

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der  
der Universität Tübingen  
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

**Mechanismen des durch Enterokokken induzierten  
Zelltodes in Makrophagen**

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

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

**vorgelegt von**

**Glienke, Friederike Juliane**

**2020**

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. S. Gröbner
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. D. Schneidawind

Tag der Disputation: 23.01.2020

Meinen Eltern und meinem Großvater

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Nosokomiale Infektionen durch Enterokokken .....	2
1.2 Enterokokken-Spezies .....	4
1.2.1 Enterokokken spp. als opportunistische Erreger .....	5
1.2.2 Virulenz von Enterokokken .....	6
1.3 Makrophagen und Apoptose.....	12
1.4 Zelltod durch Zellnekrose .....	15
1.5 Zielstellung.....	16
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>17</b>
2.1 In-vitro-Untersuchungen an infizierten Makrophagen.....	17
2.1.1 Murine J774A.1-Makrophagen .....	17
2.1.2 Isolierung muriner Makrophagen aus Knochenmark.....	17
2.1.3 Kultivierung der Zelllinien J774A.1 und BMDM .....	19
2.1.4 Zellzahlbestimmung und Zellproportionierung.....	21
2.2 Bakterien .....	22
2.2.1 Kultivierung und Bestimmung der Bakteriendichte .....	22
2.3 Infektion von J774A.1-Makrophagen .....	23
2.4 Zelltodanalyse mittels Durchflusszytometrie.....	25
2.4.1 Gestörte Membranpotentiale .....	25
2.4.2 Geschädigte Zellmembranen .....	25
2.5 Elektronenmikroskopische Untersuchungen .....	26
2.6 Immunoblot – Nachweis von Caspasen .....	27
2.6.1 Proben für SDS – PAGE .....	27
2.6.2 Immundetektion .....	29
2.7 Laktatdehydrogenase .....	29
2.8 In-vivo-Infektionsmodell .....	30

2.8.1 Versuchstiere.....	30
2.8.2 Peritonitismodell .....	30
2.9 Statistik .....	32
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>33</b>
3.1 Durch <i>E. faecium</i> induzierter Zelltod bei J774A.1-Makrophagen .....	33
3.1.1 Differenzierung Zelltod-induzierender Faktoren .....	33
3.2 Art des Zelltods von Makrophagen durch <i>E. faecium</i> .....	35
3.2.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen von J774A.1-Makrophagen .....	36
3.2.2 Nekroseinduzierte Zellschwellung .....	37
3.2.3 LDH-Messung bei J774A.1-Makrophagen .....	40
3.2.4 Caspase 3 – Immunoblot – J774A.1-Makrophagen .....	41
3.3 Zelltod in Knochenmarks- und Peritoneal-Makrophagen (In-vivo-Infektionsversuche).....	43
3.3.1 Zelltod bei Knochenmarks-Makrophagen.....	43
3.3.2 Zelltod bei Peritoneal-Makrophagen.....	44
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>48</b>
4.1 Durch <i>E. faecium</i> induzierter Zelltod von Makrophagen .....	48
4.2 Elektronenmikroskopische Analysen .....	51
4.3 Nekrosebedingte Zellschwellung und LDH-Freisetzung.. ..	53
4.4 Caspase 3 – Immunoblot.. ..	55
4.5 In-vivo-Untersuchungen von Peritoneal-Makrophagen .....	56
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>59</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>61</b>
<b>7. Anhang</b>	
7.1 Erklärung zum Eigenanteil.....	70
7.2 Veröffentlichung .....	71
7.2 Danksagung.....	72

## Abkürzungsverzeichnis

Ace	Adhesin to collagen of <i>E. faecalis</i>
APC	Allophycocyanin
AS	Aggregation Substance
<i>Asa1</i>	Subgruppe a1 - Gen
<i>Asc10</i>	Subgruppe c10 - Gen
<i>Asp1</i>	Subgruppe p1 – Gen
ATCC	American Type Culture Collection
Bax	Bcl-2-assoziiertes X-Protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BgsA bzw. B	<i>Biofilm-associated glycolipid synthesis A bzw. B</i>
<i>Bid</i>	BH3 interacting domain death agonist
BMDM	Bone marrow derived macrophages
BSA	Bovine serum albumin
CD11b	Cluster of differentiation 11b
CFU	Colony forming unit
CSF	Colony stimulating factor
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
EARS-Net	European Antimicrobial Resistance Surveillance Netzwerk
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
Ebp	Endocarditis and biofilm-associated pili
EBS	enterococcal binding substance
ECF	extracytoplasmic function
EDTA	Ethylindiamintetraessigsäure
Eep	Enhanced expression of pheromone
EfbA	enterococcal fibronectin-binding protein
ElrA	enterococcal leucine-rich-repeat-containing protein
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
E.spp	Enterococcus species
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Esp	Enterococcus surface protein
ECM	extracellular matrix
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FasL	Fas-Ligand

FasR	Fas-Rezeptor
FCCP	Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
FCS	fetal calf serum
FSC	forward scatter
g	Erdbeschleunigung bei Zentrifugation
GeIE	Gelatinase
ICU	Intensive care unit
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IL-1	Interleukin-1
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
i.p	intraperitoneal
MCA	Monoklonaler Antikörper
LDH	Laktatdehydrogenase
LZ	Lysozym
MOI	Multiplicity of Infection
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMMs	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-buffered-saline
PI	Propidiumiodid
rpm	Drehzahl pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SigV	Extrazytoplasmatischer Sigma-Faktor
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom
srtC	Sortase C
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMRE	Tetramethylrhodaminester
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
U/ml	Unit pro Milliliter
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
$\Delta\Psi_m$	Inneres mitochondriales Membranpotential
VLE-RPMI	Very Low Endotoxin-RPMI

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Analyse der Zelltodinduktion durch Pellets bzw. Überstände von <i>E. faecium</i> nach Antibiotikavorbehandlung .....	34
Abbildung 2: Transmissionselektromikroskopische Analyse von J774A.1 Makrophagen .....	36
Abbildung 3: Zellgröße von J774A.1-Makrophagen nach Infektion mit <i>E. faecium</i> .....	38
Abbildung 4: Anteil PI-positiver J774A.1-Makrophagen nach Infektion mit <i>E. faecium</i> . .....	39
Abbildung 5: LDH-Freisetzung aus J774A.1-Makrophagen nach Infektion mit <i>E. faecium</i> .....	41
Abbildung 6: Fehlende Caspase-3 Aktivierung in J774A.1-Makrophagen nach Infektion mit <i>E. faecium</i> .....	42
Abbildung 7: <i>E. faecium</i> induzierten Zelltod in Bone-marrow-derived Makrophagen (BMDM) von TLR 2-, TLR 4- und TLR 2-/4-negativen Mäusen.....	43
Abbildung 8: Leukozytenzahl in peritonealen Lavagen nach Infektion mit <i>E. faecium</i> . .....	45
Abbildung 9: Zelltodinduktion In-vivo durch <i>E. faecium</i> in peritonealen Makrophagen. ....	47

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aufstellung der 9 aktuell bekannten Virulenzfaktoren von Enterokokken .....	7
Tabelle 2: Differenzierungsmedium für Knochenmark-Makrophagen. ....	18
Tabelle 3: Kulturmedium für J774A.1-Makrophagen. ....	20
Tabelle 4: Kultivierungsmedium für Knochenmark-Makrophagen. ....	20



## 1. Einleitung

Über einen langen Zeitraum war die Besiedlung des Dickdarms von Menschen und Säugetieren mit zahlreichen kommensalen anaeroben und grampositiven Bakterien als eine zu bewahrende und schützende Symbiose bekannt, und aus dieser Sichtweise zudem positiv besetzt mit dem Terminus „Darmflora“ (Moore et al. 1974).

Diese Vorstellung, dass Enterokokken zu den nicht virulenten Keimen zählen, wurde mit Beginn der 70iger Jahre des 20. Jh.s zunehmend revidiert, als gegen mehrere Antibiotika resistente Bakterienstämme entdeckt wurden.

Eine neue Qualität der Virulenz von Bakterien wurde deutlich, als in den letzten zwei Jahrzehnten Enterokokken in zunehmender Häufigkeit als Erreger einer nosokomialen Infektion identifiziert wurden, wobei man Ende des 20. Jh.s bereits davon ausging, dass die antimikrobielle Resistenzrate von Enterokokken gegenüber den meisten derzeit zugelassenen Antibiotika gleichermaßen anstiegen (Mundy et al. 2000). Zunehmend wurde evident, dass sich Enterokokken zu einer sehr ernst zu nehmenden Ursache vital bedrohlicher Infektionen entwickelt hatten (Shepard und Gilmore 2002). Alarmierend war bereits 10 Jahre vor diesem Hintergrund der Nachweis, dass es zur Ausbildung Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE) gekommen war, und dass darüber hinaus der Transfer von Vancomycin-Resistenzgenen auf *Staphylococcus aureus* nachgewiesen werden konnte (Noble et al. 1992).

Epidemiologische Studien in den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) und Europa haben hinsichtlich VRE und Methicillin-resistenten *S. aureus* unterschiedliche Inzidenzen nachgewiesen. Insgesamt war jedoch Anfang des 21. Jh bereits ein deutlicher Anstieg der Kolonisations- bzw. Infektionsraten zu verzeichnen (Fridkin et al. 2001; Sievert et al. 2013). In den letzten Jahren ist hingegen – bezogen auf die Rate an Blutstrominfektionen – für MRSA ein abnehmender Trend, für VRE ein deutlich zunehmender Trend zu beobachten. So zeigen die aktuellen Daten des zum European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) gehörenden European Antimicrobial Resistance

Surveillance Netzwerks (EARS-Net) für die Jahre 2014 – 2017 bei invasiven *E. faecium* - Isolaten eine Zunahme der Resistenz gegenüber Vancomycin von 9,1% im Jahr 2014 auf 16,5% im Jahr 2017 (ECDC-EARS-Net 2019).

Durch Enterokokken verursachte Infektionen wie z.B. Abszesse, Harnwegs- und Darminfektionen sind die dritthäufigste Ursache für eine Bakteriämie und die vierthäufigste Ursache für nosokomiale Infektionen in den USA (Arias und Murray 2013).

In den bakteriologischen Analysen der durch Enterokokken ausgelösten nosokomialen Infektionen wurden in 80-90% *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) und in der Mehrzahl der übrigen Fälle *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) isoliert (Jett et al. 1994).

## 1.1 Nosokomiale Infektionen durch Enterokokken

Seit der Erstpublikation über Form und Teilungsverhalten von Enterokokken vor 120 Jahren (Thiercelin 1899) hat sich die Vorstellung von einem gutartigen Kommensalen zu einem potenziell virulenten und vital bedrohlichen Erreger gewandelt.

Der Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe (ABAS) in Deutschland stufte die Spezies *E. faecalis* und *E. faecium* aktuell im Jahr 2017 in die Risikogruppe 2 nach Biostoffverordnung ein. In dieser Risikogruppe befindet sich die Mehrzahl der humanpathogenen Keime (ABAS 2017).

Mehr als 90% der durch Enterokokken verursachten nosokomialen Infektionen werden durch *E. faecalis* bzw. *E. faecium* verursacht. Seltener werden Infektionen aus der Spezies der Enterokokken durch die Arten *E. avium* (Patel et al. 1993), *E. casseliflavus* (Pompei et al. 1991), *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. mundtii* (Kaufhold und Ferrieri 1991), *E. raffinosus* (Chirurgi et al. 1991) und *E. solitarius* ausgelöst (Murray 1990).

In einer nationalen Punkt-Prävalenzerhebung des Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Surveillance von nosokomialen Infektionen unter Antibiotikaanwendung hatten im Jahr 2016 von 64.412 stationär Behandelten 3.104 Patienten eine nosokomiale Infektion. Die am häufigsten nachgewiesenen Erreger bei diesen Patienten waren *Escherichia coli* (*E. coli*) mit 16,6%,

*Clostridium difficile* (13,6%) *Staphylococcus aureus* (12,0%), *E. faecalis* (6,9%), *Pseudomonas aeruginosa* (5,8%) und *E. faecium* mit 5,7% (NRZ 2017).

Ähnlich dem Infektionsverlauf bei anderen Erregern kommt es bei Infektionen mit Enterokokken durch Freisetzung von Mediatoren zu einer Adhäsion der Bakterien an Endothelien bzw. Epithelien und der extrazellulären Matrix (ECM). Sukzessive folgen bei Fortschreiten der Infektion Gewebeinvasion, inflammatorische Reaktion des Wirtes und toxininduzierte Gewebeschädigung (Jett et al. 1994).

Strikt unterschieden werden muss die Kolonisation von Bakterien als nicht infektverursachende Besiedelung im Gegensatz zu bedrohlichen Infektionen wie z.B. Infektionen der Harnwege, Endokarditis, Cholezystitis, Meningitis einschließlich nosokomialer Infektionen durch VRE oder Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). Nosokomiale Infektionen werden häufig durch *E. faecium* (> 99% aller VRE sind *E. faecium*) oder MRSA ausgelöst. Die Rate an nosokomialen Infektionen ist in epidemiologischen Studien hochsignifikant niedriger als die Kolonisationsrate von VRE bzw. MRSA (Mutters et al. 2013).

Eine epidemiologische Studie zwischen 2005 und 2006 ergab, dass die Inzidenzdichte (nosokomiale Infektionen pro 1.000 Patiententage) auf Nicht-intensiv-Stationen 0,13 Fälle pro 1.000 Patiententage und auf Intensivstationen 0,29 Fälle pro 1.000 Patiententage betrug (Kohlenberg et al. 2009). Eine weitere Studie an zwei Krankenhäusern zur Inzidenz von nosokomialer VRE-Sepsis in den Jahren 2010 bis 2012 ergab im Jahr 2010 eine Relation von n = 1 bzw. n = 2 Erkrankten, bezogen auf 100.000 Patienten. 2011 waren es n = 4 bzw. n = 5 Erkrankte und 2012 n = 1 bzw. n = 3 Erkrankte pro 100.000 Patienten (Mutters et al. 2013). In einer weiteren Untersuchung nahmen 186 Intensive Care Units (ICU) in der Zeit von 2007 bis 2008 an einer Analyse zur Häufigkeit von MRSA in Deutschland teil (Kohlenberg et al. 2012). Während des Untersuchungszeitraums wurden auf den 186 ICU 4.935 Fälle von MRSA diagnostiziert, wobei es sich um 3.928 mitgebrachte MRSA-Fälle und 1.007 (20,4%) nosokomiale MRSA-Fälle handelte.

## 1.2 Enterokokken - Spezies

Nachdem die Bakterien *E. faecium* und *E. faecalis* bis vor ca. 30 Jahren in der Klassifikation der Bakterien als Arten der Bakteriengattung Streptococcus eingeordnet waren, wurden sie 1984 auf der Basis molekularbiologischer Charakteristika zu der eigenständigen Gattung *Enterococcus* deklariert (Schleifer und Kilpper-Bälz 1984). Inzwischen ist die Anzahl der zur Gattung *Enterococcus* gehörenden Arten auf insgesamt 28 angestiegen (Moreno et al. 2006).

Enterokokken gehören zur Ordnung der Lactobacillales und definieren sich als nicht sporenbildende, Gram-positive, Katalase- und Oxidase negative und fakultativ anaerobe Kokken, die ähnlich wie Streptokokken singulär, paarweise oder in kurzen Ketten in Erscheinung treten (Moreno et al. 2006).

Die Differenzierung von Enterokokken und Streptokokken gelingt über die Charakteristika für die Wachstumsbedingungen beider Bakterienordnungen. Enterokokkenarten vermehren sich im Gegensatz zu Streptokokken noch bei einer Raumtemperatur von 10 °C in 6,5% Natriumchloridlösung (Shanks et al. 2006). Die Wachstumsfähigkeit von Enterokokken besteht bei Temperaturen zwischen 5 bis 50 °C mit einem Optimum von 42,7 °C sowohl unter aeroben als auch aneoroben Bedingungen (Domig et al. 2003). Hinsichtlich des pH-Wertes liegt das Wachstumsoptimum bei 7,5 und generell erfolgt Wachstum in pH-Wertbereichen von 4,6 bis 9,9 (Bradley und Fraise 1996; van den Berghe et al. 2006).

*E. faecium* und *E. faecalis* besiedeln beim Menschen den Gastrointestinaltrakt und können mit der Nahrungszufuhr aufgenommen werden, wenn die Temperaturen der Nahrung im genannten Wachstumsbereich liegen (Moreno et al. 2006). Im Dickdarm besteht eine Endosymbiose zwischen Enterokokken (Symbiont) und dem Menschen als Wirt. Diese Endosymbiose versorgt Enterokokken mit Aufbaustoffen durch Zellulosespaltung und liefert dem Wirt Proteine und Vitamin B (Branner und Roth-Maier 2006).

### 1.2.1 Enterokokken spp. als opportunistische Erreger

Durch Enterokokkenspezies verursachte Infektionen sind beim Menschen mit intaktem Immunsystem selten und konzentrieren sich auf bestimmte Körperregionen. Bei immunsupprimierten und allgemein abwehrgeschwächten Menschen treten Infektionen, teilweise assoziiert mit Septikämie gehäuft im Harntrakt, im hepatobiliären System, am Endokard, in Operationswunden, im dentalen Bereich und nach Anlage von Urinkathetern bzw. Infusionssystemen auf (Poh et al. 2006; Fisher und Phillips 2009).

Europaweit und in den USA ist die Zahl der durch Enterokokken verursachten Infektionen, insbesondere durch *E. faecalis* und *E. faecium*, mit Beginn des 21. Jh.s gestiegen. In Großbritannien wurden im Jahr 2005 bei 7.066 Patienten mit Enterokokken-Bakteriämie in 63% der Fälle *E. faecalis* und in 28% *E. faecium* nachgewiesen (Health Protection Agency 2007).

In den USA fanden sich in einer Studie bei Patienten mit stationär erworbenen Infektionen in 12% Enterokokken. Dabei wurden *E. faecalis* am häufigsten als krankheitsassoziiert und *E. faecium* am häufigsten als Resistenz-assoziiert identifiziert (Fisher und Phillips 2009).

Die Pathomechanismen, die zum Wandel der Enterokokken von Kommensalen des Menschen zu hochvirulenten Keimen beitragen, sind auch heute noch unzureichend erforscht. Das trifft für die Infektionen generell und für nosokomiale Infektionen zu. Das Auftreten von nosokomialen Infektionen ist vorwiegend Device-assoziiert induziert, wobei Enterokokken, vital erhalten durch Ausbildung eines Biofilms, über Katheter bzw. Fremdmaterial in die Blutbahn oder in den Harntrakt gelangen. Im Gegensatz dazu können aus Darmpopulationen stammende Enterokokken spp. durch Translokation eine lymphatische bzw. hämatogene Streuung verursachen (Murray 1990). Eine Grundvoraussetzung für den kolongesteuerten Infektionsweg ist die adhäsive Eigenschaft von Enterokokken am Darmepithel, wobei Aggregationsmoleküle eine wichtige Rolle spielen (Jett et al. 1994). Ursächlich für das Eindringen von Enterokokken aus der lumenseitigen Epithelschicht des Kolons in den Kapillaren, Arteriolen und Lymphbahnen enthaltenden submukösen Darmwandbereich scheinen Störungen in der Immunabwehr und phagozytäre Epitheleigenschaften zu sein

(Koch et al. 2004). Im Rahmen dieser pathogenetischen Hypothese wird diskutiert, dass am Darmepithel haftende Enterokokken durch die Epithelzellen phagozytiert und über die Basalmembran in den submukösen Raum transportiert werden (Koch et al. 2004).

### **1.2.1 Virulenz von Enterokokken spp.**

Bei vital bedrohlichen Enterokokken-Infektionen greift unabhängig von der antibiotischen Therapie das humane Immunsystem in Form der angeborenen, nicht antigenspezifischen Immunität in die Infektablaufe ein, wobei die phagozytäre Fähigkeit von Makrophagen und Granulozyten durch die Virulenz der Erreger umgangen wird (Koch et al. 2004). In den letzten Jahren konnten eine Reihe von Virulenzfaktoren charakterisiert werden, die im Zusammenhang mit der Invasion von Enterokokken in das Gewebe und nachfolgender Bildung von Abszessen stehen und gravierende Hostreaktionen, wie das Systemische Inflammatorische Response-Syndrom (SIRS) induzieren (Lindenstrau et al. 2011). Relevante Virulenzfaktoren sind auch bei Untersuchungen zur Pathogenese der Endokarditis verifiziert worden (Comerlato et al. 2013; Madsen et al. 2017).

In Tab. 1 sind mit Enterokokken assoziierten molekularen Substanzen aufgeführt, die als virulente Faktoren von Enterokokken, speziell *E. faecalis* und *E. faecium*, in den letzten Jahren nachgewiesen wurden.

Tab.1: Aufstellung der 9 aktuell bekannten Virulenzfaktoren von Enterokokken.

<b>Virulenz-faktoren</b>	<b>Subtypen/ Kodierung</b>	<b>Autoren/ Erstbeschreibung</b>
Aggregationssubstanz (AS)	Asa1, Asc10, Asp1	Dunny et al. 1978
Hämolysin-Cytolysin	CyIL-L / CyIL-S	Ike et al. 1984
E. surface Protein (ESP)	espG	Huycke et al. 1991
Zellwand-Glykolipid	BgsA / BgsB	Theilacker et al. 2009
Gelatinase	gelE	Makinen et al. 1988
Adhäsion	N1; N2; N3	Patti et al. 1994
ElrA	elrG	Siezen et al. 2006
Ebp	ebpG A, B, C	Handley u. Jacob 1981
EfbA	PavA	Torelli et al. 2012
Eep	Pheromon cAD1	An et al. 1999

Die Ausstattung mit diesen Virulenzfaktoren ermöglicht es den Wirtsbakterien im Kolon, virulente Fähigkeiten wie Eindringen in Gewebe, Adhäsion an Host-epithelien und Apoptoseinduktion zu entwickeln und dadurch schwere Infektionen auslösen zu können (Tab. 1).

### **Aggregation Substance (AS)**

Erstmals wurde 1978 eine als Verklumpung bezeichnete Aggregation von seinerzeit noch *als Streptococcus faecalis*, später als *E. faecalis* klassifizierten Bakterien im Kolon nachgewiesen (Dunny et al. 1978).

Als aggregationsauslösendes Agens identifizierten die Autoren ein von Epithelzellen der Mukosa abgegebenes Protein, welches die Verklumpung von Enterokokken im Sinne einer Paarung verursachte und später als Pheromone induzierendes Oberflächenprotein identifiziert wurde, dass aggregable Wirkungen über Konjugation bei Bakterien und Eukaryoten induzieren kann (Koch et al.

2004). Ermöglicht wird die AS-induzierte Aggregation über die AS-vermittelte Enterokokken-Bindungs-Substanz (EBS), wobei 3 differente AS-Protein-Subgruppen – Asa1, Asc10, Asp1 – differenziert wurden, die selektiv von Pheromon-abhängigen konjugativen Plasmiden kodiert werden (Chuang et al. 2009; Schlievert et al. 2010).

