

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Institute für Infektionsmedizin

Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Kommissarische Direktorin: Prof. Dr. med. Barbara Gärtner



**Phänotypische *in vitro*-Charakterisierung von nasalen und klinischen
Gesellschafts-assoziierten *Staphylococcus aureus*-Isolaten**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2017

vorgelegt von

Johannes Wendl

geboren am 11.08.1994 in Mainburg

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	- I -
Abkürzungsverzeichnis	- IV -
1 Zusammenfassung	- 1 -
1.1 Deutsche Version	- 1 -
1.2 English version	- 3 -
2 Einleitung	- 4 -
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	- 4 -
2.2 Gesellschafts-assoziiertes <i>S. aureus</i>	- 5 -
2.3 Klassifizierung von <i>S. aureus</i>	- 6 -
2.4 Klonale Komplexe	- 7 -
2.5 Nasale Besiedelung mit <i>S. aureus</i>	- 9 -
2.6 Erkrankungen verursacht durch <i>S. aureus</i>	- 11 -
2.7 Zusammenhang zwischen nasaler Besiedelung und invasiver Erkrankung	- 12 -
2.8 Zytotoxizität	- 13 -
2.9 Adhäsion	- 15 -
2.10 Zielsetzung der Arbeit	- 16 -
3 Material und Methoden	- 17 -
3.1 Afrikanisch-Deutsches Netzwerk zur Forschung an Staphylokokken (StaphNet)	- 17 -
3.2 Zusammenarbeit mit Lea-Elisa Roth im Rahmen des African-German-StaphNet	- 17 -
3.3 Aufschlüsselung der untersuchten Isolate	- 18 -
3.4 Arbeitsmaterialien	- 22 -
3.4.1 Chemikalien und Kits	- 22 -
3.4.2 Nährmedien	- 22 -
3.4.3 Lösungen und Puffer	- 22 -
3.4.4 Verbrauchsmaterialien	- 23 -

3.4.5 Geräte	- 24 -
3.4.6 Software	- 24 -
3.5 Methoden	- 25 -
3.5.1 Kryokonservierung der <i>S. aureus</i> -Isolate	- 25 -
3.5.2 Kultivierung der HaCaT-Zelllinie	- 25 -
3.5.3 Zytotoxizitäts-Assay	- 26 -
3.5.4 Adhäsions-Assay	- 27 -
3.5.5 Vorversuche Adhäsions-Assay	- 28 -
3.5.6 Statistische Auswertung	- 29 -
4 Ergebnisse	- 30 -
4.1 Zytotoxizität	- 30 -
4.1.1 Klonale Komplex-spezifische Zytotoxizität	- 30 -
4.1.2 Zytotoxizität von CC5-Isolaten	- 31 -
4.1.3 Zytotoxizität von CC8-Isolaten	- 33 -
4.1.4 Zytotoxizität von CC15-Isolaten	- 36 -
4.1.5 Zytotoxizität von CC30-Isolaten	- 37 -
4.1.6 Zytotoxizität von CC45-Isolaten	- 40 -
4.1.7 Zytotoxizität von CC121-Isolaten	- 43 -
4.1.8 Zytotoxizität von CC152-Isolaten	- 45 -
4.2 Adhäsion	- 48 -
4.2.1 Etablierung der Versuchsreihe	- 48 -
4.2.1.1 Assaytyp I	- 48 -
4.2.1.2 Assaytyp II	- 49 -
4.2.1.3 Assaytyp III	- 49 -
4.2.1.4 Assaytyp IV	- 50 -
4.2.1.5 Durchführung des Adhäsionsassays im weiteren Verlauf ..	- 50 -
4.2.2 Klonale Komplex-spezifische Adhäsion	- 52 -
4.2.3 Adhäsion von CC5-Isolaten	- 53 -
4.2.4 Adhäsion von CC8-Isolaten	- 56 -
4.2.5 Adhäsion von CC15-Isolaten	- 58 -

4.2.6 Adhäsion von CC30-Isolaten	- 61 -
4.2.7 Adhäsion von CC45-Isolaten	- 63 -
4.2.8 Adhäsion von CC121-Isolaten	- 65 -
4.2.9 Adhäsion von CC152-Isolaten	- 67 -
5 Diskussion	- 70 -
5.1 Zytotoxizität	- 70 -
5.1.1 Einordnung der Zytotoxizitätswerte nach klonalem Komplex	- 70 -
5.1.2 Einordnung der Zytotoxizitätswerte nasaler und klinischer Isolate ..	- 77 -
5.2 Adhäsion	- 79 -
5.2.1 Etablierung des Adhäsionsassays	- 79 -
5.2.2 Einordnung der Adhäsionswerte nach klonalem Komplex	- 80 -
5.2.3 Einordnung der Adhäsionswerte nasaler und klinischer Isolate	- 85 -
5.2.4 Einordnung der Adhäsionswerte nach geographischer Herkunft	- 87 -
5.3 Fazit der Diskussion	- 88 -
6 Anhang	- 90 -
7 Literaturverzeichnis	- 98 -
8 Danksagung	- 112 -
9 Lebenslauf	- 113 -

Abkürzungsverzeichnis

BHI	Brain-Heart Infusion
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CA-SA	Gesellschafts-assoziiertes <i>S. aureus</i>
CC	klonaler Komplex
CFU	Kolonie-formende Einheit
ClfA	Clumping factor A
ClfB	Clumping factor B
Cna	Kollagen-Adhäsion
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Eap	Extrazelluläres Adhäsionsprotein
Efb	Extrazelluläres Fibrinogen-bindendes Protein
<i>egc</i>	enterotoxin gene cluster
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälberserum
FnBP-A	Fibronectin-bindendes Protein A
FnBP-B	Fibronectin-bindendes Protein B
FnBR	Fibronectin binding-repeats
HaCaT	Human adult low Calcium high Temperature-Keratinocyten
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
<i>hla</i>	Gen kodierend für α -Hämolysin
<i>hlb</i>	Gen kodierend für β -Hämolysin
hlgA	Hämolysin γ Komponente A
Ig	Immunglobulin
IsdA	Eisen-reguliertes Oberflächenprotein A
LDH	Laktatdehydrogenase
lukE	Leukozidin E-Komponente
MALDI-TOF	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung mit Flugzeitmessung
MGE	Mobile genetische Elemente

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
MLST	Multi-Locus Sequenz-Typisierung
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMMs	Microbial surface components recognizing matrix molecules
MSSA	Methicillin-sensitiver <i>Staphylococcus aureus</i>
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Elektrolytlösung
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PVL	Panton-Valentine Leukozidin
RNA	Ribonukleinsäure
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. carnosus</i>	<i>Staphylococcus carnosus</i>
SCC _{mec}	Staphylococcal chromosome cassette <i>mec</i>
<i>scn</i>	Gen kodierend für Staphylokokken Komplement-Inhibitor
SCV	Small colony variants
SE	Staphylokokken-Enterotoxine
SERAMs	Secretable expanded repertoire adhesive molecules
<i>spa</i>	Gen kodierend für <i>Staphylococcus aureus</i> -Protein A
ST	Sequenztyp
StaphNet	Afrikanisch-Deutsches Netzwerk zur Forschung an Staphylokokken
TLR	Toll-like Rezeptor
TSS	toxisches Schocksyndrom
TSST	toxisches Schocksyndrom-Toxin
µl	Mikroliter
Upm	Umdrehungen pro Minute
Vwb	von-Willebrandt Faktor-bindendes Protein
WGS	Ganzgenom-Sequenzierung
WTA	Zellwandständige Teichonsäuren
z. B.	zum Beispiel
ZVK	Zentralvenöser Katheter

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Version

Staphylococcus aureus ist ein weltweit verbreiteter, opportunistischer Krankheitserreger, der als nasopharyngealer Kommensale in Industrieländern bis zu 30% der Bevölkerung besiedelt. Isolate dieser Bakterienart lassen sich aufgrund ihrer genetischen Linien in verschiedene klonale Komplexe (CC) unterscheiden. Sein reichhaltiges Arsenal an Wirtsfaktoren wie Adhäsions-, Toxin- oder Leukocidin-Genprodukte sind die Ursache dafür, dass *S. aureus* verschiedenste Erkrankungen, von oberflächlichen bis hin zu lebensbedrohlichen Infektionen, induzieren kann. In mehreren Studien wurde bereits das zytotoxische und adhäsive Potential Krankenhaus-assoziiertes MRSA-Isolate (HA-MRSA), nicht jedoch Gesellschafts-assoziiertes *S. aureus*-Isolate, sogenannter CA-SA (community acquired *S. aureus*), untersucht. Diese Studien zeigen, dass bei HA-MRSA Isolaten kein signifikanter Unterschied zwischen nasalen (aus dem Nasenvorhof isolierte asymptomatische Isolate) und klinischen (aus Infektionsherden gewonnene Stämme) Isolaten in Bezug auf ihre Zytotoxizität oder ihre Adhäsionsfähigkeit hin besteht.

In dieser Arbeit wurde das phänotypische Virulenz- und Adhäsionsverhalten nasaler und klinischer CA-SA Isolate unterschiedlicher klonaler Komplexe an humane Keratinozyten untersucht. Die Stämme wurden im Rahmen des `Afrikanisch-Deutschen Netzwerkes zur Forschung an Staphylokokken` (StaphNet) in verschiedenen geographischen Regionen Afrikas und Deutschlands gesammelt und genotypisch mit einem DNA-Microarray (Alere Technologies) charakterisiert. Ziel war es, Faktoren zu identifizieren, die die Entstehung einer invasiven Infektion begünstigen. Die Zytotoxizitätsanalyse, ebenso wie die Bestimmung der Adhäsion an humane Keratinozyten, zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen zwei Isolatgruppen. Jedoch fielen zum Teil große Unterschiede im phänotypischen Verhalten zwischen den einzelnen klonalen Komplexen auf. So wiesen Isolate des klonalen Komplexes 152 (CC152), der Zytotoxizitäts-stärkste klonale Komplex, im Durchschnitt eine relative Zytotoxizität von $93 \pm 1\%$ auf, während Isolate der Zytotoxizitäts-schwächsten klonalen Komplexe, CC30 und CC5, im Durchschnitt nur eine relative Zytotoxizitätsrate von $34 \pm 33\%$ bzw. $42 \pm 15\%$ aufwiesen. Zudem ließ sich für einzelne klonale Komplexe eine positive Korrelation zwischen dem zytotoxischen Potential und der Anwesenheit PVL-kodierender Gene eines CC aufzeigen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in Bezug auf Zytotoxizität und Adhäsion keine signifikanten Unterschiede zwischen Isolaten nasaler

bzw. klinischer Herkunft bestehen. Vielmehr basieren solche Unterschiede auf der unterschiedlichen Genausstattung und -expression verschiedener *S. aureus*-Isolate.

1.2 English version

Staphylococcus aureus is a worldwide endemic opportunistic pathogen colonizing up to 30% of the population of industrialised countries as a nasopharyngeal commensal. Isolates of this bacterial species display a certain genetic heterogeneity, and can be differentiated into various clonal complexes (CC). The genetic repertoire, in particular differences in adhesion-, toxin- or leukocidin genes, is the reason why *S. aureus* is able to induce various diseases ranging from superficial up to life threatening infections. Previous studies examined already the cytotoxic and adhesive potentials of hospital-associated Methicillin-resistant *S. aureus* (HA-MRSA) isolates obtained from the nasal epithelium (nasal isolates) and isolates obtained from an infection site (clinical isolates). These studies failed to reveal significant differences between nasal isolates and clinical isolates with respect to their cytotoxicity or adhesion behaviour. However, for *S. aureus*-isolates circulating in the community (the so-called community-associated *S. aureus* [CA-SA]) it is currently unknown, whether nasal- and clinical isolates of a given CC display a similar cytotoxicity and/or adhesion behaviour. Here, the cytotoxic- and adhesive behaviour of a set of representative nasal and clinical CA-SA isolates of various CCs to human keratinocytes was studied in order to identify putative factors favouring the development of invasive infections. The examined isolates were collected by the `African-German Network on Staphylococci` (StaphNet) in different geographic areas of Africa and Germany, respectively, and characterized genetically with a DNA-Microarray (Alere Technologies) and by *spa* typing. When comparing the cytotoxic- and adhesion potential of nasal- and clinical CA-SA isolates to human keratinocytes, no clear differences between both groups were observed. However, significant differences in the phenotypic behaviour were identifiable between specific clonal complexes. While isolates of the clonal complex 152 (CC152), the most cytotoxic clonal complex identified in this study, displayed a relative cytotoxicity of $93 \pm 1\%$ against keratinocytes, only small cytotoxic potentials were observed for CC30 ($34 \pm 33\%$) and CC5 ($42 \pm 15\%$) isolates, respectively, which were the weakest cytotoxic clonal complexes of the strain panel tested here. In addition, for several clonal complexes there was a positive correlation between the cytotoxic potential and the presence of PVL-encoding genes for some of the CCs. Taken together there is no significant difference between nasal and clinical isolates regarding cytotoxicity or adhesion. Possession and Expression of various genes appear to make the difference in cytotoxicity and adhesion auf *S. aureus*.

2 Einleitung

2.1 *Staphylococcus aureus*

Der Arzt Robert Koch beschrieb im Jahre 1878 erstmalig Bakterien, die sich unter dem Mikroskop als traubenförmig angeordnete Kokken darstellten. Aufgrund dieser Anordnung bezeichnete er seine Entdeckung nach dem griechischen Begriff *staphyle* (Traube) als Staphylokokken. Bereits wenige Jahre später stellte Alexander Ogston die Verbindung zwischen dem Bakterium und *S. aureus*-assoziierten Erkrankungen her (Ogston, 1881).

S. aureus besitzt ein zirkuläres Genom, das aus durchschnittlich 2800 Kilobasenpaaren aufgebaut ist. Dieses lässt sich in ein "core"-Genom, das in allen Isolaten dieser Art zu finden ist, und mobile genetische Elemente, die zwischen einzelnen Bakterien ausgetauscht werden können und nur zum Teil in den verschiedenen *S. aureus* Isolattypen vorkommen, unterteilen (Lowy, 1998; Lindsay, 2006). Im Vergleich zu vielen anderen Bakterienarten weist *S. aureus* eine große genetische Variabilität auf und stellt somit eine sehr heterogene Spezies dar (Mandell, 2009). Klassischerweise erfolgt eine Identifizierung durch das Anlegen einer Kultur mit anschließend positiver Testung auf Katalase und Koagulase. Mittlerweile ist der Einsatz molekular-diagnostischer Verfahren in der täglichen Diagnostikroutine etabliert, wodurch bei wichtigen Patientenmaterialien wie z.B. Blutkulturen eine schnellere Speziesbestimmung direkt aus dem Material ermöglicht wird (Mandell, 2009).

Bei etwa 20-35% aller Personen ist das *Vestibulum nasi* dauerhaft mit *S. aureus* besiedelt (Nashev, 2004; Peacock, 2001). Diese Personen stellen somit ein nachhaltiges Reservoir für den Erreger dar. Gleichzeitig weisen die Träger ein deutlich erhöhtes Risiko auf, an einer *S. aureus*-assoziierten Erkrankung zu leiden (Wertheim, 2005). Zu dieser Gruppe von Erkrankungen zählen unter anderem Haut- und Weichteilinfektionen, Endokarditis, Sepsis, Osteomyelitis oder das toxische Schocksyndrom. Unterschieden wird hier insbesondere zwischen invasiven Infektionsformen und solchen, die durch Toxine verursacht werden. Hier sind jedoch auch Zwischenformen mit Toxin-vermittelten invasiven Erkrankungen beschrieben (Lowy, 1998; Mandell, 2009). Über die letzten Jahrzehnte hinweg rückte insbesondere die Tendenz zu Resistenzbildungen immer stärker in den Fokus von Klinik und Forschung. Bereits Mitte des letzten Jahrhunderts wurden *S. aureus*-Stämme beschrieben, die gegen penicillinasefeste β -Laktam Antibiotika unempfindlich waren (Lowy, 1998). Diese wurden nach der damals verwendeten Testsubstanz Methicillin als Methicillin-resistente

Staphylococcus aureus (MRSA) bezeichnet. Zunächst war das Auftreten dieser β -Laktam resistenten Stämme hauptsächlich ein Problem von Gesundheitseinrichtungen. Mittlerweile finden sich jedoch immer häufiger Isolate, die innerhalb der Gesellschaft ohne unmittelbaren Kontakt zum Gesundheitssystem erworben wurden, sogenannte „community associated MRSA“ (CA-MRSA) oder denen landwirtschaftliche Nutztiere als Reservoir dienen, die sogenannten „livestock-associated MRSA“ (LA-MRSA) (Ballhausen, 2016). Zur Abgrenzung letzterer beider Gruppen werden die in Gesundheitseinrichtungen kursierenden MRSA-Isolate heutzutage als HA-MRSA („healthcare-associated“ oder „hospital-acquired“ MRSA) bezeichnet. Allen MRSA-Stämmen gemein ist das auf dem mobilen genetischen Element SCCmec liegende *mecA*- bzw. *mecC*-Gen. Ihr Genprodukt besteht aus dem alternativen Penicillin-bindenden Protein 2a (PBP2a), eine Transpeptidase, welche eine deutlich reduzierte Affinität zu β -Laktam Antibiotika aufweist und so auch in Anwesenheit klinisch relevanter β -Laktamspiegel noch eine ausreichende Quervernetzung der Zellwand gewährleistet (Lowy, 1998). Im Vergleich zu den Methicillin-sensiblen *S. aureus* (MSSA) weisen MRSA in der Regel noch weitere Resistenzdeterminanten auf, die sie auch gegenüber vielen anderen Antibiotikaklassen unempfindlich machen und so die Therapie massiv erschweren (Nouwen, 2005).

Eine Bekämpfung von MSSA mit Antibiotika findet in der Regel mit penicillinasefesten β -Laktamen statt. Insbesondere das Präparat Flucloxacillin findet in Deutschland häufig Anwendung. MRSA werden aufgrund der Resistenzsituation standardmäßig mit dem Glykopeptid Vancomycin therapiert (Liu, 2011). Da in den letzten Jahren jedoch auch die Entwicklung Vancomycin-resistenter MRSA-Stämme beschrieben wurde, wird aktuell bei Verdacht auf eine Vancomycin-Resistenz, abhängig vom jeweiligen Krankheitsbild, die Gabe von Daptomycin, Linezolid oder Tigecyclin empfohlen (Schulz-Stübner, 2016).

2.2 Gesellschafts-assoziiertes *S. aureus*

Für die späten 1990er-Jahre ist der Ausbruch Gesellschafts-assoziiertes *S. aureus*-Erkrankungen zuerst beschrieben (Chambers, 2001). Als Gesellschafts-assoziiert definiert werden Isolate, die spätestens innerhalb der ersten 48 Stunden nach Aufnahme ins Krankenhaus gewonnen wurden. Auch darf der betroffene Patient während des letzten Jahres keine weiteren stationären Krankenhausaufenthalte angeben (Deurenberg, 2008). Ergänzt werden diese Kriterien zunehmend durch molekularbiologische Methoden. So gilt das

Vorhandensein PVL-kodierender Gene als Marker für CA-Stämme (Budimir, 2009; Brauner, 2013). Bei Methicillin-resistenten Varianten spielt die SCC*mec*-Kassette zudem eine wichtige Rolle bei der Einordnung eines Isolates [siehe auch Kapitel 2.3]. So weisen CA-MRSA in der Regel SCC*mec* Kassetten der Typen IV, V oder VII auf, wohingegen HA-MRSA meist die SCC*mec*-Typen I-III besitzen (Wu, 2010; Brauner, 2013). Henry Chambers zeigte, dass bereits im Jahr 2001 in den USA etwa 40% der MRSA-Infizierten in stationären Gesundheitseinrichtungen mit einem Gesellschafts-assoziierten Stamm von *S. aureus* besiedelt waren (Chambers, 2001). Es mehren sich zudem die Beschreibungen, dass sich CA-MRSA verstärkt über Gesundheitseinrichtungen verbreiten (Stryjewski, 2008; Deurenberg, 2008). Insbesondere in Nordamerika gewinnt der PVL-positive CA-MRSA Subtyp USA300 dabei zunehmend an Bedeutung (Deurenberg, 2008). Im Gegensatz zu Krankenhaus-assoziierten Infektionen betreffen Gesellschafts-assoziierte Erkrankungen auch ansonsten gesunde Personen. Regelmäßig liegen auch keine weiteren prädisponierenden Faktoren für eine MRSA-Infektion vor (Deresinski, 2005; Krziwanek, 2007). Der von CA-MRSA betroffene Patient ist im Durchschnitt zwischen 20 und 47 Jahren alt und damit verhältnismäßig jung (Stryjewski, 2008). Insbesondere für nekrotisierende Pneumonien ist häufig ein Gesellschafts-assoziiertes Stamm (CA-Stamm) verantwortlich (Deresinski, 2005; Stryjewski, 2008).

2.3 Klassifizierung von *S. aureus*

Über die letzten Jahre hinweg hat die molekulare Diagnostik in der medizinischen Mikrobiologie stark an Bedeutung gewonnen. Durch sie wird die Identifizierung und Klassifizierung von Erregern deutlich vereinfacht. Ergebnisse liegen in der Regel bereits nach wenigen Stunden vor (Mandell, 2009). Eines dieser Verfahren stellt die Multi-Locus Sequenztypisierung (MLST) dar. Diese Methode erlaubt den Vergleich der Basenabfolge sieben sogenannter Haushaltsgene: *arcC*, *aroF*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, und *yqiY* (Mandell, 2009; Deurenberg, 2008). Ihre Sequenzen werden mit einer internationalen Datenbank abgeglichen. Stimmen mindestens fünf Allelsequenzen der Haushaltsgene überein, spricht man von einem klonalen Komplex (CC). Stämme, die sieben gleiche Allele aufweisen, werden als Klone bezeichnet (Mandell, 2009; Lindsay, 2006). Weniger diskriminativ, aber schon länger bekannt ist die Unterscheidung von SA Isolaten per Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE). Diese Methode gestattet es, auch größere chromosomale Fragmente gelelektrophoretisch aufzutrennen. In einer Elektrophoresekammer werden hierzu wechselnde elektrische Spannungen erzeugt,

wodurch sich auch die Richtung der Stromflüsse wechselt. Durch diese Spannungsunterschiede bewegen sich die chromosomalen Fragmente im Agarosegel größenabhängig unterschiedlich stark und bilden ein charakteristisches Bandenmuster. Ein Vergleich dieser Banden lässt eine Einordnung der Stämme zu (Mandell, 2009). Heutzutage dienen Kompletengenom-Sequenzierungen (WGS) und DNA-Microarrays der besseren Unterscheidung innerhalb eines klonalen Komplexes (Hamed, 2015). Mit diesen Untersuchungstechniken werden eine Vielzahl an Genloci (DNA-Microarray) bzw. das Gesamtgenom (WGS) erfasst (Mandell, 2009). Besonders wichtig sind diese Verfahren mittlerweile im Ausbruchmanagement von Epidemien, da hier regional oft der gleiche CC vorherrschend ist. WGS und DNA-Microarray lassen zudem vielfach Rückschlüsse auf die Herkunft eines Erregers zu (Hamed, 2015).

Speziell für die Klassifizierung von MRSA wurde die *SCCmec*-Typisierung entwickelt. *SCCmec* steht für die 'staphylococcal chromosome cassette *mec*'. Diese stellt ein mobiles genetisches Element dar, das den horizontalen Transfer von Resistenzgenen gegen β -Laktam Antibiotika erlaubt (Lindsay, 2006; Turlej, 2011). Die Kasette fungiert zudem als Integrationsregion für weitere MGE wie Plasmide und Transposons, so dass in diesem Element häufig noch weitere Resistenzdeterminanten zu finden sind. Mittels *SCCmec*-Typisierung gelingt es, genetische Unterschiede der jeweiligen *SCCmec* sichtbar zu machen. (Turlej, 2011).

2.4 Klonale Komplexe

Im folgenden Abschnitt soll näher auf die in diese Untersuchung eingeschlossenen Klonalen Komplexe (CCs) eingegangen und deren Eigenschaften erläutert werden.

Bezüglich des Anteils der einzelnen CCs an der Zusammensetzung der *S. aureus*-Population, lassen sich sehr starke geographische Variationen erkennen (Shittu, 2012; Ruimy, 2008). Teilweise zeigen sich bereits innerhalb eines einzelnen Landes erhebliche Unterschiede in der Verteilung der klonalen Komplexe (Shittu, 2012). So wird CC5 aufgrund der Häufigkeit seines Auftretens in Süddeutschland auch als 'Süddeutscher klonaler Komplex' bezeichnet. In Europa sind CC5-Isolate insbesondere als Krankenhaus-assoziierte Isolate beschrieben, die oberflächliche Hautläsionen und chronische Ulzerationen verursachen (Jappe, 2008; Messad, 2012). Daten des „StaphNet“ Konsortiums belegen, dass CC5-Isolate auch in Afrika gehäuft vorzufinden sind (Ruffing, 2017). Stämme des CC5 traten bislang nur vereinzelt als PVL-

positive Isolate in Erscheinung (Müller-Premru, 2005). Bei PVL handelt es sich um einen porenbildenden Enzymkomplex, der aus den zwei sekretorischen Proteinuntereinheiten LukS-PV und LukF-PV besteht (Lina, 1999; Melles, 2006). Diese erzeugen eine Pore in der Zellmembran immunkompetenter Zellen (insbesondere Leukozyten, Makrophagen und Monozyten), was zu deren Lyse bzw. Apoptose führt.

Eine andere, in Westeuropa wie Afrika ebenfalls weit verbreitete, *S. aureus*-Untergruppe stellt CC8 dar (Ruffing, 2017). Auch dieser klonale Komplex wird häufig aus chronischen Ulcera isoliert und Isolate dieses CCs weisen in diesen Regionen im Großteil der Fälle keine PVL-kodierenden Gene auf (Messad, 2012; Monecke, 2007). Immer größere Bedeutung erlangte, insbesondere wegen seiner Assoziation mit chronischen und nicht-heilenden Ulzera, zuletzt der PVL-positive Subtyp USA300, der ebenfalls CC8 zugerechnet wird (Krziwanek, 2007; Krziwanek, 2010). Dieser besonders in Nordamerika kursierende CA-MRSA Subtyp wurde in letzter Zeit auch wiederholt in Europa detektiert (Nimmo, 2012), auch wenn der Anteil an USA300 auf diesem Kontinent im Vergleich zu anderen Regionen dieser Erde noch vergleichsweise gering ist (Glaser, 2016).

Eine phylogenetisch enge Verwandtschaft besteht zwischen den klonalen Komplexen CC30 und CC45, welche weltweit endemisch auftreten und die häufigsten klonalen Komplexe bei nasaler Besiedelung des Menschen darstellen (Sharma-Kuinkel, 2015). Insbesondere CC30 Isolate sind häufig für Endokarditiden, septische Arthritis oder Osteomyelitis verantwortlich (Sharma-Kuinkel, 2015). Auch neigen Isolate dieses CCs dazu, persistierende oder rezidivierende Infektionen zu verursachen (Sharma-Kuinkel, 2015).

Ebenfalls weltweit endemisch, aber mit unterschiedlicher Gewichtung, treten mittlerweile Stämme des CC121 auf (Kurt, 2013). So wurden in einer Afrikanisch-Deutschen Vergleichsstudie Stämme dieses CCs signifikant häufiger in Afrika als in Deutschland detektiert (Ruffing, 2017). Des Weiteren wurde dieser CC bevorzugt aus klinischen Proben isoliert (Ruffing, 2017), was vermuten lässt, dass Isolate dieses CCs ein erhöhtes Virulenzpotenzial aufweisen. Die Insertion einer *SCC_{mec}* Kasette scheint bei CC121 deutlich erschwert zu sein, wobei die Ursache dieser Beobachtung nicht abschließend geklärt ist (Kurt, 2013). Insbesondere verursachen Stämme dieses CCs Furunkel und Toxin-bedingte Erkrankungen, die u.a. durch die Bildung der Exfoliativtoxine A bzw. B hervorgerufen werden (Masiuk, 2010; Kurt, 2013). Im Gegensatz zu CC5 oder CC8 weisen CC121-Isolate in bis zu 85% der Fälle auch PVL-kodierende Gene auf, welche auf demselben MGE kodiert sind wie *etA*, *B* oder *D* (Egyir, 2014b; Masiuk, 2010; Sharma-Kuinkel, 2015).

Ein *S. aureus*-Subtyp, der insbesondere in afrikanischen Ländern vorzufinden ist, ist CC152 (Ruimy, 2008; Ruffing, 2017). Seit etwa 2002 tritt dieser klonale Komplex jedoch auch in Europa immer häufiger in Erscheinung, insbesondere in Dänemark und der Schweiz (Krziwanek, 2007). Es wird davon ausgegangen, dass CC152 keine nosokomialen Vorgänger besitzt, sondern bereits Gesellschafts-assoziiert entstanden ist (Krziwanek, 2007; Krziwanek, 2010).

2.5 Nasale Besiedelung mit *S. aureus*

Wie zuvor schon erwähnt ist *S. aureus* dazu in der Lage, den Nasopharynx auch gesunder Personen zu besiedeln. Bevorzugt wird dabei das *Vestibulum nasi* kolonisiert. Diese Region bietet dem Bakterium durch seinen Besatz mit Keratinozyten sowie dem Nicht-Zilien tragenden Epithel einen geeigneten Lebensraum (Peacock, 2001; Cole, 2001). Jüngere Vergleichsstudien weisen aber darauf hin, dass *S. aureus* mit einer ähnlichen Häufigkeit auch in der Mundhöhle vorzufinden ist (Mertz, 2007; Nilsson, 2006; Young, 2017), so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Bakterienart ebenfalls der oralen Mikroflora zuzuordnen ist. Als Trägerstatus werden dauerhafte, intermittierende und Nicht-Trägerschaft definiert, wobei die Unterscheidungskriterien in der Literatur nicht einheitlich festgelegt sind (Miller, 2014; Edwards, 2011). Ein häufig verwendetes Kriterium für dauerhafte Kolonisierung ist die, wonach zwei identische, im Abstand von mehr als 24 Stunden gewonnene Abstriche diesen Status definieren (Nashev, 2004).

Durchschnittlich gelten 20-35% der Bevölkerung als dauerhaft mit *S. aureus* besiedelt und 45-60% zumindest als intermittierend besiedelt. Etwa 20% aller Personen werden der Gruppe der dauerhaften Nicht-Träger zugerechnet (Nashev, 2004; Peacock, 2001). Einige Faktoren des Trägers begünstigen die nasopharyngale Besiedelung mit *S. aureus*. Bei Neugeborenen in den ersten Lebenswochen ist ein solcher Test sogar in bis zu 70% der Fälle positiv (Wertheim, 2005). Auch einige Vorerkrankungen des Patienten gehen mit einer Prädisposition für nasale Trägerschaft einher. Hierzu gehören unter anderem Diabetes mellitus, Häm- bzw. Peritonealdialysepflichtigkeit, Leber- und Nierenerkrankungen im Endstadium oder HIV-Trägerschaft (Wertheim, 2005). Die *S. aureus*-Populationen von Dauer-Trägern unterscheidet sich insofern signifikant von der nur intermittierend Besiedelter, als dass bei ihnen kontinuierlich dasselbe Isolat detektiert werden kann. Bei vorübergehender Besiedelung können in der Regel mehrere Stämme mit unterschiedlichen *spa*-Typen nachgewiesen werden

(Edwards, 2011; Peacock, 2001). Auch ist die Bakteriendichte im *Vestibulum nasi* bei dauerhaft Besiedelten höher (Wertheim, 2005).

Um die Besiedelung seiner ökologischen Nische mit anderen Stämmen zu verhindern, müssen sich nasale *S. aureus*-Stämme kontinuierlich reproduzieren (Edwards, 2011). Verstärkt wird dieser Prozess durch den hohen Verlust an adhärenenten oder internalisierten Bakterien in Keratinozyten, die über die Schleimhäute in hohem Maße abgestoßen werden. Darüber hinaus finden sich auffallend häufig Enterotoxin-kodierende Gene im Genom nasaler Isolate (Nashev, 2004). Insbesondere sind die auf dem *egc*-Cluster kodierten Gene *seg*, *sei* und *seh* häufig vertreten (Nashev, 2004) [siehe auch Kapitel 2.11]. Es ist bekannt, dass die Expression dieser Gene insbesondere während der exponentiellen und damit reproduktiven Phase des Bakterienwachstums erfolgt (Grumann, 2008; Nowrouzian, 2015). Die genaue Rolle, die diese Enterotoxine bei der nasalen Besiedelung des Menschen spielen, gilt es jedoch noch zu erforschen. Einen weiteren für die Kolonisation des Nasenepithels bedeutsamen Faktor stellt das Adhäsion Clumping factor B (ClfB) dar. Während zellwandständige Teichonsäuren (WTA) hauptsächlich in der Anfangsphase der Besiedelung große Wichtigkeit zukommen, ist ClfB vor allem zur Aufrechterhaltung der nasalen Trägerschaft erforderlich (Baur, 2014).

Doch auch die individuellen Bedingungen in der Nasenhöhle des Trägers entscheiden über den Trägerstatus. So zeigten Peacock et al. (Peacock, 2001), dass die Adhäsion von *S. aureus*-Laborstämmen *in vitro* an losgelöste Nasenepithelzellen von Trägern größer war als an die von Nicht-Trägern. Die hierfür verantwortlichen genetischen Faktoren sind bislang jedoch unbekannt. Darüber hinaus fand man in den Träger-Sekreten signifikant höhere Entzündungsparameter vor, als in der Vergleichsgruppe (Cole, 2001). Auch Eisenstoffwechsel-Parameter im Nasensekret sind wichtig für die Frage, ob eine nasale Besiedelung stattfindet. So erleichtert Hämoglobin im Nasensekret die Kolonialisierung der Nasenvorhöfe durch *S. aureus*. Auch das Eisen-regulierte Protein A (IsdA) stellt einen solchen Faktor dar, da es Lactoferrin bindet, welches antimikrobielle Eigenschaften aufweist (Edwards, 2011; Foster, 2014). Durch die Bindung des Lactoferrins wird eine Schädigung von *S. aureus* verhindert und die Besiedelung des *Vestibulum nasi* begünstigt (Edwards, 2011; Foster, 2014).

2.6 Erkrankungen verursacht durch *S. aureus*

Neben der Fähigkeit, Schleimhäute zu besiedeln, ist *S. aureus* als fakultativ pathogener Mikroorganismus auch in der Lage, Erkrankungen hervorzurufen. Unterteilt werden diese in invasive und Toxin-vermittelte Formen (Lowy, 1998). Über die letzten Jahrzehnte hinweg hat die Zahl invasiver *S. aureus*-Erkrankungen signifikant zugenommen. Auch ist der prozentuale Anteil von MRSA-Infektionen an *S. aureus*-Erkrankungen insgesamt stark zunehmend (Askarian, 2014). Ein erhöhtes Infektionsrisiko wurde insbesondere bei Bewohnern von betreuten Pflegeeinrichtungen beobachtet (Epstein, 2015). Auch das Vorhandensein chronischer Wunden, oder das Vorhandensein von Fremdkörpern wie einem zentralvenösen Katheter (ZVK), stellen prädisponierende Faktoren für invasive *S. aureus*-Erkrankungen dar (Epstein, 2015).

Besonders häufig durch *S. aureus* verursacht werden Wund- und Weichteilinfektionen, Endokarditis sowie Osteomyelitis (Lowy, 1998). Wund- und Weichteilinfektionen mit *S. aureus* führen meist zu einer gestörten Wundheilung und damit auch zu verlängerter Hospitalisierung betroffener Patienten. In zunehmendem Maße lassen sich aus Wundabstrichen auch MRSA-Stämme isolieren (Askarian, 2014). Insbesondere bei Ulzera und chronischen, nicht-heilenden Wunden spielen die Faktoren Eap und Efb eine wichtige Rolle. Dabei vermittelt Eap zunächst die Adhäsion an die Wunde, wodurch deren Besiedelung mit *S. aureus* ermöglicht wird. Des Weiteren ermöglicht Eap, insbesondere in Abwesenheit von FnBP, die Aufnahme von *S. aureus* in eukaryote Zellen (Chavakis, 2005). Eap beeinflusst zudem über eine Veränderung der Zellmorphologie sowie einer Modifikation der $\alpha 2\beta 1$ -Integrine die Migrations- und Proliferationsfähigkeit von Keratinozyten (Eisenbeis, 2017). Im Anschluss hemmt Eap zudem die Rekrutierung pro-inflammatorischer Zellen sowie die Neovaskularisierung und trägt somit entscheidend zur Entstehung persistierender Wundheilungsstörungen bei (Athanasopoulos, 2006). Das ebenfalls zu den von *S. aureus* in das umgebende Milieu sekretierte und partiell an die bakterielle Zelloberfläche zurückgebundene Protein Efb stört durch Bindung von Fibrinogen-Monomeren den Ablauf der Gerinnungskaskade, was die gestörte Wundheilung begünstigt (Chavakis, 2005). Weltweit werden 25-35% aller Endokarditiden durch *S. aureus* verursacht. Überdurchschnittlich häufig werden diese Endokarditiden dabei durch Stämme der CCs 5 oder 30 verursacht (Nienaber, 2011). Anders als andere bakterielle Endokarditis-Erreger können *S. aureus* Zellen hierbei auch an weitestgehend unbeschädigtes Klappengewebe binden und so eine Endokardentzündung hervorrufen (Lowy, 1998). Als Risikogruppen gelten Patienten mit

mechanischem Klappenersatz, intravenös Drogenabhängige, HIV-Infizierte sowie ältere Personen (Lowy, 1998). Zur Gewebsbesiedelung nutzt *S. aureus* in erster Linie Oberflächenproteine und Teichonsäuren. Die Rolle der Oberflächenproteine, Leukocidine und Hämolyse wird in Kapitel 2.8 detailliert besprochen [siehe Kapitel 2.8: Zytotoxizität].

2.7 Zusammenhang zwischen nasaler Besiedelung und invasiver Erkrankung

1954 postulierte L.G. Tulloch als Erster einen Zusammenhang zwischen nasaler *S. aureus*-Trägerschaft und invasiver Infektion mit dem Erreger (Originalreferenz). Seine Überlegung stützte er darauf, dass sich in einer Reihe invasiver Isolate in 88% der Fälle der gleiche Phagentyp nachweisen ließ wie im korrespondierenden nasalen Abstrich (Wenzel, 1995). Interessanterweise lässt sich diese Assoziation zum Infektionsrisiko nur bei dauerhafter nasaler Trägerschaft herstellen. Intermittierend Besiedelte hingegen besitzen das gleiche Infektionsrisiko wie Nicht-Träger (Wertheim, 2005). Im weltweiten Mittel erkranken durchschnittlich 0,03% einer Bevölkerung an einer invasiven *S. aureus*-Erkrankung, wobei es regional mitunter deutliche Abweichungen gibt. Die Hälfte der Erkrankungen entsteht mit Assoziation zum Gesundheitssystem, die andere Hälfte ohne Verbindung zum Gesundheitssystem (Kluytmans, 2005).

Ein Zusammenhang zwischen Besiedelung und Erkrankung wurde zuerst bei Patienten, die sich einer Hämo- oder Peritonealdialyse unterziehen mussten, beobachtet. So geht ein nasaler *S. aureus*-Nachweis mit einem dreimal so häufigen Auftreten Dialyse-assoziiierter Infekte einher (Nouwen, 2005). Bei Patienten, die eine Peritonealdialyse durchführen, treten insbesondere Infektionen der Austrittsstelle des Dialysekatheters (‘exit-site infections’) sowie Peritonitis auf. So ist das Auftreten einer ‘exit-site infection’ bei nasalen Dauer-Trägern um das 6-7 fache wahrscheinlicher als bei Nicht-Trägern (Wenzel, 1995). Nouwen et al. wiesen 2005 nach, dass nahezu alle dieser Erkrankungen endogener Herkunft sind (Nouwen, 2005). Mit 37% aller Fälle stellt *S. aureus* den häufigsten Grund für eine Infektion orthopädischer Endoprothesen dar (Levy, 2013). Unter orthopädischen Patienten liegt das globale Infektionsrisiko für Träger etwa 5,8-mal höher als für Nicht-Träger (Skramm, 2014). Skramm et al. fanden 2014 innerhalb einer orthopädischen Patientengruppe in nahezu allen Fällen in der nasalen und korrespondierenden invasiven Kultur denselben CC. Dies lässt die Annahme einer Übertragung von besiedelten Körperstellen auf Wunden desselben Patienten sehr wahrscheinlich erscheinen (Skramm, 2014). Belegt ist ein Zusammenhang auch für

rezidivierende, durch *S. aureus* verursachte, Hautinfekte. Nashev et al. (Nashev, 2004) ordneten die Herkunft von Hautinfekt-Isolaten nach genotypischer Analyse den Nasenvorhöfen der Erkrankten zu.

