysozymdosis. Als nicht suszeptibel hingegen erwiesen sich eine murine und eine humane Darmepithelzelllinie.

Weitergehende Versuche zeigten, dass Lysozym bei einer empfänglichen Epithelzelllinie (HeLa) zunächst die bakterielle Adhäsion steigert und mit einer zeitlichen Verzögerung nekrotischen Zelltod auslöst. Im Gegensatz dazu konnte bei einer Darmepithelzelllinie (CaCo-2) weder die bakterielle Adhäsion durch Lysozym gesteigert noch Nekrose induziert werden.

So scheint Nekroseinduktion in Darmepithelzellen durch *E. faecium* in Anwesenheit von Lysozym, welches physiologischerweise im Darm vorhanden ist, keine Rolle für die Entstehung opportunistischer Infektionen durch diese Bakterien zu spielen.

Als mögliche Ursachen für die zytotoxische Wirkung von *E. faecium* in myeloischen, lymphoiden und HeLa-Zellen wurden zunächst die beiden bakteriellen Oberflächenproteine Esp und SgrA untersucht. Infektionsversuche mit entsprechenden Deletionsmutanten zeigten, dass Nekrose auch bei fehlender Expression dieser Proteine induziert wurde. Lediglich bei murinen Makrophagen und Lymphozyten war SgrA zumindest partiell für die zytotoxische Wirkung von *E. faecium* verantwortlich.

Bei Verwendung eines *E. faecium*-Stamms, der keine extrazellulären Sauerstoffradikale produziert, wurde die Zelltodrate in HeLa-Zellen und J774A.1-Makrophagen signifikant reduziert, der zytotoxische Effekt konnte jedoch nicht vollständig aufgehoben werden.

Insgesamt lässt sich aus diesen Beobachtungen das folgende, hypothetische Pathogenesemodell (Abb. 4.1) ableiten:

Lysozym, ein kationisches Molekül steigert die bakterielle Adhäsion an verschiedenen Wirtszellen mit Ausnahme intestinaler Epithelien. Möglicherweise ist dieser Effekt auf eine durch Lysozym veränderte Nettogesamtladung der Enterokokken zurückzuführen. Die gesteigerte bakterielle Adhäsion scheint eine entscheidende Voraussetzung für den zytotoxischen Effekt von *E. faecium* zu sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die räumliche Nähe zwischen Wirtszelle und *E. faecium* es einem löslichen, hochflüchtigem Toxin wie beispielsweise reaktiven Sauerstoffspezies ermöglicht, die eukaryote Zellmembran zu schädigen und dadurch Nekrose auszulösen. Eine Schädigung des Darmepithels (z.B. durch Chemotherapie) wäre in diesem Pathogenitätsmodell die Voraussetzung dafür, dass *E. faecium* Darmwand-assoziierte Zellen der angeborenen und erworbenen Immunsystems erreicht, diese abtötet und damit systemische Infektionen auslöst.

5. Literaturverzeichnis

1. **Abraham, R. T., and A. Weiss.**2004. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat Rev Immunol* **4**:301-308.
2. **Cetinkaya, Y., P. Falk, and C. G. Mayhall.** 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev* **13**:686-707.
3. **Chae, H. J., J. S. Kang, J. O. Byun, K. S. Han, D. U. Kim, S. M. Oh, H. M. Kim, S. W. Chae, and H. R. Kim.** 2000. Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacol Res* **42**:373-381.
4. **Chatterjee, I., J. R. Iredell, M. Woods, and J. Lipman.** 2007. The implications of enterococci for the intensive care unit. *Crit Care Resusc* **9**:69-75.
5. **Chavers, L. S., S. A. Moser, W. H. Benjamin, S. E. Banks, J. R. Steinhauer, A. M. Smith, C. N. Johnson, E. Funkhouser, L. P. Chavers, A. M. Stamm, and K. B. Waites.** 2003. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. *J Hosp Infect* **53**:159-171.
6. **Chow, J. W.** 2000. Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clin Infect Dis* **31**:586-589.
7. **Duane, P. G., J. B. Rubins, H. R. Weisel, and E. N. Janoff.** 1993. Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells. *Infect Immun* **61**:4392-4397.
8. **European Centre for Disease Prevention and Control.** 2010. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). ECDC, Stockholm.
9. **Fisher, K., and C. Phillips.** 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* **155**:1749-1757.
10. **Frey, A., K. T. Giannasca, R. Weltzin, P. J. Giannasca, H. Reggio, W. I. Lencer, and M. R. Neutra.** 1996. Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. *J Exp Med* **184**:1045-1059.
11. **Grobner, S., E. Fritz, F. Schoch, M. Schaller, A. C. Berger, M. Bitzer, and I. B. Autenrieth.**2010. Lysozyme activates *Enterococcus faecium* to induce necrotic cell death in macrophages. *Cell Mol Life Sci* **67**:3331-3344.
12. **Hawes, S. E., S. L. Hillier, J. Benedetti, C. E. Stevens, L. A. Koutsky, P. Wolner-Hanssen, and K. K. Holmes.** 1996. Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections. *J Infect Dis* **174**:1058-1063.
13. **Heikens, E., M. J. Bonten, and R. J. Willems.** 2007. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *J Bacteriol* **189**:8233-8240.
14. **Hendrickx, A. P., M. van Luit-Asbroek, C. M. Schapendonk, W. J. van Wamel, J. C. Braat, L. M. Wijnands, M. J. Bonten, and R. J. Willems.** 2009. SgrA, a nidogen-binding LPXTG surface adhesin implicated in