Für die Subgruppe Asc10 von *E. faecalis* wurde in vivo eine signifikante Erhöhung der Letalität bei Kaninchen durch Entstehung von Endokarditis und des Weiteren an einem Modell zur Untersuchung von Herzklappen beim Schwein die Kolonisation von *E. faecalis* nach Bildung eines Biofilms nachgewiesen (Schlievert et al. 1998; Chuang et al. 2009).

### **Hämolysin-Cytolysin (Cyl)**

Die Erstbeschreibung einer Virulenzsteigerung durch Expression von Hämolysin-Cyl bei *E. faecalis* erfolgte tierexperimentell an Mäusen (Ike et al. 1984). Wenig später wurde die hohe Expression von Hämolysin-Cyl durch *E. faecalis* im Zusammenhang mit Bakteriämie nach parenteraler Nutrition nachgewiesen (Ike et al. 1987). Wie auch der Virulenzfaktor AS wird Hämolysin-Cyl über das Pheromon-abhängige Plasmid pAD1 kodiert (Chow et al. 1993).

Hämolysin-Cyl verursacht beim Menschen über eine lysierende Wirkung einen Erythrozytenzerfall (Ike et al. 1984).

Die virulenzsteigernde Wirkung von Hämolysin-L wurde erstmals an einem Endokarditis-Modell in einer In-vivo-Untersuchung an Kaninchen überprüft. Nach Infektion der Versuchstiere durch Stämme von *E. faecalis* mit oder ohne Hämolysin-Cyl-Expression sowie mit und ohne Asa1-Expression betrug die Mortalität mit Hämolysin-Cyl plus Asa1 55%, ohne Hämolysin-Cyl mit Asa1 15% und mit Hämolysin-Cyl, aber ohne Asa1-Expression 0% (Chow et al. 1993).

### **Enterococcus surface protein (ESP)**

Enterokokkales Surface Protein wurde erstmals bei einem Gentamicin-resistenten virulenten *E. faecalis* isoliert (Huycke et al. 1991).

In einer In-vivo-Untersuchung an einem Maus-Modell mit durch *E. faecalis* verursachte Harnwegsinfektionen fand sich eine wesentlich höhere Kolonisa-



tionsrate mit ESP-positiven Bakterien im Vergleich zu *E. faecalis* ohne ESP-Gen (Shankar et al. 2001).

ESP trägt zur Kolonisation und Resistenzentwicklung von *E. faecalis*, insbesondere bei Infektionen des Harntrakts bei. Weiterhin induziert ESP bei *E. faecalis* eine Erhöhung der Resistenz durch Formation eines widerstandsfähigen, die Bakterien umhüllenden Biofilms (Tendolkar et al. 2004). Diese Biofilme bestehen aus biochemischen Substanzen wie Protein, Desoxyribonukleinsäure (DNA) und/oder Kohlenhydraten (O'Toole et al. 2000).

Die Ausbildung eines Biofilms spielt in der Pathogenese schwerer Infektionen wie Endokarditis und Harnwegsinfektion eine dominierende Rolle und ist für den Anstieg von nosokomialen Infektionen bei Einsatz von Harn- und Infusionskathetern ein wichtiger Faktor (Donlan und Costerton 2002). Auf Grund dieser Beobachtungen wird das ESP-Gen als wichtigstes virulenzsteigerndes Gen, zumindest für *E. faecalis* und *E. faecium* angesehen (Ballering et al. 2009; Chuang-Smith et al. 2010).

Aus neueren Untersuchungen zu Resistenzentwicklung und nosokomialen Infektionen resultiert die Hypothese, dass die Bildung des Biofilms per se ursächlich für antibiotisches Therapieversagen ist (Hoiby et al. 2011). Die Autoren verweisen darauf, dass dies in 65% aller Fälle von bakteriellen Infektionen beim Menschen auftritt (Frei et al. 2011). So könnte der Biofilm zur natürlichen Lebensform bestimmter Bakterien gehören. Auch muss die allgemeine Auffassung, dass Biofilmbildung per se mit einer Adhäsion an Oberflächen assoziiert ist, überdacht werden, da es häufig freischwebende Formen von Biofilm gibt. Diese Biofilmaggregate könnten aufgrund von Ablösung oder aus eigenständiger Synthese entstanden sein (Hall-Stoodley und Stoodley 2009).

### **Zellwand-Glykolipid**

Glykolipidsynthese ist essentiell für das Überleben und die Funktion von Enterokokken. *E. faecalis* synthetisiert die zwei essentiellen Zellwand-Glykolipide Mono- und Diglycosyl-diacylglycerol mittels der Glykosyltransferasen *Biofilm-associated glycolipid synthesis A* (BgsA) und *B* (BgsB). Bei mutations

bedingtem Fehlen von BgsA kommt es zu einer Biofilmstörung durch Syntheseausfall von Diglycosyl-diacylglycerol. Bei BsgB-Defizit resultiert ein kompletter Ausfall der Synthese von Zellwand-Glykosid (Theilacker et al. 2009). In Studien konnte gezeigt werden, dass mutierte Stämme von *E. faecalis* häufig eine gestörte bzw. fehlende Glykolipidsynthese aufweisen können. Diese Synthesestörung führt zu einer eingeschränkten Formation von Biofilm und daraus resultierend zu einer Verminderung der Rate an nosokomialen Infektionen, Harnwegsinfektion und Endokarditis (Haller et al. 2014).

### **Gelatinase**

Gelatinase (GelE) ist eine durch das Gen *gelE* kodierte Zink-Metalloprotease, welche über Hydrolyse einen Abbau von Kollagen, Fibrinogen, Fibrin sowie der Komplement-Komponenten C3 und C3a bewirkt. *E. faecium* besitzt daneben eine weitere Protease (Serinprotease, SprE), deren hydrolytische Wirkung geringer ist (Thurlow et al. 2010).

Erstmals wurde die proteolytische Wirkung dieser hydrophoben extrazellulären Metalloendopeptidase bei *E. faecalis* des Stammes OG1-10 im Jahr 1988 und das Gelatinase kodierende Gen *gelE* wenig später im Jahr 1991 nachgewiesen (Makinen et al. 1988; Su et al. 1991).

In einer tierexperimentellen Untersuchung erfolgte mit einem Endokarditismodell bei Kaninchen ein Vergleich der proteinabbauenden Wirkungen von GelE und SprE. Dabei wurde ein 6,5-fach höherer Anstieg der Koloniebildung (Colony forming Unit-CFU) pro Gramm Herzgewebe durch Einwirkung von Gelatinase gegenüber Serinprotease nachgewiesen (Thurlow et al. 2010).

### **Adhesin (Ace):**

Adhesin, funktionsbezogen bezeichnet als „Adhesin für Kollagen von *E. faecalis*“ (Ace), ist in seiner Wirkung vergleichbar mit ESP. Adhesin agiert als ein sich an Zellwänden von *E. faecalis* fixierendes kollagenbindendes Protein (Nallapareddy et al. 2000).

Die Erstbeschreibung sowie die Strukturanalyse erfolgte 1998. In weiteren

Untersuchungen konnten 3 Subtypen mit den terminalen Ketten N1, N2 und N3 differenziert werden (Patti et al. 1994; Rich et al. 1998)

Das Ace-Gen gehört zur Gruppe der „Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“ (MSCRAMM) und vermittelt die Bindung an Kollagenfasern (Rich et al. 1999). Damit gehört Adhesin zu den Molekülen, die einen primären Kontakt zum kollagenenthaltenden Wirtsgewebe und damit die Entstehung von Infektionen ermöglichen. Solcherart Wirtsgewebe findet sich an Herzklappen und Aortenklappen insbesondere dann, wenn sich bei Endothelschäden sogenannte sterile Vegetationen durch Ablagerung von Thrombozyten entwickeln.

### **ElrA**

ElrA (enterococcal leucine-rich-repeat-containing protein) ist ein zellwand-assoziiertes Protein (Siezen et al. 2006). Es verfügt über eine aggressive, makrophagen-eliminierende Wirkung und seine infektionsfördernde Virulenz wurde nach tierexperimentell induzierter Peritonitis von Mäusen nachgewiesen. Nach Inaktivierung des elr-Gens (elrG) konnte eine signifikante Reduktion der Letalität nachgewiesen werden (Brinster et al. 2007). Neben der extrem gesteigerten Letalität in der Versuchsgruppe mit aktivem ElrA wurde eine gesteigerte Freisetzung des inflammatorischen Interleukins-6 (IL-6) beobachtet.

### **Ebp**

1981 wurden erstmals haarähnliche Zellanhänge (Fimbrien) mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen bei *E. faecalis* Stamm beschrieben (Handley und Jacob 1981). Ebp (endocarditis and biofilm-associated pili) ist ein biofilmassoziiertes Protein, das durch die drei Ebp-Gene A, B und C sowie durch ein assoziiertes Sortase-Gen (srtC) kodiert wird. Über die EbpA-srtC Gene werden Formation von Biofilm, bakterielle Adhäsion und nachfolgend Infektion vermittelt (Nallapareddy et al. 2006).

### **EfbA**

Das Fibronektin-bindende Protein A (EfbA) ist ein Adhesin, das eine chemische

Verbindung mit Fibronectin an der Hülle von *E. faecalis* eingeht. Kodiert wird EfbA bei *E. faecium* vom Gen für das Protein *Pneumococcaler Adhäsions und Virulenzfaktor A* (PavA); bei dem Keim *E. faecalis* über den EF1249 Locus (Torelli et al. 2012)

Fibronectin findet sich vermehrt in der extrazellulären Matrix der Endothelien im kardialen und vaskulären Bereich und ist die Voraussetzung für eine zunächst sterile Vegetation mit Thrombozyten- und Fibrinhaftung. Über eine nachfolgende Kolonisation mit *E. faecalis* kann dann eine Infektion in Form einer Endokarditis entstehen (Singh et al. 2015).

### **Eep**

Eep (Enhanced expression of pheromone) ist eine Determinante des *E. faecalis*-Chromosoms und hat durch Generierung von Peptid-Pheromonen, speziell des Pheromons cAD1 einen stimulierenden Einfluss auf die Bildung von der Aggregationssubstanz AS. Erstmals wurde diese Determinante und sein Einfluss auf die Freisetzung von AS am Wild-Typ OG1X bei *E. faecalis* nachgewiesen (An et al. 1999)

Zusammenfassend ist festzustellen, dass viele der für *E. faecalis* beschriebenen Virulenzfaktoren lediglich hinsichtlich der Adhärenz von Bakterien untersucht wurden. Das bedeutet, dass die Präsenz von Virulenzfaktoren nicht automatisch Invasivität impliziert. So könnten in der Zukunft weitere, die Virulenz von Enterokokken beeinflussende Faktoren identifiziert werden, die unmittelbar zum Auftreten von Infektionen führen (Madsen et al. 2017).

## **1.3 Makrophagen und Apoptose**

Der Kontakt zwischen virulenten Enterokokken des Magen-Darm-Trakts und dem angeborenen Immunsystem wird über Makrophagen definiert, wobei zunächst eine transepitheliale Migration von *E. faecalis* bzw. *E. faecium* in subepitheliale Blut- und Lymphgefäße und weiter in Milz und Leber erfolgt (Zeng et al. 2004).

Durch Migration bzw. operationsbedingt in die Abdominalhöhle eingedrungene Enterokokken werden zunächst mit Makrophagen des Peritoneums und weiterer Gewebeformen als erste Immunabwehr konfrontiert, oder sie überleben die bakterizide Wirkung der Makrophagen, indem sie zumindest teilweise in Lymphknoten und hämatogen in Milz oder Leber adhärent sind (Zou und Shankar 2014).

Makrophagen entstehen aus Monozyten des Knochenmarks nach Kontakt mit Antigenen, Bakterien und apoptotischen bzw. nekrotischen Zellpartikeln. Durch Chemotaxis angestrebte Zielorte für das Entstehen von Makrophagen sind Ansammlungen von pathogenen Keimen. Die Differenzierung in Makrophagen und die makrophageninduzierte Immunabwehr wird über Zytokine wie z.B. Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) Interferon-Gamma (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) gesteuert (Duque und Descoteaux 2014).

Makrophagen exprimieren spezifische Oberflächenproteine, zu denen die Clusters of Differentiation (CD) wie z.B. CD14, CD11b, CD68 sowie Lysozym M gehören und welche mit den Methoden von Durchflusszytometrie oder Immunhistochemie differenziert werden können (Zola et al. 2005).

Makrophagen treten in 2 unterschiedlichen Erscheinungsformen auf, wobei der Phänotyp-M1 durch Endotoxin, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  exprimiert wird und der Phänotyp-M2 in seiner Erscheinungsform durch Interleukin-4 (IL-4) sowie nekrotisches Gewebe gesteuert wird (Italiani und Boraschi 2014).

Frühere Untersuchungen an einem Maus-Modell haben gezeigt, dass Stämme von Hämolysin- und Gelatinase-produzierenden *E. faecalis* in peritonealen Makrophagen bis zu 6 Tage überleben können (Gentry-Weeks et al. 1999). Darauf aufbauend wurde postuliert, dass peritoneale Makrophagen eine Carrierfunktion für *E. faecalis* in Richtung Blut- und Lymphbahnen übernehmen (Wells et al. 1988).

In der vorliegenden Arbeit konnte bei murinen, mit Lysozym behandelten *E. faecium* infizierten Makrophagen eine Volumenzunahme, eine Vakuolisierung des Zytoplasmas und Perforationen von Zellmembranen als Zeichen des irreversiblen Zelltods in Form von Nekrose nachgewiesen werden (Gröbner et al.

2010). Dagegen erfolgt bei Apoptose ein programmierter Zelltod mit Schrumpfung der Zellen, Zerfall der Zellstrukturen und Ablösung aus dem Zellverband (Hotchkiss et al. 2009).

Um den durch *E. faecium* verursachten Zelltod von Makrophagen und damit die begünstigte Infektionsausbreitung zu verhindern, ist es essentiell, die Zelltodverursachenden Mechanismen von *E. faecium* in Makrophagen zu entschlüsseln. Daraus könnten neue, effektive Strategien zur Prävention von enterokokkalen Infektionen resultieren. Im Gegensatz zur Nekrose handelt es sich bei Apoptose um einen schonenden Vorgang, bei dem gealterte und geschädigte Zellen eliminiert werden, um die Homöostase von Gewebe aufrecht zu erhalten (Karp 2005). Des Weiteren ist die Apoptose ein wichtiger Faktor in der Gewebedifferenzierung während der Embryonalentwicklung, in der Abwehrstrategie zur Kontrolle von bakteriellen und viralen Infektionen sowie im Einleiten der Beendigung von Immunreaktionen (Ashida et al. 2011).

Für die Triggerung von Apoptose existieren 2 hypothetische Mechanismen:

► Der extrinsische Weg zur apoptotischen Eliminierung von Zellen wird über den Fas-Rezeptor (FasR) induziert, der auch unter den Bezeichnungen CD95 bzw. APO-1 (Apoptosisantigen-1) bekannt ist (Trauth et al. 1989). Der FasR gehört zur TNF-Rezeptorfamilie, ist an Zelloberflächen lokalisiert und löst über Ligandenbindung (FasL) die Apoptose der betreffenden Zelle aus (Ashkenazi und Dixit 1998). Die biochemischen Vorgänge der Apoptose führen nach Ligandenbindung über Aktivierung von Cysteinproteasen (Procaspase 8; Procaspase 3) in den betroffenen Zellen zu DNA-Fragmentierung und Zelltod (Ulett und Adderson 2006).

Zu den Zellen, die FasR exprimieren, gehören aktivierte T- und B-Lymphozyten, Hepatozyten, Epithelzellen von Ovarien, sowie verschiedene Tumorzellen.

► Im Gegensatz zum extrinsischen Weg führt die Auslösung des intrinsischen Algorithmus der Apoptose über eine Signalvermittlung aus den Mitochondrien der betroffenen Zellen (Green und Reed 1998). Diese Signalvermittlung wird primär induziert durch Wachstumsfaktoren, Chemotherapie, Radiotherapie sowie intrazellulären Stress, hervorgerufen durch Ischämie und Toxine. Die aktivierten

*BH3 only Proteine* supprimieren die inhibitorische Wirkung von antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen (Adams und Cory 1998). Das führt zur Polymerisation von proapoptotischen Proteinen wie Bcl-2-assoziiertes X-Protein (Bax) und BH3 interacting domain death agonist (Bid) an der umhüllenden mitochondrialen Membran. Die membranfixierten Proteine Bax und Bid initiieren die Durchsetzung der mitochondrialen Membran mit Poren, über welche Cytochrom c in das Zytoplasma der betroffenen Zellen gelangt. Cytochrom c induziert wiederum die Formation von Apoptosomen. Diese Apoptosome sind multimere Proteinkomplexe, die als Gerüst für die proteolytische Aktivierung von Procaspase 9, des essentiellen Schlüsselproteins für Apoptose fungiert (Arnoult et al. 2009). Procaspase 9 aktiviert zunächst Caspase 9 und dieses Protein leitet mit der Bildung der Caspasen 3 und 10 den finalen Teil der Apoptose ein (Zou und Shankar 2014).

#### **1.4 Zelltod durch Zellnekrose**

Der Terminus Nekrose definiert den Zelltod als passiven, nichtprogrammierten Zerfall von Zellen auf Grund einer irreversiblen Schädigung von Struktur und/oder Energiehaushalt (Ziegler und Groscurth 2004).

Gegenüber dem programmierten Zelltod in Form der Apoptose ist eine Nekrose zunächst eine Teilschädigung des Organismus, bei immanenter Gefahr vitaler Bedrohung. Die Intensität des nekrosebedingten Zelltods ist abhängig von der zellerstörenden Wirkung vorhandener Noxen und/oder dem Ausmaß der Störung der Synthese von Adenosintriphosphat (ATP). Daraus resultieren im Vergleich zur Apoptose ein inkongruenter Algorithmus und damit ein inhomogener Verlauf der Nekrose (Ziegler und Groscurth 2004). Mit dem Verlust der ATP-Synthese kommt es zu einem Verlust des kontrollierten transmembranösen Ionenaustauschs. Diese Störung initiiert eine konzentrationsgesteuerte Ionenwanderung über die Membranporen mit zellulärem Kaliumverlust, Natrium- sowie Wassereinstrom und Zellschwellung (Barros et al. 2001). Mit der Volumenzunahme der nekrosebedrohten Zellen gelangen entzündungsfördernde Zellmoleküle wie z.B. TNF- $\alpha$  und Zytokine in die

Extrazellulärmatrix. Die Folge sind starke Entzündungsreaktionen, die zur Verstärkung der Nekrose und Zelltod führen (Fink und Cookson 2005).

## 1.5 Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, mit Hilfe von In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen zu analysieren, aufgrund welcher Mechanismen *E. faecium* den Zelltod von Makrophagen induziert. Damit soll die Frage beantwortet werden, ob es sich bei einem Zelltod von Makrophagen durch *E. faecium* um einen programmierten Zelltod in Form der Apoptose oder um einen toxisch bedingten Zelluntergang in Form von Nekrose handelt.

Zur Beantwortung der Zielstellung wurden folgende Aufgabenstellungen formuliert:

- Analyse möglicher Schädigungen von Zellwand und mitochondrialem Transmembranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) von Makrophagen nach Infektion durch *E. faecalis* und *E. faecium* über 150 min mit unterschiedlichen Multiplicity of Infection (MOI) mittels Durchflusszytometrie
- Überprüfung möglicher Einflüsse von löslichen Bakterienüberständen und Bakterienpellets der Enterokokkenkulturen hinsichtlich des Zelltods von Makrophagen.
- Analyse von Formveränderungen infizierter Makrophagen hinsichtlich Schrumpfung oder Schwellung mittels durchflusszytometrischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen und Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) in der Makrophagenkultur als Indikator für nekrotischen Zelltod sowie Immunblotting von Caspase 3 als Marker für Apoptose.
- Bestätigung der bei den In-vitro-Untersuchungen erhobenen Befunde am Mausmodell an Makrophagen des Knochenmarks und des Peritoneums.



## **2. Material und Methoden**

### **2.1 In-vitro-Untersuchungen an infizierten Makrophagen**

#### **2.1.1 Murine J774A.1-Makrophagen**

Für In-vitro-Untersuchungen an infizierten Makrophagen wurde die murine Makrophagen-Zell-Linie J774A.1 von American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia) eingesetzt (ATCC 2007). Ursprünglich wurde diese, vorwiegend adhärent wachsenden Zell-Linie aus dem retikulären Sarkom einer weiblichen BALB/c-Albinomaus kultiviert (ATCC TIB67), wobei nach Angaben von ATCC die Verdopplungszeit in der Kultur 17 Stunden beträgt. Die Makrophagen der Zell-Linie J774A.1 synthetisieren das bakterizid wirkende Lysozym und IL-1 und besitzen Rezeptoren für Complement C3 (ATCC 2007).

#### **2.1.2 Isolierung muriner Makrophagen aus Knochenmark**

Makrophagen aus dem Knochenmark (Bone marrow-derived macrophages – BMDM) wurden aus dem tibialen und femoralen Knochenmark von 4 bis 6 Wochen alten, Toll-like-Rezeptor (TLR)-defizienten (TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup>, und TLR2<sup>-/-</sup> x TLR4<sup>-/-</sup>) sowie TLR-tragenden weiblichen Mäusen (C57BL/6x129Sv) gewonnen (Charles River, Sulzfeld).

Für die Entnahme von Knochenmark wurden die Versuchstiere durch Inhalation von CO<sub>2</sub> narkotisiert und die Tötung erfolgte durch Luxation der Halswirbelsäule mittels ruckartigen Streckens der Mäuse.

Nach Desinfektion der Tiere mit Isopropanol (Stierand GmbH, Waldstetten) und Entfernung der Haut an den unteren Extremitäten wurden Femur und Tibia exstirpiert und bis zur Entnahme des Knochenmarks in eisgekühlter, phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelagert (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Die Entnahme von Knochenmark erfolgte unter sterilen Kautelen auf Präparierplatten, indem zunächst die gelenkflächentragenden Knochenabschnitte so weit reseziert wurden, bis der eröffnete Knochenmarkraum sichtbar wurde. Für die Gewinnung des Knochenmarks erfolgten die Ausspülung des Markraums mit einer PBS-gefüllten Injektionsspritze und das Einbringen der Spülflüssigkeit in

konische Falcon-50ml-Zentrifugentubes (Eppendorf AG, Hamburg.) Anschließend wurden die Tubes für 5 min mit 400 g bei 24 °C zentrifugiert (Tischzentrifuge, Eppendorf AG, Hamburg), der Überstand abgenommen und die Zellpellets nach Pipettierung des flüssigen Überstandes in Differenzierungsmedium für BMDM resuspendiert (Tab.2).

**Tab. 2:** Differenzierungsmedium für Knochenmark-Makrophagen; Überstand von L929-Zellen enthält Makrophagen-stimulierenden Faktor; M-CSF (macrophage colony stimulating factor).