Zur Prävention einer Übertragung besteht die Möglichkeit, nasale Träger mit dem Präparat Mupirocin zu behandeln. Dieses wird in Form einer Salbe in die Nasenvorhöfe eingebracht und über 14 Tage hinweg regelmäßig angewandt. Teilweise wird zusätzlich eine 2% Chlorhexidin-Waschlotion verwendet, um auch andere besiedelte Körperstellen zu dekolonisieren (Perl, 2002; Levy, 2013). Eine Mupirocin-Behandlung eliminiert die nasale *S. aureus*-Trägerschaft bei 80-85% der Patienten (Perl, 2013). Für Häm- und Peritonealdialysepatienten ist eine signifikante Reduktion invasiver *S. aureus*-Erkrankungen bei einer solchen Therapie belegt; gleiches gilt für chirurgische Patienten, die vor einer elektiven Operation behandelt wurden (Wenzel, 1995). Bei orthopädischen Patienten beobachtete Levy et al. (Levy, 2013) ebenfalls eine Verringerung invasiver Wundinfekte; eine statistische Signifikanz war hierfür jedoch nicht gegeben.

2.8 Zytotoxizität

Entscheidend für die Zytotoxizität eines *S. aureus*-Stammes sind die von ihm produzierten Toxine (Merghni, 2015). Da sie nach ihrer Produktion vom Bakterium sezerniert werden, werden sie vielfach als Exotoxine bezeichnet. Unter diesem Begriff fasst man unter anderem Zytolysine, Staphylokokken-Enterotoxine (SEs), SE-like Proteine oder das toxische Schocksyndrom-Toxin-1 (TSST-1) zusammen (Stach, 2014; Bien, 2011). Ihre primären Aufgaben sind, die Immunantwort des Wirtes zu modulieren und umliegendes Gewebe zu zerstören. Hierdurch werden Nährstoffe freigesetzt, die das Bakterium für sein Wachstum und seine Vermehrung benötigt (Bien, 2011; Dinges, 2000). Exprimiert werden diese Faktoren vorwiegend in der stationären Wachstumsphase (Dinges, 2000; Stach, 2014). Gleichzeitig ist ein Genaustausch durch Bakteriophagen oder Plasmide möglich, wodurch die Zytotoxizität der Empfängerstämme verstärkt werden kann (Dinges, 2000). Durch Bindung an MHC-II-Moleküle außerhalb der klassischen Bindungsstelle lösen sie direkt eine T-Zellantwort aus. Besonders häufig wird eine Bindung an die V β -Region des T-Zell-Rezeptors beschrieben (Marrack, 1990; Stach, 2014). Infolge der Immunaktivierung von bis zu 20% der gesamten T-Zellpopulation kommt es zu einer massiven Freisetzung von Zytokinen und Mediatoren, sowie dem Abtöten MHC-II-positiver Zellen durch zytotoxische T-Zellen. Dies führt zu

mitunter Schock-ähnlichen Reaktionen des Wirtsorganismus (Marrack, 1990; Dohlsten, 1991).

Eine Untergruppe der Exotoxine stellen die Zytolysine dar, worunter die α -, β - und γ -Toxine fallen. Diese Toxine werden auch als Hämolysine bezeichnet, da ihre membranschädigende Wirkung zunächst an Erythrozyten beobachtet wurde (Bien, 2011). Das α -Toxin stellt das am häufigsten vertretene zytolytische Protein von *S. aureus* dar (Stach, 2014). Es wird durch *hla* kodiert und zunächst in löslicher Form freigesetzt (Merghni, 2015; Menestrina, 1991). Anschließend erfolgt ein Einbau in die Wirtszellmembran, wo es als Heptamer eine Pore formt. Infolge dessen kommt es zur osmotischen Lyse der Zelle (Bien, 2011). Merghni et al. gelang es, eine signifikante Korrelation zwischen dem Vorhandensein der *hla*-Genregion und der Zytotoxizität eines Stammes nachzuweisen (Merghni, 2015).

Im Gegensatz hierzu scheint das ebenfalls zu den Hämolysinen zählende β -Toxin selbst keine ausgeprägte zytolytische Aktivität zu besitzen (Bien, 2011; Kmiecik, 2016). Als Sphingomyelinase bindet Hlb an Sphingomyelin in den Plasmamembranen eukaryonter Zellen und katalysiert dort die Spaltung der Phosphodiesterbindung des Plasmamembranlipids (Huseby, 2007). Durch eine Veränderung der Membran-Fluidität und der Destabilisierung der Bilayer-Struktur der Zellmembran sensibilisiert es die Wirtszelle jedoch für andere Toxine wie das Panton-Valentine Leukozidin oder das α -Toxin (Bien, 2011; Stach, 2014).

Das durch das *hlgABC* Operon kodierte γ -Toxin fügt insbesondere Erythrozyten und Leukozyten Schaden zu (Bien, 2011). Ähnlich wie PVL setzt sich γ -Toxin aus zwei Untereinheiten, entweder HlgA und B oder HlgB und C, zusammen und führt so zu einer Porenbildung in den Membranen der Zielzellen bzw. der Solubilisierung der Membranen. Die Expression der Gene, die für α - und γ -Toxine kodieren, werden über dieselben Transkriptionsfaktoren reguliert und sind in nahezu allen pathogenen *S. aureus*-Stämmen vorhanden (Menestrina, 1991).

Das Toxische Schocksyndrom Toxin TSST-1 wirkt, wie die SEs und SE-like Proteine, als Superantigen. Es ist insbesondere mit dem menstruationsbedingten TSS vergesellschaftet [siehe auch Kapitel 2.6.2] und löst vor allem durch die Aktivierung von T-Zellen und der darauf folgenden Ausschüttung von Zytokinen einen Schockzustand aus (Marrack, 1990; Deurenberg, 2005; Koosha, 2016).

Etwa 30% aller Lebensmittelvergiftungen der westlichen Welt werden durch Staphylokokken-Enterotoxine (SEs) verursacht (Kadariya, 2014). Ihre Symptome entstehen hauptsächlich

durch die Ausschüttung von Mediatoren wie IL-2, IFN- γ oder TNF- α (Kadariya, 2014; Dohlsten, 1991).

2.9 Adhäsion

Sowohl für eine dauerhafte Besiedelung als auch für *S. aureus*-assoziierte Erkrankungen ist die Anheftung an Wirtszellen eine Grundvoraussetzung. Die Adhäsion wird über zahlreiche Adhäsine vermittelt, deren Expression, ähnlich wie bei den zuvor beschriebenen Toxinen, einem komplexen Netzwerk an Regulatoren unterliegt (Cheung, 2004). Eine wichtige Rolle für die Adhäsion von *S. aureus* an Wirtsstrukturen spielen die „microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“ (MSCRAMMs). Foster et al. (Foster, 2014) unterteilen die MSCRAMMs in drei Untergruppen bezogen auf genetische Motive, die mittels Struktur-Funktionsanalyse definiert wurden: Clf-Sdr Proteine, FnBPs sowie Cna. Über diese MSCRAMMS-Gruppen gelingt es *S. aureus*, direkt oder indirekt über Liganden an die Wirtszelle zu binden (Alexander, 2001; Foster, 2014).

Zu den am besten erforschten Adhäsinen zählen die Fibronectin-bindenden Proteine A und B (FnBP-A bzw. FnBP-B). Ihren Gegenpart an der Wirtszelle stellen $\alpha 5\beta 1$ sowie $\alpha 2\beta 1$ -Rezeptoren dar, mit denen die FnBPs über Fibronectin Brücken ausbilden (Heilmann, 2009; Hauck, 2006; Eisenbeis, 2017). Das Glykoprotein Fibronectin stellt ein wichtiges Strukturmerkmal der extrazellulären Matrix (EZM), also der Zellbestandteile des Interzellularraumes dar. Des Weiteren ist es in gelöster Form in Blutplasma vorzufinden und spielt dort eine wichtige Rolle in der Wundheilung und Blutgerinnung. Über die FnBPs wird Fibronectin irreversibel an die Bakterienoberfläche gebunden und so eine Adhäsion an die EZM ermöglicht. *S. aureus*-Mutanten, denen beide Gene für FnBPs fehlen, zeigen *in vitro* nahezu keine Adhäsion an humane Zelllinien (Hauck, 2006). Neben den FnBPs ist auch das Kollagen-Adhäsin Cna (durch *cna* kodiert), an der Adhäsion an Keratinozyten beteiligt. Unter Beteiligung von Cna bindet *S. aureus* an die Kollagen Typen IV und V, weiteren Bestandteilen der EZM (Heilmann, 2009). Weitere gut beschriebene Adhäsine sind die Fibrinogenbindepoteine Clumping factor A und B (ClfA bzw. ClfB). Auch sie gehören der Proteingruppe der MSCRAMMs an und bewirken eine stabile Bindung von Fibrinogen/Fibrin (van Belkum, 2001; Heilmann, 2009). Fibrinogen stellt ebenfalls einen membranständigen Faktor der Zelloberfläche dar. Zugleich fungiert er als Faktor der Blutgerinnung (Heilmann, 2009). Aus diesem Grund kann *S. aureus* über den platelet membrane receptor auch an Thrombozyten binden und die Bildung kleiner Thromben induzieren. Diese dienen der

Verbreitung des Bakteriums im Wirtsorganismus (Heilmann, 2009, Joost, 2009). Zusätzlich ist *S. aureus* in der Lage, zellwandständige Teichonsäuren (WTA) zu exprimieren (Foster, 2014). Diese stehen als Adhäsine über den Rezeptor SCREC-1 in Verbindung mit der Zellmembran der Wirtszelle. Dieser Rezeptor ist in zahlreichen humanen Gewebetypen wie dem Epithel der Mundschleimhaut, Erythrozyten oder Fibroblasten vorhanden, wodurch eine Adhäsion an diese Gewebetypen ermöglicht wird (van Belkum, 2001; Baur, 2014).

Neben den MSCRAMMs spielen auch die „secretable expanded repertoire adhesive molecules“ (SERAM) eine wichtige Rolle bei der Anheftung von *S. aureus* an Wirtsorganismen (Heilmann, 2009). Sie werden vom Bakterium sezerniert und zumindest teilweise an die Bakterienzellwand zurückgebunden (Heilmann, 2009; Harraghy, 2003).

Hierbei ist insbesondere das extrazelluläre Adhäsionsprotein (Eap) zu nennen. Es weist eine hohe Affinität zu verschiedenen Plasmaproteinen und Proteinen der EZM auf. Durch eine zusätzliche Bindung von WTA erfolgt eine bessere Adhäsion von *S. aureus* insbesondere an Fibroblasten und Epithelien (Harraghy, 2003; Hussain, 2008). Dieser Faktor wird, anders als die meisten Adhäsine von *S. aureus*, die bevorzugt in der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert werden (Cheung, 2004), vorrangig in der post-exponentiellen Wachstumsphase exprimiert (Joost, 2009).

2.10 Zielsetzung der Arbeit

Eingebettet in das Afrikanisch-Deutsche Netzwerk zur Forschung an Staphylokokken (StaphNet) war es bei dieser Arbeit von besonderem Interesse, Aussagen über das phänotypische *in vitro*-Verhalten Gesellschafts-assoziiierter Staphylokokken afrikanischer bzw. deutscher Herkunft treffen zu können. Hierbei war es insbesondere von Bedeutung, zu untersuchen, ob sich Isolate nasaler und klinischer Herkunft in ihrem phänotypischen Verhalten voneinander unterscheiden.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit war, zu erforschen, ob es Unterschiede in der Zytotoxizität und Adhäsion von *S. aureus* Isolaten unterschiedlicher klonaler Komplexe gibt und inwiefern sich diese mit dem genetischen Repertoire an Virulenzfaktoren der jeweiligen CCs korrelieren lassen.

Des Weiteren sollte für die Adhäsionsexperimente auch ein potentieller Einfluss der Herkunft der Isolate untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Afrikanisch-Deutsches Netzwerk zur Forschung an Staphylokokken (African-German-StaphNet)

Die untersuchten *S. aureus*-Isolate wurden im Rahmen von Erhebungen des Afrikanisch-Deutschen Netzwerkes zur Forschung an Staphylokokken (StaphNet) gesammelt. Das Konsortium gründete sich 2009, um die Forschung an *S. aureus* insbesondere in afrikanischen Ländern zu koordinieren und zu intensivieren. Am StaphNet sind drei afrikanische und drei deutsche Projektpartner beteiligt: Ifakara (Tansania), Lambaréné (Gabun), Manhiça (Mosambik) sowie Freiburg, Homburg und Münster.

Zur Durchführung des Projektes lagen positive Ethikvoten des *Ministry of Health and Social Welfare of Tanzania* (Ifakara), des *Institutional Ethics Committee of the Medical Research Unit of the International Foundation of the Albert Schweitzer Hospital* (Lambaréné) sowie des *Comité Nationale de Bioética para a Saude* (Manhiça) vor. Auch die Ethikkommission der Albert-Ludwigs-Universität (Freiburg), die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes (Homburg) sowie die Ethikkommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Westfälischen Wilhelms-Universität (Münster) gaben positive Ethikvoten bezüglich des Projektes ab.

3.2 Zusammenarbeit mit Lea-Elisa Roth im Rahmen des African-German-StaphNet

Die Zytotoxizitätsbestimmung der untersuchten *S. aureus*-Isolate erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Lea-Elisa Roth. Dabei wurde der Zytotoxizitäts-Assay bei der Hälfte der Isolate von L. Roth durchgeführt, die andere Hälfte von mir. Die Daten wurden anschließend zusammengeführt und mit unterschiedlicher Fragestellung von beiden Beteiligten ausgewertet. Die Auswertung bzgl. der Frage, ob sich die Isolate afrikanischer bzw. deutscher Herkunft in ihrem Zytotoxizitätsverhalten unterscheiden, wurde von Lea-Elisa Roth im Rahmen ihrer Bachelorarbeit an der Hochschule Kaiserslautern - Standort Zweibrücken - untersucht und dort als Bachelorarbeit vorgelegt (Roth, 2016).

Im Rahmen dieser Dissertation soll untersucht werden, ob sich nasale und klinische Isolate in ihrem zytotoxischen Potential unterscheiden. Die geographische Herkunft der Isolate spielt

bei dieser Fragestellung keine wesentliche Rolle und wird lediglich graphisch in der Ergebnisübersicht dargestellt. Eine Diskussion erfolgt soweit nicht (hierzu siehe Roth, 2016).

Die Adhäsionsassays wurden ausschließlich von mir durchgeführt; daher erfolgt im Rahmen dieser Arbeit für diesen Assay sowohl eine Auswertung im Hinblick auf geographische Unterschiede und die Frage, ob sich nasale und klinische Isolate voneinander unterscheiden.

3.3 Aufschlüsselung der untersuchten Isolate:

In die Untersuchung eingeschlossen wurden ausschließlich Gesellschafts-assoziierte, Methicillin-sensible Isolate (CA-MSSA). Bei den 70 ausgewählten Stämmen wurde nach dem Lokalisationsort des Abstriches sowie der geographischen Herkunft unterschieden. Dabei wurde versucht, soweit als möglich von jedem Herkunftsort und jeder Isolationsquelle ein Isolat mit einzuschließen.

Tabelle 1: Übersicht der untersuchten Isolate aufgeschlüsselt nach Klonalen Komplexen (CCs) sowie nach Herkunftsorten. Gleichzeitig erfolgte eine Unterscheidung in nasale (n) und klinische (k) Isolate

	CC5		CC8		CC15		CC30		CC45		CC121		CC152		
	n	k	n	k	n	k	n	k	n	k	n	k	n	k	<i>gesamt:</i>
Ifakara	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	10
Lambaréné	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	12
Manhiça	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	11
Freiburg	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	10
Homburg	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	9
Münster	0	1	2	0	1	1	0	1	2	1	0	1	0	0	10
gesamt:	11		11		10		8		7		10		5		62

Nach Lokalisation des Abstriches:

Tabelle 2: Übersicht zur Lokalisation des Abstriches der untersuchten Isolate

Nasale Isolate	30
Klinische Isolate	32
- davon Wundabstriche	29
-davon Blutstromisolate	3

Tabelle 3: Übersicht über den prozentualen Anteil an *S. aureus*-Isolaten, die für einen Zytotoxizitätsvermittelnden Genlocus positiv sind, aufgeschlüsselt nach klonalem Komplex

	CC5	CC8	CC15	CC30	CC45	CC121	CC152
PVL-kodierende Genloci (<i>lukF-PV</i> und <i>lukS-PV</i>)	9%	9%	0%	50%	0%	70%	80%
Hämolyysin A (<i>hla</i>)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Hämolyysin B (<i>hlyB</i>)	100%	91%	10%	88%	17%	100%	20%
Toxisches Schocksyndrom-Toxin-1 (<i>tst-I</i>)	9%	0%	0%	38%	43%	0%	0%
Enterotoxin A (<i>sea</i>)	18%	27%	0%	13%	0%	0%	0%
Enterotoxin N (<i>selN</i>)	100%	27%	10%	100%	100%	100%	0%
Hämolyysin γ Komponente A (<i>hlgA</i>)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Leukozidin E-Komponente (<i>lukE</i>)	100%	91%	90%	0%	17%	90%	20%
Staphylokokken Komplementsystem-Inhibitor (<i>scn</i>)	91%	100%	100%	75%	100%	100%	100%
Exfoliativtoxin A (<i>etA</i>)	0%	0%	10%	0%	0%	20%	0%
Exfoliativtoxin B (<i>etB</i>)	0%	0%	10%	0%	0%	10%	20%
Exfoliativtoxin D (<i>etD</i>)	0%	9%	0%	0%	0%	0%	0%

Tabelle 4: Übersicht über den prozentualen Anteil der für einen Adhäsion-vermittelnden Genlocus positiven *S. aureus*-Isolate, aufgeschlüsselt nach klonalem Komplex

	CC5	CC8	CC15	CC30	CC45	CC121	CC152
Fibronectin-bindendes Protein A (<i>fnbA</i>)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Fibronectin-bindendes Protein B (<i>fnbB</i>)	100%	82%	90%	63%	100%	100%	100%
Kollagen-Adhäsion (<i>cna</i>)	0%	9%	10%	88%	83%	100%	83%
Extrazelluläres Adhäsionsprotein (<i>eap</i>)	91%	100%	100%	100%	100%	100%	20%
Clumping factor A (<i>clfA</i>)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Clumping factor B (<i>clfB</i>)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
von-Willebrandt Faktor-bindendes Protein (<i>vwb</i>)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Eisen-reguliertes Oberflächenprotein A (<i>isdA</i>)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Staphylokokken-Protein A (<i>spa</i>)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Sialoprotein-bindendes Protein C (<i>sdrC</i>)	100%	100%	100%	100%	100%	90%	20%
Sialoprotein-bindendes Protein D (<i>sdrD</i>)	91%	82%	90%	88%	100%	90%	100%
<i>S. aureus</i>-Oberflächenprotein G (<i>sasG</i>)	100%	91%	90%	0%	33%	10%	0%

Bezeichnung der einzelnen Isolate:

Gemäß den Statuten des StaphNet wurde jedem Isolat nach einem festgelegten Schema eine Abkürzung zugeordnet. Den ersten Teil dieser Zuordnung bildet das Kürzel des Herkunftsortes. So kodiert IT für Ifakara (Tansania), LG für Lambaréné (Gabun) und MM für Manhiça (Mosambik). Den deutschen Kooperationspartnern wurde FR für Freiburg, HS für Homburg (Saarland) bzw. MW für Münster (Nordrhein-Westfalen) zugeordnet.

Der zweite Teil der Abkürzung lässt den Rückschluss zu, ob ein Isolat nasaler oder klinischer Abstammung ist. So bezeichnet der Buchstabe N nasale Isolate, mit B werden Blutstromisolate und mit O Stämme aus invasiven Wundabstrichen bezeichnet.

Der letzte Teil der Bezeichnung steht für die laufende Nummerierung eines Stammes. So lassen sich Isolate, die sowohl der gleichen geographischen Herkunft, als auch der gleichen Lokalisation (Nase, Blut, Wunde) zugeordnet werden, voneinander unterscheiden. Eine gemäß diesen Richtlinien zugeordnete Bezeichnung wäre beispielsweise HS-O032.

3.4 Arbeitsmaterialien

3.4.1 Chemikalien und Kits:

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Kits

Chemikalien/Kits	Hersteller
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega, Fitchburg/USA
Trypanblau	Bio-Rad Laboratories; München/Deutschland
TrypLE™ Express	gibco® life technologies, Carlsbad/USA

3.4.2 Nährmedien

Tabelle 6: Verwendete Nährmedien

Medium	Hersteller
Brain-Heart Infusion (BHI)	Becton Dickinson, Heidelberg/Deutschland
MCDB-Nährmedium mit 5% fetalem Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin/Deutschland
MCDB-Nährmedium mit 10% FCS	Biochrom, Berlin/Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren	gibco® life technologies, Carlsbad/USA
Tryptic Soy Agar (TSA) mit 5% Schafblut	Becton Dickinson, Heidelberg/Deutschland
Tryptic Soy Broth (TSB)	Becton Dickinson, Heidelberg/Deutschland

3.4.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 7: Verwendete Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung/Hersteller
1×PBS	
NaCl	8,0g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,44g
KH ₂ PO ₄	0,24g
Millipore®-Wasser	ad 1000 m

FitC-Ausgangslösung Fluoresceinisothocyanat-Isomer I Ethanol	0,05g ad 10 ml
Formaldehyd 37% vol.	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe/Deutschland
Glycerin	Becton Dickinson, Heidelberg/Deutschland
Natriumhydrogencarbonat-Lösung NaHCO ₃ Millipore®-Wasser	0,84g ad 100 ml sterilfiltriert und Kalibration auf pH=9,0
FitC-Lösung FitC-Ausgangslösung Natriumhydrogencarbonat-Lösung	100µl ad 1 ml

3.4.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
96-Well-Platten (durchsichtig) mit Deckel	Mast Diagnostica, Reinfeld/Deutschland
96-Well-Platten (schwarz) mit Deckel	Greiner Bio-One, Kremsmünster/Österreich
Cryo-Röhrchen	Greiner Bio-One, Kremsmünster/Österreich
Einmalspritze (5 ml)	B. Braun, Melsungen
"Falcon"-Röhrchen 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg/Deutschland
Filter (0,2 µm Porengröße)	Sarstedt, Nürmbrecht/Deutschland
Impfösen (steril)	Sarstedt, Nürmbrecht/Deutschland
Petrischalen	Heinz Herenz GmbH, Hamburg/Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürmbrecht/Deutschland
Reagiergefäße 1,5 ml bzw. 2 ml	Eppendorf, Hamburg/Deutschland
Zellkulturschalen	TPP (Techno Plastic Products), Trasadingen/Schweiz

3.4.5 Geräte

Tabelle 9: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank	Heraeus, Langenselbold/Deutschland
Hochgeschwindigkeitszentrifuge	Eppendorf, Hamburg/Deutschland
Magnetrührer	IKA®-Werke, Staufen /Deutschland
McFarland Photometer	BioMérieux, Marcy L'Étoile/Frankreich
Mehrkanalpipette	Brand, Wertheim/Deutschland
Minizentrifuge	Eppendorf, Hamburg/Deutschland
Multitron-Rüttler	Infors HT, Bottmingen/Schweiz
Sterilbank HeraSafe™	Heraeus, Langenselbold/Deutschland
Thermo-Schüttler	Eppendorf, Hamburg/Deutschland
Transferpipette	Socorex Isba SA, Lausanne/Schweiz
Transferpipette	VWR International, Darmstadt/Deutschland
Vortex-Mixer VV3	VWR International, Darmstadt/Deutschland
Wallac Victor 2V Microplate Reader	Perkin Elmer, Waltham/USA
Zellzahl-Zähler TC20™	Bio-Rad Laboratories; München/Deutschland
Zentrifuge 4K15	Sigma Laborzentrifugen, Osterode/Deutschland

3.4.6 Software

Tabelle 10: Verwendete Software zur Versuchsauswertung

Software	Hersteller
Acrobat Reader	Adobe, Dublin/Irland
Excel	Microsoft, Redmond/USA
GraphPad Prism™ 6.0	GraphPad Software Inc., San Diego/USA
SigmaPlot™	Systat Software GmbH, Erkrath/Deutschland
Wallac 1420 Manager	Perkin Elmer, Waltham/USA
Word	Microsoft, Redmond/USA

3.5 Methoden

3.5.1 Kryokonservierung der *S. aureus*-Isolate:

Die *S. aureus*-Isolate wurden auf TSA-Platten mit 5% Schafblut-Anteil kultiviert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Kolonie mittels einer sterilen Impföse in 3 ml Brain-Heart Infusion (BHI) gelöst und über Nacht bei 37°C und 150 Upm bebrütet. Am nächsten Tag wurde in einem Cryo-Röhrchen 600 µl einer 30%igen Glycerinlösung vorgelegt und dieses mit 400 µl der Übernacht-Kultur vermischt. Durch die Lagerung bei -70°C wurde eine Konservierung über mehrere Monate bis Jahre hinweg ermöglicht.

Zur weiteren Verwendung wurde eine volle Impföse der Cryokultur des jeweils benötigten Stammes mittels 3-Impfösenausstrich auf eine TSA-Blutplatte aufgebracht und 24 Stunden lang bei 37°C inkubiert.

3.5.2 Kultivierung der HaCaT-Zelllinie:

Zur Durchführung der Versuche wurden HaCaT-Keratinocyten (Human adult low Calcium high Temperature-Keratinocyten) kultiviert. Zunächst wurde das alte Medium entfernt und die Zellen mit 1×PBS gewaschen. Durch die anschließende Zugabe von 2 ml TrypLE™ Express pro Kulturschale lösten sich die Zellen vom Boden der Schale. Diese Reaktion wurde nach 10 Minuten durch 2 ml MCDB-Medium mit 10% FCS und 1% nicht-essentielle Aminosäuren gestoppt. Die Suspension wurde dann in ein "Falcon"-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei $2300 \times g$ für 5 Minuten und dem Absaugen des dabei entstandenen Überstandes blieben die Zellen auf dem Boden des Röhrchens zurück. Das Pellet wurde in 1 ml des FCS/AA-komplementierten Mediums gelöst und mit weiteren 9 ml des Mediums vermischt. Anschließend erfolgte die Messung der Zellzahl und des Anteils der lebenden HaCaTs. Anschließend erfolgte das Auffüllen der Zellsuspension mit Medium, sodass eine Endkonzentration von 3×10^7 Zellen/ml erreicht wurde. Das Zell-Medium-Gemisch wurde dann zu je 10 ml in neue Zellkulturschalen verteilt. Dieser Vorgang wurde zwei Mal pro Woche wiederholt, um optimale Kulturbedingungen für diesen Zelltyp herzustellen.

3.5.3 Zytotoxizitäts-Assay:

Um die Zytotoxizität der Isolate bestimmen zu können, wurden am Vortag des Versuches 3×10^4 HaCaTs pro Vertiefung in eine 96-Well-Platte ausgesät. Hierbei wurde mit MCDB-Medium mit einem auf 5% reduzierten FKS-Anteil gearbeitet, um eine Verfälschung der Messergebnisse zu verhindern. Ebenso wurde von den zu testenden *S. aureus* Stämmen jeweils eine Kolonie per Impföse von einer Blutplatte abgelöst, in 3 ml TSB eingerührt und die Kulturen bei 37°C und 150 rpm über Nacht inkubiert. Am Versuchstag wurde die optische Dichte der Übernacht-Kulturen bestimmt und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 8 durch Mischen der Bakteriensuspension mit der benötigten Menge an TSB eingestellt. Durch zweiminütiges Zentrifugation bei $14.000 \times g$ wurden die Bakterien pelletiert. Der Überstand wurde steril filtriert. Anschließend wurden 50 µl des steril filtrierten Überstandes 1:3 mit MCDB-Medium (mit 5% FCS und 1% nicht-essentielle Aminosäuren) verdünnt und pro Well 50 µl des verdünnten Bakterienüberstandes auf die adhären HaCaT Zellen pipettiert. In drei Wells, welche als Positivkontrolle dienten, wurde kein Bakterienüberstand überführt. In drei andere Wells wurde als Negativkontrolle statt des Bakterienüberstandes 50 µl des 1:3 mit MCDB verdünnten TSB hinzugegeben.

Nach 3 Stunden und 15 Minuten Inkubation bei 37°C in 5% CO_2 -Atmosphäre wurde in die Wells der Positivkontrolle je 10 µl der mitgelieferten Lösung zur Lyse der Zellen gegeben. In alle weiteren zellhaltigen Wells wurden je 10 µl $1 \times$ PBS pipettiert. Nach weiteren 45 Minuten Inkubation unter den gleichen Bedingungen erfolgte die Zentrifugation der 96-Well-Platte bei $250 \times g$ für 4 Minuten. Anschließend wurden je 50 µl des Überstandes in eine neue 96 Well-Platte pipettiert und je 50 µl des mitgelieferten Substrat-Mixes zugegeben. Ab diesem Schritt war die Versuchsanordnung mittels Alufolie vor Licht zu schützen. Nach der anschließenden Inkubation von 30 Minuten wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 50 µl der mitgelieferten Lösung zum Abstoppen der Reaktion beendet und die Absorption im Wallac Victor 2V Microplate Reader bei 490 nm gemessen.

Um eine prozentuale Zytotoxizitäts-Berechnung zu ermöglichen, wurde sowohl für die Positiv- wie auch die Negativkontrolle ein Mittelwert gebildet. Der Mittelwert der Negativkontrolle wurde vom jeweiligen Messwert subtrahiert und der dabei entstandene Wert durch das Mittel der Positivkontrolle geteilt und mit dem Faktor 100 multipliziert. Der dabei entstandene Wert stellt die relative Zytotoxizität eines Stammes dar:

$$\left[\frac{\text{Messwert} - \text{Mittelwert der Negativkontrolle}}{\text{Mittelwert der Positivkontrolle} - \text{Mittelwert der Negativkontrolle}} \right] \times 100$$

3.5.4 Adhäsions-Assay:

Zur Bestimmung der prozentualen Adhäsion an humane Keratinozyten wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) verwendet. Am Versuchsvortag wurden 50 µl einer HaCaT-Zellsuspension mit 6×10^5 Zellen pro ml in jede Vertiefung einer 96 Well-Platte mit schwarzem Boden überführt. Des Weiteren wurden, wie zuvor beschrieben, von den zu testenden *S. aureus* Stämmen 3 ml TSB-Übernachtskulturen hergestellt.

Am Morgen des Versuchstages wurde jeweils 100 µl der Übernachtskultur in 3 ml frischem TSB angeimpft. Nach dreistündiger Inkubation bei 37°C und 150 Upm wurde je 1 ml der Bakteriensuspension für 2 Minuten bei $14.000 \times g$ zentrifugiert, der Überstand abgenommen und der Bodensatz mit 1 ml 1×PBS gewaschen. Das Bakterienpellet wurde in 1 ml einer 100 mM NaHCO₃-Lösung, die 100 µg FITC-Farbstoff pro ml enthält, aufgenommen, gevortext und 60 Minuten bei 1000 Upm im Thermoblock bei 37°C inkubiert. Um freies FITC zu entfernen, erfolgte ein dreimaliges Waschen der Bakterien mit je 1 ml 1 × PBS. Zwischen den Waschschrritten wurde das Eppendorfgefäß je 2 Minuten bei $14.000 \times g$ zentrifugiert, um ein solides Pellet am Boden des Gefäßes zu erhalten. Nach Abschluss der Waschschrritte wurde eine OD₆₀₀ von 1 mittels PBS eingestellt. Unterdessen wurden in jede der Vertiefungen der vorbereiteten 96 Well-Platte je 200 µl MCDB-Medium ohne FCS hinzugegeben, welches kurz darauf wieder abgenommen wurde. Anschließend wurden je 50 µl der mit FITC gefärbten Bakteriensuspension in jedes Well überführt, in dem sich bereits 50 µl der HaCaT-MCDB-Gemisch befand. Diesem Schritt schloss sich eine 45 minütige Inkubation bei 37°C in 5%iger CO₂-Atmosphäre an. Nach Zugabe von 150 µl 1 × PBS in jedes Well wurden 200 µl des Überstandes abgenommen, sodass in jedem Well 50 µl Flüssigkeit verblieb. Jede Vertiefung wurde daraufhin noch zwei Mal mit 200 µl PBS gewaschen, um nicht-adhärenente Bakterien zu entfernen.

Als Referenz wurden je 50 µl der gefärbten Bakteriensuspension mit einer optischen Dichte von 1 des jeweiligen Stammes in leere Wells gegeben. Pro Stamm und Versuchstag wurden jeweils 3 Replika der Referenzwells gemessen. Zur Bestimmung der prozentualen Adhäsion wurde die Fluoreszenz in der 96 Well-Platte im Victor ELISA Reader mit dem Programm CFSE nach Anregung durch Licht der Wellenlänge 495 nm mit einer Belichtungszeit von 0,1 Sekunden bei 525 nm gemessen. Das Verhältnis der Werte der „Adhäsionswells“ wurde durch den durchschnittlichen Messwert der „Referenzwells“ geteilt und mit dem Faktor 100 multipliziert. Bereinigt um den Wert der Autofluoreszenz der verwendeten Platten ergibt sich dabei der prozentuale Anteil an adhärenenten Bakterien.

3.5.5 Vorversuche Adhäsions-Assay:

Um einen standardisierten Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen, wurde als Positivkontrolle der *S. aureus* Stamm Cowan-1 verwendet, der für seine hohe Adhäsion an Keratinozyten bekannt ist (Cowan, 1954). Als Negativkontrolle kamen die Stämme *S. carnosus* TM-300 und *S. aureus* 1711 zum Einsatz, die als Stämme mit niedrigen Adhäsionswerten beschrieben sind (Ballhausen, 2014; Schleifer, 1982). Gleichzeitig wurde der dem CC5 zugehörige Stamm FR-N052 einbezogen, um auch ein Isolat der eigentlichen Versuchsreihe regelmäßig mit zu testen. Jeder Versuch wurde fünfmal wiederholt und die Durchschnittswerte miteinander verglichen.

Zur Etablierung des Adhäsions-Assays wurden unterschiedliche Methoden der Versuchsdurchführung getestet.

Versuch mit fixierten Zellen:

Um zu testen, welchen Effekt eine chemische Fixierung der HaCaTs auf den Versuch hat, wurden die Zellen mit Formaldehyd behandelt. Hierzu wurden zu den am Vortag mit einer Dichte von 3×10^4 Zellen pro Well ausgesäten HaCaTs je 50 μl einer 16%-Formaldehyd-Lösung gegeben. Nach 15-minütiger Inkubationszeit wurde der komplette Überstand abgenommen und die Platte unter dem Abzug getrocknet. Der Rest des Versuches wurde wie oben erläutert durchgeführt.

Versuch mit Zentrifugation:

Eine andere Versuchsanordnung beinhaltete die Zentrifugation der mit Bakterien koinkubierten Zellen, um einen möglichen Effekt auf die Versuchsergebnisse zu überprüfen. Der Adhäsions-Versuch wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Um die HaCaTs mit der Bakteriensuspension in Kontakt zu bringen, wurde die 96-Well-Platte für 5 Minuten bei $450 \times g$ zentrifugiert. Die sich anschließende Inkubationszeit wurde auf 15 Minuten verkürzt. Die Auswertung erfolgte gemäß der regulären Vorgehensweise.

Beide Variationen des Adhäsions-Versuches wurden sowohl alleine, als auch jeweils in Kombination durchgeführt.

3.5.6 Statistische Auswertung:

Die Auswertung der Messungen des *Wallac Victor 2V Microplate Reader* erfolgte mittels der Wallac 1420 Manager-Software. Die weitere Aufbereitung der Daten wurde in Microsoft Excel und GraphPad PrismTM 6.0 vorgenommen.

Als Testverfahren wurde für zwei Stichprobenmengen mit einem $n \geq 4$ der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Bei Gruppengrößen von $n \leq 3$ wurde aufgrund der fehlenden Stärke des auf Rangsummenunterschieden basierenden Tests bei kleinen Stichprobengrößen auf einen T-Test zurückgegriffen. Die statistische Auswertung von mehr als zwei, nicht-normalverteilten Stichprobenmengen erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von einem Dunn's Post-hoc-Test.

4.1 Zytotoxizität

4.1.1 Klonale Komplex-spezifische Zytotoxizität

Eine Betrachtung der ermittelten Zytotoxizitäts-Werte zeigte Unterschiede zwischen den CCs in Bezug auf ihre Fähigkeit, Zellen der spontan immortalisierten humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT zu schädigen. Eine auffallend hohe relative Zytotoxizität zeigten die Überstände der CC121 und CC152 Isolate mit durchschnittlich $79 \pm 25\%$ bzw. $93 \pm 1\%$ relativer LDH-Freisetzung. Eine ebenfalls hohe relative Zytotoxizitätsrate wiesen die Isolate des CC8 mit $70 \pm 12\%$ auf. Mittlere Zytotoxizitäten ließen sich bei Isolaten des CC5 mit $42 \pm 15\%$, CC15 mit $45 \pm 10\%$ sowie bei CC45 mit $60 \pm 28\%$ relativer LDH-Freisetzung beobachten. Im Vergleich dazu fielen die durchschnittlichen relativen Zytotoxizitätswerte der Isolate des CC30 mit $34 \pm 33\%$ niedriger aus. Auffällig ist zudem, dass mit Ausnahme der CC121-Isolate, die eine ähnlich hohe Zytotoxizität aufwiesen, in den einzelnen CC zum Teil isolatspezifische Unterschiede in der relativen Zytotoxizität gefunden wurden.

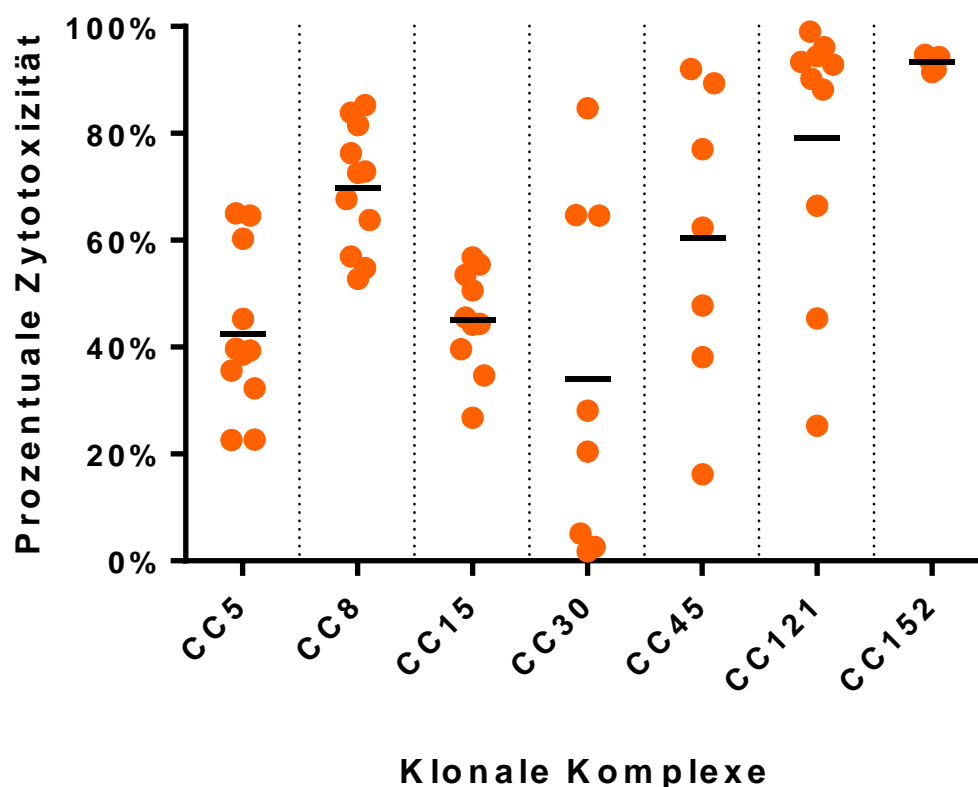


Abbildung 1: Überblick über die prozentuale relative Zytotoxizität unterteilt nach klonalen Komplexen. Gemessen wurde die relative LDH-Freisetzung der HaCaT Zellkulturen nach Inkubation mit den Übernachtkulturüberständen der Stämme der jeweiligen klonalen Komplexe mittels CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay mit drei biologischen Wiederholungen pro Stamm mit jeweils drei technischen Replikaten. In der Scatter Dot Plot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der relativen Zytotoxizitätswerte der gesamten Isolatgruppe.

