

Der Kampf gegen *Staphylococcus aureus*

-

Ubiquitäres Anti-Emp und die Detektionsbasis für stochastische Peptidarrays

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie- und Biowissenschaften des

Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

Dissertation

von

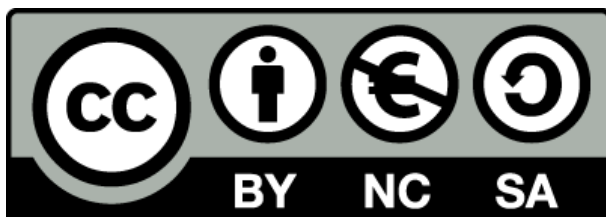
Master of Science Fabian Falk

geboren in Karlsruhe-Durlach

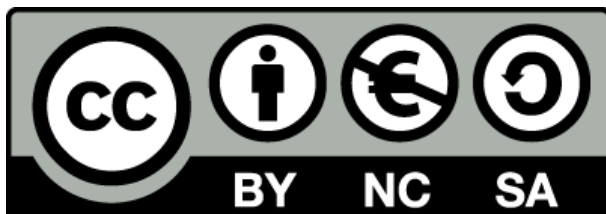
Referent: Prof. Dr. Frank Breitling

Korreferent: Prof. Dr. Tilman Lamparter

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2023



Dieses Werk ist unter einer *Creative Commons* Lizenz vom Typ Namensnennung - Nicht-kommerziell - Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 International zugänglich. Um eine Kopie dieser Lizenz einzusehen, konsultieren Sie <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> oder wenden Sie sich brieflich an *Creative Commons*, Postfach 1866, Mountain View, California, 94042, USA.



This work is licensed under the *Creative Commons* Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/> or send a letter to *Creative Commons*, PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA.

Die vorliegende Arbeit wurde von Beginn im November 2017, bis zum Ende im April 2023 unter Anleitung von Prof. Dr. Breitling und Prof. Dr. Lamparter am Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) angefertigt.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich wahrheitsgemäß, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis beachtet habe. Des Weiteren erkläre ich, dass ich mich derzeit in keinem laufenden Promotionsverfahren befinde, und auch keine vorausgegangenen Promotionsversuche unternommen habe. Die elektronische Version der Arbeit stimmt mit der schriftlichen Version überein und die Archivierung der Primärdaten gemäß Abs. A (6) der Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des KIT ist beim Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT) am KIT gesichert.

Karlsruhe, den 10.01.2024

Fabian Falk

Auszug

Ein menschlicher Antikörper gegen das extrazelluläre Matrixprotein (**Emp**) von *Staphylococcus aureus* wird in einem großen Anteil von Spenderseren nachgewiesen und zeigt in Substitutionsanalysen in jedem Serum sehr ähnliche Antikörper-Fingerabdrücke. Der Antikörper besitzt das Epitop ‚HYVPEFKGSLPAPRV‘, welches einem Aminosäureabschnitt am C-Terminus des Antigens entspricht. Diese Beobachtung widerspricht einer zufällig gesteuerten Entwicklung und Selektion des Antikörpers. In dieser Arbeit wird das Hauptaugenmerk daraufgelegt, das Phänomen dieses Antikörper-Fingerabdrucks durch Immunfärbungen von Substitutionsanalysen einer größeren Population von Patienten zu beobachten sowie Unterschiede und Gemeinsamkeiten zu charakterisieren. Der Antikörper wird in der Dissertation aus dem Serum aufgereinigt, analysiert, charakterisiert und auf eine mögliche Funktion überprüft.

Als zusätzliches Ziel wird die Detektionsgrundlage einer neuartigen und kostengünstigen Entwicklung getestet, welche dabei helfen könnte, eine Vielzahl von potentiell antibakteriellen Substanzen aus einer großen Auswahl an zufällig generierten Peptiden zu identifizieren. Aufgrund der steigenden Anzahl an Pathogenen, welche Resistenzen gegen antimikrobielle Substanzen entwickeln, steigt die Nachfrage nach humanverträglichen Alternativen weiter an. Die Entwicklung neuer Antibiotika ist derweil ein sehr zeit- und kostenaufwändiges Unterfangen. Ein Ultrahochdurchsatzverfahren, welches eine kostengünstige, stochastische Generation von mehreren Millionen Peptiden in einem einzigen Array erlaubt, sollte den Aufwand eines Screenings nach antibakteriellen Substanzen um ein Vielfaches reduzieren.

Staphylococcus aureus hat eine hohe Relevanz im aktuellen Gesundheitswesen, da es für einen Großteil der nosokomialen Infektionen verantwortlich ist. Es kann ein großes Spektrum an Organen und Implantaten infizieren und ist aufgrund seiner Versatilität, Anpassungsfähigkeit, Widerstandsfähigkeit und zunehmenden Resistenz gegen antibiotische Substanzen sehr schwierig zu behandeln. Es wurden bereits viele Versuche unternommen, um einen effektiven Impfstoff gegen das Bakterium zu entwickeln. Viele davon waren vielversprechend, aber bisher sind letztendlich alle Versuche, einen solchen Impfstoff zu entwickeln, gescheitert. Weitere Forschungen über dieses Bakterium sorgen aber zunehmend für ein besseres Verständnis der Beziehung zwischen *Staphylococcus aureus* und dem Menschen. Sie erhöhen somit die Chance, einen effektiven Impfstoff zu entwickeln. Das Wissen, welches in dieser Dissertation gesammelt wird, soll zusammen mit einer intensiven Recherche zur Aufklärung über den Ursprung und die Funktion des Antikörpers beitragen. Diese Arbeit soll das Wissen über *Staphylococcus aureus* erweitern und damit die Medizin auf dem Weg zur Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes unterstützen.

Abstract

A human antibody against the extracellular matrix protein (**Emp**) of *Staphylococcus aureus* is discovered in a large proportion of donor sera and shows very similar antibody fingerprints in substitution analyses in each serum. The antibody presents the epitope ,HYVPEFKGSLPAPRV', which corresponds to an amino acid segment at the C-terminus of the antigen. This observation contradicts the common theory of randomized development and selection of antibodies. In this thesis, the focus is set on the observation of the phenomenon shown by this antibody fingerprint. This is achieved by comparing differences and similarities of immunostainings and substitution analyses of a larger population of patients. After purification of the antibody from patient serum, it will be subsequently analysed, characterized and tested for possible function within the scope of this thesis.

As an additional goal, the detection basis of a novel and inexpensive screening method will be investigated. This method could help to identify a variety of potentially antibacterial substances from a large selection of randomly generated peptides. Due to the increasing number of pathogens developing resistance to antimicrobial agents, the demand for human-compatible alternatives continues to grow. Meanwhile, the development of new antibiotics is a very time-consuming and costly endeavour. An ultra-high-throughput method that allows cost-effective, stochastic generation of several million peptides in a single array should reduce the effort of screening for antibacterial substances significantly.

Staphylococcus aureus as a pathogen is highly relevant in the current healthcare system, as it is responsible for a large proportion of nosocomial infections. It can infect a wide range of organs and implants and is very difficult to treat due to its versatility, adaptability, resilience and increasing resistance to antibiotic substances. Many attempts have been made to develop an effective vaccine against this bacterium. Some have been promising, but so far, all attempts to develop such a vaccine have ultimately failed. However, further research into this pathogen is cumulatively providing a better understanding of the relationship between *Staphylococcus aureus* and humans, increasing the chances of gradually developing an effective vaccine. The knowledge gathered in this dissertation, together with intensive research on published studies, will help to approach the elucidation of the origin and function of the antibody. This contribution has the intention to increase the knowledge about *Staphylococcus aureus* and bringing healthcare a step closer to a successful vaccine.

1 Einleitung	1
2 Theoretischer Hintergrund	4
2.1 Blutserum als Informationsquelle	4
2.2 Das menschliche Immunsystem gegen <i>Staphylococcus aureus</i>	7
2.2.1 Angeborenes Immunsystem	8
2.2.1.1 Das Komplementsystem	9
2.2.1.2 Neutrophile Granulozyten.....	10
2.2.1.3 <i>HL-60</i> Zelllinie und der opsonophagozytischer Tötungsassay	15
2.2.2 B-Lymphozyten und Immunglobuline.....	16
2.2.2.1 Somatische Rekombination und junktionale Diversität	17
2.2.2.2 Zentrale und periphere Toleranz	18
2.2.2.3 Aktivierung von B-Lymphozyten	19
2.2.2.4 Entwicklungsverlauf von Plasmablasten.....	20
2.2.2.5 Effektormechanismen von Antikörpern und Immunglobulin-Isotypen	21
2.2.3 Immunologisches Gedächtnis.....	23
2.2.3.1 B-Lymphozyten-Gedächtniszellen.....	24
2.2.3.2 Plasma-Gedächtniszellen	25
2.2.4 Zustand und Rolle von Antikörpertiter gegen <i>Staphylococcus aureus</i>	26
2.2.5 Unkonventionelle B-Zellen und natürliche Antikörper.....	30
2.2.6 Immunsystem-assoziiertes Kollateralschaden.....	32
2.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	35
2.3.1 Entdeckung, Namensgebung und Abstammung.....	35
2.3.2 Propagation und Risikofaktoren.....	36
2.3.3 Adhäsine	41
2.3.3.1 <i>MSCRAMM</i> und <i>SERAM</i>	42
2.3.3.2 Extrazelluläres Matrixprotein	46
2.3.4 Virulenz und Pathologie.....	49
2.3.4.1 Regulation der Virulenz.....	50
2.3.4.2 Phänotypen.....	50
2.3.4.2.1 Planktonischer Phänotyp und Abszessgemeinschaft.....	50
2.3.4.2.2 Biofilm und Schläfer.....	51
2.3.4.2.3 Kleine Kolonien-Variante	52
2.3.4.3 Toxine, Superantigene und Phenol-lösliche Moduline.....	53
2.3.4.4 Immunevasion.....	56

2.3.4.4.1 Verweigerung von Opsonisierung und Phagozytose.....	56
2.3.4.4.2 Invasion von Wirtszellen.....	58
2.3.4.4.3 Überleben im Phagolysosom.....	60
2.3.4.4.4 Direkte Manipulation von Immunzellen.....	61
2.3.4.4 Resistenz gegen antimikrobielle Substanzen.....	63
2.3.4.5 Pathologie.....	67
2.3.5 Präventive Maßnahmen, Behandlung und Impfungen.....	70
2.3.5.1 Impfungen und passive Immunisierung.....	71
2.3.5.2 Therapien, Präventionen und Behandlungen.....	74
2.3.5.3 Neue und unkonventionelle Behandlungen.....	77
2.3.5.4 Prospekt.....	79
2.4 Das Prinzip der stochastischen Peptidarrays.....	83
2.4.1 Antimikrobielle Peptide.....	84
2.4.2 Beladung von Bakterien in den mikrostrukturierten Träger.....	85
2.4.3 Eigenschaften des bakteriellen Reporterstammes.....	86
3 Ziel der Arbeit.....	88
4 Ergebnisse.....	90
4.1 Substitutionsanalysen von Patientenseren.....	90
4.1.1 Analyse des Antikörper-Fingerabdrucks.....	97
4.1.2 Konsensussequenz des Anti-Emp-Epitops.....	106
4.1.3 Vergleich der Signalstärken zwischen den Testseren.....	109
4.1.4 Unterschiede der Gruppen in Konsensussequenz und Aminosäureblot.....	116
4.2 Affinitätschromatographie.....	118
4.2.1 Sondierung für optimale Parameter.....	118
4.2.1.1 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration.....	119
4.2.1.2 Bestimmung der Antikörperfunktion und Ausbeute.....	120
4.2.1.3 Analyse von Protein- und Antikörperbanden.....	126
4.2.2 Optimierte Affinitätschromatographie.....	140
4.2.2.1 Bestimmung der Antikörperfunktion und Ausbeute.....	140
4.2.2.2 Analyse von Protein- und Antikörperbanden.....	144
4.2.2.3 Annäherung an die Proteinmenge über relative Intensität.....	157
4.2.3 Weitere Affinitätschromatographien.....	159
4.2.4 Optimierte Bestimmung der Proteinmenge.....	166

4.3 Charakterisierung des Anti-Emp-Antikörpers	171
4.3.1 Bestimmung des IgG-Subtyps	171
4.3.2 Bestimmung des Isotyps der leichten Kette	172
4.3.3 Massenspektrometrische Analyse des Anti-Emp-Antikörpers	174
4.4 Überprüfung der Antikörper-Antigen-Interaktion <i>in vitro</i>	179
4.4.1 LDS-PAGE und <i>Western Blot</i>	180
4.4.2 Reduktion der Wirkung von Immunglobulin-bindende Proteinen.....	186
4.4.2.1 Einsatz von alternativem Sekundärantikörper	186
4.4.2.2 Sättigung der Immunglobulin-bindenden Proteine.....	192
4.4.3 Optimierter Nachweis der Affinität <i>in vitro</i>	194
4.5 Überprüfung der Antikörper-Antigen-Interaktion <i>in situ</i>	198
4.6 Interaktion zwischen ApoA1, Emp und Anti-Emp	203
4.7 Überprüfung der Antikörperfunktion <i>in vivo</i>	207
4.7.1 Wirkung der Prozesschemikalien auf <i>Staphylococcus aureus</i>	208
4.7.2 Affinität der Prozesschemikalien gegenüber Emp.....	211
4.7.3 Einfacher OPTA	213
4.7.4 Komplexer OPTA.....	219
4.8 Ausgewählte Anti-Emp-scFvs aus humanem Phagen-Display	224
4.9 Markierung von Anti-Emp exprimierenden B-Zellen	230
4.10 Test des <i>RGB-S</i> Reporterstammes in der Anwendung für stochastische Peptidarrays	237
4.10.1 Befüllung und Visualisierung des mikrostrukturierten Glasträgers	237
4.10.2 Stressantwort des <i>RGB-S</i> Reporter gegenüber Ciprofloxacin.....	240
4.10.3 Diffusion von Bakterien innerhalb der Kavitäten.....	242
4.10.4 Bestimmung der <i>MIC</i> durch Resazurin	244
4.10.5 Bestimmung der Stress-induzierten Expression über Zeit.....	246
4.10.6 Durchführung eines Beweises des Prinzips	248
5 Zusammenfassung	251
6 Diskussion.....	253
7 Ausblick.....	262

8 Experimenteller Teil.....	267
8.1 Material und Geräte	267
8.1.1 Grundausrüstung.....	267
8.1.2 Messgeräte und Apparaturen	267
8.1.2.1 1290 Infinity II Flüssigchromatographiesystem.....	267
8.1.2.2 CanoScan 9000F.....	267
8.1.2.3 DensiCHEK plus Densitometer	268
8.1.2.4 Digitale Pumpe Reglo ICC	268
8.1.2.5 DMLS Durchlichtmikroskop.....	268
8.1.2.6 Eclipse Ti.....	269
8.1.2.7 Elmasonic S 100 H.....	270
8.1.2.8 FACSCanto™ System.....	270
8.1.2.9 FLUOstar OPTIMA.....	271
8.1.2.10 Impact II QTOF MS.....	272
8.1.2.11 Innoscan 1100 AL.....	272
8.1.2.12 Invertiertes AE20 Phasenkontrastmikroskop	273
8.1.2.13 Jenway 7305.....	274
8.1.2.14 Muffelofen L24/11/B180.....	274
8.1.2.15 NanoDrop® 1000 Spektralphotometer	275
8.1.2.16 Odyssey Classic Imaging System	275
8.1.2.17 Optisches Digitalmikroskop VHX-600.....	276
8.1.2.18 Optisches System nach Clemens von Bojničić-Kninski	276
8.1.2.19 PixCell II.....	278
8.1.2.20 Synergy H1 Hybrid Multimodus-Mikrotiterplatten-Lesegerät.....	278
8.1.2.21 VL-115.BL.....	279
8.1.2.22 XCell SureLock™ Mini-Cell Elektrophorese-System mit XCell II Blotmodul.....	280
8.1.2.23 Zelldichtemessgerät Biowave WPA CO 8000.....	280
8.1.2.24 Zepto Modell 2 Grundgerät Typ A	280
8.1.3 Basischemikalien.....	281
8.1.4 Kommerzielle Produkte.....	283
8.1.5 Antikörper	288
8.1.6 Peptide	290
8.1.7 Zusammensetzung von Puffern, Lösungen und Nährmedien	291
8.1.8 Bakterienstämme.....	297
8.1.9 Humanmaterial und Ethik	298

8.1.10	Verwendete Computerprogramme.....	299
8.2	Präparation und Analytik von Proteinen und Peptiden	300
8.2.1	Affinitätschromatographie durch Epitop-Paratop-Koppelung.....	300
8.2.1.1	Serumextraktion.....	300
8.2.1.2	Vorbereitung der stationären Phase.....	300
8.2.1.3	Affinitätschromatographie	301
8.2.1.4	Elution der spezifischen Antikörper	301
8.2.2	Herstellung von Bakterienlysat aus Bakterien.....	301
8.2.3	Präparation und Analyse von Proteinen.....	302
8.2.3.1	LDS-PAGE.....	302
8.2.3.2	Färbung mit <i>Coomassie</i> [®] -Brillant-Blau	303
8.2.3.3	<i>Western Blot</i>	303
8.2.3.4	<i>Ponceau S</i> -Färbung.....	304
8.2.4	Herstellung von Peptidarrays.....	304
8.2.5	Immunfärbung	304
8.2.5.1	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen.....	304
8.2.5.2	Immunfärbung von PVDF-Membranen.....	305
8.2.5.3	Immunfärbung von Peptidarrays	306
8.2.5.4	Immunfärbung von immobilisierten <i>Staphylokokken</i>	308
8.2.6	MS Analyse von Antikörpern	309
8.2.6.1	Fällung und Präparation des Anti-Emp-Antikörpers.....	309
8.2.6.2	Enzymatischer Verdau der Antikörper	309
8.2.6.3	Flüssigchromatographie mit Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer	310
8.2.7	<i>In-vitro</i> -Selektion des Emp-Antigens durch humanes Phagen-Display.....	310
8.3	Zellbiologische Experimente	311
8.3.1	Kultivierung und Differenzierung von <i>HL-60</i> Zellen	311
8.3.1.1	Kultivierung von <i>HL-60</i> Zellen	311
8.3.1.2	Differenzierung von <i>HL-60</i> Zellen zu aktiven neutrophilen Granulozyten.....	311
8.3.1.3	Zellzahlbestimmung durch Trypanblau-Färbung	311
8.3.1.4	Evaluierung der Zelldifferenzierung.....	311
8.3.2	<i>FACS</i> von peripheren mononukleären Blutzellen	312
8.3.2.1	Blutentnahme und Lyse von Erythrozyten	312
8.3.2.2	Markierung von biotinylierten Peptiden durch fluoreszierendes Avidin	312
8.3.2.3	Sieben von Anti-Emp Gedächtniszellen durch <i>FACS</i>	312
8.4	Mikrobiologische Experimente	313

8.4.1 Kultivierungsbedingungen	313
8.4.1.1 <i>Staphylokokken</i> und <i>Bacillus subtilis</i>	313
8.4.1.2 <i>Escherichia coli</i> und <i>RGB-S Reporter</i>	313
8.4.1.3 <i>Synechocystis spec.</i>	314
8.4.2 Bestimmung der Bakterienzahl durch Trübungswert.....	314
8.4.3 Immobilisierung von <i>Staphylokokken</i> auf Glasträgern	314
8.4.4 Test auf toxisches Potential der Versuchsreagenzien des Tötungsassays	314
8.4.5 Kolorimetrische Bestimmung der <i>MIC</i> von antimikrobiellen Substanzen durch Resazurin.....	316
8.4.6 Protokoll zur Messung der Stressantwort unter Exposition von Stressoren.....	316
8.4.7 Hydrostatische Befüllung und Auswertung der mikrostrukturierten Glasträger	318
8.4.7.1 Assemblierung der fluidischen Kammer	318
8.4.7.2 Hydrostatische Befüllung von mikrostrukturierten Glasträgern	318
8.4.7.3 Präparation und Detektion von <i>Synechocystis spec.</i>	318
8.4.7.4 Präparation und Detektion von humanen Erythrozyten	319
8.4.7.5 Lebend-Tot-Färbung	319
8.4.7.5.1 Präparation von Bakterien durch Lebend-Tot-Färbung	319
8.4.7.5.2 Detektion von Bakterien durch Lebend-Tot-Färbung	319
8.4.7.6 <i>RGB-S Reporter</i>	320
8.4.7.6.1 Präparation des <i>RGB-S Reporters</i>	320
8.4.7.6.2 Detektion des <i>RGB-S Reporters</i>	320
8.4.7.7 Test auf antimikrobielle Stressantwort in mikrostrukturierten Glasträgern	320
8.5 Durchführung des OPTA.....	321
8.5.1 Vorbereitung der Kulturen und Reagenzien	321
8.5.1.1 Vorbereitung der <i>Staphylokokken</i>	321
8.5.1.2 Vorbereitung der differenzierten <i>HL-60</i> Zellen.....	321
8.5.1.3 Vorbereitung der Testsubstanzen und Versuchsreagenzien	321
8.5.2 Durchführung des OPTA	322
8.5.3 Analyse des OPTA	322
8.5.4 Dokumentation und Auswertung.....	323
8.6 Polymerherstellung und chemische Modifikation von mikrostrukturierten Glasträgern	323
8.6.1 Veredelung von mikrostrukturierten Glasträger mit 10:90-PEGMA-co-PMMA-Polymerfilm	323

8.6.1.1	Reinigung und Aktivierung der mikrostrukturierten Glaträger.....	323
8.6.1.2	Synthese von Brom-Silan.....	323
8.6.1.3	Silanisierung der mikrostrukturierten Glasoberfläche	323
8.6.1.4	Veredelung der mikrostrukturierten Glasoberfläche.....	324
8.6.1.5	Knüpfung von Fmoc-βA an Copolymer	324
8.6.2	Oberflächensynthese von antibiotischen Peptiden auf einem modifizierten mikrostrukturierten Träger	324
8.6.2.1	Fmoc-Entschützung	325
8.6.2.2	Waschen und trocknen	325
8.6.2.3	Acetylierung von freien Aminogruppen.....	325
8.6.2.4	Seitenkettenentschützung.....	325
8.6.2.5	Knüpfung von Peptiden auf 10:90-PEGMA-co-PMMA-Polymerfilm	325
8.6.3	Hydrophobierung von Glas	326
8.6.3.1	Sicherung von Mikrokavitäten	326
8.6.3.2	Aktivierung von mikrostrukturierten Glaträgern.....	326
8.6.3.3	Aktivierung von Glasplatten.....	326
8.6.3.4	Hydrophobierung durch Dampfabscheidung	326
8.6.4	Herstellen einer Gussform aus PMMA und einer Dichtung aus PDMS	327
9	Abkürzungen	328
9.1	Aminosäuren.....	328
9.2	Chemikalien	329
9.3	Biomoleküle, Gene und Proteine.....	330
9.4	Sonstige.....	335
9.5	Einheiten.....	339
9.6	Größenordnungen.....	340
10	Literaturverzeichnis	341
11	Bilderlizenzen	386
12	Anhang.....	387
12.1	Publikationen und Konferenzbeiträge.....	387
12.2	Danksagungen.....	388
12.3	Anlagen.....	390

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Epitopkartierung des Emp von <i>Staphylococcus aureus</i> zeigt Antikörper von 20 Testseren, welche innerhalb der Aminosäuresequenz des Proteins binden und durch eine Sekundärfärbung markiert werden. Die X-Achse beschreibt die Position der markierten Aminosäure in der Sequenz. Anti- Emp -Antikörper binden bevorzugt am C-Terminus ^[48] . Durch eine motivbasierte Analyse durch Weber <i>et al.</i> (2017) ist bekannt, dass die rot markierten Peptide für die Interaktion zwischen Peptid und Antikörper essenziell sind ^[41] . Das Bild wurde mit Erlaubnis von Frau Rentschler verwendet ^[48]	5
Abbildung 2: Rechts im Bild ist das Fluoreszenzsignal von zwei Substitutionsanalysen zu erkennen, welche mit dem Anti- Emp -Fingerabdruck assoziiert werden (Oben = Fünfer-Konfiguration; Unten = 16er-Konfiguration). Das Signalmuster der Substitutionsanalyse entspricht dem aus der Publikation von Dr. Weber bekannten Muster ^[41] . Links im Bild ist schematisch eine konditionierte Formatierung derselben Substitutionsanalysen zu erkennen. Die Konditionierung basiert auf den Intensitätswerten, welche bei der Auswertung durch den <i>PepSlide</i> [®] Analyzer jedem fluoreszierenden Peptidspot zugeteilt wird.	6
Abbildung 3: Der kumulative Effekt von Antikörpern und Komplementen und ihren jeweiligen Rezeptoren ermöglicht die Phagozytose von <i>Staphylococcus aureus</i> durch phagozytische Zellen. Die Illustration wurde aus der Publikation von McGuinness <i>et al.</i> (2016) übernommen ^[9] . Die genannte Publikation ist über eine internationale Namensnennung-Lizenz 4.0 von <i>Creative Commons</i> (CC BY 4.0) geschützt ^[a]	13
Abbildung 4: Das Bild zeigt ein vereinfachtes Modell, wie sich ein Bakterienstamm von <i>Staphylococcus aureus</i> innerhalb einer Kommune verbreitet. In der Illustration sind besiedelte Menschen mit gelber Farbe und infizierte Menschen in roter Farbe hervorgehoben. Die doppelten roten Pfeile zeigen Kontaktwege, auf denen eine Übertragung stattfinden kann. Je größer das Übertragungsrisiko, desto breiter der doppelte Pfeil. Die Illustration stammt aus der Publikation von Knox <i>et al.</i> (2017) ^[404] und wurde mit der Erlaubnis von <i>Elsevier</i> verändert. Eine Lizenz für eine Übersetzung und Veröffentlichung wurde von dem Herausgeber erworben ^[b]	41
Abbildung 5: Ein von Geraci <i>et al.</i> (2017) publiziertes und durch das Computerprogramm <i>I-TASSER</i> vorhergesagtes dreidimensionales Modell des Emp scheint mit der größten Wahrscheinlichkeit der tatsächlichen Form des Proteins zu entsprechen. Links wird der N-Terminus in blau und rechts der C-Terminus in Rot gezeigt. Die Aminosäure Histidin mit ihrem Imidazol an der Seitenkette wird in weißer Farbe hervorgehoben. Die Illustration wurde aus der Publikation von Geraci <i>et al.</i> (2017) ^[610] übernommen. Die genannte Publikation ist über eine internationale Namensnennung-Lizenz 4.0 von <i>Creative Commons</i> (CC BY 4.0) geschützt ^[a]	47
Abbildung 6: <i>Staphylococcus aureus</i> besitzt ein großes Spektrum an direkten und indirekten Mechanismen, um eine Opsonisierung und das Wirken einer Immunantwort zu verhindern. Diese Schutzmechanismen sind für das Überleben des Bakteriums im Wirtskörper essenziell. Diese Illustration wurde aus der Publikation von Pozzi <i>et al.</i> (2016) ^[559] übernommen und übersetzt. Die genannte Publikation ist über eine internationale, nicht-kommerzielle Namensnennung-Lizenz 4.0 mit der Weitergabe unter gleichen Bedingungen von <i>Creative Commons</i> (CC BY-NC-SA 4.0) geschützt ^[c]	59
Abbildung 7: Unterhalb der Zeitlinie werden chronologisch alle Meilensteine in der Resistenzentwicklung von <i>Staphylococcus aureus</i> bis zu der Erscheinung von VRSA dargestellt. Über die Zeitlinie ist die Entwicklung der korrespondierenden Antibiotika gezeigt. Diese Illustration wurde entsprechend der Publikation von McGuinness <i>et al.</i> (2017) ^[945] nachgebildet. Die genannte Publikation ist über eine internationale nicht-kommerzielle Namensnennung-Lizenz 4.0 für die Weitergabe unter gleichen Bedingungen von <i>Creative Commons</i> (CC BY-NC 4.0) geschützt ^[d]	64
Abbildung 8: Darstellung eines mikrostrukturierten Glasträgers aus Quarzglas mit vergrößertem Ausschnitt seiner Mikrostrukturen. Die ~ 2,8 Mio. Kavitäten sind auf einer Fläche von 75,0 x 25,0 mm ² durch einen Durchmesser von 12,0 µm und einer Tiefe von 10,0 µm bei einem Abstand von 8,0 µm definiert. Sie dienen als individuelle Reaktionsräume während der Peptidsynthese. Das Bild entstammt der Dissertation von Roman Popov (2018) ^[1356] . Es ist über eine internationale, nicht-kommerzielle Namensnennung-Lizenz 4.0 mit der Weitergabe unter gleichen Bedingungen von <i>Creative Commons</i> (CC BY-NC-SA 4.0) geschützt ^[c]	84
Abbildung 9: Der Glasträger wird mit Hilfe einer Kunststoffdichtung passend zwischen zwei großen Quarzglasplatten gepresst und über Öffnungen in der Dichtung mit dem Fluidiksystem verbunden. Zwischen dem Träger und der langen Glasplatte entsteht ein Fluidikkanal, in welchem nach der Befüllung eine Kontaktfläche zwischen Mikrostrukturen und Bakteriensuspension entsteht. Das Bild wurde mit der Erlaubnis des Autors, Zekun Zhou, verändert und übernommen ^[l]	85

Abbildung 10: Mit Patientenseren inkubierte <i>PEPperCHIP</i> [®] Peptid-Mikroarrays auf einem Glasträger mit Fünfer-Konfiguration. Die Seren dienen als Quelle für den Primärantikörper und benetzen die Arrays in einem Verdünnungsverhältnis von 1:100. Gebundene Primärantikörper werden durch Anti-IgG <i>Fc DyLight</i> [®] 680 in der Sekundärfärbung markiert. Substitutionsanalysen, deren SA aufgrund von Messartefakten die Schwelle überschreiten, sind rot umrandet und markiert.	93
Abbildung 11: Mit Patientenseren inkubierte <i>PEPperCHIP</i> [®] Peptid-Mikroarrays auf einem Glasträger mit Fünfer-Konfiguration. Die Seren dienen als Quelle für den Primärantikörper und benetzen die Arrays in einem Verdünnungsverhältnis von 1:100. Gebundene Primärantikörper werden durch Anti-IgA <i>DyLight</i> [®] 800 in der Sekundärfärbung markiert. Substitutionsanalysen, deren SA aufgrund von Messartefakten die Schwelle überschreiten, sind rot umrandet und markiert.	94
Abbildung 12: Mit Patientenseren inkubierte <i>PEPperCHIP</i> [®] Peptid-Mikroarrays auf einem Glasträger mit 16er-Konfiguration. Die Seren dienen als Quelle für den Primärantikörper und benetzen die Arrays in einem Verdünnungsverhältnis von 1:100. Gebundene Primärantikörper werden durch Anti-IgG <i>Fc DyLight</i> [®] 680 in der Sekundärfärbung markiert. Die Umrandung und Farbe der Arrays beschreibt folgende Charakteristika: Blau = keine Besiedlung vorhanden; Gold = Besiedlung vorhanden; Grün = unbekannter Status; Rot = Mittelwert des Epitops überschreitet Schwelle der SA oder zeigt große Diskrepanz zwischen Messwert und empirischer Evidenz.	95
Abbildung 13: Mit Patientenseren inkubierte <i>PEPperCHIP</i> [®] Peptid-Mikroarrays auf einem Glasträger mit 16er-Konfiguration. Die Seren dienen als Quelle für den Primärantikörper und benetzen die Arrays in einem Verdünnungsverhältnis von 1:100. Gebundene Primärantikörper werden durch Anti-IgA <i>DyLight</i> [®] 800 in der Sekundärfärbung markiert. Die Umrandung und Farbe der Arrays beschreibt folgende Charakteristika: Blau = keine Besiedlung vorhanden; Gold = Besiedlung vorhanden; Grün = unbekannter Status; Rot = Mittelwert des Epitops überschreitet Schwelle der SA oder zeigt große Diskrepanz zwischen Messwert und empirischer Evidenz.	96
Abbildung 14: Alle Sekundärfärbungen werden in einem Verhältnis von 1:5000 durchgeführt und sind entsprechend ihrer Parameter auf der Abbildung verteilt. Oben = schwache Affinität des Epitops; Unten = normale Affinität des Epitops; Links = Elution bei pH 2,0; Rechts = Elution bei pH 3,0; Mitte = Serum. Mit Ausnahme des Serums ist der Proteingehalt bei der Primärfärbung von jeder Probe zum direkten Vergleich auf einen Proteingehalt von 1,0 µg/mL normalisiert.	121
Abbildung 15: Alle Sekundärfärbungen werden in einem Verhältnis von 1:5000 durchgeführt und sind entsprechend ihrer Parameter auf der Abbildung verteilt. Oben = schwache Affinität des Epitops; Unten = normale Affinität des Epitops; Links = Elution bei pH 2,0; Rechts = Elution bei pH 3,0; Mitte = Serum. Mit Ausnahme des Serums ist der Proteingehalt bei der Primärfärbung von jeder Probe zum direkten Vergleich auf einen Proteingehalt von 1,0 µg/mL normalisiert.	122
Abbildung 16: Nicht-reduzierende LDS-PAGE aller während der Affinitätschromatographie generierten Proben und stationären Phasen nach einer <i>Coomassie</i> [®] -Brillant-Blau-Färbung. Alle Proben werden in einem Volumen von 10,0 µL aufgetragen. Zusätzlich zu den Proben werden 1,0 und 2,0 µg bovines Serumalbumin (BSA)(K) und ein Marker für Proteingrößen (M) als Kontrollen verwendet. Die Legende beschreibt, welche Antikörper (Ak.) oder Antikörperfragmente in den nummerierten Banden mit größter Wahrscheinlichkeit zu finden sind.	127
Abbildung 17: LDS-PAGE aller während der Affinitätschromatographie generierten Proben und stationären Phasen unter reduzierenden Bedingungen, nach einer <i>Coomassie</i> [®] -Brillant-Blau-Färbung.	128
Abbildung 18: Von jeder Probe werden 2,0 µL in einer reduzierenden LDS-PAGE verwendet. Nach der Übertragung auf eine Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) werden die Proben in einem Verhältnis von 1:5000 mit Sekundärantikörpern gegen leichte und schwere Ketten von IgG eingefärbt. Zusätzlich zu den Proben wird das Serum in einem Verhältnis von 1:200 und ein Marker für Proteingrößen als Kontrollen aufgetragen. Die Legende beschreibt, welche Antikörper oder Antikörperfragmente in den nummerierten Banden mit größter Wahrscheinlichkeit zu finden sind.	129
Abbildung 19: Von jeder Probe werden 2,0 µL in einer reduzierenden der LDS-PAGE verwendet. Nach der Übertragung auf eine Membran aus PVDF werden die Proben in einem Verhältnis von 1:5000 mit Sekundärantikörpern gegen schwere Ketten von IgA eingefärbt. Zusätzlich zu den Proben werden das Serum in einem Verhältnis von 1:200 und ein Marker für Proteingrößen als Kontrollen aufgetragen. Die Legende beschreibt, welche Antikörper oder Antikörperfragmente in den nummerierten Banden mit größter Wahrscheinlichkeit zu finden sind.	130
Abbildung 20: Kombination der beiden <i>Western Blots</i> aus Abbildung 18 und 19. Die Legende beschreibt, welche Antikörper oder Antikörperfragmente in den nummerierten Banden mit größter Wahrscheinlichkeit zu finden sind.	131
Abbildung 21: Zusammenfassung aller mit <i>Coomassie</i> [®] -Brillant-Blau eingefärbten Banden der LDS-PAGE aus den Abbildungen 16 und 17. Die Markierungen der Peaks wurden aus diesen Abbildungen übernommen. Eine rote Linie beschreibt die Abgrenzung eines Peaks gegenüber dem Hintergrundrauschen. Diese Abgrenzung wird für jeden Peak gleich gehalten, damit ein Vergleich zwischen den Proben möglich ist. Die Peaks 1 bis 3 der nicht-reduzierten Proben und Peaks 3 bis 5 der reduzierten Proben werden jeweils als gemeinsamer Peak zusammengefasst, da ihre Flächen sich teilweise überlappen.	133