<b>Substanz</b>	<b>Menge/ Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
DMEM	40 ml	Invitrogen, Karlsruhe
FCS	10% (v/v)	Sigma, Taufkirchen
Pferdeserum	5% (v/v)	Mepro, Vechta
L-Glutamin	1% (v/v)	Sigma, Taufkirchen
Natriumpyruvat	0,5% (v/v)	Biochrom, Berlin
L929-Zellüberstand	20% (v/v)	ATCC, Rockville, MD
Penicillin	10 <sup>4</sup> U/ml	Invitrogen, Karlsruhe
Streptomycin	10 <sup>4</sup> U/ml	

Danach erfolgte die Aussaat von je 1 x 10<sup>6</sup> Knochenmarkszellen, gelöst in 10 ml Differenzierungsmedium, in Petrischalen mit einem Durchmesser von 9,5 cm und Inkubation für 7 bis 9 Tage im Brutschrank bei 37 °C. In dieser Zeit erfolgte die Ausreifung der Makrophagen des Knochenmarks.

Nach Abschluss der Differenzierungsphase von BMD-Makrophagen wurden je 3 x 10<sup>5</sup>, in 100 µl PBS suspendierte Zellen mittels Propidiumiodid (PI) und Allophycocyanin (APC) markiert, indem monoklonale Antikörper (MCA) Ratte-anti-Maus gegen die makrophagenspezifischen Oberflächenproteine CD11b

(Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg) und F4/80 (AbD Serotec, Düsseldorf) eingesetzt wurden, die mit Propidiumiodid (PI) bzw. Allophycocyanin (APC) konjugiert waren. Folgende Ansätze dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle für die Markierung der BMDM:

- BMDM ohne Zusätze,
- BMDM (Isotypkontrollen),
- BMDM mit CD11b-PI plus F4/80-APC.

Mittels durchflusszytometrischer Analyse der gefärbten Zellen nach Beendigung der Differenzierungsphase wurden 97% der Zellen als ausgereifte BMDM (CC11b<sup>+</sup> / F4 / 80<sup>+</sup>) identifiziert.

### **2.1.3 Kultivierung der Zelllinien J774A.1 und BMDM**

Alle Versuchsabläufe mit Zellkulturen erfolgten in einer Laminarflow-Reinluftwerkbank (BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl).

Für die Kultivierung der Makrophagen-Linien J774A.1 und BMDM wurden die Zelllinien in einem Zellkulturbrutschrank (Mettler GmbH, Schwabach) bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in Schräghalsflaschen für adhärenente Zellen mit einer Grundfläche von 175 cm<sup>2</sup> (Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold) bzw. in T75-Flasks (Greiner Bio-One, Frickenhausen) mit einer Grundfläche von 75 cm<sup>2</sup> in 20 ml Kulturmedium gezüchtet. Das Kulturmedium wurde in 2- bis 3-tägigem Abstand gewechselt und parallel dazu wurden die gezüchteten Makrophagen in Abhängigkeit vom Ausmaß der Vermehrung im Verhältnis 1:5 bis 1:10 geteilt. Davor erfolgte zunächst die Ablösung adhärenenter Zellen vom Boden der Kulturbehältnisse, indem diese für 5 min im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> mit 5 ml Trypsin/ Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) inkubiert wurden (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Danach wurden die gesplitteten Makrophagen in frischem Kulturmedium weiter im Brutschrank kultiviert (Tab. 3 und Tab.4).

**Tab. 3:** Kulturmedium für J774A.1-Makrophagen; Prozentangaben in Volumenprozent (v/v); Millimol – mM; Mikromol –  $\mu$ M.

VLE- RPMI (Very Low Endotoxin – Roswell Park Memorial Institute)

<b>Substanz</b>	<b>Menge/ Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
VLE-RPMI 1640 Medium	500 ml	Biochrom, Berlin
Fetales Kälberserum (FCS)	10% (v/v)	Sigma, Taufkirchen
L-Glutamin	200 mM	Invitrogen, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol (ME)	50 $\mu$ M	Sigma, Taufkirchen
Nichtessentielle Aminosäuren	1% (v/v)	Biochrom, Berlin
Natriumpyruvat	100 mM	Biochrom, Berlin

**Tab. 4:** Kultivierungsmedium für Knochenmark-Makrophagen;  
DMEM –Dulbecco`s Modified Eagle Medium.

<b>Substanz</b>	<b>Menge/ Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
DMEM	40 ml	Invitrogen, Karlsruhe
FCS	10% (v/v)	Sigma, Taufkirchen
L-Glutamin	1% (v/v)	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumpyruvat	0,5% (v/v)	Biochrom, Berlin

Die für die Versuche benötigten Makrophagen wurden nach Abnahme des Überstands und einmaligem Waschen mit Hank`scher Lösung vom Boden der Kulturgefäße abgelöst. Unterstützt wurde dieser Prozess durch Zugabe von 1 ml

des Enzymkomplexes Accutase (PAA Laboratories GmbH, Egelsbach). Innerhalb von 10 bis 15 min bei 37 °C im Brutschrank waren die Makrophagen von den Petrischalen abgelöst. Es folgte ein 2-maliges Waschen in Hank'scher Lösung (Biochrom GmbH, Berlin) bei 24 °C mit 2-maligem Zentrifugieren für 5 min bei 400 g. Nach Absaugen des Überstandes und Resuspension in antibiotikafreies Kulturmedium wurden die Makrophagen im Brutschrank für die vorgesehenen Versuche in sterilen Falcon-Tubes gelagert. Das in der Arbeit verwendete Kulturmedium enthält als Nährsubstanz das von Moore G.E. 1966 am Roswell Park Memorial Institute in Buffalo, New York entwickelte Kulturmedium RPMI 1640 (Moore et al. 1967), wobei in der vorliegenden Arbeit die *Very Low Endotoxin* -Variante (VLE) des Kulturmediums (Biochrom GmbH, Berlin) eingesetzt wurde (Tab. 3).

Die in der Arbeit eingesetzte Zellkulturmedien wurden unter sterilen Kautelen hergestellt und bei +4 °C gelagert. Wenn FCS beigefügt wurde, erfolgte zuvor für 30 min eine Hitzeinaktivierung in einem auf 56 °C erhitzten Wasserbad.

#### **2.1.4 Zellzahlbestimmung und Zellportionierung**

Die Zellzahlbestimmung und Portionierung in Mengen von  $1 \times 10^6$  kultivierter Makrophagen erfolgte nach Resuspension der Zellen in antibiotikafreiem Kulturmedium. Dafür wurden gleiche Zellanteile dieser Lösung mit Trypanblau (Sigma-Aldrich, Steinheim) versetzt und in eine Neubauer-Zählkammer (Gynemed GmbH, Lensahn) überführt. Die vitalen (nicht gefärbten) Zellen aus 4 Quadranten der Zählkammer wurden summiert und der Mittelwert berechnet. Die Zellkonzentration der ursprünglichen Suspension ergab sich aus dem Mittelwert, dessen Multiplikation mit dem Kammerfaktor von  $1 \times 10^4$  Zellen/ml sowie der Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors.

Nach Zugabe von Kulturmedium konnten die Zellsuspension auf die festgelegte Konzentration von  $1 \times 10^6$ /ml eingestellt werden und je 1 ml des Mediums mit genau dieser Zellkonzentration wurde in je eine der 24 Vertiefungen der 24-well Zellkulturplatte (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) pipettiert.

## 2.2 Bakterien

Die folgenden Bakterienarten wurden für die In-vitro-Untersuchungen mit infizierten Makrophagen eingesetzt:

- ▶ *E. faecium*
- ▶ *E. faecalis*
- ▶ *Staphylococcus aureus*

Bei der in der Arbeit verwendeten Spezies von *E. faecium* handelt es sich um den Referenzstamm ATCC 6057, der ubiquitär und apathogen in Lebensmitteln und insbesondere in Käsesorten (Camembert, Mozzarella) nachgewiesen und isoliert werden kann.

Als weitere Art aus der Gattung *Enterococcus* wurde bei den in der Arbeit durchgeführten Infektionsversuchen *E. faecalis* mit dem Referenzstamm ATCC 29212 eingesetzt, der aus Urin eines Patienten mit Harnwegsinfektion gewonnen wurde.

Für Kontrolltests bei den Infektionsversuchen wurde der Referenzstamm ATCC 29213 verwendet, bei dem es sich um einen gram- und koagulase-positiven *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) handelt, der aus dem Wundabstrich eines Patienten gezüchtet wurde.

### 2.2.1 Kultivierung und Bestimmung der Bakteriendichte

Die in der Arbeit verwendeten, maximal 3 Tage alten Bakterienkolonien von *E. faecium*, *E. faecalis* und *S. aureus* Bakterienarten wurden über einen Zeitraum von 12 Stunden (h) kultiviert, bevor sie für Infektionsversuche eingesetzt wurden. Bei dem verwendeten Kulturmedium handelte es sich um die von Bertani 1951 entwickelte *Lysogeny-Bouillon* (LB-Medium) mit den Inhaltsstoffen Hefextrakt, NaCl und Trypton, einem durch Proteinabbau entstandenen Peptid- und Aminosäuregemisch (Bertani G 1951). Nach Füllung von Kultivierungstubes mit je 3 ml LB-Medium und Bakterien erfolgte über einen Zeitraum von 12 h die Kultivierung in einem Schüttelinkubator mit einer Drehzahl von 200 pro min (rpm) und bei 37 °C.

Nach Abschluss der Bakterienkultivierung wurden die Tubes bei 24 °C und 4.000 g für 5 min zentrifugiert und nach Abnahme der Überstände erfolgte die Resuspension der bakterienhaltigen Pellets in je 1 ml PBS bei 24 °C und nachfolgend die Bestimmung der Bakteriendichte.

Zunächst wurden Aliquots in einer Menge von 50 Mikroliter ( $\mu\text{l}$ ) aus den bakterienhaltigen Resuspensionen entnommen, durch Zusatz von 950  $\mu\text{l}$  PBS in einem Verhältnis von 1:20 verdünnt und danach bei der Wellenlänge von 600 Nanometer (nm) die optische Dichte ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ) mit einem Biophotometer gemessen (Eppendorf AG, Hamburg). Dafür mussten die bei der Kultivierung entstandenen Suspensionen auf eine  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 1,0 eingestellt werden, wofür das nach der nachstehenden Formel berechnete Volumen

$$(\text{Volumen PBS } [\mu\text{l}] = \text{OD}_{600\text{nm}} \times 1000 - 50)$$

vorgegeben und nachfolgend 50  $\mu\text{l}$  der Bakteriensuspension hinzugegeben wurden. Die Anzahl der Bakterien pro ml PBS-Suspension ergab danach auf Basis der Formel  $\text{OD}_{600\text{nm}} \times 3 \times 10^8$  eine für alle Bakterienproben einheitliche Bakterienzahl. Die entsprechenden PBS-Volumina und 100  $\mu\text{l}$  einer Bakteriensuspension wurden auf Eppendorf-Tubes verteilt.

### 2.3 Infektion von J774A.1-Makrophagen

Makrophagen der Zell-Linie J774A.1 wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  pro ml antibiotikafreiem Kulturmedium (s. Tab. 3) auf 24-well-Zellkulturplatten verteilt und anschließend mit den drei eingesetzten Bakterienarten in einem Infektionsverhältnis von 20:1 infiziert. Die *Multiplicity of Infection* (MOI) von 20 entsprach damit einer Relation von  $1 \times 10^7$  Bakterien in 33, 3  $\mu\text{l}$  der Bakterien-suspension  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1$ .

Nach Abschluss der Infektion der J774A.1-Makrophagen wurde die 24-well-Zellkulturplatte für 5 min bei 400 g zentrifugiert, um einen sicheren Kontakt zwischen Zellen und Bakterien zu gewährleisten.

2.5 h nach Induktion der Infektion wurden die 3 Bakterienarten selektiv abgetötet, indem pro ml Bakterien-Zell-Suspension 10 mg, aus weißem Hühnerei

gewonnenes Lysozym (L6876, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) für Enterokokken und 40 µg pro ml Lysostaphin (L0761, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) für *S. aureus* zugefügt und die Zellsuspensionen danach für 1.5 h in einem Zell-Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> weiter inkubiert wurden.

Probenentnahmen für nachfolgende Untersuchungen an infizierten J774A.1-Makrophagen zur Analyse der Zelltodraten mittels Durchflusszytometrie erfolgten nach insgesamt 2.0, 3.0, 3.5 bzw. 4.0 Stunden nach Infektion. Als Vergleichs- und Negativkontrollen für die Analyse der Zelltodraten infizierter J774A.1-Makrophagen dienten folgende Negativ- und Positivkontrollen.

#### **Negativkontrollen:**

- ▶ Antibiotikafreies Kulturmedium ohne infizierte Zellen – (Tab.3)
- ▶ Antibiotikafreies Kulturmedium mit 10 mg/ ml bakterizid wirkenden Lysozym, um mögliche Effekte von Lysozym auf die Zelltodrate zu erkennen,
- ▶ Siliziumdioxid-Perlen mit einem Durchmesser von 1 µm (Kisker Biotech, Steinfurt), 3-mal mit PBS gewaschen und MOI 20:1 zum Ausschluss unspezifischer, insbesondere phagozytosebedingter Effekte.

#### **Positivkontrollen:**

- ▶ Mit *S. aureus* (ATCC 29213) infizierte Makrophagen wurden als Positivkontrolle für Zelltod durch Apoptose eingesetzt (Baran et al. 2001).
- ▶ Als weitere Positivkontrolle für Zelltod durch Apoptose erfolgte der Zusatz des Proteinkinase-Inhibitors Staurosporin (4 µM, Sigma-Aldrich, Taufkirchen), zu den in der Arbeit vorgenommenen Zellkulturen. Staurosporin induziert eine Störung des Transmembranpotentials der Mitochondrien (Harkin et al. 1998).
- ▶ Eine weitere Positivkontrolle für die durch einen Verlust des Transmembranpotentials der Mitochondrien in Zellkulturen induzierte Apoptose war der Zusatz von 100 µM Carbonyl cyanide (trifluoromethoxy) phenylhydrazon (FCCP) 30 min vor Entnahme von Proben der infizierten J774A.1-Makrophagen zur Analyse der Zelltodraten mittels Durchflusszytometrie (Sigma-Aldrich, Taufkirchen). FCCP wirkt als Entkoppler bei der mitochondrialen, oxidativen Phosphorylierung. Diese Störung in der zellulären Energiezufuhr spielt bei eukaryotischen eine essentielle Rolle (Kuruvilla et al. 2003).



► Als Positivkontrolle für die Induktion von nekrotischem Zelltod wurden J774A.1-Makrophagen vor der durchflusszytometrischen Analyse für 10 min einer Temperatur von 60 °C ausgesetzt.

## **2.4 Zelltodanalyse mittels Durchflusszytometrie**

Mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur™ (Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg) konnten TMRE- und PI-gefärbte Zellen identifiziert und die erhobenen Daten mit Hilfe der Software WinMDI 2.8 system (J. Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, Kalifornien) bearbeitet und ausgewertet werden. Mit dieser Methode konnte auf folgende Weise eine Differenzierung zwischen programmiertem (apoptotischen) bzw. nekroseinduziertem Zelltod vorgenommen werden:

### **2.4.1 Gestörte Membranpotentiale**

Essentielle Hinweise für programmierten apoptotischen Zelltod sind Störungen des inneren mitochondrialen Transmembranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) mit sukzessivem völligen Zusammenbrechen des Membranpotentials. Dieser Potentialverlust ist nach Anfärbung der Zellen mit dem spezifischen, fluoreszierenden Farbstoff Tetramethylrhodamineester (TMRE) mit der Methode der Durchflusszytometrie (FACS – Fluorescence-activated cell sorting) nachweisbar.

Für diesen Nachweis wurden 15 min vor Beendigung der zeitlich gestaffelten Versuchsansätze je 250  $\mu$ l der infizierten J774A.1-Makrophagen mit TMRE in einer Endkonzentration von 40 nM in FACS-Tubes (Molecular Probes Europe BV, Leiden) angefärbt. Nach kurzem Schütteln der Tubes wurden diese für 15 min im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert und danach bis zur Durchführung der Messungen auf Eis gelagert.

### **2.4.2 Geschädigte Zellmembranen**

Der Nachweis von durch Nekrose geschädigten Zellmembranen kann durch die transmembranöse Aufnahme von Propidiumiodid (PI) in Zellen mit diesen Membranschäden mittels Durchflusszytometrie verifiziert werden. Dazu wurden 8  $\mu$ l PI mit einer Endkonzentration von 50 ng/ml (Calbiochem, Bad Soden) pro

Ansatz beigefügt, die Proben intensiv gemischt und nach 10 min durchflusszytometrisch analysiert.

## 2.5 Elektromikroskopische Untersuchungen

Für die elektromikroskopischen Untersuchungen wurden zunächst nichtinfizierte J774A.1-Makrophagen in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  in Falcon-Tubes von 6-well-Platten (Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg) ausgesät. Nach Infektion der Makrophagen mit *E. faecium* (ATCC 6057) in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Bakterien in 33,3  $\mu$ l der Bakteriensuspension mit einer Inkubationszeit von 2.5 h mit und einer MOI von 20 wurden die Bakterien mit Lysozym (LZ, 10 mg/ ml) abgetötet und die infizierten Makrophagen für 3.5 h inkubiert. Nach der Gesamtinkubationszeit von 6 h wurden die Makrophagen schonend vom Boden der Inkubationstubes ab gespült, in 1,5-ml-Tubes mit auf 37 °C erwärmter PBS gewaschen und mit je 1 ml glutaraldehydhaltiger Karnovsky-Lösung für 10 min bei 37 °C fixiert. Danach wurden die fixierten Zellen bei 4 °C bis zur elektronenmikroskopischen Untersuchung gelagert.

Für die elektronenmikroskopischen Bildgebungen wurden die fixierten und kühlgelagerten infizierten J774A.1-Makrophagen zunächst auf 37 °C erwärmt und unmittelbar danach in 3,5%ige Agarose eingebettet (FMC Bio Products, Rockland, Maine), und erneut mit Karnovsky-Lösung fixiert. Danach erfolgte eine weitere Fixation der Präparateblöcke für 2 h in Aqua destillata mit 1%igem Osmiumtetroxid (Carl Roth, Karlsruhe) und 1,5%igem Kaliumferrocyanid (Carl Roth, Karlsruhe) sowie die definitive Einbettung in Epoxidharz und die Anfertigung ultradünner Schnitte (30 nm). Die mikroskopischen Untersuchungen erfolgten mit einem Zeiss-LIBRA® 120 Transmissions-Elektronenmikroskop-TEM (Carl Zeiss NTS GmbH, Jena/ Oberkochen).

Negativkontrollen für elektronenmikroskopische Untersuchungen waren:

- Nichtinfizierte J774A.1-Makrophagen,
- Mit *E. faecium* (ATCC 6057) infizierte Makrophagen ohne Lysozymzugabe nach 2.5 h und
- Nichtinfizierte J774A.1, die nach 3.5 h mit Lysozym (LZ, 10 mg/ ml) behandelt wurden.
- Positivkontrollen elektronenmikroskopischer Untersuchungen für Apoptose waren J774A.1-Makrophagen, die 3.5 h lang mit Staurosporin (Stauro, 4  $\mu$ M) inkubiert wurden.
- Positivkontrollen für nekrosebedingten Zelltod waren J774A.1-Makrophagen, die 10 min einer Temperatur von 60 °C ausgesetzt waren.

## 2.6 Immunoblot – Nachweis von Caspasen

Immunoblot-Untersuchungen wurden in der Arbeit vorgenommen, um Proteine zu identifizieren, die im Zusammenhang mit Zelltod gespalten werden.

Speziell standen dabei Spaltprodukte des Proteins Caspase 3 im Vordergrund, die, wie in der Einleitung durch Ergebnisse aus der Literatur belegt, als Marker für apoptotischen Zelltod identifiziert werden konnten. Als Methode für diese Analyse kam die Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) + Poly Acrylamid Gel Elektrophorese (PAGE) zum Einsatz.

### 2.6.1 Proben für SDS-PAGE

Als Proben für SDS-PAGE wurden je  $4 \times 10^6$  J774A.1-Makrophagen und Makrophagen aus Knochenmark zusammen mit je 2 ml antibiotikafreiem Medium auf 6-well-Platten ausgesät und mit *E. faecium* (ATCC 6057) bei einer MOI von 20 infiziert. Nach Inkubationszeiten von 1 h und 2 h wurden je 250  $\mu$ l der Zellsuspensionen entnommen. Die in den verbliebenen Zellsuspensionen noch vorhandenen Enterokokken wurden 2.5 h nach Infektionsbeginn mit Zugabe von 15  $\mu$ l Lysozym (LZ, 10 mg/ ml) abgetötet, 0.5 h und 1.5 h danach wurden nochmals je 250  $\mu$ l der Zellsuspensionen entnommen. Die Zellsuspensionen wurden auf Eis gelagert und nach Versuchsende für 5 min bei 400 g und 4 °C

zentrifugiert. Die Zellpellets wurden schonend vom Boden der Tubes abgelöst, in 1 ml PBS resuspendiert und erneut für 5 min bei 400 g und 4 °C zentrifugiert.

Diese Zellpellets wurden in 40 µl Lysispuffer (pH 7,4; 50 mM Trispuffer; 137 mM NaCl, 50 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); 0,5% Nonidet P40 (Merck, Darmstadt) für 30 min bei 4 °C resuspendiert und für 10 min mit 10.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Je 20 µl des Überstands des Zentrifugats wurden in Laemmli-Puffer (pH 6,8; 125 mM HCl-Trispuffer; 1 M Dithiothreitol (DTT); 50% (v/v) Glycerin; 20% (v/v) Natriumdodecylsulfat (SDS); 0,5% (v/v) Bromophenolblau (Sigma, Taufkirchen) aufgenommen. Danach erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 95 °C in einem Thermoinkubator (Eppendorf, Hamburg) und die abschließende Lagerung bei einer Temperatur von -20 °C.

Das Trenngel bildet die unterste Schicht der Gelformation und dient der Auftrennung der vorhandenen Proteine. In der vorliegenden Arbeit wurde ein 10%iges SDS-Trenngel eingesetzt.

Das Sammelgel (20% SDS) ist die oberste Schicht. In ihm werden die Proteine positioniert und auf gleicher Höhe gesammelt. Die polymerisierten Gele wurden zunächst in die Gelkammern gestellt und diese mit SDS-Laufpuffer (pH 8,3; 25 mM Trispuffer; 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS) aufgefüllt (Merck, Darmstadt). Die Laufzeit der Proben unter Anlage einer Stromstärke von 30 mA (Milliamper) erfolgte bis zum Erreichen einer gemeinsamen Linie und nach Erhöhen der Stromstärke auf 60 mA erfolgte die Auftrennung der Proteine.

Der Proteintransfer aus dem Gel auf die Nitrozellulose-Membran erfolgte unter Anlage einer Stromstärke von 300 mA in einer Western-Blot-Kammer mittels einer zwischen 2 Glasplatten angefertigten Schichtung aus Gel-Cast, Nitrozellulose-Membran, Bütten (Whatman)-Papier und Schwämmen.

Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden durch 2-stündiges Einlegen der Membran in 5% Milchpulver, gelöst in Blockpuffer (Bovine Serum Albumin - BSA), blockiert.

### 2.6.2 Immundetektion

Für die Immundetektion der Proteine wurden die Membranen mit dem Anti-Rabbit-Primärantikörper Anti-Caspase-3, Kurzbezeichnung 8G10 (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) bzw. mit dem Anti-Rabbit-Primärantikörper Anti-Caspase-1, Kurzbezeichnung sc-514 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) für 24 h bei 4 °C auf einem Rolleninkubator (Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim) inkubiert. Danach wurden die Membranen 3-mal für 10 min mit Blockpuffer in einem Schüttelinkubator (Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim) gewaschen.

Neben den Anti-Caspase 1 und 3 Primärantikörpern erfolgte eine Immundetektion für das Protein  $\beta$ -Aktin. Dafür wurde die Membran über 12 h bei 4 °C mit dem MCL Anti-Rabbit-Primärantikörper Anti- $\beta$ -Aktin mit der Kurzbezeichnung AC-15 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) inkubiert.

Für die Sichtbarmachung der gebundenen Primärantikörper wurden die Membranen mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti-Rabbit-Sekundärantikörper (Bioz Dako, Hamburg) für 60 min in Blockpuffer bei 24 °C in einem Rolleninkubator inkubiert. Danach wurde die Membran 3-mal mit Blockpuffer für je 10 min in einem Schüttelinkubator gewaschen.

## 2.7 Laktatdehydrogenase

Ein Marker für nekrotischen Zelltod ist die Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) aus Zytoplasma, wenn die Zellmembran nekroseinduziert zunächst permeabel und sukzessive gänzlich zerstört wird.

Für die Messung von Laktatdehydrogenase (LDH) wurden J774A.1-Makrophagen in 24-well-Platten in 1 ml Kulturmedium ohne Antibiotika und ohne FCS ausgesät und mit *E. faecium* (ATCC 6057) in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  pro Vertiefung infiziert. 6 h nach Infektion wurden je 950  $\mu$ l des Zellkultur-Mediums abgenommen, in Tubes von 1,5 ml pipettiert und 5 min bei 400 g und 4 °C zentrifugiert. Je 10  $\mu$ l des Überstandes nach Zentrifugation wurden für die LDH-Analyse eingesetzt.

Folgende Versuchsansätze wurden untersucht:

- *E. faecium* (ATTC 6057) MOI 20,
- *E. faecium* (ATTC 6057) MOI 20 mit 10 mg/ ml Lysozym,
- *E. faecium* (ATTC 6057) MOI 200,
- *E. faecium* (ATTC 6057) MOI 200 mit 10 mg/ ml Lysozym,
- Positivkontrolle von J774A.1-Makrophagen bei 60 °C für 10 min,
- Negativkontrolle – Kulturmedium ohne Antibiotika und FCS,
- Negativkontrolle – Kulturmedium mit 10 mg/ ml Lysozym ohne Antibiotika und FCS.

Die LDH-Analysen wurden mit dem LDH-P Monokit durchgeführt (Biocon, Vöhl).

## 2.8 In-vivo-Infektionsmodell

Für die in der Arbeit vorgenommenen Tierversuche lag über die Einrichtung für Tierschutz, tierärztlichen Dienst und Labortierkunde der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität eine Genehmigung des Regierungspräsidiums Tübingen, Referat 35, vom 07.01.2009 vor.

### 2.8.1 Versuchstiere

Für die In-vivo-Versuche wurden weibliche, 10 bis 14 Wochen alte Mäuse vom Typ C57BL/6x129/Sv verwendet (Charles River, Sulzfeld).

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in Kleintierkäfigen bei konstanter Raumtemperatur von 20 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 60 – 75%. Zweimal pro Woche wurden die Käfige gesäubert und neu eingestreut. Wasser und Futter waren gut zugänglich und wurden täglich erneuert.

### 2.8.2 Peritonitismodell

Für die In-vivo-Untersuchungen wurden 5 Versuchsgruppen gebildet, wobei für die Untersuchungen pro Gruppe 2 bis 3 Tiere zur Verfügung standen.

Die Infektionsversuche erfolgten unter Narkose mit Inhalation von CO<sub>2</sub>. Nach Desinfektion der Bauchhaut mit Isopropanol erfolgte die intraperitoneale (i.p.) Injektion von versuchsrelevanten Substanzen (200 µl PBS, 2 mg Lysozym) und Bakterien (1 x 10<sup>8</sup> *E. faecium* ATCC 6057).

Von den 15 Versuchstieren waren während der Narkoseeinleitung 3 der Tiere gestorben. Die überlebenden 12 Tiere verteilten sich entsprechend der i.p. injizierten Substanzen auf folgende Gruppen:

- Gruppe – PBS (Tiere 1 und 2),
- Gruppe – PBS mit Lysozym (Tiere 3 und 4),
- Gruppe – PBS mit *E. faecium* (Tiere 5 und 6),
- Gruppe – PBS mit Lysozym und *E. faecium* (Tiere 7, 8 und 9),
- Gruppe – PBS mit *E. faecium*; Lysozym nach 2.5 h (Tiere 10, 11 und 12).

48 Stunden nach Infektionsinduktion wurden Peritoneallavagen mit je 15 ml PBS (4 °C) durchgeführt. Für die Durchführung der Peritoneallavage wurden die Versuchstiere durch Inhalation von CO<sub>2</sub> narkotisiert. Die Tötung erfolgte durch Luxation der Halswirbelsäule mittels ruckartigen Streckens der Mäuse. Anschließend wurde die Bauchhaut mit Isopropanol desinfiziert und 15 ml PBS transkutan in die Peritonealhöhle injiziert. Nach Massieren der Bauchregion wurde die intraabdominal befindliche Flüssigkeit unter sterilen Kautelen aspiriert. Die gewonnene Lavageflüssigkeit von ca. 12 ml pro Tier wurde in sterilen Tubes bei 4 °C gelagert. Von diesen Lavagen wurden jeweils 4 ml pro Tier abgenommen und für nachfolgende Positivkontrollen in einem 50 ml-Tube gepoolt. Die gesammelten Zellsuspensionen (8 ml pro Versuchstier; 48 ml gepoolt) wurden für 5 min bei 400 g zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Nach Resuspension der Pellets in 2 ml antibiotikafreiem J774A1-Kulturmedium wurde je 1 ml der Zellsuspension in zwei Reaktionsgefäße mit einem Volumen von 2 ml überführt. Der Inhalt dieser 2 Reaktionsgefäße diente als Positivkontrollen einerseits für apoptotischen Zelluntergang mit FCCP (Inkubation mit 2 µl/ml für 15 min bei 37 °C) und andererseits für nekrotischen Zelltod durch Erwärmung der Zellen auf 60 °C für die Dauer von 10 min. Zur Vorbereitung der durchflusszytometrischen Analyse für die Positivkontrollen wurden die Zellen in den Reaktionsgefäßen mit TMRE (49 nM/ml) und mit PI (50 ng/ml) für 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mit F4/80-APC-Antikörpern (1 µl pro Tube) für 30 min inkubiert (Serotec GmbH, Düsseldorf) und anschließend bei 4 °C bis zur Durchführung der FACS gelagert.

Weitere Anteile der resuspendierten Zellen wurden zu je 250  $\mu$ l in 4 FACS-Röhrchen pipettiert. Für die Analyse der Zelltodrate der aus den Peritoneallavagen gewonnenen Makrophagen wurden die Lavagen wie bei der Vorbereitung der Kontrollversuche zentrifugiert, die Pellets in 250  $\mu$ l antibiotikafreiem-Kulturmedium resuspendiert und anschließend mit TMRE und PI gefärbt sowie danach mit APC-markiertem F4/80-Antikörper inkubiert und anschließend bei 4 °C bis zur Durchführung der durchflusszytometrischen Analyse gelagert.

## **2.9 Statistik**

Für die In-vitro-Experimente wurden jeweils mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Bedingungen wurden mittels des Student- t-Test berechnet. Als statistisch signifikant wurde eine Differenz von  $p < 0,05$  angesehen.



## 3 Ergebnisse

Parallel zu den Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen Versuchen wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen J774A.1-Makrophagen mit Enterokokken (*E. faecium* (ATCC 6057) bei differenten MOI infiziert. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass *E. faecium* bei Exposition mit Lysozym den Zelltod von Makrophagen in-vitro und in-vivo induziert. Durchflusszytometrische Analysen von infizierten J774A.1-Makrophagen ergaben eine vermehrte Aufnahme von PI und damit einen Verlust der Zellmembranintegrität sowie eine Abnahme des inneren mitochondrialen Transmembranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) (Gröbner et al. 2010). Weiterhin konnte in diesen Untersuchungen gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung von *E. faecium* mit Lysozym und nachfolgend mit Breitspektrumprotease zu einer deutlichen Verminderung von Zelltod bei infizierten Makrophagen führt. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass möglicherweise eine direkte Interaktion *E. faecium* mit Zellmembranen von Makrophagen den Zelltod der infizierten J774A.1-Makrophagen induziert hatte (Gröbner et al. 2010).

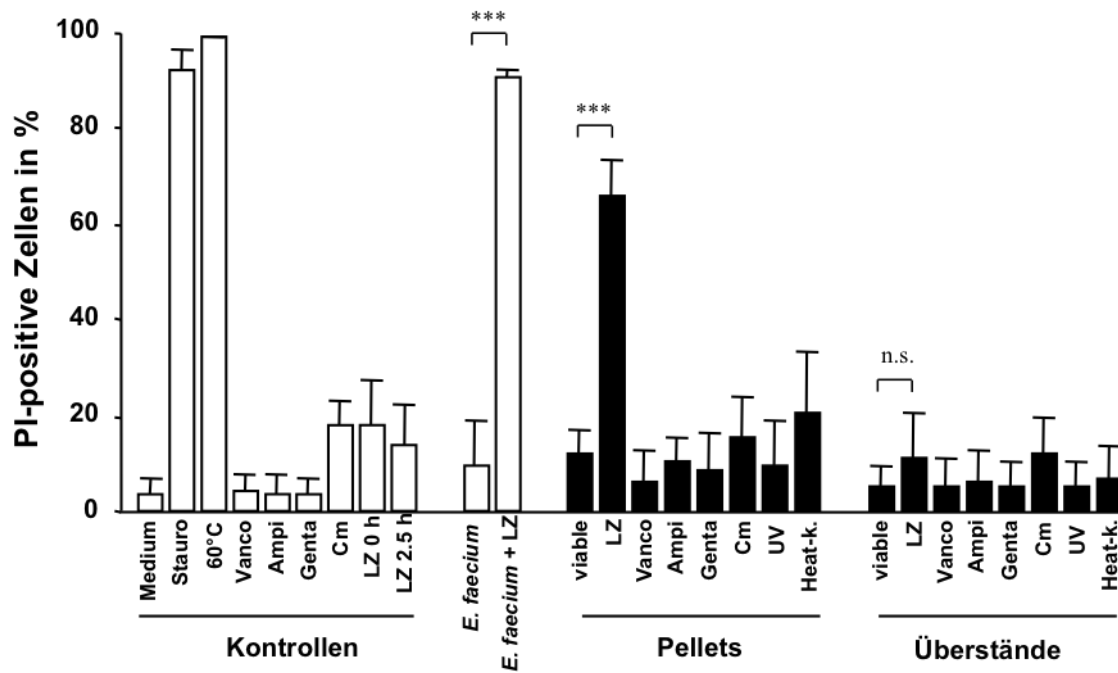
### 3.1 Durch *E. faecium* induzierter Zelltod bei J774A.1-Makrophagen

Um differenzieren zu können, ob zentrifugierte bakterielle Komponenten von *E. faecium* (Pellets) oder lösliche bzw. unlösliche Bestandteile im durch Zentrifugation entstandenen Überstand (Supernatants) den Zelltod von J774A.1-Makrophagen (ATCC 2007) induzieren, wurde ein Vorversuch zur Analyse und möglichen Differenzierung zelltodinduzierender Faktoren bei Makrophagen durchgeführt.

#### 3.1.1 Differenzierung Zelltod-induzierender Faktoren

Für diesen Vorversuch erfolgte eine Inkubation von *E. faecium* mit Lysozym. Als Kontrollen dienten verschiedene Antibiotika (Vancomycin, Ampicillin, Gentamycin, Chloramphenicol), der Proteinkinaseinhibitor Staurosporin und der Entkoppler der Atmungskette FCCP zur Induktion von Apoptose. Die Erhitzung der

Bakterien für 10 min bei 60 °C und UV-Bestrahlung dienten zur Induktion von nekrotischem Zelltod und Zellkulturmedium als negative Kontrolle. Nach einer Inkubationszeit von 6 h wurden die Versuchsansätze mittels Durchflusszytometrie auf eine intrazelluläre Anreicherung von PI untersucht (Abb. 1).



**Abb.1:** Analyse der Zelltodinduktion durch Pellets bzw. Überstände von *E. faecium* nach Antibiotikavorbereitung.

*E. faecium* (ATCC 6057) wurde durch Zugabe von 10 µl Lysozym (LZ, 10 mg/ml) oder verschiedene Antibiotika wie Vancomycin (Vanco, 10 mg/ml), Ampicillin (Ampi, 100 mg/ml), Gentamicin (Genta, 10 mg/ml) bzw. Chloramphenicol (Cm, 50 mg/ml) und anschließender Inkubation für 60 min im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> vorbehandelt. Als Kontrollen dienten Kulturmedium, Staurosporin (Stauro, 4 µM), mit 60 °C vorbehandelte *E. faecium* sowie *E. faecium*, denen zu Beginn des Versuchs Lysozym (LZ, 10 mg/ml) bzw. 2.5 h nach Inkubationsbeginn Lysozym (LZ, 10 mg/ml) zugegeben wurde (multiplicity of infection; MOI 20).

Um den Einfluss von Pellets und Überständen auf den Zelltod von Makrophagen zu testen, wurden J774A.1-Makrophagen mit vorbehandelten Bakterienkulturen (MOI 200) inkubiert. Dazu wurden vitale Bakterien mit und ohne Lysozym bzw. mit den aufgeführten Antibiotika inkubiert. Weitere Versuche erfolgten mit *E. faecium* nach Vorbehandlung mit UV-Strahlen sowie mit für 10 min auf 95 °C erhitzten *E. faecium* (heat-killed).

6 h nach Beginn der Versuche wurden die Makrophagen durchflusszytometrisch auf das Vorliegen von Propidiumiodid (PI)-Positivität analysiert.

Die dargestellten Daten sind für 3 unabhängige Versuche repräsentativ und sind Mittelwerte aus 3 Parallelbestimmungen. Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen wurden im Diagramm als statistisch nichtsignifikant (n.s.) bzw. hochsignifikant  $p < 0,001$  (\*\*\*) gekennzeichnet.

Bei den Kontrollen wurde den J774A.1-Makrophagen Kulturmedium, Antibiotika und LZ ohne *E. faecium* beigefügt. In 3 weiteren Kontrollversuchen wurde der

Zelltod durch Zugabe von Staurosporin, *E. faecium* plus Lysozym (LZ) und Temperatureinwirkung von 60 °C induziert (Abb.1).

Die Durchflusszytometrie zeigte nach Zugabe von Staurosporin  $92,0 \pm 4,6\%$  PI-positive Makrophagen ( $p < 0,001$ ). Nach Erwärmung auf 60 °C waren  $99,0 \pm 0,2\%$  der Makrophagen PI-positiv und 2,5 h nach Zugabe von *E. faecium* plus LZ (MOI 20) betrug der Anteil PI-positiver Zellen  $83,6 \pm 2,1\%$  ( $p < 0,001$ ).

Bei Inkubation von Makrophagen mit Überständen LZ- bzw. Antibiotika-behandelter, UV-bestrahlter bzw. erhitzter Bakterienkulturen betrug die Mittelwerte des Anteils PI-positiver Makrophagen nur zwischen 4,2 bis 9,6% (n. s.). Damit konnte nachgewiesen werden, dass in den Überständen keine Substanzen vorhanden waren, die einen Zelltod von Makrophagen induzieren.

Im Vergleich zu den Ergebnissen der Inkubation mit Überständen zeigten Pellet-Proben, welche mit Lysozym (LZ) behandelt wurden, einen deutlichen, zelltodinduzierenden Effekt. Nach Inkubation von Pellets über 2,5 h und Zugabe von LZ (MOI 200) betrug der Anteil PI-positiver Makrophagen  $90,4 \pm 2,1\%$  ( $p < 0,001$ ). Dieses Ergebnis lag damit im Vergleich mit dem Anteil PI-positiver Makrophagen von  $20,9 \pm 12,6\%$  nach Zelltodinduktion durch hitzegetötete Bakterien hochsignifikant höher (Abb. 1). Insgesamt deuten die Ergebnisse auf Zelltodinduktion durch nichtlösliche Bestandteile von Enterokokken hin, wobei eine Vorbehandlung der Bakterien mit Lysozym essentiell ist.

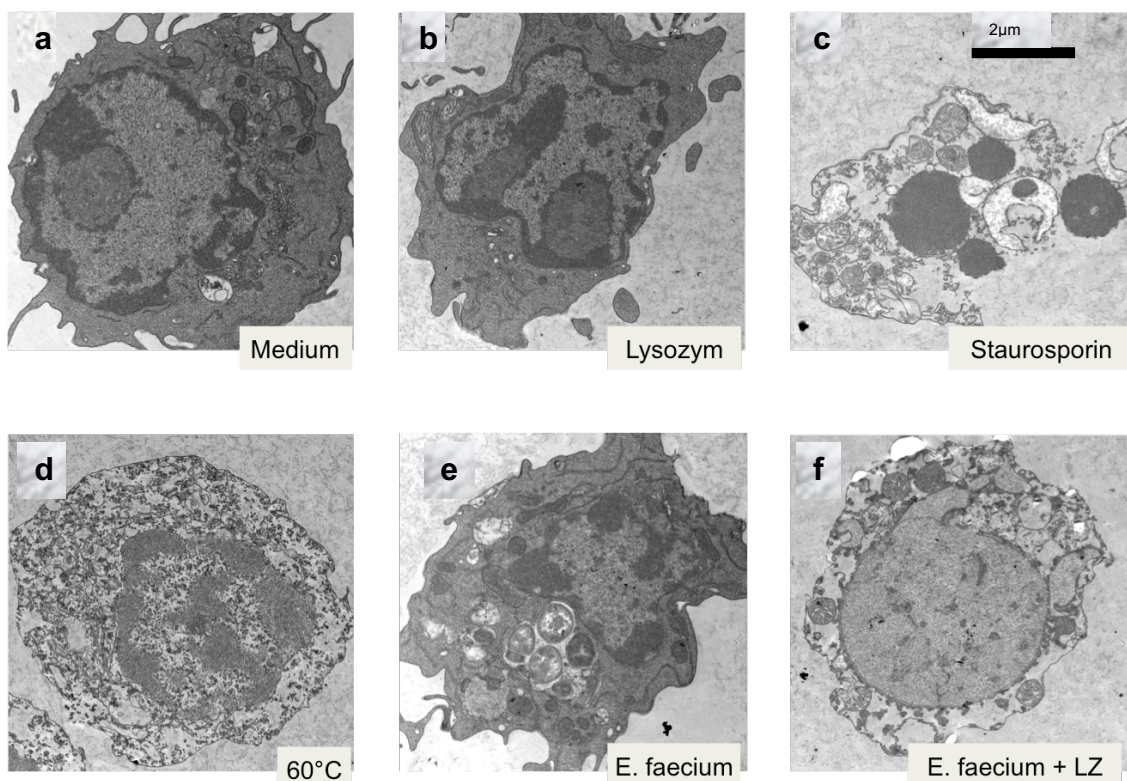
### **3.2 Art des Zelltods von Makrophagen durch *E. faecium***

Um eine Differenzierung zwischen einem durch *E. faecium* induzierten Zelltod von Makrophagen hinsichtlich Apoptose oder Nekrose vornehmen zu können, erfolgten in der vorliegenden Arbeit elektronenmikroskopische Untersuchungen, Bestimmungen von Laktatdehydrogenase und Immunoblot-Analysen von Caspasen.

#### **3.2.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen von J774A.1-Makrophagen**

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden als Negativkontrollen nichtinfizierte J774A.1-Makrophagen (ATCC 2007), 2.5 h nach mit *E. faecium* (ATCC 6057) infizierte Makrophagen ohne Lysozymzugabe und

nichtinfizierte J774A.1-Makrophagen mit Lysozym-Zugabe (LZ, 10 mg/ ml) für die Dauer von 3.5 h eingesetzt. Als Positivkontrollen für das Vorliegen einer Apoptose wurden bei den elektronenmikroskopische Untersuchungen J774A.1-Makrophagen verwendet, die nach einer Zellkultur von 3.5 h mit Staurosporin (Stauro, 4  $\mu$ M) inkubiert worden waren. Als Positivkontrollen für nekrosebedingten Zelltod dienten J774A.1-Makrophagen, die für 10 min einer Temperatur von 60 °C ausgesetzt waren (Abb. 2; nach Gröbner et al. 2010).



**Abb. 2: Transmissionselektromikroskopische Analyse von J774A.1-Markrophagen (nach Gröbner et al. 2010).**

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von J774A.1 Makrophagen angefertigt, die für 6 h mit *E. faecium* (ATCC 6057, MOI 20) ohne bzw. mit Zugabe von Lysozym nach 2,5 h infiziert waren. Unbehandelte Makrophagen (Medium) und Makrophagen, die nur mit Lysozym (LZ, 10 mg / ml) behandelt worden waren, dienten als Negativkontrollen. Makrophagen, welche mit Staurosporin bzw. mit 60°C für 10 min hitzebehandelt wurden, dienten als Kontrollen für Apoptose bzw. Nekrose. Der Maßstab beträgt in allen 6 Teilabbildungen (a – f) 2  $\mu$ m. Die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder erfolgte durch Frau Birgit Fehrenbacher (MTA in der Abteilung von Prof. Dr. med. M. Schaller – Dermatologie, Universitätsklinikum Tübingen)

Um typische morphologische Merkmale von Apoptose bzw. Nekrose zu analysieren, wurden J774A.1-Makrophagen für 6 h mit *E. faecium* (ATCC 6057, MOI 20) infiziert und 2,5 h nach Infektion erfolgte die Zugabe von Lysozym (LZ, 10 mg/ ml).

Wie in Abb. 2 (nach Gröbner et al. 2010) dargestellt, hatten Makrophagen, die nur mit Lysozym inkubiert worden waren eine intakte Zellmorphologie (Abb. 2b). Die morphologischen Eigenschaften dieser mit Lysozym inkubierten Makrophagen war identisch mit den ohne Lysozym in Kulturmedium gezüchteter Makrophagen (Abb. 2a).