Tabelle 11: Übersicht über die signifikanten Unterschiede im Zytotoxizitätsverhalten verschiedener CCs nach Analyse der Daten per Kruskal-Wallis-Test mit nachfolgendem Dunn's Post-hoc-Test

Zytotoxizitäts-stärkerer CC	Zytotoxizitäts-schwächerer CC	Signifikanzniveau	
CC121	CC5	*	$p \leq 0,05$
	CC15	*	$p \leq 0,05$
	CC30	*	$p \leq 0,05$
CC152	CC5	**	$p \leq 0,01$
	CC15	**	$p \leq 0,01$
	CC30	**	$p \leq 0,01$

Der Vergleich mittels Kruskal-Wallis-Test mit nachfolgendem Dunn's Post-hoc-Test zeigte, dass die klonalen Komplexe CC121 und CC152 gegenüber CC5, CC15 und CC30 signifikant höhere relative Zytotoxizitätswerte aufwiesen. In Bezug auf CC152 zeigt sich gegenüber CC5, CC15 und CC30 ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,01$.

4.1.2 Zytotoxizität von CC5-Isolaten

Die Isolate des CC5 zeigten ein heterogenes Verteilungsmuster in Bezug auf ihre Zytotoxizitätswerte. Insbesondere die Isolate IT-N095, FR-O017 und HS-O033 wiesen im Vergleich zu den übrigen Stämmen dieses CCs hohe Werte auf. Die Stämme MM-N056 und HS-N040 hingegen zeigten eine niedrige relative Zytotoxizität. Generell lagen die Werte dieses klonalen Komplexes im Mittelfeld der analysierten Isolate. Die im Vorfeld der Untersuchung mittels DNA-Microarray erhobenen molekulargenetischen Daten zeigten, dass lediglich eines der untersuchten Isolate, MM-O024, die Gene *lukF-PV* und *lukS-PV* aufweist. Auch die für TSST-1 kodierende Genregion *tst* ließ sich nur bei einem Isolat, HS-N040, nachweisen. Die Hämolysegene *hla* und *hly* hingegen fanden sich bei allen Vertretern des CC5.

Im Mann-Whitney-U-Test zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zytotoxizitätswerte nasaler bzw. klinischer Isolate ($p=0,24$; Mann-Whitney-U-Test). So ließen sich für die aus Nasenabstrichen gesunder Träger gewonnenen Stämme durchschnittliche relative Zytotoxizitätswerte von $36 \pm 16\%$ ermitteln, für klinische Isolate lagen diese bei $48 \pm 14\%$.

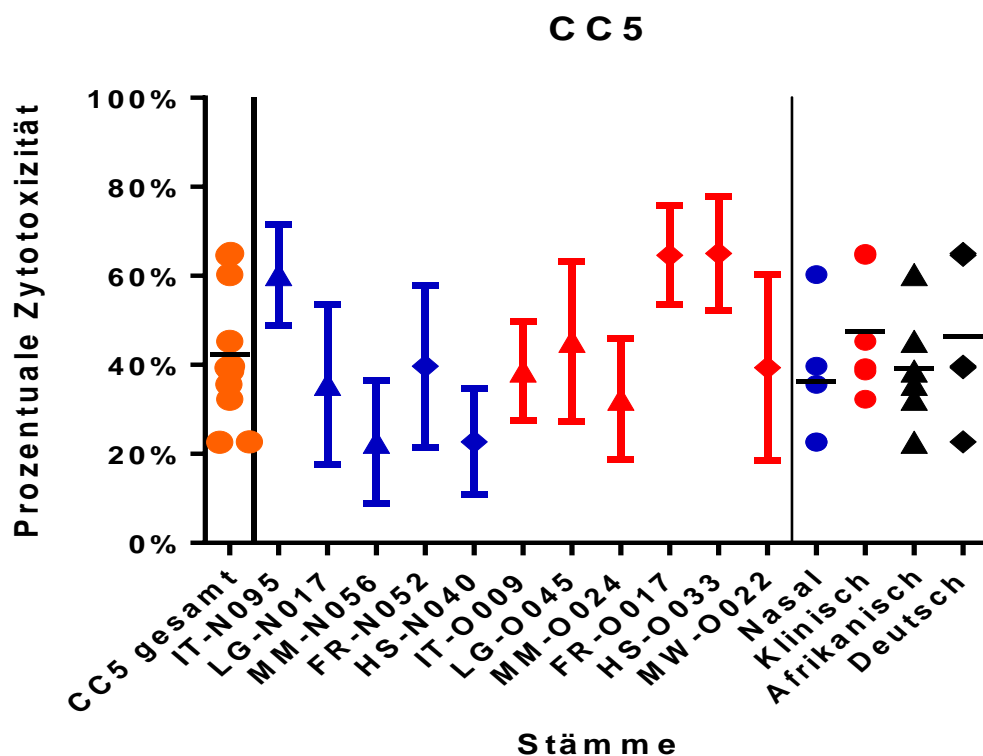


Abbildung 2: Relative Zytotoxizität der Kulturüberstände der Stämme des klonalen Komplexes 5. Gemessen wurde die relative LDH-Freisetzung der HaCaT Zellkulturen nach Inkubation mit den Übernachtkulturüberständen der Stämme mittels CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay mit drei biologischen Wiederholungen pro Stamm mit jeweils drei technischen Replikaten. In der Scattered- bzw. Aligned Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Zytotoxizitätswerte der gesamten Isolatgruppe. Die Messwerte der einzelnen Isolate werden in der "One sign per row"-Darstellung dargestellt. Dabei gibt das Symbol den Mittelwert, der Strich die einfache Standardabweichung nach oben bzw. unten an. Blaue Symbole stellen nasale, rote Symbole klinische Isolate dar. Dreiecksförmige Symbole charakterisieren afrikanische, rautenförmige Symbole hingegen deutsche Isolate.

In der folgenden Abbildung finden sich die Zytotoxizitätswerte der Isolate des CC5 aufgegliedert nach dem Vorhandensein der Gene *lukF-PV*, *h1b* und *tst-1* eines Isolates im Microarray-Verfahren. Da sich bei den Isolaten des CC5 eine zahlenmäßig ungleiche Verteilung dieser Gene in gen-positive bzw. -negative Isolate zeigt, ist eine statistische Auswertung mit der Fragestellung nach Unterschieden im Zytotoxizitätsverhalten Gen-positiver bzw. -negativer Isolate nicht möglich. Gleichzeitig wird die Frage nach dem Einfluss dieser Gene bei CC5 für weiterführende Untersuchungen eine Frage von Interesse sein.

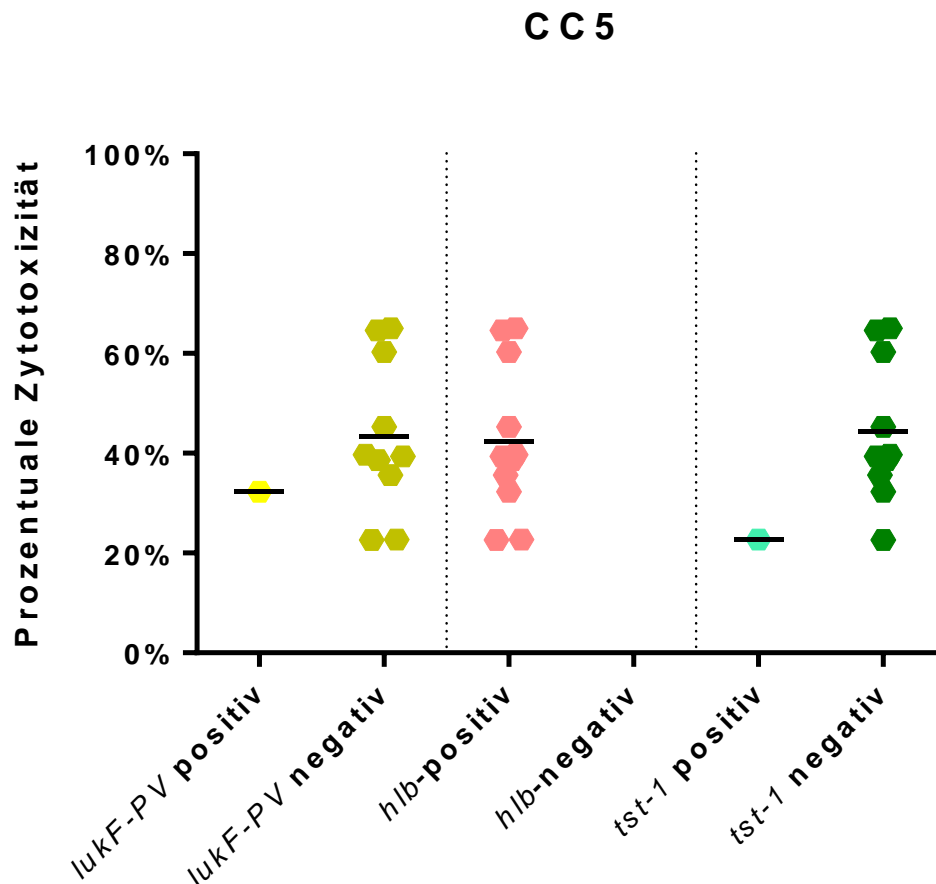


Abbildung 3: Relative Zytotoxizität der Kulturüberstände der Stämme des klonalen Komplexes 5 unterteilt nach Isolaten, bei denen das in der Legende aufgeführte Gen im DNA-Microarray nachgewiesen wurde bzw. fehlte. Gemessen wurde die relative LDH-Freisetzung der Stämme mittels CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay mit drei biologischen Wiederholungen pro Stamm mit jeweils drei technischen Wiederholungen. In der Scattered Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Zytotoxizitätswerte der gesamten Isolatgruppe. Gelbe, rote und dunkelgrüne Symbole repräsentieren das Vorhandensein eines Gens (*lukF-PV*, *hlb*, *tst-1*); goldene, pinke und hellgrüne dagegen deren Fehlen.

4.1.3 Zytotoxizität von CC8-Isolaten

Die vor allem in Westeuropa weit verbreiteten Isolate des Typs CC8 wiesen nach den Isolaten der CC121 und CC152 das im Durchschnitt dritthöchste Zytotoxizitätspotential auf. Besonders hohe LDH Werte ließen sich insbesondere bei den Isolaten LG-O017 ($84 \pm 14\%$) und MM-O021 ($85 \pm 12\%$) beobachten (vgl. Abb. 3). Die Isolate IT-N054 und MW-N026 wiesen dagegen im Mittel mit $53 \pm 14\%$ bzw. $57 \pm 13\%$ niedrigere Zytotoxizitätswerte auf. Bei der Betrachtung der genetischen Repertoires der CC8 Isolate fiel auf, dass das stark zytotoxische Isolat LG-O017 den einzigen Vertreter dieses klonalen Komplexes darstellt, der PVL-kodierende Gene aufweist. Gleichzeitig besitzt ausschließlich der schwach zytotoxische

Stamm MW-N026 keine intakte *hly*-Genregion. Der *hly*-Genlocus ist bei allen Isolaten des CC8 nachweisbar. Das für TSST-1 kodierende Gen *tst* dagegen ist bei keinem der Isolate des CC8 nachzuweisen.

Innerhalb dieses klonalen Komplexes zeichnete sich eine Tendenz zu höherer Zytotoxizität der klinischen Isolate ab ($p=0,0519$, Mann-Whitney-U-Test). Durchschnittlich setzten die Überstände dieser Isolate $78 \pm 8\%$ der LDH Mengen frei, die nach Zugabe der Lysisreagenz beobachtet wurde, während die Überstände der nasalen Stämme hingegen ca. $63 \pm 10\%$ der LDH-Mengen im Vergleich zur Positivkontrolle freisetzen.

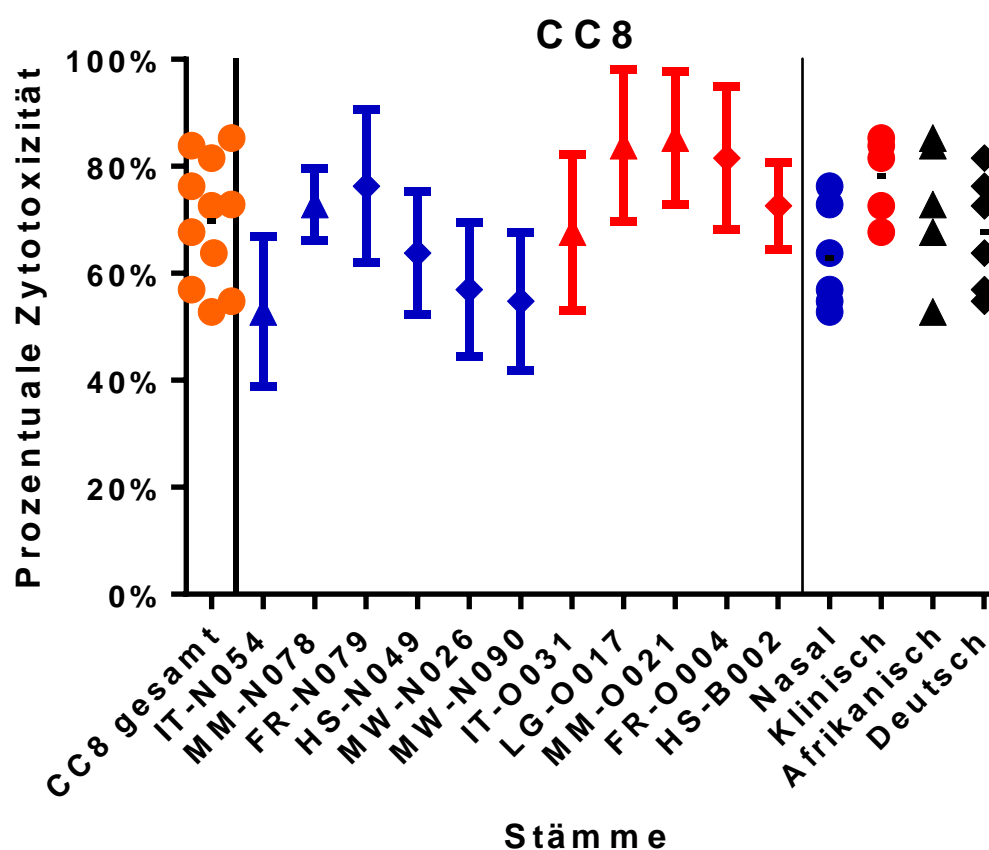


Abbildung 4: Relative Zytotoxizität der Kulturüberstände der Stämme des klonalen Komplexes 8. Gemessen wurde die relative LDH-Freisetzung der HaCaT Zellkulturen nach Inkubation mit den Übernachtkulturüberständen der Stämme mittels CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay mit drei biologischen Wiederholungen pro Stamm mit jeweils drei technischen Replikaten. In der Scattered- bzw. Aligned Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Zytotoxizitätswerte der gesamten Isolatgruppe. Die Messwerte der einzelnen Isolate werden in der "One sign per row"-Darstellung dargestellt. Dabei gibt das Symbol den Mittelwert, der Strich die einfache Standardabweichung nach oben bzw. unten an. Blaue Symbole stellen nasale, rote Symbole klinische Isolate dar. Dreiecksförmige Symbole charakterisieren afrikanische, rautenförmige Symbole hingegen deutsche Isolate.

Ein statistischer Vergleich der Zytotoxizitätswerte nasaler und klinischer Isolate, um den Einfluss zytotoxizitätsvermittelnder Gene auf diesen Parameter zu beurteilen, ist auch bei CC8 aufgrund der Homogenität der Genausstattung der CC8-Isolate nicht möglich. Zwar weist das *lukF-PV* positive LG-O017 mit $84 \pm 14\%$ eine für CC8 überdurchschnittliche Zytotoxizität auf. Ob dies auf dem Einfluss dieses Gens beruht, lässt sich jedoch statistisch nicht belegen.

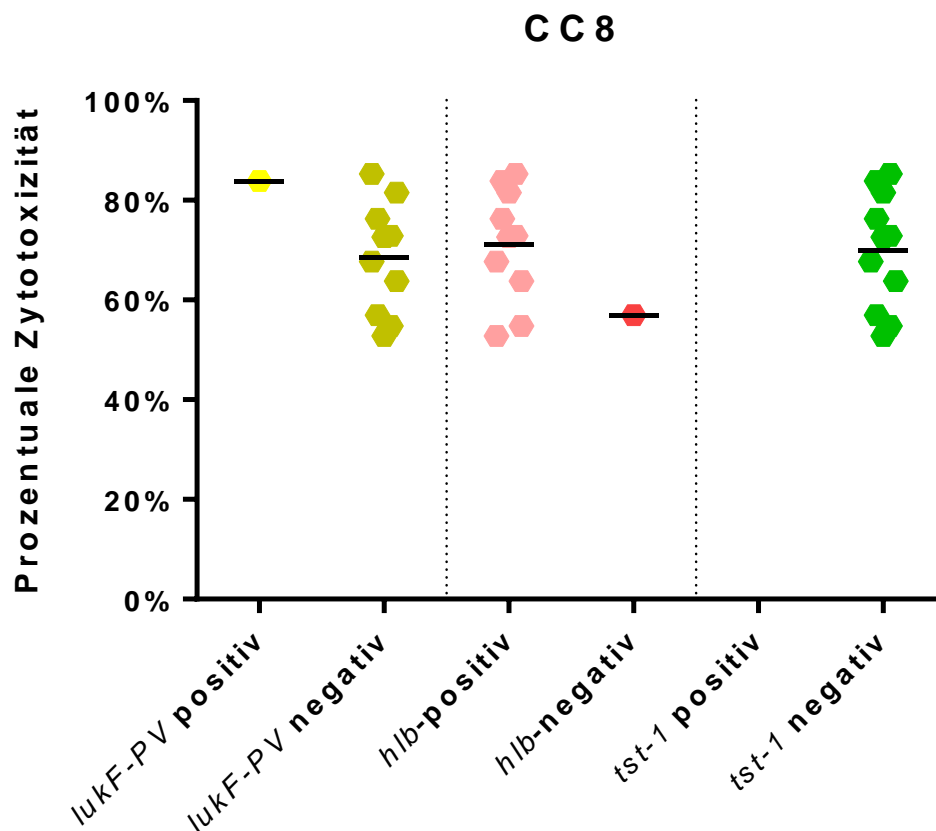


Abbildung 5: Relative Zytotoxizität der Kulturüberstände der Stämme des klonalen Komplexes 8 unterteilt nach Isolaten, bei denen das in der Legende aufgeführte Gen im DNA-Microarray nachgewiesen wurde bzw. fehlte. Gemessen wurde die relative LDH-Freisetzung der Stämme mittels CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay mit drei biologischen Wiederholungen pro Stamm mit jeweils drei technischen Wiederholungen. In der Scattered Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Zytotoxizitätswerte der gesamten Isolatgruppe. Gelbe, rote und dunkelgrüne Symbole repräsentieren das Vorhandensein eines Gens (*lukF-PV*, *hlb*, *tst-1*); goldene, pinke und hellgrüne dagegen deren Fehlen.

4.1.4 Zytotoxizität von CC15-Isolaten

Insgesamt lagen die relativen Zytotoxizitätswerte dieses klonalen Komplexes mit durchschnittlich $45 \pm 10\%$ im unteren Mittelfeld der untersuchten CCs. Die relativen Zytotoxizitätswerte der Stämme aus nasalen Proben bzw. Wundabstrichen und Blutstromisolaten unterschieden sich auch bei diesem CC nicht signifikant ($p=0,667$). Die Isolate klinischen Ursprungs zeigten mit durchschnittlich $46 \pm 12\%$ relativer LDH Freisetzung eine ähnliche relative Zytotoxizitäts-Rate wie die Stämme nasalen Ursprungs mit $44 \pm 8\%$.

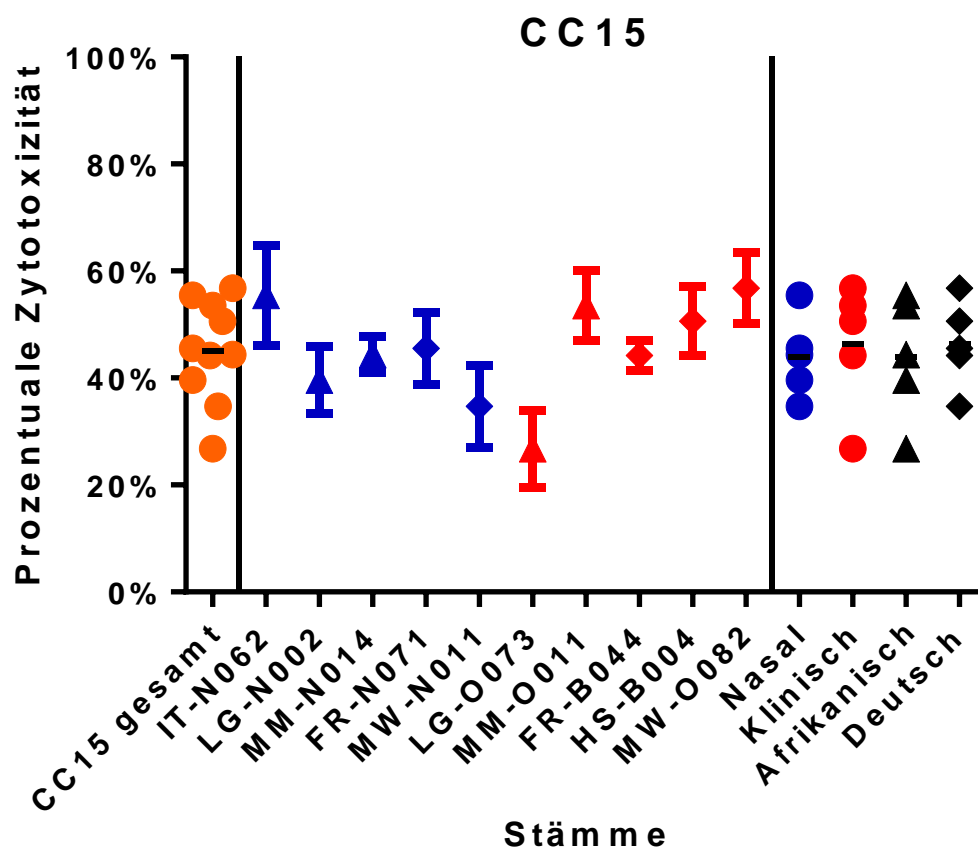


Abbildung 6: Relative Zytotoxizität der Kulturüberstände der Stämme des klonalen Komplexes 15. Gemessen wurde die relative LDH-Freisetzung der HaCaT Zellkulturen nach Inkubation mit den Übernachtkulturüberständen der Stämme mittels CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay mit drei biologischen Wiederholungen pro Stamm mit jeweils drei technischen Replikaten. In der Scattered- bzw. Aligned Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Zytotoxizitätswerte der gesamten Isolatgruppe. Die Messwerte der einzelnen Isolate werden in der "One sign per row"-Darstellung dargestellt. Dabei gibt das Symbol den Mittelwert, der Strich die einfache Standardabweichung nach oben bzw. unten an. Blaue Symbole stellen nasale, rote Symbole klinische Isolate dar. Dreiecksförmige Symbole charakterisieren afrikanische, rautenförmige Symbole hingegen deutsche Isolate.

Genotypisch zeigte sich erneut eine stark homogene Ausstattung der getesteten CC15-Isolaten mit zytotoxizitätsvermittelnden Genen. Das einzige *hIb*-positive Isolat stellt MW-N011 dar. Die Zytotoxizitätswerte dieses Isolates heben sich jedoch nicht von denen der anderen CC15-Isolate ab.

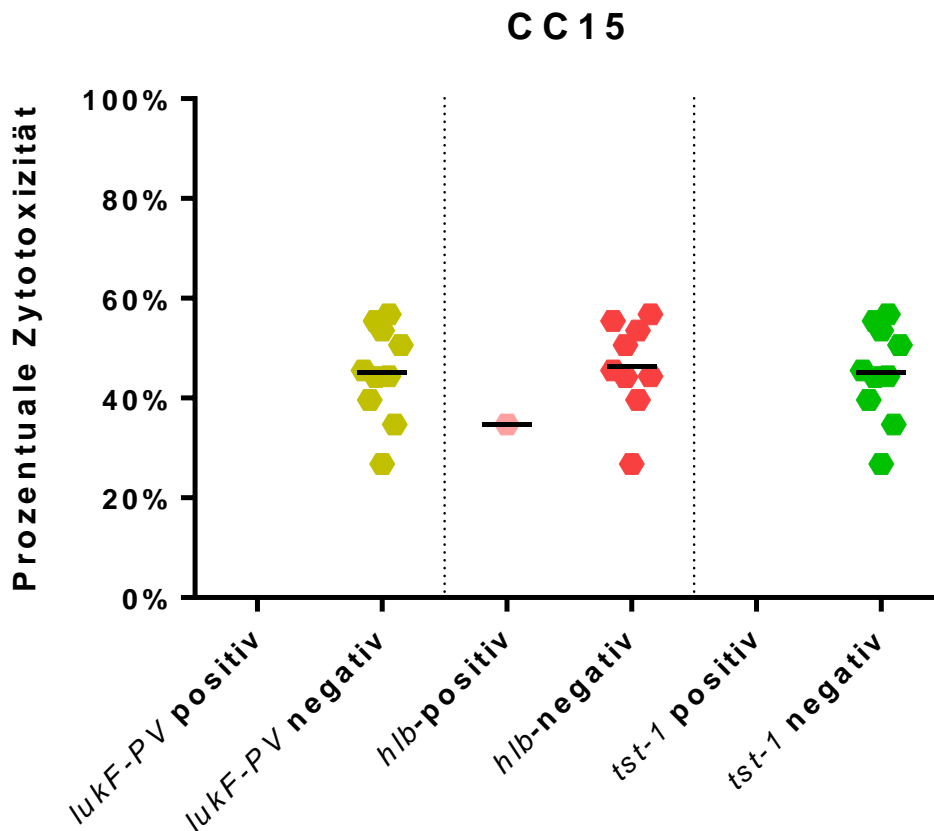


Abbildung 7: Relative Zytotoxizität der Kulturüberstände der Stämme des klonalen Komplexes 15 unterteilt nach Isolaten, bei denen das in der Legende aufgeführte Gen im DNA-Microarray nachgewiesen wurde bzw. fehlte. Gemessen wurde die relative LDH-Freisetzung der Stämme mittels CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay mit drei biologischen Wiederholungen pro Stamm mit jeweils drei technischen Wiederholungen. In der Scattered Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Zytotoxizitätswerte der gesamten Isolatgruppe. Gelbe, rote und dunkelgrüne Symbole repräsentieren das Vorhandensein eines Gens (*lukF-PV*, *hIb*, *tst-1*); goldene, pinke und hellgrüne dagegen deren Fehlen.

4.1.5 Zytotoxizität von CC30-Isolaten

CC30 stellt den klonalen Komplex mit der weitaus größten Heterogenität in Hinblick auf das zytotoxische Potential der Kulturüberstände dar. Auf der einen Seite waren hier Isolate wie IT-N012 ($85 \pm 5\%$) mit hohem bzw. IT-O056 ($65 \pm 7\%$) und LG-O030 ($65 \pm 9\%$) mit mittlerem zytotoxischen Potential vertreten. Auf der anderen Seite zeigten die Isolate FR-

N095 ($5 \pm 4\%$), HS-N001 ($3 \pm 1\%$) und HS-O046 ($2 \pm 2\%$) nur ein marginales Potential, HaCaTs zu lysieren (vgl. Abb. 8). In der Gesamtschau stellten sich die Werte dieses klonalen Komplexes als die niedrigsten der Untersuchung dar (vgl. Abb. 8). Gleichzeitig wird eine Beurteilung dieser Daten durch die großen Unterschiede der Zytotoxizitätswerte innerhalb dieser Gruppe deutlich erschwert. Die relative LDH-Freisetzung lag bei den Wundabstrich-Isolaten mit $38 \pm 32\%$ auf vergleichbarem Niveau wie die Werte der nasalen Abstriche mit $30 \pm 38\%$.

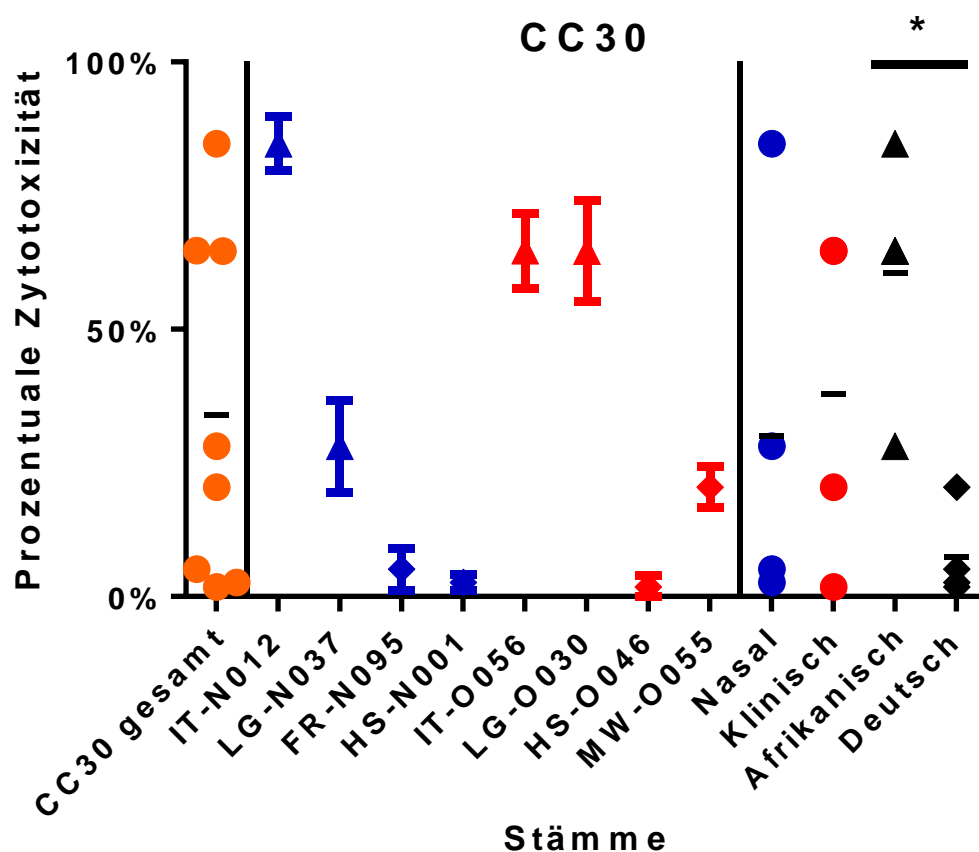


Abbildung 8: Relative Zytotoxizität der Kulturüberstände der Stämme des klonalen Komplexes 30. Gemessen wurde die relative LDH-Freisetzung der HaCaT Zellkulturen nach Inkubation mit den Übernachtkulturüberständen der Stämme mittels CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay mit drei biologischen Wiederholungen pro Stamm mit jeweils drei technischen Replikaten. In der Scattered- bzw. Aligned Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Zytotoxizitätswerte der gesamten Isolatgruppe. Die Messwerte der einzelnen Isolate werden in der "One sign per row"-Darstellung dargestellt. Dabei gibt das Symbol den Mittelwert, der Strich die einfache Standardabweichung nach oben bzw. unten an. Blaue Symbole stellen nasale, rote Symbole klinische Isolate dar. Dreiecksförmige Symbole charakterisieren afrikanische, rautenförmige Symbole hingegen deutsche Isolate.

Neben den phänotypischen Daten weisen auch die genotypischen Untersuchungen auf eine große Heterogenität innerhalb dieses klonalen Komplexes hin. So ließen sich bei den vier Isolaten IT-N012, IT-O056, LG-N037 und LG-O030, welche zugleich die stärkste zytotoxische Wirkung *in vitro* zeigten, die PVL-kodierenden Gene *lukF-PV* sowie *lukS-PV* nachweisen. Die anderen Isolate des CC30 wiesen diese Gene nicht auf. HS-O046 stellt das einzige *hly*-negative Isolat dieses klonalen Komplexes dar.

In der Literatur wurde bereits eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein PVL-kodierender Gene und hohen zytotoxischen Potentialen bei diversen *S. aureus*-Isolaten beschrieben (Ballhausen, 2016). Bei CC30 zeigten sich bei den *lukF-PV* positiven Isolaten signifikant höhere Zytotoxizitätswerte ($p=0,029$, Mann-Whitney-U-Test) als bei den *lukF-PV* negativen Vertretern desselben CCs (vgl. Abbildung 9).

In der Literatur wird ein Zytotoxizitäts-verstärkender Effekt ebenfalls von *tst-1*, einem Gen welches für das Toxische Schocksyndrom-Toxin 1 kodiert, beschrieben (Zarai Koosha, 2016). Im Gegensatz hierzu wiesen in unserer Untersuchung die *tst-1* positiven Vertreter des CC30 eine signifikant niedrigere Zytotoxizität auf als die *tst-1* negativen Isolate ($p=0,0151$; T-Test).

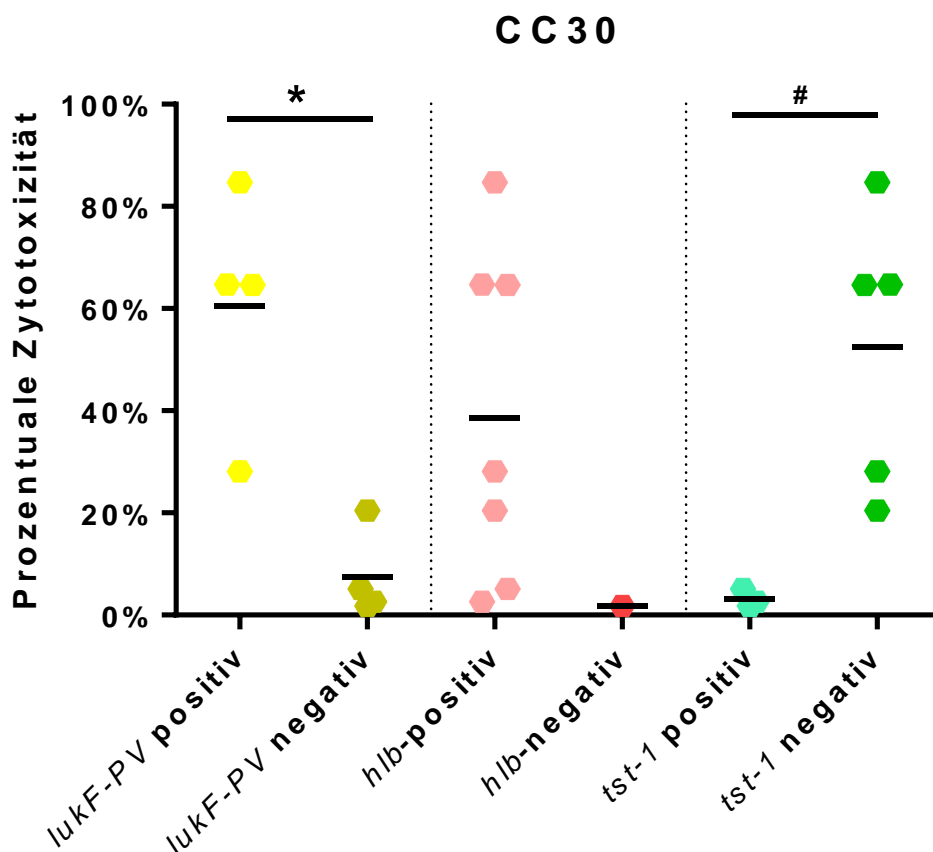


Abbildung 9: Relative Zytotoxizität der Kulturüberstände der Stämme des klonalen Komplexes 30 unterteilt nach Isolaten, bei denen das in der Legende aufgeführte Gen im DNA-Microarray nachgewiesen wurde bzw. fehlte. Gemessen wurde die relative LDH-Freisetzung der Stämme mittels CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay mit drei biologischen Wiederholungen pro Stamm mit jeweils drei technischen Wiederholungen. In der Scattered Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Zytotoxizitätswerte der gesamten Isolatgruppe. *, $p \leq 0,05$ (Mann-Whitney-U-Test). # $p \leq 0,05$ (T-Test). Gelbe, rote und dunkelgrüne Symbole repräsentieren das Vorhandensein eines Gens (*lukF-PV*, *hlb*, *tst-1*); goldene, pinke und hellgrüne dagegen deren Fehlen.

4.1.6 Zytotoxizität von CC45-Isolaten

CC45 teilt neben einer engen phylogenetischen Verwandtschaft auch die große Heterogenität der Zytotoxizitätswerte in dieser Untersuchung mit CC30. Neben Stämmen wie MM-N001, MW-N100 oder auch MW-O049, die durch ihre hohen relativen Zytotoxizitätswerte auffielen, lagen andere Isolate wie MM-O069 oder LG-N018 bezüglich ihres zytotoxischen Potentials im hinteren Drittel. Im Gesamtdurchschnitt lagen die relativen Zytotoxizitäts-Werte des CC45 mit $48 \pm 19\%$ jedoch über denen des CC30.

Wie bereits bei den vorhergehend beschriebenen klonalen Komplexen, so lässt sich auch für CC45 kein Unterschied in der Zytotoxizität zwischen nasalen und klinischen Isolaten beobachten. Letztere Isolate wiesen Durchschnittswerte von $57 \pm 38\%$ relativer Zytotoxizität auf, wohingegen die Isolate aus Nasenabstrichen $63 \pm 24\%$ der LDH-Freisetzung der Positivkontrolle zeigten ($p > 0,999$, T-Test). Die Isolatgruppe klinischer Herkunft bestand hier jedoch aus nur drei Isolaten.