- biofilm formation, and EcbA, a collagen binding MSCRAMM, are two novel adhesins of hospital-acquired *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* **77**:5097-5106.
15. **Huycke, M. M., D. Moore, W. Joyce, P. Wise, L. Shepard, Y. Kotake, and M. S. Gilmore.** 2001. Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* requires demethylmenaquinone and is attenuated by functional terminal quinol oxidases. *Mol Microbiol* **42**:729-740.
 16. **Ibrahim, H. R., T. Aoki, and A. Pellegrini.** 2002. Strategies for new antimicrobial proteins and peptides: Lysozyme and aprotinin as model molecules. *Curr Pharm Design* **8**:671-693.
 17. **Jansen, W. T., M. Bolm, R. Balling, G. S. Chhatwal, and R. Schnabel.** 2002. Hydrogen peroxide-mediated killing of *Caenorhabditis elegans* by *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* **70**:5202-5207.
 18. **Jett, B. D., M. M. Huycke, and M. S. Gilmore.** 1994. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* **7**:462-478.
 19. **Jolles, P., and J. Jolles.** 1984. What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Mol Cell Biochem* **63**:165-189.
 20. **Koch, S., M. Hufnagel, C. Theilacker, and J. Huebner.** 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* **22**:822-830.
 21. **Leavis, H., J. Top, N. Shankar, K. Borgen, M. Bonten, J. van Embden, and R. J. Willems.** 2004. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J Bacteriol* **186**:672-682.
 22. **Leavis, H. L., M. J. Bonten, and R. J. Willems.** 2006. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* **9**:454-460.
 23. **Leendertse, M., R. J. Willems, I. A. Giebelen, J. J. Roelofs, M. J. Bonten, and T. van der Poll.** 2009. Neutrophils are essential for rapid clearance of *Enterococcus faecium* in mice. *Infect Immun* **77**:485-491.
 24. **Lucey, B. P., W. A. Nelson-Rees, and G. M. Hutchins.** 2009. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch Pathol Lab Med* **133**:1463-1467.
 25. **Lutz, M. B., N. Kukutsch, A. L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani, and G. Schuler.** 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* **223**:77-92.
 26. **Mason, D. Y., and C. R. Taylor.** 1975. The distribution of muramidase (lysozyme) in human tissues. *J Clin Pathol* **28**:124-132.
 27. **Mazmanian, S. K., H. Ton-That, and O. Schneewind.** 2001. Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **40**:1049-1057.
 28. **Moreno, M. R. F., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou, and L. De Vuyst.** 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* **106**:1-24.

29. **Moy, T. I., E. Mylonakis, S. B. Calderwood, and F. M. Ausubel.** 2004. Cytotoxicity of hydrogen peroxide produced by *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* **72**:4512-4520.
30. **Mundy, L. M., D. F. Sahn, and M. Gilmore.** 2000. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* **13**:513-522.
31. **Murray, B. E.** 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev* **3**:46-65.
32. **Murray, B. E., K. V. Singh, and G. M. Weinstock.** 2002. An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob Agents Ch* **46**:1845-1850.
33. **Omura, S., Y. Iwai, A. Hirano, A. Nakagawa, J. Awaya, H. Tsuchya, Y. Takahashi, and R. Masuma.** 1977. A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **30**:275-282.
34. **Pericone, C. D., K. Overweg, P. W. Hermans, and J. N. Weiser.** 2000. Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infect Immun* **68**:3990-3997.
35. **Pignatelli, M., and W. F. Bodmer.** 1988. Genetics and biochemistry of collagen binding-triggered glandular differentiation in a human colon carcinoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:5561-5565.
36. **Schleifer, K. H., and R. Kilpper-Balz.** 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. . *International Journal of Systematic Bacteriology* **34**:31-34.
37. **Sherman, J.** 1937. The *Streptococci*. *Bacteriological Reviews* **1**:3-97.
38. **Sundstrom, C., and K. Nilsson.** 1976. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* **17**:565-577.
39. **Tendolkar, P. M., A. S. Baghdayan, and N. Shankar.** 2003. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cell Mol Life Sci* **60**:2622-2636.
40. **Top, J., R. Willems, and M. Bonten.** 2008. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**:297-308.
41. **Top, J., R. Willems, S. van der Velden, M. Asbroek, and M. Bonten.** 2008. Emergence of clonal complex 17 *Enterococcus faecium* in The Netherlands. *J Clin Microbiol* **46**:214-219.
42. **van Merode, A. E., H. C. van der Mei, H. J. Busscher, and B. P. Krom.** 2006. Influence of culture heterogeneity in cell surface charge on adhesion and biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **188**:2421-2426.
43. **Wells, C. L., R. P. Jechorek, and S. L. Erlandsen.** 1990. Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. *J Infect Dis* **162**:82-90.