Morphologische Zeichen von apoptotischen Zelltod, wie z.B. Zellschrumpfung, Chromatinkondensation und Fragmentierung des Zellkerns, waren als Positivkontrolle bei Makrophagen zu erkennen, die für 6 h mit Staurosporin inkubiert worden waren (Abb. 2c).

Im Gegensatz dazu zeigten Makrophagen nach 10-minütiger Temperatureinwirkung von 60 °C als Positivkontrolle für nekrotischen Zelltod die typischen Merkmale wie vakuolisiertes Zytoplasma ohne Zellschrumpfung (Abb. 2d).

Als Negativkontrollen wurde neben der Inkubation von nichtinfizierten und in Kulturmedium befindlichen Makrophagen eine Infektion der Makrophagen durch *E. faecium* ohne Zugabe von Lysozym vorgenommen (Abb. 2e). Bei diesem Versuch zeigten sich ebenfalls intakte Makrophagen ohne Vakuolisierung, Zellschrumpfung oder Kernfragmentierung.

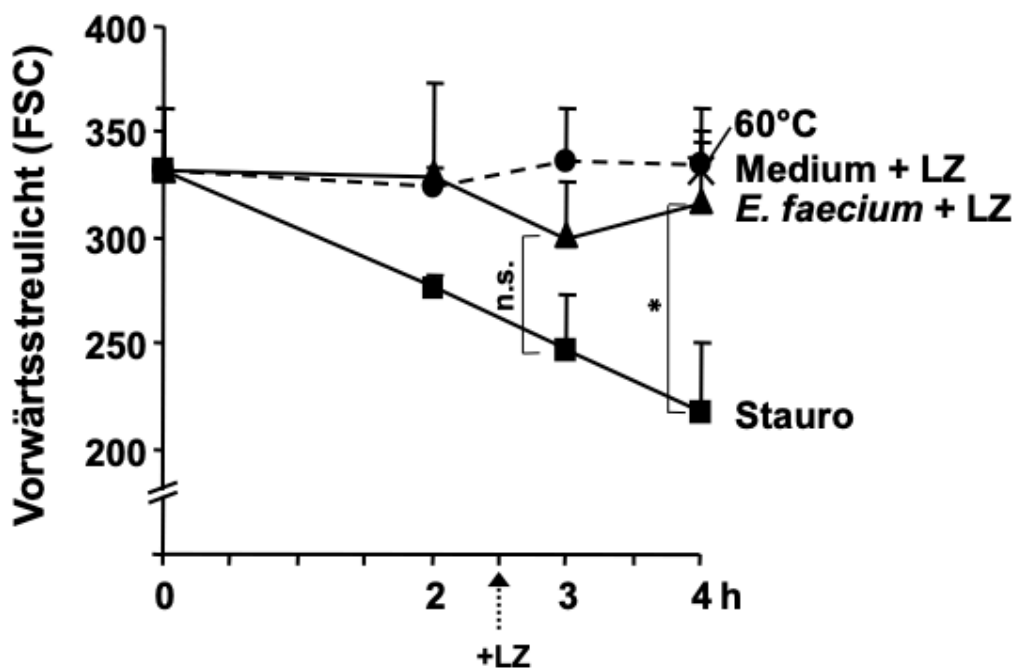
Typische Zeichen einer Zellnekrose, vergleichbar mit Temperatureinwirkung von 60 °C, waren bei Makrophagen zu beobachten, die 6 h mit *E. faecium* infiziert und bei denen 2,5 h nach Versuchsbeginn eine Zugabe von Lysozym (LZ, 10 mg/ ml) erfolgt war. Bei diesen Zellen zeigten sich eine nekrosetypische Vakuolisierung des Zytoplasmas sowie deutliche Zeichen von Zellschwellung. Dagegen waren bei der Auswertung der Transmissionselektronen-mikroskopischen Analyse keine apoptotischen Zeichen wie Kernfragmentierung oder Zellschrumpfung zu beobachten (Abb. 2f).

### **3.2.2 Nekroseinduzierte Zellschwellung**

Nekrotischer Zelltod ist durch intrazelluläre Na<sup>+</sup> Anreicherung und damit einhergehende Zellschwellung charakterisiert. Der begleitende K<sup>+</sup> Ausstrom kann die Zellschwellung der nekrotischen Zellen bremsen und ist die Ursache für die Zellschrumpfung während der Apoptose (Bortner et al. 1997; Carini et al. 1999). Um die Zellschwellung zu objektivieren, wurde zur Messung der Zellgröße von

Makrophagen das Vorwärtstreulicht (Forward Scatter - FSC) zeitabhängig zur Infektion mit *E. faecium* ermittelt. Dabei korreliert das Maß der Beugung, bzw. die Menge des gestreuten Lichts mit der entsprechenden Zellgröße.

Zunächst wurde in einem ersten Versuchsansatz das FSC der Makrophagen nach Zugabe von Staurosporin, bei Hitzeeinwirkung von 60 °C sowie bei Infektion und Zugabe von Lysozym und bei Inkubation in Kulturmedium und Zugabe von Lysozym (LZ, 10 mg/ ml), 2,5 h nach Beginn der Infektion bestimmt (Abb. 3; nach Gröbner et al. 2010).



**Abb.3: Zellgröße von J774A.1-Makrophagen nach Infektion mit *E. faecium* (nach Gröbner et al. 2010).**

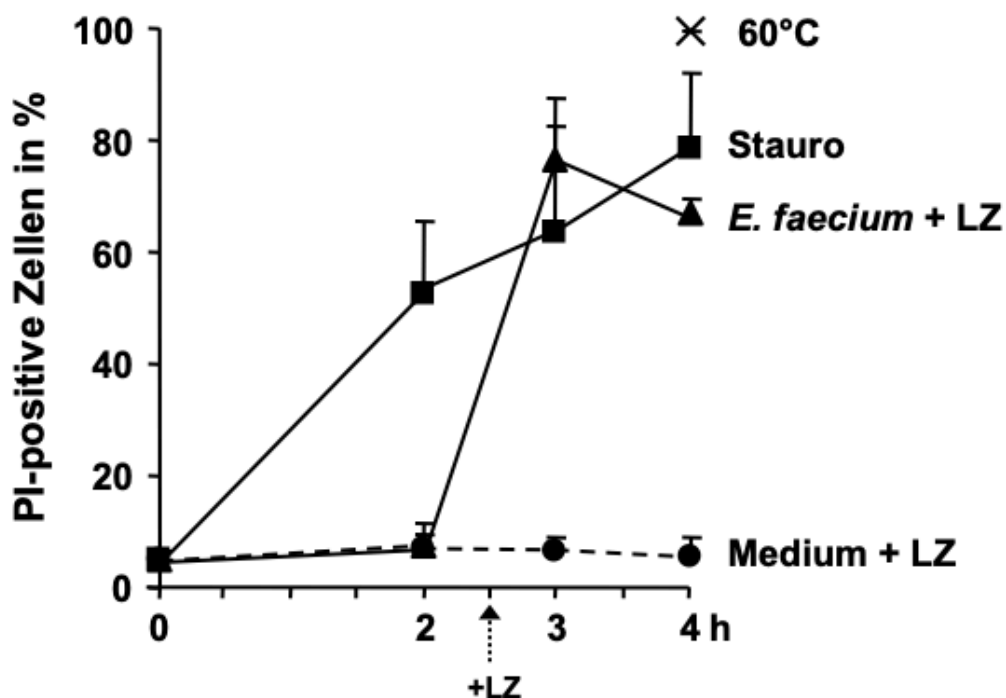
J774A.1 Makrophagen wurden mit *E. faecium* (ATCC 6057, MOI 20) infiziert. 2,5 h nach Beginn der Infektion wurden die Bakterien durch Zugabe von Lysozym (LZ, 10 mg/ ml) abgetötet. Proben wurden am Versuchsbeginn, nach 2 h, 2,5 h, 3 h und am Versuchsende (nach 4 h) abgenommen und der FSC durchflusszytometrisch analysiert.

Als Kontrollen wurden J774A.1 Makrophagen nur mit Zellkulturmedium bzw. mit Lysozym (LZ) behandelt. Staurosporin (Stauro) diente als Negativkontrolle für Zellschrumpfung (apoptotischer Zelltod) und für 10 min auf 60 °C erhitzte J774A.1 Makrophagen fungierten als Positivkontrollen für Nekrose mit deutlicher Zellschwellung.

Die dargestellten Daten sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen. Unterschiede zur entsprechenden Kontrolle sind wie folgt dargestellt: n.s. = nicht signifikant; \*  $p < 0,05$ .

Wie in der Abb. 3 dargestellt (nach Gröbner et al. 2010), fanden sich 2 – 4 h nach Infektion von J774A.1 mit *E. faecium* keine wesentlichen Veränderungen des

FSC. Ähnlich verhielt es sich mit den Makrophagen, die 10 min bei 60 °C erhitzt worden waren. Im Gegensatz dazu war bei Staurosporin-behandelten, apoptotischen Makrophagen eine signifikante Abnahme des FSC zu beobachten. Die fehlende Schrumpfung der *E. faecium*-infizierten Makrophagen bzw. ihr gleichbleibendes Zellvolumen – ähnlich der 60 °C-behandelten nekrotischen Kontrollzellen – deutet auf eine Induktion nekrotischen Zelltods durch *E. faecium*. In einem 2. Versuchsansatz wurde die Zahl der PI-positiven Makrophagen durchflusszytometrisch unter denselben Versuchsbedingungen wie in Abb. 3 in Prozent bestimmt (Abb. 4; nach Gröbner et al. 2010).



**Abb.4:** Anteil PI-positiver J774A.1-Makrophagen nach Infektion mit *E. faecium* (nach Gröbner et al. 2010).

J774A.1 Makrophagen wurden mit *E. faecium* (ATCC 6057, MOI 20) infiziert. Nach 2,5 h wurden die Bakterien durch Zugabe von Lysozym (LZ, 10 mg/ ml) abgetötet, die Makrophagen mit PI angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

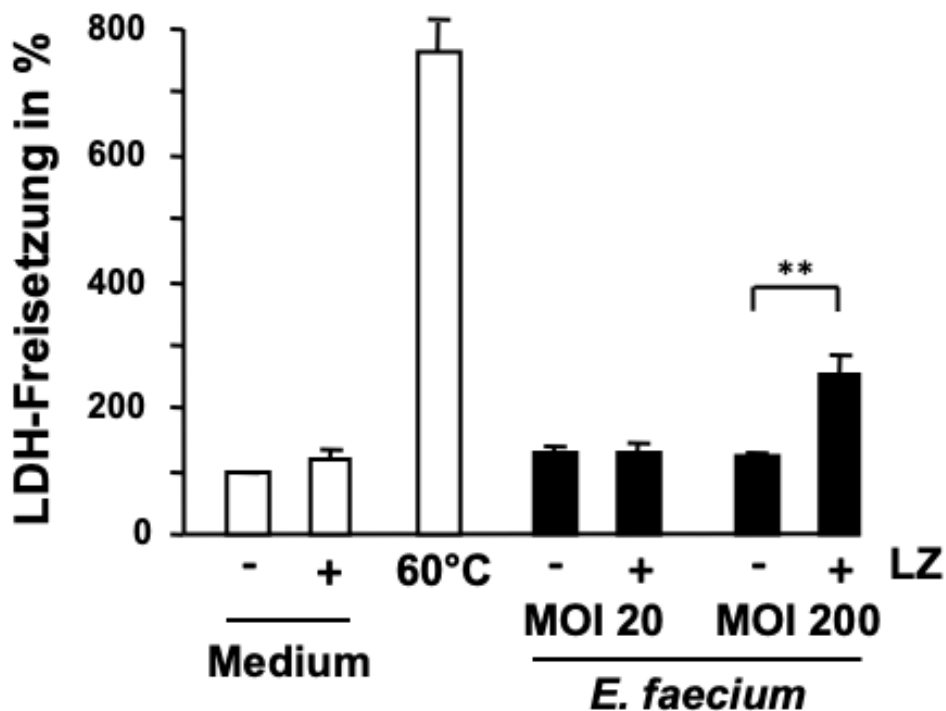
Als Kontrollen dienten folgende Versuchsansätze: Inkubation der Makrophagen in Kulturmedium mit Zugabe von Lysozym, mit Staurosporin (Stauro, 4 µM) behandelte Makrophagen sowie für 10 min auf 60 °C erhitzte Makrophagen. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen.

Wie in Abb. 4 dargestellt, betrug der Mittelwert von PI-positiven Makrophagen 4 h nach Versuchsbeginn bei für 10 min auf 60 °C erhitzten Zellen 100%, nach Zugabe von Staurosporin 80%, bei mit *E. faecium* infizierten Makrophagen und Zugabe von Lysozym (LZ) 70% und bei Inkubation in Kulturmedium und Zugabe von LZ lediglich 5% (nach Gröbner et al. 2010). Diese Daten weisen darauf hin, dass mit *E. faecium* infizierte Makrophagen einen durch Nekrose induzierten Zelltod mit großen, nicht geschrumpften Zellkörpern aufweisen. Als positive Kontrolle für diese Form des Zelltods diente der hitzeinduzierte Versuchsansatz. Im Kontrast dazu wiesen die mit Staurosporin inkubierten Makrophagen ebenfalls einen hohen Prozentsatz von PI-positiven Zellen auf, jedoch wiesen diese Zellen eine starke Schrumpfung und damit Zeichen eines apoptotischen Zelltods auf.

### 3.2.3 LDH-Messung bei J774A.1 – Makrophagen

Ein weiteres Merkmal von nekrotischem Zelltod ist die Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) aus dem Zytosol durch die zerstörte Zellmembran. Dazu wurden J774A.1-Makrophagen 6 h mit *E. faecium* und Zugabe von Lysozym in unterschiedlicher MOI infiziert und der Kulturüberstand anschließend auf den Nachweis von LDH analysiert. Wie in Abb. 5 dargestellt (nach Gröbner et al. 2010), konnte keine LDH-Freisetzung beobachtet werden, wenn die Zellen mit einer MOI von 20 infiziert wurden. Hingegen war die LDH-Konzentration im Überstand der Makrophagen, die mit *E. faecium* bei einer MOI von 200 in Anwesenheit von Lysozym infiziert wurden 1,8 mal höher im Vergleich zu den Zellen, die mit *E. faecium* (MOI 200) ohne Zugabe von Lysozym infiziert wurden. Als Ergebnis dieses Versuchsansatzes kann geschlussfolgert werden, dass eine Infektion mit *E. faecium* und hoher MOI von 200 nach Zugabe von Lysozym, im Vergleich zu einer geringeren MOI von 20, eine signifikant höhere LDH-Freisetzung ( $p < 0,01$ ) aus infizierten J774A.1-Makrophagen bewirkt.





**Abb. 5: LDH-Freisetzung aus J774A.1-Makrophagen nach Infektion mit *E. faecium* (nach Gröbner et al. 2010).**

J774A.1-Makrophagen wurden mit *E. faecium* (ATCC 6057, MOI 20 und MOI 200) infiziert und nach 2,5 h wurde Lysozym (LZ) zugegeben. Nach 6 h wurden die Überstände der Zellkulturproben abpipettiert und im Spektralphotometer auf LDH-Gehalt analysiert. Als Negativ-Kontrolle diente Medium mit und ohne Anwesenheit von Lysozym und als Positiv-Kontrolle wurden Zellen für 10 min. bei 60 °C erhitzt. Als Vergleichsgröße für die LDH-Freisetzungen diente der LDH-Gehalt im Überstand von nichtinfizierten Makrophagen in Kulturmedium ohne LZ-Zugabe (Diagrammsäule Medium minus), der in diesem Versuch auf 100% festgelegt worden war.

Die Daten sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Die signifikanten Unterschiede zwischen der Probe mit Lysozym zur Probe ohne Lysozymzugabe wurden wie folgt dargestellt:

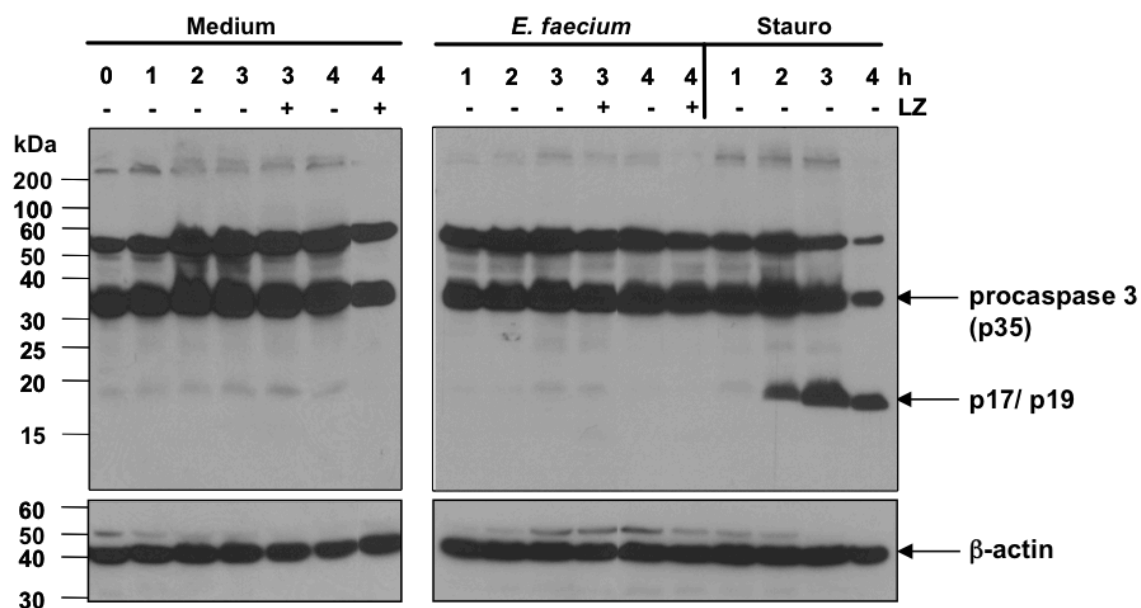
\*\*  $p < 0,01$ .

### 3.2.4 Caspase 3 – Immunoblot – J774A.1-Makrophagen

Um den durch Infektion mit *E. faecium* induzierten Zelltod von Makrophagen hinsichtlich nekrotischer bzw. apoptotischer Zellzerstörung detaillierter analysieren zu können, wurde ein Immunoblotting für Caspase 3 von durch *E. faecium* infizierten J774A.1-Makrophagen durchgeführt. Bei der apoptotischen Form des Zelltods spielen Caspasen und besonders die Aktivierung von Caspase 3 eine dominierende Rolle. So sind Caspasen, die eine Gruppe von Cystein-Proteasen bilden, zentrale Regulatoren der Apoptose. Eingeleitet wird

die Apoptose mit der Aktivierung von Effektor-Procaspase 3, vermittelt durch die Initiator-Caspasen 8 und 9 über deren Todesrezeptor- bzw. mitochondrialen Signalweg. Nachfolgend initiiert die mittels Hydrolyse aktivierte Procaspase 3 das Apoptoseprotein Caspase 3, indem Procaspase 3 (p35) in die zwei aktiven Caspase-3 Formen (p17 und p19) prozessiert wird.

Wie in Abb. 6 dargestellt (nach Gröbner et al. 2010), konnten die Spaltprodukte von Caspase 3, p17 und p19, nach Zugabe von Staurosporin zu mit *E. faecium* infizierten J774A.1-Makrophagen 2 und 4 h nach Versuchsbeginn nachgewiesen werden, woraus auf Zelltod durch Apoptose geschlossen werden konnte. Im Gegensatz dazu war diese Procaspase-3-Spaltung während der ersten 4 h nach der Infektion mit *E. faecium* nicht nachweisbar, woraus geschlussfolgert werden konnte, dass der durch *E. faecium* induzierte Zelltod von J774A.1-Makrophagen nicht durch Caspase-Spaltprodukte vermittelt wird und damit nicht apoptotisch, sondern durch Zellnekrose erfolgt.



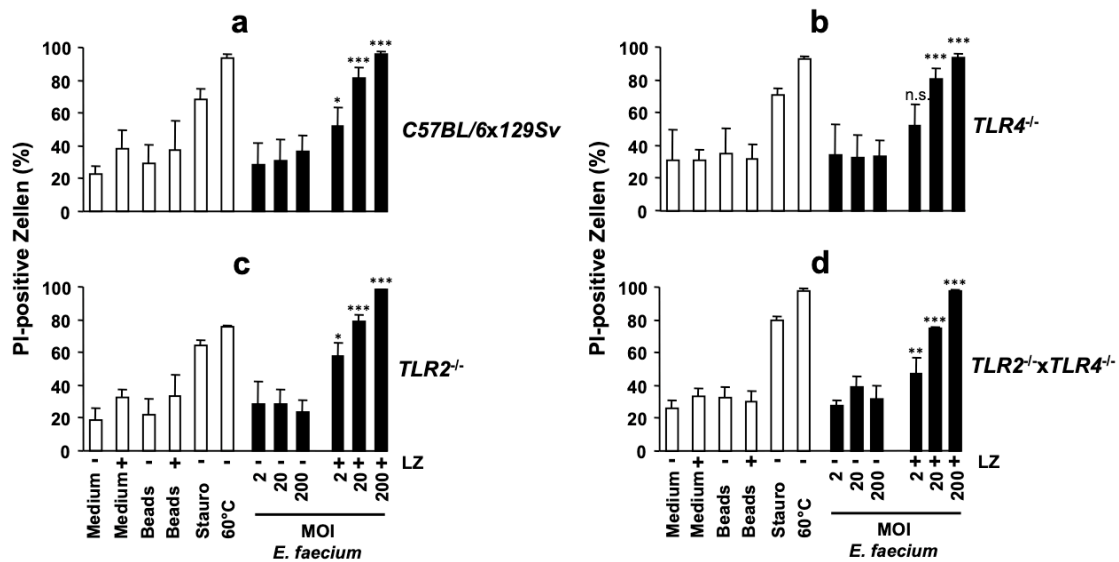
**Abb.6: Fehlende Caspase-3 Aktivierung in J774A.1-Makrophagen nach Infektion mit *E. faecium* (nach Gröbner et al. 2010).**

Nach verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion von J774A.1-Makrophagen mit *E. faecium* (ATCC 6057, MOI 20) und Zugabe von Lysozym (LZ, 10 mg/ ml) 2,5 h nach Infektion, wurden Zellen geerntet, lysiert und das Immunoblotting für Caspase 3 mit den Zellextrakten durchgeführt. Dargestellt ist ein Ergebnis aus drei repräsentativen unabhängigen Experimenten. Mit Staurosporin (Stauro, 4  $\mu$ M) behandelte Zellen wurden als Positivkontrolle eingesetzt. Als Ladekontrolle wurde die Membran gestriipt und anschließend mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Aktin inkubiert.