Abbildung 22: Zusammenfassung der Banden des <i>Western Blots</i> aus der Abbildung 18. Die Markierungen der Peaks wurden aus dieser Abbildung übernommen. Eine Abgrenzung zum Hintergrundrauschen ist so marginal, dass sie nicht im Blot angezeigt wird. Sie wird für jeden Peak gleich gehalten, damit ein Vergleich zwischen den Proben möglich ist.....	134
Abbildung 23: Zusammenfassung der Banden des <i>Western Blots</i> der Abbildung 19. Die Markierungen der Peaks wurden aus dieser Abbildung übernommen. Wenn sichtbar, beschreibt eine rote Linie die Abgrenzung des Peaks gegenüber dem Hintergrundrauschen. Diese Abgrenzung wird für jeden Peak gleich gehalten, damit ein Vergleich zwischen den Proben möglich ist	135
Abbildung 24: Alle Proben für die Primärfärbung sind in einem Verhältnis von 1:500 verdünnt. Die beiden Sekundärantikörper werden mit einem Verdünnungsfaktor von 1:5000 aufgetragen. Färbungen gegen IgG sind links und gegen IgA rechts abgebildet.	141
Abbildung 25: LDS-PAGE aller während der optimierten Affinitätschromatographie generierten Proben und stationären Phasen, nach einer <i>Coomassie</i> [®] -Brillant-Blau-Färbung. Von jeder Probe wird 6,0 % des Gesamtvolumens in die Taschen gefüllt. Zusätzlich werden 1,0 µg BSA und ein Marker für Proteingrößen als Maßstab für das Molekulargewicht als Kontrolle verwendet. Die Legende beschreibt, welche Antikörper oder Antikörperfragmente in den nummerierten Banden mit größter Wahrscheinlichkeit zu finden sind.	145
Abbildung 26: Zusammenfassung aller mit <i>Coomassie</i> [®] -Brillant-Blau eingefärbten Banden der LDS-PAGE aus der Abbildung 25. Die Markierungen der Peaks wurden aus dieser Abbildung übernommen. Eine rote Linie beschreibt die Abgrenzung des Peaks gegenüber dem Hintergrundrauschen. Diese Abgrenzung wird für jeden Peak gleich gehalten, damit ein Vergleich zwischen den Proben möglich ist. Bei den nicht-reduzierten Proben werden Peaks 1 bis 3 als gemeinsamer Peak zusammengefasst, da ihre Fläche sich teilweise überlappt. Dasselbe gilt für Peaks 1 und 2 sowie 3 bis 5 bei den reduzierten Proben.....	146
Abbildung 27: Von jeder Probe werden 4,0 µL in einer reduzierenden und nicht-reduzierenden LDS-PAGE verwendet. Nach der Übertragung auf eine Membran aus PVDF werden die Proben in einem Verhältnis von 1:5000 mit Sekundärantikörpern gegen leichte und schwere Ketten von IgG eingefärbt. Zusätzlich zu den Proben werden das Serum in einem Verhältnis von 1:100 und ein Marker für Proteingrößen als Kontrollen aufgetragen. Der linke <i>Western Blot</i> ist in Kontrast und Helligkeit um das Zweifache und der rechte um das Zehnfache verstärkt. Die Legende beschreibt, welche Antikörper oder Antikörperfragmente in den nummerierten Banden mit größter Wahrscheinlichkeit zu finden sind.	147
Abbildung 28: Zusammenfassung der Banden des <i>Western Blots</i> aus der Abbildung 27. Die Markierungen der Peaks wurden aus dieser Abbildung übernommen. Eine blaue Linie, wenn sichtbar, beschreibt die Abgrenzung des Peaks gegenüber dem Hintergrundrauschen. Diese Abgrenzung wird für jeden Peak gleich gehalten, damit ein Vergleich zwischen den Proben möglich ist. Bei den nicht-reduzierten Proben werden Peaks 1 bis 4 als gemeinsamer Peak zusammengefasst, da ihre Flächen sich teilweise überlappen.....	148
Abbildung 29: Von jeder Probe werden 4,0 µL in einer reduzierenden und nicht-reduzierenden LDS-PAGE verwendet. Nach der Übertragung auf eine Membran aus PVDF werden die Proben in einem Verhältnis von 1:5000 mit Sekundärantikörpern gegen schwere Ketten von IgA eingefärbt. Zusätzlich zu den Proben werden das Serum in einem Verhältnis von 1:100 und ein Marker für Proteingrößen als Kontrollen aufgetragen. Der linke <i>Western Blot</i> ist in Kontrast und Helligkeit um das Zehnfache und der rechte um das 40-fache verstärkt. Die Legende beschreibt, welche Antikörper oder Antikörperfragmente in den nummerierten Banden mit größter Wahrscheinlichkeit zu finden sind.....	149
Abbildung 30: Zusammenfassung der Banden des <i>Western Blots</i> der Abbildung 29. Die Markierungen der Peaks wurden aus dieser Abbildung übernommen. Eine rote Linie, wenn sichtbar, beschreibt die Abgrenzung des Peaks gegenüber dem Hintergrundrauschen. Diese Abgrenzung wird für jeden Peak gleich gehalten, damit ein Vergleich zwischen den Proben möglich ist. Bei den nicht-reduzierten Proben werden Peaks 1 bis 4 als gemeinsamer Peak zusammengefasst, da ihre Flächen sich teilweise überlappen.....	150
Abbildung 31: Kombination der beiden <i>Western Blots</i> aus Abbildung 27 und 29. Die Legende beschreibt, welche Antikörper oder Antikörperfragmente in den nummerierten Banden mit größter Wahrscheinlichkeit zu finden sind.	151
Abbildung 32: Visuelle Darstellung der Flächen, welche für eine Annäherung an die absolute Proteinmenge gemessen wurden.	158
Abbildung 33: LDS-PAGE aller während der optimierten Affinitätschromatographie von den Seren von FS3 und FS4 generierten Proben, nach einer <i>Coomassie</i> [®] -Brillant-Blau-Färbung. Von jeder Probe wird 10,0 µl in eine Geltasche gefüllt. Zusätzlich zu den Proben werden jeweils zwei Proben mit 1,0 und 2,0 µg BSA als Referenzwert und ein Marker für Proteingrößen als Maßstab für das Molekulargewicht als Kontrollen beigefügt. Der Kontrast und die Helligkeit der Abbildung sind optimiert. Die Legende beschreibt, welche Antikörper oder Antikörperfragmente in den nummerierten Banden mit größter Wahrscheinlichkeit zu finden sind. Zur Bestimmung der Proteinmenge von Antikörpern werden alle Banden im gelben Rechteck verwendet.	167

Abbildung 34: Zusammenfassung aller mit <i>Coomassie</i> [®] -Brillant-Blau eingefärbten Banden der LDS-PAGE aus der Abbildung 33. Die Markierungen der Peaks wurden aus dieser Abbildungen übernommen. Eine rote Linie beschreibt die Abgrenzung des Peaks gegenüber dem Hintergrundrauschen. Diese Abgrenzung wird für jeden Peak gleich gehalten, damit ein Vergleich zwischen den Proben möglich ist. In der Flächenberechnung werden die Peaks 1 bis 3 sowie 5 und 6 zusammengefasst, da ihre Flächen sich teilweise überlappen.....	168
Abbildung 35: Visuelle Darstellung der Flächen, welche für eine Annäherung der absoluten Proteinmenge in den Elutionen der Affinitätschromatographie von Serum FS3 gemessen wurden. Links sind die Oberflächendiagramme der BSA -Proben dargestellt, welche als Referenzmenge eingesetzt wurden. Rechts sind die Oberflächendiagramme der ersten drei Banden aus den jeweiligen Elutionen abgebildet.....	169
Abbildung 36: Visuelle Darstellung der Flächen, welche für eine Annäherung der absoluten Proteinmenge in den Elutionen der Affinitätschromatographie von Serum FS4 gemessen wurden. Links sind die Oberflächendiagramme der BSA -Proben dargestellt, welche als Referenzmenge eingesetzt wurden. Rechts sind die Oberflächendiagramme der ersten drei Banden aus den jeweiligen Elutionen abgebildet.....	169
Abbildung 37: Im zentralen Array wird die Sekundärfärbung gegen IgG abgebildet. Oberhalb und unterhalb davon sind Sekundärfärbungen gegen spezifische Subtypen von IgG dargestellt. Alle Primär- und Sekundärfärbungen werden in einem Verhältnis von 1:1000 durchgeführt. Zur besseren Sichtbarkeit werden sie graphisch verstärkt und in Falschfarben dargestellt.	171
Abbildung 38: Zur Primärfärbung aller Substitutionsanalysen wird das Blutserum einer Testperson im Verhältnis von 1:200 verwendet. Sekundärfärbungen mit Anti- κ <i>DyLight</i> [®] 800 werden in einem Verhältnis von 1:1000 und Sekundärfärbungen mit Anti- λ <i>DyLight</i> [®] 680 werden in einem Verhältnis von 1:750 durchgeführt. Rot = markierte leichte λ -Ketten; Grün = markierte leichte κ -Ketten. Die Bilder sind in Falschfarben dargestellt und die mit Anti- λ markierten Arrays werden um das 50-fache verstärkt...	173
Abbildung 39: Von jedem Lysat wird 9,0 μ l in eine Geltasche gefüllt. Zusätzlich zu den Proben werden 1,0 μ g Emp und ein Marker für Proteingrößen als Maßstab für das Molekulargewicht beigefügt. Die Helligkeit und der Kontrast des Bildes sind optimiert.	181
Abbildung 40: Zusätzlich zu den Proben wird Emp mit einer Menge von 16,0 ng und ein Marker für Proteingrößen aufgetragen. Zur Immunfärbung werden die Proben im Verhältnis von 1:500 mit Anti- Emp und in einem Verhältnis von 1:5000 mit Sekundäran antikörpern gegen IgG₁ eingefärbt. Kontrast und Helligkeit des <i>Western Blots</i> sind um das Zehnfache verstärkt.	183
Abbildung 41: Zusammenfassung der Banden des <i>Western Blots</i> aus der Abbildung 38. Die Markierungen der Peaks wurden aus dieser Abbildung übernommen. Die Abgrenzung für jeden Peak wird gleich gehalten, damit ein Vergleich zwischen den Proben möglich ist. Bei Peaks mit größerem Hintergrundrauschen wird die Abgrenzung mit einer blauen Linie hervorgehoben. Der Peak von Sbi und SpA sowie von Emp und fehlgefaltetem Emp , werden jeweils als eine Fläche zusammengefasst.	184
Abbildung 42: Zusätzlich zu den Proben wird Emp mit einer Menge von 16,0 ng und ein Marker für Proteingrößen aufgetragen. Nach der Übertragung auf eine Membran aus PVDF werden die Proben in einem Verhältnis von 1:500 mit Anti- Emp und in einem Verhältnis von 1:5000 mit Sekundäran antikörpern gegen die <i>Fc</i> -Region von IgG eingefärbt. Kontrast und Helligkeit des <i>Western Blots</i> sind um das Achtfache verstärkt.....	187
Abbildung 43: Zusätzlich zu den Proben wird Emp mit einer Menge von 16,0 ng und ein Marker für Proteingrößen aufgetragen. Nach der Übertragung auf eine Membran aus PVDF werden die Kontrolle von den Proben getrennt und in einem Verhältnis von 1:5000 mit Sekundäran antikörpern gegen die <i>Fc</i> -Region von IgG eingefärbt. Kontrast und Helligkeit des <i>Western Blots</i> sind um das Achtfache verstärkt.	189
Abbildung 44: Zusammenfassung der Banden der <i>Western Blots</i> aus den Abbildungen 42 und 43. Die Markierungen der Peaks wurden aus diesen Abbildungen übernommen. Die Abgrenzung wird für jeden Peak gleich gehalten, damit ein Vergleich zwischen den Proben möglich ist. Bei Peaks mit größerem Hintergrundrauschen wird die Abgrenzung mit einer blauen Linie hervorgehoben. Der Peak von Sbi und SpA sowie von Emp und fehlgefaltetem Emp , werden jeweils in einer Fläche zusammengefasst.....	190
Abbildung 45: Zusätzlich zu den Proben wird zwei Mal Emp mit einer Menge von 16,0 ng und ein Marker für Proteingrößen aufgetragen. Nach der Übertragung auf eine Membran aus PVDF wird die Kontrolle von den Proben getrennt. Die Proben werden in einem Verhältnis von 1:500 mit Anti- Emp eingefärbt. Sowohl Proben als auch Kontrollen werden anschließend in einem Verhältnis von 1:5000 mit Sekundäran antikörpern gegen die <i>Fc</i> -Region von IgG inkubiert. Kontrast und Helligkeit sind um das Achtfache verstärkt.	193
Abbildung 46: Zusätzlich zu den Proben wird Emp mit einer Menge von 16,0 ng und einem Marker für Proteingrößen aufgetragen. Nach der Übertragung auf eine Membran aus PVDF werden die Proben in einem Verhältnis von 1:500 mit Anti- Emp und in einem Verhältnis von 1:5000 mit Sekundäran antikörpern gegen die <i>Fc</i> -Region von IgG eingefärbt. Kontrast und Helligkeit sind um das Fünffache verstärkt.....	195

Abbildung 47: Zusammenfassung der Banden des <i>Western Blots</i> aus der Abbildung 46. Die Markierungen der Peaks wurden aus dieser Abbildung übernommen. Diese Abgrenzung wird für jeden Peak gleich gehalten, damit ein Vergleich zwischen den Proben möglich ist. Bei Peaks mit größerem Hintergrundrauschen wird die Abgrenzung mit einer blauen Linie hervorgehoben. Der Peak von Sbi und SpA sowie von Emp und fehlgefaltetem Emp , werden jeweils als eine Fläche zusammengefasst.	196
Abbildung 48: Jeweils eine Farbbildaufnahme der beiden Bakterienstämme wurde bei einer Belichtungszeit von 20 Mikrosekunden detektiert.	199
Abbildung 49: Jeweils eine Farbbildaufnahme einzelner und gruppierter <i>Staphylokokken</i> unter Anregung des Fluorophors des Sekundäntikörpers. In der Primärfärbung wird kein Antikörper verwendet.	200
Abbildung 50: Jeweils eine Farbbildaufnahme einzelner und gruppierter <i>Staphylokokken</i> unter Anregung des Fluorophors des Sekundäntikörpers. In der Primärfärbung wird Anti- Myc in einer Konzentration von 15,0 µg/mL verwendet.	201
Abbildung 51: Jeweils eine Farbbildaufnahme einzelner und gruppierter <i>Staphylokokken</i> unter Anregung des Fluorophors des Sekundäntikörpers. In der Primärfärbung wird eine Elution von FS2 in einem Verhältnis von 1:500 verwendet.	202
Abbildung 52: Die Substitutionsanalyse wird direkt mit 10,0 µg/mL markiertem menschlichen ApoA1 eingefärbt. Zur besseren Sichtbarkeit werden die Helligkeit und der Kontrast des Arrays um das 50-fach verstärkt und in Falschfarben dargestellt.	203
Abbildung 53: Links ist die Sekundärfärbung der mit Serum und Sekundäntikörper markierten Bakterienlysate dargestellt. Von jedem Lysat wurden 5,0 µL eingesetzt und zusätzlich wurde in eine Tasche 16,0 ng rekombinantes Emp als Kontrolle pipettiert. Auf der rechten Seite ist der <i>Western Blot</i> der antikörperhaltigen Fraktionen abgebildet. Hier werden von jeder Verdünnung 1,0 µL verwendet und zusätzlich eine Kontrolle aus 50,0 ng ApoA1 beigefügt. Der Sekundäntikörper wird in einem Verhältnis von 1:1000 eingesetzt. Der <i>Western Blot</i> ist in Falschfarben dargestellt und Kontrast sowie Helligkeit sind um das Vierfache verstärkt.	205
Abbildung 54: Nach der Primärfärbung werden alle Peptidarrays mit ihrem jeweiligen Sekundäntikörper in einem Verhältnis von 1:5000 eingefärbt. Die Intensitäten der oberen beiden Arrays werden als Graustufenbilder zu gleichen Bedingungen detektiert und in Messwerte umgewandelt. Zur besseren Sichtbarkeit werden alle Bilder in Falschfarben dargestellt. Zusätzlich wird Kontrast und Helligkeit der beiden unteren Arrays um das 20-fache verstärkt.	212
Abbildung 55: <i>Columbia</i> -Agar mit 5,0 % Schafsblut (<i>Columbia</i> Agar), bewachsen mit Kolonien von <i>Staphylokokken</i> . Die Bakteriensuspension mit der kleinsten Verdünnung hat eine Potenz von 10 ⁻¹ und wurde im unteren rechten Viertel jeder Platte mit einem Tropfenvolumen von 50,0 µL aufgetragen. Die Potenz der für die Innokulation verwendeten Verdünnungen nimmt im Uhrzeigersinn bis zu einem maximalen Verdünnungsfaktor von 10 ⁴ zu.	215
Abbildung 56: <i>Columbia</i> -Agar, bewachsen mit Kolonien von <i>Staphylokokken</i> . Die Bakteriensuspension mit der kleinsten Verdünnung hat eine Potenz von 10 ⁻¹ und wurde im oberen rechten Viertel jeder Platte mit einem Tropfenvolumen von 50,0 µL aufgetragen. Die Potenz der für die Innokulation verwendeten Verdünnungen nimmt im Uhrzeigersinn bis zu einem maximalen Verdünnungsfaktor von 10 ⁴ zu.	220
Abbildung 57: Abweichend zu den vorherigen Beschreibungen zeigen die Quadrate über jedem PVDF-Fragment den zur Markierung eingesetzten Primäntikörper. Links sind die Sekundärfärbungen der Proben zu sehen, welche zuvor in einem Verhältnis von 10,0 µg/mL mit <i>scFvs</i> markiert wurden. Rechts werden dieselben Proben zuvor mit einer Elution von FS2 im Verhältnis von 1:500 inkubiert. Beide Sekundäntikörper werden zur Anwendung in einem Verhältnis von 1:5000 verdünnt. Der <i>Western Blot</i> wird in Falschfarben dargestellt und Kontrast sowie Helligkeit um das Achtfache verstärkt.	226
Abbildung 58: Von jedem Lysat werden 5,0 µL in einer reduzierenden LDS-PAGE verwendet. Zusätzlich zu den Proben wird Emp mit einer Menge von 16,0 ng und ein Marker für Proteingrößen aufgetragen. Nach der Übertragung auf eine Membran aus PVDF werden die Proben in einem Verhältnis von 1:500 mit 10,0 µg/mL eines <i>scFv</i> markiert und anschließend werden sowohl Proben und Kontrollen in einem Verhältnis von 1:5000 mit Sekundäntikörpern gegen die <i>Fc</i> -Region von IgG eingefärbt. Der <i>Western Blot</i> wird in Falschfarben dargestellt und Kontrast sowie Helligkeit um das Zehnfache verstärkt.	228
Abbildung 59: Oben links = <i>Synechocystis spec.</i> ohne Vergrößerung; Oben rechts = Durch Viabilitätsfarbstoffe markierte <i>Bacillus subtilis</i> in Kavitäten, links tot, rechts lebendig, bei einer Vergrößerung von 2 X; Unten = Mikroskopische Aufnahmen von humanen Erythrozyten, links in Kavitäten, rechts auf den Stegen des Glasträgers, bei einer Vergrößerung von 2000 X. Die Aufnahmen der fluoreszierenden Bakterien werden in Falschfarben dargestellt und deren Helligkeit um 30,0 % verstärkt.	239
Abbildung 60: RGS-S Reporter nach Inkubation in einem mikrostrukturierten Glasträger mit (rechts) und ohne (links) Zugabe von Ciprofloxacin. Die Bilder sind in Falschfarben dargestellt und deren Helligkeit um 30,0 % verstärkt.	241
Abbildung 61: Erstes Bild einer Echtzeitaufnahme des <i>RGB-S</i> Reporters während der Inkubation in einem mikrostrukturierten Glasträger, supplementiert mit Ciprofloxacin. Auf der rechten Seite sind alle Pixel mit einer Signalstärke von mehr als 75,0 RFU in dem Bild mit einem gelben Rahmen ausgewählt.	243

Abbildung 62: Digitale Darstellung des Farbumschlags nach der Bestimmung der *MIC* des *RGB-S* Reporterstammes von mehreren Substanzen. Die Negativkontrolle (NK) entspricht der Kontrolle ohne Substanz und mit Bakterien. Die Positivkontrolle (PK) enthält keine Bakterien..... 245

Abbildung 63: *RGB-S* Reporter nach Inkubation in einem mikrostrukturierten Glasträger mit (rechts) und ohne (links) MP196. Die Bilder sind in Falschfarben dargestellt und deren Helligkeit um 30,0 % verstärkt..... 249

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die verschiedenen Klassen der Antikörper, welche sich bei Assemblierung durch einen Isotypen der konstanten Domäne der schweren Kette definieren. Die Daten für die Tabelle wurde aus der Abbildung 5.20 der 9. Auflage von Janeway Immunologie (2018) ^[51] übernommen und der Gesamtanteil der Antikörper im Serum mit den Messdaten von Gonzalez-Quintela <i>et al.</i> (2008) ^[188] ergänzt.....	22
Tabelle 2: Eine Auflistung von einigen wichtigen <i>MSCRAMM</i> , ihren Bindungspartnern und Funktionen. Die Tabelle wurde aus Foster <i>et al.</i> (2014) ^[10] übernommen und mit Informationen aus weiteren Publikationen ergänzt.	44
Tabelle 3: Wichtige <i>SERAM</i> mit ihren Bindungspartnern und Funktionen. Die Tabelle wurde aus Chavakis <i>et al.</i> (2005) ^[539] übernommen und mit Informationen aus weiteren Publikationen ergänzt.	45
Tabelle 4: Die Affinität des von <i>Staphylococcus aureus</i> exprimierten SpA gegenüber verschiedener Klassen von Immunglobulinen aus unterschiedlichen Spezies. Die Daten wurden aus der Publikation von Richman <i>et al.</i> (1982) ^[823] entnommen und mit Informationen von M. B. Frank (2001) ^[811] , Mark Page und Robin Thorpe (1996) ^[824] ergänzt.	58
Tabelle 5: Abhängig vom Gehalt einiger Zytokine im Blut zu Beginn und im Verlauf der Infektion kann sich der Krankheitsverlauf verschlechtern oder verbessern. Die Daten wurden aus der Publikation von Miller <i>et al.</i> (2020) ^[11] übernommen in Tabellenform zusammengefasst.	69
Tabelle 6: Abhängig von der Infektion und dem der Anfälligkeit des Bakteriums werden verschiedene Antibiotika zur Behandlung vorgeschlagen. Die Informationen für die Tabelle wurde aus der Publikation von Bamberger <i>et al.</i> (2005) übernommen ^[175] . ..	77
Tabelle 7: Einige alternative Wirkstoffe und Methoden, um Patienten mit einer Infektion durch <i>Staphylococcus aureus</i> zu behandeln und die Erfolgschance von Impfungen zu verbessern.	78
Tabelle 8: In den Zeilen werden die Designationen der unterschiedlichen Testseren und entlang der Spalten die Anzahl an der für eine erfolgreiche Interaktion möglichen Substitutionen an der jeweiligen Position im Peptid aufgelistet. Der Modalwert beschreibt die häufigste Anzahl an Aminosäuren im gesamten Datensatz für die jeweilige Position. Für die Farbkodierung gilt folgende Legende: Grün = essenzielle Position; Gold= bedingt essenzielle Position; Rot = nicht-essenzielle Position.	98
Tabelle 9: In den Zeilen werden die Designationen der unterschiedlichen Testseren und entlang der Spalten die Anzahl an der für eine erfolgreiche Interaktion möglichen Substitutionen an der jeweiligen Position im Peptid aufgelistet. Der Modalwert beschreibt die häufigste Anzahl an Aminosäuren im gesamten Datensatz für die jeweilige Position. Für die Farbkodierung gilt folgende Legende: Grün = essenzielle Position; Gold = bedingt essenzielle Position; Rot = nicht-essenzielle Position.	99
Tabelle 10 In den Zeilen werden die Designationen der unterschiedlichen Testseren und entlang der Spalten die essenziellen Aminosäuren an der jeweiligen Position im Peptid aufgelistet. An jeder Position wird die Darstellung auf maximal vier Aminosäuren begrenzt. Alle Aminosäuren sind von links nach rechts entsprechend ihrer Signalstärke absteigend sortiert. Die Aminosäuren aus der Originalsequenz sind in Rot markiert.	101
Tabelle 11: In den Zeilen werden die Designationen der unterschiedlichen Testseren und entlang der Spalten die essenziellen Aminosäuren an der jeweiligen Position im Peptid aufgelistet. An jeder Position wird die Darstellung auf maximal vier Aminosäuren begrenzt. Alle Aminosäuren sind von links nach rechts entsprechend ihrer Signalstärke absteigend sortiert. Die Aminosäuren aus der Originalsequenz sind in Rot markiert.	102
Tabelle 12: Informationen über die individuellen Charakteristika der Spenderseren.....	110
Tabelle 13: Gruppen innerhalb der Testpopulation, welche für einen statistischen Vergleich gegenübergestellt werden.....	111
Tabelle 14: Die Ergebnisse der <i>ANOVA</i> jedes Vergleichs im Überblick. Die Mittelwerte sind für beide Gruppen mit SA angegeben. Für jeden Vergleich wird ein q-Wert nach Tukey errechnet und entsprechend das Bestehen einer Signifikanz ermittelt.	112
Tabelle 15: Absorptionswerte und ungefähre Proteinmenge innerhalb der Elutionen aus der Affinitätschromatographie. Insgesamt werden drei photometrische Messungen pro Probe durchgeführt. Die SA ist in Klammer angegeben.	120
Tabelle 16: Anzahl der Peptidspots der individuellen Elutionen, deren RFI sich nach der Sekundärfärbung um mehr als 30,0 % von der korrespondierenden RFI der Peptidspot der Sekundärfärbung des Serums unterscheidet. Alle RFI sind als Mittelwerte der jeweiligen Triplikate zusammengefasst.	123
Tabelle 17: Berechnung der RFI aller während der Affinitätschromatographie entnommenen Proben und nachfolgende Bestimmung der relativen Ausbeute von funktionsfähigem Antikörpern im Verhältnis zum Blutserum.	125
Tabelle 18: Integrale aller Peaks aus den Intensitäts-Blots der nicht-reduzierten LDS-PAGE in Abbildung 21. Die Flächen werden zwischen den Aufreinigungen mit schwachem und normalem Epitop verglichen.	136
Tabelle 19: Integrale aller Peaks aus den Intensitäts-Blots der LDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen in Abbildung 21. Die Flächen werden zwischen den Aufreinigungen mit schwachem und normalem Epitop verglichen.	137

Tabelle 20: Die Integrale aller Peaks aus den Intensitäts-Blots in den Abbildungen 22 und 23. Die Flächen werden zwischen der Aufreinigung mit schwachem und normalem Epitop verglichen. Zur Vergleichbarkeit wird die Fläche des Serums mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und zum größten Integral ins Verhältnis gesetzt.	139
Tabelle 21: Anzahl der Peptidspots der individuellen Elutionen, deren RFI sich nach der Sekundärfärbung um mehr als 30,0 % von der korrespondierenden RFI der Peptidspot der Sekundärfärbung des Serums unterscheidet. Alle RFI sind als Mittelwerte der jeweiligen Triplikate zusammengefasst.	142
Tabelle 22: Berechnung der RFI aller Proben und nachfolgende Bestimmung der relativen Ausbeute von funktionsfähigem Antikörper des Antikörpertyps IgG und IgA , im Verhältnis zum Blutserum.....	143
Tabelle 23: Die relativen Flächen der Peaks aus den Intensitäts-Blots der nicht-reduzierten Proben der mit <i>Coomassie</i> [®] -Brillant-Blau eingefärbten LDS-PAGE in Abbildung 26, im Vergleich zum größten Peak des jeweiligen Molekulargewichts.	152
Tabelle 24: Die relativen Flächen der Peaks aus den Intensitäts-Blots der reduzierten Proben der mit <i>Coomassie</i> [®] -Brillant-Blau eingefärbten LDS-PAGE in Abbildung 26, im Vergleich zum größten Peak des jeweiligen Molekulargewichts.	153
Tabelle 25: Die relativen Flächen der Peaks aus den Intensitäts-Blots der nicht-reduzierten Proben des <i>Western Blots</i> in Abbildung 28, im Vergleich zum größten Peak des jeweiligen Molekulargewichts. Die Flächen der Peaks des Serums werden mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und zu der jeweils größten Fläche aus den anderen Proben ins Verhältnis gesetzt.	154
Tabelle 26: Die relativen Flächen der Peaks aus den Intensitäts-Blots der reduzierten Proben des <i>Western Blots</i> in Abbildung 28 im Vergleich zum größten Peak des jeweiligen Molekulargewichts. Die Flächen der Peaks des Serums werden mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und zu der jeweils größten Fläche aus den anderen Proben ins Verhältnis gesetzt.	155
Tabelle 27: Die relativen Flächen der Peaks aus den Intensitäts-Blots der reduzierten Proben des <i>Western Blots</i> in Abbildung 30, im Vergleich zum größten Peak des jeweiligen Molekulargewichts. Die Flächen der Peaks des Serums werden mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und zu der jeweils größten Fläche aus den anderen Proben ins Verhältnis gesetzt.	156
Tabelle 28: Die durchschnittliche Intensität Antikörper-haltiger Banden aus der LDS-PAGE in Abbildung 25 wird mit der durchschnittlichen relativen Intensität eines Referenzproteins mit bekannter Proteinmenge verglichen.	159
Tabelle 29: Anzahl der Peptidspots der individuellen Elutionen, deren RFI sich nach der Sekundärfärbung um mehr als 30,0 % von der korrespondierenden RFI der Peptidspot der Sekundärfärbung des Serums unterscheidet.	161
Tabelle 30: Anzahl der Peptidspots der individuellen Elutionen, deren RFI sich nach der Sekundärfärbung um mehr als 30,0 % von der korrespondierenden RFI der Peptidspot der Sekundärfärbung des Serums unterscheidet.	162
Tabelle 31: Berechnung der RFI aller Proben der nachfolgenden, optimierten Affinitätschromatographien von FS2 und nachfolgende Bestimmung der relativen Ausbeute von funktionsfähigem Antikörper, im Verhältnis zum Blutserum.	164
Tabelle 32: Berechnung der RFI aller Proben der optimierten Affinitätschromatographien von FS3 und FS4. Nachfolgend wird die relative Ausbeute von funktionsfähigen Antikörpern im Verhältnis zum Blutserum bestimmt.	165
Tabelle 33: Die RI Antikörper-haltiger Banden aus der LDS-PAGE in Abbildung 33 wird mit der durchschnittlichen RI eines Referenzproteins mit bekannter Proteinmenge verglichen.	170
Tabelle 34: Konstante Ketten innerhalb der Elution, welche durch MS bestimmt wurden.	174
Tabelle 35: Ergebnis der Analyse über MS für die schwere variable Kette. 3-48 ist in Rot und 3-15 in Grün hervorgehoben. .	176
Tabelle 36: Variable leichte Ketten innerhalb der Elution, welche durch MS bestimmt wurden.	177
Tabelle 37: Die relativen Flächen der Peaks aus den Intensitäts-Blots der Proben des <i>Western Blots</i> in Abbildung 41, im Vergleich zum größten Peak des jeweiligen Molekulargewichts. Die Probe von <i>Bacillus subtilis</i> wird ignoriert, da der Intensitäts-Blot keine Peaks erzeugt. Die Fläche des Peaks, welche das vermutete Emp -Dimer enthält, wird nicht in der Tabelle aufgeführt.	185
Tabelle 38: Die relativen Flächen der Peaks aus den Intensitäts-Blots der Proben des <i>Western Blots</i> in Abbildung 44, im Vergleich zum größten Peak des jeweiligen Molekulargewichts. Sekundärantikörper werden mit sek. Ak. abgekürzt. Die Fläche des Peaks, welche das vermutete Emp -Dimer enthält, wird nicht in der Tabelle aufgeführt.	191
Tabelle 39: Die relativen Flächen der Peaks aus den Intensitäts-Blots der Proben des <i>Western Blots</i> in Abbildung 47, im Vergleich zum größten Peak des jeweiligen Molekulargewichts. Die Fläche des Peaks, welche das vermutete Emp -Dimer enthält, wird nicht in der Tabelle aufgeführt. Ebenso werden die Peaks von unbekanntem Proteinen nicht aufgelistet.	197
Tabelle 40: Alle im Panning auf das Epitop reagierende scFvs mit detaillierter Information über ihre Zusammensetzung.	225
Tabelle 41: Darstellung aller Population der peripheren Blutbestandteile jeder mit <i>FACS</i> analysierten Probe.	234
Tabelle 42: Auflistung aller Objektive, welche bei der Anwendung des <i>DMLS</i> Durchlichtmikroskop zur Verfügung stehen.	268
Tabelle 43: Module des <i>Eclipse Ti</i>	269
Tabelle 44: Verfügbare Photoelektronenvervielfacher in Kombination mit den jeweiligen Anregungslasern.	271
Tabelle 45: Ausgerüstete Filterräder mit jeweils vier von acht möglichen <i>BMG-10</i> Filtern zur Begrenzung sowohl der Anregungs- als auch der Emissionswellenlängen im <i>FLOUstar OPTIMA</i>	272

Tabelle 46: Filtermodule des Innoscan 1100 AL mit dazugehöriger Anregungswellenlänge.....	273
Tabelle 47: Auflistung der vier am Objektivrevolver eingebauten Objektive des invertierten Phasenkontrastmikroskops AE20.	274
Tabelle 48: Auflistung der im optischen System integrierten optischen Filter von <i>Edmund Optics</i>	278
Tabelle 49: Auflistung der vier am Objektivrevolver eingebauten Objektive des <i>PixCell II</i>	278
Tabelle 50: Optische Filter zur Eingrenzung der Wellenlängen der Anregungs- und Emissionsspektren im <i>Synergy H1</i>	279
Tabelle 51: Auflistung aller in der Dissertation verwendeten Chemikalien.	281
Tabelle 52: Auflistung aller in der Dissertation verwendeten kommerziellen Produkte.	283
Tabelle 53: Auflistung aller in der Dissertation verwendeten Antikörper, mit Tabellenschlüssel.....	288
Tabelle 54: Auflistung aller in der Dissertation verwendeten Peptide, mit Tabellenschlüssel. Abstandshalter sind in Klammern angegeben.....	290
Tabelle 55: Auflistung aller in der Dissertation verwendeten Puffer, Lösungen und Nährmedien.	291
Tabelle 56: Auflistung aller in der Dissertation verwendeten Bakterienstämme.....	297
Tabelle 57: Die Probenkonsistenz der für die LDS-PAGE designierten Proben ist von dem jeweiligen Analyten abhängig. Letztendlich erreicht jede Probe ein Volumen von 20,0 µL.	303
Tabelle 58: Alle durch Konjugationssets mit Fluorophor markierte Proteine.....	305
Tabelle 59: Alle in Kombination verwendeten Blockierungsreagenzien, Färbepuffer sowie für die Primär- und Sekundärfärbung eingesetzten Antikörper, dargestellt im Zusammenhang mit dem jeweiligen Experiment.	306
Tabelle 60: Alle Arrayfärbungen mit der entsprechenden Angabe von Primär- und Sekundärantikörper, welche in den Färbelösungen verwendet wurden.	308
Tabelle 61: Alle verwendeten Konzentrationen der Peptid-Tetramere in der FACS zur Suche nach B-Gedächtniszellen.....	313
Tabelle 62: Verschiedene Testsubstanzen, deren toxisches Potential anhand der Wachstumsinhibition von <i>Staphylokokken</i> getestet wird. Alle Substanzen werden, wenn nicht anders angegeben, im entsprechenden Verhältnis mit DPBS-plus verdünnt.	315
Tabelle 63: Konfiguration der Monochromatoren zur Detektion von fluoreszierenden Proteinen während einer kontrollierten Exposition des RGB-S Reporters mit Stressoren.....	317
Tabelle 64: Vorbereitung der Testsubstanzen für den OPTA.....	322

Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Alle Anregungs- und Absorptionswellenlängen der fluoreszierenden Proteine des <i>RGB-S</i> Reporter Vektors. Ein Bakterium, welches diesen Vektor erhält, kann unter Stresseinfluss fluoreszierende Proteine als detektierbares Signal exprimieren. Das Diagramm ist aus der Dissertation von Ahmed Zoheir mit seiner Erlaubnis entnommen und angepasst ^[1366] . 87	
Diagramm 2: Der Aminosäureblot zeigt die durchschnittliche RFI der Sekundärfärbungen gegen IgG von Peptidspots deren Sequenz eine substituierte Aminosäure enthält. Die Signalstärke der Peptidspots wird hierbei in Relation zu der durchschnittlichen RFI der Peptidspots mit der originalen Peptidsequenz gesetzt. Es werden nur Aminosäuren angezeigt, deren RFI mindestens 60,0 % der originalen Aminosäure entsprechen. N = Stichprobenumfang. 103	103
Diagramm 3: Der Aminosäureblot zeigt die durchschnittliche RFI der Sekundärfärbungen gegen IgA von Peptidspots deren Sequenz eine substituierte Aminosäure enthält. Die Signalstärke der Peptidspots wird hierbei in Relation zu der durchschnittlichen RFI der Peptidspots mit der originalen Peptidsequenz gesetzt. Es werden nur Aminosäuren angezeigt, deren RFI mindestens 60,0 % der originalen Aminosäure entsprechen. 105	105
Diagramm 4: Aus den dominierenden Aminosäuren des gesamten Datensatzes lässt sich die Konsensussequenz bestimmen. Das gestapelte Diagramm ist entsprechend der Häufigkeit von unten nach oben absteigend sortiert. Der Balken mit der größten Häufigkeit ist durch eine violette Umrandung hervorgehoben. Die Konsensussequenz ist am Fuße der Stapel zusammengefasst. 107	107
Diagramm 5: Aus den dominierenden Aminosäuren des gesamten Datensatzes lässt sich die Konsensussequenz bestimmen. Das gestapelte Diagramm ist entsprechend der Häufigkeit von unten nach oben absteigend sortiert. Der Balken mit der größten Häufigkeit ist durch eine violette Umrandung hervorgehoben. Die Konsensussequenz ist am Fuße der Stapel zusammengefasst. Gibt es zwei Balken mit demselben Wert, wird zusätzlich die konkurrierende Aminosäure im Balken darüber angegeben. 108	108
Diagramm 6: Die Verteilung der GFI der Anti- Emp Substitutionsanalysen im Vergleich von Patienten mit und ohne bekannter Besiedlung. Alle Werte zwischen 25,0 und 75,0 % der maximalen Intensität werden innerhalb des Rechtecks als Rauten dargestellt. Werte die außerhalb des anderthalbfachen Interquartilsabstands (<i>IQR</i>) liegen, werden als statistische Ausreißer betrachtet. 113	113
Diagramm 7: Die Verteilung der GFI der Anti- Emp Substitutionsanalysen im Vergleich von Personen die jünger und älter als 25 Jahre alt sind. Alle Werte zwischen 25,0 und 75,0 % der maximalen Intensität werden innerhalb des Rechtecks als Rauten dargestellt. Werte die außerhalb des anderthalbfachen <i>IQR</i> liegen, werden als statistische Ausreißer betrachtet. 114	114
Diagramm 8: Die Verteilung der GFI der Anti- Emp Substitutionsanalysen im Vergleich von Patienten mit und ohne bekannten Allergien. Alle Werte zwischen 25,0 und 75,0 % der maximalen Intensität werden innerhalb des Rechtecks als Rauten dargestellt. Werte die außerhalb des anderthalbfachen <i>IQR</i> liegen, werden als statistische Ausreißer betrachtet. 115	115
Diagramm 9: Die Verteilung der GFI der Anti- Emp Substitutionsanalysen im Vergleich von männlichen und weiblichen Personen. Alle Werte zwischen 25,0 und 75,0 % der maximalen Intensität werden innerhalb des Rechtecks als gedrehte Quadrate dargestellt. Werte, die außerhalb des anderthalbfachen <i>IQR</i> liegen, werden als statistische Ausreißer betrachtet. 116	116
Diagramm 10: Zunahme der OD ₆₀₀ innerhalb eines Zeitraums von 15 Stunden von <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25904™, nach einer anderthalbstündigen Inkubation mit den in der Legende genannten Substanzen. Alle Messwerte sind entsprechend der Messungen einer Blindprobe gegen das Nährmedium geeicht. 209	209
Diagramm 11: Zunahme der OD ₆₀₀ innerhalb eines Zeitraums von 15 Stunden von <i>Staphylococcus aureus</i> 168L, nach einer anderthalbstündigen Inkubation mit den in der Legende genannten Substanzen. Alle Messwerte sind entsprechend der Messungen einer Blindprobe gegen das Nährmedium geeicht. 210	210
Diagramm 12: Auswertung und nachfolgende Hochzählung der Bakterienkolonien zur Berechnung der durchschnittlichen Konzentration an kolonienbildenden Einheiten der <i>Staphylokokken</i> in jeder Testreihe. 216	216
Diagramm 13: Die Differenzen in der Anzahl der Kolonien zwischen Proben und Kontrollen aus der Kolonienzählung in Diagramm 12, dargestellt als Viabilitätsdiagramm. Jede Bakterienfraktion ist als Stapel eines Säulendiagramms dargestellt. Wenn die Wirkung von <i>HL-60</i> Zellen oder Anti- Emp eine signifikante Reduktion in der Anzahl der gezählten Bakterienkulturen verursacht, wird das entsprechend an der Spitze jedes Stapels angegeben. 218	218
Diagramm 14: Auswertung und nachfolgende Hochzählung der Bakterienkolonien zur Berechnung der durchschnittlichen Konzentration an kolonienbildenden Einheiten der <i>Staphylokokken</i> in jeder Testreihe. Zu einer besseren Sichtbarkeit der Ergebnisse von 168L ist die X-Achse als dekadischer Logarithmus angegeben. 221	221

Diagramm 15: Die Differenzen in der Anzahl der Kolonien zwischen Proben und Kontrollen aus der Kolonienzählung in Diagramm 14, dargestellt als Viabilitätsdiagramm. Jede Bakterienfraktion ist als Stapel eines Säulendiagramms dargestellt. Wenn die Wirkung von <i>HL-60</i> Zellen oder den Substanzen eine signifikante Reduktion oder Zunahme in der Anzahl der gezählten Bakterienkulturen verursacht, wird das entsprechend an der Spitze jedes Stapels angegeben.	222
Diagramm 16: Vorwärts- und Seitwärtsstreuung von 50 000 Zellen. Im Rechteck werden Leukozyten als P1 definiert.	232
Diagramm 17: In P1 werden alle Zellen, deren Signalstärke des Sekundärantikörpers gegen CD27 90,0 RFU überschreitet, durch <i>Gating</i> als P2 definiert.	233
Diagramm 18: Aus P2 werden Zellen ausgewählt, welche bei der Markierung mit Anti- <i>Siglec-Fc-IgG APC</i> mindestens einen Wert von 200,0 RFU erreichen und als P3 zusammengefasst.	233
Diagramm 19: Im letzten <i>Gating</i> werden Zellen identifiziert, welche eine Signalstärke von 150,0 RFU durch die Markierung des Peptid-Tetramers besitzen und als P4 definiert.	234
Diagramm 20: Diagramme von Zellen, welche mit 150,0 nM (rechts) beziehungsweise mit 600,0 nM (links) Peptid-Tetramer markiert werden, im Vergleich.	236
Diagramm 21: Die Darstellung im Box-Plot zeigt die Verteilung der Signalstärken von GFPmut3b innerhalb der mit <i>RGB-S</i> Reporter befüllten Kavitäten beider mikrostrukturierten Glasträger. Werte, die außerhalb des anderthalbfachen <i>IQR</i> liegen, werden als statistische Ausreißer betrachtet.	242
Diagramm 22: Pixelzahl und GFI des <i>RGB-S</i> Reporters im Verlauf der Zeit.	244
Diagramm 23: Zunahme der Fluoreszenzintensität von mTagBFP2 im Verlauf von einem Tag, bei der Exposition des <i>RGB-S</i> Reporters mit MP196.	246
Diagramm 24: Zunahme der Fluoreszenzintensität von GFPmut3b im Verlauf von einem Tag, bei der Exposition des <i>RGB-S</i> Reporters mit MP196.	247
Diagramm 25: Zunahme der Fluoreszenzintensität von mRFP1 im Verlauf von einem Tag, bei der Exposition des <i>RGB-S</i> Reporters mit MP196.	247
Diagramm 26: Die Darstellung im Box-Plot zeigt die Verteilung der Signalstärken von mRFP1 innerhalb der mit <i>RGB-S</i> Reporter befüllten Kavitäten der beiden mikrostrukturierten Glasträger. Werte, die außerhalb des anderthalbfachen <i>IQR</i> liegen, werden als statistische Ausreißer betrachtet.	250

1 Einleitung

Unmittelbar nach der Geburt eines Menschen ist das ubiquitäre Bakterium *Staphylococcus aureus* ein stiller Teilhaber unseres Lebens^[1]. Seine Absichten sind als Pathogen aber schädlich. Der Mensch stellt als sein Hauptwirt seinen zentralen Lebensraum und auch Nahrungsquelle dar. Eine gesunde Person ist für solche Angreifer durch das Immunsystem normalerweise gut gewappnet, aber durch eine Koevolution, welche bereits bei archaischen Menschen und dessen Vorfahren begonnen hat, ist *Staphylococcus aureus* perfekt an seinen Wirt angepasst^[2]. Diese Anpassungen ermöglichen es dem Bakterium einen großen Teil der menschlichen Bevölkerung zu kolonisieren. Es ist deren ständiger Begleiter, was aber den meisten Menschen nicht bewusst ist^[3]. Im Verlauf ihrer Kolonisierungszeit nähern sich Wirt und Bakterium einem Equilibrium an, in welcher die Reaktion aufeinander attenuiert wird^[4,5]. Der Wirt entwickelt in dieser Zeit Antikörper gegen Superantigene^[6,7] und eine Population an T_H2-Gedächtniszellen^[8], um eine Überreaktion auf bestimmte Antigene zu vermeiden. Führt diese Kolonisierung auch nicht zwingendermaßen zu einer merklichen Infektion, so kann das opportunistische Pathogen jederzeit ein bereits kompromittiertes Immunsystem auszunutzen, um an seine begehrten Nährstoffe zu gelangen. Hierbei exprimiert es eine große Bandbreite an Virulenzfaktoren, die eine starke Effizienz darin besitzen, Wirtsproteine zu manipulieren, die Funktion des Immunsystems zu unterbinden oder sich selbst vor schädlichen Effekten abzuschirmen^[2,9]. So wie das Immunsystem viele redundante Möglichkeiten besitzt, um Krankheitserreger zu bekämpfen, besitzt *Staphylococcus aureus* viele Gegenmaßnahmen, welche ebenfalls durch Redundanzen abgesichert sind^[10]. Flexibilität und Anpassungsfähigkeit sind stark vom Bakterienstamm abhängig und sind ein essenzieller Bestandteil der Virulenz und der Gefährlichkeit und sind auch das Erfolgsprinzip für das Überleben des Bakteriums^[3,11]. Dieser Erfolg manifestiert sich in einer Vielzahl von Krankheiten, welche sich akut und chronisch von kaum merklich bis lebensbedrohlich äußern können und welche die Lebensqualität der betroffenen Personen einschränken^[12,13]. Im Jahr 2017 wurden 120 000 Fälle von durch *Staphylococcus aureus* verursachte Blutbahninfektionen in den vereinigten Staaten von Amerika bei einer Inzidenz von 38,2 bis 45,7 pro 100 000 Einwohner gezählt^[14-16]. Diese Infektionen führten in etwa 16,7 % der Fälle zum Tod^[16]. Unter Berücksichtigung aller möglichen Infektionen, die durch den Erreger verursacht werden und für eine professionelle medizinische Behandlung relevant genug sind, wird die Zahl in den Vereinigten Staaten im Jahr 1999 auf 500 000 Fälle mit einer Todesrate von 10,0 % geschätzt^[17,18]. Eine besondere Rolle spielen hierbei Infektionen durch Methicillin-resistente Varianten des Pathogens, da diese deutlich schwieriger zu behandeln sind und der Krankheitsverlauf entsprechend schwerwiegender ist. Im Jahr 2007 wurden bis zu 95 000 Infektionen durch Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) geschätzt, aus

denen 19 000 Todesfälle resultierten, was einer Letalitätsrate von 20,0 % entspricht^[19]. Weitere Hochrechnungen aus dem Jahr 1999 ergeben, dass MRSA bei ~ 21,0 % aller Infektionen durch das Bakterium involviert ist und dabei zweieinhalb mal mehr Todesfälle als Methicillin-sensitiver *Staphylococcus aureus* (MSSA) verursacht^[17]. Vergleichsweise wurden im Jahre 2011 in Deutschland in 18,0 bis 20,0 % aller Infektionen mit *Staphylococcus aureus* eine Methicillin-Resistenz des Pathogens nachgewiesen, welche bis zu 132 000 Patienten beeinträchtigt hat^[20].

Mit Entwicklung der industriellen Herstellung von Antibiotika hatte man ein effektives Mittel, um bakteriellen Infektionen die Stirn zu bieten^[21]. Bakterien sind aber dynamische Lebewesen, welche sich aufgrund ihrer hohen Mutationsrate sehr schnell verändern und an ungünstige Bedingungen anpassen können^[22]. Aus diesem Grund dauerte es nicht einmal ein halbes Jahrzehnt, bis sich erste resistente Varianten entwickelten^[23]. Diesem ersten Rückschlag konnte durch kostspielige neuentwickelte Antibiotika entgegengewirkt werden, aber auch hier währte der Erfolg nicht lange^[24]. *Staphylococcus aureus* hat seine Fähigkeit bewiesen, in relativ kurzer Zeit Resistenzen gegen eine Vielzahl von antibiotischen Substanzen zu entwickeln, besonders wenn diese nur in subletaler Dosis verabreicht werden^[25]. Mit verstreichender Zeit verteilt sich die Resistenz innerhalb der Bakterienstämme und das Pathogen eignet sich Resistenzen gegen immer mehr Substanzen an, welche als Wirkstoff zur Bekämpfung eingesetzt werden^[26,27]. Der Bedarf an einer dauerhaften Lösung in Form eines Impfstoffes, um vor allem den anfälligen Teil der Bevölkerung zu schützen, wird damit immer größer. Die ersten Impfstoffe, die gegen das Pathogen entwickelt wurden, zeigten während der ersten Testphasen sehr vielversprechende Ergebnisse. In späteren Testphasen und bei dem Einsatz im Menschen zeigten sich diese Impfstoffe allerdings wirkungslos^[28,29].

In den Industrieländern zählt das Bakterium zu einem der Pathogene, welche die größten Probleme im Gesundheitswesen verursacht und für die meisten Todesfälle verantwortlich ist^[30,31]. Statistische Daten veranschaulichen den Schaden, den das Bakterium anrichtet. Alleine die jährlichen Mehrkosten der durch das Pathogen hervorgerufenen Haut- und Weichgewebeeinfektionen werden in den vereinigten Staaten von Amerika auf 4,5 Mrd. \$ geschätzt^[32,33]. Aktuell gibt es noch wirksame Antibiotika gegen *Staphylococcus aureus*, aber die Weltgesundheitsorganisation warnt gerade davor, dass mit zunehmenden Resistenzen das Repertoire an wirksamen Substanzen in der nahen Zukunft stark schrumpfen wird^[34,35]. Um sich dieser Entwicklung entgegen zu stemmen, besteht Forschungsbedarf dergestalt, neue Wirkstoffe und Entwicklungen zu fördern und das Verhältnis zwischen Pathogen und Wirt besser zu verstehen, um sich einem wirksamen Impfstoff anzunähern^[3,11,36].

Ein Kontakt mit dem Bakterium ist unvermeidbar und trotzdem gibt es Menschen, die bis an ihr Lebensende niemals eine damit assoziierte Infektion erleiden^[4,37]. Während Antikörper gegen Antigene von *Staphylococcus aureus* in allen Menschen nachgewiesen werden können, so konnte ein damit zusammenhängender Schutz vor einer Infektion noch nicht nachgewiesen werden^[38,39]. Die Wirkung des normalerweise sehr erfolgreichen humoralen Immunsystems zeigt sich gegenüber diesem Krankheitserreger eingeschränkt^[29,40]. Aus diesem Grund ist es essenziell wichtig, die Interaktion von Antikörpern mit dem Bakterium besser zu verstehen. Jede Information kann dabei helfen dem adaptiven Immunsystem durch einen Impfstoff den Schub zu verpassen, der für einen vollständigen Schutz notwendig ist.

Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Analyse eines Antikörpers, welcher im Blutserum fast jeder Person nachweisbar ist. Der Antikörper hat die Besonderheit, dass er auf der molekularen Ebene bei jeder Testperson immer mit denselben Aminosäuren des Antigens interagiert, was einen zufälligen Ursprung praktisch ausschließt^[41,42]. Eine Aufklärung der Funktion und der Natur des Antikörpers liefert wichtige Informationen, welche bei zukünftigen Impfstoffen zu einer verbesserten Erfolgswahrscheinlichkeit führen kann.

Als Zusatz wird ein Reportersystem als Sensor für antimikrobielle Substanzen in einem neuartigen Peptidarray getestet. Diese stochastisch generierten Peptidarrays, welche auf der „Ein-Loch-ein-Peptid-Methode“ basieren, haben das Potential, Peptide im ultrahochdichten Format zu einem geringen Preis auf antimikrobielle Eigenschaften zu untersuchen. Hierdurch könnten sehr schnell neue Wirkstoffe entwickelt werden, welche dringend benötigt werden, um im Wettlauf gegen anpassungsfähige Krankheitserreger einen Vorsprung zu gewinnen^[43-45].

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Blutserum als Informationsquelle ^[42] Mit ihrer Dissertation hat Dr. Weber bewiesen, dass individuelle Antikörper mit spezifischen Fingerabdrücken in direkte Korrelation zu Krankheiten gebracht werden können. Die Überwachung der Fingerabdrücke ermöglicht hierbei die genaue Detektion von Antikörpern in der Auflösung ihrer molekularen Interaktion mit dem Antigen, sodass jeder Antikörper individuell unterschieden werden kann. Diese Art der Diagnostik ermöglicht es, genau die Antikörper zu ermitteln, welche bei einer Infektion oder eine Krankheit die größte Rolle spielen und macht es möglich, deren Relevanz einzuschätzen. Sie hat damit die Grundlage geschaffen, dass die Differenz (Δ) von einzelnen Antikörpertitern im Verlauf der Zeit als diagnostisches Werkzeug verwendet werden kann.

Zur Ermittlung potentieller Antigene hat Dr. Weber Blutseren von Patienten durch ein peptidbasiertes Phagen-Display getestet. Die Antigene, welche sich innerhalb des Displays als Treffer gezeigt haben, hat sie anschließend auf ihre individuellen molekularen Interaktionen untersucht. Für diese Untersuchungen wurden hochdichte Peptidarrays verwendet, um die Position der Antigene auf dem jeweiligen korrelierenden Protein und den individuellen molekularen Antikörper-Fingerabdruck des zugehörigen Antikörpers zu bestimmen. Insgesamt konnte Dr. Weber dadurch erfolgreich 73 Antikörper-Fingerabdrücke bestimmen. Interessanterweise gab es hierbei Antigene, welche sowohl in ihrer Position innerhalb des korrelierenden Proteins, als auch in der molekularen Auflösung des Antikörper-Fingerabdrucks bei allen Patienten identisch sind. Die Beobachtung dieses Phänomens widerspricht den biologischen Grundlagen der zufälligen Generation von Antikörpern ^[46,47].

Als ein Ergebnis im Phagen-Display hat sich das **Emp** von *Staphylococcus aureus* als relevantes Epitop hervorgehoben. Nachfolgende Analysen durch Epitopkartierung (Abbildung 1), Substitutionsanalyse (Abbildung 2) und Meme-Analyse haben ergeben, dass es bei einer großen Zahl von Patientenseren ein Antikörper nachweisbar ist, welcher auf dieses Epitop reagiert. Die Fingerabdrücke dieser Antikörper sind dabei nahezu identisch ^[41,48]. In Substitutionsanalysen wird in jedem Peptidspot eine Aminosäuresequenz an einer bestimmten Position durch eine definierte Aminosäure substituiert. Die Position der Substitution wird anhand der Zeile des Peptidarrays bestimmt und die an dieser Position eingesetzte Aminosäure wird anhand der Spalte festgelegt. Hierbei entstehen sowohl Peptidspots, deren Peptide die Originalsequenz als auch Peptidspots, deren Peptide eine abgeleitete Variante dieser Sequenz besitzen. Die originale Sequenz des Peptids entspricht hierbei dem Epitop des jeweiligen Antikörpers. Mit Hilfe dieser Analyse können die essenziellen Aminosäuren der Protein-Protein-Interaktion untersucht und der Antikörper-Fingerabdruck eines Antikörpers bestimmt werden.

HYVPEFKGSLPARPV

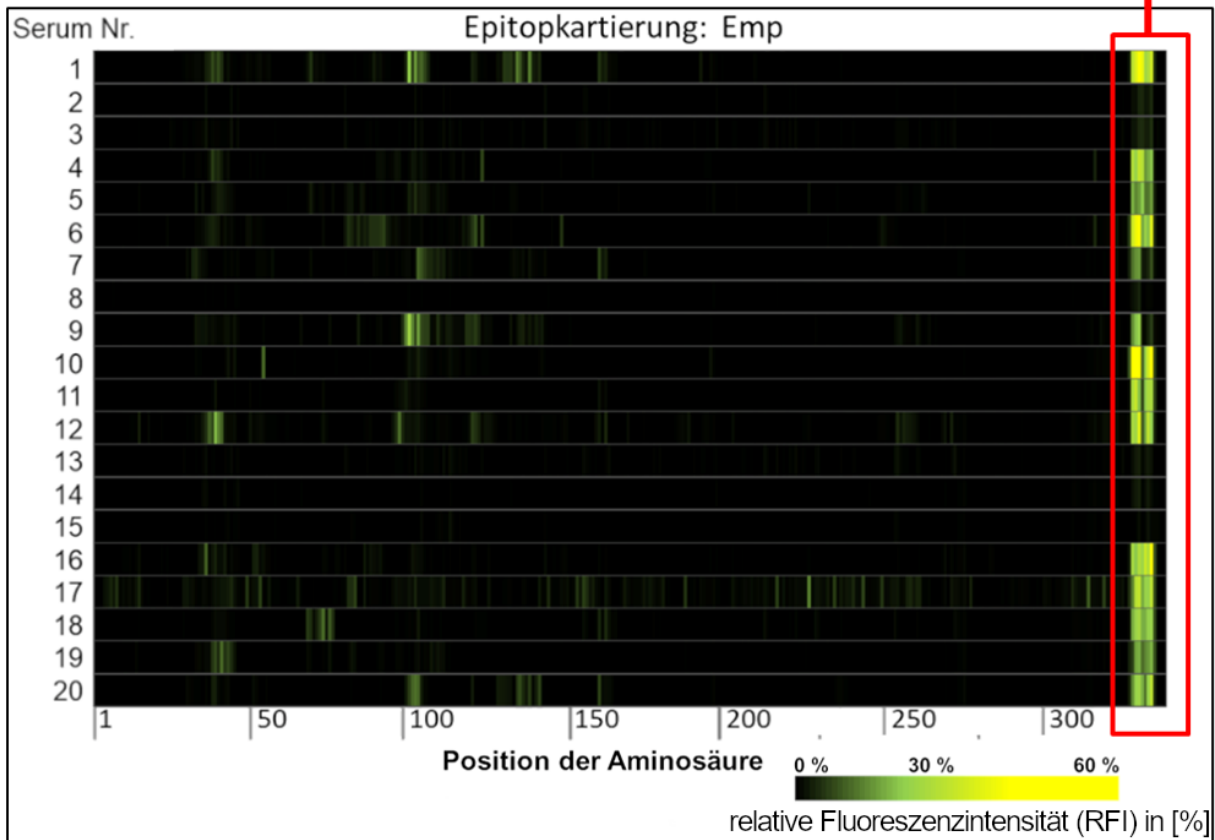


Abbildung 1: Die Epitopkartierung des **Emp** von *Staphylococcus aureus* zeigt Antikörper von 20 Testseren, welche innerhalb der Aminosäuresequenz des Proteins binden und durch eine Sekundärfärbung markiert werden. Die X-Achse beschreibt die Position der markierten Aminosäure in der Sequenz. Anti-**Emp**-Antikörper binden bevorzugt am C-Terminus^[48]. Durch eine motivbasierte Analyse durch Weber *et al.* (2017) ist bekannt, dass die rot markierten Peptide für die Interaktion zwischen Peptid und Antikörper essenziell sind^[41]. Das Bild wurde mit Erlaubnis von Frau Rentschler verwendet^[48].

Durch einen anschließenden Abgleich mit Online-Datenbanken lässt sich das zum Antikörper-Fingerabdruck zugehörige Ursprungprotein ermitteln^[41,49,50]. Die eigentliche Auswertung der Substitutionsanalyse wird auf hochdichten *PEPperCHIP*[®] Peptid-Mikroarrays durch Immunfärbung nachgewiesen. Im Blutserum befindliche Antikörper binden während der Primärfärbung auf den Peptiden innerhalb des Mikroarrays. Nach der Sekundärfärbung kann die relative Fluoreszenzintensität (RFI) der einzelnen Spots mit einem Fluoreszenzscanner aufgenommen und mit der speziell von der *PEPperPRINT* GmbH bereitgestellten Software *PepSlide*[®] Analyzer ausgewertet werden. Die Software legt ein vorgefertigtes Selektionsmuster über die einzelnen Spots und bestimmt sowohl jede individuelle relative Fluoreszenzintensität als auch das Hintergrundrauschen als RFU mit einer Datenbreite von 16 Bit.

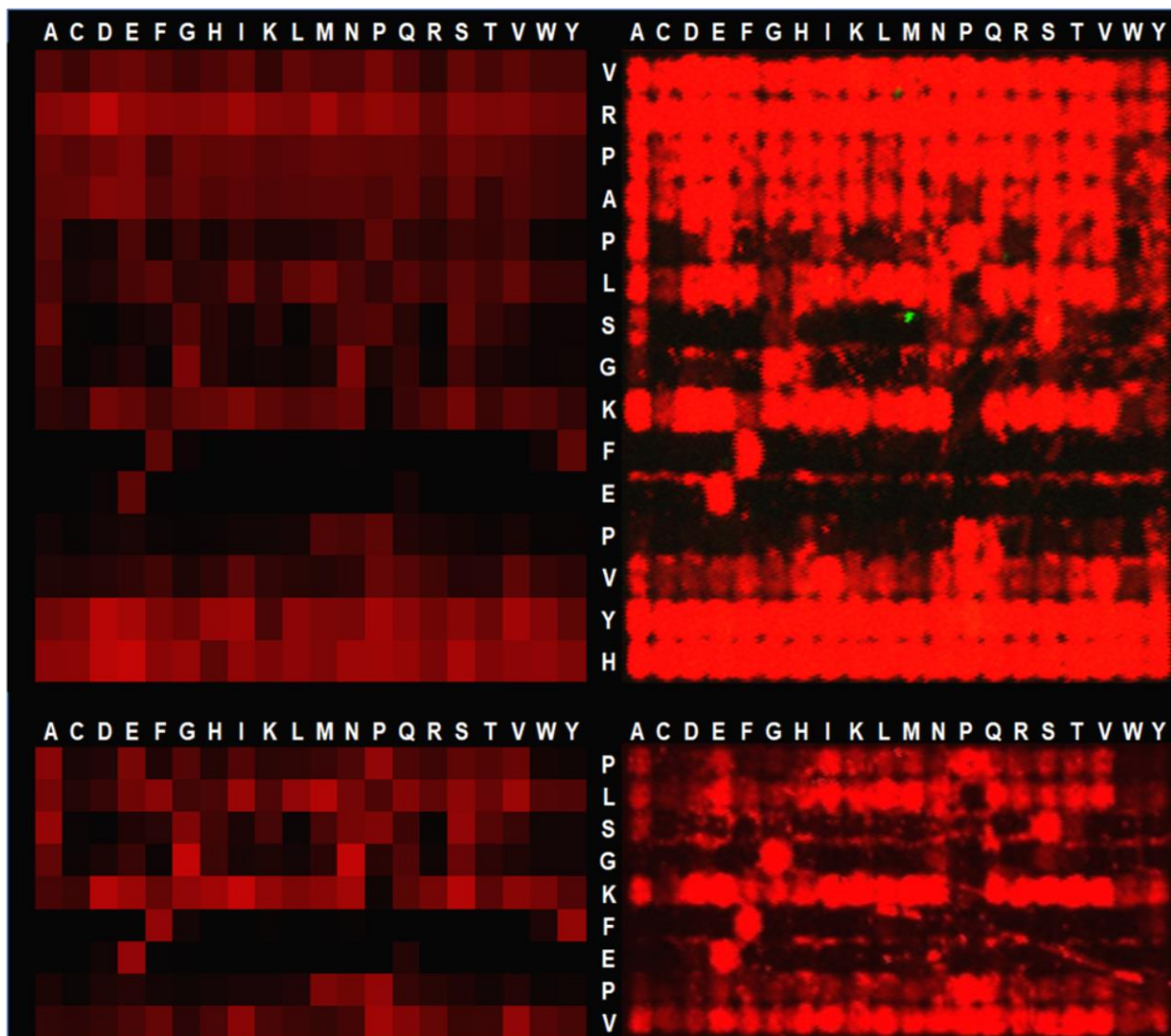


Abbildung 2: Rechts im Bild ist das Fluoreszenzsignal von zwei Substitutionsanalysen zu erkennen, welche mit dem Anti-**Emp**-Fingerabdruck assoziiert werden (Oben = Fünfer-Konfiguration; Unten = 16er-Konfiguration). Das Signalmuster der Substitutionsanalyse entspricht dem aus der Publikation von Dr. Weber bekannten Muster^[41]. Links im Bild ist schematisch eine konditionierte Formatierung derselben Substitutionsanalysen zu erkennen. Die Konditionierung basiert auf den Intensitätswerten, welche bei der Auswertung durch den *PepSlide*[®] Analyzer jedem fluoreszierenden Peptidspot zugeteilt wird.

2.2 Das menschliche Immunsystem gegen *Staphylococcus aureus* ^[51]

Um sich zu schützen, verfügt der Mensch über eine große Zahl von Verteidigungsmechanismen zur Neutralisierung von körperfremdem und potentiell infektiösem Material. Dieser Schutz umfasst drei Verteidigungsmechanismen, die nacheinander wirksam werden. Den ersten Mechanismus bilden Hautbarriere, Schleimhäute, Körperflüssigkeiten und Pellikel, welche das Mikrobiom des Wirtes im gesunden Zustand durch eine Blockierung der Permeation oder durch den Einsatz von biochemischen Substanzen schützen ^[52,53]. Aufgrund dieser Schutzmaßnahmen sind besondere Fähigkeiten notwendig, um kommensal auf dem Menschen überleben zu können ^[54]. Versagen die Schutzbarrieren aufgrund einer Verletzung oder Krankheit, müssen sich die Eindringlinge in der zweiten Verteidigungslinie gegen Phagozyten und die Wirkstoffe innerhalb des Blutes behaupten sowie zusätzlich noch die Lymphknoten passieren ^[55]. Dies gelingt meistens nur den hochspezialisierten Pathogenen, welche sich an die Verteidigungsstruktur des Wirtes angepasst haben. Opportunistische Bakterien wie *Staphylokokken* und *Streptokokken* müssen hierbei auf eine passende Gelegenheit, bei denen wichtige Schutzbarrieren kompromittiert werden, warten, um den Wirt zu befallen. Wenn sich eine solche Möglichkeit ergibt, haben die Pathogene aufgrund ihrer Spezialisierung eine reelle Chance, sich im Wirtskörper auszubreiten. Dies äußert sich dann in der Ausbildung von Krankheitssymptomen. Ein solcher Erfolg ist aber oft nur temporär, denn mit zeitlicher Verzögerung wird die adaptive Immunabwehr aktiv und kann spezifisch auf den Krankheitserreger einwirken, um das angeborenen Immunsystem bei der Neutralisierung der Bedrohung zu unterstützen. Damit es bei der nächsten Begegnung mit einem Krankheitserreger, der es so weit geschafft hat, gewappnet ist, verfügt das Immunsystem über ein Gedächtnis, sodass es sowohl das angeborene ^[56] als auch das spezialisierte adaptive Immunsystem sehr viel schneller aktivieren kann. In der Realität gibt es aber Pathogene wie zum Beispiel *Staphylococcus aureus*, die sich so perfekt an ihren Wirt angepasst haben, dass das adaptive Immunsystem nicht mehr effektiv auf sie wirken kann ^[57]. Dadurch verliert der Wirt seine effektivste Verteidigung und der Krankheitserreger kann sich in Abhängigkeit der Infektion ohne den Einsatz von moderner Medizin ungehindert ausbreiten.

In den folgenden Kapiteln werden alle Funktionen des Immunsystems abgehandelt, welche für die Verteidigung gegen *Staphylococcus aureus* wichtig und in der Dissertation von Relevanz sind.

2.2.1 Angeborenes Immunsystem ^[51]

Die Epithelzellen in der Haut und der Schleimhaut bilden effektive Barrieren, welche keine Permeabilität von Fremdmaterial ermöglichen und abhängig von ihrer Lokalisierung antimikrobielle Peptide, Fettsäuren, Proteine, Schleim und/oder Tenside zur chemischen Abwehr gegen Mikroben und Viren produzieren und sezernieren können. Bewegung auf den Epithelzellen, auf der Haut oder im Darm verhindern, dass sich Bakterien festsetzen können. Zilien transportieren Fremdkörper in der der Lunge und Nase ab. Dringen durch eine Verletzung Pathogene ein, aktivieren sich an der betroffenen Stelle Komplemente und opsonisieren und attackieren die Eindringlinge. Auch werden Phagozyten aktiv, welche damit beginnen, die Anzahl der Eindringlinge mit Unterstützung von antimikrobiellen Peptiden (AmPn) einzudämmen. Durch die Interaktion mit Pathogen- und Schadens-assoziierten molekularen Mustern (*PAMPs* und *DAMPs*) werden Rezeptoren an der Oberfläche von Immunzellen aktiviert. Dadurch wird die Produktion von Akute-Phase-Proteinen, Prostaglandinen, Leukotrienen, Plättchen-aktivierender Faktor, Zytokinen und Chemokinen angeregt. Diese Substanzen lösen Entzündungsreaktionen aus und initiieren die Wundheilung innerhalb des betroffenen Gewebes. Sie können Fieber verursachen, rekrutieren neutrophile Zellen, basophile Zellen und B-Zellen, aktivieren natürliche Killerzellen und regen T-Helferzellen zur Differenzierung an. Eine Entzündung verbessert die Durchblutung und die Permeabilität in dem betroffenen Bereich, sodass Immunzellen und Inhalte des Blutplasmas besser in das umliegende Gewebe diffundieren können. Diese Reaktion wird von Schmerzen, Schwellungen und Rötungen begleitet und kann je nach Gewebeart auch Übelkeit verursachen. Durch die Wundheilung wird zusätzlich die Produktion von weiteren AmPn stimuliert ^[58]. Mit dem Fieber wird die Körpertemperatur des Wirtes angehoben, um die Proteine des Pathogens durch einen Hitzeschock zu denaturieren. Einige Wirtszellen besitzen zusätzlich den defensiven Effekt, bei Kontakt mit Toxinen Exosomen freizusetzen, um diese zu neutralisieren ^[59].