44. **Willems, R. J., and M. J. Bonten.** 2007. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Curr Opin Infect Dis* **20**:384-390.
45. **Willems, R. J., J. Top, M. van Santen, D. A. Robinson, T. M. Coque, F. Baquero, H. Grundmann, and M. J. Bonten.** 2005. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg Infect Dis* **11**:821-828.
46. **Williamson, R., C. le Bouguenec, L. Gutmann, and T. Horaud.** 1985. One or two low affinity penicillin-binding proteins may be responsible for the range of susceptibility of *Enterococcus faecium* to benzylpenicillin. *J Gen Microbiol* **131**:1933-1940.

7. Abkürzungen

ATCC	American Type Culture Collection
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CC17	clonal complex 17
DC	dendritic cells
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Enterococcus species</i>
FCS	fetal calf serum
i-DC	immature dendritic cells
LDH	Laktatdehydrogenase
LPXTG	Leucin-Prolin-X-Threonin-Glycin, X steht für eine beliebige Aminosäure
LZ	Lysozym
MOI	multiplicity of infection
OD	optische Dichte
PBS	phosphate-buffered saline
pH	potentia Hydrogenii
PI	Propidiumiodid
ROS	reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TMRE	Tetramethylrhodaminester
TRITC	Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
Wt	wildtype
$\Delta\Psi_m$	inneres mitochondriales Transmembranpotential

8. Veröffentlichung

Höring, S., Schütz, M., Autenrieth, I.B. and S. Gröbner. 2012. Lysozyme facilitates adherence of *Enterococcus faecium* to host cells and induction of necrotic cell death. *Microbes Infect.* [im Druck]

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Privatdozent Dr. Sabine Gröbner für die Überlassung des spannenden Themas und für die immer freundliche und zuverlässige Betreuung meiner Arbeit.

Sie verstand es, mich in allen Phasen meiner Promotion tatkräftig und mit gutem Rat zu unterstützen und hat dadurch entscheidend zum Erfolg meiner Promotion beigetragen.

Herrn Professor Dr. Ingo B. Autenrieth danke ich für seine interessanten Anregungen bei der Konzeption dieser Arbeit und für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut.

Bei Frau Dr. Monika Schütz möchte ich mich herzlich für ihre Hilfe bei der Erstellung und Befundung mikroskopischer Präparate bedanken.

Frau Tanja Griesinger danke ich für ihre Hilfe bei der Versorgung meiner Zellkulturen sowie für die Tipps und Ratschläge, die ich als Labornovize von ihr erhalten habe.

Schlussendlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für deren Hilfsbereitschaft und herzliche Kollegialität bedanken.

Die Zeit am Institut war eine große Bereicherung und hat mir viel Freude bereitet!

10. Lebenslauf

Steffen Höring, geboren am 25.03.1982 in Mühlacker

Schulbildung

1988–1992 Schiller-Grundschule, Mühlacker
1992–1998 Mörike-Realschule, Mühlacker
1998 –2002 Fritz-Erler-Wirtschaftsgymnasium, Pforzheim
2002 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst und Freiwilliges Soziales Jahr

2002 – 2003 Pflegehelfer Zentral-OP, Kreisklinikum Calw
2003 – 2004 Rettungshelfer DRK Zollernalb, Albstadt-Ebingen

Berufsausbildung

2005 – 2008 Ausbildung zum Gesundheits- und Krankenpfleger,
Universitätsklinikum Tübingen

Hochschulbildung

Seit SS 2008 Studium der Humanmedizin, Eberhard-Karls-Universität
Tübingen
2010 1. Staatsexamen
2014 2. Staatsexamen und Approbation als Arzt

Promotion

2010– 2015 Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene,
Eberhard-Karls-Universität Tübingen,
Prof. Dr. Ingo B. Autenrieth