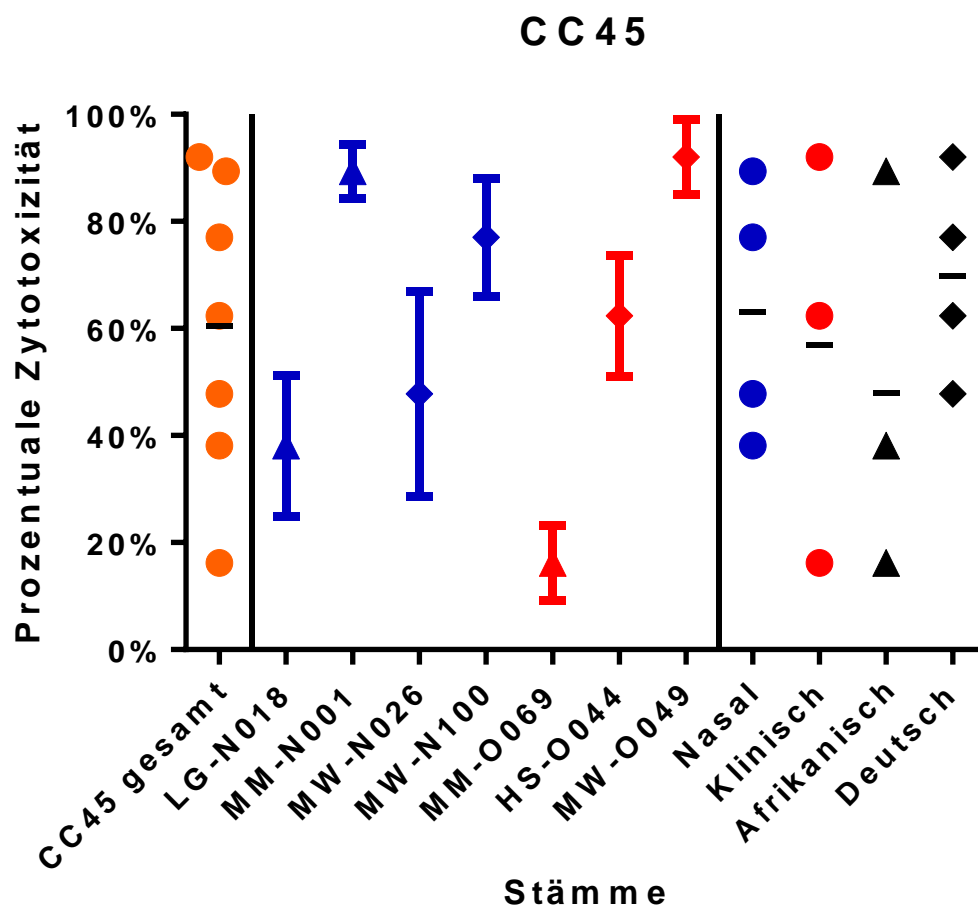


Abbildung 10: Relative Zytotoxizität der Kulturüberstände der Stämme des klonalen Komplexes 45. Gemessen wurde die relative LDH-Freisetzung der HaCaT Zellkulturen nach Inkubation mit den Übernachtkulturüberständen der Stämme mittels CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay mit drei biologischen Wiederholungen pro Stamm mit jeweils drei technischen Replikaten. In der Scattered- bzw. Aligned Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Zytotoxizitätswerte der gesamten Isolatgruppe. Die Messwerte der einzelnen Isolate werden in der "One sign per row"-Darstellung dargestellt. Dabei gibt das Symbol den Mittelwert, der Strich die einfache Standardabweichung nach oben bzw. unten an. Blaue Symbole stellen nasale, rote Symbole klinische Isolate dar. Dreiecksförmige Symbole charakterisieren afrikanische, rautenförmige Symbole hingegen deutsche Isolate.

Betrachtet man die genotypischen Daten dieses klonalen Komplexes, so zeigt sich, dass keines der Isolate PVL-kodierende Gene besitzt. Die Isolate MM-N001, MW-N100 und MW-O049 weisen das Gen *tst-1* auf. Gleichzeitig waren diese Isolate in der phänotypischen Analyse die am stärksten zytotoxischen Vertreter des CC45. MW-N100 stellt zugleich das einzige *hly*-positive Isolat dieses klonalen Komplexes dar.

In diesem CC zeigten die *tst-1* positiven Isolate eine signifikant höhere relative Zytotoxizität als die *tst-1* negativen Isolate ($p=0,0127$; T-Test). Aufgrund des geringen n war eine statistische Auswertung der Zytotoxizitätswerte in Bezug auf den Einfluss von *hly* nicht möglich.

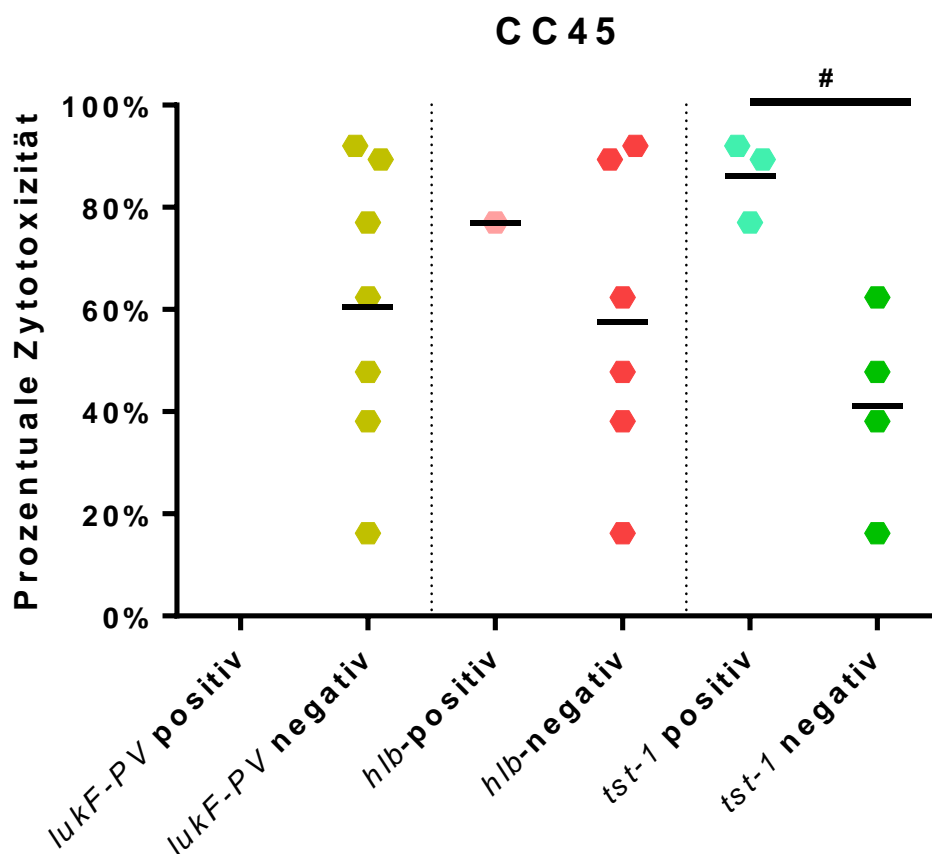


Abbildung 11: Relative Zytotoxizität der Kulturüberstände der Stämme des klonalen Komplexes 45 unterteilt nach Isolat, bei denen das in der Legende aufgeführte Gen im DNA-Microarray nachgewiesen wurde bzw. fehlte. Gemessen wurde die relative LDH-Freisetzung der Stämme mittels CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay mit drei biologischen Wiederholungen pro Stamm mit jeweils drei technischen Wiederholungen. In der Scattered Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Zytotoxizitätswerte der gesamten Isolatgruppe. Gelbe, rote und dunkelgrüne Symbole repräsentieren das Vorhandensein eines Gens (*lukF-PV*, *hly*, *tst-1*); goldene, pinke und hellgrüne dagegen deren Fehlen. # $p \leq 0,05$ (T-Test).

4.1.7 Zytotoxizität von CC121-Isolaten

CC121 stellt in dieser Erhebung den klonalen Komplex mit der zweithöchsten Durchschnittszytotoxizität dar, zeichnet sich aber auch durch eine hohe Heterogenität aus (siehe Abb. 1). So fiel das zytotoxische Potential der Isolate FR-O057 und MW-O075 mit $45 \pm 11\%$ bzw. $25 \pm 4\%$ relativer LDH-Freisetzung eher gering aus. Auf der anderen Seite induzierten die Überstände der Stämme MM-N067, IT-O038 oder auch LG-O048 eine relative LDH-Freisetzung zwischen 88 und 100% im Vergleich zur Positivkontrolle.

Wie bereits bei den vorhergehend beschriebenen klonalen Komplexen, so zeigte sich auch bei CC121 kein Unterschied in der Zytotoxizität der klinischen Isolate aus Wundabstrichen oder Blutstromproben (mit Durchschnittswerten von $75 \pm 32\%$) und den aus Nasenabstrichen gewonnenen Stämmen ($85 \pm 13\%$). Der Mann-Whitney-U-Test zeigt für die relativen Zytotoxizitätswerte der beiden Isolatgruppen erwartungsgemäß keinen statistischen Unterschied an ($p=0,829$).

Zwei der drei Isolate des CC121 ohne PVL-kodierende Gene stammen aus Nasenabstrichen gesunder Träger. Sonstige genotypische Unterschiede in Bezug auf Zytotoxizitäts vermittelnde Genloci waren zwischen nasalen und klinischen Isolaten nicht feststellbar.

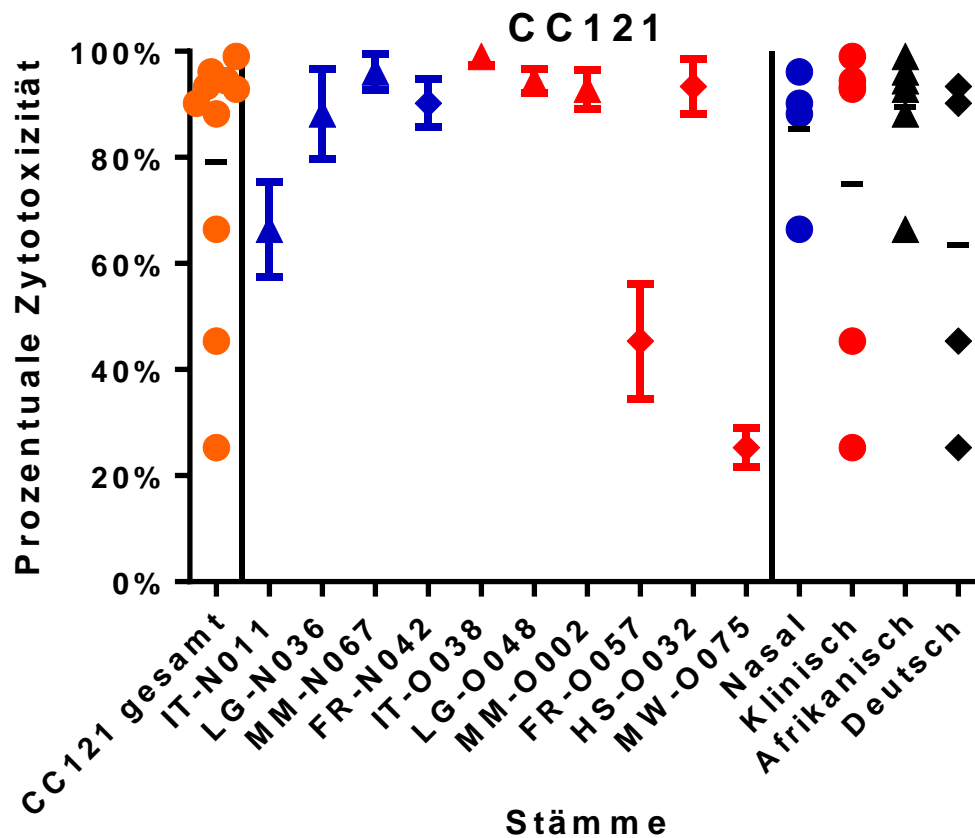


Abbildung 12: Relative Zytotoxizität der Kulturüberstände der Stämme des klonalen Komplexes 121. Gemessen wurde die relative LDH-Freisetzung der HaCaT Zellkulturen nach Inkubation mit den Übernachtkulturüberständen der Stämme mittels CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay mit drei biologischen Wiederholungen pro Stamm mit jeweils drei technischen Replikaten. In der Scattered- bzw. Aligned Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Zytotoxizitätswerte der gesamten Isolatgruppe. Die Messwerte der einzelnen Isolate werden in der "One sign per row"-Darstellung dargestellt. Dabei gibt das Symbol den Mittelwert, der Strich die einfache Standardabweichung nach oben bzw. unten an. Blaue Symbole stellen nasale, rote Symbole klinische Isolate dar. Dreiecksförmige Symbole charakterisieren afrikanische, rautenförmige Symbole hingegen deutsche Isolate.

Die im Vorfeld erhobenen DNA-Microarray-Daten zeigten hier, dass die Isolate FR-N042, FR-O057 und IT-N011 im Gegensatz zu den restlichen *S. aureus*-Isolaten des CC121 die PVL-kodierenden Gene *lukF-PV* und *lukS-PV* nicht aufweisen. Gleichzeitig zeigt sich im T-Test keine signifikante Korrelation zwischen dem Vorkommen von *lukFS-PV* und der Höhe der Zytotoxizität ($p=0,360$).

Eine mögliche genotypische Ursache für das schwach ausgeprägte zytotoxische Verhalten des Isolates MW-O075 ist aus den Microarray-Daten nicht ersichtlich.

(durchschnittlich $93,0 \pm 1\%$). Damit ist CC152 bzgl. der Zytotoxizität der klonale Komplex mit den höchsten Durchschnittswerten. Gleichzeitig stellt dieser klonale Komplex in Bezug auf das zytotoxische Potential die mit Abstand homogenste Gruppe dieser Untersuchung dar (siehe Abb. 1). Wie schon bei den anderen CCs beobachtet, wiesen die nasalen Isolate mit Durchschnittswerten von $94 \pm 0,3\%$ sehr ähnliche Werte auf wie die klinischen Isolate mit durchschnittlich $92 \pm 1\%$ relativer Zytotoxizität. Limitierend ist jedoch die geringe Anzahl an untersuchten Stämmen ($n=5$).

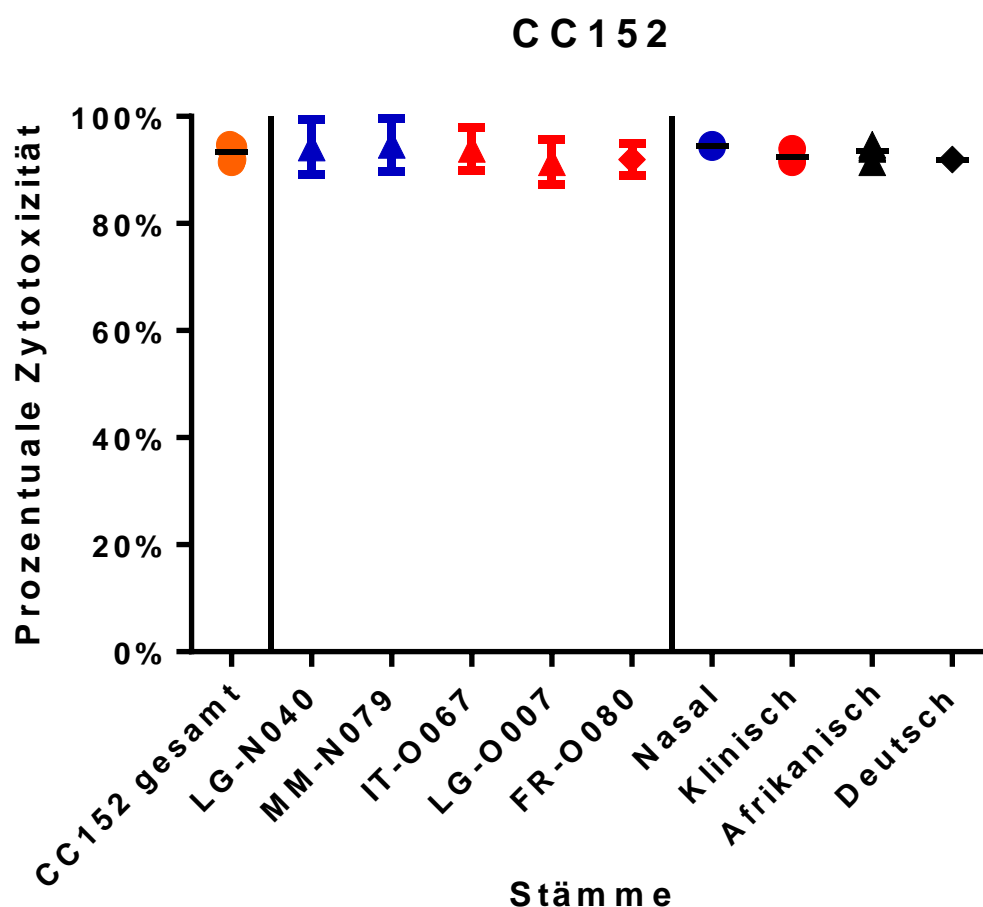


Abbildung 14: Relative Zytotoxizität der Kulturüberstände der Stämme des klonalen Komplexes 152. Gemessen wurde die relative LDH-Freisetzung der HaCaT Zellkulturen nach Inkubation mit den Übernachtkulturüberständen der Stämme mittels CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay mit drei biologischen Wiederholungen pro Stamm mit jeweils drei technischen Replikaten. In der Scattered- bzw. Aligned Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Zytotoxizitätswerte der gesamten Isolatgruppe. Die Messwerte der einzelnen Isolate werden in der "One sign per row"-Darstellung dargestellt. Dabei gibt das Symbol den Mittelwert, der Strich die einfache Standardabweichung nach oben bzw. unten an. Blaue Symbole stellen nasale, rote Symbole klinische Isolate dar. Dreiecksförmige Symbole charakterisieren afrikanische, rautenförmige Symbole hingegen deutsche Isolate.

In den DNA-Microarrays ist CC152 der klonale Komplex mit dem häufigsten Auftreten von *lukF*-PV (80%). Lediglich das in Freiburg gesammelte Isolat FR-O080 weist die Genloci *lukF*-PV und *lukS*-PV nicht auf. Gleichzeitig besitzt FR-O080 als einziges Isolat des CC152 eine intakte *hly*-Genregion. Ungeachtet dessen weist FR-O080 mit einer relativen Zytotoxizitätsrate von $92 \pm 3\%$ eine hohe Zytotoxizität auf.

Eine statistische Auswertung der Zytotoxizitätswerte des CC152 in Bezug auf *lukF*-PV ist aufgrund der geringen Gruppengrößen ($n=1$ bzw. 4) jedoch nicht möglich.

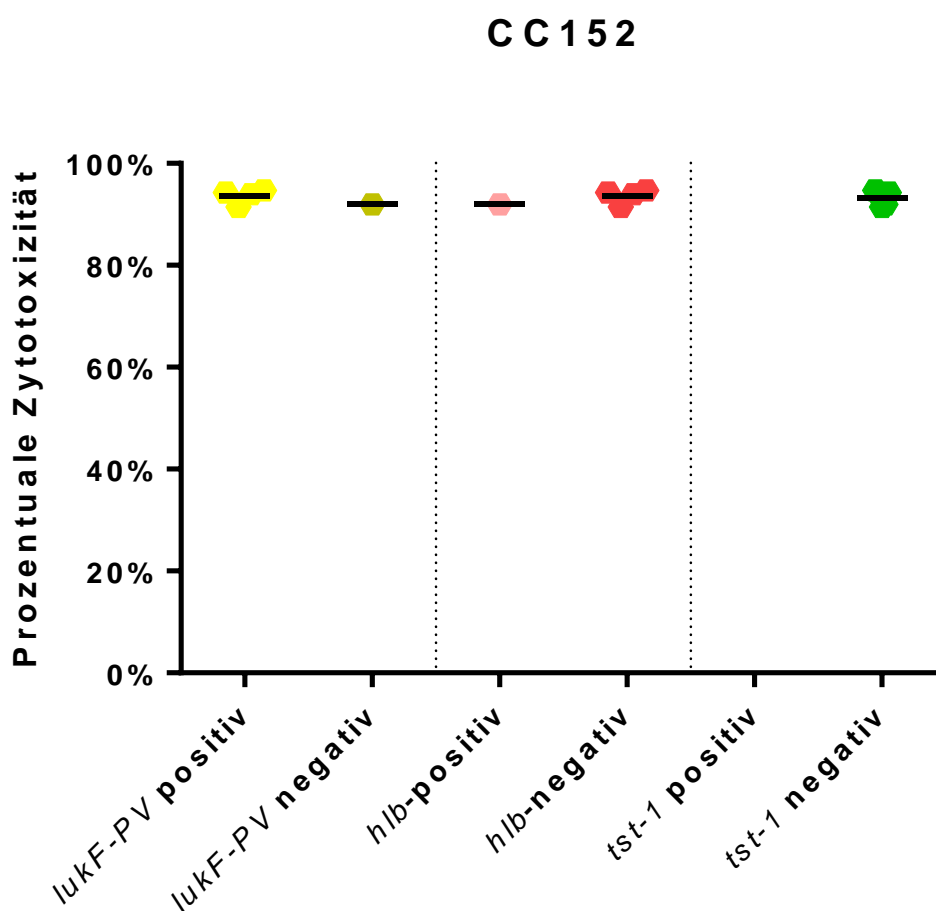


Abbildung 15: Relative Zytotoxizität der Kulturüberstände der Stämme des klonalen Komplexes 152 unterteilt nach Isolaten, bei denen das in der Legende aufgeführte Gen im DNA-Microarray nachgewiesen wurde bzw. fehlte. Gemessen wurde die relative LDH-Freisetzung der Stämme mittels CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay mit drei biologischen Wiederholungen pro Stamm mit jeweils drei technischen Wiederholungen. In der Scattered Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Zytotoxizitätswerte der gesamten Isolatgruppe. Gelbe, rote und dunkelgrüne Symbole repräsentieren das Vorhandensein eines Gens (*lukF*-PV, *hly*, *tst-1*); goldene, pinke und hellgrüne dagegen deren Fehlen.

4.2 Adhäsion

4.2.1 Etablierung der Versuchsreihe

Zur Etablierung der Adhäsions-Versuchsreihe wurden mehrere Vorversuche mit unterschiedlichen Versuchsanordnungen durchgeführt. Die Grundkonstellation der Versuchsanordnung blieb dabei, wie in Material und Methoden beschrieben, unverändert. Zum einen wurde mit nativen oder mit durch Formaldehyd fixierten HaCaT-Keratinocyten (Boukamp, 1988) gearbeitet, um einen Effekt der chemischen Fixierung auf die Messergebnisse zu untersuchen. Zum anderen wurde untersucht, ob eine fünfminütige Zentrifugation der Keratinocyten bei $450 \times g$ nach Zugabe der angefärbten Bakterien eine Auswirkung auf die Resultate hat.

4.2.1.1 Assaytyp I

Zunächst wurde der Versuch mit nativen Zellen und ohne Zentrifugation der HaCaTs durchgeführt (Assaytyp I). Das als Positivkontrolle mitgeführte hochadhäsive *S. aureus* Isolat Cowan-1 (Cowan, 1954) zeigte im Test mit $28 \pm 8\%$ adhärenen Bakterien erwartungsgemäß die höchsten Durchschnittswerte. Der als eine Art Negativkontrolle verwendete nur schwach adhäsive *S. aureus* Stamm 1711 zeigte ebenso erwartungsgemäß mit lediglich $4 \pm 1\%$ relativer Adhäsion die niedrigsten Werte. Der dem zu untersuchenden Isolate-Pool entstammende *S. aureus* Stamm FR-N052 lag mit $9 \pm 3\%$ Durchschnittsadhäsion zwischen diesen beiden Kontrollstämmen (vgl. Abb. 16).

Überraschend hohe Adhäsionsraten wurden in diesem Assaytyp mit dem *S. carnosus* Isolat TM-300 beobachtet, das in vielen Staphylokokken-Adhäsionsassays als Kontrollisolat mit niedriger Adhäsionsfähigkeit mitgeführt wurde (Schleifer, 1982; Heilmann, 2004; Rosenstein, 2009). Mit einer durchschnittlichen Adhäsion von $20 \pm 14\%$ lag der Stamm nur knapp hinter den Werten der Positivkontrolle, Cowan-1. Im Vergleich zu 1711, der ebenfalls als *S. aureus* Kontrollstamm mit einem niedrigen Adhäsionspotential fungierte (Ballhausen, 2014), zeigte TM-300 deutlich höhere Adhäsionsraten. Gleichzeitig fiel bei TM-300 eine hohe Standardabweichung von über 14% ins Auge, welche bei Stamm 1711 lediglich bei 1% lag.

4.2.1.2 Assaytyp II

Anschließend wurde der Versuch mit ebenfalls nativen HaCaTs wiederholt, die 96-Well Platte jedoch nach Zugabe der Bakterien zentrifugiert (Assaytyp II). Hier zeigten sich für Cowan-1 mit durchschnittlich $29 \pm 15\%$ adhärenen Bakterien vergleichbare Werte zu der Versuchsanordnung ohne Zentrifugation (Assaytyp I). Der Kontrollstamm 1711 lag mit $12 \pm 6\%$ Adhäsion ebenfalls in einem niedrigen Bereich, zeigte aber im Vergleich zu Assaytyp I eine ~3-fach erhöhte Adhäsionsrate; FR-N052 befand sich mit $16 \pm 13\%$ ebenfalls wie zuvor gesehen zwischen diesen beiden Kontrollstämmen und zeigte im Vergleich zu Assaytyp I nur eine geringfügig erhöhte Adhäsion (vgl. Abb. 16). Bei TM-300 hingegen blieben bei dieser Versuchsanordnung $41 \pm 30\%$ der zugesetzten Bakterien an den Keratinozyten haften. Der Kontrollstamm zeigte damit die höchsten Adhäsionsraten aller Stämme. Mit einer Standardabweichung von annähernd 30% zeigte sich bei diesem Isolat aber auch die höchsten Abweichungen vom Mittelwert. Generell fiel bei dieser Versuchsanordnung auf, dass die Standardabweichungen deutlich höher lagen als bei der Versuchsreihe ohne Zentrifugation.

4.2.1.3 Assaytyp III

Bei einer Fixierung der Keratinozyten an die Welloberfläche mittels Formaldehyd kommt es unter anderem zu einer Quervernetzung von Proteinstrukturen auf der Oberfläche der Wirtszellen (Thavarajah, 2012), die sehr wahrscheinlich einen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der Bakterienzellen an das Substrat bewirkt. Um den Effekt der chemischen Fixierung auf die Adhäsionsfähigkeit von *S. aureus* an diesen Wirtszelltyp zu untersuchen, wurde die Adhäsion auch mit fixierten HaCaTs zunächst ohne Zentrifugation getestet (Assaytyp III).

In diesem Assaytyp fiel auf, dass sich zum einen die relativen Adhäsionsraten an sich und zum anderen die Intraassayvariabilität deutlich verringerten. So wiesen Cowan-1 Zellen eine Durchschnittsadhäsion von lediglich $7 \pm 3\%$ auf. Die Adhäsionsrate des Isolats 1711 bewegte sich mit knapp $7 \pm 1\%$ ebenfalls in diesem Rahmen und auch der mitgetestete Stamm FR-N052 wies nur eine Rate von $6 \pm 1\%$ auf. Zellen des *S. carnosus* Isolats TM-300 zeigten hingegen auch in diesem Assaytyp unerwartet hohe Adhäsionsraten. Mit $17 \pm 12\%$ durchschnittlicher Adhäsion übertraf der vermeintliche Negativ-Kontrollstamm erneut die Adhäsionsraten von Cowan-1. Jedoch lag auch hier die Standardabweichung mit 12% deutlich über der der anderen getesteten Isolate (vgl. Abb. 16).

4.2.1.4 Assaytyp IV

Abschließend erfolgte die Testdurchführung mit chemisch fixierten Zellen und Zentrifugation (Assaytyp IV). Die bereits beim vorherigen Versuch beobachtete Tendenz, dass sich die Unterschiede in den Messwerten bei fixierten Zellen deutlich verkleinern, setzte sich auch bei dieser Versuchsanordnung fort. Die Ergebnisse deckten sich weitgehend mit denen des vorangegangenen Versuches ohne Zentrifugation. So wies Cowan-1 eine Rate von wiederum $7 \pm 3\%$ adhärenen Bakterien auf. Bei 1711 blieben $6 \pm 2\%$ der zugegebenen Prokaryonten an den Zellen haften. Das aus einem Nasenabstrich gewonnene Isolat FR-N052 wies eine Rate von $9 \pm 4\%$ auf. Mit $24 \pm 13\%$ durchschnittlicher Adhäsion nahm der Stamm TM-300 auch hier eine Sonderposition ein, wobei wieder eine große Standardabweichung von 13% auffiel (vgl. Abb. 16).

4.2.1.5 Durchführung des Adhäsionsassays im weiteren Verlauf

Nach Auswertung der Vorversuchsergebnisse wurde beschlossen, die Analyse der zu untersuchenden Isolate mit nativen Zellen durchzuführen und auf eine Zentrifugation zu verzichten (Assaytyp I).

Die Entscheidung für die Verwendung nativer Keratinozyten beruhte auf der deutlichen Unterscheidbarkeit der Messergebnisse bei Verwendung nicht-fixierter Zellen. Diese war bei Keratinozyten nach chemischer Fixierung nicht mehr gegeben. Auch zeigten die Vorversuche bei nativen HaCaTs für Cowan-1 die höchsten Werte, für 1711 die niedrigsten Werte, was mit den Literaturwerten übereinstimmt (Cowan, 1954; Ballhausen, 2014). Auf die Zentrifugation wurde für die weitere Versuchsdurchführung verzichtet, da die Vorversuche eine höhere Standardabweichung für zentrifugierte Durchgänge aufzeigten.

Als Teststämme für die weiteren Versuche wurde Cowan-1 als Positivkontrolle mitgeführt, und die Messergebnisse der Isolate in Relation zum jeweiligen Wert von Cowan-1 gesetzt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen (Cowan, 1954).

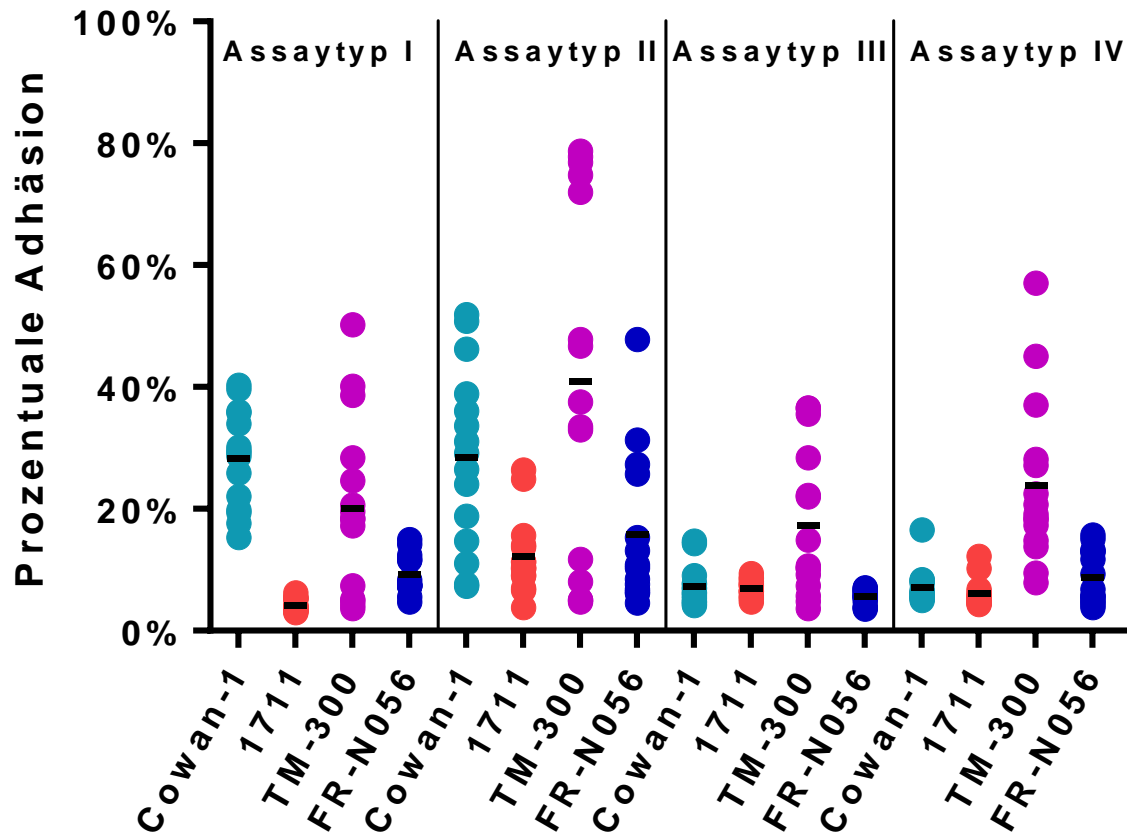


Abbildung 16: Einfluss des Assayprotokolls auf die Adhäsion von *S. aureus* an HaCaT-Zellen. Gemessen wurde, nach Durchführung des jeweiligen Assayprotokolls (siehe Abschnitt 4.2.1), die Fluoreszenz der mit dem Farbstoff FitC-angefärbten Bakterien nach Inkubation und drei Waschgängen in Relation zur Fluoreszenz der ursprünglich zugegebenen Bakteriensuspension. Die Resultate entsprechen mindestens drei biologischen Wiederholungen mit je drei technischen Replikaten. In der Aligned Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates pro Versuchsdurchgang. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Adhäsionswerte der gesamten Isolatgruppe.

4.2.2 Klonale Komplex-spezifische Adhäsion

Bei Betrachtung der relativen Adhäsionswerte der verschiedenen CCs fielen, wie bereits bei der Zytotoxizitäts-Bestimmung, zum Teil signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen klonalen Komplexen auf (Abb. 10).

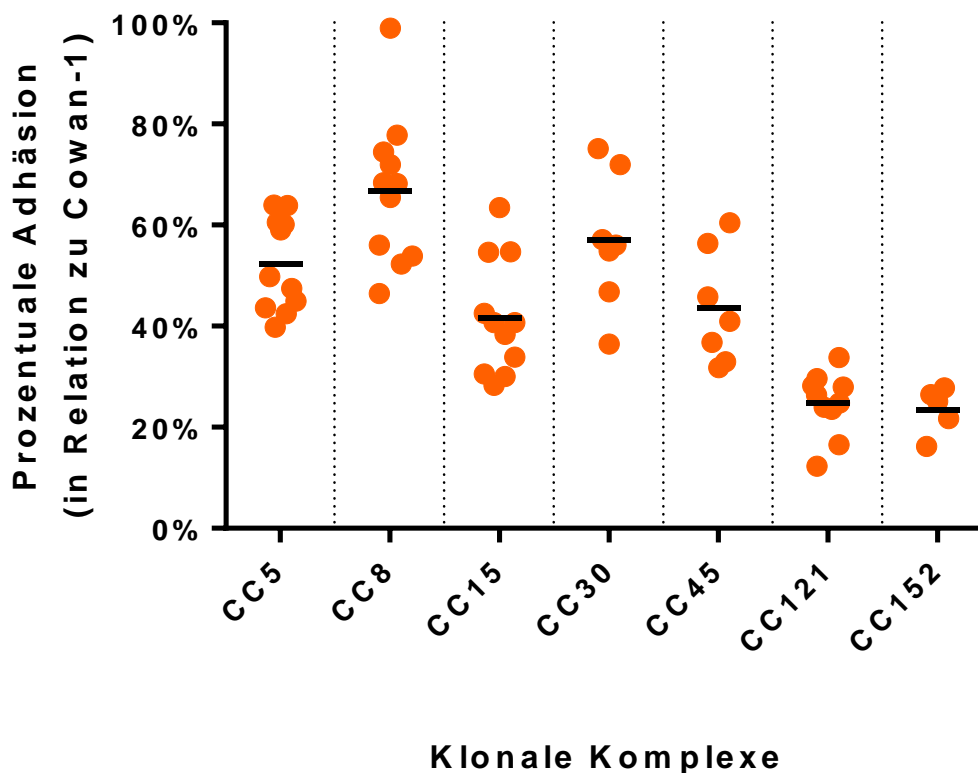


Abbildung 17: Überblick über die prozentuale Adhäsion unterteilt nach klonalen Komplexen. Gemessen wurde die Adhäsion der *S. aureus*-Stämme der jeweiligen klonalen Komplexe mittels Fluoreszenzmessung nach Anfärben der Bakterien mit dem Farbstoff FITC im Assaytyp I. Jedes Isolat wurde in mindestens drei biologischen Wiederholungen mit je drei technischen Wiederholungen getestet. Die Adhäsion der Isolate wurde nachfolgend auf die Adhäsion des Kontrollstammes Cowan-1 normalisiert. In der Scattered Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Zytotoxizitätswerte der gesamten Isolatgruppe.

Tabelle 12: Übersicht über die signifikanten Unterschiede im Adhäsionsverhalten verschiedener CCs nach Analyse der Daten per Kruskal-Wallis-Test mit nachfolgendem Dunn's Post-hoc-Test.

Adhäsions- stärkerer CC	Adhäsions- schwächerer CC	Signifikanzniveau	
CC5	CC121	**	$p \leq 0,01$
	CC152	*	$p \leq 0,05$
CC8	CC121	****	$p \leq 0,0001$
	CC152	***	$p \leq 0,001$
CC30	CC121	**	$p \leq 0,01$
	CC152	*	$p \leq 0,05$

Im Vergleich mittels Kruskal-Wallis- Test und nachfolgendem Dunn's Post-hoc-Test zeigten sich signifikante Unterschiede der Adhäsionswerte des CC121 in Relation zu CC5, CC8 sowie CC30. Auch für CC152 unterschied sich die ermittelte Adhäsion bezogen auf CC5, CC8, CC30 signifikant.

4.2.3 Adhäsion von CC5-Isolaten

Mit einer mittleren relativen Adhäsionsrate von $52 \pm 9\%$ zählt CC5 zu den stärker adhärierenden klonalen Komplexen der Untersuchung. Keines der getesteten Isolate erreicht ähnlich hohe Werte wie die Positivkontrolle Cowan-1. Das nasale Isolat MM-N056 zeigte mit einer relativen Adhäsionsrate von $64 \pm 9\%$ die stärkste Anheftung an HaCaTs innerhalb dieses klonalen Komplexes (siehe Abb. 18).

Innerhalb des CC5 zeichnete sich kein klarer Unterschied in den Adhäsions-Werten nasaler und klinischer Isolate ab (Abb. 18). Die aus Wundabstrichen isolierten Stämme wiesen eine relative Durchschnittsadhäsion von $54 \pm 8\%$ auf, wohingegen die aus Nasenabstrichen stammenden Isolate eine Durchschnittsadhäsion von $50 \pm 11\%$ zeigten ($p=0,628$; Mann-Whitney-U-Test).

Auch die prozentuale Adhäsion der Isolate afrikanischer bzw. deutscher Herkunft wiesen keine Unterschiede in Bezug auf ihre Adhäsionsfähigkeit auf ($52 \pm 10\%$ bzw. $52 \pm 9\%$; $p > 0,999$; Mann-Whitney-U-Test).

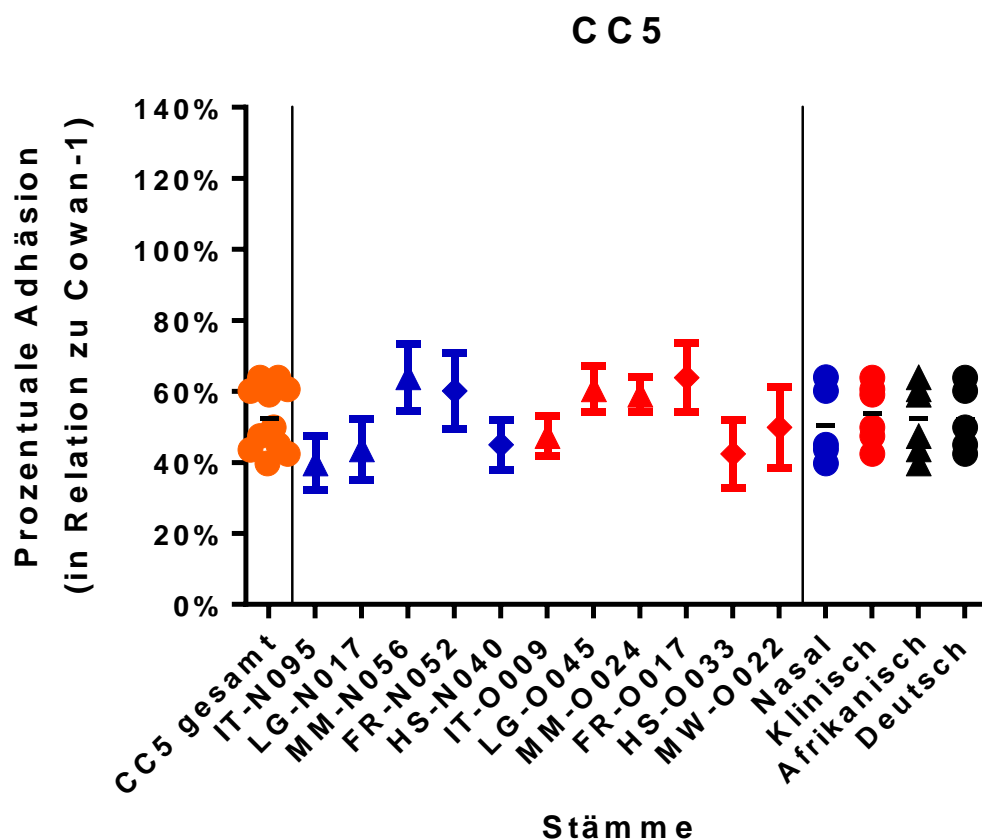


Abbildung 18: Relative Adhäsion der CC5-Isolate an HaCaT Zellen. Gemessen wurde die Adhäsion der *S. aureus*-Stämme mittels Fluoreszenzmessung nach Anfärben der Bakterien mit dem Farbstoff FITC im Assaytyp I. Jedes Isolat wurde in mindestens drei biologischen Wiederholungen mit je drei technischen Replikaten getestet. Die Adhäsion der Isolate wurde nachfolgend auf die Adhäsion des Kontrollstammes Cowan-1 normalisiert. In der Scattered - bzw. Aligned Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Adhäsionswerte der gesamten Isolatgruppe. Die Messwerte der einzelnen Isolate werden in der "One sign per row"-Darstellung dargestellt. Dabei gibt das Symbol den Mittelwert, der Strich die einfache Standardabweichung nach oben bzw. unten dar. Blaue Symbole stellen nasale, rote Symbole klinische Isolate dar. Dreiecksförmige Symbole charakterisieren afrikanische, rautenförmige Symbole hingegen deutsche Isolate.