Staphylococcus aureus besitzt viele Mechanismen, um der angeborenen Immunantwort zu entkommen oder sie zu bekämpfen (siehe Kapitel 2.3.4.4 „**Immunevasion**“). Bei der Immunantwort gegen den Erreger wird dem angeborenen Immunsystem aber dennoch die wichtigste Rolle zugesprochen ^[29].

2.2.1.1 Das Komplementsystem ^[51]

Das Komplementsystem umfasst über 30 Plasmaproteine, welche im Blutserum und anderen Körperflüssigkeiten gelöst sind. Sie sind einer der ersten immunaktiven Substanzen, denen Pathogene ausgesetzt sind, wenn sie es schaffen, in den Körper des Wirtes einzudringen. Normalerweise inaktiv, können sich manche dieser Proteine an der Oberfläche von potentiellen Krankheitserregern binden und anschließend in einer Kettenreaktion weitere Komplemente rekrutieren und aktivieren. Über den Lektinweg (über Lektine und Ficoline), den klassischen Weg (über Komplement **C1**) oder den alternativen Weg (über hydrolysiertes Komplement **C3**) kann das Komplementsystem durch Interaktion mit dem Eindringling die **C3**-Konvertase bilden. Dieses Enzym aktiviert anschließend weitere Effektoraktivitäten des Komplementsystems. Damit dieses Enzym aktiviert wird, müssen Komplement **C2** und **C4** in ihre Untereinheiten aufgespalten werden. Die Spaltung kann von **C1** durchgeführt werden, nachdem es an der Membran eines Eindringlings gebunden hat. Dieselbe Spaltung wird im Lektinweg über an der Oberfläche gebundene, Mannose-bindende, Lektin-assoziierte, Serinproteasen übernommen. Die Untereinheit **C4b** bildet kovalente Bindungen mit der Oberfläche des Pathogens und benachbarter Proteine aus. Die Untereinheit **C2a** assoziiert sich mit **C4b** zur aktiven **C3**-Konvertase. Die kovalenten Bindungen von **C4b** begrenzen die Aktivität der Konvertase hierbei auf die Oberfläche des Krankheitserregers. Das Enzym spaltet das Komplement **C3**, welches der häufigste Bestandteil des Komplementsystems ist, in seine Untereinheiten auf. Aufgrund der großen Menge von verfügbarem **C3** kann die Untereinheit **C3b** eine große Fläche auf dem Pathogen opsonisieren, was die Aktivität von Phagozyten mit Hilfe deren Komplementrezeptoren unterstützt. Über den alternativen Weg können sich Komplementfaktoren an **C3b** anlagern, um eine aktive **C3**-Konvertase zu bilden, welche ebenfalls damit beginnt, Komplement **C3** zu spalten. Durch diese Synergie kann sehr schnell ein großer Bereich der Oberfläche mit **C3b** eingedeckt werden. Ebenso konvertiert **C3b** die **C3**-Konvertase durch Interaktion zur **C5**-Konvertase, welche die Untereinheiten von Komplement **C5** durch Spaltung zugänglich machen. Die drei Untereinheiten **C3a**, **C4a** und **C5a** lösen derweil Entzündungsreaktionen aus, sodass der Lymphfluss sich erhöht und weitere Komplemente, Antikörper und Immunzellen zu der betroffenen Stelle rekrutiert werden. Das für die Entwicklung der **C3**-Konvertase abgespaltene **C2b** wird zum **C2**-Kinin verarbeitet und kann lokal begrenzte Schwellungen des Wirtsgewebes auslösen. Die Untereinheit **C5b** löst an der Membran des Krankheitserregers eine Komplementkaskade aus, welche weitere Komplementfaktoren an der Oberfläche des Pathogens rekrutiert und somit zur Ausbildung von membranangreifenden Komplexen führt. Diese Komplexe bilden Poren in der Zellmembran, welche die Homöostase des Krankheitserregers unterbrechen und bei ausreichender Zahl zur Lyse führen. Die Interaktion von **C1** mit der Oberfläche des Pathogens wird deutlich verstärkt, wenn diese bereits mit Antikörpern opsonisiert ist. Daher wird die

Komplementaktivierung durch natürliche Antikörper und das adaptive Immunsystem unterstützt. Die Untereinheiten **C4b** und **C3b** können ebenso kovalente Bindungen mit Antikörpern auf der Oberfläche eingehen und der so entstehende Komplex ist für Phagozyten ein sehr starkes Signal, um die Phagozytose einzuleiten. Durch die Spaltung von inaktiviertem **C3b** an einer Membran eines Pathogens lassen sich Liganden produzieren, welche bei Kontakt mit Komplementrezeptoren von B-Zellen, in Kombination mit der spezifischen Antikörper-Antigen-Bindung, eine sehr starke Produktion von Antikörpern auslösen. Speziell bei der Interaktion mit *Staphylococcus aureus* ist bekannt, dass das Komplementsystem dem Bakterium eine Adhäsion an das Endothelium erschwert und bei einem intrazellulären Befall die Bakterienzahl eindämmen kann ^[60,61].

2.2.1.2 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten reifen im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen heran und sind der Hauptbestandteil aller Leukozyten ^[62]. Bei der Reifung entwickeln sich die Stammzellen zu oligopotenten Progenitorzellen und diese zu unipotenten Myeloblasten weiter. Im Laufe der Granulopoiesis reifen diese Myeloblasten innerhalb von 14 Tagen über fünf Entwicklungsstufen zu reifen basophilen, eosinophilen oder neutrophilen Zellen heran ^[63]. Bereits als Myeloblasten bilden sich primäre Granula in den Zellen aus. In der ersten Entwicklungsstufe, dem Promyelozyt, erweitert sich das Zytoplasma der Zelle. In der nächsten Stufe werden die Zellen zu Myelozyten und bilden ihre sekundären und quartären Granula aus, während der Zellkern sich verkleinert und eine ovale Form annimmt ^[64]. Die dritte Entwicklungsstufe, der Metamyelozyt, wird dadurch definiert, dass der Zellkern sich krümmt und in die Länge zieht. Auch bilden sich mehr Granula aus. Darauf folgt die Entwicklung zum stabkernigen Granulozyt, bei dem sich der Zellkern hufeisenförmig verbiegt und die Zelle die tertiären Granula erzeugt. In der letzten Entwicklungsstufe bilden sich sekretorische Vesikel aus und der Zellkern teilt sich in drei bis fünf Segmente auf, um der neutrophilen Zelle mehr Flexibilität zu verleihen ^[65,66]. Sekretorische Vesikel sind mit Membrankomponenten, Serumalbumin und Proteinen gefüllt, welche die Zelle in der Adhäsion und der Migration an den Infektionsherd unterstützen ^[67,68]. Die Zellen haben nur eine geringe Lebensdauer mit einer Halbwertszeit von einigen Stunden bis wenige Tage oder bis ihre Granula verbraucht wurden ^[69,70]. Bis die Granulozyten die Entwicklungsstufe des Metamyelozyten erreicht haben, können sich die Zellen teilen und vermehren ^[71]. Diese und alle folgenden Entwicklungsstufen besitzen die Möglichkeit Fremdkörper zu phagozytieren ^[72].

Neutrophile Zellen sind eine der ersten, schnellsten und effektivsten Verteidiger, welche durch Zytokine, meistens durch Makrophagen sezerniert, in großer Zahl an die Infektionsstelle herbeigerufen und freigesetzt werden ^[73]. Ein großer Teil von ihnen wird im Knochenmark gelagert und bei der Rekrutierung durch entsprechende Substanzen wie beispielsweise

Chemokine, Hormone oder Lockstoffe in den Blutkreislauf disseminiert [74-76]. Für diese Freisetzung müssen die Zellen zuvor nicht vollständig ausgereift sein [77]. Im Blutkreislauf adhären die neutrophilen Zellen an entzündeten Endothelzellen und rollen an diesen entlang [78,79]. Während des Rollens sind die Zellen spezifischen Botenstoffen ausgesetzt, die dafür sorgen, dass die Zelle Integrine aktiviert, wodurch sich die Adhäsion am Endothelium verstärkt [80]. Durch Kriechbewegungen suchen sie sich anschließend eine geeignete Stelle, um das Blutgefäß zu verlassen [79] oder sie transmigrieren durch die Gefäßwand hindurch [81,82]. Chemotaktisch durch Botenstoffe angelockt, bewegen die Zellen sich dann weiter in Richtung des Entzündungsursprung [83]. Unmittelbar nach der Adhäsion werden die Zellen durch Zytokine, Chemokine und andere Substanzen durch ein sogenanntes ‚Priming‘ auf ihre Aktivierung vorbereitet [84]. Während dieses Vorgangs exozytieren sie ihren sekretorischen Vesikel und teilweise ihre Granula [85,86], verändern ihre Form und erhöhen die Anzahl der Rezeptoren, unter anderem auch die Anzahl an *Fcγ*-Rezeptoren, innerhalb ihrer Zellmembran [87,88]. Auch wird die Expression von Untereinheiten der Nikotinamadenindinukleotidphosphat-Oxidase (**NADPH-Oxidase**) erhöht und die membranständige Untereinheit des Enzyms sowie alle Vesikel und Granula an der Zellmembran konzentriert [89,90].

Am Ort der Entzündung angekommen, werden die geprimten Neutrophilen mit Hilfe der Sensorik von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und Komplementrezeptoren *via* Chemotaxis zu den Pathogenen gelockt und lösen bei Kontakt mit entsprechenden Liganden, unterstützt von Mustererkennungs- und *Fcγ*-Rezeptoren, die Signaltransduktion für ihre Aktivierung aus [51,91]. Mit der Aktivierung erhöhen die Zellen ihre Phagozytoseaktivität und setzen vermehrt Granula frei. Ihre Lebensdauer wird verlängert und sie beginnen bei anhaltendem Stimulus durch Chemokine, Pathogene und der Komplementuntereinheit **C5a** damit, die **NADPH-Oxidase** zu assemblieren und die Stickstoffmonoxid-Synthase zu exprimieren [51,92]. Zur Bekämpfung der Eindringlinge phagozytiert der aktivierte Neutrophil diesen und verwendet sein Lysosom und die während der Entwicklung entstandenen Granula, um ihn biochemisch zu bombardieren. Das Lysosom zeichnet sich durch einen sauren pH-Wert aus und verfügt über viele Verdauungsenzyme. Primäre Granula beinhalten Defensine, antibakterielle Proteine und die membrangebundene neutrophile Elastase [51]. Der Inhalt der sekundären Granula ist hauptsächlich Lysozym [51,93], Laktoferrin [94] und inaktivierte Cathelicidine [51] sowie die membranständige Untereinheit der **NADPH-Oxidase** [95]. Die Inhaltstoffe der tertiären Granula überlappen sich mit denen der sekundären Granula und enthalten zusätzlich Gelatinasen [96,97]. Die quartären Granula enthalten hauptsächlich Ficolin-1 [64]. Gerade bei Pathogenen sind die Mustererkennungsrezeptoren (*PRR*) oftmals nicht ausreichend, um die Phagozytose einzuleiten [98]. In diesem Fall muss der Eindringling zuvor durch das Komplementsystem oder Antikörper opsonisiert werden, um die Phagozytose durch

Komplement-^[99] und *Fc*-Rezeptoren^[100] zu unterstützen^[101,102]. Beide Rezeptoren wirken kumulativ und ermöglichen eine effizientere Phagozytose, wenn eine Opsonisierung durch beide Substanzen erfolgt ist (Abbildung 3). Nachdem der Eindringling vollständig im Phagosom eingeschlossen ist, wird dieses mit dem Lysosom und den Granula zu einem Phagolysosom fusioniert^[51]. Hierbei werden die Granula nacheinander in umgekehrter Reihenfolge zu ihrer Entwicklung während der Granulopoiesis in das Phagolysosom integriert^[103]. Das Pathogen ist dadurch einem niedrigen pH-Wert und den zerstörerischen Inhaltstoffen der Granula und des Lysosoms ausgesetzt^[95]. Ebenso werden dem Phagolysosom Metallionen wie Eisen und Mangan, die dem Bakterium nützlich sein könnten, entzogen^[104]. Gleichzeitig wird ein Influx von toxischen Ionen wie Kupfer geschaffen, um überlebenswichtige Enzyme des Pathogens zu zerstören^[105,106]. Im Zytosol von neutrophilen Zellen wird in großen Mengen das Protein Calprotectin gespeichert. Dieses Protein kann bei Freisetzung als *DAMP* wirken und so weitere Immunzellen und Entzündungsreaktionen aktivieren^[107]. Während der Phagozytose wirkt das Protein, indem es freies Eisen, Mangan und Zink bindet, damit das Pathogen diese nicht als Ressource verwenden kann^[108,109]. Die Stickstoffmonoxid-Synthase kann nach ihrer Produktion reaktive Stickstoffspezies wie das toxische Stickstoffmonoxid produzieren. Nach der Assemblierung der **NADPH**-Oxidase wird diese über die sekundären Granula in die Membran des Phagolysosoms übertragen. Hat das Enzym sich zusammengesetzt, kommt es zu einem respiratorischen Schub, welcher sich durch einen erhöhten Sauerstoffverbrauch und die Produktion von Sauerstoffradikalen und Superoxidanionen äußert. Durch das Pumpen von Kalium und Wasserstoff in das Phagolysosom werden die Superoxidanionen neutralisiert, was zu einer Absenkung des pH-Wertes führt. Durch diese Ansäuerung werden weitere Proteine aus der Membran des Phagolysosoms herausgelöst und durch die Verdauungsenzyme des Lysosoms in ihrem aktiven Zustand versetzt^[51]. Dadurch wird unter anderem die neutrophile Elastase aktiviert, welche die Eindringlinge direkt attackiert und zur Unterstützung des Angriffs die Cathelicidine aktiviert^[110]. Die Sauerstoffradikale selbst werden von der Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid umgesetzt. Diese Chemikalie kann toxisch auf das Pathogen wirken, katalytisch zu wirksamen Hydroxylradikalen umgesetzt oder durch die Myeloperoxidase (**MPO**) zu Hypohalogeniten raffiniert werden^[111]. Neutrophile Zellen geben den Inhalt ihrer Granula und die reaktiven Sauerstoffspezies ebenso in die Umgebung ab, um umliegende Krankheitserreger zu bekämpfen. Hierbei können sich auch weitere antimikrobielle Substanzen entwickeln, die chemisch aktiv sind. Beispielsweise können die neutrophilen Zellen durch die Freisetzung der neutrophilen Elastase die Herstellung von antimikrobiellen Substanzen aus dem im Blut befindlichen Apolipoprotein E ermöglichen^[112]. Durch den Einfluss der Komplement-Untereinheit **C5a** können Granulozyten sich in substanzbeladene Ektosomen transformieren, welche sowohl antimikrobielle Effekte besitzen^[113], als auch

andere Zellen des angeborenen Immunsystems durch Interaktion beeinflussen ^[114,115]. Das Resultat der Interaktion ist von dem Entstehungshintergrund der Ektosomen abhängig und es kann entzündungsfördernd ^[116,117] oder –hemmend ^[118,119] wirken ^[120].

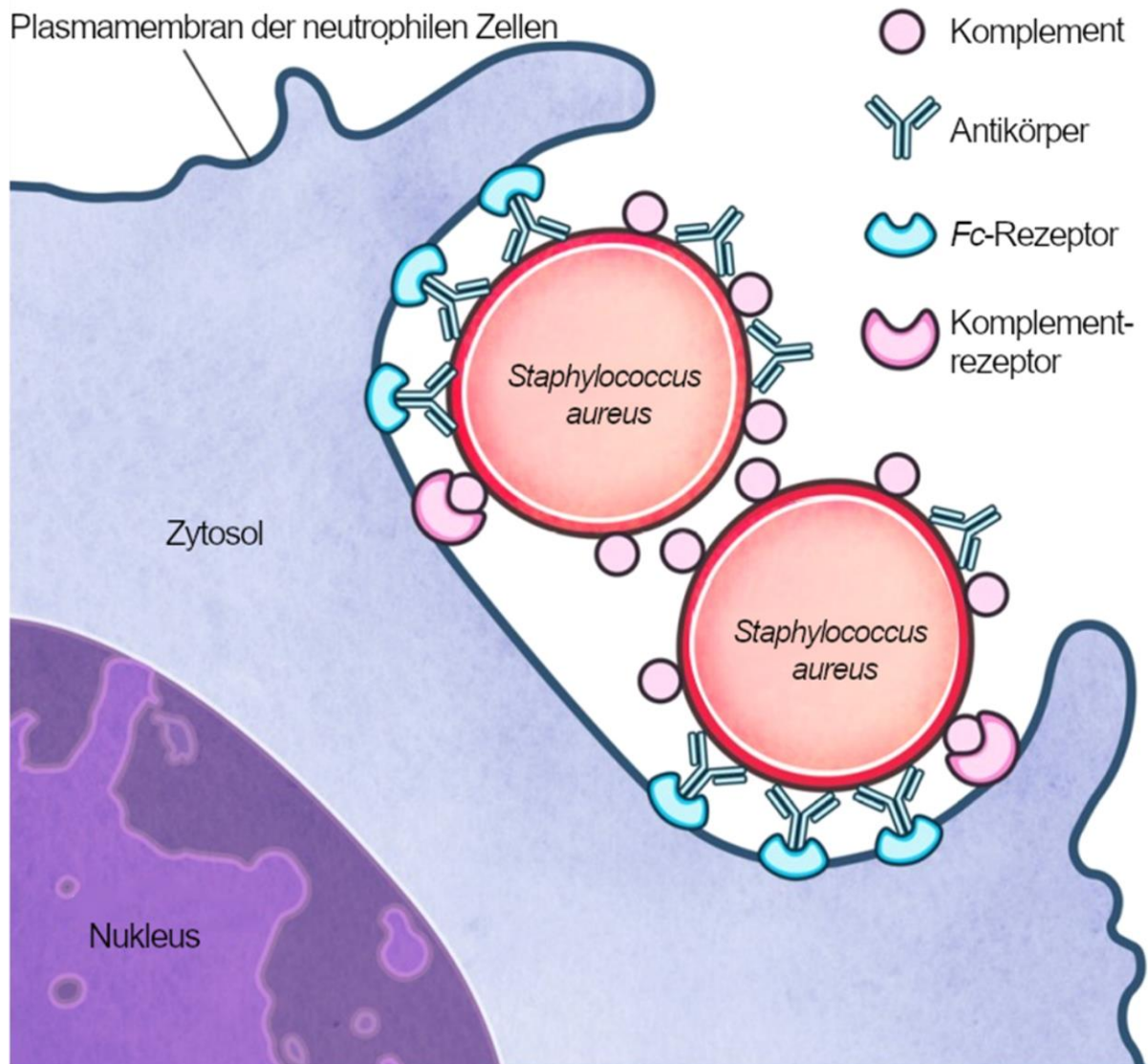


Abbildung 3: Der kumulative Effekt von Antikörpern und Komplementen und ihren jeweiligen Rezeptoren ermöglicht die Phagozytose von *Staphylococcus aureus* durch phagozytische Zellen. Die Illustration wurde aus der Publikation von McGuinness *et al.* (2016) übernommen ^[9]. Die genannte Publikation ist über eine internationale Namensnennung-Lizenz 4.0 von *Creative Commons* (CC BY 4.0) geschützt ^[a].

Eine Subpopulation der neutrophilen Zellen ist weniger darin involviert Pathogene zu phagozytieren. Diese Zellen zerstören sich selbst, um aus dem Inhalt ihrer Granula und ihrem Chromatin eine fibrilläre Falle zu bilden, welche Krankheitserreger immobilisiert und mit antimikrobiellen Substanzen überschüttet^[121]. Diese Substanzen bleiben in der Falle konzentriert und dadurch wird der unspezifische Schaden am Wirt eingegrenzt^[122,123]. Auch verstärken diese Fallen die Effizienz von Makrophagen^[124]. Zur Ausbildung dieser Netze müssen die neutrophilen Zellen aber zunächst zuvor von Thrombozyten aktiviert werden^[125].

Zusätzlich zu der direkten Interaktion mit den Eindringlingen können neutrophile Granulozyten Antigene für T-Zellen präsentieren und mit den anderen Bestandteilen des Immunsystem direkt interagieren, um sie in ihren Funktionen zu unterstützen. Sie sind in der Lage Zytokine, Chemokine und andere Substanzen abzusondern, welche eine Entzündung auslösen, hemmen oder andere Immunzellen und weitere Neutrophile stimulieren und rekrutieren können^[51]. Interessanterweise migrieren neutrophile Zellen bei einer Entzündung auch in den Lymphknoten, um dort zunächst die Aktivierung von T- und B-Zellen zu verzögern^[126]. Der genaue Hintergrund dieser Inhibition ist noch unklar, aber Nauseef und Borregaard (2014)^[76] vermuten, dass es sich hierbei um einen Sicherheitsmechanismus handelt, der dabei hilft, größeren kollateralen Schaden zu vermeiden. Ebenso sind sie in der Lage, Zytokine zu produzieren, welche die Lebensdauer und Reaktivität von B-Zellen fördern^[76]. Während einer sehr starken Entzündungsreaktion kann sich die Produktion von neutrophilen Zellen im Knochenmark verzehnfachen und sie sind dann in der Lage, sich auch außerhalb des Knochenmarks zu teilen^[127,128]. Es kommt dazu, dass mehr neutrophile Zellen in frühen Entwicklungsstufen in der Blutbahn freigesetzt werden. Die generelle Lebenserwartung von neutrophilen Zellen kann sich in diesem Fall um bis zu zehn Tage verlängern^[127,129].

Neutrophile Zellen sind eine der wichtigsten Immunzellentypen bei der Verteidigung gegen *Staphylococcus aureus*^[130-132]. Um das resiliente Bakterium effizient zu zerstören, benötigen die Zellen ein Zusammenspiel von mehreren Effektoren, um genug Stress zu erzeugen. Zum einen bedarf es eines niedrigen pH-Werts im Phagolysosom^[133] und eines respiratorischen Schubs durch die **NADPH-Oxidase**^[134]. Während des respiratorischen Schubs wird Arachidonsäure in das Phagolysosom geleitet und durch die Sauerstoffradikale oxidiert^[135]. Die resultierende Substanz ist für *Staphylococcus aureus* toxisch und kann das Bakterium töten^[135,136]. Die von neutrophilen Zellen hergestellten Cathepsine^[137] und **IIA-sPLA2**^[138,139] unterstützen diesen Prozess. Sie sind durch ihre proteolytische Aktivität an der Neutralisierung der von dem Bakterium abgesonderten Virulenzfaktoren beteiligt. Cathepsine zeigen hierbei auch eine wirksame Aktivität gegen Biofilme des Erregers^[140]. Ebenfalls ist die Produktion von Stickstoffmonoxid notwendig, da sich ohne dessen Aktivität ein großes Defizit in der Tötungseffizienz der neutrophilen Zellen zeigt^[141]. Viele Beweise zeigen, dass die reaktiven

Sauerstoffspezies und die von der **MPO** verfeinerte hypochlorige Säure einen großen Beitrag für die zuverlässige Zerstörung des Pathogens leistet [142,143]. Diese Beweise werden dadurch erhärtet, dass in den fibrillären Fallen die **MPO** eingelagert wird und die Aktivität dieses Enzyms innerhalb dieser Fallen das Bakterium mit großer Effizienz zerstört [144]. Ebenso wird während einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* die Entwicklung der Subpopulation gefördert, welche fibrilläre Fallen ausbildet, um den Krankheitserreger einzudämmen [145]. Gegen die besonders widerstandsfähigen Biofilme des Pathogens hat sich die Sekretion von DNA, neutrophiler Elastase und Laktoferrin durch neutrophile Zellen als wirkungsvoll in der Bekämpfung gezeigt [146]. **NGF- β** hat sich als starker Vermittler für die Neutrophilen- und Makrophagen-assoziierte Immunantwort herausgestellt. Der Wachstumsfaktor wird durch die Wirkung vieler Toxine, welche *Staphylococcus aureus* sezerniert, vermehrt exprimiert und ausgeschüttet. Wenn er mit der Tropomyosinrezeptorkinase auf den Phagozyten in Kontakt kommt, verstärkt es deren Effizienz und, im Falle der Neutrophilen, auch deren Rekrutierung [147]. Als ebenfalls sehr wichtig für die Effektivität der neutrophilen Zellen gegen *Staphylococcus aureus* hat sich der Lockstoff Leukotrien B4 erwiesen. Eine externe Zugabe dieser Chemikalie konnte eine erfolgreiche Beseitigung einer Infektion durch das Pathogen unterstützen [148]. Diese Wirkstoffe und chemische Reaktionen wirken redundant und in Synergie um dem Wirt eine möglichst hohe Effizienz gegenüber dem Bakterium zu verschaffen [149,150]. Eine erfolgreiche Zerstörung des Pathogens nach Phagozytose ist allerdings nicht garantiert, da *Staphylococcus aureus* über eine Vielzahl von Verteidigungsmaßnahmen verfügt [151-153]. Die Expression dieser Maßnahmen unterscheidet sich bei jedem Bakterienstamm und aus diesem Grund ist ein Erfolg stark von der Individualität eines Bakterienstammes abhängig [148,154,155].

2.2.1.3 **HL-60 Zelllinie und der opsonophagozytischer Tötungsassay**

Die in der Arbeit verwendete **HL-60** Zelllinie stammt aus einer an Promyelozytenleukämie erkrankten Person und besitzt eine Verdopplungszeit von bis zu 48 Stunden [156]. Sie ist eine Mischung von neutrophilen Zellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien, mit dem höchsten bestehenden Anteil an Promyelozyten [157], welche sich unter Zugabe von Insulin und Transferrin unablässig teilen [158]. Durch die Zugabe von N,N-Dimethylformamid lassen sich die Zellen dazu anregen, die Granulopoiesis zu durchlaufen, sodass sich im Verlauf mehrerer Tage ein Gemisch von Granulozyten mit unterschiedlichem Reifegrad entwickelt, welches die Fähigkeit zur Phagozytose besitzt [157]. Differenzierte Granulozyten dieser Zelllinie besitzen in Zellkultur eine deutlich längere Lebenszeit als natürliche neutrophile Zellen [159]. Während der Reifung verändern die neutrophilen Zellen die Zusammensetzung ihrer Oberflächenproteine. Diese können als Indikator verwendet werden, um den aktuellen Entwicklungsstatus des Gemischs mittels Durchflusszytometrie (**FACS**) zu überprüfen. Die Oberflächenproteine, welche sich für diesen Prozess eignen, sind der Komplementrezeptor 1 (**CD35**) und der

Transferrinrezeptor 1 (**CD71**). Neutrophile Granulozyten in frühen Entwicklungsstufen besitzen vermehrt **CD71** ^[160]. Dieses Protein verlieren sie im Verlauf der Granulopoiesis, während bei **CD35** ^[161] die gegenteilige Entwicklung zu beobachten ist. Nach Paschall *et al.* (2020) ^[162] sollten in einem Zellgemisch für eine effektive phagozytische Aktivität über 55,0 % der Zellen **CD35** und weniger als 20,0 % der Zellen **CD71** an ihrer Oberfläche präsentieren. In diesem Verhältnis kann das Gemisch in einem opsonophagozytischer Tötungsassay (OPTA) gegen das Bakterium eingesetzt werden, um zu testen, ob sich bei Zugabe von opsonisierenden Agenzien eine erhöhte Tötungseffizienz zeigt.

Innerhalb dieses Assays adhären die Zellen durch Gelatine und Serum an der Testoberfläche, was die allgemeine Bereitschaft zur Phagozytose der neutrophilen Zellen erhöht ^[150,163]. Durch die Zugabe von Serum und Antikörpern während des Tötungsassays wird *Staphylococcus aureus* opsonisiert, wodurch die Phagozytose der Bakterien durch die Zellen aktiviert wird. Allerdings zeigten adhären Zellen in den Versuchen nach Lu *et al.* (2014) ^[150] entgegen der Erwartungen keine erhöhte Phagozytoseaktivität bei vorheriger Opsonisierung der Bakterien. Als Begründung hierfür wird die verbesserte Phagozytoseaktivität von adhären Zellen in Unabhängigkeit von opsonisierenden Faktoren genannt ^[164,165].

In der Publikation nach Lu *et al.* (2014) ^[150] wurde der Einfluss eines spezifischen Antikörpers gegen *Staphylococcus aureus* auf die neutrophilen Zellen getestet und mit dem Einfluss von menschlichem Serum verglichen. Bei beiden Substanzen konnte nach einer Opsonisierung der Bakterien kein signifikanter Unterschied in der Phagozytoseaktivität der neutrophilen Zellen oder deren Vernichtungseffizienz beobachtet werden. Dies deckt sich mit Beobachtungen aus weiteren Publikationen ^[98,166]. Die Phagozytose der Bakterien ist daher in einem solchen Assay in keinem Fall eine Garantie dafür, dass das Bakterium letztendlich auch vernichtet wird ^[150,151].

2.2.2 B-Lymphozyten und Immunglobuline ^[51]

Die B-Lymphozyten sind spezialisierte Zellen, welche nach einer Entwicklungszeit Immunglobuline, eine effiziente und spezifische Antwort auf extrazelluläre Bedrohungen auf den Wirtskörper, herstellen und sezernieren können. Diese Proteine bestehen aus zwei identischen leichten und schweren Ketten, welche zusammen eine Ypsilon-förmige Struktur bilden. Die Ketten bestehen aus konstanten Regionen, welche am Fuß des Antikörpers die *Fc*-Region bilden, die eine Interaktion mit körpereigenen Zellen ermöglicht. An den beiden Armen des Immunglobulins, der sogenannten *F(ab)₂*-Region, werden zwei identische Antigen-Bindungsstellen, die sogenannten ‚Paratope‘, durch die variablen Regionen der beiden Ketten definiert. Die variable Domäne kann durch die Kombination verschiedener Mechanismen eine Variabilität von über 10^{12} einzigartiger Paratope ausbilden ^[167].

2.2.2.1 Somatische Rekombination und junktionale Diversität ^[51]

Die Paratope in der $F(ab)_2$ -Region besitzen jeweils drei hypervariable Regionen und können ein passendes Epitop auf ihrem Antigen binden. Das Epitop ist dabei nicht auf Aminosäuren beschränkt und kann aus allen möglichen chemischen Strukturen bestehen. B-Lymphozyten durchlaufen während ihrer Reifung die sogenannte somatische Rekombination. Während dieser Rekombination wird ein Gen aus einer Gruppe in einem Gensegment der variablen Domäne zufällig ausgewählt und mit einem zufällig ausgewählten Gen aus einer anderen Gruppe eines weiteren Gensegments durch Umlagerung gepaart. Anschließend wird es durch Spleißen verknüpft. Bei der leichten Kette werden Gene aus zwei (*V*- und *J*-Segment) und bei der schweren Kette Gene aus drei Segmenten (*V*-, *D*-, und *J*-Segment) ausgewählt. In seltenen Fällen kann es bei Rekombination der schweren Kette zur doppelten Anlagerung des Gens im mittleren Gensegment (*D*-Segment) kommen. Die für diese Rekombination verfügbaren Gene sind in Genfamilien eingeteilt und unterscheiden sich bei jedem Individuum aufgrund von Polymorphismus. Das Spleißen wird von spezifischen Enzymen durchgeführt, welche die Gene an konservierten Rekombinationssignalsequenzen zusammenführen. Diese Enzyme erzeugen einen Doppelstrangbruch zwischen der Signalsequenz und der codierenden Sequenz des Gens und verknüpfen Strang und Gegenstrang an diesem Bruch mit einer Haarnadelstruktur. Die DNA zwischen den beiden Genen wird während dieses Prozesses deletiert oder durch Inversion umgelagert. Die beiden Haarnadelstrukturen werden über den Artemis-Komplex durch die Verknüpfung nichthomologer Enden an zufälliger Stelle gespalten. Anschließend werden die DNA-Stränge wieder durch Reparaturenzyme verknüpft. Durch das Öffnen der Haarnadelstruktur an einer zufälligen Position entsteht bei beiden Strängen ein Einzelstrangüberhang mit einer palindromischen Sequenz mit einer von der Schnittposition abhängigen Länge. An den entstandenen Überhängen wird durch die terminale Desoxyribonukleotidyltransferase eine zufällige Anzahl von Nukleotiden angehängt oder durch Exonukleasen eine zufällige Anzahl entfernt. Letztendlich werden die beiden Einzelstränge zusammengeführt, nicht passende Paarungen von Nukleotiden korrigiert und die beiden Stränge als doppelsträngige DNA wiederhergestellt. Jeder naive B-Lymphozyt kann nach dieser Rekombination ein Immunglobulin mit einer einzigartigen variablen Domäne monoklonal exprimieren.

Die konstante Domäne der leichten Kette liegt entweder als Isotyp κ - oder λ -vor. Eine der Hauptaufgaben dieser Domäne ist es, die Verknüpfung mit der schweren Kette herzustellen. Zwischen den beiden Isotypen sind nach aktuellem Wissenstand keine funktionellen Unterschiede bekannt. Die konstante Domäne der schweren Kette spielt eine größere Rolle und gibt die Klasse, Subklasse und somit die Funktion des Antikörpers vor. Nach der Genumlagerung wird die variable Domäne zusammen mit der konstanten Domäne einer schweren Kette des Isotyps μ und δ transkribiert. Während der RNA-Prozessierung werden

die Introns des Transkripts zwischen der variablen Domäne durch Spleißen mit einer der beiden konstanten Domänen verknüpft und alle Introns zwischen den Genen der jeweiligen konstanten Domänen herausgeschnitten. Die resultierenden Exonen bilden während der Translation dann vollständige schwere Ketten, die sich mit leichten Ketten assoziieren und sich in Abhängigkeit des Isotyps als Immunglobuline der Klasse M (**IgM**) und D (**IgD**) zusammensetzen. Diese beiden Antikörper werden zur gleichen Zeit als Rezeptoren an der Membran des Lymphozyten präsentiert. Sobald unreife naive B-Zellen diese Rezeptoren ausgebildet haben, verlassen sie das Knochenmark und konzentrieren sich hauptsächlich in lymphatischen Organen und in lymphatischem Gewebe.

2.2.2.2 Zentrale und periphere Toleranz ^[51]

Bei der hohen Diversität der variablen Region des von B-Lymphozyten präsentierten Oberflächenimmunglobulins ist es vorgegeben, dass auch Bindungsstellen entstehen, welche körpereigene Proteine erkennen. Da Substrate, die von Antikörpern gebunden werden, durch Effektormechanismen angegriffen werden, ist es nicht wünschenswert, dass Antikörper mit einem Autoantigen als Liganden freigesetzt werden. Noch während der Entwicklung der Lymphozyten gibt es deshalb Mechanismen, um Immunzellen mit autoreaktiven Eigenschaften auszuschließen. Reagiert der Oberflächenrezeptor bereits nach der Genumlagerung mit körpereigenen Zellen, so leitet die Zelle entweder die Apoptose ein oder vollführt eine weitere Genumlagerung mit den verbleibenden Elementen der Gensegmente. Dies kann die Zelle wiederholen, bis der Oberflächenrezeptor keinen Liganden mehr binden kann oder keine Elemente mehr verbleiben. Diesem Prozess können allerdings B-Zellen entkommen, welche ein kleineres, lösliches und weniger reaktives Autoantigen binden. Treffen diese Zellen auf dieses Antigen, sodass dieses eine schwache Quervernetzung auslöst, dann werden die Zellen anergisch, wodurch sie die Expression des **IgM** einstellen und nicht mehr mit T-Zellen interagieren können. Ist das korrespondierende Autoantigen nicht erreichbar, bindet zu schwach oder liegt es in einer unzureichenden Konzentration vor, so ist die Zelle zwar autoreaktiv, hat aber keine Möglichkeit, eine Immunreaktion auszulösen.