### 3.3 Zelltod in Knochenmarks- und Peritonealmakrophagen (In-vivo-Infektionsversuche)

#### 3.3.1 Zelltod von Knochenmarks-Makrophagen

Um zu ermitteln, ob *E. faecium* auch in primären Makrophagen nekrotischen Zelltod induzieren kann, wurden Knochenmarksmakrophagen (BMDM) von C57BL/6x129Sv Mäusen mit unterschiedlicher MOI für 6 h infiziert und anschließend der Anteil PI-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Verglichen wurde die Messung von PI-positiven Zellen nach Zugabe bzw. bei Fehlen von Lysozym während des Infektionsversuchs. In Abwesenheit von Lysozym konnte keine Zelltodinduktion durch *E. faecium* nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde durch zusätzliche Inkubation mit Lysozym ein Anstieg von PI-positiven BMDM beobachtet. Die Zelltodinduktion war hinsichtlich der Prozentzahl PI-positiver Makrophagen von der Höhe der MOI abhängig (Abb. 7; nach Gröbner et al. 2010).



**Abb. 7: *E. faecium* induziert Zelltod in Bone-marrow-derived Makrophagen (BMDM) von TLR 2<sup>-/-</sup>, TLR 4<sup>-/-</sup> und TLR 2<sup>-/-</sup> x TLR 4<sup>-/-</sup> negativen Mäusen (nach Gröbner et al. 2010).**

BMDM wurden von C57/BL/6x129Sv (Wildtyp) sowie von Toll-Like-Rezeptor-negativen (TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> und TLR2<sup>-/-</sup> x TLR4<sup>-/-</sup>) Mäusen gewonnen. Die BMDM wurden mit *E. faecium* (ATCC 6057) bei unterschiedlicher MOI (2, 20, 200) infiziert. 2,5 h nach der Infektion wurden extrazelluläre Bakterien durch die Zugabe von Lysozym (LZ, 10 mg/ml) getötet und für weitere 3,5 h inkubiert. 6 h nach der Infektion wurden die Zellen mit TMRE und PI gefärbt und anschließend mittels des Durchflusszytometers analysiert. Als Positivkontrollen wurden mit Lysozym- und Staurosporin- (Stauro, 4 µM) inkubierte Makrophagen, sowie Makrophagen, die für 10 min bei 60 °C erhitzt wurden, eingesetzt. Als zusätzliche Negativkontrollen dienten

Makrophagen, die mit Silica Beads (1  $\mu\text{m}$ , MOI 20) mit und ohne Zugabe von Lysozym nach 2,5 h nach Versuchsbeginn inkubiert worden waren.

Dargestellt sind Mittelwerte aus  $n = 4$  Experimenten. Signifikante Unterschiede zu den entsprechenden Proben ohne Lysozym sind wie folgt dargestellt:

n.s. = nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

Um zu prüfen, ob die Zelltodinduktion von *E. faecium* in Makrophagen eine Abhängigkeit von TLR aufweist, wurden In-vivo-Infektionsexperimente auch mit BMDM von TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> und TLR2<sup>-/-</sup>xTLR4<sup>-/-</sup> Mäusen durchgeführt. Diese wurden mit *E. faecium* über die Versuchsdauer von 6 h infiziert (MOI 20) und 2,5 h nach Versuchsbeginn erfolgte die Zugabe von Lysozym (10 mg/ ml) zu den Zellkulturen.

In den Abbildungen 7 b, c und d ist zu erkennen, dass im Vergleich zu den Wildtyp-BMDM (Abb. 7 a) keine Differenz hinsichtlich der Zelltodrate beobachtet wurde, wenn BMDM von TLR2-, TLR4- und TLR2/ TLR4- infizierten Mäusen mit *E. faecium* infiziert wurden (nach Gröbner et al. 2010). Diese Ergebnisse sind ein Beweis dafür, dass ein Zelltod von BMDM, welcher durch *E. faecium* und Zugabe von Lysozym induziert wurde, von der TLR-2- und TLR-4- Signalwirkung unabhängig ist.

### 3.3.2 Zelltod von Peritoneal-Makrophagen

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem In-vivo-Experiment untersucht, ob der durch *E. faecium* induzierte Zelltod von Makrophagen nicht nur in vitro sondern auch unter In-vivo-Bedingungen stattfindet. Hierzu wurden Mäuse mit *E. faecium* ATCC 6057 in Anlehnung an die Publikation von Leendertse et al. (2008) durch intraperitoneale Injektion infiziert. Entsprechend der Ergebnisse dieser Publikation war eine Überlebensrate bei den Versuchstieren von 100% zu erwarten.

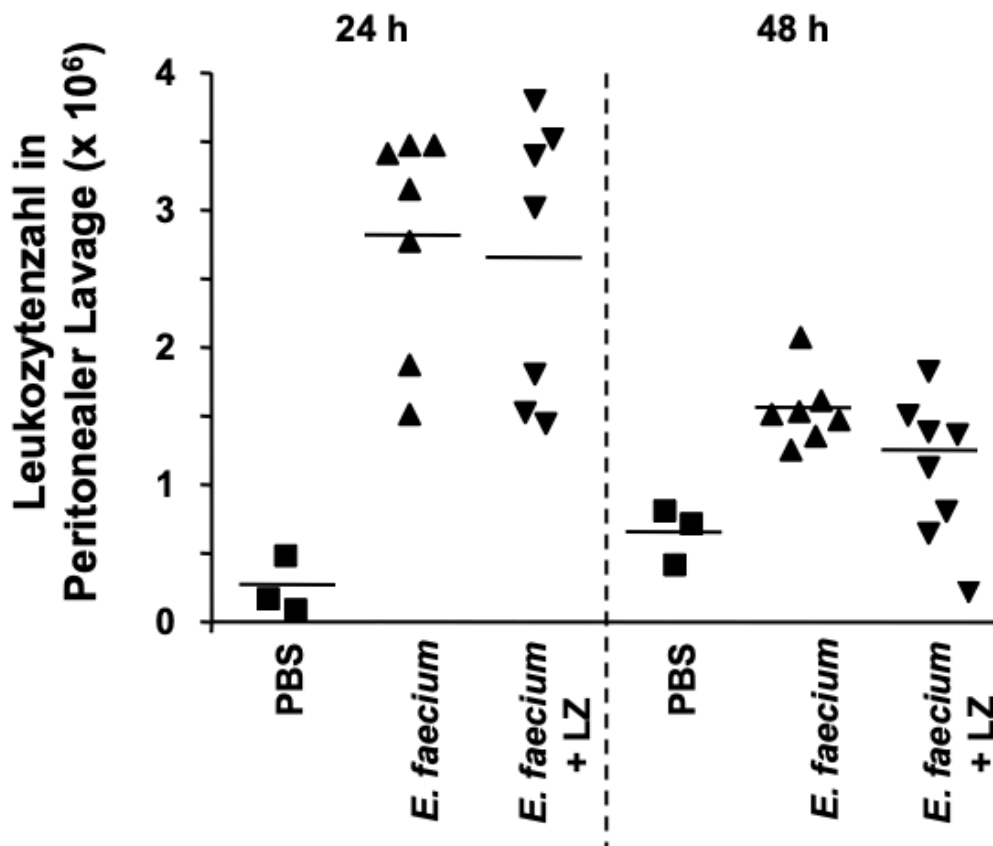
2,5 h nach Induktion der Infektion wurde den Mäusen kontralateral eine zweite intraperitoneale Injektion mit Lysozym (LZ, 10 mg in 1 ml PBS) bzw. 1 ml PBS (ohne LZ) verabreicht.

Die Leukozytenzahl aus der peritonealen Flüssigkeit wurde zu 2 Zeitpunkten im Versuchsverlauf bestimmt. Erstmals 24 h nach Induktion der Infektion, wobei die Versuchstiere zu diesem Zeitpunkt Krankheitssymptome zeigten. Und des

Weiteren 48 h nach Infektionsinduktion, wenn die Mäuse die Infektion überwunden hatten.

Die prozentualen Anteile der peritonealen Leukozyten, sowie die Zelltodrate der Makrophagen, wurden 24 h bzw. 48 h nach Infektion durchflusszytometrisch analysiert.

In Abb. 8 (nach Gröbner et al. 2010) sind die Leukozytenzahlen nach Injektion von Lysozym im Vergleich zu PBS 24 h und 48 h nach Induktion der peritonealen Infektion dargestellt. Dabei wurde eine deutlich erhöhte Zahl von peritonealen Leukozyten 24 h nach Infektion mit *E. faecium* gegenüber dem Versuchsverlauf nach 48 h gefunden.



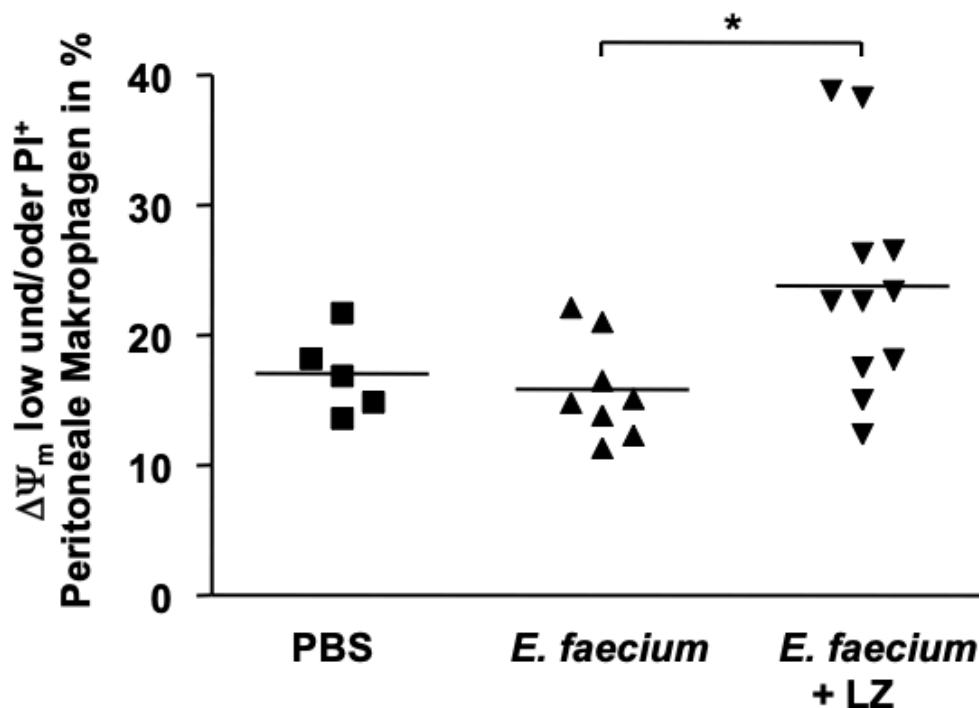
**Abb. 8: Leukozytenzahl in peritonealen Lavagen nach Infektion mit *E. faecium* (nach Gröbner et al. 2010).**

C57BL/6x129Sv Mäuse wurden intraperitoneal *E. faecium*  $1 \times 10^8$  ATCC 6057 oder PBS injiziert. 2,5 h später wurde kontralateral eine zweite intraperitoneale Injektion mit Lysozym (LZ, 10 mg/ml) bzw. PBS durchgeführt. Die Mäuse wurden 24 bzw. 48 h nach der Infektion getötet und es wurden peritoneale Lavagen durchgeführt. Anschließend erfolgte die Analyse der Leukozytenanteils mittels Durchflusszytometrie.

Hinsichtlich des Einflusses von Lysozym (LZ) auf die Anzahl von Leukozyten 24 bzw. 48 h nach Versuchsbeginn wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Leukozytenzahlen nach intraperitonealer Injektion bei Mäusen beobachtet, welche nach Infektion mit *E. faecium* und LZ oder kein LZ injiziert bekommen hatten. Die Differenzierung von peritonealen Leukozyten wurde durch Färbung mit den Zelloberflächenmarkern CD11b, F4/80 für Makrophagen und CD4, CD8 und CD 19 für Lymphozyten vorgenommen. Anschließend erfolgte eine Zellzahlmessung mittels Durchflusszytometrie. Dabei zeigte sich, dass der Anteil neutrophilen Granulozyten ( $F4/80^- / CD11b^+$ ) 24 h nach Infektion mit *E. faecium* ohne bzw. mit Zusatz von Lysozym, verglichen mit dem Prozentsatz der Makrophagen nach 48 h mit 37,3% vs. 11,0% und 42,1% vs. 8,7% deutlich höher war (Abb. 8; nach Gröbner et al. 2010).

Im Gegensatz dazu stieg der Anteil an Makrophagen ( $F4/80^+ / CD11b^-$ ) und Lymphozyten ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD19^+$ ), ausgehend von den Werten 24 h nach Infektion mit bzw. ohne Lysozym 48 h nach Versuchsbeginn bei Makrophagen (30,3% vs. 42,9% und 31,6% vs. 41,6%) und bei Lymphozyten (7,6% vs. 37,9% und 5,1% vs. 26,6%) deutlich an. Der Anstieg von Makrophagen und Lymphozyten nach 48 h entspricht der Überwindung der Infektion bei den Versuchstieren.

Die Zelltodanalyse 24 h nach intraperitonealer Infektion der peritonealen Makrophagen (Abb. 9; nach Gröbner et al. 2010) zeigt nach kontralateraler Injektion von Lysozym eine leichte Erhöhung des Anteils an Zellen, bei denen das mitochondriale Transmembranpotential ( $\Delta\Psi_m$  low) und ihre Zellmembran zerstört (PI-positive Zellen) worden war (15,9% vs. 23,8%). Für diese Analysen wurden peritoneale Makrophagen 3-fach markiert (F4/80-APC, TMRE, PI). Intraperitoneale Injektionen mit PBS bzw. Infektionen mit *E. faecium* ohne Zugabe von Lysozym beeinflussten die Zelltodrate von peritonealen Makrophagen 24 h nach Versuchsbeginn nicht (Abb. 9; nach Gröbner et al. 2010).



**Abb. 9: Zelltodinduktion in vivo durch *E. faecium* in peritonealen Makrophagen (nach Gröbner et al. 2010).**

24 h nach der Infektion mit *E. faecium*  $1 \times 10^8$  ATCC 6057 wurden die peritonealen Makrophagen mit TMRE, PI und APC-konjugierten Antikörpern gegen F4/80 dreifach gefärbt. F4/80-positive Makrophagen wurden auf Depolarisierung des inneren mitochondrialen transmembranen Potentials ( $\Delta\Psi_m$  low cells) und die Aufnahme von Propidiumiodid (PI) untersucht.

Dargestellt ist der Anteil an  $\Delta\Psi_m$  low und/oder PI<sup>+</sup> Peritonealmakrophagen. Signifikante Unterschiede zwischen der Infektion mit *E. faecium* und Lysozym (LZ, 10 mg/ml) verglichen mit Infektion mit *E. faecium* ohne Lysozymzugabe sind entsprechend gekennzeichnet (\*  $p < 0,05$ ).

48 h nach Versuchsbeginn wurden keine Unterschiede hinsichtlich der Zelltodraten nach Infektion mit *E. faecium* sowohl ohne als auch mit Zugabe von Lysozym festgestellt (grafisch nicht dargestellt).

Zusammengefasst kann geschlussfolgert werden, dass eine vermehrte Zelltodrate bei peritonealen Makrophagen, zumindest 24 h nach intraperitonealer Infektion durch *E. faecium* und Zugabe von Lysozym nachgewiesen werden konnte. Parallel dazu zeigten die Versuchstiere sowohl Krankheitssymptome wie Somnolenz und Bewegungsarmut als auch einen Anstieg peritonealer neutrophiler Granulozyten.

## 4 Diskussion

Enterokokken sind Teil der Normalflora im menschlichen Organismus und besiedeln neben den Hohlorganen Mundhöhle und Intestinaltrakt auch Körperoberfläche und Vagina (Jett et al. 1994). Gesunde mit intaktem Immunsystem sind gegenüber *Enterococcus* spp. nicht gefährdet, da polymorphkernige Granulozyten, dendritische Zellen und Makrophagen per Phagozytose invasive Bakterien eliminieren (Murray 1990).

Unter besonderen Bedingungen, wie z.B. Immunschwäche kommt es auch bei Enterokokken zur Initiierung vital bedrohlicher Infektionen in den Systemen Harntrakt, Herz-Kreislauf, Gallenwege, Abdomen sowie Haut, insbesondere nach Verbrennungen (Koch et al. 2004; Chatterjee et al. 2007). In einer In-vitro-Untersuchung bei mit Antibiotika behandelten Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass eine Translokation von *E. faecalis* durch eine intakte Schicht von Epithelzellen erfolgen kann und diese Enterokokken aus dem Intestinum in den Blutstrom gelangen und lokale Infektionen in Leber und Milz induzieren (Wells et al. 1988; Zeng et al. 2004). Damit dieser Prozess eingeleitet wird, ist die immunologische Abwehr durch Makrophagen zu überwinden. Diesbezüglich konnte nachgewiesen werden, dass *E. faecalis*-Stämme Makrophagen als Wirtszellen benutzen und deren Zelltod herbeiführen, was zu einer hämatogen fortgeleiteten und progressiven Sepsis führt (Gentry-Weeks et al. 1999; Giard et al. 2006; Leendertse et al. 2009 a).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte in vitro und in vivo am Maus-Modell nachgewiesen werden, dass der durch *E. faecium* induzierte Zelltod von Makrophagen nicht durch Apoptose, sondern durch nekrotischen Zellerfall herbeigeführt wird (Gröbner et al. 2010).

### 4.1 Durch *E. faecium* induzierter Zelltod von Makrophagen

In der vorliegenden Arbeit sollte die Hypothese überprüft werden, ob unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen durch lebende Enterokokkenstämme bzw. Überstände von *E. faecium*-Stämmen ein Zelltod bei J774A.1-



Makrophagen ausgelöst werden kann. Mittels durchflusszytometrischer Analyse konnte hierbei gezeigt werden, dass *E. faecium* plus Lysozym (MOI 20 bzw. MOI 200) Zelltod induziert (Anteil PI-positiver Zellen von  $83,6 \pm 2,1\%$  bzw.  $90,4 \pm 2,1$ ). Dagegen betrug bei Inkubation mit Überständen Lysozym-behandelter *E. faecium* die Mittelwerte PI-positiver Zellen zwischen 4,2 bis 9,6% und lösten damit keinen Zelltod aus (Abb. 1, S. 34). Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass es sich bei dem Zelltod-auslösenden Faktor von *E. faecium* nicht um einen löslichen, sondern vielmehr um einen zellulären bakteriellen Faktor handelt. Dieser wird Lysozym-spezifisch aktiviert bzw. freigesetzt, da Bakterienpellets, die mit verschiedenen Antibiotika behandelt wurden, bzw. hitzegetötet oder durch UV-Licht abgetötete *E. faecium* keinen Zelltod auslösen (Abb. 1, Seite 34).

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob BMDM von C57BL/6x129Sv-Mäusen, also primären Makrophagen nach Infektion durch *E. faecium* bei unterschiedlichen MOI nekrotischen Zelltod durchlaufen. Auch in diesem Experiment konnte nachgewiesen werden, dass nekrotischer Zelltod erst bei Zugabe von LZ erfolgt, und dass diese Zelltodinduktion MOI-abhängig ist. Damit wurde die Bedeutung der Anwesenheit von Lysozym für die Induktion von Zelltod muriner Makrophagen bestätigt (Gröbner et al. 2010; Höring et al. 2012).

Das Enzym Lysozym (LZ) ist eine wichtige angeborene Immunkomponente des Menschen und wurde bei diesen vorwiegend in Körperflüssigkeiten und auch bei zahlreichen Tierarten nachgewiesen (Jolles und Jolles 1984). LZ-Konzentrationen im Speichel des gesunden Menschen variieren in Abhängigkeit der verwendeten Messmethode von 2,2 bis 79,9  $\mu\text{g/ml}$  (Jenzano et al. 1986). LZ wird vorwiegend von Makrophagen sezerniert und ist daneben vorwiegend im Zytoplasma von Granulozyten vorhanden (Gordon et al. 1974; Keshav et al. 1991). Im Zusammenhang mit Infektionen steigen neben der Zahl von Leukozyten auch die LZ-Konzentrationen im Serum, wie in einer Untersuchung am Pneumokokken-induzierten Endokarditismodell von Kaninchen gezeigt werden konnte (Fidelman und Averyanova 1964).

LZ besitzt auf Grund der Fähigkeit, Peptidoglykan zu spalten, bakterizide Eigen-

schaften, da Peptidoglykan ein essentieller Bestandteil der Zellwand von Bakterien ist. Darüber hinaus greift LZ nichtenzymatisch mittels seiner ionischen Ladung und seiner hydrophoben Eigenschaft Zellwände von Bakterien an (Hébert et al. 2007).

In einem weiterführenden Projekt der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. med. S. Gröbner konnte gezeigt werden, dass *E. faecium* bei Zugabe von LZ eine Nekrose mit Zerstörung der Zellwände bei humanen und murinen Zellen induziert (Höring et al. 2012). Diese Zellwandnekrose war nachweisbar bei epithelialen (HeLa), myeloiden (U937; J774A.1) und lymphoiden Zellen (Jurkat J16; Thymozyten), jedoch nicht bei intestinalen epithelialen Zellen (CaCo-2; CMT-93). Mikroskopische Analysen der Studie von Höring et al. (2012) ergaben, dass es nach Zugabe von LZ zu einem Ansteigen der Adhäsionsrate von *E. faecium* an Zellwänden von HeLa-Zellen, jedoch nicht bei intestinalen Zellen kam. Die Resultate der Studie haben nachgewiesen, dass eine frühe, durch LZ vermittelte Zunahme der Bakterienadhäsion eine wichtige Rolle für die Zelltod-induktion durch *E. faecium* in HeLa-Zellen spielt.

Im Gegensatz zu *E. faecium* konnte bei Infektionsversuchen mit *E. faecalis* gezeigt werden, dass diese Bakterien, unabhängig von LZ-Zugabe bzw. Fehlen von LZ, einen Zelltod bei Makrophagen auslösen können (Gröbner et al. 2010). Sowohl bei Zugabe von LZ als auch ohne Zugabe stieg die Zahl von PI-positiven Zellen nach Infektion von J774A.1-Makrophagen mit *E. faecalis* bei MOI 20 von 49,2 auf 80,1%. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen einer Studie überein, in der 6 h nach Infektion mit *E. faecalis* ohne Zusatz von LZ Zelltod durch Nekrose bei RAW264.7-Makrophagen eintrat, was durch den Nachweis von 35% Eosin-positiver Zellen bewiesen wurde (Kirschnek et al. 2004). Für diese, im Gegensatz zu *E. faecium* LZ-unabhängige Zelltod-Induktion bei *E. faecalis* könnte die Bildung von Cytolysin bei diesen Bakterien ein Auslöser sein, da in einer früheren Studie nachgewiesen werden konnte, dass Stämme von *E. faecalis* Zelltod bei murinen Makrophagen auslösen (Miyazaki et al. 1993). Andererseits zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und einer weiteren Studie (Gröbner et al. 2010; Höring et al. 2012), dass LZ grundsätzlich bei Infektion durch Enterokokken-Stämme Zelltod initiiert. Damit wird die

Beeinflussung von infektionsbedingtem Zelltod durch virulenzsteigernde Faktoren wie z.B. Zytolysin, Aggregations-Substanz, Hämolysin-Cytolysin usw. relativiert. Für weitere virulenzsteigernde Faktoren, wie z.B. ESP und EEP, gibt es in der Literatur von dieser Aussage abweichende Ergebnisse. So fördert ESP sowohl Kolonisation als auch Resistenzentwicklung bei *E. faecalis*, indem es eine Erhöhung der Resistenz durch Formation eines widerstandsfähigen Biofilms induziert. Dieser, aus Proteinen und Kohlenhydraten bestehender Biofilm erhöht die Resistenz von Enterokokken spp. gegenüber antibiotischer Behandlung und ist zumindest bei Infektionen mit *E. faecalis* und *E. faecium* ausschlaggebend für katheterinduzierte Harnwegsinfektionen und Sepsis (Donlan und Costerton 2002; Ballering et al. 2009; Chuang-Smith et al. 2010).