Unter den Isolaten des CC5 befindet sich lediglich ein *lukF-PV* positives Isolat, MM-O024. Der Adhäsionswert dieses Isolates ähnelt mit $59 \pm 5\%$ den durchschnittlichen Adhäsionswerten der *lukF-PV* negativen Isolate mit $52 \pm 9\%$. Eine statistische Auswertung ist hier jedoch nicht möglich. Auch bzgl. des Einflusses von *fnbB* und *cna* auf die Adhäsion kann in dieser CC5-Isolatkohorte keine statistische Aussage getroffen werden, da lediglich *fnbB*-positive sowie *cna*-negative Isolate untersucht wurden. Der Einfluss weiterer Adhäsionsfaktoren wurde CC-übergreifend untersucht. Dabei konnte jedoch für keinen CC ein relevanter Einfluss eines weiteren Adhäsionsfaktors detektiert werden. Daher wurde auf die graphische Darstellung der Genverteilung in Bezug auf diese Faktoren jeweils verzichtet.

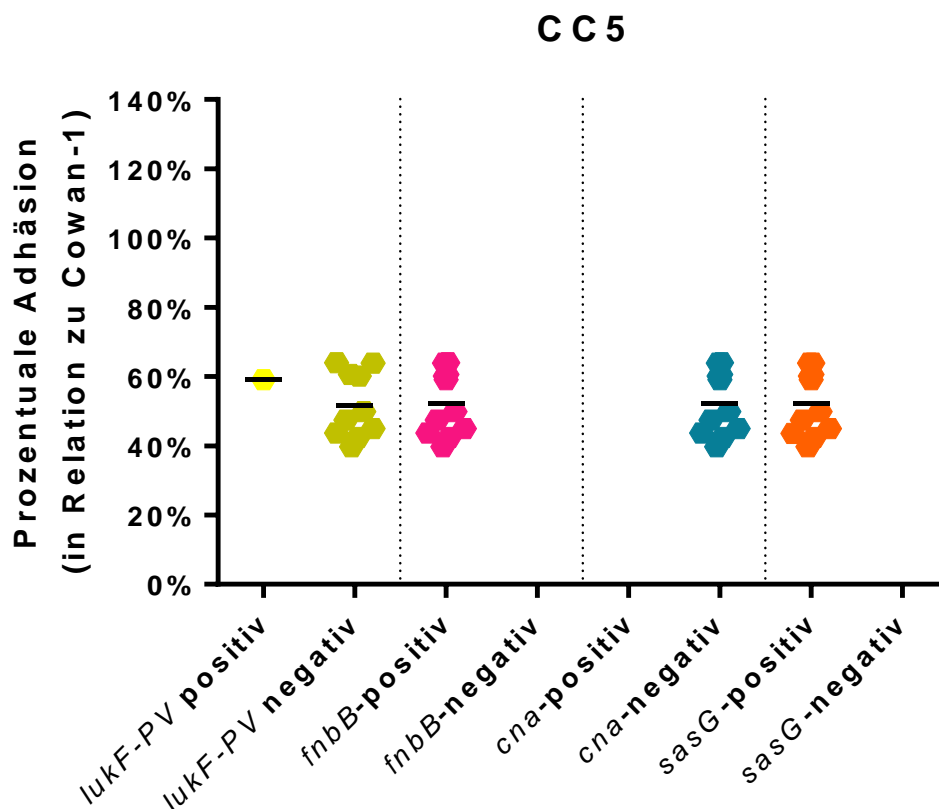


Abbildung 19: Relative prozentuale Adhäsion der Stämme des klonalen Komplexes 5 unterteilt nach Isolaten, bei denen das in der Legende aufgeführte Gen im DNA-Microarray nachgewiesen wurde bzw. fehlte. Gemessen wurde die Adhäsion der *S. aureus*-Stämme mittels Fluoreszenzmessung nach Anfärben der Bakterien mit dem Farbstoff FitC im Assaytyp I. Jedes Isolat wurde in mindestens drei biologischen Wiederholungen mit je drei technischen Wiederholungen getestet. Die Adhäsion der Isolate wurde nachfolgend auf die Adhäsion des Kontrollstammes Cowan-1 normalisiert. In der Scattered Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Adhäsionswerte der gesamten Isolatgruppe. Gelbe, pinke, hellblaue und orangene Symbole repräsentieren das Vorhandensein eines Gens (*lukF-PV*, *fnbB*, *cna*, *sasG*); goldene, lilafarbene, dunkelblaue und hellorangene Symbole dagegen deren Fehlen.

4.2.4 Adhäsion von CC8-Isolaten

Mit einer Durchschnittsadhäsionsrate von $67 \pm 15\%$ stellt CC8 den am stärksten adhärensten klonalen Komplex dieser Untersuchung dar. Jedoch ließen sich deutliche Unterschiede im Adhäsionspotential der einzelnen Isolate feststellen. So wies das Wundisolat IT-O031 mit durchschnittlichen Werten von $99 \pm 24\%$ eine ähnlich hohe Adhäsion wie Cowan-1 auf, während das nasale Isolat FR-N079 im Mittel nur $46 \pm 10\%$ der Adhäsionsrate zeigte, die mit dem Stamm Cowan-1 beobachtet wurde. Im Durchschnitt lagen alle Isolate des CC8 unter den Messergebnissen von Cowan-1, der als Positivkontrolle getestet wurde (siehe Abb. 20).

Mit $74 \pm 16\%$ relativer Adhäsion der klinischen Stämme im Vergleich zu $61 \pm 11\%$ der nasalen Stämme lassen sich keine signifikanten Unterschiede in deren Adhäsionsverhalten feststellen ($p=0,178$). Auch in Bezug auf ihre geographische Herkunft unterscheiden sich die untersuchten Isolate des CC8 nicht ($p=0,528$, Mann-Whitney-U-Test).

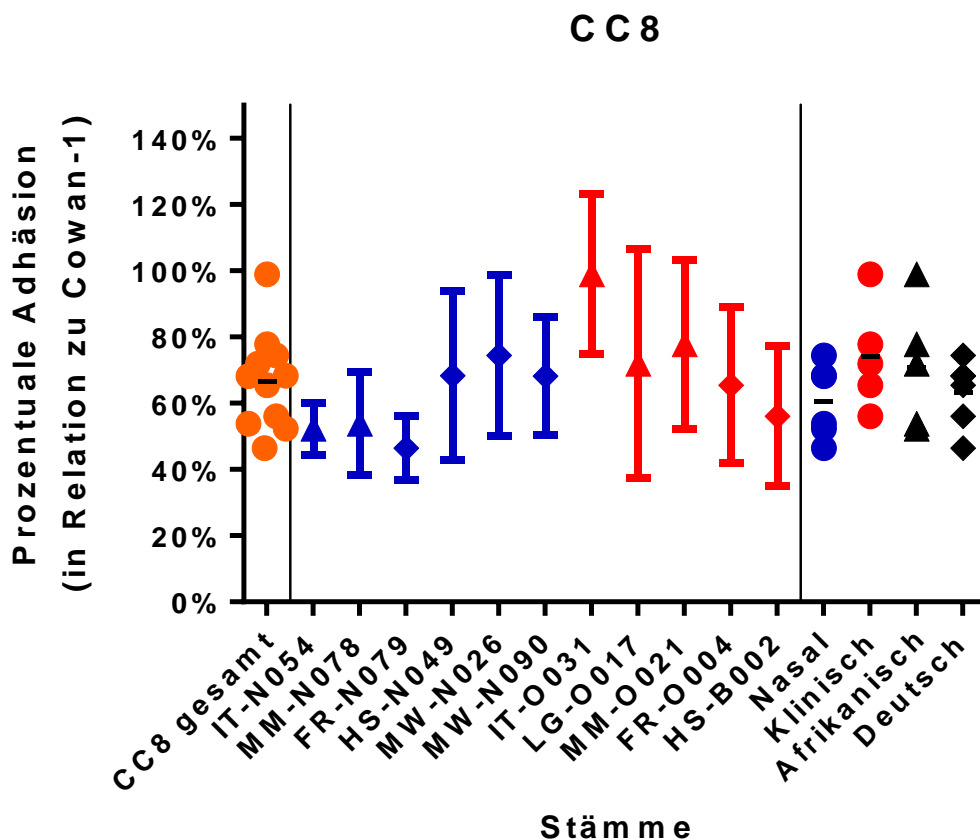


Abbildung 20: Relative Adhäsion der CC8-Isolate an HaCaT Zellen. Gemessen wurde die Adhäsion der *S. aureus*-Stämme mittels Fluoreszenzmessung nach Anfärben der Bakterien mit dem Farbstoff FITC im Assaytyp I. Jedes Isolat wurde in mindestens drei biologischen Wiederholungen mit je drei technischen Replikaten getestet. Die Adhäsion der Isolate wurde nachfolgend auf die Adhäsion des Kontrollstammes Cowan-1 normalisiert. In der Scattered - bzw. Aligned Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Adhäsionswerte der gesamten Isolatgruppe. Die Messwerte der einzelnen Isolate werden in der "One sign per row"-Darstellung dargestellt. Dabei gibt das Symbol den Mittelwert, der Strich die einfache Standardabweichung nach oben bzw. unten dar. Blaue Symbole stellen nasale, rote Symbole klinische Isolate dar. Dreiecksförmige Symbole charakterisieren afrikanische, rautenförmige Symbole hingegen deutsche Isolate.

Die beiden Isolate, die keine für FnBP-B spezifische Genregion aufwiesen, entstammen der klinischen Isolatgruppe, das *cna*-positive Isolat hingegen wurde aus dem Nasenabstrich eines gesunden Probanden isoliert.

Eine statistische Auswertung der Adhäsionswerte in Bezug auf das Vorhandensein der in Abb. 21 aufgeführten Gene ist aufgrund der großen Homogenität der Genverteilung nicht möglich. Für zukünftige, weitere Untersuchungen wäre eine Analyse in Bezug auf den Einfluss dieser Faktoren auf die Adhäsionsfähigkeit von *S. aureus* jedoch von großem Interesse.

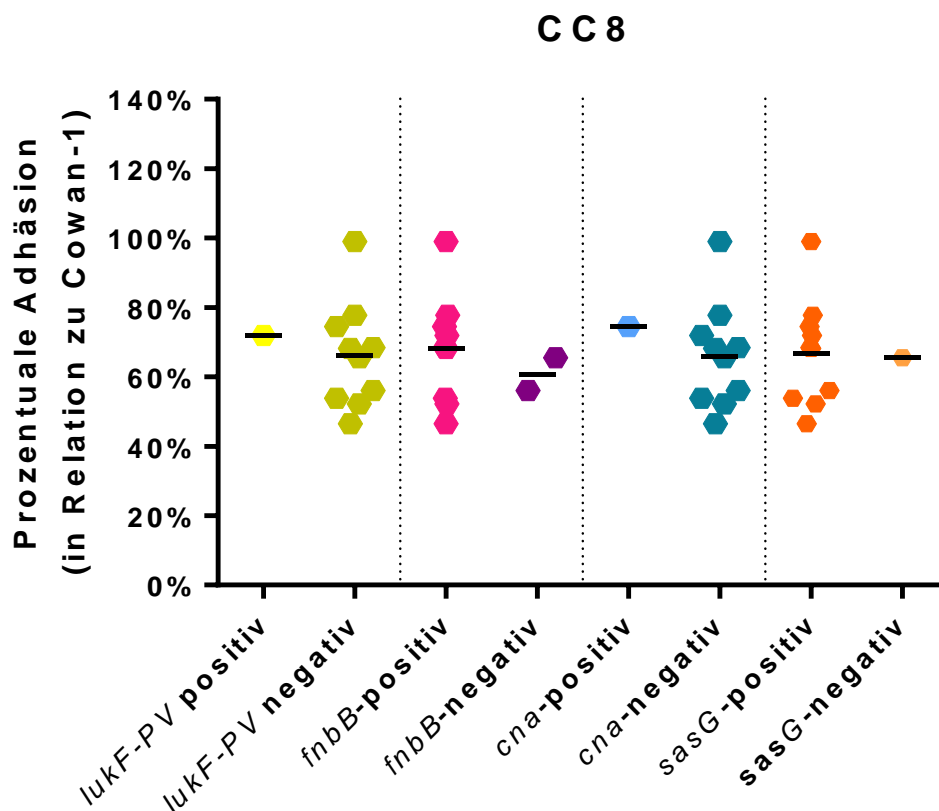


Abbildung 21: Relative prozentuale Adhäsion der Stämme des klonalen Komplexes 8 unterteilt nach Isolat, bei denen das in der Legende aufgeführte Gen im DNA-Microarray nachgewiesen wurde bzw. fehlte. Gemessen wurde die Adhäsion der *S. aureus*-Stämme mittels Fluoreszenzmessung nach Anfärben der Bakterien mit dem Farbstoff FitC im Assaytyp I. Jedes Isolat wurde in mindestens drei biologischen Wiederholungen mit je drei technischen Wiederholungen getestet. Die Adhäsion der Isolate wurde nachfolgend auf die Adhäsion des Kontrollstammes Cowan-1 normalisiert. In der Scattered Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Adhäsionswerte der gesamten Isolatgruppe. Gelbe, pinke, hellblaue und orangene Symbole repräsentieren das Vorhandensein eines Gens (*lukF-PV*, *fnbB*, *cna*, *sasG*); goldene, lilafarbene, dunkelblaue und hellorangene Symbole dagegen deren Fehlen.

4.2.5 Adhäsion von CC15-Isolaten

Bei einer relativen Adhäsion von durchschnittlich $42 \pm 12\%$ befinden sich die Werte des CC15 im mittleren Bereich. Der Stamm LG-O073 wich mit Durchschnittswerten von $63 \pm 12\%$ am stärksten nach oben ab.

Im Vergleich von nasalen und klinischen Isolaten wiesen die aus Wundabstrichen bzw. Blutkulturen stammenden Stämme bei diesem CC signifikant höhere Adhäsionsraten auf ($p=0,026$; Mann-Whitney-U-Test). Während die nasalen Stämme eine durchschnittliche

Adhäsionsrate von $33 \pm 6\%$ besaßen, lagen die Werte der klinischen Stämme mit $49 \pm 10\%$ deutlich darüber (siehe Abb. 22).

Im Vergleich afrikanischer und deutscher *S. aureus*-Isolate ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Adhäsion feststellen. Während die in Afrika gesammelten Stämme eine relative Durchschnittsadhäsion von $40 \pm 14\%$ aufwiesen, zeigten deutsche Isolate eine Adhäsionsrate von $43 \pm 10\%$ auf ($p=0,567$; Mann-Whitney-U-Test).

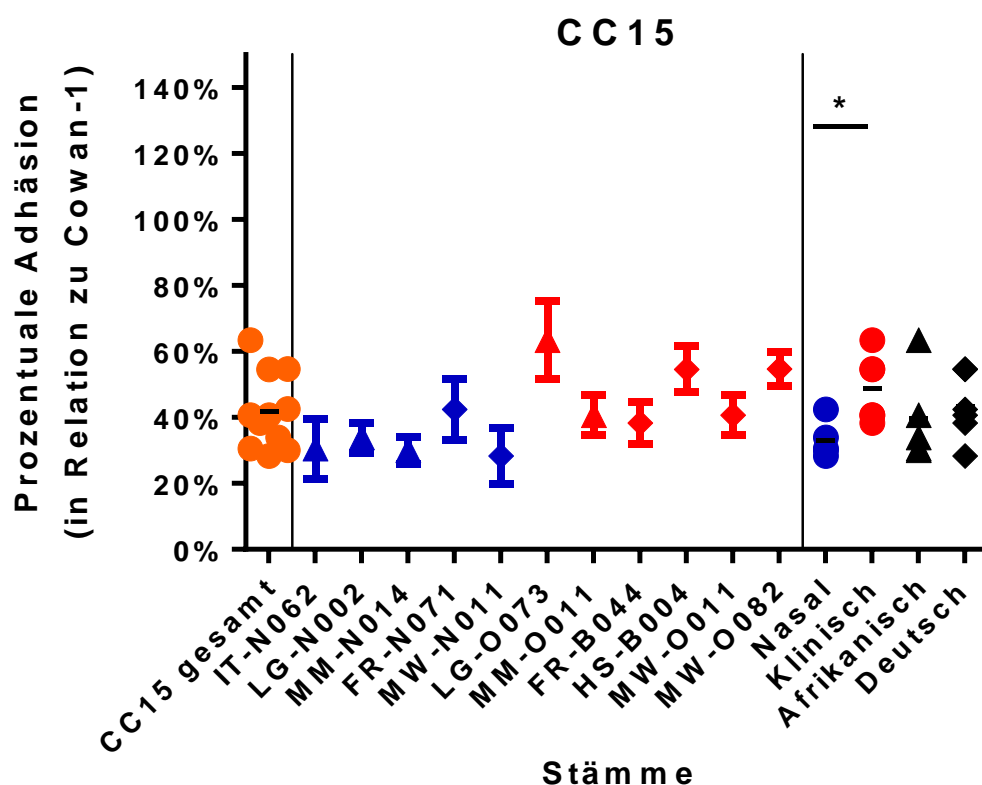


Abbildung 22: Relative Adhäsion der CC15-Isolate an HaCaT Zellen. Gemessen wurde die Adhäsion der *S. aureus*-Stämme mittels Fluoreszenzmessung nach Anfärben der Bakterien mit dem Farbstoff FITC im Assaytyp I. Jedes Isolat wurde in mindestens drei biologischen Wiederholungen mit je drei technischen Replikaten getestet. Die Adhäsion der Isolate wurde nachfolgend auf die Adhäsion des Kontrollstammes Cowan-1 normalisiert. In der Scattered - bzw. Aligned Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Adhäsionswerte der gesamten Isolatgruppe. Die Messwerte der einzelnen Isolate werden in der "One sign per row"-Darstellung dargestellt. Dabei gibt das Symbol den Mittelwert, der Strich die einfache Standardabweichung nach oben bzw. unten dar. Blaue Symbole stellen nasale, rote Symbole klinische Isolate dar. Dreiecksförmige Symbole charakterisieren afrikanische, rautenförmige Symbole hingegen deutsche Isolate; $p \leq 0,05$ (Mann-Whitney-U-Test)

In der genotypischen Analyse zeigten sich alle Isolate mit Ausnahme von MW-N011 als für die FnBP-B spezifische Genregion positiv. Gleichzeitig ist MW-N011 das einzige *cna*-positive Isolat des CC15. In der phänotypischen Betrachtung liegt dieses Isolat mit einer relativen Durchschnittsadhäsion von $28 \pm 9\%$ unter dem durchschnittlichen Mittelwert des CC15 mit $43 \pm 9\%$. Dies lässt angesichts der Tatsache, dass bei CC15 nur ein *cna*-positives Isolat untersucht wurde, jedoch keinen generellen Schluss auf den Einfluss von Cna auf das phänotypische Verhalten von *S. aureus* zu.

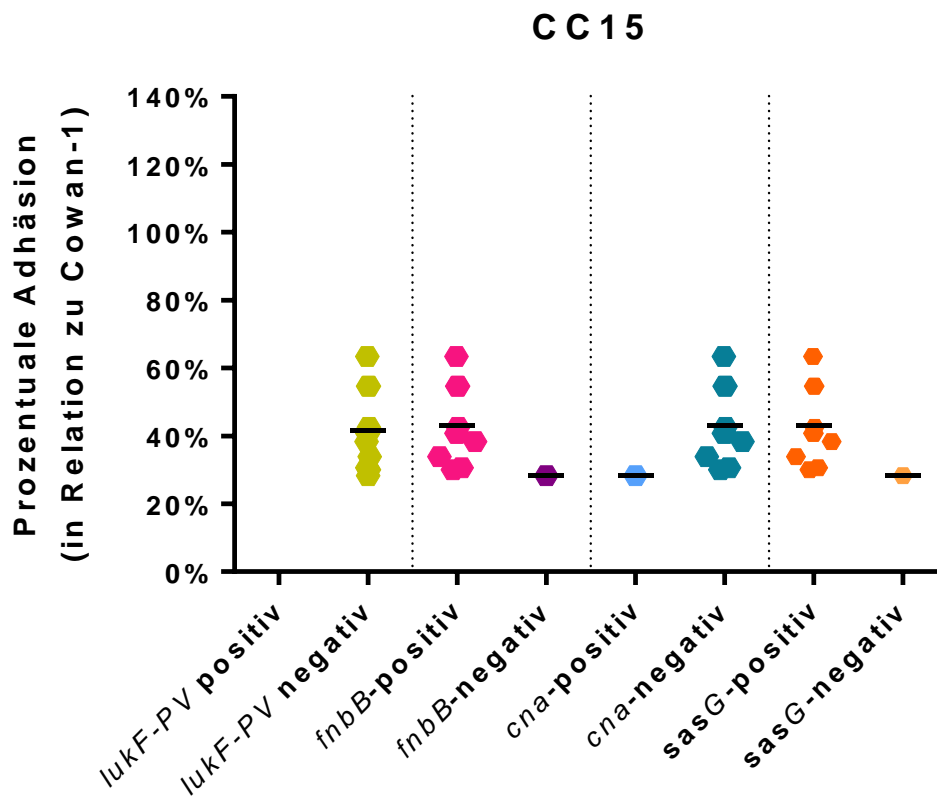


Abbildung 23: Relative prozentuale Adhäsion der Stämme des klonalen Komplexes 15 unterteilt nach Isolaten, bei denen das in der Legende aufgeführte Gen im DNA-Microarray nachgewiesen wurde bzw. fehlte. Gemessen wurde die Adhäsion der *S. aureus*-Stämme mittels Fluoreszenzmessung nach Anfärben der Bakterien mit dem Farbstoff FitC im Assaytyp I. Jedes Isolat wurde in mindestens drei biologischen Wiederholungen mit je drei technischen Wiederholungen getestet. Die Adhäsion der Isolate wurde nachfolgend auf die Adhäsion des Kontrollstammes Cowan-1 normalisiert. In der Scattered Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Adhäsionswerte der gesamten Isolatgruppe. Gelbe, pinke, hellblaue und orangene Symbole repräsentieren das Vorhandensein eines Gens (*lukF-PV*, *fnbB*, *cna*, *sasG*); goldene, lilafarbene, dunkelblaue und hellorangene Symbole dagegen deren Fehlen.

4.2.6 Adhäsion von CC30-Isolaten

Mit $57 \pm 13\%$ mittlerer relativer Adhäsionsrate stellt CC30 den klonalen Komplex dar, der in dieser Untersuchung die zweitstärkste Adhäsion aufwies. Die nasalen Isolate FR-N095 mit $75 \pm 20\%$ bzw. LG-O030 mit $72 \pm 16\%$ wiesen dabei die höchsten Werte dieses klonalen Komplexes auf, wohingegen MW-O055 mit $36 \pm 6\%$ deutlich darunter blieb. Keiner der untersuchten Stämme zeigte Werte, die über die des stark adhärenen Stammes Cowan-1 hinausgingen (vgl. Abb. 14a). Isolate nasaler bzw. klinischer Herkunft wiesen eine ähnliche relative Adhäsion von im Mittel $59 \pm 14\%$ bzw. $55 \pm 15\%$ auf ($p=0,717$; T-Test). Auch im Vergleich afrikanischer bzw. deutscher Isolate ergeben sich keine Anhaltspunkte für einen Unterschied in Bezug auf das Adhäsionspotential ($57 \pm 11\%$ vs. $56 \pm 19\%$; $p=0,918$; T-Test).

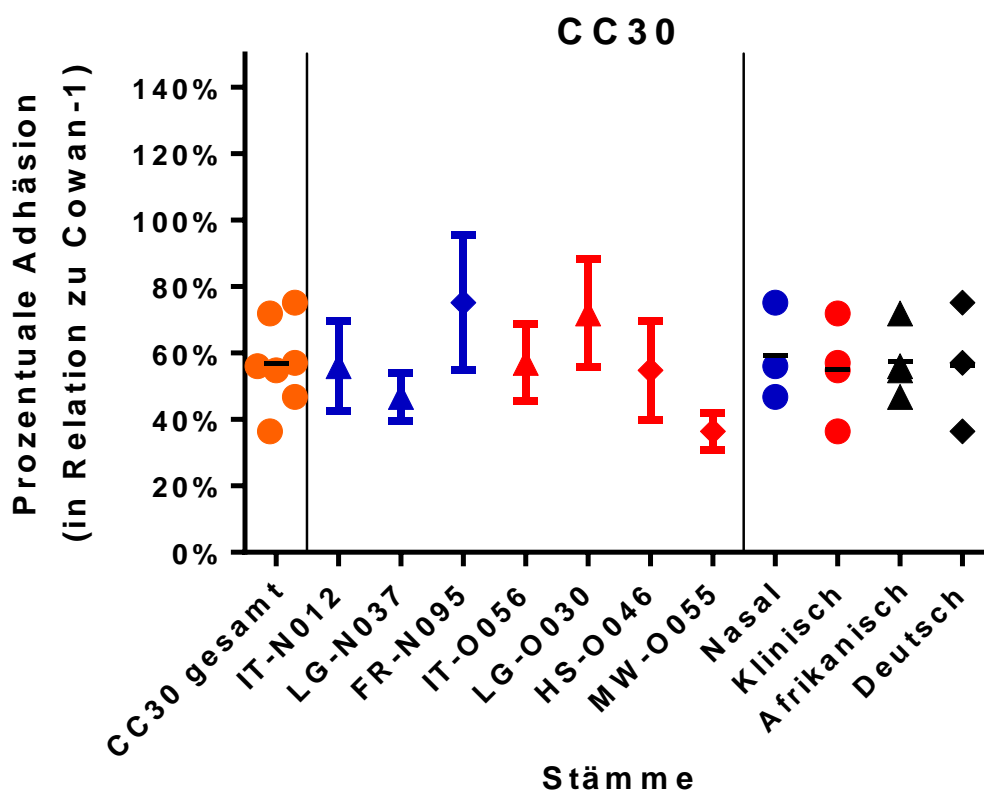


Abbildung 24: Relative Adhäsion der CC30-Isolate an HaCaT Zellen. Gemessen wurde die Adhäsion der *S. aureus*-Stämme mittels Fluoreszenzmessung nach Anfärben der Bakterien mit dem Farbstoff FITC im Assaytyp I. Jedes Isolat wurde in mindestens drei biologischen Wiederholungen mit je drei technischen Replikaten getestet. Die Adhäsion der Isolate wurde nachfolgend auf die Adhäsion des Kontrollstammes Cowan-1 normalisiert. In der Scattered - bzw. Aligned Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Adhäsionswerte der gesamten Isolatgruppe. Die Messwerte der einzelnen Isolate werden in der "One sign per row"-Darstellung dargestellt. Dabei gibt das Symbol den Mittelwert, der Strich die einfache Standardabweichung nach oben bzw. unten dar. Blaue Symbole stellen nasale, rote Symbole klinische Isolate dar. Dreiecksförmige Symbole charakterisieren afrikanische, rautenförmige Symbole hingegen deutsche Isolate.

Bei der genotypischen Analyse des klonalen Komplexes 30 zeigten sich die Isolate IT-N012, IT-O056, LG-N037 und LG-O030 als für PVL-kodierende Gene positiv. Die durchschnittliche relative Adhäsionsrate der *lukF*-PV positiven Isolate unterschied sich mit $58 \pm 10\%$ jedoch nicht signifikant von derjenigen der *lukF*-PV negativen Vertreter des CC30 mit $55 \pm 19\%$ ($p=0,831$; T-Test). Eine statistische Prüfung der anderen genetischen Parameter wurde aufgrund der heterogenen Genverteilung nicht durchgeführt.

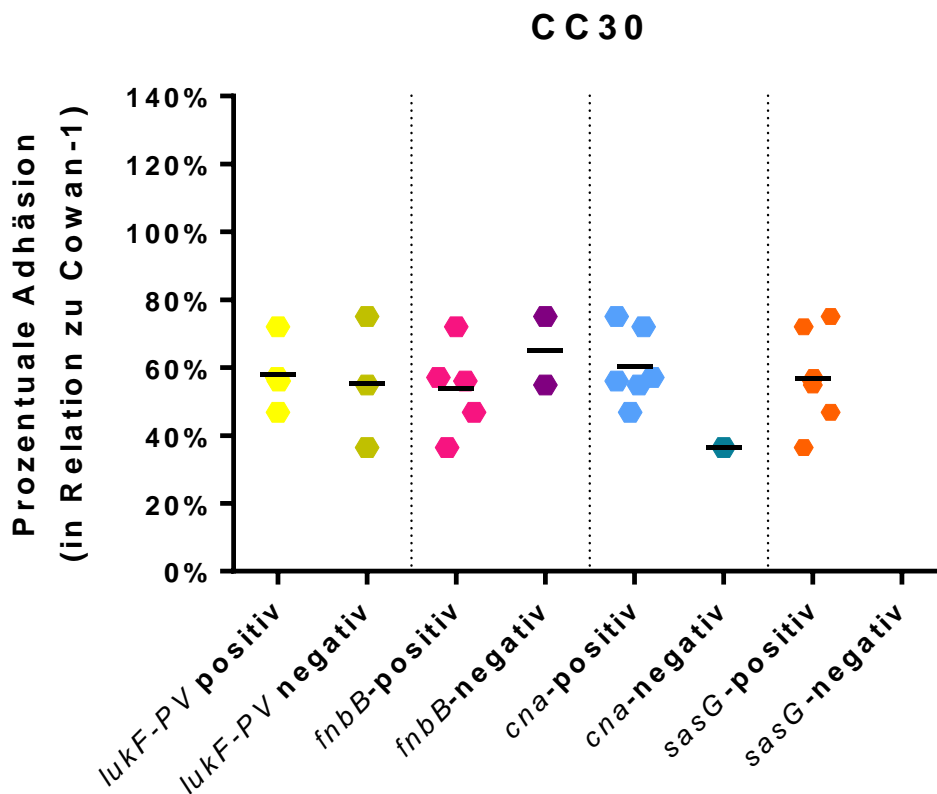


Abbildung 25: Relative prozentuale Adhäsion der Stämme des klonalen Komplexes 30 unterteilt nach Isolat, bei denen das in der Legende aufgeführte Gen im DNA-Microarray nachgewiesen wurde bzw. fehlte. Gemessen wurde die Adhäsion der *S. aureus*-Stämme mittels Fluoreszenzmessung nach Anfärben der Bakterien mit dem Farbstoff FitC im Assaytyp I. Jedes Isolat wurde in mindestens drei biologischen Wiederholungen mit je drei technischen Wiederholungen getestet. Die Adhäsion der Isolate wurde nachfolgend auf die Adhäsion des Kontrollstammes Cowan-1 normalisiert. In der Scattered Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Adhäsionswerte der gesamten Isolatgruppe. Gelbe, pinke, hellblaue und orangene Symbole repräsentieren das Vorhandensein eines Gens (*lukF*-PV, *fnbB*, *cna*, *sasG*); goldene, lilafarbene, dunkelblaue und hellorangene Symbole dagegen deren Fehlen.

4.2.7 Adhäsion von CC45-Isolaten

CC45 stellt in Hinblick auf das Adhäsionsverhalten eine homogene Gruppe an Isolaten dar, die sich mit einer durchschnittlichen relativen Adhäsion von $44 \pm 11\%$ im Mittelfeld der untersuchten Stämme bewegte. Die höchsten Adhäsionswerte des klonalen Komplexes wiesen HS-O044 mit $60 \pm 9\%$ sowie MW-N026 mit $56 \pm 7\%$ auf. MM-N001 und MM-O069 hingegen stellten mit $33 \pm 12\%$ bzw. $32 \pm 6\%$ die Stämme mit den niedrigsten Werten dar (siehe Abb. 26).

Vergleicht man die Werte nasaler und klinischer Isolate miteinander, so lassen sich auch für diesen CC keine klaren Unterschiede zwischen den beiden Gruppen identifizieren (siehe Abb. 26). Die klinischen Isolate dieses CCs wiesen durchschnittliche Werte von $46 \pm 14\%$ auf, wohingegen diese bei aus Nasenabstrichen isolierten *S. aureus*-Stämmen bei $42 \pm 10\%$ lagen ($p = 0,687$; T-Test).

In Hinblick auf die Herkunft hingegen unterschieden sich die afrikanischen und deutschen CC45 Isolate signifikant voneinander ($p=0,027$; T-Test). Während die Isolate aus afrikanischen Ländern eine relative prozentuale Adhäsion von $34 \pm 3\%$ aufzeigten, war bei deutschen Proben eine Adhäsionsrate von $51 \pm 9\%$ nachweisbar.

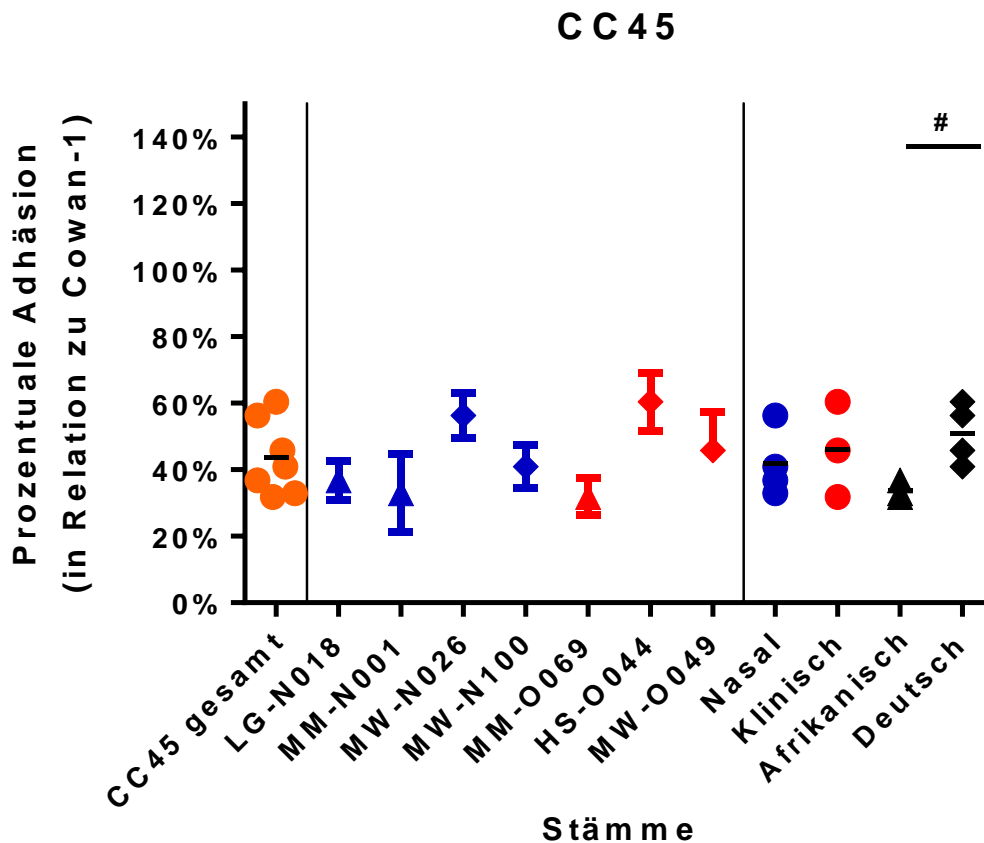


Abbildung 26: Relative Adhäsion der CC45-Isolate an HaCaT Zellen. Gemessen wurde die Adhäsion der *S. aureus*-Stämme mittels Fluoreszenzmessung nach Anfärben der Bakterien mit dem Farbstoff FITC im Assaytyp I. Jedes Isolat wurde in mindestens drei biologischen Wiederholungen mit je drei technischen Replikaten getestet. Die Adhäsion der Isolate wurde nachfolgend auf die Adhäsion des Kontrollstammes Cowan-1 normalisiert. In der Scattered - bzw. Aligned Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Adhäsionswerte der gesamten Isolatgruppe. Die Messwerte der einzelnen Isolate werden in der "One sign per row"-Darstellung dargestellt. Dabei gibt das Symbol den Mittelwert, der Strich die einfache Standardabweichung nach oben bzw. unten dar. Blaue Symbole stellen nasale, rote Symbole klinische Isolate dar. Dreiecksförmige Symbole charakterisieren afrikanische, rautenförmige Symbole hingegen deutsche Isolate; # $p \leq 0,05$ (T-Test).

Bei Betrachtung der von Ruffing et al. (Ruffing, 2017) im Vorfeld der Untersuchung erhobenen genotypischen Daten zeigt sich MW-N100 als der einzige *cna*-negative Vertreter des CC45. Die beiden Isolate LG-N018 und MW-N100 wiesen in der Microarray-Untersuchung zudem als einzige untersuchte Vertreter des CC45 *sasG* auf.

Eine statistische Untersuchung der Adhäsionswerte Gen-positiver bzw. -negativer Isolate wurde aufgrund der inhomogenen Gruppengrößen nicht durchgeführt.