Nach dem Verlassen des Knochenmarks durchwandern die B-Zellen die Peripherie auf dem Weg zur Milz. Wie im Knochenmark leiten sie hierbei die Apoptose ein, wenn sie auf dem Weg dorthin eine starke Bindung mit einem körpereigenen Antigen eingehen. Ebenso werden sie anergisch, wenn sie ein lösliches Autoantigen binden. Überlebende Lymphozyten werden schließlich durch Zytokine innerhalb der Milz dazu angeregt, sich zu reifen naiven B-Lymphozyten zu entwickeln.

2.2.2.3 Aktivierung von B-Lymphozyten^[51]

Potentielle Antigene werden in Lymphknoten und Milz von spezialisierten Makrophagen und dendritischen Zellen zurückgehalten und in den Lymphfollikeln den B-Zellen präsentiert. Bindet ein Oberflächenimmunglobulin sein Antigen, sodass es zu einer Quervernetzung mit multivalenten Bindungen kommt, reicht das alleine nicht aus, um den naiven B-Lymphozyt für eine Immunantwort zu stimulieren. Erst wenn die Signalstärke groß genug ist, wird der Lymphozyt dazu stimuliert, sich in eine aktive Plasmazelle zu verwandeln. Diese Stimulation wird unter anderem durch die Bindung von Liganden an kostimulierenden Rezeptoren an der Zellmembran erreicht. Durch die Bindung eines Antigens bewegt sich die B-Zelle in die äußeren Follikel des Lymphgewebes. Das gebundene Antigen wird durch Endozytose ins Zellinnere transportiert und, falls möglich, proteolytisch verdaut. Das Antigen oder die Peptidfragmente werden dann anschließend durch **MHC**-Klasse II gebunden und an der Zellmembran präsentiert. Im äußeren Follikel filtern die Lymphozyten im Verlauf von bis zu einem Tag weitere passende Antigene und prozessieren diese. Danach begeben sie sich an die Grenze der T-Zell-Zone, in welcher sie ihre Antigene den aktivierten T-Zellen präsentieren. T-Helferzellen, welche durch dasselbe Antigen aktiviert wurden, erkennen die präsentierten Peptidfragmente und produzieren als Folge Zytokine. Die Zytokine werden sezerniert oder an der Oberfläche der T-Helferzelle präsentiert und dienen der Aktivierung von B-Zellen. Einer der wichtigsten Stimulanzen ist hierbei das membrangebundene Protein **CD154**. Durch die Zytokine der Helferzelle werden die B-Lymphozyten zur Teilung angeregt, verändern ihren Stoffwechsel, ihre Morphologie und eventuell die Klasse ihrer Immunglobuline. Ein Großteil der aktivierten Zellen bewegt sich im Verlauf von wenigen Tagen von der Grenze der T-Zell-Zone hin zu den interfollikulären Regionen und den subkapsulären Sinus des Lymphknotens, beziehungsweise den Brückenkanälen der Milz. Dort bilden sie den sogenannten ‚Primärfokus‘. In diesem Fokus teilen sich die Zellen weiter, und ein Anteil der Zellen entwickelt sich zu Plasmablasten. Ein kleinerer Teil der B-Zellen wandert mit den assoziierten T-Lymphozyten in einen primären Follikel. Dort bilden sie ein Keimzentrum aus, in welchem sich beide Arten von Lymphozyten teilen und sich die B-Zellen, ebenso wie im Primärfokus, zu Plasmablasten entwickeln.

Die Aktivierung einer B-Zelle kann auch in Unabhängigkeit von T-Zellen initiiert werden. Beispielsweise können *PAMPs* in Form von thymusunabhängigen Antigenen zur Akkumulation der Signalstärke beitragen, um die notwendige Signalschwelle zu überschreiten. Eine solche T-Zell-unabhängige Aktivierung wird von speziellen neutrophilen Zellen innerhalb der lymphatischen Gewebe durch die Expression von Zytokinen gefördert^[168].

2.2.2.4 Entwicklungsverlauf von Plasmablasten ^[51]

Noch bevor sich die B-Zellen zu Plasmablasten entwickeln und das Keimzentrum betreten, können diese zu einem Klassenwechsel der schweren konstanten Kette angeregt werden ^[169]. Hierbei wird ein Bereich in der DNA-Sequenz herausgeschnitten, sodass ein anderer Isotyp der schweren Ketten an die codierende Sequenz für die variable Domäne angrenzt. Welche Klasse hierbei gewählt wird, beeinflussen vor allem die Zytokine, welche von den T-Helferzellen abgesondert werden. Diese Entwicklung ist nicht von der Affinität des Antikörpers gegenüber seines Antigens abhängig ^[170]. Als Plasmablast und im Keimzentrum ist dieser Prozess ebenfalls möglich, tritt aber deutlich seltener auf ^[169].

Während der Entwicklung zum Plasmablasten wird um den Zellkern herum ein ausgeprägter Golgi-Apparat entwickelt. Das endoplasmatische Retikulum wird erweitert, um die Produktion und den Transport einer großen Menge an Antikörpern zu unterstützen. Generell unterscheidet man zwei Populationen von Plasmablasten. Ein Großteil der Plasmablasten ist kurzlebig und teilt sich schnell, während eine kleinere Population sehr langlebig ist ^[171,172]. Plasmablasten im Primärfokus beginnen bereits mit der Produktion und Sekretion von **IgM**, während Plasmablasten im Keimzentrum zunächst eine somatische Hypermutation und den Klassenwechsel des Antikörpers durchlaufen. Mit Beginn der somatischen Hypermutation werden in der variablen Region der Antikörper durch enzymatische Aktivität absichtlich Punktmutation eingefügt, um nach einer Zellteilung ähnliche Variationen des ursprünglichen Paratops zu erzeugen. Die entstehenden Variationen werden durch Interaktion mit den umliegenden T-Helferzellen durch positive Selektion gefördert, indem sie bei der Bindung des Antigens eine Anregung zur Proliferation und zur Verlängerung ihrer Lebenszeit erhalten. Diese Anregung ist bei Varianten mit verbesserter Affinität stärker, da diese eine größere Menge an Antigen binden können. Die generelle Mutationsrate in diesem Entwicklungsprozess liegt hierbei zwischen 4,0 % und 12,0 % ^[173,174]. B-Lymphozyten, die nach der Mutation ein defektes Oberflächenimmunglobulin besitzen oder das Antigen nicht binden können, werden durch die Zellen nicht angeregt und deshalb durch negative Selektion eliminiert. Es ist möglich, dass sich während der somatischen Hypermutation die Spezifität des Antikörpers verändert und dieser infolgedessen ein Autoantigen binden kann. Findet deshalb unabhängig von einem T-Lymphozyten eine Quervernetzung eines Antigens an den Oberflächenimmunglobulinen statt, leitet der B-Lymphozyt die Apoptose ein.

Nach der somatischen Hypermutation und dem Klassenwechsel verändern die Zellen ihre Oberfläche, sodass sie das Keimzentrum verlassen können und wandern dann, angezogen durch Chemokine und in Abhängigkeit ihrer Rezeptoren von diesen Botenstoffen, in das Knochenmark, in die Markstränge der Lymphknoten ^[175,176], die rote Pulpa ^[175,176], Schleimhäute ^[177,178] oder in entzündetes Gewebe ^[179,180]. Plasmablasten, die sich im Mukosa-

assoziiertem lymphatisches Gewebe ausgebildet haben, verbleiben überwiegend dort. Während der Reise und auch noch am Zielort reifen die Zellen zu Plasmazellen heran. Nach diesem Entwicklungsschritt können sie sich nicht mehr teilen. An ihren Positionen angekommen, sezernieren sie große Mengen ihres Antikörpers, welche durch den Blutkreislauf oder andere Körperflüssigkeiten transportiert werden und am Entzündungsort in die betroffenen Gewebe diffundieren. Plasmazellen, welche sich aus kurzlebigen Plasmablasten entwickelt haben, zerstören sich nach wenigen Tagen selbst^[181]. Die überlebenden, langlebigen Zellen machen ~ 10,0 bis 20,0 % der verbleibenden Population aus und können in einem Zeitraum von zwei Wochen bis hin zu einem Jahr überleben^[171,182,183]. Sie verlieren mit der Zeit die Fähigkeit auf Chemokine zu reagieren und verbleiben permanent an ihrem jeweiligen Standort^[184].

Immunantworten, die aus einer T-Zell-unabhängigen Aktivierungen stammen, können sich nicht in einem Keimzentrum entwickeln. Während langlebige Plasmablasten eher mit T-Zell-abhängigen Antigenen assoziiert werden, ist es auch möglich, dass diese Zellen bei einer T-Zell-unabhängigen Aktivierungen entstehen^[185]. Während der somatischen Hypermutation wird auch die Spezifität und Affinität von **IgM**-exprimierenden Plasmablasten verändert, allerdings werden diese bei dem Erhalt von Überlebenssignalen in den meisten Fällen aufgrund ihrer Rezeptorstruktur von anderen Antikörperklassen übertroffen^[186]. Sowohl die somatische Hypermutation, als auch der Klassenwechsel kann auch unabhängig von Keimzentren erfolgen^[187].

2.2.2.5 Effektormechanismen von Antikörpern und Immunglobulin-Isotypen^[51]

Antikörper wirken auf drei unterschiedliche Arten. Sie können direkt an Giftstoffe, Bakterien und Viren binden und diese an der Interaktion mit Wirtszellen hindern. Ebenso sind sie in der Lage, Fremdkörper zu opsonisieren, sodass sie durch Phagozyten besser aufgenommen und beseitigt werden können. Letztendlich haben sie auch die Fähigkeit, die Aktivierung des Komplementsystems durch den klassischen Weg zu unterstützen, um die Wirkung der Komplement-assoziierten Opsonisierung auf Phagozyten zu verstärken, Entzündungsreaktionen einzuleiten und das gebundene Pathogen direkt anzugreifen. In Abhängigkeit vom Isotyp der schweren konstanten Kette zeigen Antikörper eine schlechtere oder bessere individuelle Effektoraktivität. Insgesamt gibt es fünf unterschiedliche Isotypen. Der Isotyp γ , wird in vier und der Isotyp α in zwei weitere Subtypen unterteilt. Die physikalischen Eigenschaften aller Isotypen sind in Tabelle 1 genauer definiert.

Tabelle 1: Die verschiedenen Klassen der Antikörper, welche sich bei Assemblierung durch einen Isotypen der konstanten Domäne der schweren Kette definieren. Die Daten für die Tabelle wurde aus der Abbildung 5.20 der 9. Auflage von Janeway Immunologie (2018)^[51] übernommen und der Gesamtanteil der Antikörper im Serum mit den Messdaten von Gonzalez-Quintela *et al.* (2008)^[188] ergänzt.

Antikörper-Isotypen im Blutserum				
Isotyp	Klasse	Molekülmasse in [kDa]	Halbwertszeit in [Tage]	Gesamtanteil in [%]
$\alpha_{1,2}$	Klasse A (IgA)	~ 160,0 bis 390,0	sechs	~ 17,1
γ_{1-4}	Klasse G (IgG)	~ 146,0 bis 165,0	sieben bis 21	~ 73,2
δ	Klasse D (IgD)	~ 184,0	drei	~ 0,2
ϵ	Klasse E (IgE)	~ 188,0	zwei	~ < 0,1
μ	Klasse M (IgM)	~ 970,0 bis 1145,0	zehn	~ 9,5

IgM bilden im Plasma ein Penta- und in seltenen Fällen auch ein Hexamer aus. Das **IgA** ist im Serum nur als Monomer vorzufinden und dimerisiert erst in anderen Körperflüssigkeiten. Die Polymerisierung der Dimere und Pentamere wird über eine separat exprimierte *J*-Kette vermittelt. Die Plasmablasten aus dem Primärfokus produzieren nach ihrer Aktivierung **IgM** als Übergang, bis spezialisiertere Antikörper aus den Plasmazellen der Keimbahn sezerniert werden. Diese Antikörper besitzen nur eine geringe Affinität gegen das Antigen, welches die Aktivierung ausgelöst hat. Sie bieten aber dafür zehn Paratope an und können sehr gut das Komplementsystem über den klassischen Weg rekrutieren, nachdem sie ihr Ziel gebunden haben. Eine gewisse Menge an **IgM** wird konstant in der Milz und von Subtypen der B-Zellen in der Bauchfellhöhle und Lunge ohne Aktivierung durch T-Zellen produziert. Diese natürlichen Antikörper binden meistens Kohlenhydrate, die von bestimmten Bakteriengruppen hergestellt werden. **IgM** kann auch durch Epithelzellen in den Darm transportiert werden. Das **IgA** wird hauptsächlich in Körpersekrete geschleust und ist vorwiegend in der Nähe von Epithelien und Schleimhautepithelien vorzufinden. Da das Komplementsystem und Phagozyten oftmals keinen Zugang zu diesen Bereichen finden, hat **IgA** eine überwiegend neutralisierende Wirkung auf Pathogene und deren Toxine. **IgE** wird durch Rezeptoren an Mastzellen gebunden und ist bei deren Aktivierung involviert. Die Hauptaufgabe der größten Gruppe, **IgG**, ist hauptsächlich die Opsonisierung und Neutralisierung von Krankheitserregern und potentiell toxischen Substanzen in Blut, Lymphe und Gewebe. Durch die Bindung des Antigens folgen Stimulationen an Phagozyten und die Aktivierung des Komplementsystems. Ebenso können die Antikörper körpereigene Zellen zur Vernichtung durch natürliche Killerzellen markieren. Sie sind in der Aktivität als Opsonin effizienter als alle anderen Klassen, und es ist auch der einzige Antikörper, welcher die Plazenta durchdringen kann. Zwischen Subtypen dieser Klasse gibt es Unterschiede in der jeweiligen Physiologie und Aktivität. So aktiviert **IgG₂** das

Komplementsystem schlechter und **IgG₃** besser als **IgG₁** ^[189]. **IgG₃** besitzt eine deutlich geringere Halbwertszeit als die anderen Immunglobuline, was vermutlich auf eine veränderte Aminosäure an der Position 435 innerhalb der Proteinsequenz zurückzuführen ist ^[190,191]. **IgG₄** hat die besondere Eigenschaft, dass er eine gepaarte schwere und leichte Kette mit einem anderen **IgG₄** tauschen und daher zwei unterschiedliche Antigene binden kann. In der Epidermis treten **IgA** und **IgG** zur Verteidigung des Wirtes im Tandem auf ^[192]. Die Funktion von sekretiertem **IgD** ist noch nicht komplett aufgeklärt, aber Erkenntnisse zeigen eine Involvierung in der Immunverteidigung der Schleimhäute ^[193] und eine Stimulation von B-, Mast- und basophilen Zellen in den Atemwegen ^[194]. Als Oberflächenimmunglobulin in naiven B-Zellen dient **IgD** als Hilfsrezeptor, um die Bindung von passenden Antigenen zu erleichtern.

In einer gemeinsamen Kultivierung von neutrophilen Zellen mit einem Biofilm von *Staphylococcus aureus* wurde gezeigt, dass Antikörper die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in den Immunzellen erhöhen können, wenn diese an einem opsonisierten Bakterium binden. Eine gesteigerte Zerstörung des Biofilms konnte hierbei ohne eine erhöhte Aktivität der Phagozytose festgestellt werden ^[195].

2.2.3 Immunologisches Gedächtnis ^[51]

Sowohl das angeborene ^[56] als auch das adaptive Immunsystem sind in der Lage ein Gedächtnis zu entwickeln, um wirkungsvolle Antikörper, *PRR* ^[56], Oberflächenimmunglobuline und T-Zell-Rezeptoren zu konservieren. Das Immungedächtnis ist hierdurch in der Lage bei einem erneuten Zusammentreffen mit bereits bekannten Antigenen oder *PAMPs* ^[56] eine wirkungsvollere und schnellere Sekundärantwort zu aktivieren. B- und Plasma-Gedächtniszellen erzeugen einen aktiven Antikörpertiter gegen bekannte Pathogene. Sie konkurrieren hierbei um eine begrenzte Anzahl von Überlebenssignalen, die in Form von Zytokinen von anderen Zellen exprimiert werden. Sie können daher nur in einer bestimmten Anzahl existieren. Das Gedächtnis des adaptiven Immunsystems erreicht einen Monat nach der Infektion seinen Höhepunkt und kann mit einer Halbwertszeit von acht bis 15 Jahren für sehr lange Zeit einen effektiven Schutz gegen eine erneute Infektion liefern. Dieses Gedächtnis ist die Grundlage, auf welcher das Prinzip einer Impfung und einer aktiven Immunisierung basiert. Durch gezielte Exposition eines Wirtes durch aktives, attenuiertes oder inaktiviertes infektiöses Material oder bestimmte Antigene können unter der Aktivierung des Immunsystems Einträge in dieses Gedächtnis generiert werden.

Adjuvantien sind bei peptidbasierten Antigenen zum Auslösen einer adäquaten Immunreaktion unabdingbar und können die Wirkung solcher Impfstoffe und die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Immunisierung erhöhen. Ein effektiver Schutz kann erreicht werden, indem entweder das verursachende Pathogen oder ein an der Pathogenese involviertes Toxin durch

die Sekundärantwort inaktiviert wird. Wichtig bei den Impfstoffen und den verwendeten Adjuvantien ist es, dass sie neben einer effizienten und langanhaltenden Wirkung auch keine toxischen Nebeneffekte oder Autoimmunerkrankungen verursachen. Aus diesem Grund müssen Impfstoffe mehrere klinische Studien durchlaufen, in welchen all diese Faktoren überprüft werden, bevor eine Zulassung auf den Markt erfolgt ^[196]. Durch Impfungen ist es auch möglich, Autoimmunerkrankungen zu behandeln und Tumorzellen gezielt zu markieren. Dadurch wird ein Schutz vor bestimmten Arten von Krebs erzeugt. Leider lässt sich nicht gegen alle Pathogene, zu denen auch *Staphylococcus aureus* zählt, ein wirkungsvoller Impfstoff entwickeln.

Dieses Thema wird genauer in Kapitel 2.3.5.1 „**Impfungen und passive Immunisierung**“ ausgeführt.

2.2.3.1 B-Lymphozyten-Gedächtniszellen ^[51]

Ein Anteil an den B-Lymphozyten, welche die Entwicklung innerhalb des Keimzentrums durchlaufen haben, entwickelt sich zu B-Gedächtniszellen anstelle von Plasmazellen. Diese Zellen verändern ihre Expression, sodass sie länger überleben und, mit Ausnahme der Oberflächenimmunglobuline, keine Antikörper sezernieren. Das Oberflächenimmunglobulin hat bereits einmal die somatische Hypermutation durchlaufen und besitzt deshalb eine bessere Affinität gegen das Antigen. In Kombination mit einer größeren Zahl an Rezeptoren besitzt der Lymphozyt bei einer zweiten Begegnung eines bekannten Pathogens eine starke Affinität gegen das Antigen und konkurriert gegen naive Zellen erfolgreich um die Bindung. Durch die vergrößerte Anzahl an Rezeptoren ist eine Aktivierung der Gedächtniszellen deutlich schneller als bei der Primärantwort, da sowohl die Quervernetzung der Antigene, als auch die Interaktion mit T-Helferzellen beschleunigt ist. Direkt nach der Aktivierung vervielfältigen sich die Zellen um das zehnfache bis 100-fache und können sich sofort zu Plasmablasten und, letztendlich, zu Plasmazellen differenzieren. Diese Plasmazellen produzieren im Vergleich zu den Lymphozyten der Primärantwort eine größere Menge an Antikörpern mit bereits spezialisiertem Paratop und geprägter Antikörperklasse. Die Abwehr ist daher schneller und effektiver als bei der vorherigen Begegnung.

Ebenso wie B-Lymphozyten sind auch unkonventionelle B-Zellen in der Lage, unabhängig von T-Lymphozyten, Gedächtniszellen auszubilden, sodass sie dem Wirt einen effektiven Schutz durch eine Sekundärantwort bieten können ^[197-199]. Einige dieser Gedächtniszellen können die somatische Hypermutation ein weiteres Mal durchlaufen, um die Affinität des Antikörpers noch weiter zu verfeinern. Neue Forschungsergebnisse liefern auch Beweise dafür, dass sich B-Gedächtniszellen unabhängig von den Entwicklungsschritten innerhalb eines Keimzentrums entwickeln können ^[200,201].

2.2.3.2 Plasma-Gedächtniszellen

Langlebige Plasmablasten nach einer Primär- oder Sekundärantwort reichern sich hauptsächlich in Knochenmark ^[202,203], Darm ^[204] und Milz ^[203,205] an ^[206]. Im Knochenmark und in der roten Pulpa können diese Zellen, unter anderem von **CXCL-12** angezogen ^[207], physischen Kontakt zu spezialisierten Stromazellen aufnehmen ^[208]. Diese Stromazellen halten die Plasmablasten in einer Nische fest, wodurch die Lebensdauer der Plasmablasten, auch, nachdem sie zu Plasmazellen differenziert sind, auf unbegrenzte Zeit verlängert wird ^[207-209]. Während ihrer Entwicklung zur Plasmazellen durchleben die langlebigen Plasmablasten einige Veränderungen in ihrer Epigenetik ^[210,211], ihrem Katabolismus ^[212,213] und ihrem Metabolismus ^[214,215], um ihre Lebenszeit direkt oder indirekt zu verlängern und den Stress der Antikörperproduktion besser zu bewältigen ^[216,217]. Um jedoch das langfristige Überleben zu gewährleisten, wird von unterschiedlichen Zellen innerhalb des Knochenmarks und der roten Pulpa eine Vielzahl an verschiedenen, teilweise redundanten Botenstoffen vermittelt ^[218-231]. Während also ein Großteil der Plasmazellen nach der Immunantwort abstirbt, wird ein gewisser Teil am Leben gehalten und wirkt dem Absinken des Antikörpertiters nach der Infektion entgegen ^[232,233]. Der dann aktuell bestehende Titer bildet einen Teil des humoralen Immunsystems und kann das entsprechende Pathogen nach erneutem Kontakt noch vor der Aktivierung einer Sekundärantwort neutralisieren. Für die effiziente Entwicklung einer Plasma-Gedächtniszelle werden sowohl die Keimzentren, als auch T-Zellen benötigt ^[234]. Die Existenz von **IgM**-Plasma-Gedächtniszellen ^[235] zeigt allerdings, dass ein Keimzentrum für die langlebige Entwicklung nicht notwendig ist. Jedoch ist es erwiesen, dass Plasmazellen aus den Keimzentren besser um die verfügbaren Überlebenssignale in den Nischen konkurrieren können ^[236] und so ihre Lebenszeit vergleichsweise länger erhöhen. Diese sich bevorzugend in der Milz aufhaltenden **IgM**-Plasma-Gedächtniszellen zeigen unabhängig von Keimzentren somatische Mutationen auf, welche allerdings nicht auf die Spezifität des Antigens selektiert werden ^[235].

Die Anzahl von langlebigen Plasmazellen, die sicher innerhalb einer Nische für die langfristige Expression von Antikörper befinden, umfasst ~ 1,0 % bis 1,0 % aller Knochenmarkzellen und ihre Gesamtzahl wird auf 1,0 Mrd. Zellen geschätzt ^[237,238]. Nach einer Infektion differenzieren entsprechend Berechnungen von Radbruch *et al.* (2006) ^[239] ~ 1,0 Mio. Plasmablasten zu langlebigen Plasmazellen, welche sich für die lang anhaltende Produktion von Antikörpern in den Nischen des Knochenmarks einfinden. Das entspricht einem Tausendstel des geschätzten Limits innerhalb der Nischen und auch der relativen Anzahl an gemessenen spezifischen Antikörper-produzierenden Zellen im Blut nach einer Impfung ^[240,241]. Diese neuen Zellen konkurrieren um die besetzten Stellen der Nischen und verdrängen die darin befindlichen alten Zellen. So wird angenommen, dass die Menge an Gedächtniszellen gegen ältere Antigenen bei jeder neu auftretenden Infektion um ein Tausendstel reduziert wird ^[242].

Des Weiteren wurden Kontrollmechanismen entdeckt, durch welche die Anzahl an bestehenden Zellen innerhalb der Nischen über regulatorische Antikörper beeinflusst werden können [243]. Ebenso erschöpft sich die Anzahl an Plasmazellen innerhalb der Nischen während einer systemischen Infektion oder chronischen Entzündung stark [244,245]. Es gibt auch Beweise dafür, dass die Plasma-Gedächtniszellen sich bei diesen beiden Krankheitsbildern vermehrt in andere Regionen abwandern, welche viel **CXCL-12** enthalten oder Entzündungen aufweisen [246,247]. Es besteht also die Wahrscheinlichkeit, dass eine Plasma-Gedächtniszelle nicht bis zu ihrem Lebensende in ihrer Nische verbleibt. Tatsächlich können die Plasmazellen auch ohne direkten Kontakt mit den Stroma-Zellen für lange Zeit überleben und ihre Lebenszeit wird auch in anderen Geweben verlängert [248]. Radbruch *et al.* (2006) [239] extrapoliert die Lebenszeit von Plasmazellen innerhalb der Nischen im Knochenmark und den Schutz, den sie bieten können, auf 30 Jahre.

2.2.4 Zustand und Rolle von Antikörpertiter gegen *Staphylococcus aureus*

Durch die ubiquitäre und pathogene Natur von *Staphylococcus aureus* kommt der Mensch unvermeidlich mit dem Bakterium in Kontakt. In Abhängigkeit vom Verlauf eines solchen Kontaktes wird das Immunsystem aktiviert. Es bekommt die Chance Gedächtniszellen auszubilden um den persönlichen individuellen Schutz des Wirtes mit spezifischen Antikörpern zu ergänzen [38,249-252]. Dies hat zur Folge, dass im Serum von Personen, welche unter einer Infektion des Bakteriums gelitten haben, anschließend erhöhte Werte von spezifischen Antikörpern nachweisbar sind. Diese Antikörper binden eine große Vielfalt von Antigenen, insbesondere Virulenzfaktoren des Bakteriums [253-255]. Bei einer Untersuchung von **IgA** und **IgG** nach einem Infektionsereignis zeigte sich für beide Antikörperklassen ein über einen langen Zeitraum stabil bestehender Titer in den Seren der infizierten Personen [249]. Auch konnte ein sehr schnell erfolgender, kurzlebiger und überaus starker Anstieg bestimmter Antikörper nachgewiesen werden [38,249,256]. Dies lässt sehr wahrscheinlich auf die Aktivität entsprechender, bereits vorhandener B- und Plasma-Gedächtniszellen schließen [38,256,257]. Das Spektrum an durch die Antikörper abgedeckten Antigene hängt dabei maßgeblich von der Schwere der Infektion ab. So werden während einer schweren Infektion Antikörper gegen Antigene ausgebildet, welche bei einer oberflächlichen Infektion nicht nachweisbar sind [258]. Besonders deutlich zeigt sich der Anstieg von Antikörpern bei Patienten, nachdem sie an einer Bakteriämie erkrankt sind [257]. Bei leichteren Infekten oder anhaltender Kolonisation entwickeln sich derweil Antikörper, die vermehrt Superantigene neutralisieren [7,259]. Auch wird das Spektrum der abgedeckten Antigene und die Stärke des Antikörpertiters maßgeblich von den exprimierten Virulenzfaktoren eines individuellen Bakterienstammes und der Anzahl an Expositionserignissen beeinflusst [249,253,260].

Gegen Toxine und Superantigene gerichtete Antikörper spielen eine wichtige Rolle beim Schutz des Wirtes. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass ein vorhandener Titer dieser Antikörper den Wirt vor einer Infektion oder einem schweren Krankheitsverlauf schützen und entsprechende Toxine *in vitro* neutralisieren kann [6,254,255,261-266]. Die Antikörper können aufgrund von Kreuzreaktivität in manchen Fällen mehr als nur einen Typ eines schädlichen Moleküls neutralisieren [267]. Erstaunlich häufig wird bei den Wirten speziell gegen solche Antigene hierbei der **IgG₄** Subtyp entwickelt [268,269]. Umgekehrt ist zu beobachten, dass bei der Abwesenheit dieser Antikörpertiter schwerwiegende Krankheitsverläufe sowie eine erhöhte Infektions- und Todesrate auftreten. Dies gilt im Falle einer Bakteriämie [253,270], bei Implantat-assoziierten Krankheiten [271] oder beim Auftreten eines toxischen Schocks [272].

Viele der Antikörper gegen *Staphylococcus aureus* können durch Opsonisierung auch *in vitro* die Phagozytose verstärken [99,101,150]. Diese Antikörper können durch Kreuzreaktion mehrere Proteine mit ähnlicher Funktion binden [273] und die Affinität einiger solcher Antikörper kann sich auch bevorzugt [274] oder nur [275] gegen den Phänotyp des Biofilms richten. Experimente von Lu *et al.* (2014) [150] lassen vermuten, dass dieser Effekt *in vivo* keinen signifikanten Einfluss auf die Zerstörung des Pathogens hat. Bei Patienten mit einem angeborenen Defekt bei der Herstellung bestimmter *PRR* konnte aber beobachtet werden, dass Antikörper gegen Lipoteichonsäure die fehlende Funktion der Rezeptoren kompensieren konnten. Das Immunsystems des Wirtes war in diesen Fällen in der Lage, trotz des Defekts das Pathogen zu detektieren und zu vernichten. Paarte sich der Defekt allerdings mit fehlenden Antikörpern, hatte das verheerende Folgen für den Wirt [276]. Ebenso wurden erst kürzlich sehr effektive Antikörper des **IgG₃**-Subtyps in menschlichen Spendern entdeckt, durch deren Unterstützung neutrophile Zellen in der Lage sind, die Bakterienzahl *in vitro* und *in vivo* effektiv zu reduzieren [277,278]. Der Subtyp des Antikörpers ist hierbei der entscheidende Faktor, da er bessere Effektorfunktionen hat und, interessanterweise, die in Kapitel 2.2.2.5 „**Effektormechanismen von Antikörpern und Immunglobulin-Isotypen**“ erwähnte Mutation der Aminosäure an der 435. Position eine Neutralisierung durch *Staphylokokken* via **SpA** verhindert [278,279]. Dies wird durch eine Studie von Whitehouse *et al.* (2016) [280] bestätigt, in welcher eine Phagozytose in niedrigen, aber nicht bei hohen Titern von **IgG₃**-Antikörpern durch das Protein verhindert wurde.

Die Antikörperprofile von Patienten sind heterogen, zeigen aber erkennbare Unterschiede zwischen besiedelten Personen und Personen ohne Besiedlung bei der Stärke des Titers und in dem Spektrum der abgedeckten Antigenen auf [38,249,252]. Durchschnittlich ist der Titer von gegen *Staphylokokken* gerichteten Antikörpern in besiedelten Personen nahezu anderthalbmal so hoch, als in Personen ohne Besiedlung [252]. Unabhängig von merklichen Infektionen können entsprechend entwickelte Antikörpertiter gegen Antigene von

Staphylococcus aureus bereits in einem jungen Alter gemessen werden und generell bis zu 3,0 % aller Antikörperantworten des Blutserums umfassen [281]. Bei besiedelten Personen zeigt der Titer vor allem eine verstärkte Reaktivität gegenüber Toxinen und Superantigenen des Pathogens [7,38,249,252,266,282-286]. Die Antikörper korrespondieren dabei hauptsächlich mit den spezifischen Antigenen des mit dem Wirt assoziierten Bakterienstammes [38,252]. Eine künstliche Besiedlung mit einem anderen Bakterienstamm ändert das Antikörperprofil nicht merklich. Somit liegt der Schluss nahe, dass die Besiedlung selbst vermutlich keinen großen Einfluss auf die Entwicklung der Antikörper hat [287]. Wahrscheinlicher ist es, dass aufgrund der Besiedlung kleinere, für den Wirt kaum merkliche Infektionen erfolgen, die den Anreiz für die entsprechende Immunantwort geben [250,288]. Interessanterweise wurde *Staphylococcus aureus* im Rahmen einer künstlichen Kolonisierung von einer Person ohne Besiedlung sehr schnell vernichtet, während sie in einem dauerhaften Träger vergleichsweise sehr lange verweilen konnten [282]. Durch eine vorhandene Besiedlung sind Personen deutlich stärker gefährdet an einer Bakteriämie zu erkranken [289,290], werden allerdings durch den vorhandenen humoralen Schutz überwiegend vor einem schweren Krankheitsverlauf bewahrt. Deshalb weisen besiedelte Personen eine signifikant niedrigere Mortalitätsrate auf als Personen ohne Besiedlung [291]. Wird der Wirt allerdings durch einen exogenen Stamm infiziert oder durch einen neuen Stamm besiedelt, ist die Effizienz des bestehenden Schutzes teilweise kompromittiert [38,292]. Bei Neugeborenen kann sich dieser durch Kontakt erworbene Schutz stark verzögern, sodass es Monate dauern kann, bis sie eigene korrespondierende Antikörper nach einer Besiedlung produzieren [293]. Bei Patienten die generell eine unzureichende Menge an Antikörpertiter besitzen oder diese aufgrund von Defekten nicht ausbilden, ist der Krankheitsverlauf bei einer Blutbahninfektion meistens schwerer [284].

In einer Studie von Kolata *et al.* (2011) [38] werden die Unterschiede im Serum von beiden Gruppen vor und nach einer Infektion hervorgehoben. Bei einer Person ohne Besiedlung zeigten die Antikörper vor einer Infektion im Serum nur eine geringfügige Aktivität gegen *Staphylococcus aureus*. Das Serum einer besiedelten Person hatte derweil ein starkes Signal gegen mehrere Proteine des Krankheitserregers. Während einer Infektion hatte die besiedelte Person **IgG** gegen bereits durch das Immungedächtnis bekannte Antigene und keine nennenswerten Mengen an **IgM** produziert. Neue Antikörper gegen bisher unbekannte Antigene wurden nur geringfügig entwickelt. Die Person ohne Besiedlung wiederum hatte eine Vielzahl von neuen Antikörpern gegen das Bakterium hervorgebracht und exprimiert. Hierbei wurde zusätzlich zu **IgG** auch ein kurzlebiger Schub an **IgM** Antikörper nachgewiesen

Meyer *et al.* (2021) [252] haben eine große Population von gesunden Menschen auf vorhandene Antikörper gegen eine breite Auswahl von mit *Staphylococcus aureus* assoziierten Antigenen getestet. Bei jeder einzelnen Testperson konnten im Blutserum nachweisbare Mengen von

IgG und **IgA** gefunden werden, welche gegen mindestens ein Antigen des Bakteriums gerichtet sind. Jeweils ~ 7,0 % der Population besitzt von einer der beiden Antikörperklassen einen hohen oder niedrigen Antikörpergehalt gegen alle getesteten Antigene. Ein Drittel der getesteten Seren, welche hierbei einen niedrigen Antikörpertiter haben, zeigen diesen bei beiden Antikörperklassen. Bei einem hohen Titer ist dies hingegen nur bei 12,0 % der getesteten Seren der Fall. Insgesamt sind ~ 87,0 % aller Testpersonen, welche einen niedrigen Gehalt an gegen *Staphylococcus aureus* gerichtetes **IgA** und ~ 93,0 % aller Testpersonen, welche einen niedrigen Gehalt an gegen *Staphylococcus aureus* gerichtetes **IgG** besitzen, nicht besiedelt. Entsprechend sind bei Personen mit einem hohen Gehalt an gegen *Staphylococcus aureus* gerichteten Immunglobulinen ~ 49,0 % der Testpersonen im Fall von **IgA** und ~ 64,0 % der Testpersonen im Fall von **IgG** besiedelt. Mit zunehmenden Alter nimmt der Titer der meisten gegen das Bakterium gerichteten **IgG** und einiger **IgA** ab und bei zunehmenden unverhältnismäßigem Körpergewicht sinkt der **IgG**-Titer und steigt der **IgA**-Titer im Serum. Unter den mit dem Alter zunehmenden Antikörpern zählen unter anderem Antikörper, die gegen Superantigene und Toxine gerichtet sind. Männer haben generell einen ausgeprägteren Titer gegen die getesteten Antigene als Frauen. Ergänzend haben Whitehouse *et al.* (2016) [280] bei einer kleineren Population an Patienten einen mit dem Alter abnehmenden Titer von gegen *Staphylococcus aureus* gerichtetem **IgG**₁ und **IgM** beobachtet.