In einer jüngeren Studie wurde nach Infektion durch *E. faecalis* eine Einflussnahme auf die Wirkung von LZ durch eine Eep-vermittelte (Enhanced expression of pheromone) verminderte Lysozym-Resistenz bei *E. faecalis* durch Aktivierung des extrazytoplasmatischen Sigma-Faktors (SigV) beobachtet (Varahan et al. 2013). Frühere Studien hatten bereits nachgewiesen, dass die Anwesenheit von LZ zur Aktivierung von SigV, einem essentiellen Faktor der extrazytoplasmatischen Funktion (ECF) in *E. faecalis* führt, und dass die Blockade von SigV die Anfälligkeit des Bakteriums im Hinblick auf die Wirkung von Lysozym erhöht (Makinoshima und Glickman 2006; Le Jeune et al. 2010). In diesem Zusammenhang ist kritisch zu diskutieren, dass bei den meisten dieser Studien lediglich der Einfluss der untersuchten Virulenzfaktoren im Vordergrund stand, und dass der Nachweis der Virulenzfaktoren nicht gleichbedeutend mit Invasivität auf Körperzellen bedeutet (Madsen et al. 2017).

## 4.2 Elektronenmikroskopische Analysen

Durch elektronenmikroskopische Untersuchung von J774A.1-Makrophagen, bei denen über einen Zeitraum von 6 h eine Infektion mit *E. faecium* und eine Zugabe von Lysozym erfolgt war, zeigten sich typische morphologische Merkmale des nekrotischen Zelltods wie Vakuolisierung des Zytoplasmas und Zellschwellung.

Dagegen fanden sich keine apoptotischen Zeichen wie Kernfragmentierung oder Zellschrumpfung (Abb. 2, Seite 36).

Bei den mikroskopischen Analysen wurde weiterhin beobachtet, dass nach Zugabe von Lysozym zu Kulturen von Makrophagen und *E. faecium* keine Bakterien im extrazellulären Bereich der Makrophagen sichtbar waren, so dass vermutet werden kann, dass es durch Lysozym zu einer starken Adhärenz zwischen Bakterienwand und Wand der Makrophagen kommt und dieser Befund die Einleitung des Zelltods durch *E. faecium* vermittelt. Für diese Hypothese spricht auch der Befund, dass bei Infektion von Makrophagen mit niedriger MOI 20 vorwiegend Zellen mit durchlässigen Zellmembranen, aber noch intaktem Mitochondrien-Transmembranpotential beobachtet wurden, was auf eine direkte Interaktion von Enterokokken mit Zellmembranen schließen lässt (Gröbner et al. 2010).

In der Literatur sind mehrere Untersuchungen publiziert, bei denen elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Nachweis nekrotischen Zelltods eingesetzt wurden. Eine detaillierte Untersuchung nekrosetypischer ultrastruktureller Veränderungen an Zellmembranen, Zytoplasma, Zellkernen und Mitochondrien wurde von Ziegler und Groscurth (2004) vorgenommen. Als wichtigste Merkmale des teils passiv, teils programmiert verlaufenden nekrotischen Zelltods werden die zunehmende Permeabilität der Zellmembran, Dilatation von Organellen und Dissoziation der Ribosomen vom endoplasmatischen Reticulum hervorgehoben. Auf Grund der erhöhten Permeabilität der Zellmembran treten frühzeitig perizelluläre Entzündungszeichen auf. Der autophage nekrotische Zelltod ist charakterisiert durch zytoplasmatische Vakuolen und bei nichtlysosomalem nekrotischen Zelltod dominieren dilatierte Organellen. Zellkerne zerfallen erst im Spätstadium der Nekrose (Ziegler und Groscurth 2004).

In einer elektronenmikroskopischen Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass das antimikrobiell und onkolytisch wirksame Peptid LTX-315, welches zur Behandlung von B16-Melanomen eingesetzt wird, einen dem durch *E. faecium* hervorgerufenen und vergleichbaren typischen Phänotyp des nekrotischen Zelltods induziert (Forveille et al. 2015). Bei Anwendung von Peptid

LTX-315 kommt es nicht zur Aktivierung von Caspasen, und die Tumorzellen zeigen keine apoptotisch-typische Kondensation der Zellkerne, sondern weisen die Zeichen des nekrotischen Zelltods mit Zellschwellung, dilatierten Mitochondrien und Vakuolisierung auf. Entsprechend konnte in dieser Studie die durch das Peptid LTX-315 induzierte Zellnekrose durch die stark wirksamen Hemmer von Zellnekrosen, die Nekrostatine 1 und 2, nicht unterbunden werden. Die Induktion von apoptotischem bzw. nekrotischem Zelltod kann hinsichtlich der Art der Induktion nicht nur substanzspezifisch, sondern auch dosisabhängig sein. In einer ultrastrukturellen In-vivo-Untersuchung bei Albino-Mäusen mit Induktion einer experimentellen Pankreatitis durch Injektionen von Caerulein konnte gezeigt werden, dass die Art des resultierenden Zelltods dosisabhängig ist (Jacob et al. 2014). In der Low-dose-Gruppe (4 mal 50 µg/ kg) war der apoptotische Zelltod dominant und in der High-Dose-Gruppe (8 mal 50 µg/ kg) zeigte eine Vielzahl azinärer Zellen einen nekrotischen Zelltod. Im Gegensatz dazu gibt es bei identischer Ursache für Zelltod auch zelldifferentes Auftreten von Apoptose und Nekrose.

In einer Studie zum Zelltod nach plazental-foetaler Infektion durch *Listeria monocytogenes* wiesen humane B-Lymphozyten und murine Hepatozyten, T-Lymphozyten und dendritische Zellen apoptotischen Zelltod auf, während bei humanen und murinen Makrophagen ein nekrotischer Zelltod nachweisbar war (Ammendolia et al. 2009).

### 4.3 Nekrosebedingte Zellschwellung und LDH-Freisetzung

Bei nekrotischem Zelltod kommt es zu einer intrazellulären Na<sup>+</sup> Anreicherung und damit verknüpft zu einer Zellschwellung. Der parallel stattfindende K<sup>+</sup>-Ausstrom bremst die Zellschwellung und damit entsteht eine der Ursachen für die Zellschrumpfung während der Apoptose (Bortner et al. 1997; Carini et al. 1999). Für die Messung der Zellgröße von Makrophagen wurde das Vorwärtsstreulicht (FSC) zeitbezogen zur Infektion mit *E. faecium* als Messgröße eingesetzt. Dabei entspricht das Maß der Menge des gestreuten Lichts der vorhandenen Zellgröße. 2 h bis 4 h nach Infektion der Makrophagen mit *E. faecium* blieb eine

Schrumpfung der Makrophagen aus, während Makrophagen nach Zugabe von Staurosporin, einer Apoptose-auslösenden Substanz, eine signifikante und FSC-bezogene Schrumpfung zeigten (Abb. 3, Seite 38).

In einem weiteren Versuchsansatz erfolgte durchflusszytometrisch die Messung des Anteils an PI-positiven Makrophagen. Die Koinzidenz eines hohen Anteils der PI-positiven Makrophagen bei fehlender Zellschrumpfung deutet darauf hin, dass mit *E. faecium* infizierte Makrophagen einen durch Nekrose induzierten Zelltod aufweisen. Als positive Kontrolle für diese Form des Zelltods ohne Schrumpfung des Zellkörpers eignete sich ein Versuchsansatz mit Hitze-induktion. Im Gegensatz zum nekrotischen Zelltod wiesen mit Staurosporin inkubierte Makrophagen einen hohen Prozentsatz an PI-positiven Zellen und eine starke Schrumpfung entsprechend einem apoptotischen Zelltod auf (Abb. 4, Seite 39).

Eine weitere Methode zur Analyse nekrotischen Zelltods ist die Bestimmung extrazellulär nachgewiesener LDH. Bei nekrotischem Zelltod gelangt LDH aus dem Zytosol von Makrophagen infolge permeabler bzw. zerstörter Zellmembranen in den Überstand von infizierten Zellen.

Bestimmungsmethoden zum Nachweis von Zytotoxizität und Nekrose basieren auf 2 differenten Prinzipien:

1. Differentielle Aufnahme von DNA-bindenden Farbstoffen ohne transmembralen Zugang, wie z.B. Propidiumiodid
2. Transmembralen Austritt intrazellulärer Marker, wie z.B. LDH

In der vorliegenden Arbeit wurde als Nachweis für nekrotischen Zelltod 6 h nach Infektion von J774A.1-Makrophagen mit *E. faecium* bei unterschiedlicher MOI sowie mit und ohne Zugabe von LZ eine Bestimmung der LDH-Konzentration im Zellkulturüberstand vorgenommen. Während bei einer MOI von 20 keine LDH im Überstand gefunden wurde, war der LDH-Gehalt bei MOI 200 und Zugabe von LZ 1,8 mal höher im Vergleich zum Versuchsansatz mit identischer MOI jedoch ohne LZ-Zugabe (Abb. 3, Seite 38). Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit der Abb. 4 (Anteil PI-positiver J774A.1-Makrophagen nach Infektion mit *E. faecium*; Ergebnisteil S.39) zeigt sich auf Grund der PI-Positivität der Zellen, dass *E. faecium* bereits bei MOI 20 Zellmembranen von Makrophagen zerstört. Dieser

Befund erscheint hinsichtlich der Ergebnisse der LDH-Messung widersprüchlich, jedoch ist zu berücksichtigen, dass das Molekulargewicht von LDH 170-fach größer ist als das Molekulargewicht von PI. So könnte diese Diskrepanz auf Grund der unterschiedlichen Molekülgröße hervorgerufen sein, indem bei minimaler Porosität der Zellmembran PI bereits in die Zelle gelangt, LDH jedoch noch nicht die Zellmembran passieren kann.

#### 4.4 Caspase 3 – Immunoblot

Neben der Differenzierung zwischen nekrotischem und apoptotischem Zelltod durch elektronenmikroskopische Untersuchungen sowie Bestimmungen von LDH und Zellschwellung ist der Nachweis des Apoptoseproteins Caspase 3 ein wichtiger Marker, um Nekrose von Apoptose differenzieren zu können.

Eingeleitet wird die Apoptose durch Aktivierung der Effektor-Procaspase 3, wobei die Initiator-Caspasen 8 und 9 diesen Prozess starten. Procaspase 3 wird mittels Hydrolyse in die 2 aktiven Spaltprodukte von Caspase 3 (p17 und p19) transformiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Immunoblotting für Caspase 3 bei durch *E. faecium* infizierten J774A.1-Makrophagen mit und ohne Zugabe von Lysozym durchgeführt. Im Ergebnis dieser Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass bis 4 h nach Versuchsbeginn und Zugabe von Staurosporin die aktiven Caspase-3-Formen p17 und p19 im Immunoblotting vorhanden waren, woraus auf eine durch Staurosporin induzierte Apoptose geschlossen werden konnte. Diese Spaltung von Procaspase 3 in die aktiven Formen p17 und p19 war im Immunoblotting bei *E. faecium* infizierten J774A.1-Makrophagen 2 und 4 Stunden nach Versuchsbeginn nicht nachweisbar, woraus eindeutig auf einen Zelltod durch Nekrose geschlossen werden konnte (Abb. 6, Seite 42). Des Weiteren ist dieses Ergebnis in Übereinstimmung mit einer Untersuchung, bei der gezeigt werden konnte, dass der Pancaspase-Inhibitor zVAD.fmk den nekroseinduzierten Zelltod bei durch *E. faecium* infizierten J774A.1-Makrophagen nicht verhindern konnte (Gröbner et al. 2010). Bei den in dieser Publikation erhobenen Befunden für nekrotischen Zelltod konnte Pyroptose, ein

Caspase-1-abhängiger, nichtapoptotischer Zelltod ausgeschlossen werden, da im Immunoblotting von *E. faecium* infizierten BMDM weder bei Zugabe noch ohne Anwesenheit von Lysozym Caspase 1 nachgewiesen werden konnte.

#### 4.5 In-vivo-Untersuchungen von Peritoneal-Makrophagen

In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob durch *E. faecium* induzierter nekrotischer Zelltod von Makrophagen unter In-vivo-Bedingungen stattfindet. Hierzu wurden Mäuse mit *E. faecium* ATCC 6057 ( $1 \times 10^8$ ) in Anlehnung an die Publikation von Leendertse et al. (2008) mittels intraperitonealer (i.p.) Injektion infiziert. Zusätzlich erfolgte 2,5 h nach dieser Injektion eine weitere kontralaterale i.p.-Injektion mit LZ bzw. mit PBS. 24 h nach Infektion mit *E. faecium* stiegen die Leukozytenzahlen (Granulozyten und Lymphozyten) sowohl in der Gruppe ohne LZ als auch mit LZ in demselben Maße an. Messungen des transmembranen Potentials und der PI-positiven Peritonealmakrophagen zeigten eine signifikant höhere Zelltodrate in der Tiergruppe mit Infektion durch *E. faecium* und zusätzlicher Gabe von LZ.

An einem nichtletalen *E. faecium*-Peritonitis-Modell konnte in vivo gezeigt werden, dass eine Signalisierung über den Toll-Like-Rezeptor 2 und MyD88 zur Einwanderung von Neutrophilen in die Peritonealhöhle und damit zu einer frühen Enterokokken-Eliminierung beiträgt (Leendertse et al. 2008). Peritoneale Makrophagen könnten für diese Migration von Neutrophilen verantwortlich sein, da sie bei In-vitro-Infektion mit *E. faecium* eine von TLR2- und MyD88-Proteinen abhängige Produktion von proinflammatorischem TNF- $\alpha$  zeigten (Leendertse et al. 2008). Die Daten in der vorliegenden Arbeit haben jedoch nachgewiesen, dass weder der TLR2- noch der TLR4-Signalweg am Zelltod von Makrophagen beteiligt sind, wenn dieser durch *E. faecium* in vitro induziert wird (Abb. 7, Seite 43).

In einer weiteren In-vivo-Untersuchung konnte ein wesentlicher Einfluss von Neutrophilen für die schnelle Beseitigung von *E. faecium* bei Mäusen nachgewiesen werden. Mäuse, die vor der intraperitonealen *E. faecium*-Exposition eine geringe Zahl an Neutrophilen aufwiesen, zeigten eine erhebliche



Verzögerung der Enterokokken-Clearance in verschiedenen Organen (Leendertse et al. 2009 a).

In einer weiteren In-vivo-Untersuchung dieser Arbeitsgruppe konnte zusätzlich gezeigt werden, dass sogar bei Fehlen von Neutrophilen *E. faecium* zu einem großen Teil eliminiert wurde. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass andere Faktoren des Immunsystems das Fehlen von Neutrophilen ausgleichen können. So kann auch diskutiert werden, dass Makrophagen eine entscheidende Rolle bei der Wirtsabwehr gegen eine intraperitoneale Infektion mit *E. faecium* spielen können, da Mäuse, die über eine geringe Zahl an peritonealen Makrophagen verfügten, eine Verzögerung der peritonealen und systemischen Clearance von *E. faecium* aufwiesen (Leendertse et al. 2009 b).

Ein überraschender Befund zeigte sich auch bei In-vivo-Untersuchungen an Peritonitis-Modellen der Maus, indem nachgewiesen werden konnte, dass die Migration von Makrophagen in die Peritonealhöhle trotz einer massiven Infektion durch Enterokokken verringert war (Leendertse et al. 2009 b; LaFleur et al. 2004). Ein möglicher zugrundeliegender Mechanismus dieses Phänomens könnte sein, dass, wie in der hier vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde, ein durch Enterokokken verursachter Zelltod zur Verminderung peritonealer Makrophagen führen könnte (Abb. 9, Seite 47).

Diese Hypothese wird durch das Ergebnis einer In-vivo-Studie gestützt, in der das Überleben von Mäusen durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit anti-apoptischen Proteaseinhibitoren in einem Peritonitis-Sepsis-Modell von Mäusen gesteigert werden konnte (Weaver et al. 2004).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Symptome einer Infektion und Zelltod von peritonealen Makrophagen lediglich in den ersten 24 h nach Infektion mit *E. faecium* beobachtet, nicht aber bis 48 h nach Infektionsinduktion, wenn die Versuchstiere die Erkrankung überstanden hatten. Möglicherweise induziert der Zelltod von peritonealen Makrophagen eine Downregulation der initial übermäßigen Immunantwort auf die durch *E. faecium* verursachte Peritonitis.

Man kann davon ausgehen, dass in Peritonitismodellen das aus dem Darm oder aus peritonealen Makrophagen stammende Lysozym, zur Induktion des Zelltods beiträgt (Gordon et al. 1974). Diese Hypothese wurde durch die Ergebnisse der

vorliegenden Arbeit mit der In-vivo-Induktion von Infektion mit *E. faecium* und zusätzlicher Applikation von Lysozym unterstützt.

Generell könnte Zelltodinduktion durch Enterokokken ein allgemeiner Mechanismus sein, um es diesen Bakterien zu ermöglichen, natürliche Barrieren, wie z.B. Epithelschichten des Darms oder der Harnblase zu durchdringen. Diese Hypothese wird durch ein Untersuchungsergebnis gestützt, bei dem nach Infektion von humanen Urothelzellen durch *E. faecalis* die Ausbildung einer dreidimensionalen Zellstruktur während der Kultivierung auftrat, welche, auf Grund einer dadurch möglichen höheren Anfälligkeit der Zellbarriere, den Zelltod weitgehend initiierte (Dozmorov et al. 2007).

## 5. Zusammenfassung

Durch den Einsatz von Antibiotika haben sich sowohl Virulenz als auch Resistenz der den Darm besiedelnden Enterokokken erhöht und sukzessive zu einem gravierenden Anstieg der Infektionsraten geführt. Aktuelle Daten der ECDC zeigen für Vancomycin-resistente *E. faecium*-Blutkulturisolate einen Anstieg von 9,1% im Jahr 2014 auf 16,5% im Jahr 2017 (ECDC-EARS-Net, 2019).

Untersuchungen zur Pathogenese und zu Mechanismen von Infektionen durch *E. faecium* sind daher von hoher klinischer Relevanz.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es sich bei durch *E. faecium* induziertem Zelltod von Makrophagen um einen programmierten Zelltod in Form der Apoptose oder um einen toxisch bedingten Zelluntergang in Form von Nekrose handelt.

Als Targetzellen für die Infektionsversuche mit *E. faecium* (ATCC 6057) dienen J774A.1-Makrophagen. Es konnte nachgewiesen werden, dass Zelltodinduktion nicht durch Überstände, sondern durch Pellets von *E. faecium*, also zelluläre bakterielle Bestandteile verursacht werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Lysozym essentiell für die Induktion des Zelltods durch *E. faecium* ist.

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von J774A.1-Makrophagen nach Infektion mit *E. faecium* und Zugabe von Lysozym waren typische morphologische Zeichen nekrotischen Zelltods mit Vakuolisierung des Zytoplasmas und Zellschwellung zu beobachten. Apoptotische Merkmale wie Kernfragmentierung oder Zellschrumpfung waren dagegen nicht nachweisbar.

Fehlende Schrumpfung bei durch *E. faecium* infizierten Makrophagen und ein extrazellulärer Nachweis von LDH infolge Ausstroms aus den Zellen durch Nekrose bedingte, poröse Zellwände sind weitere Zeichen für nekrotischen Zelltod und wurden in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen.

Als weitere Methode zur Differenzierung des Zelltods von *E. faecium* infizierten Makrophagen wurde in der vorliegenden Arbeit ein Immunoblotting für Caspase 3

durchgeführt. In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass bis 4 h nach Versuchsbeginn und bei Zugabe von Staurosporin die aktiven Caspase-3-Formen p17 und p19 im Immunoblotting vorhanden waren, woraus auf durch Staurosporin induzierte Apoptose geschlossen werden konnte. Dagegen war die Spaltung von Procaspase 3 in die aktiven Formen p17 und p19 im Immunoblotting von mit *E. faecium* infizierten J774A.1-Makrophagen 2 und 4 Stunden nach Versuchsbeginn nicht nachweisbar. Damit konnte eindeutig auf einen Zelltod durch Nekrose geschlossen werden.

In einer In-vivo-Untersuchung wurden die Ergebnisse der In-vitro-Untersuchungen hinsichtlich eines nekrotischen bzw. apoptotischen Zelltods nach Infektion von peritonealen Makrophagen mit *E. faecium* überprüft und bestätigt. Messungen des transmembranen Potentials und der Propidiumiodid-Positivität von peritonealen Makrophagen zeigten erst bei zusätzlicher Gabe von Lysozym eine signifikant höhere Zelltodrate durch Nekrose in der Tiergruppe nach Infektion mit *E. faecium*.

## 6 Literaturverzeichnis

1. **ABAS (Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe)** (2017) Begründungspapier zur Einstufung von *E. faecalis*. S. 1 – 18. ([https://www.baua.de/DE/Aufgaben/Geschaeftsfuehrung-von-Ausschuessen/ABAS/pdf/Enterococcus-faecalis-2.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=2](https://www.baua.de/DE/Aufgaben/Geschaeftsfuehrung-von-Ausschuessen/ABAS/pdf/Enterococcus-faecalis-2.pdf?__blob=publicationFile&v=2) (Letzter Zugriff: 14. 11. 2018).
2. **Adams JM and Cory S.** 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**:1322-1326.
3. **Ammendolia MG, Superti F, Bertuccini L, Seganti L, Cipriani D, Longhi C** (2009) Necrotic cell death in human amniotic cells infected by *Listeria monocytogenes*. *Int J Immunopathol Pharmacol* **22**:153-162.
4. **An FY, Sulavik MC und Clewell DB** (1999) Identification and characterization of a determinant (eep) on the *Enterococcus faecalis* chromosome that is involved in production of the peptide sex pheromone cAD1. *J Bacteriol* **181**:5915-5921.
5. **Arias CA and Murray BE** (2013) The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* **10**:266-278.
6. **Arnoult D, Carneiro L, Tattoli I and Girardin SE** (2009) The role of mitochondria in cellular defense against microbial infection. *Semin Immunol* **21**:223-232.
7. **Ashida H, Mimuro H, Ogawa M, Kobayashi T, Sanada T, Kim M and Sasakawa C** (2011) Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. *J Cell Biol* **195**:931-942.
8. **Ashkenazi A und Dixit VM** (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**:1305-1308.
9. **ATCC** (2007) Product Information Sheet for ATCC TIB-67.
10. **Ballering KS, Kristich CJ, Grindle SM, Oromendia A and Beattie DT** (2009) Functional genomics of *Enterococcus faecalis*: multiple novel genetic determinants for biofilm formation in the core genome. *J Bacteriol* **191**:2806-2814.
11. **Baran J, Weglarczyk K, Mysiak M, Guzik K, Ernst M, Flad HD and Pryjma J** (2001) Fas (CD95)-Fas ligand interactions are responsible for monocyte apoptosis occurring as a result of phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **69**:1287-1297.
12. **Barros LF, Hermosilla T and Castro J** (2001) Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis (Review) *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **130**:401-409.
13. **Bertani G** (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**:293-300.
14. **Bortner CD, Hughes FM Jr, Cidlowski JA** (1997) A primary role of for K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem.* **272**: 32436-32442.
15. **Bradley CR and Fraise AP** (1996) Heat and chemical resistance of enterococci. *J Hosp Infect* **34**:191-196.