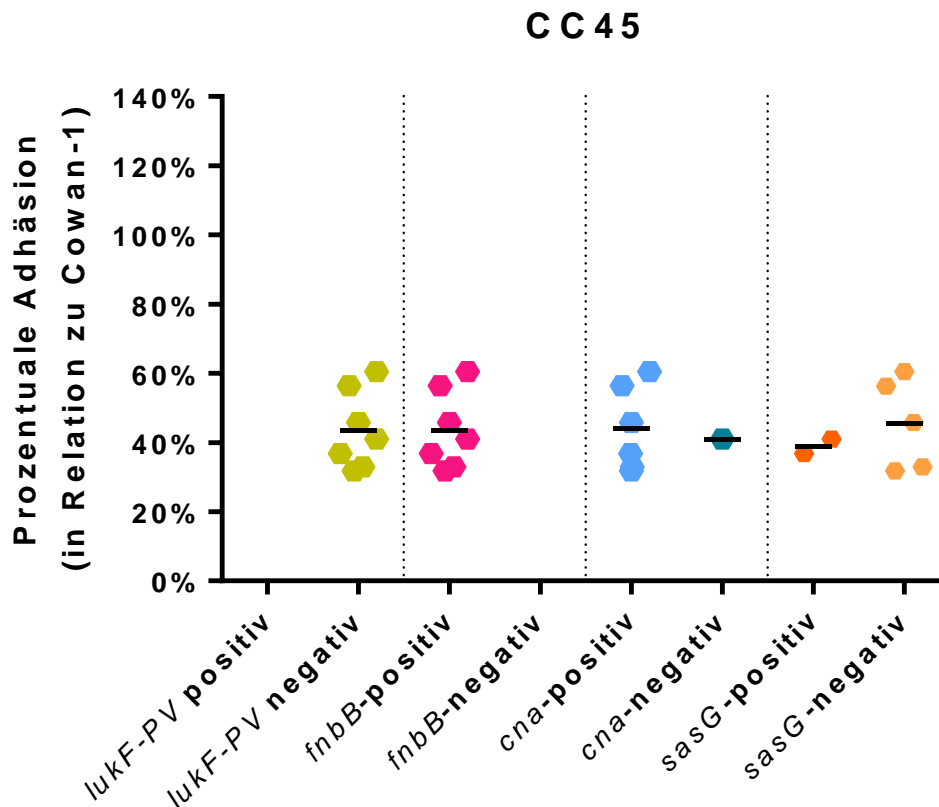


Abbildung 27: Relative prozentuale Adhäsion der Stämme des klonalen Komplexes 45 unterteilt nach Isolaten, bei denen das in der Legende aufgeführte Gen im DNA-Microarray nachgewiesen wurde bzw. fehlte. Gemessen wurde die Adhäsion der *S. aureus*-Stämme mittels Fluoreszenzmessung nach Anfärben der Bakterien mit dem Farbstoff FitC im Assaytyp I. Jedes Isolat wurde in mindestens drei biologischen Wiederholungen mit je drei technischen Wiederholungen getestet. Die Adhäsion der Isolate wurde nachfolgend auf die Adhäsion des Kontrollstammes Cowan-1 normalisiert. In der Scattered Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Adhäsionswerte der gesamten Isolatgruppe. Gelbe, pinke, hellblaue und orangene Symbole repräsentieren das Vorhandensein eines Gens (*lukF-PV*, *fnbB*, *cna*, *sasG*); goldene, lilafarbene, dunkelblaue und hellorangene Symbole dagegen deren Fehlen.

4.2.8 Adhäsion von CC121-Isolaten

Der hauptsächlich in Afrika endemisch verbreitete CC121 (Kurt, 2013) wies mit einer durchschnittlichen Adhäsion von $25 \pm 6\%$ nur eine schwache Fähigkeit zur Anheftung an humane Keratinozyten auf. Als adhäsionsschwächstes Isolat fällt MW-O075 mit einer relativen mittleren Adhäsionsrate von lediglich $12 \pm 4\%$ auf. Beim Vergleich der Werte nasaler und klinischer Isolate dieses CCs zeigten sich, wie schon für die meisten anderen CCs beobachtet, keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (siehe Abb. 16a). Mit $26 \pm 7\%$ lag die mittlere Adhäsionsrate der nicht-invasiven Stämme nur zwei Prozentpunkt über der der invasiven Stämme mit $24 \pm 6\%$ ($p=0,752$; Mann-Whitney-U-Test). Im Vergleich afrikanischer und deutscher Isolate finden sich ebenfalls keine signifikanten

Unterschiede in Bezug auf die Adhäsionswerte beider Isolatgruppen ($25 \pm 6\%$ vs. $24 \pm 8\%$, $p=0,895$; Mann-Whitney-U-Test).

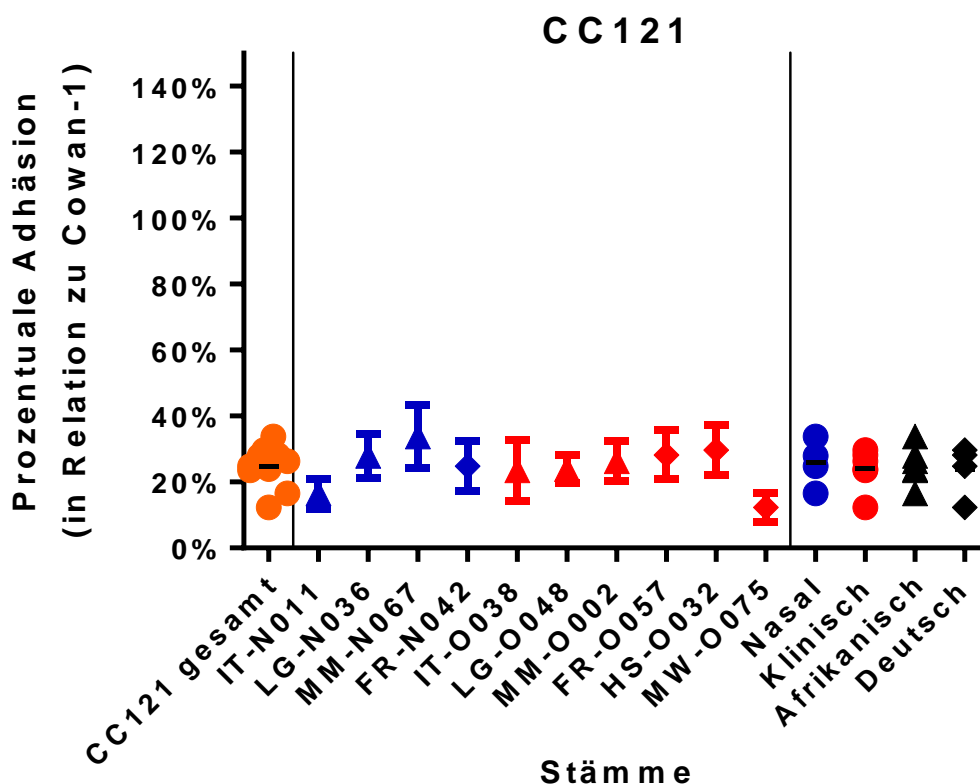


Abbildung 28: Relative Adhäsion der CC121-Isolate an HaCaT Zellen. Gemessen wurde die Adhäsion der *S. aureus*-Stämme mittels Fluoreszenzmessung nach Anfärben der Bakterien mit dem Farbstoff FITC im Assaytyp I. Jedes Isolat wurde in mindestens drei biologischen Wiederholungen mit je drei technischen Replikaten getestet. Die Adhäsion der Isolate wurde nachfolgend auf die Adhäsion des Kontrollstammes Cowan-1 normalisiert. In der Scattered - bzw. Aligned Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Adhäsionswerte der gesamten Isolatgruppe. Die Messwerte der einzelnen Isolate werden in der "One sign per row"-Darstellung dargestellt. Dabei gibt das Symbol den Mittelwert, der Strich die einfache Standardabweichung nach oben bzw. unten dar. Blaue Symbole stellen nasale, rote Symbole klinische Isolate dar. Dreiecksförmige Symbole charakterisieren afrikanische, rautenförmige Symbole hingegen deutsche Isolate.

70% der getesteten Isolate des CC121 wiesen im DNA-Microarray PVL-kodierende Genloci auf. Negativ für die PVL-kodierenden Gene sind die Stämme IT-N011, FR-N042 und FR-O057. Die Adhäsionswerte dieser *lukF-PV* negativen Stämme unterschieden sich in ihrem relativen Adhäsionswerten mit $23 \pm 6\%$ jedoch nicht signifikant vom Mittelwert der *lukF-PV* positiven Isolate mit $25 \pm 7\%$ ($p=0,717$; T-Test).

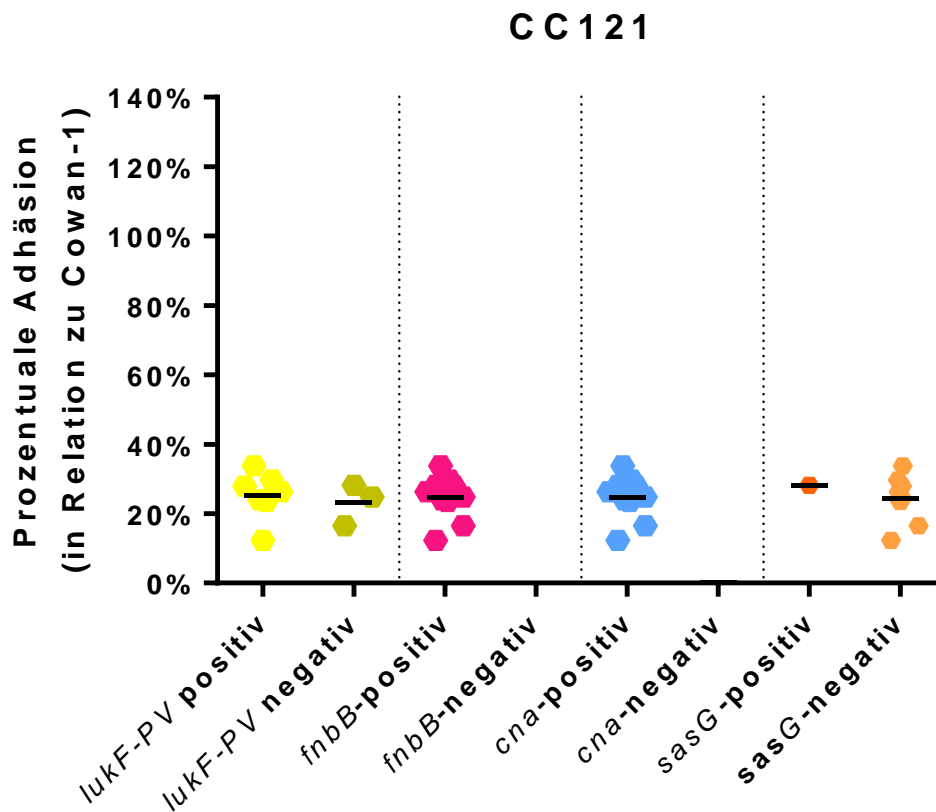


Abbildung 29: Relative prozentuale Adhäsion der Stämme des klonalen Komplexes 121 unterteilt nach Isolaten, bei denen das in der Legende aufgeführte Gen im DNA-Microarray nachgewiesen wurde bzw. fehlte. Gemessen wurde die Adhäsion der *S. aureus*-Stämme mittels Fluoreszenzmessung nach Anfärben der Bakterien mit dem Farbstoff FitC im Assaytyp I. Jedes Isolat wurde in mindestens drei biologischen Wiederholungen mit je drei technischen Wiederholungen getestet. Die Adhäsion der Isolate wurde nachfolgend auf die Adhäsion des Kontrollstammes Cowan-1 normalisiert. In der Scattered Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Adhäsionswerte der gesamten Isolatgruppe. Gelbe, pinke, hellblaue und orangene Symbole repräsentieren das Vorhandensein eines Gens (*lukF-PV*, *fnbB*, *cna*, *sasG*); goldene, lilafarbene, dunkelblaue und hellorangene Symbole dagegen deren Fehlen.

4.2.9 Adhäsion von CC152-Isolaten

War CC152 bei der Untersuchung der Zytotoxizität der CC mit den höchsten Messwerten, so setzt sich dieser klonale Komplex bei der Betrachtung der Adhäsion aus den Stämmen mit den niedrigsten Werten zusammen. Mit einer relativen Durchschnittsadhäsion von lediglich $23 \pm 5\%$ bildet er die Schlussgruppe dieser Untersuchung. Die beiden nasalen Isolate zeigten eine mittlere relative Adhäsion von $22 \pm 9\%$, während die klinischen Isolate eine mittlere relative Adhäsion von $25 \pm 3\%$ aufwiesen. Auf eine statistische Auswertung wurde hier aufgrund des niedrigen n ($n=2-3$) verzichtet. Ein statistischer Vergleich der Isolate afrikanischer bzw. deutscher Herkunft konnte aufgrund des $n = 1$ in der deutschen Isolatkohorte ebenfalls nicht durchgeführt werden.

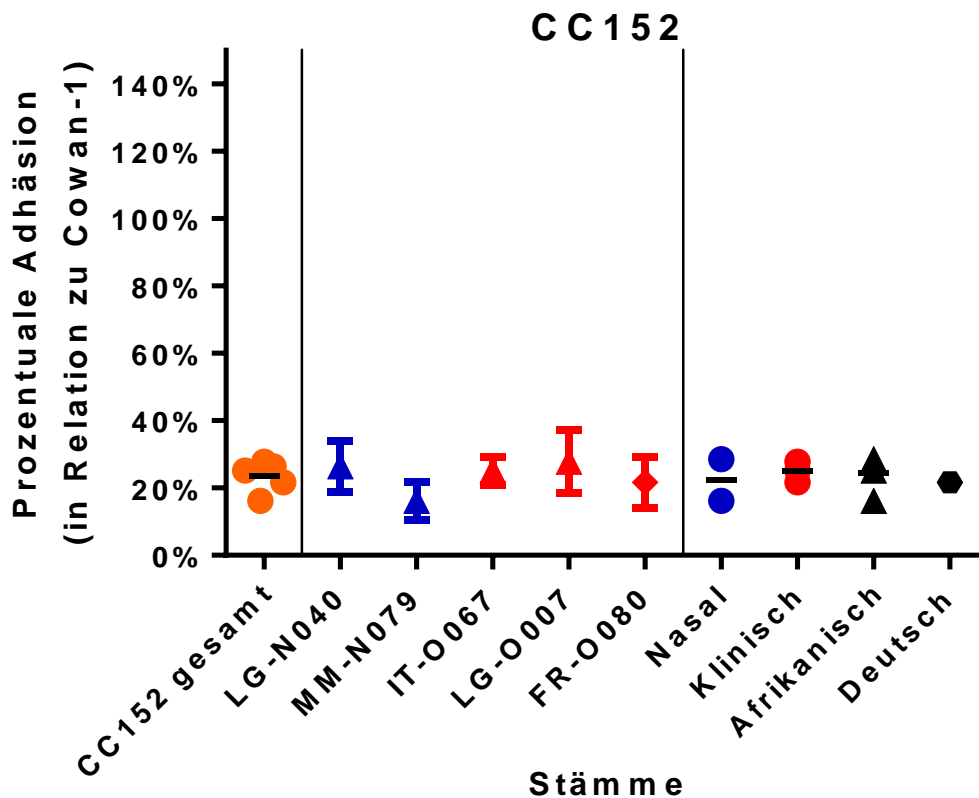


Abbildung 30: Relative Adhäsion der CC152-Isolate an HaCaT Zellen. Gemessen wurde die Adhäsion der *S. aureus*-Stämme mittels Fluoreszenzmessung nach Anfärben der Bakterien mit dem Farbstoff FITC im Assaytyp I. Jedes Isolat wurde in mindestens drei biologischen Wiederholungen mit je drei technischen Replikaten getestet. Die Adhäsion der Isolate wurde nachfolgend auf die Adhäsion des Kontrollstammes Cowan-1 normalisiert. In der Scattered - bzw. Aligned Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Adhäsionswerte der gesamten Isolatgruppe. Die Messwerte der einzelnen Isolate werden in der "One sign per row"-Darstellung dargestellt. Dabei gibt das Symbol den Mittelwert, der Strich die einfache Standardabweichung nach oben bzw. unten dar. Blaue Symbole stellen nasale, rote Symbole klinische Isolate dar. Dreiecksförmige Symbole charakterisieren afrikanische, rautenförmige Symbole hingegen deutsche Isolate.

FR-O080 stellt das einzige untersuchte CC152-Isolat dar, das kein *lukF*-PV aufweist. Gleichzeitig weist es jedoch als einziges Isolat dieses klonalen Komplexes das Kollagen-Adhäsion vermittelnde Gen *cna* auf. In der phänotypischen Betrachtung liegt dieses Isolat mit $22 \pm 8\%$ relativer Durchschnittsadhäsion nahe an den Durchschnittswerten des CC152 ($23 \pm 5\%$). Eine weitergehende Statistik ist aufgrund der geringen Fallzahlen ($n=0-1$) der Isolate mit Vorhandensein/Fehlen des jeweiligen Gens unterblieben.

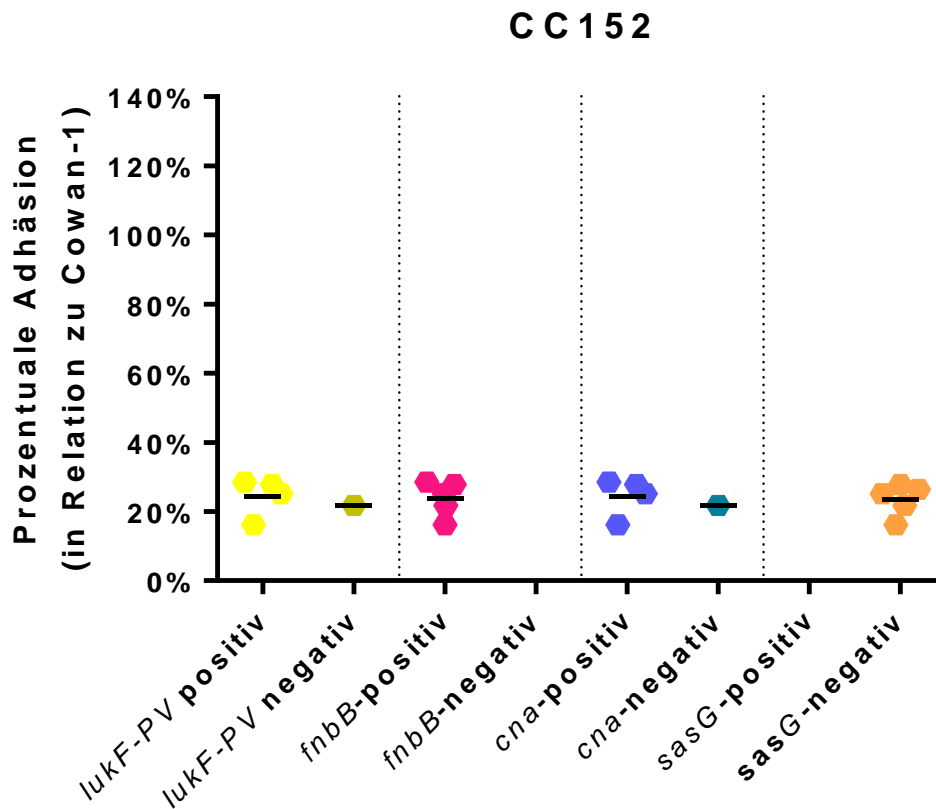


Abbildung 31: Relative prozentuale Adhäsion der Stämme des klonalen Komplexes 152 unterteilt nach Isolaten, bei denen das in der Legende aufgeführte Gen im DNA-Microarray nachgewiesen wurde bzw. fehlte. Gemessen wurde die Adhäsion der *S. aureus*-Stämme mittels Fluoreszenzmessung nach Anfärben der Bakterien mit dem Farbstoff FitC im Assaytyp I. Jedes Isolat wurde in mindestens drei biologischen Wiederholungen mit je drei technischen Wiederholungen getestet. Die Adhäsion der Isolate wurde nachfolgend auf die Adhäsion des Kontrollstammes Cowan-1 normalisiert. In der Scattered Dotplot-Darstellung repräsentieren die einzelnen Punkte jeweils den Mittelwert eines Isolates. Der Strich repräsentiert den Mittelwert der Adhäsionswerte der gesamten Isolatgruppe. Gelbe, pinke, hellblaue und orangene Symbole repräsentieren das Vorhandensein eines Gens (*lukF-PV*, *fnbB*, *cna*, *sasG*); goldene, lilafarbene, dunkelblaue und hellorangene Symbole dagegen deren Fehlen.

5 Diskussion

S. aureus stellt im Gesundheitssystem alle Beteiligten vor zunehmend größer werdende Herausforderungen. Während für Krankenhaus-assoziierte *S. aureus*-Infektionen auf eine umfangreiche Datenlage zurückgegriffen werden kann, ist das phänotypische Verhalten Gesellschafts-assoziiierter Stämme (CA-SA) bis dato wenig erforscht. Die vergleichende Untersuchung der nasalen und klinischen Isolate ist wichtig, um beurteilen zu können, ob bestimmte Eigenschaften eines Stammes diesen bevorzugt dazu befähigen, invasive Infektionen hervorzurufen. Bislang wurde keine Studie publiziert, die das phänotypische Verhalten bzgl. Zytotoxizität und Adhäsion an Zellkulturen, in diesem Fall nativen, humanen Keratinozyten (HaCaTs), vergleichend untersucht hat. Bisherige Adhäsionsversuche wurden entweder mit einzelnen Wirtsfaktoren durchgeführt oder es gab keine vergleichende Wertung nasaler und invasiver Isolate. Eine vergleichende Testung an humanen Zelllinien ist für eine realitätsnahe Beurteilung des Virulenzpotentials von CA-SA jedoch notwendig.

5.1 Zytotoxizität

5.1.1 Einordnung der Zytotoxizitätswerte nach klonalem Komplex

Es ist bekannt, dass von *S. aureus* sekretierte Proteine, insbesondere Hämolyse und Leukozidine, einen großen Einfluss auf die Zytotoxizitätsrate der jeweiligen *S. aureus* Isolate haben (Lowy, 1998; Merghni, 2015). Um später einen Rückschluss ziehen zu können, welche genetischen Faktoren möglicherweise zur zytotoxischen Wirkung beitragen, wurden die in unsere Erhebung eingeschlossenen Isolate im Vorfeld mittels DNA-Microarray genotypisiert (Ruffing et al., 2017). Die in Abb. 1 dargestellte relative Zytotoxizität der im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten Isolate zeigt, dass sich die Vertreter einzelner klonaler Komplexe (CCs) in ihrer Fähigkeit, humane Keratinozyten zu schädigen, zum Teil signifikant voneinander unterscheiden. So wiesen Isolate des CC30 mit $34 \pm 33\%$ bzw. CC5 mit $42 \pm 15\%$ relativer Zytotoxizität vergleichsweise geringe Zytotoxizitätswerte auf. Dies korreliert mit den Daten von Oosthuysen et al. (Oosthuysen, 2014), die für CC5 und CC30-Isolate ebenfalls geringe zytotoxische Potentiale bei südafrikanischen Isolaten nachwiesen. Dies lässt vermuten, dass sich Stämme des gleichen klonalen Komplexes in Bezug auf ihr zytotoxisches Verhalten, ungeachtet ihrer geographischen Herkunft, ähneln. Letztere Hypothese wird durch die im Rahmen dieser Dissertation erhobenen Daten jedoch nur zum Teil gestützt. So konnte

zwar für Isolate des CC5 im Rahmen dieser Arbeit keine klaren Unterschiede in der relativen Zytotoxizität zwischen den Isolaten afrikanischer und deutscher Herkunft beobachtet werden (Abb. 2). Für CC30-Isolate hingegen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Zytotoxizität in Hinblick auf die Herkunft der Isolate. So zeigten die afrikanischen Isolate, unabhängig davon, ob sie aus einem Infektionsgeschehen heraus oder aus den Nasenvorhöfen der Probanden isoliert wurden, eine signifikant höhere relative Zytotoxizität als ihre genotypisch verwandten Isolate aus Deutschland (Abb. 8). Dieser Unterschied in der Zytotoxizität innerhalb des CC30 ist sehr wahrscheinlich auf das Vorhandensein der für das Panton-Valentin-Leukozidin (PVL) codierenden Gene *lukF/S-PV* zurückzuführen, welche in den afrikanischen Isolaten dieses CCs, nicht aber in den entsprechenden deutschen Isolaten vorhanden sind (Abb. 9). Die genomische Heterogenität der CC30-Isolate ist insofern nicht überraschend, da diesem CC 17 Sequenztypen zugerechnet werden (Feil, 2003). McGavin et al. beschrieben eine Unterteilung des CC30 mittels Untersuchung von Einzelnukleotid-Polymorphismen in 3 Kladen, die sich im Laufe der phylogenetischen Entwicklung aufgeteilt hätten. Diese umfassen jeweils mehrere unterschiedliche STs und weisen meist unterschiedliche SCCmec-Typen auf. Stämme der Klade 2 werden dabei vollständig, solche der Klade 3 teilweise dem Gesellschafts-assoziierten Spektrum zugeordnet (McGavin, 2012). Da Isolate beider CCs trotz ihrer geringen Zytotoxizitätswerte erfolgreich eine invasive Infektion hervorbrachten, scheint die Zytotoxizität nicht der maßgebliche Faktor für eine erfolgreiche Infektion des menschlichen Organismus durch *S. aureus* zu sein.

Die Ergebnisse unserer Zytotoxizitätsuntersuchung deuten darauf hin, dass nasale und klinische Isolate des gleichen klonalen Komplexes in der Regel ein ähnliches zytotoxisches Potential aufweisen. Gleichzeitig lässt sich daraus folgern, dass die Gefahr von Infektionen bei beiden, nasalen bzw. klinischen, Isolattypen in gleichem Ausmaß gegeben ist und somit die Lokalisation der *S. aureus*-Population eine untergeordnete Rolle spielt. Des Weiteren deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Zugehörigkeit eines Isolates zu einem klonalen Komplex eine größere Rolle spielt als bislang angenommen. Es konnte in der jüngeren Vergangenheit schon mehrfach gezeigt werden, dass sich Infektionen mit unterschiedlichen CCs in unterschiedlichen Krankheitsentitäten äußern können (Melles, 2006; Stach, 2014). So verursacht z.B. CC5 in einer Vielzahl von Fällen oberflächliche Hautläsionen, wohingegen CC8 häufig für chronische Ulzera verantwortlich ist (Jappe 2008; Messad, 2012). Die unterschiedlichen Zytotoxizitätswerte der CCs, die im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurden, weisen darauf hin, dass die Höhe des zytotoxischen Potentials für die Ausbildung einer *S. aureus*-Krankheitsentität eine Rolle spielen könnte. Für zukünftige Studien wäre es

daher von Interesse, an einer größeren Stichprobenmenge die Höhe des zytotoxischen Potentials mit der Krankheitsentität der jeweiligen *S. aureus*-Isolate abzugleichen. Bislang spielt dieses Kriterium in der klinischen Praxis eine untergeordnete Rolle. Zukünftig ist ein differenzierterer Behandlungsansatz, abhängig vom Genotyp eines Patienten-Isolates, sowohl in Bezug auf die Eradikation nasaler Trägerschaft als auch der Behandlung von klinischen Erscheinungsformen einer *S. aureus*-Infektion denkbar.

Die Stämme des CC121 wiesen in der hier vorliegenden Untersuchung mit $79 \pm 25\%$ lysierter Zellen die zweithöchste Zytotoxizität aller hier getesteten klonalen Komplexe auf. Anders als bei CC30 beobachtet, lassen sich die relativen Zytotoxizitätsunterschiede zwischen den einzelnen CC121 Isolaten nicht auf das Vorhandensein bzw. Fehlen von *lukFS*-PV zurückführen. Zwar zeigten die PVL-positiven Isolate dieses CC mehrheitlich hohe Zytotoxizitätsraten ($>70\%$). Eine ähnlich hohe Zytotoxizitätsrate konnte jedoch auch bei einem PVL-negativen Isolat, FR-N057, beobachtet werden ($28 \pm 7\%$), während das PVL-positive Isolat MW-O075 mit $12 \pm 4\%$ eine vergleichsweise niedrige Zytotoxizitätsrate zeigte (Abb. 28). Ein PVL-positives CC121-Isolat mit einer vergleichsweise niedrigen Zytotoxizitätsrate wurde ebenfalls in der Studie von Oosthuysen et al. (Oosthuysen, 2014) beobachtet, die für diesen CC lediglich eine geringe Zytotoxizitätsrate ermittelten. Dieser Rückschluss ist jedoch mit einer gewissen Vorsicht zu betrachten, da Oosthuysen et al. (Oosthuysen, 2014) im Rahmen dieser Studie nur ein CC121-Isolat analysierten.

Für CC121 sind in der Literatur sechs phylogenetisch und genotypisch unterscheidbare Subgruppen beschrieben (Kurt, 2013). Die Differenzierung dieser Untergruppen ist durch den Vergleich sogenannter Housekeeping-Gene möglich. Isolate derselben Subgruppe wurden in der Regel in geographischer Nähe zueinander aufgefunden (Kurt, 2013). Dies deutet darauf hin, dass geographische und genetische Verwandtschaft miteinander einhergehen, wobei diese Korrelation bei den verschiedenen CCs unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Dies könnte auch Einfluss auf das zytotoxische bzw. adhäsive Potential haben, wodurch Isolate aus gleichen geographischen Regionen ähnliche phänotypische Eigenschaften aufweisen können. Insbesondere eine mögliche niedrigere Rate an PVL-kodierenden Genen (*lukF*-PV, *lukS*-PV) könnte für die von Oosthuysen et al. (Oosthuysen, 2014) beschriebene niedrigere Zytotoxizität von CC121 eine Rolle spielen. Das von Oosthuysen et al. (Oosthuysen, 2014) verwendete CC121-Isolat zeigte sich in der genotypischen Testung als PVL-Gen-positiv. Die genotypischen Daten des DNA-Microarray wiederum zeigten, dass 70% der im Rahmen dieser Doktorarbeit betrachteten CC121-Isolate die Gene *lukF*-PV und *lukS*-PV aufweisen. In

der statistischen Testung mittels T-Test zeigen sich keine signifikanten Unterschiede ($p=0,360$) der Isolatgruppen in Bezug auf das Fehlen oder Vorhandensein der PVL-kodierenden Gene. In der Zusammenschau unserer Daten sowie der von Oosthuysen et al. ergibt sich kein Hinweis darauf, dass *lukFS*-PV eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung des zytotoxischen Potentials spielt. Gleichzeitig zeigten sich alle untersuchten CC121 Isolate positiv für die Hämolyisin A und Hämolyisin B-kodierenden Gene *hla* und *hly*. Nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Expression von PVL für die Zytotoxizität von CC121 eine bedeutende Rolle spielen könnte. Für zukünftige Studien wäre eine Untersuchung von Stämmen mit paritätischer Verteilung von *lukFS*-PV positiven bzw. -negativen Stämmen von großem Interesse, um einen Kausalzusammenhang mit dem phänotypischen Zytotoxizitätsverhalten zu überprüfen.

Von besonderem Interesse in Bezug auf die genetische Ausstattung mit Toxingenen waren die Isolate des CC30. Die PVL-Gen-positiven Isolate IT-N012, IT-O056, LG-N037 und LG-O030 stellten zugleich die vier am stärksten zytotoxischen CC30-Isolate dar. Die *lukFS*-PV positiven *S. aureus*-Isolate des CC30 wiesen eine signifikant ($p=0,029$) höhere Zytotoxizitätsrate auf als die PVL-Gen-negativen Vertreter des CC30 (vgl. Abb. 5b). Dies stellt einen deutlichen Hinweis darauf dar, dass das Vorhandensein der PVL-kodierenden Gene *lukF*-PV und *lukS*-PV, welche stets in Paarung auftreten, die Zytotoxizität dieses CCs verstärken.

Diese These wurde bereits im Vorfeld von Chen et al. (Chen, 2013) für Methicillin-resistente Stämme des ST59 aus Taiwan postuliert. Die Arbeitsgruppe um Chen et al. untersuchte 6 PVL-Gen negative sowie 8 PVL-Gen positive Isolate auf ihre Zytotoxizität. Die PVL-Gen-positiven Vertreter zeigten in dieser Untersuchung signifikant höhere Zytotoxizitätswerte als ihre PVL-Gen-negativen Verwandten (Chen, 2013). Gleichzeitig gelang es dieser Gruppe, die höhere Zytotoxizität mit der Produktion vom PVL zu korrelieren, was die große Bedeutung dieses Faktors für die Schädigung humaner Wirtszellen verdeutlicht (Chen, 2013). Im Gegensatz zu unserer Untersuchung wurden als Wirtszellen jedoch neutrophile Granulozyten verwendet, die in einer Übernachtkultur mit den sterilfiltrierten Überständen inkubiert wurden (Chen, 2013). Eine ähnlich gelagerte Untersuchung von Löffler et al. (Löffler, 2010) an Methicillin-resistenten Isolaten, mit humanen, neutrophilen Granulozyten als Zielzellen und einer Stunde Inkubation, stützt ebenfalls diese Vermutung und kam zu dem Ergebnis, dass Isolate mit PVL-kodierenden Genen generell stärker zytotoxisch wirken als solche ohne. Die um zwei Stunden verkürzte Inkubationszeit könnte eine Auswirkung auf die gemessene

Zytotoxizitätsrate haben, da der Effekt von Toxinen u.a. von der Wirkungszeit abhängig ist (Lowy, 1998; Yang, 2016). Für künftige Untersuchungen wäre es von Interesse, PVL-Expressionsanalysen mit den untersuchten *S. aureus*-Isolaten vorzunehmen. Das alleinige Vorhandensein der für PVL codierenden Gene lässt noch keine Aussage darüber zu, ob das entsprechende Protein in diesem Stamm auch gebildet wird. Eine fehlende oder schwache PVL Expression könnte auch eine Erklärung dafür liefern, warum das *lukF*-PV/*lukS*-PV positive CC121-Isolat MW-O075 mit $12 \pm 4\%$ eine vergleichsweise niedrige Zytotoxizität zeigte (siehe Abb. 28). Die hohe Zytotoxizität des *lukF*-PV/*lukS*-PV negativen CC121-Isolats FR-N042 mit $90 \pm 4\%$ weist wiederum darauf hin, dass PVL nicht der einzige ausschlaggebende Faktor für das hohe lytische Potential von CC121 sein kann.

Eine weitere Auffälligkeit im Genprofil des CC30 stellte das Vorhandensein des Gens *tst-I* dar, welches für das toxische Schocksyndrom-Toxin 1 kodiert. Dieses Gen konnte bei den hier untersuchten CC30 Isolaten nur bei FR-N095, HS-N001 und HS-O046 im DNA-Microarray detektiert werden. Alle drei Isolate wiesen im Vergleich zu den *tst-I* negativen Isolaten dieses CCs eine deutlich reduzierte relative Zytotoxizität auf ($p=0,0151$; T-Test). Dieser Befund lässt darauf schließen, dass zumindest in CC30 Isolaten *tst-I* einen negativen Einfluss auf das zytotoxische Potential von *S. aureus* ausübt. Dies steht in einem gewissen Widerspruch zu den Beobachtungen von Lee *et al* (Lee, 1991), die einen direkten zytotoxischen Effekt von TSST-1 auf Endothelzellen beobachteten. Es ist bisher jedoch nicht untersucht, ob ein solcher Effekt dieses primär als Superantigen wirkenden Toxins auch auf Epithelzellen gegeben ist. Da alle drei *tst-I* positiven Isolate jedoch zugleich auch *lukF*-PV/*lukS*-PV negativ waren, kann gemutmaßt werden, dass vor allem das Fehlen von PVL maßgeblich zu den vergleichsweise niedrigen Zytotoxizitätsraten der hier untersuchten *tst-I* positiven CC30 Isolate beigetragen hat. Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass in diesen Isolaten unter den verwendeten Wachstumsbedingungen kein TSST-1 gebildet wurde, da die Expression von TSST-1 in *S. aureus* sehr stark durch äußere Faktoren beeinflusst wird. So ist bekannt, dass die Anwesenheit von Glukose im Anzuchtmedium wie auch das Vorhandensein niedriger Sauerstoffkonzentrationen bei der Kultivierung von *S. aureus* zu einer Reprimierung der *tst-I* Transkription führen (Schlievert, 1983; Yarwood, 2000).

Dass *tst-I* einen positiven Einfluss auf die Zytotoxizität von *S. aureus* auch auf Keratinozyten ausüben könnte, legen die phänotypischen Beobachtungen der Isolate des CC45 nahe. Das in dieser Arbeit untersuchte CC45 Isolatsset enthielt mit MM-N001, MW-N100 und MW-O049

drei *tst-1* positive Isolate. Beim Vergleich der relativen Zytotoxizitätsraten dieser Isolate mit den *tst-1* negativen Vertretern des CC45 (n=5) zeigte sich eine signifikant erhöhte Zytotoxizität der *tst-1* positiven Isolate ($p=0,027$; T-Test). Aufgrund der geringen Fallzahlen *tst-1* positiver *S. aureus*-Isolate in dieser Untersuchung ist ein Kausalzusammenhang zwischen dem Vorhandensein von *tst-1* und der Höhe der relativen Zytotoxizität jedoch mit Vorsicht zu bewerten. Des Weiteren wäre eine Expressionsanalyse für die *tst-1* positiven Isolate der CCs 30 und 45 von Interesse, ggf. unter Hinzuziehung weiterer *tst-1* positiver Isolate dieser klonalen Komplexe. Hiermit könnte überprüft werden, ob die Zytotoxizität der Isolate dieses CCs mit der Expression des Proteins TSST-1 korreliert.

In der mit südafrikanischen Isolaten durchgeführten Studie von Oosthuysen *et al* (Oosthuysen, 2014) stufte die Arbeitsgruppe die CCs 8, 15 und 45 als stark zytotoxisch ein. Bei CC 8 gab es insofern eine Übereinstimmung bzgl. des zytotoxischen Potentials mit den Werten dieser Arbeit, CC45 präsentierte sich in unserer Erhebung mit $60 \pm 28\%$ Zytotoxizitätsrate mittelstark zytotoxisch. Hier muss jedoch einschränkend erwähnt werden, dass die in dieser Promotionsarbeit untersuchten CC45-Isolate eine vergleichsweise starke Heterogenität in Hinblick auf die relative Zytotoxizität zeigten, die wie zuvor dargelegt, möglicherweise auf das Vorhandensein bzw. Fehlen von *tst-1* zurückführbar ist. Oosthuysen *et al* (Oosthuysen, 2014) wiederum untersuchten zwar 8 CC8-Isolate, aber nur ein CC45-Isolat in ihrer Studie. Ebenso wurde von Oosthuysen *et al* (Oosthuysen, 2014) nur drei Isolate des CC15 phänotypisch charakterisiert, die allerdings alle eine hohe Zytotoxizität aufwiesen. In der hier vorliegenden Arbeit hingegen zeigten die CC15 Isolate eine mittlere bis niedrige relative Zytotoxizität (Abb. 6). Auch hierfür könnte durch eine phylogenetisch bedingte unterschiedliche Verteilung von Genen, die geographische Herkunft eine wichtige Rolle spielen. Eine höhere Zytotoxizität afrikanischer Isolate des CC15 konnte in unserer Arbeit jedoch nicht festgestellt werden; deren Zytotoxizität unterschied sich nicht wesentlich von der deutscher CC15-Isolate ($p=0,802$; Mann-Whitney-U-Test). Ebenso zeigten die hier untersuchten CC15 Isolate eine sehr homogene Ausstattung an toxischen Virulenzfaktoren (Abb. 7). Als eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Höhe der Zytotoxizitätsraten bei CC15 in dieser Arbeit und der Studie von Oosthuysen *et al* (Oosthuysen, 2014) können Einflüsse assayspezifischer Faktoren nicht generell ausgeschlossen werden. Während Oosthuysen *et al.* (Oosthuysen, 2014) die Zytotoxizität an einer endothelialen Ea-hy926-Zelllinie testeten, wurden in dieser Untersuchung humane Keratinozyten (HaCaT) verwendet. Bei Oosthuysen *et al.* (Oosthuysen, 2014) kam zur Anzucht der humanen Zellen Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) zum Einsatz, während in dieser Arbeit MCDB-

Nährmedium verwendet wurde. DMEM enthält mehr Aminosäuren, als dies bei dem in dieser Arbeit verwendeten MCDB der Fall ist. Da MCDB-Medium mit zusätzlich 1 vol.-% essentieller Aminosäuren versetzt wurde, dürfte der Effekt dieses Unterschiedes auf die gemessenen Zytotoxizitätswerte jedoch gering sein. Gleichzeitig beeinflussen die Umweltbedingungen die Expression zytotoxisch wirksamer Faktoren (Sakoulas, 2012; Yang, 2016). Somit kommen auch unterschiedliche Anzuchtbedingungen als Einflussfaktor in Betracht. Um eine Beeinflussung der Messergebnisse durch die Versuchsbedingungen auszuschließen, könnte neben der Herstellung gleicher Versuchsbedingungen in zukünftigen Experimenten auch eine Expressionsanalyse von Nutzen sein. Des Weiteren kommen genotypische Unterschiede bezüglich der PVL-kodierenden Gene, der Hämolysegene *hla* und *hly* sowie des toxischen Schocksyndrom-Toxin-1 kodierenden Gens *tst-1* als Auslöser der unterschiedlichen Zytotoxizitätswerte in Betracht. Da jedoch von Oostuysen et al. (Oostuysen, 2014) mit Ausnahme des PVL-Status keine genotypischen Daten zu den verwendeten Stämmen angegeben wurden, ist der mögliche Einfluss genotypischer Unterschiede auf die Zytotoxizität hier nicht beurteilbar.