Die Antikörperprofile zwischen besiedelten Personen und Personen ohne Besiedlung zeigen bei vielen Antigenen keinen signifikanten Unterschied und in einigen Fällen sogar Titer, welche bei Personen ohne Besiedlung erhöht sind. Diese erhöhten Titer richten sich hauptsächlich gegen *MSCRAMM* (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) und werden durch **IgM** dominiert [249,281,294]. Das lässt sich entweder auf eine kürzlich zurückliegende Infektion, die Beteiligung von natürlichen Antikörpern [295,296] oder langlebigen **IgM**-Plasma-Gedächtniszellen [235] zurückführen. Da *MSCRAMM* für *Staphylococcus aureus* wichtig für die Etablierung im Wirt sind, ist es nicht auszuschließen, dass entsprechende Personen einen über das humorale Immunsystem vermittelten Schutz gegen das Bakterium besitzen [249]. Nichtsdestotrotz gibt es nach dem aktuellen Wissensstand keinen Nachweis, dass ein bestimmter Antikörpertiter einen zuverlässigen Schutz gegen eine Kolonisierung oder Infektion durch das Pathogen bieten kann [256,297]. Einige Studien zeigen sogar, dass Antikörper, welche gegen bestimmte Antigene gerichtet sind, durch ihr gemeinsames Wirken eine Opsonisierung des Bakteriums verhindern oder den Krankheitsverlauf sogar verschlimmern können [298-300]. Neben den funktionsfähigen Antikörpern werden während einer Immunantwort auch Blindgänger gegen die Antigene des Bakteriums entwickelt. Diese Antikörper binden zwar ihr Ziel, haben aber keinerlei Effektorfunktionen [301,302]. Auch verfügt das Pathogen über sehr virulente Proteine, die durch eine niedrige Immunogenität definiert sind, sodass kaum neutralisierende Antikörper gegen sie produziert werden [303-305].

Patienten mit der Schmetterlingskrankheit entwickeln aufgrund der Symptome Wunden, die verstärkt durch mehrere Stämme von *Staphylococcus aureus* besiedelt werden [306,307]. Eine Konsequenz dieser Krankheit ist es, dass erkrankte Personen extrem hohe Antikörpertiter gegen das Pathogen ausbilden [269,308]. Interessanterweise haben diese Personen trotz der erhöhten Exposition kein verstärktes Risiko an einer Bakteriämie zu erkranken [308]. Gegen ausgewählte *SERAM* (*secretable expanded repertoire adhesive molecules*) von *Staphylococcus aureus*, zeigten Spender mit der Krankheit im Durchschnitt einen zehnfach erhöhten Titer im Vergleich zu gesunden Personen [309].

Anti-**Emp**-Antikörper wurden bereits in mehreren Studien im Blutserum von Patienten nachgewiesen. Bisher konnte ihnen aber keine entscheidende Rolle bei dem Verlauf der Kolonisation, Infektion oder Pathologie zugesprochen werden [41,252,281,284]. In der Studie von Meyer *et al.* (2021) [252] wurde auch **Emp** als Antigen gegen eine große Anzahl von Patientenseren getestet. Das in diesen Seren befindliche **IgA** zeigt im Durchschnitt den sechstgrößten Titer gegen das Protein. Hierbei wird ein Nachweis von gegen **Emp** gerichtetem **IgA** deutlicher öfter und stärker bei Männern beobachtet, als bei Frauen. Werden die Seren nach dem Tabakkonsum der Spender in Raucher und Nichtraucher eingeteilt, zeigt sich bei der zweiten Gruppe ein durchschnittlich deutlich erhöhter Titer von **IgG**, welches auf **Emp** als Antigen reagiert. Die Differenz in den Titern zwischen den beiden Gruppen ist bei diesem Protein unter allen getesteten Antigenen die größte. Bei Personen, welche an der Schmetterlingskrankheit leiden, ist der Titer der Anti-**Emp**-Antikörper im Vergleich zu einer gesunden Person erhöht. Allerdings ist dieser erhöhte Titer vergleichsweise niedriger als bei Antikörpern, welche gegen andere *SERAM* gerichtet sind [309].

2.2.5 Unkonventionelle B-Zellen und natürliche Antikörper

Unkonventionelle B-Zellen entsprechen ~5,0 % der Gesamtpopulation der B-Lymphozyten und werden in Typ A und B unterschieden [310]. Die Zellen des Typs A werden entwickelt, während der Fötus noch im Mutterleib ist und sie sind in der Lage natürliche Antikörper zu sezernieren und sich selbst zu erneuern [311,312]. Der Typ B etabliert sich bei neugeborenen Kindern im Knochenmark und kann sich, wie Typ A, erneuern [313,314]. Die Erneuerung der Zellen findet unabhängig vom Knochenmark statt und die beiden Typen können sich nicht gegenseitig wiederherstellen. Voll entwickelte unkonventionelle B-Zellen blockieren nach ihrer Reifung ihre eigene Neubildung und begrenzen so ihre Population [312]. Bei der Entwicklung von natürlichen Antikörpern innerhalb unkonventioneller B-Zellen werden diese nur geringfügig von junktionaler Diversität oder hypersomatischer Mutation verändert und zeigen eine hohe genetische Übereinstimmung mit ihrer ursprünglichen Gensequenz [315,316]. Durch die limitierte Anzahl an unkonventionellen B-Zellen ist auch die Anzahl an natürlichen Antikörpern und

deren Bindungsmöglichkeiten begrenzt und diese bestehende Menge wird nur bedingt durch Mutationen verändert^[295]. Eine wichtige Funktion dieser Zellen besteht darin, in der frühen Lebensphase die Toleranz gegenüber probiotischen kommensalen Bakterien innerhalb des Darms zu entwickeln und zu vermitteln^[317,318]. Im Wirt regulieren sie zusätzlich Entzündungsreaktionen herunter, schützen ihn vor autoreaktiven Lymphozyten und vor Antigenen, welche bei Gewebeschäden eine Autoimmunreaktion auslösen könnten^[319]. Natürliche Antikörper zeigen für gewöhnlich eine niedrige Affinität, eine hohe Kreuzreaktivität und treten hauptsächlich in der Antikörperklasse eines **IgM** auf^[51,320]. Allerdings sind auch natürliche **IgG**^[321] und **IgA**^[317,322] bekannt^[323]. Es wird angenommen, dass 80,0 % aller zirkulierenden **IgM**^[324,325] und 50,0 % aller **IgA**^[326] tatsächlich natürliche Antikörper sind, die ihren Ursprung aus unkonventionellen B-Zellen haben^[327]. Sie haben hauptsächlich eine schwere variable Kette der VH3-Genfamilie^[328] und die leichten Ketten können bei an Krebs erkrankten Menschen durch den λ -Isotyp dominiert werden^[295]. Das Paratop dieser Antikörper kann Membranbausteine von Pathogenen^[329,330] und auch körpereigene Moleküle^[319,331] binden^[51,327]. Sie unterstützen vor allem in der postnatalen Entwicklung die Immunabwehr des Wirtes^[321,332]. Auch sind sie bei der Früherkennung und Opsonisierung von krankhaft veränderten oder zerstörten Zellen beteiligt^[319,333-336]. Bei Kontakt zu bakteriellen Lipopolysacchariden können Sie die Differenzierung zu **IgM**-sezernierenden Plasmazellen schneller vollziehen als konventionelle B-Zellen^[337]. Auch können sie einen Klassenwechsel zu **IgA**^[338] oder **IgG**^[339] absolvieren und die Affinität ihres Antikörpers durch somatische Hypermutationen^[340] verstärken, wenn sie entsprechenden Stimuli ausgesetzt sind. Ebenso sind sie in der Lage, Apoptose in Krebszellen^[341,342] auszulösen und den Wirt vor Autoimmunkrankheiten^[324], Atherosklerose^[324] und altersbedingten Krankheiten^[327] zu schützen. Die Qualität und das Antikörperprofil der unkonventionellen B-Zellen nimmt mit dem zunehmenden Alter ab^[343]. Speziell die Anzahl an natürlichem **IgG** nimmt aber mit dem Alter zu^[344]. Nach einer Infektion ist vor allem ein Anstieg an natürlichem **IgG** zu beobachten, welches gegen doppelsträngige DNA gerichtet ist^[345]. Diese Antikörper zeigen sehr oft ein Spektrum an Kreuzreaktivität gegen viele bakterielle Antigene^[346]. Zusammen mit dem Komplementsystem können die Zellen die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen fördern^[329]. Die Expression der Antikörper selbst wird stark durch die Zytokine gesteuert, welche von $\gamma\delta$ T-Zellen sezerniert werden^[347].

Natürliches **IgA** bildet einen relevanten Anteil des Antikörpergehalts der Schleimhäute von Neugeborenen^[330]. Ihre Funktion ist komplementär zu **IgM** und ein Defekt dieser Antikörper kann zu schwerwiegenden Krankheiten führen^[324,348]. **IgG** und **IgM** aus unkonventionellen B-Zellen binden exakt dieselben Antigene und ein Fünftel aller **IgG** bindet eine große Zahl von Antigenen mit niedriger Affinität^[319]. Natürliches **IgG** tritt bevorzugt als **IgG₃**^[349,350] auf und benötigt im Wirt eine lange Entwicklungszeit^[351], welche erst mit dem Kontakt zu mikrobiellen

und fremden Antigenen beginnt^[323,330]. Es kann bis zu zwei Jahre dauern, bis messbare Mengen im Serum detektierbar sind^[351]. Die Antikörper interagieren mit Antigenen von *Staphylococcus aureus* und dem Komplementsystem über den Lektinweg, um die phagozytische Aktivität von Monozyten zu verstärken^[321]. Bereits vorhandene natürliche Antikörper, welche Oberflächenmoleküle von *Staphylococcus aureus* binden, können die Effizienz einer Impfung verhindern. Hierbei behindern sich die Antikörper aus den beiden Quellen gegenseitig in ihrer Funktion, sodass keine Opsonisierung stattfindet^[352].

Zu der Entwicklung von unkonventionellen B-Zellen gibt es zwei Theorien. In der ersten wird die Annahme vertreten, dass die Entwicklung dieser Zellen aus einem von konventionellen B-Zellen unabhängigen Vorläufer entspringt^[312]. In der zweiten Theorie nimmt man an, dass sich beide B-Zellen aus demselben Vorläufer entwickeln und dieser durch die von B-Zell-Rezeptoren empfangenen kombinatorischen Signale aus Fremd- und Wirtsantigen dazu aufgefordert wird, sich in unkonventionelle B-Zellen zu differenzieren^[320,353]. Neue Studien haben Beweise für beide Theorien geliefert: Daher ist anzunehmen, dass sie sich nicht gegenseitig ausschließen^[354,355]. Tatsächlich haben Graf *et al.* (2019)^[354] einen Beweis geliefert, dass sogar gereifte B-Zellen mit den passenden Signalen zu unkonventionellen B-Zellen konvertiert werden können. Diese Beobachtung stellt die Unveränderlichkeit des Repertoires von natürlichen Antikörpern nach der neonatalen Phase in Frage. Born *et al.* (2016)^[347] nehmen an, dass der Wirt einen Mechanismus gefunden hat um sicherzustellen, dass er nach der Geburt ein funktionsfähiges Repertoire an unkonventionellen B-Zellen und natürlichen Antikörpern hervorbringt. Es wird spekuliert, dass bei dieser Entwicklung hauptsächlich die stark konservierten $\gamma\delta$ T-Zellen eine große Rolle spielen.

2.2.6 Immunsystem-assoziiertes Kollateralschaden

Eine Immunantwort ist wichtig, um gefährliche Pathogene oder Schadstoffe zu neutralisieren, bevor sie im Wirt großen Schaden verursachen können. Der Einsatz von Immunzellen selbst ist aber ressourcenintensiv und setzt den Wirtskörper oftmals unter Stress. Unter normalen Umständen ist der Kollateralschaden geringfügiger als der Schaden, den das Pathogen ohne Abwehr anrichten könnte. Bei speziellen Bedingungen kann das Immunsystem aber auch außer Kontrolle geraten, was verheerende Folgen für den Wirt hat^[51].

Das Prinzip eines Fiebers ist es, dass der Wirtskörper die temperaturbedingten Schäden an den Proteinen besser kompensieren kann als das Pathogen. Überschreitet die Temperatur aber bestimmte Schwellenwerte, kann der resultierende Schaden am eigenen Körper lebensbedrohlich werden^[356]. Die Antikörperproduktion von Plasmazellen benötigt viele Ressourcen, nicht nur für die Antikörperproduktion selbst, sondern um zu verhindern, dass der Produktionsstress die Zellen zerstört^[214,357]. Bei manchen Krankheitsbildern kann die ständige

Produktion von Antikörpern sogar zu ernsthaften gesundheitlichen Problemen führen^[358]. Ebenso sind sowohl autoreaktive B-^[359] als auch Plasma-Gedächtniszellen^[360] die Ursache für chronische Allergien oder Autoimmunerkrankung^[361]. Wenn körpereigene Moleküle vom eigenen Immunsystem durch Antikörper neutralisiert werden, kann dies chronische Krankheiten verursachen, welche die Lebensqualität deutlich verschlechtern. Ebenso kann nach Sensibilisierung gegen ein Allergen bei erneutem Kontakt eine übertriebene Reaktion auftreten, weil entsprechende Kontrollmechanismen versagen^[51]. Werden bei einer Aktivierung des Komplementsystems die beiden Untereinheiten **C3a** und **C5a** in zu großer Menge produziert, kann das beim Wirt einen gefährlichen anaphylaktischen Schock auslösen. Bei dieser sogenannten Anaphylaxie kommt es zu einer übermäßigen Ausschüttung von entzündungsfördernden Substanzen, welche sich in einer positiven Rückkoppelung verstärkt. Hierbei kommt es zur verstärkten Entzündungsreaktionen. Je nach Gewebe können die Schwellungen und der Abfall des Blutdrucks lebensgefährliche Ausmaße annehmen^[51]. Zusätzlich kann der membranangreifende Komplex des Komplementsystems auch Wirtszellen attackieren. Betrachtet man neutrophile Zellen, so sind viele Substanzen, die gegen die Bakterien eingesetzt werden, auch gegen den Wirtskörper aktiv. Die reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies und die Inhaltstoffe der Granula sind in der Lage beträchtlichen Kollateralschaden an Wirtszellen anzurichten^[362,363]. Die Substanzen, welche von T-Helferzellen während einer Infektion abgesondert werden, lösen Entzündungen aus und rekrutieren weitere Immunzellen. Beides kann indirekt die Wirtszellen beschädigen. Speziell $\gamma\delta$ T-Zellen, welche **IL-17** und **IFN- γ** produzieren, können durch die Expression dieser Zytokine langfristig das Risiko für den Wirt erhöhen, an Krebs zu erkranken^[364]. Im Falle von *Staphylococcus aureus* ist es sogar möglich, dass der durch T-Zellen verursachte Kollateralschaden die Situation verschlechtert und die Pathogenität sowie Abszessbildung des Bakteriums fördert^[365]. Besonders wenn T-Helferzellen überreagieren oder ihre Aktivität nicht abklingt, ist dies sehr gefährlich für den Wirt, da ein lebensgefährlicher Zytokinsturm ausgelöst werden kann^[366,367]. Diese übertriebene Form der Immunantwort führt zu einer Hyperinflammation des Körpers, die meist zur Kompensation direkt von einer Ausschüttung entzündungshemmender Zytokine begleitet wird^[368]. Diese kompensierenden Zytokine senken die Entzündung im Verlauf der Zeit ab, erreichen aber irgendwann den gegenteiligen Effekt, sodass der Wirt anschließend einer Immunsuppression ausgesetzt ist. Bei Wandel des Immunsystems durch diese beiden Extreme werden die Gerinnungsfaktoren erschöpft, wodurch es zu einer Verstopfung von Blutgefäßen, Blutungsneigung, spontanen Blutungen und eine Funktionsstörung des Endothels kommt^[369]. Als Folge dieser schwerwiegenden Symptome besteht für den Wirt das Risiko an multiples Organversagen zu sterben^[368,370]. Zytotoxische T-Zellen haben ein sehr zerstörerisches Potential, da sie wirtseigene Zellen

angreifen, um Krankheitserreger zu bekämpfen. Sie verursachen daher schon in ihrer gewöhnlichen Funktionsweise beträchtlichen Schaden an Wirtszellen.

Aufgrund ihres destruktiven Potentials ist es wichtig, dass die Immunantworten der Zellen mit dem größten Zerstörungspotential erst nach Erreichen einer Aktivierungsschwelle eingeleitet werden und ihre Reaktionen lokal begrenzt werden^[51]. Lymphozyten besitzen aus diesem Grund neben den aktivierenden auch inhibitorische Rezeptoren, um eine Signalschwelle bis zur Aktivierung zu schaffen. Zudem sind bei B-Lymphozyten und zytotoxischen T-Zellen auch kostimulierenden Faktoren und Kontakt zu anderen aktivierten Zellen zur Initiierung einer Immunantwort notwendig^[51]. Regulatorische B-^[371], T-^[51], und Plasmazellen^[372] können sich aus den jeweiligen Lymphozyten entwickeln, unterdrücken die Aktivität von anderen Lymphozyten und sorgen in der Homöostase für eine Signalschwelle, die zur Aktivierung der adaptiven Immunabwehr überschritten werden muss. Bestehende Antigene haben mit Ende der Infektion nur eine sehr begrenzte Lebensdauer und die meisten Lymphozyten sterben ab, nachdem der Stimulus durch die Pathogene und den entsprechend assoziierten Antigenen ausbleibt^[373]. Opsonisierende Komponenten des Komplementsystems werden in kürzester Zeit inaktiviert, wenn sie kein Ziel finden und die Lebensdauer und Effizienz aller Komponenten wird durch körpereigene Proteine stark reguliert^[51]. Neutrophile Zellen beginnen erst nach dem Priming damit, toxische Substanzen auszuschütten. Eine Apoptose von aktiven Zellen wird bereits nach der Phagozytose und dem respiratorischen Schub der Zelle eingeleitet, wodurch sie sehr bald absterben, nachdem sie ihre Wirkung entfaltet haben^[374,375]. Fehlt diese unmittelbare Apoptose, ist der Kollateralschaden merklich verstärkt und der Entzündungszustand wird verlängert^[376,377]. Neutrophile Zellen, die bereits durch Priming auf ihre Aktivierung vorbereitet wurden, können diese spontan abbrechen und sich wieder normalisieren^[378,379]. Zerstörte neutrophile Zellen werden durch Makrophagen aufgenommen und beseitigt^[380,381]. Bei diesem Prozess werden Zytokine freigesetzt, welche die Proliferation, Differenzierung und Rekrutierung von neutrophilen Zellen reduzieren^[382].

2.3 *Staphylococcus aureus*

Zusammen mit *Staphylococcus epidermidis* ist *Staphylococcus aureus* einer der meist erforschten Vertreter der *Staphylokokken*^[383]. Es sind unbewegliche, Gram-negative und fakultativ anaerobe Kokken, welche sich bevorzugt in einer traubenartigen Form aneinanderreihen, da sie sich in zwei Richtungen teilen. Auf einer Nährplatte bildet das Bakterium große, gelbliche Kolonien aus, deren Farbe an der Namensgebung maßgeblich beteiligt ist. Es ist sowohl ein kommensales, als auch ein opportunistisch pathogenes Bakterium, welches in der Umgebung ubiquitär zu finden ist^[384]. Die Hauptwirte des Pathogens sind Menschen und Rinder^[385], wobei aber ein breites Spektrum an Säugetieren als Wirt toleriert wird^[386]. Als Pathogen ist es, direkt hinter der Gesamtheit der Koagulase-negativen *Staphylokokken*, für die meisten nosokomialen Infektionen verantwortlich und kann eine Vielzahl von Krankheiten in einem Spektrum von störend bis tödlich verursachen^[384]. Hierbei tritt er als extrazellulärer^[387,388] und intrazellulärer^[389,390] Krankheitserreger in Erscheinung. Dabei kann es viele verschiedene Bereiche des Körpers befallen. Das Pathogen gehört zu den *ESKAPE*-Bakterien, die eine erhöhte Wahrscheinlichkeit besitzen, eine stärkere Resilienz gegenüber antibiotischen Stoffen zu besitzen und zu entwickeln^[391-393]. Als Teil unseres Mikrobioms ist es einer unserer ständigen unbemerkten Begleiter und kann derzeit im Krankheitsfall noch mit Antibiotika behandelt werden, um ein schlimmeres Krankheitsbild zu verhindern^[384].

2.3.1 Entdeckung, Namensgebung und Abstammung

Die erste Entdeckung von *Staphylokokken* wurde von Alexander Ogston beschrieben^[394], der sie im Eiter der Abszesse seiner Patienten zusammen mit *Streptokokken* beobachtete, die von Theodor Billroth und Jaromír, Freiherr von Mundy (1874)^[395] entdeckt wurden^[396]. Im 19. Jahrhundert aufgrund ihrer Form als Mikrokokken zusammengefasst, sind sich beide Bakterien optisch sehr ähnlich, mit der Ausnahme, dass *Streptokokken* sich in einer Kette und *Staphylokokken* sich in einer Traube gruppieren. Ogston unterschied 1882 zwischen schlecht riechenden Eiterungen, die hauptsächlich Giftstoffe und aerobe Mikroben enthielten, und geruchslosen Eiterungen, die sich oftmals graduell bis zu Knochen oder Hirn ausbreiteten und in einer tödlichen Sepsis endeten. Er nahm an, dass diese Symptome durch die von ihm beobachteten Bakterien nicht direkt verursacht wurden und dass der Abszess als Reaktion des Körpers auf diese ungebetenen Eindringlinge entstand. Durch die Injektion von mit *Staphylokokken* angereichertem Eiter in Mäusen zeigte er, dass sich um die Injektionsstellen Abszesse bildeten und die Symptome ähnlich, wenn auch schwächer als bei menschlichen Patienten ausgeprägt waren^[394]. Den Namen *Staphylococcus* setzte er aus den beiden griechischen Wörtern *σταφυλή* (*staphyle*, Übersetzung: Traube)^[397] und *κόκκος* (*kokkos*,

Übersetzung: Korn)^[398] zusammen und zusammengefasst lässt es sich frei als „Traubenkügelchen“ übersetzen^[399]. Der Gattungsname ist hierbei eine Referenz an die traubenförmige Gruppierung, in welcher sich die Bakterien aggregieren^[384]. *Staphylococcus aureus* selbst wurde zwei Jahre später von Dr. Friedrich Julius Rosenbach während seiner Forschungsarbeit in Wiesbaden isoliert und nach der goldenen Farbe seiner Kolonien mit dem Artnamen *aureus* (Übersetzung: golden)^[400] benannt^[384].

Es sind elf dominante Abstammungen von *Staphylococcus aureus* bekannt, welche bevorzugt den Menschen als Wirt befallen^[401]. Diese verschiedenen Abstammungen unterscheiden sich in ihrer Virulenz, der bevorzugten Kolonisierungsumgebung und in der Fähigkeit, Resistenzen gegen antimikrobielle Substanzen auszubilden. Die Bakterienstämme 101L, ATCC[®] 25904[™] und USA300 sind Mitglieder der Abstammung des klonalen Komplexes 8, während die Stämme 168L, 282L und KE2775 von dem klonalen Komplex 30 abstammen.

2.3.2 Propagation und Risikofaktoren

Das Bakterium *Staphylococcus aureus* ist ubiquitär und überall dort zu finden, wo sich der Mensch als Hauptwirt verbreitet hat. Es ist ein Teil des kommensalen Mikrobioms der Haut und der Schleimhäute, kann Menschen in bestimmten Organen besiedeln und dort eine Infektion auslösen^[402,403]. Sowohl MRSA, als auch MSSA können sich innerhalb einer menschlichen Population über die Kommune (CA-)^[404], das Gesundheitswesen (HA-)^[405] oder über kontaminierte Nahrungsmittel^[406,407] und Alltagsgegenstände ausbreiten^[404]. In einer menschlichen Population wird hierbei zwischen drei Wirtsformen unterschieden. Die erste Wirtsform ist zu jeder Zeit mit mindestens einem Bakterienstamm von *Staphylococcus aureus* besiedelt. Dies sind ca. 20,0 % aller Menschen, wobei Kinder noch häufiger betroffen sind^[408]. Bei der zweiten Wirtsform, welche mit einer Häufigkeit von durchschnittlich 60,0 % auftritt, werden Betroffene zu periodischen Trägern von *Staphylococcus aureus*. Letztendlich werden durchschnittlich 20,0 % aller Menschen zu keinem Zeitpunkt von dem Pathogen besiedelt^[409-411]. Insgesamt sind im Durchschnitt etwa 37,2 % der menschlichen Bevölkerung zu jeder Zeit mit *Staphylococcus aureus* besiedelt^[412]. Viele der betroffenen Personen wechseln ihren Trägerstatus im Laufe der Zeit, wobei diese Veränderung häufig zwischen dem 10. und 20. Lebensjahr auftritt^[408]. Die Besiedlung kann bereits in den ersten Tagen nach der Geburt erfolgen^[413] und die Bakterien entstammen mit einer Wahrscheinlichkeit von bis zu 80,0 % der Mutter^[1,414]. In neun von zehn Fällen ist der Bakterienstamm identisch mit dem Pathogen, welches sich im *Vestibulum nasi* der Mutter eingenistet hat^[414]. Innerhalb der ersten acht Wochen ist jeder zweite Säugling mit dem Bakterium besiedelt und nach sechs Monaten reduziert sich die Inzidenz auf ein Fünftel^[413].

Das *Vestibulum nasi* befindet sich in den vorderen Nasenlöchern und ist ein keratinisierter Körperbereich mit Schweiß- und Talgdrüsen sowie Körperbehaarung, welcher von der Schleimhaut des *Limen nasi* eingegrenzt wird^[356]. Dieser Bereich ist das bevorzugte Habitat für das Pathogen, welches sich ab Geburt des Wirtes mit Hilfe spezialisierter Proteine in den keratinisierten Epithelzellen dieser Region relativ sicher vor der menschlichen Immunabwehr permanent etablieren und sich von dort aus auf den ganzen Körper verteilen kann^[415,416]. Während auch andere Bereiche, wie beispielsweise der Oropharynx^[417,418], die Axilla^[409,419], das Rektum^[418], das Perineum^[409,417] und die Leiste^[418,419] besiedelt werden können, so hat sich gezeigt, dass durch die Beseitigung der im *Vestibulum nasi* nistenden *Staphylokokken* auch die Besiedlung in anderen Körperbereichen rückläufig sind^[420,421]. Bei der permanenten Wirtsform hat sich gezeigt, dass dauerhafte Träger von einem prädominanten Stamm und periodische Träger von diversen Bakterienstämmen besiedelt werden^[411,422]. Der prädominante Bakterienstamm erschwert die Kolonisierung durch andere Stämme von *Staphylococcus aureus*, deren Ursprung im Gesundheitswesen liegt^[422]. Vor allem bei periodischen Trägern wurde ein sehr schneller Wechsel des besiedelnden Stammes sowie die zeitweise Anwesenheit von mehreren Bakterienstämmen zur selben Zeit beobachtet^[292,423]. Durchschnittlich werden diese Träger für vier Wochen von einem Bakterienstamm besiedelt, bevor dieser durch einen anderen abgelöst wird. Dieser Wechsel findet ungefähr sechsmal im Jahr statt^[423]. Stammen diese *Staphylokokken* von einem dauerhaften Träger, so wurde nachgewiesen, dass sie eine erhöhte Affinität und Adhäsion gegenüber nasalen Epithelzellen aufweisen^[424]. Zusätzlich zeigte sich, dass Personen, die aufgrund einer Infektion mit *Staphylokokken* stationäre Krankenpflege erhalten hatten, nach ihrer Entlassung eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber einer erneuten Infektion und Besiedlung zeigten^[425,426].

Faktoren, die eine Besiedlung oder Infektion begünstigen, sind zahlreich. So können das Alter^[408,422], Ethnizität^[427], Genetik^[427-435], Geschlecht^[436-438], Gewicht^[37], der Zustand des Hormonhaushalts^[439,440], Ernährung^[436,441,442] und Immunsystem^[443,444] eine Rolle spielen. Aber auch Verzicht auf Tabak^[436,441], die Zusammensetzung der Zytokine im Blut^[445-447] oder der Inhaltstoffe der nasalen Sekrete^[448], das Mikrobiom der Nase^[449,450] und das Bestehen von bestimmten humanen Leukozytenantigenen oder deren Polymorphismen^[427-430,434,435] können von Bedeutung sein. Ebenso hat die Beschaffenheit der Zellwand und der Zellwandproteine von *Staphylococcus aureus* einen Einfluss auf den Erfolg einer Besiedlung^[451,452]. Vorerkrankungen oder Verletzungen sind ebenfalls signifikante Faktoren, welche eine Besiedlung oder Infektion begünstigen können. Zu diesen Erkrankungen zählen unter anderem: Hautkrankheiten^[308,453-457] und -verletzungen^[458-460], bestimmte Entzündungen^[461,462], Weichgewebeeinfektionen^[455] und Krankheiten, die das Immunsystem^[463-465], den Stoffwechsel^[460,466] oder die Nierenfunktion^[467-469] einschränken. Speziell bei Patienten mit Mukoviszidose wurde beobachtet, dass *Staphylococcus aureus*

seinen Metabolismus^[470], Phänotyp^[471,472] und das Spektrum seiner Virulenzfaktoren^[473,474] verändert, um sich an die durch die Krankheit veränderten Bedingungen in der Lunge anzupassen, um dadurch seine Persistenz zu erhöhen^[475]. Darüber hinaus leiden auch Drogenkonsumenten, die Substanzen intravenös verabreichen^[460,476] und Allergiker, die wiederholt Injektionen zur Behandlung erhalten haben^[477] unter einem erhöhten Risiko der Kolonisierung. Vor allem deutet diese Beobachtung darauf hin, dass dieses Risiko besonders dann erhöht ist, wenn die Schutzwirkung der Hautbarriere durchbrochen wird, wie es zum Beispiel bei einer Perforation durch Nadeln, bei Einsetzen eines Katheters oder bei Verletzungen der Fall ist. Bei immunsupprimierenden Krankheiten wie beispielsweise eine Erkrankung an dem humanen Immundefizienz-Virus ist das Infektionsrisiko erhöht, denn diese Personen halten sich häufig in Kliniken auf. Diese Einrichtungen gelten als potentiell Habitat für *Staphylococcus aureus*^[478,479]. Speziell bei Menschen mit einer Störung betreffend der Qualität oder Quantität des Komplementsystems^[480,481], von bestimmten Zytokinen^[482-484], Makrophagen^[485,486], Keratinozyten^[487], neutrophilen Zellen^[485,488,489] sowie von T_H1-^[479,490] oder T_H17-Zellen^[491,492] besteht ein erhöhtes Risiko durch einen Befall mit *Staphylococcus aureus* und einer nachfolgenden Infektion. Eine Person ist den gleichen Risiken ausgesetzt, wenn aufgrund einer Erkrankung bei einer Entzündungsreaktion die Polarisierung der T-Effektorzellen zu T_H2-Zellen begünstigt ist^[493,494]. Dies ist nicht nur auf eine Abwesenheit der anderen Effektorzellen zurückzuführen, denn die T_H2-Zellen fördern aktiv die Expression von Fibrinogen und Fibronectin, was die Proliferation von *Staphylococcus aureus* begünstigt^[495]. Das Verhältnis von **IFN- γ** zu **IL-17** hat sich als ausschlaggebend für die Vorhersage gezeigt, ob eine Person für eine Besiedlung prädestiniert ist. Ist der Anteil von **IFN- γ** niedrig, wurden die Personen mit einer großen Wahrscheinlichkeit besiedelt, während die Kolonisierung bei einem größeren Verhältnis von **IFN- γ** ausgeblieben ist^[446,496]. Dieses Phänomen hängt damit zusammen, dass die Expression von **hBD-3** innerhalb der Epithelzellen der Nase durch **IFN- γ** verstärkt wird^[497]. Ohne die Ausschüttung dieses Defensins steigt die Wahrscheinlichkeit einer Besiedlung des *Vestibulum nasi* durch das Bakterium deutlich^[446,498].

Obwohl eine Kolonisierung durch das Pathogen häufig auftritt, führt nur ein sehr geringer Anteil davon zu einer Infektion^[415,499]. Es gibt daher Individuen, welche trotz einer Besiedlung bis an ihr Lebensende keine Infektion durch das Pathogen erleiden^[4,37]. Besiedelte Personen haben aber ein generell erhöhtes Risiko, sich mit dem opportunistischen Krankheitserreger zu infizieren und das Bakterium zu verbreiten^[408,412,415]. Sie werden hierbei bevorzugt von ihrem endogenen Bakterienstamm infiziert^[38,290,418]. Personen ohne Besiedlung haben hingegen bei einer Infektion generell das erhöhte Risiko einen schwereren Krankheitsverlauf zu erleiden^[291]. Auch können mehrere Bakterienstämme, sowohl MSSA und MRSA, gleichzeitig an einer Infektion beteiligt sein^[500]. Eine Infektion ist auch durch eine Kreuzkontamination über einen exogenen Stamm möglich^[501,502]. Dieser hat ein größeres infektiöses Potential als ein

kolonisierender Stamm^[38,249]. Vermehrt treten exogene Infektionen nach stationären Krankenhausaufenthalten auf. Innerhalb von Kliniken werden die Bakterien über septische Wunden verteilt und können sich durch die Kontamination und Besiedlung von Personal und Umgebung etablieren und Patienten infizieren^[405]. *Staphylococcus aureus* ist mit 13,0 %^[503,504] der zweithäufigste Verursacher einer nosokomialen Infektion und an 20,0 %^[505] aller postoperativen Infektionen beteiligt. Ein erheblicher Teil davon ist in dieser Umgebung Methicillin-resistent^[506]. Unter anderem während einer Operation und bei der postoperativen Versorgung steigt das Infektionsrisiko, da die natürliche Schutzbarriere der Haut durch Katheter oder Zugänge durchbrochen wird und das Pathogen so freien Zugang zum Körperinneren hat^[507,508]. Während der Operation kann das Bakterium hämatogen oder über die Luft in den operativen Bereich gelangen. Hier kann das Risiko einer Kreuzinfektion durch präventive Hygienemaßnahmen^[509], saubere Wundversorgung^[509] und die prophylaktische Gabe von Antibiotika^[510] reduziert werden. Diese Reduktion ist allerdings nur bedingt gegen *Staphylokokken* aus der eigenen Kolonisierung wirksam^[412,501]. Bei einem Krankenhausaufenthalt mit operativem Eingriff oder Hautperforation ist bei einem Patienten mit kompromittierten Gesundheitszustand die Gefahr einer Infektion besonders stark erhöht^[511,512]. Die Größe des Risikos ist hierbei von der Dauer und dem Umfang des Eingriffes abhängig^[513].