16. **Branner GR and Roth-Maier DA** (2006) Influence of pre-, pro-, and synbiotics on the intestinal availability of different B-vitamins. *Arch Anim Nutr* **60**:191-204.
17. **Brinster S, Posteraro B, Bierne H, Alberti A, Makhzami S, Sanguinetti M and Serror P** (2007) Enterococcal leucine-rich repeat-containing protein involved in virulence and host inflammatory response. *Infect Immun* **75**:4463-4471.
18. **Carini R, Autelli R, Bellomo G, Albano E** (1999) Alterations of cell volume regulation in the development of hepatocyte necrosis. *Exp Cell Res*. **248**:280-293
19. **Chatterjee I, Iredell JR, Woods M, Lipman J** (2007) The implications of enterococci for the intensive care unit. *Crit Care Resusc* **9**:69-75.
20. **Chirurgi VA, Oster SE, Goldberg AA, Zervos MJ and McCabe RE** (1991) Ampicillin-resistant *Enterococcus raffinosus* in an acute-care hospital: case-control study and antimicrobial susceptibilities. *J Clin Microbiol* **29**:2663-2665.
21. **Chow JW, Thal LA, Perri MB, Vazquez JA, Donabedian SM, Clewell DB and Zervos MJ** (1993) Plasmid associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:2474-2477.
22. **Chuang ON, Schlievert PM, Wells CL, Manias DA, Tripp TJ and Dunny GM** (2009) Multiple functional domains of *Enterococcus faecalis* aggregation substance Asc10 contribute to endocarditis virulence. *Infect Immun* **77**:539-48.
23. **Chuang-Smith ON, Wells CL, Henry-Stanley MJ and Dunny GM** (2010) Acceleration of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by aggregation substance expression in an ex vivo model of cardiac valve colonization. *PLoS ONE* **5**: e15798.
24. **Comerlato CB, Carvalho de Resende MC, Caierão and d'Azevedo** (2013) Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **108**:590-595.
25. **Domig KJ, Mayer HK and Kneifel W** (2003). Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. *Int J Food Microbiol* **88**:165-188.
26. **Donlan RM, Costerton JW** (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**:167-193.
27. **Dozmorov MG, Kyker KD, Saban R, Shankar N, Baghdayan AS, Centola MB, Hurst RE** (2007) Systems biology approach for mapping the response of human urothelial cells to infection by *Enterococcus faecalis*. *BMC Bioinformatics* **8(Suppl 7)**:S2.
28. **Dunny GM, Brown BL and Clewell DB** (1978) Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: Evidence for a bacterial sex pheromone. *Proc Natl Acad Sci* **75**:3479-3483.
29. **Duque GA and Descoteaux A** (2014) Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infection Diseases. *Front Immunol* **5**: 491-502.

30. **ECDC-EARS-Net** (2019)  
<http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/database/Pages/database.aspx> (Letzter Zugriff: 12. 02. 2019)
31. **Fidelman ES, Averyanova LL** (1964) Changes in the blood lysozyme concentration in animals following injections of *Streptococcus* and of homologous tissue antigen. *Bull Exp Biol Med* **58**:39–41.
32. **Fink SL and Cookson BT** (2005) Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* **73**:1907-1916.
33. **Fisher K and Phillips C** (2009) The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. *Microbiology* **155**:1749-1757.
34. **Forveille S, Zhou H, Sauvat A, Bezu L, Müller K, Liu P, Zitvogel L, Rekdal Ø, Kepp O, Kroemer G** (2015) The oncolytic peptide LTX-315 triggers necrotic cell death. *Cell Cycle* **14**:3506-3512.
35. **Frei E, Hodgkiss-Harlow K, Rossi PJ, Edmiston CE and Bandyk Jr. DF** (2011) Microbial pathogenesis of bacterial biofilms: a causative factor of vascular surgical site infection. *Vasc Endovascular Surg* **45**: 688-696.
36. **Fridkin SK, Edwards JR, Tenover FC, Gaynes RP and McGowan JE Jr** (2001) Antimicrobial resistance prevalence rates in hospital antibiograms reflect prevalence rates among pathogens associated with hospital-acquired infections. Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology (ICARE) Project; National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Hospitals. *Clin Infect Dis* **33**: 324-330.
37. **Gentry-Weeks CR, Karkhoff-Schweizer R, Pikis A, Estay M and Keith JM** (1999) Survival of Enterococcus faecalis in mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* **67**:2160-2165.
38. **Giard JC, Riboulet E, Verneuil N, Sanguinetti M, Auffray Y, Hartke A** (2006) Characterization of Ers, a PrfA-like regulator of Enterococcus faecalis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **46**:410- 418.
39. **Green DR and Reed JC** (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1309 -1312.
40. **Gordon S, Todd J, Cohn ZA** (1974) In vitro synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear phagocytes. *J Exp Med* **139**:1228-1248.
41. **Gröbner S, Fritz E, Schoch F, Schaller M, Berger AC, Bitzer M and Autenrieth IB** (2010) Lysozyme activates Enterococcus faecium to induce necrotic cell death in macrophages. *Cell Mol Life Sci* **67**:3331-3344.
42. **Hall-Stoodley L und Stoodley P** (2009) Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* **11**:1034-1043.
43. **Haller C, Berthold M, Wobser D, Kropec A, Lauriola M, Schlensak C and Huebner** (2014) Cell-wall glycolipid mutations and their effects on virulence of E. faecalis in a rat model of infective endocarditis. *PLoS One* **9**: e91863.
44. **Handley PS and Jacob AE** (1981) Some structural and physiological properties of fimbriae of Streptococcus faecalis. *J Gen Microbiol* **127**: 289-293.
45. **Harkin ST, Cohen GM and Gescher A** (1998) Modulation of apoptosis in rat thymocytes by analogs of staurosporine lack of direct association with inhibition of protein kinase C. *Mol Pharmacol* **54**: 663-670.

46. **Health Protection Agency** (2007) Bacteraemia. Available from [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/250717/0796.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/250717/0796.pdf) (Letzter Zugriff: 27. 11. 2018).
47. **Hébert, L., Courtin, P., Torelli, R., Sanguinetti, M., Chapot-Chartier, M.P., Auffray, Y. and Benachour, A** (2007) *Enterococcus faecalis* constitutes an unusual bacterial model in lysozyme resistance. *Infect Immun.* **75**:5390-98
48. **Höring S, Schütz M, Autenrith IB, Gröbner Sabine** (2012) Lysozyme facilitates adherence of *Enterococcus faecium* to host cells and induction of necrotic cell death. *Microbes Infect.* **14**:554-562.
49. **Hoiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen PO, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T and Bjarnsholt T** (2011) The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* **3**:55-65.
50. **Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE and Swanson PE** (2009) Cell death. *N.Engl.J.Med* **361**:1570-1583.
51. **Huycke MM, Spiegel CA, Gilmore MS** (1991) Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **35**:1626-1634.
52. **Ike Y, Hashimoto H and Clewell DB** (1984) Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies *zymogenes* contributes to virulence in mice. *Infect Immun* **45**:528-530.
53. **Ike Y, Hashimoto H and Clewell DB** (1987) High incidence of hemolysin production by *Enterococcus faecalis* strains associated with human parenteral infections. *J Clin Microbiol* **24**: 1524-1528.
54. **Italiani P and Boraschi D** (2014) From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front Immunol* **5**:514-535.
55. **Jacob TG, Sreekumar VI, Roy TS, Garg PK** (2014) Electron-microscopic evidence of mitochondria containing macroautophagy in experimental acute pancreatitis: implications for cell death. *Pancreatology* **14**:454-458.
56. **Jenzano JW, Hogan SL, Lundblad RL** (1986) Factors influencing measurement of human salivary lysozyme in lysoplate and turbidimetric assays. *J Clin Microbiol* **24**:963-967.
57. **Jett BD, Huycke MM and Gilmore MS** (1994) Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* **7**:462-478.
58. **Jolles P, Jolles J** (1984) What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Mol Cell Biochem* **63**:165-189.
59. **Karp G** (2005) *Molekulare Zellbiologie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
60. **Kaufhold A and Ferrieri P** (1991) Isolation of *Enterococcus mundtii* from normally sterile body sites in two patients. *J Clin Microbiol* **29**: 1075-1077.
61. **Keshav S, Chung P, Milon G, Gordon S** (1991) Lysozyme is an inducible marker of macrophage activation in murine tissues as demonstrated by in situ hybridization. *J Exp Med* **174**:1049-1058.
62. **Kirschnek S, Scheffel J, Heinzmann U, and Hacker G** (2004) Necrosis-like cell death induced by bacteria in mouse macrophages. *Eur J Immunol.* **34**:1461-71.



63. **Koch S, Hufnagel M, Theilacker C and Huebner J** (2004) Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* **22**:822-830.
64. **Kohlenberg A, Schwab F, Meyer E, Behnke M, Geffers C, Gastmeier P** (2009) Regional trends in multidrug-resistant infections in German intensive care units: a real-time model for epidemiological monitoring and analysis. *J Hosp Infect* **73**:239-245.
65. **Kohlenberg A, Schwab F, Behnke M, Gastmeier P** (2012) Screening and control of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in 186 intensive care units: different situations and individual solutions. *Crit Care* **15**:R285
66. **Kuruvilla S, Qualls Jr. CW, Tyler RD, Witherspoon SM, Benavides GR, Yoon LW, Dold K, Brown RH, Sangiah S and Morgan KT** (2003) Effects of minimally toxic levels of carbonyl cyanide P-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), elucidated through differential gene expression with biochemical and morphological correlations. *Toxicol Sci* **73**:348-61.
67. **LaFleur AM, Lukacs NW, Kunkel SL, Matsukawa A** (2004) Role of CC chemokine CCL6/C10 as a monocyte chemoattractant in a murine acute peritonitis. *Mediators Inflamm* **13**:349-355.
68. **Leendertse M, Willems RJ, Giebelen IA, van den Pangaart PS, Wiersinga WJ, de Vos AF, Florquin S, Bonten MJ, van der Poll T** (2008) TLR2-dependent MyD88 signaling contributes to early host defense in murine *Enterococcus faecium* peritonitis. *J Immunol* **180**:4865-4874.
69. **Leendertse M, Willems RJ, Giebelen IA, Roelofs JJ, Bonten MJ, van der Poll T** (2009 a) Neutrophils are essential for rapid clearance of *Enterococcus faecium* in mice. *Infect Immun* **77**:485-491.
70. **Leendertse M, Willems RJ, Giebelen IA, Roelofs JJ, van Rooijen N, Bonten MJ, van der Poll T** (2009 b) Peritoneal macrophages are important for the early containment of *Enterococcus faecium* peritonitis in mice. *Innate Immun* **15**:3-12.
71. **Le Jeune A, Torelli R, Sanguinetti M, Giard JC, Hartke A, Auffray Y, Benachour A** (2010) The extracytoplasmic function sigma factor SigV plays a key role in the original model of lysozyme resistance and virulence of *Enterococcus faecalis*. *PLoS One* **5**:e9658.
72. **Lindenstrau AG, Pavlovic M, Bringmann A, Behr J, Ehrmann MA, Vogel RF**. Comparison of genotypic and phenotypic cluster analyses of virulence determinants and possible role of CRISPR elements towards their incidence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* . *Syst Appl Microbiol.* 2011;**34**:553–560.
73. **Madsen KT, Skov MN, Gill S, Kemp M** (2017) Virulence Factors Associated with *Enterococcus faecalis* Infective Endocarditis: A Mini Review. *The Open Microbiology Journal* **11**:1-11.
74. **Makinen P, Clewell DB, An F and Makinen KK** (1988) Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metallo-endopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (strain OG1-10). *J Biol Chem* **264**:3325-3334.

75. **Makinoshima H, Glickman MS** (2006) Site-2 proteases in prokaryotes: regulated intramembrane proteolysis expands to microbial pathogenesis. *Microbes Infect.* **8**:1882–1888.
76. **Miyazaki, S., Ohno, A., Kobayashi, I., Uji, T., Yamaguchi, K., and Goto, S.** (1993) Cytotoxic effect of hemolytic culture supernatant from *Enterococcus faecalis* on mouse polymorphonuclear neutrophils and macrophages. *Microbiol Immunol.* **37**:265-70.
77. **Moore GE, Gerner RE and Franklin HA** (1967) Culture of normal human leucocytes. *JAMA* **199**:519-524.
78. **Moore WE and Holdeman LV** (1974) Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbio* **27**:961-979.
79. **Moreno MRF, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E and de Vuyst** (2006) The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* **106**:1-24.
80. **Mundy LM, Sahn DF and Gilmore M** (2000) Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* **13**:513-22.
81. **Murray BE** (1990) The life and times of the enterococcus. *Clin Microbiol Rev* **3**:46-65.
82. **Mutters NT, Mersch-Sundermann V, Mutters R, Brandt C, Schneider-Brachert W, Frank U** (2013) Control of the Spread of Vancomycin-Resistant Enterococci in Hospitals. *Epidemiology and Clinical Relevance. Dtsch Arztebl Int* **110**:725-731.
83. **Nallapareddy SR, Singh KV, Duh RW, Weinstock GM and Murray BE** (2000) Diversity of ace, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of ace during human infections. *Infect Immun* **68**:5210-5217.
84. **Nallapareddy SR, Singh KV, Sillanpaa J, Garsin DA, Hook M, Erlandsen SL und Murray BE** (2006) Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J Clin Invest* **116**: 2799-2807.
85. **Noble W, Virani Z and Crec R** (1992) Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **93**:195-198.
86. **NRZ-Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen** (2017) [https://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/download/pps2016/PPS\\_2016\\_Abschlussbericht\\_20.07.2017.pdf](https://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/download/pps2016/PPS_2016_Abschlussbericht_20.07.2017.pdf) (Letzter Zugriff: 25. 11. 2018).
87. **O'Toole GA, Kaplan HB, Kolter R** (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**:49-79.
88. **Patel R, Keating MR, Cockerill III FR and Steckelberg JM.** (1993) Bacteremia due to *Enterococcus avium*. *Clin Infect Dis* **17**:1006-1011.
89. **Patti JM, Allen BL, McGavin MJ and Hook M** (1994) MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* **48**:585-617.
90. **Poh CH, Oh HML and Tan AL** (2006) Epidemiology and clinical outcome of enterococcal bacteraemia in an acute care hospital. *J Infect* **52**:383-386.

91. **Pompei R, Lampis G, Berlutti F and Thaller MC** (1991) Characterization of yellow-pigmented enterococci from severe human infections. *J Clin Microbiol* **29**:2884-2886.
92. **Rich RL, Demeler B, Ashby K, Deivanayagam CCS, Petrich JW, Patti JM, Narayana SVL and Höök M** (1998) Domain structure of the *Staphylococcus aureus* collagen adhesin. *Biochemistry* **37**:15423-15433.
93. **Rich RL, Kreikemeyer B, Owens RT, LaBrenz S, Narayana SVL, Weinstock GM, Murray BE, Höök M** (1999) Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *J Biol Chem* **274**:26939-26945.
94. **Schleifer KH and Kilpper-Bälz R** (1984) Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. . *Int J Syst Bacteriol* **34**:31-34.
95. **Schlievert PM, Chuang-Smith ON, Peterson ML, Cook LC and Dunny GM** (2010) *Enterococcus faecalis* endocarditis severity in rabbits is reduced by IgG Fabs interfering with aggregation substance. *PloS One* **5**: e13194.
96. **Shankar NC., Lockatell V, Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS and Johnson DE** (2001) Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect Immun* **69**:4366-4372.
97. **Shanks OC, Santo Domingo JW and Graham JE** (2006). Use of competitive DNA hybridization to identify differences in the genomes of bacteria. *J Microbiol Methods* **66**:321–330.
98. **Shepard BD, Gilmore MS** (2002) Differential expression of virulence-related genes in *Enterococcus faecalis* in response to biological cues in serum and urine. *Infect Immun* **70**:4344-4352.
99. **Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, Kallen A, Limbago B, Fridkin S** (2013) Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol* **34**:1-14.
100. **Siezen R, Boekhorst J, Muscariello L, Molenaar D, Renckens B und M. Kleerebezem** (2006) *Lactobacillus plantarum* gene clusters encoding putative cell-surface protein complexes for carbohydrate utilization are conserved in specific gram-positive bacteria. *BMC Genomics* **7**:126-138.
101. **Singh KV, La Rosa SL, Somarajan SR, Roh JH and Murray BE** (2015) The fibronectin-binding protein EfbA contributes to pathogenesis and protects against infective endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 2015; **83**:4487-94.
102. **Su Y A, Sulavik M C, He P, Makinen K K, Makinen P-L, Fiedler S, Wirth R, Clewell D B** (1991) Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect Immun* **59**:415-420.
103. **Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS and Shankar N** (2004) Enterococcal Surface Protein Esp Enhances Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* **72**:6032-6939.

104. **Theilacker C, Sanchez-Carballo P, Toma I, Fabretti F, Sava I, Kropec A, Holst O and Huebner J** (2009) Glycolipids are involved in biofilm accumulation and prolonged bacteraemia in *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol* **71**:1055-1069.
105. **Thiercelin ME** (1899) Morphologie et modes de reproduction de l'enterocoque. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et des ses Filiales* **11**:551-553
106. **Thurlow LR, Thomas VC, Narayanan S, Olson S, Fleming SD and Hancock LE** (2010) Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* **78**: 4936-4943.
107. **Torelli R, Serror P, Paroni Sterbini F, Florio AR, Stringaro A, Colone M, De Carolis E, Martini C, Giard JC, Sanguinetti M und Posteraro B** (2012) The PavA-like fibronectin-binding protein of *Enterococcus faecalis*, EfbA, is important for virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. *J Infect Dis* **206**:952-960.
108. **Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Möller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH** (1989) Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* **245**:301-305.
109. **Ulett GC and Adderson EE** (2006) Regulation of Apoptosis by Gram-Positive Bacteria: Mechanistic Diversity and Consequences for Immunity. *Curr Immunol Rev* **2**:119-141.
110. **Van den Berghe E, De Winter Tand De Vuyst L** (2006). Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. *Int J Food Microbiol* **107**: 159-170.
111. **Varahan S, Iyer VS, Moore WT, Hancock LE** (2013) Eep Confers Lyszyme Resistance to *Enterococcus faecalis* via Activation of the Extracytoplasmic Function Sigma Factor SigV. *J Bacteriol* **195**:3125-3134.
112. **Weaver JG, Rouse MS, Steckelberg JM, Badley AD** (2004) Improved survival in experimental sepsis with an orally administered inhibitor of apoptosis. *FASEB J* **18**:1185-1191.
113. **Wells CL, Jechorek RP, Maddaus MA, Simmons RL** (1988) Effects of clindamycin and metronidazole on the intestinal colonization and translocation of enterococci in mice. *Antimicrob. Agents Chemother* **32** 1769-1775.
114. **Wells CL, Maddaus MA, Simmons RL** (1988) Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria. *Rev Infect Dis* **10**:958-979.
115. **Zeng J, Teng F, Weinstock GM und Murray BE** (2004) Translocation of *Enterococcus faecalis* strains across a monolayer of polarized human enterocyte-like T84 cells. *J. Clin. Microbiol* **42**: 1149-1154.
116. **Ziegler U and Groscurth P** (2004) Morphological Features of Cell Death. *Physiology* **19**:124-128

117. **Zola H, Swart B, Nicholson I, Aasted B, Bensussan A, Boumsell L, Buckley C, Clark G, Drbal K, Engel P, Hart D, Horejsi V, Isacke C, Macardle P, Malavasi F, Mason D, Olive D, Saalmueller A, Schlossman SF, Schwartz-Albiez R, Simmons P, Tedder TF, Uguccioni M and Warren H** (2005) CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. *Blood* **106**:3123-3126.
118. **Zou J and Shankar N** (2014) Enterococcus faecalis infection activates phosphatidylinositol 3-Kinase signaling to block apoptotic cell death in macrophages. *Infect Immun* **82**:5132-5142.

## **7. Anhang**

### **7.1 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationschrift**

Die Arbeit wurde im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen unter Betreuung von Frau PD Dr. med. Sabine Gröbner durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau PD Dr. med. Sabine Gröbner. Sämtliche Versuche wurden, nach Einarbeitung durch Frau PD Dr. med. Sabine Gröbner und Frau Bettina Hackl (Medizinsch-technische Assistentin), von mir durchgeführt.

Alle Auswertungen der Ergebnisse wurden unter Planung und Anleitung von Frau PD Dr. med. S. Gröbner eigenständig durch mich ausgeführt.

Die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder wurde in Zusammenarbeit mit Frau Birgit Fehrenbacher (MTA in der Abteilung von Prof. Dr. med. Martin Schaller – Dermatologie, Universitätsklinikum Tübingen) durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

## 7.2 Veröffentlichung

**Gröbner, S., Fritz, E., Schoch, F., Schaller, M., Berger, A.C., Bitzer, M., and Autenrieth, I.B.** (2010) Lysozyme activates *Enterococcus faecium* to induce necrotic cell death in macrophages. *Cell Mol Life Sci.* **67**:3331-44.

### **7.3 Danksagung**

Mein größter Dank gilt meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. Sabine Gröbner, die nie den Glauben an diese Arbeit verloren hat und mich nicht nur während der Laborarbeit unterstützte sondern auch bei der Erstellung dieser Arbeit mir unermüdlich mit Rat und Tat zur Seite stand!

Herrn Prof. Dr. med. Ingo Autenrieth möchte ich für die Überlassung des Themas und für die exzellenten Arbeitsbedingungen am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene danken.

Auch gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Institutes für ihre stets freundliche Hilfsbereitschaft, ganz besonders Frau Bettina Hackl, die mir half, mich in der "Laborwelt" zurechtzufinden.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Großvater, denen ich diese Arbeit widme. Ohne die jahrelange Unterstützung während meines Studiums und darüber hinaus wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Und "last, but not least" danke ich meinem lieben Ehemann Arnt für seine Liebe und Stärke an meiner Seite.