Keines der von uns untersuchten Isolate des CC15 wies die Gene *lukF-PV* und *lukS-PV* auf, des Weiteren war nur eines der hier untersuchten CC15-Isolate *hly*-positiv. Eine der Funktionen des durch *hly* kodierten β -Toxins ist es, die Bilayer-Struktur der Wirtszellmembran für andere Toxine zu sensibilisieren, wodurch die Wirkung beispielsweise des PVL verstärkt wird (Bien, 2011; Kmiecik, 2016). Für zukünftige Untersuchungen wäre es deshalb von Interesse, weitere *hly*-positive Vertreter des CC15, ggf. unter Einbeziehung einer Expressionsanalyse, auf den Einfluss von *hly* auf die Zytotoxizität eines Isolates zu untersuchen.

Ballhausen et al. (Ballhausen, 2014) untersuchten 2014 den stark zytotoxischen klonalen Komplex CC398 und führten dessen hohe Zytotoxizitätswerte auf eine starke Expression der *hla*- bzw. *hly*-Genloci zurück. Das α -Hämolysin ist das potenteste membranschädigende Toxin, das *S. aureus* zu exprimieren in der Lage ist (Merghni, 2015). In der Testung mittels DNA-Microarray wiesen alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Isolate *hla* auf, sodass eine Aussage über den Zusammenhang zwischen *hla*-Genen und dem Ergebnis der Zytotoxizitätsmessung ohne Expressionsuntersuchung nicht möglich ist. In Bezug auf das Vorhandensein des *hly*-Gens lassen sich zwischen den klonalen Komplexen jedoch Unterschiede feststellen. So weisen 91% bzw. 88% der Isolate von CC8 und CC30 dieses Gen auf. Innerhalb des CC121 waren alle Isolate *hly*-positiv, im Vergleich jedoch nur ein CC152-

Isolat. Gleichzeitig wies CC152 jedoch die höchsten Zytotoxizitätswerte unserer Untersuchung auf. In der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test bzw. T-Test konnte bei keinem klonalen Komplex ein signifikanter Unterschied zwischen *hly*-positiven und *hly*-negativen Isolaten desselben CCs festgestellt werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass bei Einbeziehung einer größeren Zahl insbesondere *hly*-negativer *S. aureus*-Isolate ein Einfluss dieses Genlocus' zu beobachten gewesen wäre.

5.1.2 Einordnung der Zytotoxizitätswerte nasaler und klinischer Isolate

Eine der zentralen Fragestellungen dieser Dissertation war es, zu untersuchen, ob sich klinische, aus dem Infektionsgeschehen heraus isolierte, Gesellschafts-assoziierte *S. aureus* Isolate in ihrem Virulenzpotential maßgeblich von nasalen Isolaten unterscheiden, die in den entsprechenden Trägern keine akute Infektion induzierten. Hierzu wurden aus den jeweiligen Regionen (Gabun, Mosambik, Tansania, Deutschland) nach Möglichkeit jeweils ein nasales sowie ein klinisches Isolat der in der Studie von Ruffing et al. (Ruffing, 2017) als am häufigsten in Afrika bzw. Deutschland vorzufindenden klonalen Komplexe ausgewählt. Bei der vergleichenden Analyse der Gesellschafts-assoziierten nasalen und invasiven Isolate dieser Isolakohorte zeigten sich jedoch bei keinem der hier untersuchten klonalen Komplexe ein signifikanter Unterschied in den Zytotoxizitätsraten nasaler bzw. klinischer Stämme.

Auch eine Untersuchung von Ayepola et al. (Ayepola, 2015) befasste sich mit der unterschiedlichen Verteilung von Virulenzfaktoren zwischen nasalen und klinischen Isolaten. Eingeschlossen wurden sowohl nasale als auch klinische *S. aureus*-Isolate nigerianischer Herkunft. Die Autoren beobachteten insbesondere in der Gruppe der aus Infektionsgeschehen gewonnenen Isolate eine Dominanz des *spa*-Types „*spa*-CC 084“, der dem CC15 zugeordnet wird. Die vergleichende Testung genetischer Faktoren mittels PCR ergab zudem einen signifikant höheren Anteil PVL-Gen-positiver Vertreter unter den Stämmen invasiven Ursprungs (Ayepola, 2015). Dies korreliert mit den Ergebnissen der hier vorgestellten Arbeit insofern, als dass auch hier bei den klinischen Isolaten zu einem höheren Anteil PVL-kodierende Gene nachgewiesen werden konnten. So waren 41% der für *lukFS*-PV positiv getesteten Isolate nasaler und 59% klinischer Herkunft. Bemerkenswerterweise wies keines der im Rahmen dieser Arbeit analysierten CC15 Isolate die Gene *lukFS*-PV auf (Abb. 7). Dies ist aber vermutlich der Tatsache geschuldet, dass für diese Studie ein vergleichsweise kleines *n* von 10 CC15-Isolaten Verwendung fand. In der in Ruffing et al (Ruffing, 2017)

veröffentlichten Studie, die die genotypische Charakterisierung der im Rahmen des Verbundprojektes SkinStaph in Afrika und Deutschland gesammelten CA-SA beschreibt und die Quelle für die hier verwendeten Isolate bildet, wurde in der Gruppe der afrikanischen, klinischen Isolate in 187 von 300 Isolaten (62%) *lukFS*-PV detektiert, während in der Gruppe der afrikanischen, nasalen Isolate nur in 85 von 300 Isolaten (28%) *lukFS*-PV vorgefunden wurde. Allerdings wiesen die in dieser Studie beschriebenen CC15 Isolate nur einen vergleichsweise geringen Anteil an *lukFS*-PV auf (25% der afrikanischen Isolate und 2% der deutschen Isolate). Ebenso wurde mit 52/300 und 57/300 ein ähnlich hoher Anteil an CC15 in den afrikanischen Isolaten klinischen bzw. nasalen Ursprungs detektiert. Dies lässt vermuten, dass CC15-Isolate, vermutlich aufgrund des geringeren Anteils an *lukFS*-PV, in diesen Regionen Afrikas weniger stark zum *S. aureus* bedingten Infektionsgeschehen beitragen, als in anderen Regionen Afrikas, wie etwa Nigeria. Darüber hinaus stützt es die Vermutung, dass die Genprodukte PVL-kodierender Gene einen signifikanten Einfluss auf die Infektiösität von *S. aureus* ausüben (Askarian, 2013). Diese Hypothese wird auch dadurch untermauert, dass in den afrikanischen Isolaten der CCs 121 und 152, die bevorzugt aus dem Infektionsgeschehen heraus isoliert wurden, mit 90% und 100% nahezu alle Isolate *lukFS*-PV positiv waren (Ruffing, 2017).

Das für das porenbildenden α -Toxin kodierende Gen *hla* ließ sich mittels DNA-Microarray bei allen Isolaten dieser Studie nachweisen und unterschied sich in seiner Verteilung daher nicht zwischen den beiden Isolatgruppen. Auch *hly*, kodierend für das zytolytische β -Toxin von *S. aureus*, fand sich mit 49% bzw. 51% bei nicht-invasiven und invasiven Isolaten nahezu gleich häufig. In Zusammenschau mit den ähnlichen Zytotoxizitätswerten nasaler und invasiver Isolate widerspricht dies der These, dass *hla* und *hly* eine entscheidende Rolle bei der Zytotoxizität von *S. aureus* zukommt. Neben der Höhe des zytotoxischen Potentials spielen jedoch auch anderen Einflussgrößen, insbesondere die Adhäsion an humane Zellen, eine entscheidende Rolle bei der Entstehung invasiver Erkrankungen.

5.2 Adhäsion

5.2.1 Etablierung des Adhäsionsassays

Bei der Etablierung der Adhäsionsversuchsreihe wurde initial versucht, den *S. carnosus*-Stamm TM-300, der bereits in einer Reihe vorangegangener Adhäsions- und Invasionsstudien als Staphylokokken Isolat mit einer niedrigen Adhäsions-/Invasionsrate beschrieben wurde (Sinha, 2000; Hagger, 2003; Heilmann, 2004; Grundmeier, 2004; Agerer, 2005; Kerdudou, 2006; Oosthuysen, 2014; Linn, 2015), als Kontrollstamm zu etablieren (siehe auch Kapitel 4.2.1). In der Mehrzahl der Fälle wurde hierbei die Adhäsion von TM-300 an einzelne Wirtsfaktoren oder endotheliale Zellen/Gewebe untersucht (Sinha, 2000; Heilmann, 2004; Grundmeier, 2004; Kerdudou, 2006). Es wurde aber auch eine Studie veröffentlicht, bei denen TM-300 eine marginale Adhäsion an humane Keratinozyten aufwies (Lin, 2015). Im Gegensatz zu unserer Versuchsanordnung wurden dabei als Wirtszellen humane Karzinomzellen des Nasenseptums (RPMI 2650) verwendet und die Adhäsionsrate bestimmt. Im Gegensatz zu den zuvor zitierten Studien erwies sich TM-300 im Rahmen dieser Arbeit jedoch als ein Isolat, das je nach Assayprotokoll eine hohe Adhäsion an HaCaT Zellen aufwies, die sogar höher ausfallen konnte als die Adhäsion des als hoch-adhärenenten *S. aureus*-Kontrollstamm mitgeführten Isolats Cowan-1 (Abb. 16). Daher wurde in den nachfolgend besprochenen Adhäsionsassays der als schwach adhärierend beschriebene Laborstamm 1711 (Ballhausen, 2014) zu Vergleichszwecken mitgeführt, der, im Einklang mit der Literatur, auch im Rahmen dieser Arbeit in allen Adhäsionsassays niedrige und in der Regel vergleichbare Adhäsionsraten aufwies (Abb. 16). Einzig bei der Adhäsionstestung der CC8-Stämme lagen die Werte des Isolats 1711 in Relation zu Cowan-1 mit $25 \pm 2\%$ prozentualer Adhäsion deutlich über den Werten, die mit den anderen CCs ermittelt wurden ($13 \pm 1\%$ bis $18 \pm 1\%$). Dies lässt die Möglichkeit zu, dass bei der Bewertung der Adhäsion der CC8-Isolate die auf den Adhäsionswerten des Isolats Cowan-1 normalisierten Ergebnisse um bis zu einem Faktor 0,6 zu hoch liegen. Auf der anderen Seite besteht auch die Möglichkeit einer im Verhältnis zu starken Adhäsion von 1711 in den CC8-Versuchsreihen. In diesem Fall wären die Werte des CC8 nicht zu korrigieren. Rückblickend ist die Ursache dieser Abweichung nicht sicher zu ergründen. Bei der Adhäsionsbestimmung der anderen CCs zeigte sich die Relation von 1711 zu Cowan-1 als konstant und zuverlässig.

Beim Vergleich der unterschiedlichen Adhäsionsassayvarianten fiel auf, dass die Fixierung der Keratinozyten über Formaldehyd zu einer markanten Abnahme der Adhäsionsfähigkeit von *S. aureus* an diesen Zelltyp führte (Abb. 16). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen,

dass über die Quervernetzung der Proteine der extrazellulären Matrix der Keratinozyten für *S. aureus* wichtige Interaktionspartner, wie Fibronektin, Kollagen und Vitronektin, aber auch in der eukaryonten Zellmembran verankerte Rezeptoren wie ICAM-1 und die $\alpha_2\beta_5$ -Integrine in ihrer Struktur bzw. Zugänglichkeit soweit verändert wurden, dass sie von den entsprechenden bakteriellen Interaktionspartnern nicht mehr effektiv gebunden werden konnten. Zugleich unterstreichen diese Versuche die Bedeutung, Adhäsionsassays nach Möglichkeit mit lebenden, nicht fixierten Zellen durchzuführen. Da die Zentrifugation der Bakterienzellen auf die humanen Wirtszellen, wie in den Assaytypen II und IV durchgeführt, zu einer erhöhten Intraassayvariabilität führte, wurde auf diesen Schritt ebenfalls verzichtet und Assaytyp I als Methode der Wahl für die Testung des afrikanisch/deutschen Isolatsets genutzt. Nichtsdestotrotz ist diese Beobachtung überraschend, da eigentlich erwartet wurde, dass durch die Zentrifugation der Bakterien auf die adhärenen Wirtszellen eine bessere Synchronisation der Bakterienzellenadhäsion an ihre Zielstrukturen hervorgerufen wird, da auf diese Weise möglicherweise vorhandenen Unterschiede in der Sedimentationsrate der zu vergleichenden Bakterienstämme eliminiert werden können. Die Ursache, warum das Zentrifugieren der Bakterien auf die adhärenen Wirtszellen zu einer Zunahme der Variabilität zwischen den Wiederholungen führte, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden

5.2.2 Einordnung der Adhäsionswerte nach klonalem Komplex

Ähnlich wie schon bei der relativen Zytotoxizität beobachtet, so zeigten die hier analysierten CCs auch in Hinblick auf ihre Adhäsionsfähigkeit an Keratinozyten zum Teil signifikante Unterschiede zueinander (Abb. 17). So zeigten die Isolate der CCs 121 und 152, die in den Zytotoxizitätsassays eine sehr hohe Zytotoxizität ($\geq 80\%$) aufwiesen, bei der Adhäsion an HaCaT Zellen den exakt gegenteiligen Effekt. Isolate der CCs 5, 15, 30 und 45, die in den Zytotoxizitätsassays eine mittlere relative Zytotoxizität (33-66%) aufwiesen, zeigten auch bei der Anbindung an die humanen Wirtszellen eine mittlere Adhäsionsfähigkeit. Einzig bei den Isolaten des CC8 wurde sowohl bei der Adhäsion als auch bei der relativen Zytotoxizität im Mittel hohe Adhäsions- und Zytotoxizitätsraten ($\geq 66\%$) beobachtet. Diese Beobachtungen korrelieren mit einer Vielzahl an in vitro Untersuchungen, in denen eine wachstumsphasenabhängige inverse Korrelation zwischen der Produktion von Adhäsinen und Toxinen beobachtet wurden (begutachtet in Cheung, 2004). Des Weiteren spielt die Zusammensetzung an globalen Regulatoren in *S. aureus* eine elementare Rolle bei der Expression von Virulenzfaktoren (Herbert, 2010). So weist das im Rahmen dieser Arbeit als

Positivkontrolle für die Adhäsionsassays verwendete *S. aureus* Isolat Cowan I aufgrund einer *agr* Mutation eine hohe Expression an Adhäsionsfaktoren auf, ist aber nicht dazu in der Lage, die Mehrzahl der *S. aureus* Toxine zu exprimieren, obwohl diese Gene auch im Genom dieses Isolats vorhanden sind (Grundmeier, 2010). Ähnliches gilt für den *S. aureus* Stamm SA113, der ebenfalls eine *agr* Mutation aufweist und eine hohe Biofilmbildung, die unter anderem mit dem Vorhandensein von Adhäsinen korreliert ist, aber nur eine geringe Toxinproduktion zeigt (Lin, 2015). Mutationen in *sarA* wiederum führen in *S. aureus* zu einer erhöhten Proteaseproduktion, die das Vorhandensein von Adhäsionsfaktoren wie Protein A und FnBA/B auf der bakteriellen Zelloberfläche reduziert (Karlsson, 2001), je nach genetischen Hintergrund aber auch dazu führen kann, dass die Menge an Exotoxinen posttranslational reduziert wird (Zielinska, 2012). All diese Beobachtungen unterstreichen, dass neben dem Vorhandensein der Gene für Adhäsionsfaktoren und Exoproteinen auch das Repertoire an globalen Regulatoren, die die Expression dieser Virulenzfaktoren kontrollieren, und deren Aktivität von elementarer Bedeutung sind (Jenkins, 2015).

Bis dato sind nur wenige Studien verfügbar, die die Adhäsionsfähigkeit unterschiedlicher CCs an eukaryote Wirtskomponenten auch phänotypisch charakterisierten (Askarian, 2013; Oosthuysen, 2014; Perez-Montarelo, 2017). So untersuchten Oosthuysen et al. (Oosthuysen, 2014) ein Set von 25 südafrikanischen *S. aureus*-Isolate ebenfalls in Bezug auf ihre Adhäsionsfähigkeit. Im Gegensatz zu der in dieser Doktorarbeit gewählten Versuchsanordnung wurde von Oosthuysen et al. (Oosthuysen, 2014) die Bindung an einzelne Wirtszellfaktoren wie Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen Typ IV und V untersucht. Eine solch differenzierte phänotypische Adhäsionstestung an einzelne Faktoren wurde in unserer Untersuchung nicht durchgeführt, jedoch bildet die Verwendung lebender Zellen, wie in dieser Arbeit und den Studien von Askarian et al. (Askarian, 2013) und Pérez-Montarelo et al. (Pérez-Montarelo, 2017) geschehen, die Realität bakterieller Adhäsion zuverlässiger ab als die Verwendung immobilisierter Einzelfaktoren. Zudem ließ die im Vorfeld durchgeführte Microarray-Untersuchung Rückschlüsse auf die genetische Ausstattung der Isolate mit Adhäsions-assoziierten Genen mit der Einschränkung zu, dass nur die Gene und deren Allele detektiert werden konnten, die der Microarray abbildet.

Bei Oosthuysen et al. (Oosthuysen, 2014) zeigten CC5 und CC8 eine präferierte Bindung an Fibrinogen und Fibronectin, wohingegen die Adhäsion an Kollagen Typ IV bzw. Typ V deutlich schwächer ausgeprägt war. In unseren Microarray-Untersuchungen zeigten sich sämtliche Isolate des CC5 und CC8 positiv für *clfA*, *clfB* sowie *fnbA*. Die beiden Isolate

FR-0004 und HS-B002 des CC8 wiesen jedoch kein *fnbB* auf. Gleichzeitig wiesen sie Adhäsionswerte unter dem Durchschnitt ihres klonalen Komplexes auf. Eine statistische Signifikanz für ein generell niedrigeres Adhäsionspotential *fnbB*-negativer Isolate bei CC8 war aufgrund des kleinen $n=2$ jedoch nicht bestimmbar. Ähnlich wie bei Pérez-Montarelo et al. (Pérez-Montarelo, 2017) für die Adhäsion an Endothelzellen beobachtet, wiesen die klonalen Komplexe CC5 und CC8 insgesamt die dritthöchsten bzw. höchsten Adhäsionswerte eines klonalen Komplexes in dieser Erhebung auf. Dies lässt die Vermutung zu, dass insbesondere die *fnbB*-Genregion an der Adhäsion beteiligt ist, wie auch bereits von Hauck et al. sowie Heilmann et al. gezeigt wurde (Hauck, 2006; Heilmann, 2009). Um einen derartigen Kausalzusammenhang zu überprüfen, bietet sich für zukünftige Studien eine Expressionsanalyse der durch diese Genregionen kodierten Proteine an, um die Übertragung der Geninformation auf die Proteinebene zu untersuchen. Darüber hinaus wäre im nächsten Schritt eine vergleichende Testung der Adhäsion der von uns betrachteten Isolate an einzelne Wirtsfaktoren aufschlussreich, um einen detaillierteren Vergleich zwischen genotypischem und phänotypischem Erscheinungsbild zu überprüfen.

Das *cna*-Gen, welches für das Adhäsionsprotein Kollagen kodiert, konnte bei keinem Isolat des CC5 und nur bei einem Vertreter des CC8 nachgewiesen werden. Ein entscheidender Einfluss von *cna* auf die Gesamtadhäsion an HaCaT Zellen erscheint jedoch aufgrund der hohen Durchschnittswerte des CC5 und CC8 fraglich. Letztere Hypothese wird ebenso von den Beobachtungen von Pérez-Montarelo et al. (Pérez-Montarelo, 2017) unterstützt, die ebenfalls für die Adhäsion der spanischen CC5- und CC8-Isolate nur geringe Kollagen-Bindungsraten, aber hohe Adhäsionsraten an HUVECs beobachteten.

Im Gegensatz zu CC5 und CC8 zeigen CC15 und CC30 bei Oosthuysen et al. (Oosthuysen, 2014) eine verstärkte Bindung an Kollagen Typ IV und V, wohingegen die Bindung an Fibrinogen und Fibronectin deutlich schwächer ausgeprägt war. Ähnlich hohe Adhäsionsraten an Kollagen wurden in der von Pérez-Montarelo et al. (Pérez-Montarelo, 2017) durchgeführten Studie ebenfalls für CC30, nicht aber für CC15 beobachtet. In der genotypischen Analyse der im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Isolate wiesen 88% der CC30-Isolate *cna* auf. Bei CC15 hingegen konnte nur bei MW-N011 dieses Gen detektiert werden. Die Adhäsions-schwächsten klonalen Komplexe CC121 und CC152 waren hingegen in 100% bzw. 83% der Fälle *cna*-positiv. Dies deutet darauf hin, dass sich die Häufigkeit des Auftretens von *cna* in verschiedenen klonalen Komplexen unterscheidet, jedoch keine entscheidende Rolle für das adhäsive Potential an humane Epithel- und Endothelzellen

darstellt. Des Weiteren ist denkbar, dass die entsprechenden Gene vorhanden sind, jedoch nicht exprimiert werden. Damit scheint auch das humanpathogene Potential eines Stammes nicht in relevantem Ausmaß von dem Vorhandensein des *cna*-Gens als Einzelfaktor abhängig zu sein.

fnbA, welches für die Bindung an Fibrinogen bzw. Fibronectin von entscheidender Bedeutung ist, war bei allen Stämmen dieser beiden klonalen Komplexe vorhanden. Shinji et al. beschrieben 2011 die Expression des Gens *fnbA* als unverzichtbar für die Adhäsion von *S. aureus* an Fibroblasten, wobei dessen Expression mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR) überprüft wurde und *fnbA*-negative Mutanten eine nur marginale Adhäsion aufwiesen (Shinji, 2011). Das Vorhandensein dieses Gens bei allen in dieser Arbeit untersuchten Isolaten lässt, in Anbetracht der durchaus variablen Adhäsionsprofile der verschiedenen CCs an HaCaT Zellen (Abb. 17) keine klare Aussage zur Bedeutung von *fnbA* für die Adhäsion an Keratinozyten zu. In einer ebenfalls am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene durchgeführten Studie konnte Philipp Jung an einem Set von CC398-Isolaten zeigen, dass die Adhäsionsfähigkeit dieser Isolate an HaCaT-Zellen mit deren *fnbA*-Transkriptionsaktivität korrelierte (Jung, 2017). Diese Beobachtungen unterstreichen erneut, dass neben der genotypischen Charakterisierung von Isolaten auch deren phänotypisches Verhalten analysiert werden sollte, um ein repräsentatives Bild der Virulenzeigenschaften dieser Isolate zu erhalten. In Hinblick auf die hier erhobenen Daten wäre es von Interesse, in zukünftigen Untersuchungen die *fnbA* Transkripten der jeweiligen Isolate zu ermitteln, um so einen möglichen Einfluss von *fnbA* auf die Adhäsionsfähigkeit der Isolate an Keratinozyten zu untersuchen.

In der Literatur ist auch das Vorhandensein von *fnbB* als ein entscheidender Faktor für die Adhäsion an humane Zellen beschrieben (Lammers, 1999; Shinji, 2011; Xiong, 2015). Dabei begünstigt FnBP-B, das Genprodukt des *fnbB*-Lokus, eine Bindung von *S. aureus* an Fibronectinmoleküle auf der Wirtszelloberfläche, wobei eine solche Bindung nur bei gleichzeitigem Vorhandensein von FnBP-A zustande kommt. *S. aureus*-Laborstämme, denen die Gene *fnbA* und *fnbB* fehlten, wiesen an Zellen aus bovinem Brustdrüsengewebe nur 15% der Adhäsion von Isolaten mit beiden vorhandenen Genen auf (Lammers, 1999). In unserer Untersuchung unterschied sich der Anteil *fnbB*-positiver Isolate zwischen den klonalen Komplexen. So wiesen bei CC30 nur 63% der Isolate das *fnbB*-Gen auf. Bei CC8 war dies hingegen bei 82% der untersuchten Vertreter der Fall, bei CC5 und CC45 bei jeweils 100%. Gleichzeitig wies CC30 eine durchschnittliche relative Adhäsion von $57 \pm 13\%$ auf und stellte

damit den am zweitstärksten adhärensten klonalen Komplex unserer Erhebung dar. CC8 wies mit einer Rate von $67 \pm 15\%$ Adhäsion den am stärksten adhärensten CC unserer Untersuchung auf, CC5 und CC45 zeigten mit $52 \pm 9\%$ bzw. $44 \pm 11\%$ eine mittlere Adhäsion. Überraschenderweise wiesen jedoch auch alle Isolate der schwach-adhärensten klonalen Komplexe CC121 und CC152 *fnbB* auf. Da zudem die *fnbB*-positiven wie -negativen CC30-Isolate eine ähnliche hohe Adhäsionsrate an HaCaT-Zellen aufwiesen (Abb. 25), liegt der Schluss nahe, dass *fnbB* eine nur geringe Bedeutung in Bezug auf die Adhäsion an Keratinozyten zukommt. Eine Ursache könnte sein, dass die Bindung an Fibronectin, welche durch *fnbB* vermittelt wird, nicht bei allen klonalen Komplexen gleich stark ausgeprägt ist. So wiesen Xiong et al. 2015 mittels Atomic Force Microscopy an einer Kohorte von Bakteriämie-Isolaten nach, dass die Adhäsion an immobilisiertes Fibronectin bei FnBP-B-exprimierenden Stämmen des CC5 deutlich ausgeprägter ist als bei entsprechenden Stämmen des CC45 (Xiong, 2015). Zurückgeführt wird dieser Effekt auf Mutationen in den "Fibronectin-binding repeats" (FnBRs) des *fnbB*-Gens, welche Xiong et al. bei den Isolaten des CC45 mittels PCR detektierten (Xiong, 2015). Der im Vorfeld unserer Untersuchung durchgeführte DNA-Microarray zur Bestimmung der Genausstattung unserer Isolate erfasste zwar das Vorhandensein von *fnbB*, mögliche Mutationen in den FnBRs wurden durch dieses Verfahren nicht erfasst. Daher wäre es von Interesse, die Verteilung der FnBRs dieser Isolatkohorte in Bezug auf den klonalen Komplex zu untersuchen. Ein weiterer Punkt, der bei Xiong et al. die Adhäsionsfähigkeit beeinflusste, war die Expression von *fnbB*, welche nach 6 Stunden Inkubationszeit bei Isolaten des CC45 signifikant höher ausfiel als bei CC5-Stämmen (Xiong, 2015). Dies deutet darauf hin, dass nicht bei jedem Stamm in demselben Maß die Umsetzung der Geninformationen auf Proteinebene stattfindet. Deshalb sollte als Folgeuntersuchung eine *fnbB* qRT-PCR durchgeführt werden, um die Rolle und die Höhe der Transkription von *fnbB* zu untersuchen.

Der Einfluss PVL-kodierende Gene auf die Adhäsion von *S. aureus* an Wirtsfaktoren bzw. -zellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So beobachteten Bentzmann et al. (Bentzmann, 2004), dass PVL-positive *S. aureus* Pneumonie-Isolate eine signifikant höhere Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin, Kollagen und Laminin aufwiesen als ein Vergleichsset PVL-negativer *S. aureus* Pneumonie-Isolate. Die unterschiedliche Anbindung der PVL-positiven *S. aureus* Pneumonie-Isolate an die ECM-Komponenten konnte zum Teil mit dem Vorhandensein von *cna* korreliert werden. Ebenso zeigten die PVL-positiven *S. aureus* Pneumonie-Isolate im Vergleich zu ihren PVL-negativen Vergleichsstämmen eine signifikant erhöhte Anbindung an vorgeschädigtes epitheliales

Gewebe (Bentzmann, 2004). Allerdings wurden die von Bentzmann et al. (Bentzmann, 2004) untersuchten Isolate genotypisch nicht näher charakterisiert, so dass für diese Studie keine Informationen zu der CC-Zugehörigkeit der Stämme vorliegen. Oosthuysen et al. (Oosthuysen, 2014) wiederum beobachteten in ihrer Studie, dass PVL-negative Isolate eine höhere Adhäsionsrate an Fibronectin aufwiesen als PVL-positive Isolate. Die Bedeutung dieser Befunde wird aber dadurch eingeschränkt, dass beide Studien bei dem Vergleich der Adhäsionsfähigkeit PVL-positiver und -negativer Isolate keine Korrelation zu den CCs herstellten. Chen et al. (Chen, 2013) beobachteten zudem keinen signifikanten Unterschied in der Adhäsionsfähigkeit PVL-positiver und -negativer Isolate des im asiatischen Raum endemischen CC59. In Einklang mit letzterem Befund zeigte sich auch im Rahmen dieser Arbeit für die CCs 30 und 121, in denen sowohl PVL-positive wie -negative Isolate in einem vergleichsweise ausbalancierten Verhältnis vorlagen, kein klarer Unterschied im Adhäsionsverhalten beider Gruppen an HaCaT Zellen (Abb. 25 und 29). Dies unterstützt die von Bentzmann et al. (Bentzmann, 2004) aufgestellte Hypothese, dass die verstärkte Adhäsion PVL-positiver Pneumonie-Isolate an vorgeschädigtes Epithel vermutlich auf ein nicht näher identifiziertes Exoprotein in diesen Isolaten und nicht auf PVL zurückzuführen ist. Zugleich dokumentiert es das Risiko, vermeintliche Zusammenhänge zu identifizieren, wenn phänotypische Eigenschaften unterschiedlicher CCs miteinander verglichen werden (wie bei Oosthuysen, 2014 geschehen). So hätte die isolierte Betrachtung der Adhäsionsergebnisse des hoch-adhäsiven CC8 (1/11 Isolate PVL-positiv) und des wenig-adhärenenten CC152 (4/5 Isolate PVL-positiv) durchaus zu dem Schluss führen können, dass PVL einen negativen Einfluss auf die Adhäsion von *S. aureus* an Epithelzellen ausübt.

5.2.3 Einordnung der Adhäsionswerte nasaler und klinischer Isolate

Ebenso wie zuvor für die Beurteilung der relativen Zytotoxizitätsraten dargelegt, war es ein zentrales Ziel dieser Dissertation zu untersuchen, ob sich aus dem Infektionsgeschehen heraus isolierte *S. aureus* Stämme von nasalen Isolaten in Hinblick auf ihr Adhäsionsverhalten hin unterscheiden. Bezüglich der Adhäsion wiesen klinische Isolate desselben CCs in unserer Erhebung mehrheitlich ähnliche Werte auf als nasale Stämme des gleichen klonalen Komplexes. Auch im Vergleich aller Isolate dieser Untersuchung, unabhängig von der Zugehörigkeit zu einem CC, lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der nasalen und der klinischen Isolatkohorte feststellen ($p=0,611$). Mit Ausnahme des CC15 ($p=0,026$) ist in Bezug auf diese Unterschiede keine statistische Signifikanz ($p\leq 0,05$) gegeben, sodass bei

den übrigen CCs nicht von einem Unterschied in Bezug auf die Adhäsion gesprochen werden kann. Dies deutet darauf hin, dass das adhäsive Potential eines Isolates allein kein ausschlaggebendes Kriterium für die Kolonisationsfähigkeit und/oder Pathogenität eines Stammes darstellt und dass das Adhäsionsverhalten nasaler und klinische Isolate ähnlicher ist, als bislang vermutet (Elgalai, 2003). Eine molekulare Grundlage dafür, warum klinische Isolate des CC15 signifikant höhere Adhäsionsraten aufwiesen als ihre nasalen Vertreter, konnte im Rahmen dieser Arbeit leider nicht identifiziert werden.

Eine Erhebung von Elgalai et al. untersuchte die Adhäsionsfähigkeit von 149 *S. aureus*-Isolaten an die Wirtsfaktoren Fibrinogen, Fibronectin, Laminin und Kollagen (Elgalai, 2003). Auch in dieser Untersuchung ließ sich eine Tendenz zu höheren Adhäsionswerten klinischer Isolate im Vergleich zu den ebenfalls getesteten nasalen Isolaten feststellen. Wie schon bei unserer Erhebung waren aber auch hier die beobachteten Unterschiede nicht von statistischer Signifikanz ($p \leq 0,05$). Diese Beobachtung zeigt, dass auch eine differenzierte Betrachtung einzelner Wirtszellfaktoren keine signifikanten Unterschiede im Adhäsionsverhalten nasaler oder klinischer Isolate ergibt. Die Verwendung humaner Keratinozyten bildet die bakteriellen Adhäsionsbedingungen dabei jedoch realitätsnäher ab. Zusammenfassend sprechen die ähnlichen Adhäsionswerte nasaler und klinischer Stämme eines CCs dafür, dass eine hohe Adhäsionsrate allein keine Voraussetzung dafür ist, dass ein Stamm erfolgreicher als andere Stämme das *Vestibulum nasi* besiedelt oder invasive Erkrankungen hervorrufen kann. Bislang konnte auch kein einzelner, anderer Faktor aufgefunden werden, der einen bestimmten Stamm dazu befähigt, invasive Infektionen auszulösen. Insofern scheinen vielmehr zahlreiche Faktoren, sowohl auf Seiten des Bakteriums als auch des Wirtes, für die Besiedelung von Wunden mit ursprünglich nasalen *S. aureus*-Stämmen von Bedeutung zu sein (Lowy, 1998; Heilmann, 2009; Askarian, 2013). Diskutiert werden insbesondere die Fibronectin-bindenden Protein A bzw. B sowie das extrazelluläre Adhäsionsprotein Eap (Hauck, 2006; Heilmann, 2009; Harraghy 2003). Diese werden bei unterschiedlichen *S. aureus*-Stämmen in unterschiedlicher Häufigkeit exprimiert, auch besitzen unterschiedliche Wirtszelltypen die zugehörigen Rezeptorproteine in unterschiedlicher Anzahl (Hauck, 2006; Heilmann, 2009). Dies führt möglicherweise dazu, dass die individuellen Voraussetzungen des Bakteriums, aber auch des betroffenen Patienten die Adhäsion in stärkerem Maß beeinflusst, als in einem reinen *in vitro*-Modell abzubilden ist.

5.2.4 Einordnung der Adhäsionswerte nach geographischer Herkunft

Vergleicht man die relative Adhäsionsrate von Isolaten afrikanischer und deutscher Herkunft, so fällt ebenfalls eine starke Übereinstimmung der Werte innerhalb der einzelnen CCs auf. Bei keinem der von uns untersuchten klonalen Komplexe zeigte sich im Mann-Whitney-U-Test ein signifikant unterschiedliches Adhäsionsverhalten der afrikanischen bzw. deutschen Isolatkohorte.

Bislang existieren nur wenige Studien, die einen Vergleich zwischen Gesellschaft-assoziierten *S. aureus*-Isolaten aus Industrie- und Entwicklungsländern ziehen (Ballhausen; 2014; Ruffing, 2017). In den wenigen vorhandenen Studien zeigen sich jedoch starke Unterschiede in der Verteilung der klonalen Komplexe zwischen afrikanischen und europäischen Ländern (Ruffing, 2017). Während die klonalen Komplexe 8 und 15 in Europa signifikant häufiger anzutreffen sind, finden sich CC121 und CC152 verstärkt in Afrika wieder (Shittu, 2012; Ruffing, 2017). In unserer Arbeit konnten stark variierende Adhäsionswerte zwischen den verschiedenen CCs nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 5.2.1). Die unterschiedliche Vorkommenshäufigkeit der CCs in den unterschiedlichen geographischen Regionen wurde in unserer Untersuchung nicht berücksichtigt. Vielmehr wurden zum Zwecke der Vergleichbarkeit der Isolatgruppen innerhalb eines CCs etwa gleich viele afrikanische und deutsche Isolate herangezogen. Daher ist denkbar, dass sich nach Bereinigung der Auftretenswahrscheinlichkeit verschiedener CCs die Adhäsionswerte von *S. aureus* in afrikanischen und deutschen Gebieten durchaus voneinander unterscheiden könnten.

Egyir et al. (Egyir, 2014a) wiesen in ihrer multizentrischen Analyse ghanaischer *S. aureus*-Isolate nach, dass Isolate aus ländlichen und städtischen Gebieten in ihrem Genrepertoire signifikante Unterschiede aufweisen, insbesondere was das Vorkommen PVL-kodierender Gene betrifft. Die in unserer Studie untersuchten Isolate wurden ausschließlich in städtischen Regionen gesammelt. Dies trifft sowohl auf die afrikanische wie die deutsche Isolatkohorte zu. Aus diesem Grund ist es denkbar, dass der Einschluss von Stämmen aus ruralen Regionen veränderte Adhäsionseigenschaften zur Folge hätte.

5.3 Fazit der Diskussion

Zusammenfassend liefert diese Arbeit neue Erkenntnisse über die Interaktion von Gesellschafts-assoziierten *S. aureus*-Isolaten mit humanen Keratinozyten und ihre Zytotoxizität. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da für Gesellschafts-assoziierte Isolate und für den Vergleich nasalere und klinischer Stämme miteinander bisher nur wenige Daten phänotypischer Analysen vorliegen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig aufgezeigt werden, dass in Bezug auf die Zytotoxizität und Adhäsion an Keratinozyten kein signifikanter Unterschied zwischen nasalere und klinischen CA-SA Isolaten vorliegt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass dies insbesondere für CC152, CC45 und CC30 durch die geringe Anzahl an untersuchten Isolaten hervorgerufen wurde. Daher wäre eine Ausweitung der Studie unter Hinzunahme weiterer Isolate dieser CCs wünschenswert.

Die Korrelation phänotypischer Eigenschaften der Isolate mit den jeweiligen, per DNA-Microarray identifizierten, Repertoires an Virulenzgenen erbrachte ebenfalls in der Mehrzahl der Fälle keinen Aufschluss darüber, warum eine bestimmte Isolatgruppe ein signifikant verändertes Adhäsions- oder Zytotoxizitätsverhalten zeigt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass kein einzelner der im DNA-Microarray nachweisbaren genetischen Faktoren über die verschiedenen CCs hinweg über die Zytotoxizität und/oder Adhäsionsfähigkeit eines *S. aureus*-Stammes entscheidet. Vielmehr scheint eine Vielzahl solcher Faktoren für die Invasivität von entscheidender Bedeutung zu sein, wobei hierfür insbesondere die Genprodukte von *lukF-PV* sowie *lukS-PV* in Betracht kommen. Für zukünftige Erhebungen wäre es von Interesse, die einzelnen Oberflächenmoleküle humaner Zellen stärker auf ihre Auswirkung auf das phänotypische Verhalten hin zu untersuchen. Auffällig ist, dass CC8 als einziger klonaler Komplex sowohl eine hohe Zytotoxizität als auch eine hohe Adhäsion aufweist. Kein klonaler Komplex weist hingegen sowohl eine niedrige Zytotoxizität wie auch eine niedrige Adhäsion auf. Dies deutet darauf hin, dass eine Kombination aus Zytotoxizität und Adhäsion eine Rolle für die Fähigkeit eines *S. aureus*-Isolates, die menschliche Nasenschleimhaut zu kolonisieren bzw. invasive Erkrankungen auszulösen, spielt. Da sich die Adhäsions- bzw. Zytotoxizitätswerte für nasale und klinische Isolate nicht signifikant voneinander unterscheiden, kann gemutmaßt werden, dass die Anforderungen an *S. aureus*, um erfolgreich in beiden Milieus zu persistieren, ähneln.