Der primäre Ort, an dem die Verbreitung einer Kolonisierung ihren Lauf nimmt, ist die häusliche Umgebung. Familienmitglieder stehen in sehr engem und häufigem Kontakt, wodurch sie einem hohen Übertragungsrisiko ausgesetzt sind^[514-516]. Dieses Risiko ist besonders bei Kindern, pflegebedürftigen Menschen und Haustieren relevant, da diese eine verminderte Möglichkeit und Bereitschaft zur Selbstpflege und -hygiene besitzen^[517-519]. Ein besiedeltes Haushaltsmitglied kann die Haushaltsumgebung und Alltagsgegenstände kontaminieren, welche dann ein Kolonisierungspotential für andere Familienmitglieder bilden, wobei die Anzahl und das Alter aller Familienmitglieder einen großen Einfluss auf die Verbreitung dieser Kontamination haben^[404,520]. Sobald sich *Staphylococcus aureus* in einem Haushalt etabliert hat, verwandelt sich dieser in eine Brutstätte mit kontaminierten Gegenständen und Oberflächen, wodurch sich das Risiko der Bewohner besiedelt zu werden oder eine Infektion zu erleiden drastisch steigert^[404]. Hierbei ist sowohl die Umgebung selbst^[521,522], als auch der Kontakt zu anderen Haushaltsmitgliedern^[523,524] der hauptsächliche Grund für das erhöhte Risiko. Hat sich das Pathogen erst einmal im Haushalt eingenistet, kann er abwechselnd zwischen periodischen und dauerhaften Trägern übertragen werden und auf diese Weise wiederkehrende Besiedlungen und Infektionen verursachen^[523,525]. Andere Menschen, die im engen Kontakt mit diesem Infektionsherd stehen, wie etwa Verwandte, laufen in Gefahr, sich selbst und ihren eigenen Haushalt zu gefährden. Dieses Infektionsrisiko wird dann verstärkt, wenn das Pathogen einen klinischen Ursprung hatte, wie es nach einem

Krankenhausaufenthalt der Fall sein kann. So wurde beobachtet, dass der Bakterienstamm USA300, welcher sich prädominant im Gesundheitswesen einnistet, sich nach Genesung der betroffenen Personen über Monate im Haushalt der infizierten Person halten und diesen verseuchen kann ^[520,522,526]. Ein vereinfachtes Modell möglicher Übertragungswege ist in Abbildung 4 dargestellt.

In einer Simulation nach Macal *et al.* (2014) ^[527] wird geschätzt, dass 95,0 % der Ansteckungsereignisse nicht durch eine Infektion, sondern durch besiedelte Personen verursacht werden. Das Infektionsrisiko steigt logischerweise mit der Häufigkeit des menschlichen Umgangs und dem Umgang mit potentiell kontaminierten Gegenständen, sodass größere Menschenmengen sowie öffentliche und private Einrichtung mit großer Fluktuation und insbesondere Schulen und Kindertagesstätten ein großes Gefährdungspotential aufweisen ^[527]. Tatsächlich ist diese Simulation realistisch, da der Umgang mit besiedelten und infizierten Personen sowie das Teilen von kontaminierten Hygiene- und Alltagsgegenständen zur der wahrscheinlichsten Übertragung eines über die Kommune akquirierten *Staphylococcus aureus* führt ^[520,528,529]. Darüber hinaus konnte der Ursprung von Epidemien von *Staphylococcus aureus* bereits in öffentlich zugänglichen und häufig frequentierten Räumen nachgewiesen werden ^[530,531]. Während zum Besiedlungsverhalten von *Staphylococcus aureus* bereits eine enorme Datenmenge bekannt ist, ist die Datenerfassung trotz allem ungenau, da diese meistens retroaktiv nach einer Infektion getätigt wird. Aus diesem Grund lassen sich weder die Quelle der Kolonisierung, noch der Übertragungsverlauf erfassen. Ebenso beschränken sich die meisten Publikationen auf eine nasale Kolonisierung und vernachlässigen hierbei andere potentielle befallene Körperbereiche, wodurch eine Unschärfe entsteht ^[532,533].

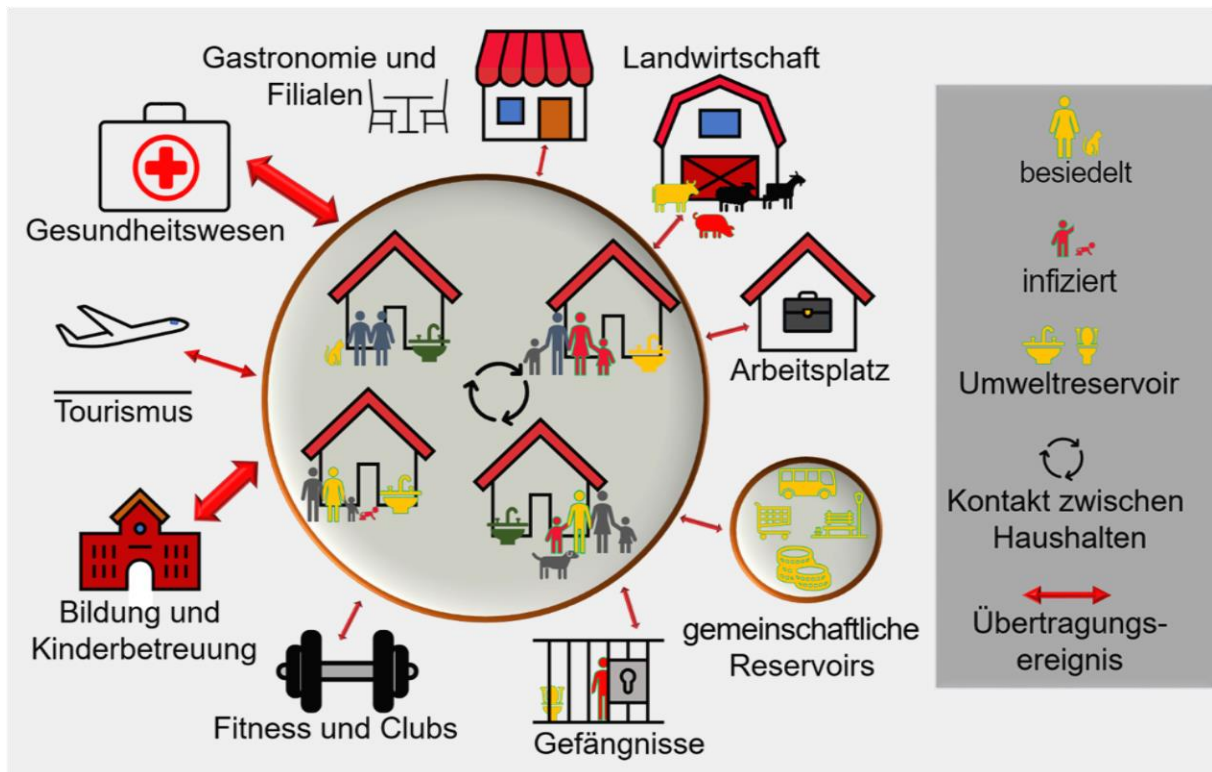


Abbildung 4: Das Bild zeigt ein vereinfachtes Modell, wie sich ein Bakterienstamm von *Staphylococcus aureus* innerhalb einer Kommune verbreitet. In der Illustration sind besiedelte Menschen mit gelber Farbe und infizierte Menschen in roter Farbe hervorgehoben. Die doppelten roten Pfeile zeigen Kontaktwege, auf denen eine Übertragung stattfinden kann. Je größer das Übertragungsrisiko, desto breiter der doppelte Pfeil. Die Illustration stammt aus der Publikation von Knox *et al* (2017)^[404] und wurde mit der Erlaubnis von *Elsevier* verändert. Eine Lizenz für eine Übersetzung und Veröffentlichung wurde von dem Herausgeber erworben^[6].

2.3.3 Adhäsine

Um den Wirt befallen zu können, muss zunächst physischer Kontakt zu dessen Zellen^[534] oder, im Falle von Thrombozyten, Zellfragmenten^[535] aufgebaut werden. So binden *Staphylokokken* bevorzugt an der extrazellulären Matrix von Endothelzellen^[403]. Diese Matrix ist eine dreidimensionale Suprastruktur, welche sich aus verschiedenen Glykoproteinen wie beispielsweise Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen und Vitronectin zusammensetzt^[536]. Adhäsine von Pathogenen erkennen sehr häufig die molekularen Bestandteile dieser extrazellulären Matrix, allen voran das Fibronectin^[537,538]. Für die Interaktion mit einer so gearteten Matrix verfügt das Pathogen über eine Vielzahl von Adhäsinen und Zellwandkomponenten, welche ein breites Spektrum an Funktionen besitzen und oftmals mit zwei oder mehr Wirtsproteinen interagieren können. Beispielsweise sind sie sehr prominent darin, das Pathogen vor dem Immunsystem des Wirtes zu verbergen oder dessen Effektivität zu reduzieren^[10].

In diesem Kapitel stehen hauptsächlich die adhäsiven Eigenschaften der Proteine im Vordergrund, während die potentiellen immunevasiven Eigenschaften in Kapitel 2.3.4.4 „**Immunevasion**“ abgehandelt werden.

2.3.3.1 **MSCRAMM und SERAM**

Wichtige Adhäsine, welche *Staphylococcus aureus* an seiner Zellwand präsentiert, werden unter dem Akronym *MSCRAMM* in Tabelle 2 zusammengefasst^[10,154]. Weiter verfügt *Staphylococcus aureus* über sekretierte Proteine, welche sich nach der Freisetzung an die Außenhülle des Bakteriums anlagern und ebenfalls in der Adhäsion involviert sind. Vertreter dieser Proteine sind unter dem Akronym *SERAM* in Tabelle 3 dargestellt^[154,539]. Unter den *Staphylokokken* stehen der Gattung *Staphylococcus aureus* eine größere Variation an Oberflächenkomponenten zur Verfügung als bei verwandten Krankheitserregern, auch wenn die genaue Anzahl vom jeweiligen Bakterienstamm abhängig ist^[2,154,540]. Das Spektrum an exprimierten *MSCRAMM* und *SERAM* wird ebenfalls durch die aktuelle Wachstumsphase und Nährstoffsituation beeinflusst. So werden beispielsweise manche dieser Proteine nur bei Eisenmangel hergestellt^[541,542]. Bei beiden Proteingruppen treten Redundanzen auf, sodass mehrere Proteine oftmals die gleichen Liganden binden und auch eine ähnliche Funktion besitzen^[540]. Des Weiteren ist auch die Teichonsäure, ein Zellwandbestandteil von Gram-positiven Bakterien, an der initialen Adhäsion der Bakterien an der Oberfläche involviert^[543].

Proteine aus der Gruppe der *MSCRAMM* besitzen typischerweise am C-Terminus das sogenannte LPXTG-Motiv, eine Erkennungssequenz für die Cystein-Endopeptidase **SrtA**. Das Enzym spaltet die Proteine innerhalb des Motivs und integriert diese anschließend durch eine kovalente Bindung in die Peptidoglycanschicht des Bakteriums^[544,545]. Ein Großteil der Proteine besitzt am N-Terminus eine Tandemstruktur aus zwei Untereinheiten, welche der Faltung von **IgG** sehr ähnlich ist^[546]. Eine Besonderheit ist hierbei das **SpA**, welches an seinem N-Terminus ein Tandem aus fünf Domänen besitzt, welche jeweils eine Struktur aus drei Helix-Bündeln bilden^[304,547,548]. Der Bindungsmechanismus, mit welcher die Faktoren ihre Liganden binden, ist als ‚*dock, lock and latch*‘ bekannt^[549]. Zwischen zwei Untereinheiten wird eine Tasche gebildet, in welcher der Ligand binden kann. Nach der Bindung wird durch eine Konformationsänderung die C-terminale Erweiterung einer Untereinheit in der zweiten arretiert^[546,550]. Dieser Mechanismus resultiert in einer Bindung des Liganden durch die zwei Untereinheiten, welche sowohl mechanisch, als auch durch starke Wechselwirkungen erfolgt^[550].

Eines der wichtigen Adhäsine, welches das Bakterium die Kolonisierung im *Vestibulum nasi* ermöglicht, ist **CifB**. Es verfügt über die Fähigkeit, mehrere ω -Schleifen in Loricrin und am C-terminalen Ende von Keratin 10 zu binden ^[551]. Diese beiden Proteine werden bevorzugt in Plattenepithelzellen ausgebildet, welche einen Großteil des *Vestibulum nasi* definieren ^[552,553]. Ebenso ermöglicht **IsdA** die Festsetzung an den Epithelzellen, indem es mit seiner Bindungsstelle für Häm-Gruppen als Kreuzreaktion auch Loricrin, Keratin 10 und Involucrin, einen Bindungspartner von Loricrin, binden kann ^[294,554].

Die Proteine innerhalb des Akronyms *SERAM* werden aktiv von dem Bakterium sekretiert, woraufhin diese sich mit der Zellwand von *Staphylococcus aureus* assoziieren und von dort aus mit Wirtszellen interagieren können. Die Verankerung dieser Proteine wird durch Interaktion mit Zellwandkomponenten, wie beispielsweise die neutrale Phosphatase oder die Teichonsäure ermöglicht, kann aber auch durch Selbstassoziation vermittelt werden. Im molekularen Detail sind diese Mechanismen aktuell noch nicht genauer erforscht ^[555,556]. Unter den *SERAM* gibt es Vertreter, deren bisherig bekannte Hauptfunktion darin besteht, ein Anheften des Bakteriums an der Wirtszelle zu ermöglichen. Zu diesen Proteinen gehören das **Emp** ^[539] und das 1,0 MDa große **Ebh** ^[557]. Zwei Proteine innerhalb dieser Gruppe tragen enorm zur Virulenz von *Staphylococcus aureus* bei. Zum einen handelt es sich hierbei um die Koagulase (**Coa**), welche ihren Beitrag nicht durch Adhäsion, sondern hauptsächlich in der Ausbildung einer schützenden Kapsel leistet ^[558,559]. Zum anderen produzieren die *Staphylokokken* das **Eap**, welches ein sehr versatiles Werkzeug mit großer Funktionalität ist. Das Protein ist eines der am meisten erforschten Proteine aus der *SERAM*-Gruppe. Es unterstützt das Bakterium sowohl bei der Adhäsion als auch bei der Immunevasion ^[2]. Wird das Protein nicht exprimiert, ist eine Interaktion mit den Wirtsorganismen sehr stark reduziert ^[560], wodurch eine Kolonisierung und eine intrazelluläre Invasion ^[561] der Wirtszellen nicht mehr möglich ist.

Tabelle 2: Eine Auflistung von einigen wichtigen *MSCRAMM*, ihren Bindungspartnern und Funktionen. Die Tabelle wurde aus Foster *et al.* (2014) [10] übernommen und mit Informationen aus weiteren Publikationen ergänzt.

MSCRAMM		
Adhäsion	Bindungspartner	Funktion
CifA (~ 97,0 kDa) [562]	Annexin 2 [563], Fibrinogen (γ -Kette) [546,564], Komplementfaktor I [565,566], vWF [567]	Adhäsion [546,564], Aggregation von Thrombozyten [568,569], Immunevasion [565,566], Schutz vor Scherkraft [567]
FnBPA und FnBPB [570] (~ 63,0 und 104,0 kDa) [571]	Elastin [572], Fibrinogen (γ -Kette) [572,573], Fibronectin [574,575], Plasminogen [576]	Adhäsion [572,575], Aggregation von Thrombozyten [577,578], Biofilmbildung [579], Immunevasion [576], intrazelluläre Invasion [574,580], Agglutination [581]
IsdA (~ 39,0 kDa) [582]	Fibrinogen [583], Fibronectin [583], Häm-Gruppen [583,584], Involucrin [554], Keratin 10 [554], Loricrin [554]	Adhäsion [294], Aktivierung von Thrombozyten [585], Eisenerwerb [584], Resistenz gegen antimikrobielle Substanzen [586,587]
IsdB (~ 72,0 kDa) [582]	Häm-Gruppen [588], Integrin β -3 [589]	Eisenerwerb [588], intrazelluläre Invasion [589]
SpA (~ 39,9 kDa) [590]	gC1qR/p33 [591], Immunglobuline [592,593], TNFR1 [594], vWF [567,595]	Adhäsion [591], Aggregation von Thrombozyten [591,595,596], Biofilmbildung [597], Immunevasion [592,593], Schutz vor Scherkraft [567], Superaktivierung von TNFR1 [594]

Tabelle 3: Wichtige *SERAM* mit ihren Bindungspartnern und Funktionen. Die Tabelle wurde aus Chavakis *et al.* (2005) ^[539] übernommen und mit Informationen aus weiteren Publikationen ergänzt.

SERAM		
Adhäsion	Bindungspartner	Funktion
Eap (~ 60,0 bis 72,0 kDa) ^[598]	DNA ^[599] , Fibrinogen ^[598,600] , Fibronectin ^[598,600] , homophile Interaktion ^[600] , ICAM-1 ^[601] , Knochen-Sialoprotein ^[598] , Kollagen ^[598,600] , Prothrombin ^[600] , Thrombospondin 1 ^[598] , Vitronectin ^[598]	Adhäsion ^[598,600] , Agglutination ^[600] , Immunevasion ^[599,601,602] und -modulation ^[603] , intrazelluläre Invasion ^[606] , Störung der Wundheilung ^[601]
Efb (~ 19,0 kDa) ^[604]	Fibrinogen ^[605,606] , Komplement C3 ^[607]	Bindung von Thrombozyten ^[606] , Immunevasion ^[607] , Störung der Wundheilung ^[608] , verhindert Aggregation von Thrombozyten ^[606]
Emp (~ 35,5 kDa) ^[609]	Fibrinogen ^[609,610] , Fibronectin ^[609,610] , Kollagen ^[609,610] , Vitronectin ^[609,610]	Adhäsion ^[609,610]
Coa (~ 59,0 kDa) ^[611]	Fibrinogen ^[612] , Prothrombin ^[612] ,	Aktivierung von Thrombozyten ^[613] , Aktivierung von Staphylothrombin ^[613] , Immunevasion ^[614]
vWbp (~ 66,0 kDa) ^[615]	Fibrinogen ^[615] , Fibronectin ^[615] , Prothrombin ^[616] , vWF ^[615]	Adhäsion und Kolonisierung ^[615] , Immunevasion ^[617] , Koagulation von Plasma ^[616]

2.3.3.2 Extrazelluläres Matrixprotein

Das **Emp** von *Staphylococcus aureus* ist das Zielprotein, mit dem das Epitop des Anti-**Emp**-Antikörpers interagiert^[41]. Das korrespondierende monocistronische Gen *emp* hat einen offenen Leserahmen mit einer Größe von 1023 bp und wurde von Hussain *et al.* (2001)^[609] in 246 Stämmen von *Staphylococcus aureus* nachgewiesen. Die Ergebnisse eines *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* von Geraci *et al.* (2017)^[610] implizieren, dass *Staphylokokken*, welche die Barrieren von Epithelzellen nicht überwinden können und nur eine niedrige Virulenz besitzen, nicht über das *emp*-Gen verfügen. Ein Beispiel hierfür ist die Gattung *Staphylococcus epidermidis*, in welcher *emp* bisher nur in einer einzigen Methicillin-resistenten Variante als Fragment festgestellt werden konnte^[618]. Als eine Ausnahme zu der Implikation zeigt sich allerdings die Gattung *Staphylococcus haemolyticus*, welche das Gen trotz ihrer geringen Virulenz besitzt^[619,620].

Die Transkription von *emp* in *Staphylococcus aureus* beginnt nach vier Stunden Kultivierungszeit in der späten logarithmischen Phase und die Konzentration des Proteins nimmt auch nach Erreichen der stationären Phase stetig zu^[609]. Enthält die Umgebung des Bakteriums wenig Eisen, wird die Transkription von *emp* in *Staphylococcus aureus* primär durch den Regulator *fur*^[621] und die Expression des *ica*-Operons^[621] geregelt. Eine generelle Expression des Proteins wird aber auch unter Abhängigkeit der globalen Regulatoren *sae*^[621-623], *agr*^[621] und, mit geringem Einfluss, *sarA*^[621] gesteuert. In einer Umgebung reich an Eisen und unter osmotischem Stress wird die Transkription über noch nicht bekannte Faktoren in Unabhängigkeit von *fur* herunterreguliert^[624]. Da in Wirtsumgebung aufgrund von eisenbindenden Proteinen ein Mangel an diesem Element herrscht, ist davon auszugehen, dass die Transkription von *emp* unter den *in vivo* im Wirt herrschenden Bedingungen hochreguliert ist^[621].

Nach der Translation der mRNA besitzt das **Emp** 341 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von ~ 38,5 kDa^[609]. Die ersten 26 Aminosäuren zeigen eine sehr große Ähnlichkeit gegenüber bekannten bakteriellen Signalpeptiden^[625], welche abgetrennt werden, sobald das Protein seinen Zielort erreicht hat^[610]. In seiner endgültigen Form hat ein einzelnes **Emp** daher 315 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von ~ 35,5 kDa. Das Protein besitzt 42 positive und 19 negative Seitenketten^[609], hat in der zentralen Sequenz einen sehr hohen Gehalt an Histidin und besitzt einen stark konservierten C-Terminus^[610]. Eine von Hussain *et al.* (2001)^[609] durchgeführte statistische Analyse der Aminosäuresequenz durch das Computerprogramm *SAPS (School of Advanced Professional Studies)* von *EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute)* hat einen isoelektrischen Punkt von pH ~ 10,4 und eine positive Gesamtladung des Proteins vorhergesagt. Bis heute wurde noch keine dreidimensionale Struktur von **Emp** beschrieben,

aber Geraci *et al.* (2017) ^[610] haben die Struktur und Funktion experimentell und analytisch bestimmt. Durch Elektronenmikroskopie wurde als Tertiärstruktur ein ringförmiges Protein mit knopfförmigen Fibrillen dargestellt, welches sich in Polymeren von zwei bis vier Einheiten zusammenfügt. Die sichtbaren Fibrillen haben hierbei eine Länge und Breite von bis zu 180,0 nm. Eine Circular dichroismusspektroskopie zeigte, dass das **Emp** von 40,0 % β -Faltblatt-Strukturen ausgeprägt wird und eine Proteinanalyse durch *I-TASSER* (*Iterative Threading ASSEmbly Refinement*) von *Zhang Lab* schlägt eine hufeisenförmige Struktur für das Protein vor (Abbildung 5). Als strukturelle Analoga zu der Vorhersage empfiehlt das Programm bei den zehn besten Treffern prokaryotische und eukaryotische Proteine mit Leucin-reichen Wiederholungen.

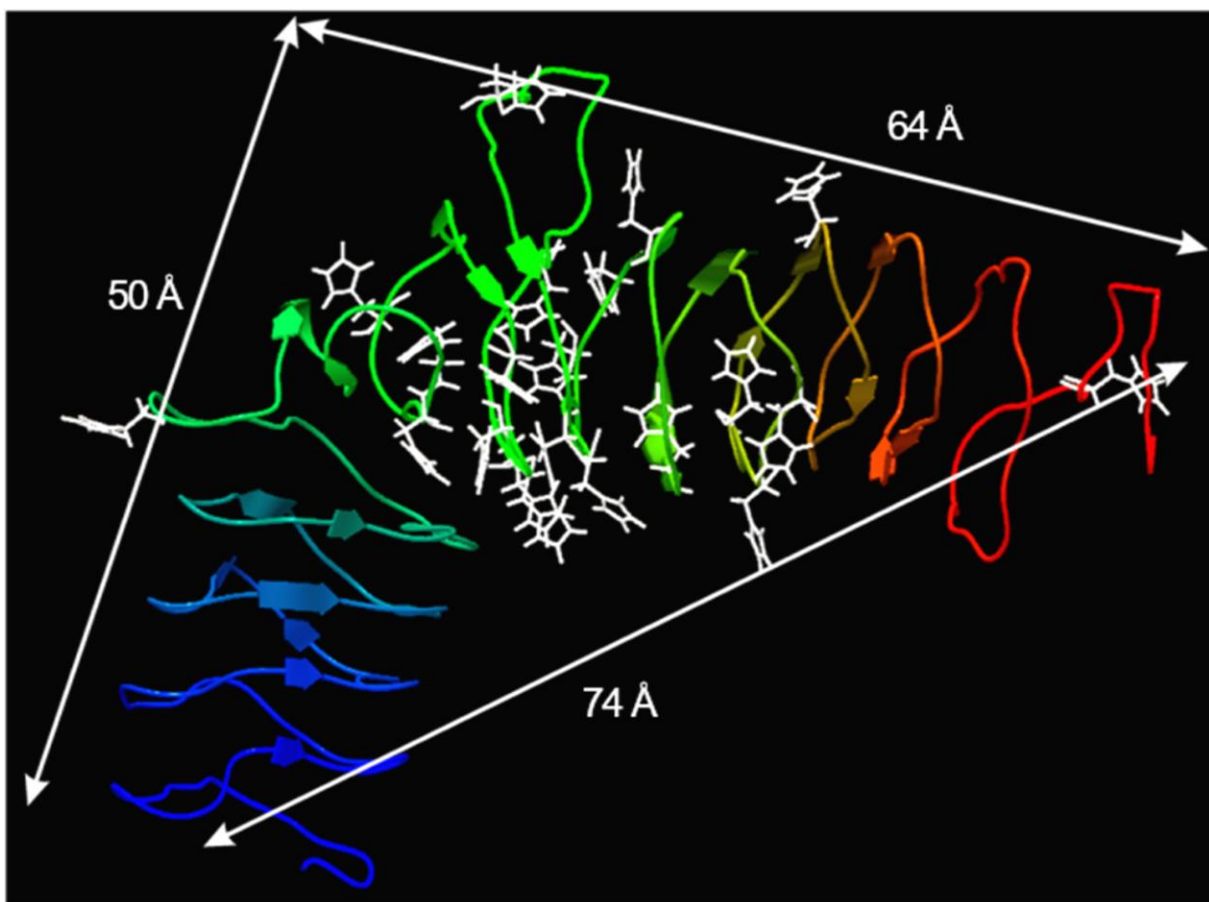


Abbildung 5: Ein von Geraci *et al.* (2017) publiziertes und durch das Computerprogramm *I-TASSER* vorhergesagtes dreidimensionales Modell des **Emp** scheint mit der größten Wahrscheinlichkeit der tatsächlichen Form des Proteins zu entsprechen. Links wird der N-Terminus in blau und rechts der C-Terminus in Rot gezeigt. Die Aminosäure Histidin mit ihrem Imidazol an der Seitenkette wird in weißer Farbe hervorgehoben. Die Illustration wurde aus der Publikation von Geraci *et al.* (2017) ^[610] übernommen. Die genannte Publikation ist über eine internationale Namensnennung-Lizenz 4.0 von *Creative Commons* (CC BY 4.0) geschützt ^[a].

Emp wird hauptsächlich in Zellwandextrakten von *Staphylococcus aureus* nachgewiesen, kann aber auch im erschöpften Nährmedium entdeckt werden, wenn dieses aufkonzentriert wird^[609,621]. Es ist kein Protein bekannt, welches die Verankerung von **Emp** in der Zelloberfläche ermöglicht. Vielmehr ist anzunehmen, dass es aufgrund seines positiven isoelektrischen Punktes und seiner Ladungen sich elektrostatisch auf negativ geladenen Oberflächenmolekülen, wie beispielsweise Teichonsäure, anlagern kann. Zusätzlich verfügt das Protein über 36,3 % hydrophobe Seitenketten, was eine hydrophobe Wechselwirkung mit Lipidgruppen und Lipoteichonsäuren auf der Zellwand ermöglicht. Beide Effekte schließen sich in diesem Fall nicht aus und können auch gemeinsam auftreten, um das **Emp** an seinem Bestimmungsort zu verankern^[609].

Die Funktion von **Emp** ist noch nicht vollständig geklärt, aber es ist bekannt, dass das Protein zur Abszessbildung notwendig ist und auch dazu beiträgt, dass das Bakterium längere Zeit im Wirtsorganismus bestehen kann^[626]. Bei einer chronischen Osteomyelitis ist die Expression sichtbar erhöht und für die Biofilmbildung in einer Umgebung mit niedrigem Eisengehalt wird das Protein essenziell benötigt^[627]. Ebenso wird es bei der Abszessbildung vermehrt von Bakterien innerhalb der dort entstehenden Läsion produziert^[626]. Ähnliche Proteine mit einem hohen Gehalt an Histidin sind aufgrund der Beschaffenheit der Aminosäure häufig in der Interaktion mit anderen Proteinen oder Molekülen involviert^[628]. Fibrilläre Proteine wie **Emp** sind auch aus anderen Bakterienstämmen bekannt und haben verschiedene Funktionen, von Adhäsion an Wirtsoberflächen, bis hin zum lateralen Gentransfer. Das Protein, welches aufgrund von funktioneller Analogie die größte Assoziation zu **Emp** zeigt, ist das Curli-Protein^[610]. Ähnlich wie bei **Emp**, unterstützt dieses in Gram-negativen Bakterien vorkommende Protein sowohl die Biofilmbildung als auch die Adhäsion und Invasion von Wirtszellen^[629].

Das **Emp** zeigt eine Affinität gegenüber dem Wirtsgewebe und kann sowohl auf Haut, Knochen als auch Knorpel adhären. Wird die extrazelluläre Matrix des Gewebes zuvor proteolytisch verdaut, steigt diese Bindungsspezifität und -effizienz deutlich^[610]. Auf molekularer Ebene interagiert das **Emp** mit den Wirtsproteinen Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin und einigen Kollagenen. Hierbei ist die Affinität gegenüber Kollagen I und Vitronectin größer als bei Fibronectin und Fibrinogen^[609]. Experimente mit trunkiertem Protein zeigen, dass der N-Terminus für die Ausbildung der Fibrillen und die Polymerisation essenziell ist, während der C-Terminus die Zielspezifität gegenüber Wirtsproteinen bestimmt und zu deren Bindung beiträgt. Die größte Bindungsaffinität zeigt allerdings die zentrale Sequenz des Proteins, welche durch ein häufiges Auftreten der Aminosäure Histidin ausgeprägt ist. Besteht ein vollständiger C-Terminus, ist die Bindungseffektivität des zentralen Bereiches in der Interaktion mit Wirtsproteinen reduziert, was vermuten lässt, dass dieser Bereich auch an der

Dissoziation zwischen **Emp** und den Wirtsproteinen beteiligt ist^[610]. In *emp*-Deletionsexperimenten von Hussain *et al.* (2001)^[609] wurde gezeigt, dass *Staphylococcus aureus* trotz fehlendem *emp* weiterhin die Proteine Fibronectin und Fibrinogen binden kann, auch wenn die Bindungsstärke signifikant reduziert wurde. Das Protein trägt also maßgeblich zur Adhäsion an der Wirtszelle bei, wird aber durch weitere Adhäsine durch redundante Funktionalität ergänzt. Geraci *et al.* (2017)^[610] schlagen ein Modell vor, in welchem **Emp** erst in einer späteren Infektionsphase seinen Beitrag zur Virulenz leistet, nachdem die extrazelluläre Matrix durch Virulenzfaktoren des Pathogens und der Immunantwort des Wirtes beschädigt wurde. Durch **Emp** verbessert sich das Potential des Bakteriums, sich an dem beschädigten Gewebe zu verankern und von dort aus tiefer in den Wirt einzudringen.

2.3.4 Virulenz und Pathologie

Unter normalen Umständen ist das Innere eines menschlichen Körpers ein sehr ungeeigneter Ort für Organismen, um an Nährstoffe zu gelangen. Ein Pathogen muss zuerst die Hautbarriere überwinden und es dann schaffen, nicht vom adaptiven und humoralen Immunsystem eliminiert zu werden. Zudem werden essenzielle Elemente wie Eisen bereits vom Wirtskörper gebunden und sind in den Körperflüssigkeiten nur sehr spärlich aufzufinden^[630]. Gelingt es dem Pathogen jedoch, all diese Barrieren zu überwinden, hat es die Möglichkeit, Wirtszellen zu zerstören, um sie als Nährstoffquelle zu nutzen^[621]. *Staphylococcus aureus* ist die Bakterienart mit der höchsten Virulenz seiner Gattung und evolutionär perfekt dafür gerüstet, genau dieses Ziel zu erreichen^[631]. Es verfügt über verschiedene Werkzeuge, sogenannte Virulenzfaktoren, um sich gegen das Immunsystem zu wehren, Wirtszellen zu manipulieren und zu zerstören und Resistenzen gegen antimikrobielle Substanzen zu auszubilden^[632-634]. Hierbei kann es die Expression der Virulenzfaktoren hervorragend auf verschiedene Bereiche im Wirtskörper anpassen, um sich beste Chancen für eine erfolgreiche Infektion zu schaffen^[12,635]. Sein Repertoire an Virulenzfaktoren unterscheidet sich in Abhängigkeit des Bakterienstammes^[154,636]. Anhand seiner Umgebung, kann er die Faktoren exprimieren, die ihm den größten Vorteil verschaffen^[631,637,638]. Auch kann eine manganhaltige Umgebung die Virulenz und Fitness des Bakteriums verstärken^[639]. Bevorzugte Angriffsziele des Bakteriums sind unter anderem die roten Blutkörperchen, die einen hohen Eisengehalt aufweisen. Aus diesem Grund verfügt das Pathogen über eine Vielzahl an Toxinen, um Blutbestandteile zu zerstören^[640,641]. Die Virulenz des Bakteriums ist letztendlich zusammen mit dem in Kapitel 2.2.6 „**Immunsystem-assoziiertes Kollateralschaden**“ beschriebenen Wirken der körpereigenen Immunantwort für das Krankheitsbild im Wirtsorganismus verantwortlich. Die folgenden Kapitel fassen zusammen, welche Virulenzfaktoren *Staphylococcus aureus* zu einem gefährlich Pathogen machen und welche Folgen eine Infektion für den Wirtsorganismus haben kann.

2.3.4.1 Regulation der Virulenz

Die Expression von Virulenzfaktoren wird durch ein Netzwerk von Regulatoren und Operonen beeinflusst^[637,642]. Die relevantesten dieser Regulatoren sind *agr*^[631], *fur*^[621], *sae*^[643,644], σ^B ^[645,646] und *sarA*^[631,647] sowie dessen Homologe^[648] wie auch das Operon *ica*^[621]. Einer oder mehrere dieser Regulatoren können an der Expression eines einzelnen Virulenzfaktors beteiligt sein und sich gegenseitig direkt beeinflussen^[631,649], aber auch unabhängig voneinander agieren^[656].

Der Regulator *agr*, eine der wichtigsten Regulatoren, wird durch ein autoinduziertes Peptid beeinflusst, dessen Signalstärke mit steigender Anzahl der Bakterienpopulation zunimmt^[650,651]. Dieses sogenannte ‚*quorum sensing*‘ ist ein Sensor, der es dem Erreger ermöglicht, die eigene Populationsdichte wahrzunehmen und seine Genregulation entsprechend anzupassen^[652]. Dieses System ist verhältnismäßig aufwändig in der Aufrechterhaltung und in einer großen Population bilden sich deshalb sehr oft Mutanten, welche kein voll funktionsfähiges *agr* besitzen^[653-655]. Das *quorum sensing* dieser Mutanten wird durch die Peptidproduktion der umgebenden Bakterien gesteuert, während sie selbst die eingesparten Ressourcen anderweitig verwenden^[655,656].

Staphylococcus aureus besitzt durch dieses Netzwerk an Sensorik eine Möglichkeit, sowohl seinen eigenen Zustand, als auch die Situation des Wirts zu evaluieren und seine Expression entsprechend anzupassen^[657].

2.3.4.2 Phänotypen

In Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen^[658], Dauer der Infektion^[658-660], dem Bakterienstamm^[661], dem Gesundheitszustand des Wirtes^[661] und des befallenen Gewebes^[662,663] kann *Staphylococcus aureus* bei einer Infektion des Wirtskörpers einen Abszess^[12], einen Biofilm^[658,662], eine kleine Kolonien-Varianten^[659,661] oder Schläfer^[658,664] ausbilden. Die Phänotypen des Biofilms und der kleinen Kolonien-Variante werden von dem Pathogen meistens ausgebildet, wenn es antibiotischem Stress ausgesetzt ist und sich in einer für ihn unwirtlichen Umgebung befindet^[665,666]. Der induzierende Stress kann in Form von heftigen Widerstand des Immunsystems^[667-669] oder antimikrobiellen Substanzen^[658,664,670] auftreten. Die Ausbildung dieser Phänotypen ermöglichen es dem Bakterium, sich für längere Zeit im Wirt einzunisten.