Interessanterweise zeigt diese Arbeit, wie bereits einige Publikationen über Krankenhaus-assoziierte *S. aureus*-Stämme zuvor, für einzelne CCs eine positive Korrelation zwischen dem Vorhandensein PVL-kodierender Gene und der Zytotoxizitätsrate des jeweiligen klonalen

Komplexes (Löffler, 2010; Chen, 2013). Dies stärkt die Vermutung, dass die Proteine LukF-PV und LukS-PV auf die phänotypische Bakterium-Wirtszell-Interaktion von Gesellschafts-assoziierten *S. aureus*-Stämmen einen entscheidenden Einfluss haben könnten (Askarian, 2013; Chen, 2013; Oosthuysen, 2014). Das Vorhandensein eines bestimmten Genlocus ist jedoch nicht gleichzusetzen mit der Transkription und Translation des hierdurch kodierten Gens. Für zukünftige Studien wird es daher von Bedeutung sein, Expressionsanalysen und Western Blots für die interessierenden Virulenzfaktoren der hier untersuchten Isolate durchzuführen, um mögliche Belege für die hier postulierten Kausalzusammenhänge zu finden.

6 Anhang

Ergebnisse der Untersuchung Zytotoxizitäts-assoziiierter Genloci im DNA-Microarray (Identibac®)

	toxic shock syndrome toxin 1	enterotoxin A	enterotoxin N	haemolysin gamma, component A	Panton Valentine leukocidin F component	leukocidin E component	haemolysin alpha	haemolysin beta	exfoliative toxin serotype A	exfoliative toxin serotype B	exfoliative toxin D
STRAIN / ISOLATE	tst1 (consensus)	sea	seln (consensus)	hlgA	lukF-PV	lukE	hla	hlb_probe 1	etA	etB	etD
CC5											
IT-N095	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
LG-N017	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
MM-N056	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
FR-N052	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
HS-N040	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0
IT-O009	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
LG-O045	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
MM-O024	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
FR-B017	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
HS-O033	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
MW-O022	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
CC8											
IT-N054	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
MM-N078	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
FR-N079	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0

	toxic shock syndrome toxin 1	enterotoxin A	enterotoxin N	haemolysin gamma, component A	Panton Valentine leukocidin F component	leukocidin E component	haemolysin alpha	haemolysin beta	exfoliative toxin serotype A	exfoliative toxin serotype B	exfoliative toxin D
STRAIN / ISOLATE	tst1 (cons- ensus)	sea	seln (cons- ensus)	hlgA	lukF-PV	lukE	hla	hlb_probe 1	etA	etB	etD
HS-N049	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
MW-N026	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
MW-N090	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
IT-O031	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
LG-O017	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
MM-O021	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
FR-O004	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1
HS-B002	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
CC15											
IT-N062	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
LG-N002	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
MM-N014	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
FR-N071	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
MW-N011	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0
LG-O073	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0
MM-O011	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
FR-B044	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
HS-B004	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
MW-O082	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
CC30											
IT-N012	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0

	toxic shock syndrome toxin 1	enterotoxin A	enterotoxin N	haemolysin gamma, component A	Panton Valentine leukocidin F component	leukocidin E component	haemolysin alpha	haemolysin beta	exfoliative toxin serotype A	exfoliative toxin serotype B	exfoliative toxin D
STRAIN / ISOLATE	tst1 (consensus)	sea	seln (consensus)	hlgA	lukF-PV	lukE	hla	hlb_probe 1	etA	etB	etD
LG-N037	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
FR-N095	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
HS-N001	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
IT-O056	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
LG-O030	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
HS-O046	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
MW-O055	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
CC45											
LG-N018	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
MM-N001	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
MW-N026	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
MW-N100	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
MM-O069	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
HS-O044	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
MW-O049	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
CC121											
IT-N011	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0
LG-N036	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
MM-N067	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
FR-N042	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0

	toxic shock syndrome toxin 1	enterotoxin A	enterotoxin N	haemolysin gamma, component A	Panton Valentine leukocidin F component	leukocidin E component	haemolysin alpha	haemolysin beta	exfoliative toxin serotype A	exfoliative toxin serotype B	exfoliative toxin D
STRAIN / ISOLATE	tst1 (consensus)	sea	seln (consensus)	hlgA	lukF-PV	lukE	hla	hlb_probe 1	etA	etB	etD
IT-O038	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
LG-O048	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
MM-O002	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
FR-O057	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
HS-O032	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
MW-O075	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
CC152											
LG-N040	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
MM-N079	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
IT-O067	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
LG-O007	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
FR-O080	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0

Ergebnisse der Untersuchung Adhäsions-assoziiierter Genloci im DNA-Microarray (Identibac®)

	coagulase	thermostable extracellular nuclease	F component from hypothetical leukocidin from ruminants	bone sialoprotein-binding protein	clumping factor A	clumping factor B	collagen-binding adhesin	fibronectin-binding protein A	fibronectin-binding protein B	Ser-Asp rich fibrinogen-/bone sialoprotein-binding protein C	van Willebrand factor binding protein
STRAIN / ISOLATE	coA	nuc1	lukF-PV (P83)	bbp (total)	clfA (total)	clfB (total)	cna	fnbA (total)	fnbB (total)	sdrC (total)	vwb (total)
CC5											
IT-N095	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
LG-N017	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
MM-N056	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
FR-N052	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
HS-N040	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
IT-O009	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
LG-O045	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
MM-O024	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
FR-B017	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
HS-O033	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
MW-O022	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
CC8											
IT-N054	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
MM-N078	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
FR-N079	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
HS-N049	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1

	coagulase	thermostable extracellular nuclease	F component from hypothetical leukocidin from ruminants	bone sialoprotein-binding protein	clumping factor A	clumping factor B	collagen-binding adhesin	fibronectin-binding protein A	fibronectin-binding protein B	Ser-Asp rich fibrinogen-/bone sialoprotein-binding protein C	van Willebrand factor binding protein
STRAIN / ISOLATE	coA	nuc1	lukF-PV (P83)	bbp (total)	clfA (total)	clfB (total)	cna	fnbA (total)	fnbB (total)	sdrC (total)	vwb (total)
MW-N026	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
MW-N090	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
IT-O031	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
LG-O017	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
MM-O021	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
FR-O004	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1
HS-B002	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1
CC15											
IT-N062	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
LG-N002	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
MM-N014	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
FR-N071	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
MW-N011	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
LG-O073	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
MM-O011	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
FR-B044	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
HS-B004	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
MW-O082	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
CC30											
IT-N012	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1

	coagulase	thermostable extracellular nuclease	F component from hypothetical leukocidin from ruminants	bone sialoprotein-binding protein	clumping factor A	clumping factor B	collagen-binding adhesin	fibronectin-binding protein A	fibronectin-binding protein B	Ser-Asp rich fibrinogen-/bone sialoprotein-binding protein C	van Willebrand factor binding protein
STRAIN / ISOLATE	coA	nuc1	lukF-PV (P83)	bbp (total)	clfA (total)	clfB (total)	cna	fnbA (total)	fnbB (total)	sdrC (total)	vwb (total)
LG-N037	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FR-N095	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
HS-N001	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
IT-O056	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
LG-O030	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
HS-O046	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1
MW-O055	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
CC45											
LG-N018	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
MM-N001	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
MW-N026	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
MW-N100	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
MM-O069	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
HS-O044	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
MW-O049	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
CC121											
IT-N011	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
LG-N036	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
MM-N067	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FR-N042	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1

	coagulase	thermostable extracellular nuclease	F component from hypothetical leukocidin from ruminants	bone sialoprotein-binding protein	clumping factor A	clumping factor B	collagen-binding adhesin	fibronectin-binding protein A	fibronectin-binding protein B	Ser-Asp rich fibrinogen-/bone sialoprotein-binding protein C	van Willebrand factor binding protein
STRAIN / ISOLATE	coA	nuc1	lukF-PV (P83)	bbp (total)	clfA (total)	clfB (total)	cna	fnbA (total)	fnbB (total)	sdrC (total)	vwb (total)
IT-O038	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
LG-O048	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
MM-O002	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FR-O057	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
HS-O032	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
MW-O075	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
CC152											
LG-N040	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
MM-N079	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
IT-O067	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
LG-O007	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
FR-O080	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1

7 Literaturverzeichnis

1. Agerer F, Lux S, Michel A, Rohde M, Ohlsen K et al. (2005) Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalisation. *Journal of cell science* 118 (Pt 10): 2189–2200.
2. Alexander EH, Hudson MC (2001) Factors influencing the internalization of *Staphylococcus aureus* and impacts on the course of infections in humans. *Applied microbiology and biotechnology* 56 (3-4): 361–366.
3. Alva-Murillo N, Lopez-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A (2014) Nonprofessional phagocytic cell receptors involved in *Staphylococcus aureus* internalization. *BioMed research international* 2014: 538546.
4. Alva-Murillo N, Tellez-Perez AD, Medina-Estrada I, Alvarez-Aguilar C, Ochoa-Zarzosa A et al. (2014) Modulation of the inflammatory response of bovine mammary epithelial cells by cholecalciferol (vitamin D) during *Staphylococcus aureus* internalization. *Microbial pathogenesis* 77: 24–30.
5. Askarian F, Sangvik M, Hanssen A-M, Snipen L, Sollid JUE et al. (2014) *Staphylococcus aureus* nasal isolates from healthy individuals cause highly variable host cell responses in vitro: the Tromsø Staph and Skin Study. *Pathogens and disease* 70 (2): 158–166.
6. Athanasopoulos AN, Economopoulou M, Orlova VV, Sobke A, Schneider D et al. (2006) The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. *Blood* 107 (7): 2720–2727.
7. Ayepola OO, Olasupo NA, Egwari LO, Becker K, Schaumburg F (2015) Molecular Characterization and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolates from Clinical Infection and Asymptomatic Carriers in Southwest Nigeria. *PloS one* 10 (9): e0137531.
8. Ballhausen B, Jung P, Kriegeskorte A, Makgotlho PE, Ruffing U et al. (2014) LA-MRSA CC398 differ from classical community acquired-MRSA and hospital acquired-MRSA lineages: functional analysis of infection and colonization processes. *International journal of medical microbiology : IJMM* 304 (7): 777–786.
9. Ballhausen B, Kriegeskorte A, van Alen S, Jung P, Kock R et al. (2016) The pathogenicity and host adaptation of livestock-associated MRSA CC398. *Veterinary microbiology*.
10. Bartels MD, Petersen A, Worning P, Nielsen JB, Larner-Svensson H et al. (2014) Comparing whole-genome sequencing with Sanger sequencing for spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology* 52 (12): 4305–4308.

11. Basic-Hammer N, Vogel V, Basset P, Blanc DS (2010) Impact of recombination on genetic variability within *Staphylococcus aureus* clonal complexes. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 10 (7): 1117–1123.
12. Baur S, Rautenberg M, Faulstich M, Grau T, Severin Y et al. (2014) A nasal epithelial receptor for *Staphylococcus aureus* WTA governs adhesion to epithelial cells and modulates nasal colonization. *PLoS pathogens* 10 (5): e1004089.
13. Bennett JE, Blaser MJ, Dolin R, editors (2015) *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders. 1 p.
14. Bentzmann S de, Tristan A, Etienne J, Brousse N, Vandenesch F et al. (2004) *Staphylococcus aureus* isolates associated with necrotizing pneumonia bind to basement membrane type I and IV collagens and laminin. *The Journal of infectious diseases* 190 (8): 1506–1515.
15. Bien J, Sokolova O, Bozko P (2011) Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *Journal of pathogens* 2011: 601905.
16. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A et al. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology* 106 (3): 761–771.
17. Brauner J, Hallin M, Deplano A, Mendonca R de, Nonhoff C et al. (2013) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones circulating in Belgium from 2005 to 2009: changing epidemiology. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 32 (5): 613–620.
18. Budimir A, Deurenberg RH, Bosnjak Z, Stobberingh EE, Cetkovic H et al. (2010) A variant of the Southern German clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predominant in Croatia. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 16 (8): 1077–1083.
19. Bur S, Preissner KT, Herrmann M, Bischoff M (2013) The *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein promotes bacterial internalization by keratinocytes independent of fibronectin-binding proteins. *The Journal of investigative dermatology* 133 (8): 2004–2012.
20. Chambers HF (2001) The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*. *Emerging infectious diseases* 7 (2): 178–182.
21. Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, Herrmann M (2005) *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thrombosis and haemostasis* 94 (2): 278–285.

22. Chen C-J, Unger C, Hoffmann W, Lindsay JA, Huang Y-C et al. (2013) Characterization and comparison of 2 distinct epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones of ST59 lineage. *PloS one* 8 (9): e63210.
23. Cheung AL, Bayer AS, Zhang G, Gresham H, Xiong Y-Q (2004) Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS immunology and medical microbiology* 40 (1): 1–9.
24. Clarke SR, Andre G, Walsh EJ, Dufrene YF, Foster TJ et al. (2009) Iron-regulated surface determinant protein A mediates adhesion of *Staphylococcus aureus* to human corneocyte envelope proteins. *Infection and immunity* 77 (6): 2408–2416.
25. Cole AM, Tahk S, Oren A, Yoshioka D, Kim YH et al. (2001) Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 8 (6): 1064–1069.
26. COWAN ST, SHAW C, WILLIAMS RE (1954) Type strain for *Staphylococcus aureus* Rosenbach. *Journal of general microbiology* 10 (1): 174–176.
27. Deresinski S (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 40 (4): 562–573.
28. Deurenberg RH, Nieuwenhuis RF, Driessen C, London N, Stassen FR et al. (2005) The prevalence of the *Staphylococcus aureus* *tst* gene among community- and hospital-acquired strains and isolates from Wegener's Granulomatosis patients. *FEMS microbiology letters* 245 (1): 185–189.
29. Deurenberg RH, Rijnders MIA, Sebastian S, Welling MA, Beisser PS et al. (2009) The *Staphylococcus aureus* lineage-specific markers collagen adhesin and toxic shock syndrome toxin 1 distinguish multilocus sequence typing clonal complexes within spa clonal complexes. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 65 (2): 116–122.
30. Deurenberg RH, Stobberingh EE (2008) The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 8 (6): 747–763.
31. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews* 13 (1): 16-34, table of contents.
32. Dohlsten M, Hedlund G, Kalland T (1991) Staphylococcal-enterotoxin-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Immunology today* 12 (5): 147–150.
33. Edwards AM, Massey RC, Clarke SR (2012) Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization. *Molecular oral microbiology* 27 (1): 1–10.
34. Egyir B, Guardabassi L, Esson J, Nielsen SS, Newman MJ et al. (2014a) Insights into nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in an urban and a rural community in Ghana. *PloS one* 9 (4): e96119.

35. Egyir B, Guardabassi L, Sorum M, Nielsen SS, Kolekang A et al. (2014b) Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of clinical *Staphylococcus aureus* from healthcare institutions in Ghana. PloS one 9 (2): e89716.
36. Eisenbeis J, Peisker H, Backes CS, Bur S, Hölter S et al. (2017) The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* acts as a proliferation and migration repressing factor that alters the cell morphology of keratinocytes. International journal of medical microbiology : IJMM 307 (2): 116–125.
37. Elgalai I, Foster HA (2003) Comparison of adhesion of wound isolates of *Staphylococcus aureus* to immobilized proteins. Journal of applied microbiology 94 (3): 413–420.
38. Epstein L, Mu Y, Belflower R, Scott J, Ray S et al. (2016) Risk Factors for Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection After Recent Discharge From an Acute-Care Hospitalization, 2011-2013. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 62 (1): 45–52.
39. Ferens WA, Bohach GA (2000) Persistence of *Staphylococcus aureus* on mucosal membranes: superantigens and internalization by host cells. The Journal of laboratory and clinical medicine 135 (3): 225–230.
40. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Hook M (2014) Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. Nature reviews. Microbiology 12 (1): 49–62.
41. Glaser P, Martins-Simoes P, Villain A, Barbier M, Tristan A et al. (2016) Demography and Intercontinental Spread of the USA300 Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Lineage. mBio 7 (1): e02183-15.
42. Grumann D, Scharf SS, Holtfreter S, Kohler C, Steil L et al. (2008) Immune cell activation by enterotoxin gene cluster (egc)-encoded and non-egc superantigens from *Staphylococcus aureus*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 181 (7): 5054–5061.
43. Grundmeier M, Hussain M, Becker P, Heilmann C, Peters G et al. (2004) Truncation of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* strain Newman leads to deficient adherence and host cell invasion due to loss of the cell wall anchor function. Infection and immunity 72 (12): 7155–7163.
44. Grundmeier M, Tuchscher L, Brück M, Viemann D, Roth J et al. (2010) Staphylococcal strains vary greatly in their ability to induce an inflammatory response in endothelial cells. The Journal of infectious diseases 201 (6): 871–880.
45. Hagar A, Hussain M, Lönnies H, Herrmann M, Norrby-Teglund A et al. (2003) Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. Infection and immunity 71 (5): 2310–2317.

46. Hamed M, Nitsche-Schmitz DP, Ruffing U, Steglich M, Dordel J et al. (2015) Whole genome sequence typing and microarray profiling of nasal and blood stream methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates: Clues to phylogeny and invasiveness. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 36: 475–482.
47. Hamilton SM, Bryant AE, Carroll KC, Lockary V, Ma Y et al. (2007) In vitro production of panton-valentine leukocidin among strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing diverse infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 45 (12): 1550–1558.
48. Harraghy N, Hussain M, Hagggar A, Chavakis T, Sinha B et al. (2003) The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology (Reading, England)* 149 (Pt 10): 2701–2707.
49. Hauck CR, Agerer F, Muenzner P, Schmitter T (2006) Cellular adhesion molecules as targets for bacterial infection. *European journal of cell biology* 85 (3-4): 235–242.
50. Heilmann C, Niemann S, Sinha B, Herrmann M, Kehrel BE et al. (2004) *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein (FnBP)-mediated adherence to platelets, and aggregation of platelets induced by FnBPA but not by FnBPB. *The Journal of infectious diseases* 190 (2): 321–329.
51. Heilmann C (2011) Adhesion mechanisms of staphylococci. *Advances in experimental medicine and biology* 715: 105–123.
52. Herbert S, Ziebandt A-K, Ohlsen K, Schäfer T, Hecker M et al. (2010) Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infection and immunity* 78 (6): 2877–2889.
53. Ho J, Boost M, O'Donoghue M (2015) Prevalence of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* colonising food handlers: does nasal carriage status matter. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 34 (11): 2177–2181.
54. Hoffmann C, Ohlsen K, Hauck CR (2011) Integrin-mediated uptake of fibronectin-binding bacteria. *European journal of cell biology* 90 (11): 891–896.
55. Hu Q, Cheng H, Yuan W, Zeng F, Shang W et al. (2015) Panton-Valentine leukocidin (PVL)-positive health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates are associated with skin and soft tissue infections and colonized mainly by infective PVL-encoding bacteriophages. *Journal of clinical microbiology* 53 (1): 67–72.
56. Huseby M, Shi K, Brown CK, Digre J, Mengistu F et al. (2007) Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* 189 (23): 8719–8726.
57. Hussain M, Eiff C von, Sinha B, Joost I, Herrmann M et al. (2008) eap Gene as novel target for specific identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology* 46 (2): 470–476.

58. Jappe U, Heuck D, Strommenger B, Wendt C, Werner G et al. (2008) *Staphylococcus aureus* in dermatology outpatients with special emphasis on community-associated methicillin-resistant strains. *The Journal of investigative dermatology* 128 (11): 2655–2664.
59. Jenkins A, Diep BA, Mai TT, Vo NH, Warrenner P et al. (2015) Differential expression and roles of *Staphylococcus aureus* virulence determinants during colonization and disease. *mBio* 6 (1): e02272-14.
60. Joost I, Blass D, Burian M, Goerke C, Wolz C et al. (2009) Transcription analysis of the extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* in authentic human infection and in vitro. *The Journal of infectious diseases* 199 (10): 1471–1478.
61. Jung P (2017) Nutztier-assoziiierter Methicillin resistenter *Staphylococcus aureus* des Klonalen Komplexes 398: Faktoren der Wirtsadhäsion und Immunevasion bei Menschen und Nutztieren.
62. Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D (2014) *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *BioMed research international* 2014: 827965.
63. Karlsson A, Saravia-Otten P, Tegmark K, Morfeldt E, Arvidson S (2001) Decreased amounts of cell wall-associated protein A and fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* sarA mutants due to up-regulation of extracellular proteases. *Infection and immunity* 69 (8): 4742–4748.
64. Kerdudou S, Laschke MW, Sinha B, Preissner KT, Menger MD et al. (2006) Fibronectin binding proteins contribute to the adherence of *Staphylococcus aureus* to intact endothelium in vivo. *Thrombosis and haemostasis* 96 (2): 183–189.
65. Kluytmans, J A J W, Wertheim HFL (2005) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. *Infection* 33 (1): 3–8.
66. Kmiecik W, Szewczyk EM, Ciszewski M (2016) Searching for Beta-Haemolysin hlb Gene in *Staphylococcus pseudintermedius* with Species-Specific Primers. *Current microbiology* 73 (1): 148–152.
67. Krut O, Utermohlen O, Schlossherr X, Kronke M (2003) Strain-specific association of cytotoxic activity and virulence of clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Infection and immunity* 71 (5): 2716–2723.
68. Krziwanek K, Luger C, Sammer B, Stumvoll S, Stammler M et al. (2007) PVL-positive MRSA in Austria. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 26 (12): 931–935.
69. Krziwanek K, Metz-Gercek S, Mittermayer H (2011) Trends in the occurrence of MRSA strains in Upper Austria from 2006 to 2009. *Clinical microbiology and infection* : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 17 (6): 920–923.

70. Kurt K, Rasigade J-P, Laurent F, Goering RV, Zemlickova H et al. (2013) Subpopulations of *Staphylococcus aureus* clonal complex 121 are associated with distinct clinical entities. PLoS one 8 (3): e58155.
71. Lamers RP, Stinnett JW, Muthukrishnan G, Parkinson CL, Cole AM (2011) Evolutionary analyses of *Staphylococcus aureus* identify genetic relationships between nasal carriage and clinical isolates. PLoS one 6 (1): e16426.
72. Lammers A, Nuijten PJ, Smith HE (1999) The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. FEMS microbiology letters 180 (1): 103–109.
73. Laupland KB, Church DL, Mucenski M, Sutherland LR, Davies HD (2003) Population-based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections. The Journal of infectious diseases 187 (9): 1452–1459.
74. Lee PK, Vercellotti GM, Deringer JR, Schlievert PM (1991) Effects of staphylococcal toxic shock syndrome toxin 1 on aortic endothelial cells. The Journal of infectious diseases 164 (4): 711–719.
75. Levy P-Y, Ollivier M, Drancourt M, Raoult D, Argenson J-N (2013) Relation between nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and surgical site infection in orthopedic surgery: the role of nasal contamination. A systematic literature review and meta-analysis. Orthopaedics & traumatology, surgery & research : OTSR 99 (6): 645–651.
76. Lin MH, Shu JC, Lin LP, Chong KY, Cheng YW et al. (2015) Elucidating the crucial role of poly N-acetylglucosamine from *Staphylococcus aureus* in cellular adhesion and pathogenesis. PLoS one 10 (4): e0124216.
77. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO et al. (1999) Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 29 (5): 1128–1132.
78. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK et al. (2011) Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children: executive summary. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 52 (3): 285–292.
79. Lindsay JA, Moore CE, Day NP, Peacock SJ, Witney AA et al. (2006) Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of *Staphylococcus aureus* has a unique combination of surface-associated and regulatory genes. Journal of bacteriology 188 (2): 669–676.
80. Loffler B, Hussain M, Grundmeier M, Bruck M, Holzinger D et al. (2010) *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. PLoS pathogens 6 (1): e1000715.

81. Lowy FD (1998) *Staphylococcus aureus* infections. The New England journal of medicine 339 (8): 520–532.
82. Marrack P, Kappler J (1990) The staphylococcal enterotoxins and their relatives. Science (New York, N.Y.) 248 (4959): 1066.
83. Masiuk H, Kopron K, Grumann D, Goerke C, Kolata J et al. (2010) Association of recurrent furunculosis with Panton-Valentine leukocidin and the genetic background of *Staphylococcus aureus*. Journal of clinical microbiology 48 (5): 1527–1535.
84. McAdow M, Missiakas DM, Schneewind O (2012) *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. Journal of innate immunity 4 (2): 141–148.
85. McCarthy AJ, Lindsay JA (2010) Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions. BMC microbiology 10: 173.
86. McGavin MJ, Arsic B, Nickerson NN (2012) Evolutionary blueprint for host- and niche-adaptation in *Staphylococcus aureus* clonal complex CC30. Frontiers in cellular and infection microbiology 2: 48.
87. Melles DC, van Leeuwen WB, Boelens HAM, Peeters JK, Verbrugh HA et al. (2006) Panton-Valentine leukocidin genes in *Staphylococcus aureus*. Emerging infectious diseases 12 (7): 1174–1175.
88. Melter O, Radojevic B (2010) Small colony variants of *Staphylococcus aureus*--review. Folia microbiologica 55 (6): 548–558.
89. Menestrina G, Serra MD, Prevost G (2001) Mode of action of beta-barrel pore-forming toxins of the staphylococcal alpha-hemolysin family. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 39 (11): 1661–1672.
90. Merghni A, Ben Nejma M, Helali I, Hentati H, Bongiovanni A et al. (2015) Assessment of adhesion, invasion and cytotoxicity potential of oral *Staphylococcus aureus* strains. Microbial pathogenesis 86: 1–9.
91. Mertz D, Frei R, Jaussi B, Tietz A, Stebler C et al. (2007) Throat swabs are necessary to reliably detect carriers of *Staphylococcus aureus*. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 45 (4): 475–477.
92. Messad N, Landraud L, Canivet B, Lina G, Richard J-L et al. (2013) Distribution of edin in *Staphylococcus aureus* isolated from diabetic foot ulcers. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 19 (9): 875–880.
93. Miller RR, Walker AS, Godwin H, Fung R, Votintseva A et al. (2014) Dynamics of acquisition and loss of carriage of *Staphylococcus aureus* strains in the community: the effect of clonal complex. The Journal of infection 68 (5): 426–439.

94. Mithoe D, Rijnders MIA, Roede BM, Stobberingh E, Moller AVM (2012) Prevalence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Panton-Valentine leukocidin-positive *S. aureus* in general practice patients with skin and soft tissue infections in the northern and southern regions of The Netherlands. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 31 (3): 349–356.
95. Monecke S, Slickers P, Ellington MJ, Kearns AM, Ehricht R (2007) High diversity of Panton-Valentine leukocidin-positive, methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* and implications for the evolution of community-associated methicillin-resistant *S. aureus*. *Clinical microbiology and infection* : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 13 (12): 1157–1164.
96. Moon BY, Park JY, Hwang SY, Robinson DA, Thomas JC et al. (2015) Phage-mediated horizontal transfer of a *Staphylococcus aureus* virulence-associated genomic island. *Scientific reports* 5: 9784.
97. Muller-Premru M, Strommenger B, Alikadic N, Witte W, Friedrich AW et al. (2005) New strains of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine leukocidin causing an outbreak of severe soft tissue infection in a football team. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 24 (12): 848–850.
98. Nashev D, Toshkova K, Salasia SIO, Hassan AA, Lammler C et al. (2004) Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS microbiology letters* 233 (1): 45–52.
99. Nilsson P, Ripa T (2006) *Staphylococcus aureus* throat colonization is more frequent than colonization in the anterior nares. *Journal of clinical microbiology* 44 (9): 3334–3339.
100. Nienaber JJC, Sharma Kuinkel BK, Clarke-Pearson M, Lamlerthton S, Park L et al. (2011) Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* endocarditis isolates are associated with clonal complex 30 genotype and a distinct repertoire of enterotoxins and adhesins. *The Journal of infectious diseases* 204 (5): 704–713.
101. Nimmo GR (2012) USA300 abroad: global spread of a virulent strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology and infection* : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 18 (8): 725–734.
102. Nouwen J, Boelens H, van Belkum A, Verbrugh H (2004) Human factor in *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Infection and immunity* 72 (11): 6685–6688.
103. Nouwen JL, Fieren, Marien W J A, Snijders S, Verbrugh HA, van Belkum A (2005) Persistent (not intermittent) nasal carriage of *Staphylococcus aureus* is the determinant of CPD-related infections. *Kidney international* 67 (3): 1084–1092.

104. Nowrouzian FL, Ali A, Badiou C, Dauwalder O, Lina G et al. (2015) Impacts of enterotoxin gene cluster-encoded superantigens on local and systemic experimental *Staphylococcus aureus* infections. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 34 (7): 1443–1449.
105. Ogston A (1881) Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases. *British medical journal* 1 (1054): 369.b2-375.
106. Oosthuysen WF, Orth H, Lombard C, Sinha B, Wasserman E (2014) In vitro characterization of representative clinical South African *Staphylococcus aureus* isolates from various clonal lineages. *New microbes and new infections* 2 (4): 115–122.
107. Ozekinci T, Dal T, Yanik K, Ozcan N, Can S et al. (2014) Panton-Valentine leukocidin in community and hospital-acquired *Staphylococcus aureus* strains. *Biotechnology, biotechnological equipment* 28 (6): 1089–1094.
108. Park WB, Kim SH, Kang C-i, Cho JH, Bang JW et al. (2007) In vitro ability of *Staphylococcus aureus* isolates from bacteraemic patients with and without metastatic complications to invade vascular endothelial cells. *Journal of medical microbiology* 56 (Pt 10): 1290–1295.
109. Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L et al. (2002) Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity* 70 (9): 4987–4996.
110. Peacock SJ, Silva I de, Lowy FD (2001) What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology* 9 (12): 605–610.
111. Pérez-Montarelo D, Viedma E, Murcia M, Muñoz-Gallego I, Larrosa N et al. (2017) Pathogenic Characteristics of *Staphylococcus aureus* Endovascular Infection Isolates from Different Clonal Complexes. *Frontiers in microbiology* 8: 917.
112. Perez-Roth E, Alcoba-Florez J, Lopez-Aguilar C, Gutierrez-Gonzalez I, Rivero-Perez B et al. (2010) Familial furunculosis associated with community-acquired leukocidin-positive methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST152. *Journal of clinical microbiology* 48 (1): 329–332.
113. Perl TM, Cullen JJ, Wenzel RP, Zimmerman MB, Pfaller MA et al. (2002) Intranasal mupirocin to prevent postoperative *Staphylococcus aureus* infections. *The New England journal of medicine* 346 (24): 1871–1877.
114. Ribeiro M, Monteiro FJ, Ferraz MP (2012) Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. *Biomatter* 2 (4): 176–194.
115. Rosenstein R, Nerz C, Biswas L, Resch A, Raddatz G et al. (2009) Genome analysis of the meat starter culture bacterium *Staphylococcus carnosus* TM300. *Applied and environmental microbiology* 75 (3): 811–822.

116. Ruffing U, Wende L, Schubert S, Kazimoto T, Abdulla S, Akulenko R, Alabi A, Bischoff M, Germann A, Friedrich A, Grobusch MP, Helms V, Hofmann J, Kern WV, Mandomando I, Mellmann A, Peters G, Schaumburg F, Vubil D, Herrmann M, von Müller L, editor (2013) African and German multicenter screening study of 1200 *Staphylococcus aureus* isolates.: International Journal of Medical Microbiology.
117. Ruffing U, Akulenko R, Bischoff M, Helms V, Herrmann M et al. (2012) Matched-cohort DNA microarray diversity analysis of methicillin sensitive and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospital admission patients. PloS one 7 (12): e52487.
118. Ruffing U, Alabi A, Kazimoto T, Vubil DC, Akulenko R et al. (2017) Community-Associated *Staphylococcus aureus* from Sub-Saharan Africa and Germany: A Cross-Sectional Geographic Correlation Study. Scientific reports 7 (1): 154.
119. Ruimy R, Maiga A, Armand-Lefevre L, Maiga I, Diallo A et al. (2008) The carriage population of *Staphylococcus aureus* from Mali is composed of a combination of pandemic clones and the divergent Pantone-Valentine leukocidin-positive genotype ST152. Journal of bacteriology 190 (11): 3962–3968.
120. Said-Salim B, Mathema B, Braughton K, Davis S, Sinsimer D et al. (2005) Differential distribution and expression of Pantone-Valentine leukocidin among community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Journal of clinical microbiology 43 (7): 3373–3379.
121. Sakoulas G, Nam S-J, Loesgen S, Fenical W, Jensen PR et al. (2012) Novel bacterial metabolite merochlorin A demonstrates in vitro activity against multi-drug resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PloS one 7 (1): e29439.
122. Schleifer KH, Fischer U. (1982) Description of a New Species of the Genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. International Journal of systematic 32 (2): 153–156.
123. Schlievert PM, Blomster DA (1983) Production of staphylococcal pyrogenic exotoxin type C: influence of physical and chemical factors. The Journal of infectious diseases 147 (2): 236–242.
124. Schulz-Stubner S, Reska M, Hauer T, Schaumann R (2016) Infektionen und Kolonisationen: Was können wir verbessern. Deutsche medizinische Wochenschrift (1946) 141 (6): e47-52.
125. Sharma-Kuinkel BK, Mongodin EF, Myers JR, Vore KL, Canfield GS et al. (2015) Potential Influence of *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 30 Genotype and Transcriptome on Hematogenous Infections. Open forum infectious diseases 2 (3): ofv093.
126. Shinji H, Yosizawa Y, Tajima A, Iwase T, Sugimoto S et al. (2011) Role of fibronectin-binding proteins A and B in in vitro cellular infections and in vivo septic infections by *Staphylococcus aureus*. Infection and immunity 79 (6): 2215–2223.

127. Shittu A, Oyedara O, Abegunrin F, Okon K, Raji A et al. (2012) Characterization of methicillin-susceptible and -resistant staphylococci in the clinical setting: a multicentre study in Nigeria. *BMC infectious diseases* 12: 286.
128. Sinha B, Francois P, Que YA, Hussain M, Heilmann C et al. (2000) Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infection and immunity* 68 (12): 6871–6878.
129. Skramm I, Fossum Moen AE, Aroen A, Bukholm G (2014) Surgical Site Infections in Orthopaedic Surgery Demonstrate Clones Similar to Those in Orthopaedic *Staphylococcus aureus* Nasal Carriers. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 96 (11): 882–888.
130. Spaan AN, Henry T, van Rooijen, Willemien J M, Perret M, Badiou C et al. (2013) The staphylococcal toxin Pantone-Valentine Leukocidin targets human C5a receptors. *Cell host & microbe* 13 (5): 584–594.
131. Stach CS, Herrera A, Schlievert PM (2014) Staphylococcal superantigens interact with multiple host receptors to cause serious diseases. *Immunologic research* 59 (1-3): 177–181.
132. Strauss L, Ruffing U, Abdulla S, Alabi A, Akulenko R et al. (2016) Detecting *Staphylococcus aureus* Virulence and Resistance Genes: a Comparison of Whole-Genome Sequencing and DNA Microarray Technology. *Journal of clinical microbiology* 54 (4): 1008–1016.
133. Stryjewski ME, Chambers HF (2008) Skin and soft-tissue infections caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 46 Suppl 5: S368-77.
134. Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K (2012) Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP* 16 (3): 400–405.
135. Tristan A, Rasigade J-P, Ruizendaal E, Laurent F, Bes M et al. (2012) Rise of CC398 lineage of *Staphylococcus aureus* among Infective endocarditis isolates revealed by two consecutive population-based studies in France. *PloS one* 7 (12): e51172.
136. Tseng CW, Biancotti JC, Berg BL, Gate D, Kolar SL et al. (2015) Increased Susceptibility of Humanized NSG Mice to Pantone-Valentine Leukocidin and *Staphylococcus aureus* Skin Infection. *PLoS pathogens* 11 (11): e1005292.
137. Turlej A, Hryniewicz W, Empel J (2011) Staphylococcal cassette chromosome mec (Sccmec) classification and typing methods: an overview. *Polish journal of microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologow = The Polish Society of Microbiologists* 60 (2): 95–103.
138. Turner CE, Sriskandan S (2015) Pantone-Valentine leucocidin expression by *Staphylococcus aureus* exposed to common antibiotics. *The Journal of infection* 71 (3): 338–346.

139. van Belkum A, Kools-Sijmons M, Verbrugh H (2002) Attachment of *Staphylococcus aureus* to eukaryotic cells and experimental pitfalls in staphylococcal adherence assays: a critical appraisal. *Journal of microbiological methods* 48 (1): 19–42.
140. van Belkum A, Melles DC, Snijders SV, van Leeuwen WB, Wertheim HFL et al. (2006) Clonal distribution and differential occurrence of the enterotoxin gene cluster, *egc*, in carriage- versus bacteremia-associated isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology* 44 (4): 1555–1557.
141. Weidenmaier C, Kokai-Kun JF, Kristian SA, Chanturiya T, Kalbacher H et al. (2004) Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nature medicine* 10 (3): 243–245.
142. Wenzel RP, Perl TM (1995) The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and the incidence of postoperative wound infection. *The Journal of hospital infection* 31 (1): 13–24.
143. Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A et al. (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet. Infectious diseases* 5 (12): 751–762.
144. Wu D, Wang Q, Yang Y, Geng W, Wang Q et al. (2010) Epidemiology and molecular characteristics of community-associated methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from skin/soft tissue infections in a children's hospital in Beijing, China. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 67 (1): 1–8.
145. Xiong YQ, Sharma-Kuinkel BK, Casillas-Ituarte NN, Fowler VG, JR, Rude T et al. (2015) Endovascular infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* are linked to clonal complex-specific alterations in binding and invasion domains of fibronectin-binding protein A as well as the occurrence of *fnbB*. *Infection and immunity* 83 (12): 4772–4780.
146. Yang Y, Sun H, Liu X, Wang M, Xue T et al. (2016) Regulatory mechanism of the three-component system HptRSA in glucose-6-phosphate uptake in *Staphylococcus aureus*. *Medical microbiology and immunology* 205 (3): 241–253.
147. Yarwood JM, Schlievert PM (2000) Oxygen and carbon dioxide regulation of toxic shock syndrome toxin 1 production by *Staphylococcus aureus* MN8. *Journal of clinical microbiology* 38 (5): 1797–1803
148. Young BC, Votintseva AA, Foster D, Godwin H, Miller RR et al. (2017) Multi-site and nasal swabbing for carriage of *Staphylococcus aureus*: what does a single nose swab predict. *The Journal of hospital infection* 96 (3): 232–237.
149. Zarei Koosha R, Mahmoodzadeh Hosseini H, Mehdizadeh Aghdam E, Ghorbani Tajandareh S, Imani Fooladi AA (2016) Distribution of *tsst-1* and *mecA* Genes in *Staphylococcus aureus* Isolated From Clinical Specimens. *Jundishapur journal of microbiology* 9 (3): e29057.

150. Zielinska AK, Beenken KE, Mrak LN, Spencer HJ, Post GR et al. (2012) sarA-mediated repression of protease production plays a key role in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* USA300 isolates. *Molecular microbiology* 86 (5): 1183–1196.

8 Danksagung

Zuerst danken möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. sc. nat. Markus Bischoff, für die Überlassung des Themas, die intensive Betreuung und die Verbesserungsvorschläge, die mir bei meiner Arbeit und den ersten Schritten in der "Welt der Wissenschaft" sehr geholfen haben.

Meiner Betreuerin, Diplom-Biologin Ulla Ruffing, danke ich für die Unterstützung und ausdauernde Motivation beim Erstellen dieser Arbeit. Vielen Dank auch für die Korrektur meiner Entwürfe, die sicher einiges an Durchhaltevermögen erforderte.

Es freut mich besonders, mit Lea-Elisa Roth eine tolle Laborpartnerin gefunden zu haben. Vielen Dank für die Einarbeitung in die Abläufe eines mikrobiologischen Labors, die gute Zusammenarbeit und die ausdauernde Motivation während der Versuche.

Dem gesamten Team des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene möchte ich für die herzliche Aufnahme in das Labor und die Unterstützung bei meiner Arbeit danken. Ohne diese Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ein besonderer Dank gilt Philipp Jung für die Versuchsetablierung und die dauerhafte Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Versuche.

Vielen Dank auch an Karin Hilgert, Medizinisch-technische Assistentin im mikrobiologischen Forschungslabor, für die Hilfsbereitschaft, Geduld und ihr Organisationsgeschick ohne die das Arbeiten im Labor undenkbar gewesen wäre.

Ein besonderer Dank gebührt meiner Familie für die Unterstützung im Studium, das Verständnis und die Motivation während des Verfassens dieser Arbeit. Danke.