2.3.4.2.1 Planktonischer Phänotyp und Abszessgemeinschaft

Im normalen planktonischen Phänotyp besitzt *Staphylococcus aureus* das größte zytotoxische Potential und die stärkste Aktivität und erzeugt nach einer Infektion des Gewebes Abszesse^[12,671]. Nachdem sich das Bakterium im Wirt erfolgreich adhärert und niedergelassen hat, beginnt es, gesteuert durch das *quorum sensing*, mit der Expression von

toxischen Substanzen und zerstört im Verlauf von mehreren Tagen das umliegende Wirtsgewebe^[650]. Das dabei freiwerdende Fibrin wird vom dem Pathogen dazu genutzt, eine fibrilläre Kapsel um den Infektionsherd auszubilden, um sich vor dem Immunsystem des Wirtes zu isolieren^[671,672]. Gleichzeitig lockt das Bakterium Immunzellen an seine Position, indem es Lipoproteine sezerniert, welche die *PRR* der Immunzellen aktivieren^[633,673]. Diese Immunzellen sammeln sich am Rand des Abszesses, um die Bakterien zu bekämpfen. Dabei treten beim umliegenden Gewebe Kollateralschäden auf. Gleichzeitig werden die Wirtszellen durch Toxine weiter dezimiert, was zur Freisetzung von noch größeren Mengen Fibrin und auch Eiter führt^[671,674,675]. Im weiteren Verlauf nimmt die Bakterienzahl innerhalb des Abszesses weiter zu und dieser vergrößert sich unter Ausbildung einer großen Pseudokapsel^[671]. Ab einer gewissen Größe und gesteuert über das *quorum sensing*^[676] wird die Integrität der Kapsel und Pseudokapsel durch enzymatische Aktivität reduziert, bis beide Strukturen reißen. Darauf folgt eine Verbreitung der im Abszess kultivierten Bakterien im Wirtskörper. Die verbreiteten Bakterien können den Prozess wiederholen und eine Abszessbildung an einer anderen Position auslösen^[671,677].

Für die Ausbildung eines Abszesses sind die Virulenzfaktoren **Coa** und **SpA** nötig^[671]. Damit die Bakterien nach der Abszessruptur eine neue Infektion verursachen können, müssen sie unter anderem in der Lage sein, **Eap** zu exprimieren. Ebenso leisten die Proteine **Cna**, **CifA**, **FnBPA**, **FnBPB**, **IsdA**, **IsdB** und **vWbp** einen sehr großen Beitrag in der Ausbildung eines Abszesses^[626]. Auch ist die Rekrutierung und nachfolgende Zerstörung von neutrophilen Zellen notwendig, um die fibrilläre Kapsel zu vergrößern und die Pseudokapsel aufzubauen^[671]. Bleiben wichtige Signale aus, welche normalerweise die Rekrutierung dieser Immunzellen vermitteln, kann das Pathogen keinen Abszess hervorrufen^[678,679].

2.3.4.2.2 Biofilm und Schläfer

Viele Regulatoren haben einen Einfluss auf die Produktion der Proteine und Substanzen, die für eine Ausbildung eines Biofilms benötigt werden^[680]. Essenziell dafür sind Signale der Regulatoren σ^B ^[645,646] und *sarA*^[681,682]. Auch spielen das Operon *ica*^[621,683] und die Regulatoren *fur*^[621], *rbf*^[684], *srrAB*^[685], *tcaR*^[686] und *spx*^[687] eine größere Rolle bei der Entwicklung dieses Phänotyps. Der Virulenzfaktor **SpA**, dessen Expression durch die Regulatoren *agr*, *sarA* und *sae* reguliert wird, ist ebenfalls für die Ausbildung eines Biofilms notwendig^[597,631]. Zu weiteren bekannten Proteinen, welche die Ausbildung eines Biofilms unterstützen, zählen das **Atl**^[579], **Bap**^[688], **FnBPA**^[579] und **FnBPB**^[579]. Biofilme entstehen bevorzugt auf körperfremden Material, wie beispielsweise Implantate^[689], können aber auch Gewebe befallen^[690,691]. Das Bakterium kann sich auf fast jeder Oberfläche ohne Einschränkung einnisten, um dort einen Biofilm zu erzeugen^[692]. Unter dem Einfluss des wirtseigenen **IL-1 β** wird die Ausbildung des Phänotyps gefördert und dieser kann die durch

das Zytokin hervorgerufenen Entzündung deutlich besser tolerieren^[667]. In einem heranwachsenden Biofilm bilden Bakterien eine Glykokalyx, welche neben Polysacchariden als Hauptbestandteil^[693-695], unter anderem aus extrazellulärer Desoxyribonukleinsäure (eDNA)^[696,697], Amyloidfibrillen^[698] und einer Mischung von bakteriellen Proteinen^[699,700] und Wirtsproteinen^[701] besteht. Die Produktion und Integration von eDNA unterstützt hierbei die Stabilität des Biofilms in seiner frühen Entwicklungsphase^[696,702]. Der Biofilm bildet eine dreidimensionale Struktur aus mehreren Schichten aus^[680]. Innerhalb dieser Schichten koexistieren *Staphylokokken* mit aeroben Stoffwechsel in den oberen Schichten, langsamen anaeroben Stoffwechsel in den tieferen Schichten sowie fermentierende und tote Bakterien im Inneren des Biofilms^[155,703]. Aus den Bakterien im Inneren des Biofilms können sich sogenannte Schläfer entwickeln, welche ihre Biosynthese auf ein Minimum begrenzen, sodass bakterizide Wirkstoffe keinerlei Angriffspunkt finden^[155]. Solche Schläfer können sehr hohe Konzentrationen von antimikrobiellen Substanzen tolerieren. Sie werden unter antibiotischem Druck vermehrt ausgebildet und sind in der Lage, sich zu einem späteren Zeitpunkt zu reaktivieren^[704,705].

In einem voll entwickelten Biofilm ist die Expression von einigen Toxinen, Superantigenen und immunevasiven Virulenzfaktoren im Vergleich zu planktonischen Bakterien deutlich erhöht^[706-708]. Während der Zunahme der Signalstärke des *quorum sensing* wird die Entwicklung vieler Biofilmkomponenten inhibiert und die Expression von peptidischen Detergenzien und Proteasen erhöht, welche lytisch auf den Biofilm wirken. So nimmt die Stabilität eines stark ausgereiften Biofilmes ab und als Resultat können sich Flocken aus diesem herauslösen und sich im Wirt als Aussaat für neue Infektionen verteilen^[709,710].

2.3.4.2.3 Kleine Kolonien-Variante

Die Ausbildung des Phänotyps der kleinen Kolonien-Variante geht mit einem reprimierten Signal des über *agr* vermittelten *quorum sensing* von *Staphylococcus aureus* einher. Hierbei wird das Signal aktiv durch eine Expression von σ^B ^[711] unterdrückt und gleichzeitig bleibt eine positive Verstärkung durch *sarA* aus^[712]. Fehlt die reprimierende Funktion von σ^B , so kann dieser Phänotyp nicht ausgebildet werden^[541,660,713].

Kleine Kolonien-Varianten können sich sehr gut an andere Zellen anheften, in diese eindringen und für längere Zeit bestehen^[714,715]. Diese Varianten verändern sich morphologisch und haben eine deutlich reduzierte Verdoppelungszeit^[716]: Sie reduzieren ihren Metabolismus^[665] und exprimieren auch eine reduzierte Auswahl und Anzahl an Virulenzfaktoren^[665,717]. Unter den verbleibenden Virulenzfaktoren dominieren hauptsächlich Adhäsine^[717]. Außerdem neigen sie dazu einen Biofilm zu entwickeln oder eine Autolyse einzugehen^[718]. Die reduzierte Anzahl an Virulenzfaktoren zeigt sich unter anderem durch die ausbleibende Expression von

Staphyloxanthin, Leukotoxinen und **Coa** [719]. Auch resultiert die Veränderung oftmals darin, dass das Bakterium nicht mehr alle essenziellen Substanzen selbst herstellen kann [716,719]. Die kleine Kolonien-Variante tritt außergewöhnlich oft bei einem Wirt mit Mukoviszidose auf [720,721]. *In vitro* wird dieser Phänotyp von *Staphylococcus aureus* meistens nicht aufrecht gehalten, sodass die Bakterien zu ihrem planktonischen Phänotyp zurückkehren [659,722]. Diese Rückkehr wird *in vivo* durch die Abwesenheit von Stressoren oder die Nähe zu einer nährstoffreichen Umgebungen ausgelöst und ist oftmals der Verursacher von wiederkehrenden Infektionen [659,723]. Bei langer Exposition kann *Pseudomonas aeruginosa* durch die Sezernierung bestimmter Toxine in einer kompetitiven Infektion *Staphylococcus aureus* dazu zwingen, sich in die kleine Kolonien-Variante zu verwandeln [724].

2.3.4.3 Toxine, Superantigene und Phenol-lösliche Moduline

Staphylococcus aureus verfügt über ein breites Arsenal an giftigen Substanzen, welche eine Bedrohung für den Wirt darstellen und schwere Krankheiten verursachen können. Obwohl selten, können diese Krankheitsprozesse zu lebensbedrohlichen Zuständen wie nekrotischer Faszitis [725], toxischem Schocksyndrom [726] oder akuter Epidermolyse durch Staphylokokkentoxin [727] führen. Die am besten erforschten toxischen Substanzen werden hierbei in Phenol-lösliche Moduline [728,729], Poren-bildende Toxine [730,731] und Superantigene [732,733] unterschieden. Die ersten beiden Kategorien wirken zytotoxisch auf Wirtszellen. Die widerstandsfähigen Superantigene können hingegen innerhalb kürzester Zeit, unabhängig von der Spezifität von T-Zell-Rezeptoren, eine übertriebene Immunreaktion von T-Zellen auslösen, diese für nachfolgende Immunreaktionen erschöpfen und sogar einen Zytokinsturm hervorrufen [732,733]. Außerhalb dieser Kategorien gibt es noch weitere toxische Substanzen, wie beispielsweise **Hlb**, dessen enzymatische Aktivität toxisch auf den Wirt wirkt [734]. Mehrere Toxine in Kombination können ihre Wirkung gegenseitig verstärken [735-737] oder inhibieren [738]. Eine Verstärkung ist auch durch Toxine anderer Bakterienarten möglich [739]. Viele dieser Giftstoffe werden von dem Bakterium in Form von extrazellulären Vesikeln abgesondert. Diese tragen in Abhängigkeit von der Temperatur wesentlich zu deren Effizienz bei [740,741].

Phenol-lösliche Moduline sind amphipathische, toxische Peptide, deren Kontakt mit Immunzellen durch Priming und Rekrutierung von neutrophilen Zellen sowie Ausschüttung von Zytokinen beantwortet wird [728,742]. Ihre zerstörerische Wirkung ist hierbei nicht nur auf den Wirt beschränkt, sondern wird auch im Konkurrenzkampf mit anderen Bakterien eingesetzt [743]. Zusätzlich wirken diese Peptide bei der Strukturierung und Auflösung des Biofilms mit [744]. Sie können die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen fördern [745], können eine Degranulation von Mastzellen auslösen [746] und manipulieren das Verhalten von Immunzellen [747,748].

Unter den Poren-bildendenden Toxinen wird **Hla** in den häufigsten Fällen von dem Pathogen exprimiert. Das Toxin besteht aus sieben gleichgroßen Untereinheiten und ist die Hauptursache für die Toxizität von *Staphylococcus aureus*^[749,750]. In niedriger Konzentration kann es hämolytisch wirken und zerstört B- und T-Zellen sowie Monozyten durch Aktivierung der Apoptose^[751]. In einer hohen Konzentration interagiert es wahllos mit der Lipiddoppelschicht von Zellen und verursacht einen unkontrollierten Austausch von Calciumionen zwischen den Zellen. Dadurch werden die Zellen in großer Menge zerstört, was zu einer Nekrose des assoziierten Gewebes führt^[752]. Auch kann es in manchen Fällen als Superantigen wirken und bei einer Lungenentzündung eine Überreaktion der T-Zellen oder eine Aktivierung von Inflammasomen mit assoziiertem Kollateralschaden verursachen^[753,754]. Ebenso reduziert es die antimikrobielle Aktivität von Thrombozyten^[755], kann eine Adhäsion der Zellmatrix innerhalb des Epithels der Lunge stören^[756,757] und verursacht eine starke Ausschüttung von entzündungsfördernden Zytokinen durch neutrophile Zellen^[755]. Wirkt das Toxin auf murine Mastzellen, wird eine nachfolgende Invasion durch *Staphylococcus aureus* vereinfacht und ein intrazelluläres Überleben des Pathogens innerhalb der Zelle gewährleistet^[758].

Speziell um die immunaktiven Zellen des Wirtes aktiv zu bekämpfen, besitzt *Staphylococcus aureus* bis zu fünf bekannte Leukotoxine, welche darauf spezialisiert sind, Leukozyten zu vernichten (Abbildung 6 C). Zu diesen Toxinen zählen das **HlgAB**, **HlgCB**, **LukAB**, **LukED** und das **PVL**^[731]. Diese Toxine bestehen aus zwei Untereinheiten, von denen die eine dem Protein die Spezifität gegenüber den Wirtszellen verleiht und die andere die Bindung an deren Plasmamembran ermöglicht^[759,760]. Sie werden vom Erreger sezerniert und binden mit Ausnahme von **LukAB** als Monomer an eine Wirtszelle. Nach erstem Kontakt werden abwechselnd die beiden Untereinheiten rekrutiert, bis ein oktameres β -Fass entsteht, welches die Zellmembran der Wirtszelle durchdringt^[759,761-763]. Bildet sich eine ausreichende Anzahl dieser Fässer in der Membran, wird die Homöostase der Zelle unterbrochen, was letztendlich zu ihrer Zerstörung führt^[731,764]. Bei **LukAB** bildet sich ein Heterodimer, bevor eine Bindung mit der Wirtszelle erfolgt^[765]. Die Spezifität der Leukotoxine ist hierbei hauptsächlich auf Chemokin- und Komplementrezeptoren ausgerichtet, mit denen sie sowohl Erythrozyten, als auch bestimmte Populationen von Leukozyten zerstören können^[731,766]. Eine besondere Eigenschaft von **LukAB** ist es, eine neutrophile Zelle, welche das Pathogen bereits verschlungen hat, von innen heraus zu zerstören^[767]. Das **PVL** ist innerhalb dieser Gruppe das Toxin, welches vermehrt mit starker Virulenz und einem schweren Krankheitsverlauf bei einer Infektion durch *Staphylococcus aureus* assoziiert wird^[768,769]. Es bildet Poren in Leukozyten und den Mitochondrien der Wirtszellen aus^[770] und zerstört sie mit einer solchen Effizienz, dass eine gefährliche Nekrose im Gewebe erfolgt^[570]. Die Toxine haben neben den leukozidischen Effekten noch weitere Möglichkeiten das Immunsystem zu manipulieren^[731].

So können sie beispielsweise die neutrophilen Granulozyten aktivieren, damit diese eine bessere Chemotaxis aufweisen, um diese dann direkt in eine tödliche Falle aus Giftstoffen zu locken [771,772]. Ebenso sind sie in der Lage das Inflammasom in Immunzellen, Epithelzellen und Osteoblasten zu aktivieren und können dadurch eine Entzündungsreaktion, entfernt vom eigentlichen Infektionsort, auslösen [773-776].

Das toxische Schocksyndrom betrifft zu 90,0 % Frauen, da die *Staphylokokken* bei dieser Vergiftung überwiegend über Menstruationsartikel in den Körper gelangen. In diesen Artikeln können sich die Pathogene vermehren und das Superantigen **TSST-1** produzieren [777,778]. Dieses Protein hat in hohen Konzentration einen zytotoxischen Effekt auf Zellen und sorgt in niedrigen Konzentration für eine Leckage in Endothelzellen [778,779]. Besonders gefährlich ist allerdings, dass es als Superantigen bei Leukozyten zu einer starken Immunreaktion führt, welche einen Zytokinsturm erzeugen kann. Die Produktion des Toxins wird durch einen Mangel an Magnesiumionen deutlich erhöht [778]. Darüber hinaus sind ein neutraler pH-Wert und erhöhte Sauerstoffkonzentrationen erforderlich. Diese speziellen Bedingungen sind der Grund dafür, dass dieses Toxin bei einer Infektion in anderen Körperbereichen nicht exprimiert wird [778]. Symptome dieses Syndroms reichen von Fieber und Hypotonie bis hin zu einem diffusen makulösen Exanthem und bleibt es unbehandelt, kann es zu einem multiplen Organversagen mit Todesfolge führen [780].

Akute Epidermolysen durch ein Staphylokokkentoxin ist eine Krankheit, die überwiegend bei Neugeborenen und Kinder auftreten kann [781,782]. Die Superantigene **ETA** und **ETB** sind zusätzlich Serinproteasen, welche gezielt das Protein **DSG1** spalten. Dieses Protein ist das Haftprotein, welches in der Epidermis das *Stratum granulosum* und *Stratum spinosum* miteinander verbindet [780,783]. Ohne diese Verbindung kommt es zu einer Akantholyse, wodurch sich die Keratinozyten in der oberen Schicht der Epidermis ablösen [784]. Die Krankheit ist gekennzeichnet durch Symptome wie Fieber, Exantheme, nässender Hautauschlag sowie eine Rachen- oder Mittelohrentzündung. Ebenso bilden sich leicht platzende Blasen auf der Haut. Darüber hinaus können als Folge der Hautschäden Sekundärinfektionen erfolgen, welche den Körper zusätzlich belasten und zu einer Sepsis oder Lungenentzündung führen können [780]. Neugeborene und Kinder haben eine Mortalitätsrate von 3,6 bis 11,0%. Diese liegt bei Erwachsenen zwischen 40,0 bis 63,0 % [782].

Es gibt noch weitere giftige Substanzen, die für den Wirt schädlich sein können. Wie bei der Besiedlung und der Infektion spielen für die Schwere der Vergiftung Vorerkrankungen und Alter des Wirts eine entscheidende Rolle [412,785].

2.3.4.4 Immunevasion

Damit sich *Staphylococcus aureus* im Wirtsorganismus etablieren kann, muss er sich gegen das Immunsystem des Wirtes schützen^[51]. Neben den Leukotoxinen besitzt er zu diesem Zweck eine Vielzahl weiterer Möglichkeiten, sich vor ungewollter Aufmerksamkeit zu verbergen und in den Gegenangriff überzugehen^[2]. Diese Gesamtheit an Virulenzfaktoren ist entscheidend dafür, dass sich das Bakterium im Verlauf einer Infektion und auch darüber hinaus im Wirt behaupten kann^[9]. Sowohl die Anzahl dieser Proteine als auch die Art und Weise, wie diese die wirtseigenen Mechanismen manipulieren können, um dem Immunsystem einen Schritt voraus zu sein, zeigen, wie sehr sich das Pathogen auf den Menschen spezialisiert hat und welche Gefahr er darstellt.

2.3.4.4.1 Verweigerung von Opsonisierung und Phagozytose

Als Grundausstattung besitzen Gram-positive Bakterien eine Peptidoglycanschicht, welche die Wirksamkeit von membranangreifenden Komplexen verhindert^[786]. Zusätzlich werden bis zu 80,0 % aller Bakterien der Gattung *Staphylococcus aureus* von einer Kapsel aus Polysacchariden umhüllt, um eine Opsonisierung zu verhindern. Bei den klinisch relevanten Varianten des Bakteriums werden in dieser Kapsel bevorzugt die Kapselpolysaccharide CP5 und CP8 nachgewiesen (Abbildung 6 F)^[787,788].

Coa ist ein sehr starker Virulenzfaktor mit dessen Hilfe das Bakterium der Aufmerksamkeit von Phagozyten entgehen kann^[617]. Das Protein kann mit menschlichem Prothrombin assoziieren, um das enzymatisch aktive Staphylothrombin zu bilden. Das durch **Coa** aktivierte Thrombin spaltet den Gerinnungsfaktor Fibrinogen in sechs Fibrin-Monomere auf. Diese Monomere können mit sich selbst und anderen Monomeren polymerisieren und ein Blutgerinnsel erzeugen^[559]. Normalerweise ist die Bildung dieser Blutgerinnsel ein natürlicher Prozess der Blutgerinnung, um Blutungen zu stoppen^[558]. **Coa** ermöglicht *Staphylococcus aureus*, diesen Prozess unabhängig von einer Verletzung auszulösen^[2]. Mit der R-Domäne des Proteins und Fibrin-bindenden Adhäsinen kann der Erreger aus diesen Gerinnsel eine Kapsel aufbauen, welche die Bakterien umhüllt und vor der Phagozytose durch Immunzellen schützt (Abbildung 6 A)^[789]. In dieser Funktion hat die Domäne eine sehr hohe Effektivität, da gezeigt wurde, dass die Belastung des Krankheitserregers im Blut stark reduziert wird, wenn diese R-Domäne durch einen Antikörper blockiert wird^[559]. Diese Agglutination von Blutgerinnsel kann so weit gehen, dass sich ein Thrombus bildet, welcher zu einer Embolie und dadurch zu einer lebensgefährlichen Situation führen kann^[790]. Während der Abszessbildung ist **Coa** auch an der Herstellung der großen Pseudokapsel aus Fibrin, in welcher die Bakterienpopulation heranwächst, involviert^[626]. In dieser Funktion wird **Coa** vor allem durch das Oberflächenprotein **CifA** unterstützt, welches sowohl Fibrin, als auch Fibrinogen^[791-793] an der Oberfläche von *Staphylococcus aureus* bindet. Das gebundene Fibrin bietet so neues Substrat

für das Staphylothrombin und unterstützt dadurch die Vergrößerung und die Integrität der fibrillären Kapsel und Pseudokapsel^[794]. Ergänzend hierzu bildet **vWbp** eine weitreichendere schützende Matrix aus, welche allerdings eine geringere defensive Wirkung als die Kapsel selbst hat^[617]. **FnBPA** und **FnBPB** können ebenfalls ihren Beitrag zum Aufbau der Kapsel und Pseudokapsel leisten, indem sie Thrombozyten binden^[581]. **Emp** lagert sich in die von *Staphylococcus aureus* erzeugte Kapsel ein, zeigt dort allerdings keine nachweisbare Funktion^[617].

Insbesondere zur Abwehr gegen die Antikörper und das Komplementsystem des Wirtes verfügen viele Stämme von *Staphylococcus aureus* über die Virulenzfaktoren **Cna**^[795], **C4BP**^[796], **CIfA**^[566], **Eap**^[797], **Ecb**^[798], **Efb**^[799], **IsdH**^[800], **Sbi**^[801,802], **SdrE**^[803,804], **SpA**^[802,805], **SSL7**^[806,807] und **SSL10**^[808,809] (Abbildung 6 B). Diese Proteine werden in der Zellwand der Bakterien angereichert oder sezerniert. Sie können sowohl Antikörper als auch einige Komplementfaktoren blockieren, neutralisieren oder deren Zerstörung fördern. Das Protein **SpA** wird von fast jeden Bakterienstamm der Spezies exprimiert. Die Neutralisierung der Immunglobuline ist nicht auf Menschen beschränkt, sondern beeinflusst ebenso Antikörper von anderen Säugetieren, wie in Tabelle 4 dargestellt, mit unterschiedlicher Effektivität^[810,811]. Zusätzlich ist **SpA** sehr immunogen, sodass B-Zellen bevorzugt Antikörper gegen das Protein ausbilden und dafür andere wichtige Proteine als potentielle Ziele für Antikörper vernachlässigt werden^[304]. Der Vorläufer von **SpA** verfügt über ein YSIRK-GXXS-Signalpeptid. Diese Peptidsequenz vermittelt eine erhöhte Sekretion des Proteins durch die Septalmembran in die Querwand eines replizierenden Bakteriums, sodass die Bakterienzellwand bei ihrer Erzeugung bereits mit dem Protein benetzt ist und sofort mit potentiellen Liganden interagieren kann^[812,813]. Zur Ergänzung des Schutzes gegenüber Antikörpern und Komplementfaktoren kann das Bakterium unter anderem verschiedene Proteasen sezernieren, um diese Proteine zu zerstören^[814,815]. Interessanterweise kann das wirtseigene Plasmin durch das Protein Staphylokinase rekrutiert und manipuliert werden, um opsonisierende Substanzen, Komplementfaktoren und AmP zu zerstören^[816,817]. Neben der Inaktivierung von Antikörpern kann das Komplementsystem auch außer Kraft gesetzt werden, indem die Funktion der **C3**-Konvertase direkt gehemmt wird. Dies wird durch den **SCIN** erreicht, der das Enzym durch kompetitive Hemmung blockiert (Abbildung 6 D). Durch die Deaktivierung des Enzyms wird die Spaltung der Komplementkomponente **C3** verhindert, wodurch die Aktivierung der Komplementkaskade und somit die Opsonisierung des Krankheitserregers, ausbleibt^[818,819].

Speziell *Staphylokokken* mit dem Phänotyp der kleinen Kolonien-Variante werden deutlich seltener von Phagozyten aufgenommen und vernichtet^[820]. Biofilme besitzen einen größeren Schutz gegenüber der Phagozytose, welcher unter anderem durch die Akkumulation des polysaccharidischen interzellulären Adhäsins (PIA)^[821] und von Poly-N-acetyl- β -1,6-

Glucosamin^[275] erzeugt wird^[822]. Auch Abszesse erschweren es phagozytischen Zellen die Bakterien aufzunehmen. Durch die größere Kontaktfläche des Abszesses gegenüber Leukozyten findet aber ein reger Austausch von Toxinen zwischen Bakterien und Zellen statt^[671,674].

Tabelle 4: Die Affinität des von *Staphylococcus aureus* exprimierten **SpA** gegenüber verschiedener Klassen von Immunglobulinen aus unterschiedlichen Spezies. Die Daten wurden aus der Publikation von Richman *et al.* (1982)^[823] entnommen und mit Informationen von M. B. Frank (2001)^[811], Mark Page und Robin Thorpe (1996)^[824] ergänzt.

Affinität von SpA			
humanes Immunglobulin		sonstige IgG	
IgA	normale Affinität	Hase	starke Affinität
IgD	normale Affinität	Hamster	normale Affinität
IgE	normale Affinität	Maus IgG ₁	normale Affinität
IgG ₁	starke Affinität	Maus IgG _{2a}	starke Affinität
IgG ₂	starke Affinität	Maus IgG _{2b}	starke Affinität
IgG ₃	keine Affinität	Maus IgG ₃	normale Affinität
IgG ₄	starke Affinität	Meerschweinchen	starke Affinität
IgM	starke Affinität	Rind	normale Affinität
Fab-Region	normale Affinität	Pferd	normale Affinität
F(ab) ₂ -Region	normale Affinität	Ratte	starke Affinität
scFv (<i>single chain variable fragment</i>)	normale Affinität	Schwein	starke Affinität
Fc-Region	normale Affinität	Huhn	keine Affinität
leichte Kette κ-Isotyp	keine Affinität	Ziege	keine Affinität
leichte Kette λ-Isotyp	keine Affinität		

2.3.4.4.2 Invasion von Wirtszellen

Das Pathogen hat die Möglichkeit in menschliche Zellen einzudringen und diese, geschützt vor dem Immunsystem, zu infizieren^[825,826]. Die Invasion in die Wirtszellen wird hauptsächlich von dem Phänotyp der kleinen Kolonien-Variante ausgeführt^[827,828]. Durch diese Eigenschaft können die Bakterien auch in Phagozyten wie neutrophilen Zellen^[829], Makrophagen^[830] und Kupffer-Zellen^[831] eindringen. Auf diese Art und Weise kann das Pathogen beispielsweise die neutrophile Zelle als Schutzschild und Transporter benutzen und sich sogar innerhalb der Zelle vermehren^[829,830]. Eine solche Zellinvasion gelingt unter anderem durch **FnBPA** und **FnBPB**, die in der Lage sind, die Konformation von Fibronectin so zu verändern, dass eine RDG-

Sequenz präsentiert wird [832]. Diese Sequenz wird von dem α -5- β -1 Rezeptor erkannt, welcher eine Endozytose in die Wirtszelle ermöglicht [833]. Weitere Proteine wie **Eap** [834] und **Atl** [835] unterstützen diesen Prozess, wobei **Atl** hauptsächlich in der Invasion von phagozytisch nicht-aktiven Zellen involviert ist [835]. Bei der Invasion von Epithelzellen innerhalb der Lunge dringt das Bakterium durch die Interaktion von **Tet38**, einer Effluxpumpe, mit dem **CD36** an den Oberflächen von Epithelzellen in das Innere der Zelle ein [836,837].

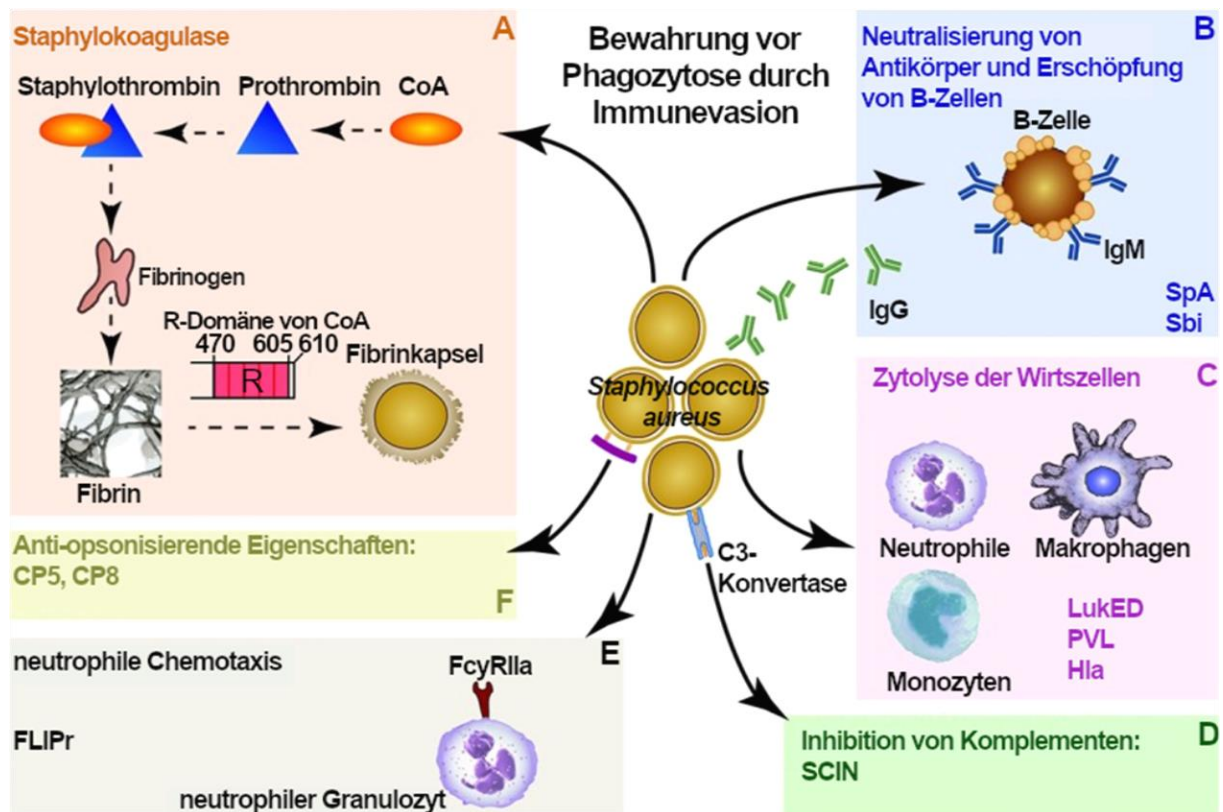


Abbildung 6: *Staphylococcus aureus* besitzt ein großes Spektrum an direkten und indirekten Mechanismen, um eine Opsonisierung und das Wirken einer Immunantwort zu verhindern. Diese Schutzmechanismen sind für das Überleben des Bakteriums im Wirtskörper essenziell. Diese Illustration wurde aus der Publikation von Pozzi *et al.* (2016) [559] übernommen und übersetzt. Die genannte Publikation ist über eine internationale, nicht-kommerzielle Namensnennung-Lizenz 4.0 mit der Weitergabe unter gleichen Bedingungen von *Creative Commons* (CC BY-NC-SA 4.0) geschützt [6].

Durch die Endozytose befindet sich das Bakterium in einer nährstoffreichen Umgebung und ist durch die Wirtszelle vor dem Immunsystem und antibakteriellen Substanzen abgeschirmt [838,839]. Innerhalb einer Zelle sind *Staphylokokken* ebenso vor der Auslöschung durch die Wirtsabwehr bewahrt. Sie können die Autophagie beeinflussen [840,841], sodass sie nicht von der Wirtszelle vernichtet werden und diese zu einem späteren Zeitpunkt verlassen um den Wirt erneut befallen zu können [723,842].

2.3.4.4.3 Überleben im Phagolysosom

Falls das Bakterium phagozytiert werden sollte, besitzt es eine Vielzahl von Werkzeugen, um sich vor den AmPn, Lysozymen und reaktiven Sauerstoffspezies, welche neutrophile Zellen und Makrophagen absondern, zu schützen [9,152,843]. Direkt nach der Phagozytose wird das Bakterium veränderten Bedingungen ausgesetzt, worauf es mit einer Anpassung seiner Genexpression antwortet [844-846]. Es erhöht die Expression von Stressantworten und Enzymen zur Umsetzung verschiedenster Substrate. Zusätzlich schränkt es seine Zellteilung ein [847] und wechselt auf einen anaeroben Stoffwechsel [848]. So kann es Nährstoffmangel und oxidative Schäden besser kompensieren. Kurze Zeit danach wird die Expression von Adhäsinen und Toxinen gesteigert [152,847]. Bei Kontakt mit toxischen Konzentrationen von Kupfer verhindert das Bakterium den Transport des toxischen Elements in sein Lumen [849]. Zu den Stressantworten des Bakteriums zählt die Expression von **SodA** und **SodM**, welche Sauerstoffradikale in Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff umsetzen und gleichzeitig Mangan als Nährstoff sichern [850,851]. Für das Überleben im Phagolysosom ist Mangan unerlässlich, unter anderem auch, weil die beiden Dismutasen dieses Element als Kofaktor benötigen [852,853]. Deshalb ist es für das Bakterium wichtig, essenzielle Nährstoffe wie Eisen, Mangan und Zink durch die Expression von Transportern und Metallophoren zu erhalten [854-857]. Zu den auf die Stressantwort exprimierten Enzymen zählen unter anderem **Aur** und eine große Zahl weiterer Proteasen, welche durch ihre proteolytische Aktivität Schutz gegenüber antimikrobiellen Proteinen und Peptiden vermitteln [858,859]. Auf den toxischen Effekt von ungesättigten Fettsäuren im Phagolysosom reagiert *Staphylococcus aureus* mit einer erhöhten und veränderten Expression von Zellmembran-assoziierten Proteinen und verstärkt seinen Metabolismus [860,861]. Über **PerR** und **MsaB** werden **AhpC**, **KatA** und Staphyloxanthin aktiviert [862]. Die beiden Enzyme spalten das gefährliche Wasserstoffperoxid und andere Peroxide zu Wasser und Alkohol, beziehungsweise zu molekularem Sauerstoff [863,864]. Staphyloxanthin ist ein goldenes Pigment und ein starkes Antioxidans, welches reaktive Sauerstoffspezies inaktiviert [865,866]. Auch sezerniert das Bakterium Liponsäure, welche ebenfalls als Antioxidans wirksam ist [867]. Durch insgesamt fünf regulatorische Elemente wird die Aktivierung von **Hmp** gesteuert [868]. Dieses Protein vermittelt die Resistenz von *Staphylococcus aureus* gegenüber Stickoxiden und reaktiven Stickstoffspezies und kann durch nitrosativen Stress verursachte Schäden reparieren [869,870]. Das Bakterium wechselt bei Kontakt zu Stickstoffmonoxid auf einen fermentativen Stoffwechsel. So kann es die Toxizität dieser Chemikalie umgehen [868,871]. Zudem verfügt *Staphylococcus aureus* selbst über die Möglichkeit, Stickoxide zu produzieren. Zum einen setzt das die phagozytische Zelle einem nitrosativem Stress aus, zum anderen nutzt das Bakterium die damit zusammenhängenden Stoffwechselwege, um den eigenen nitrosativen Stress und die Effektivität von AmPn zu reduzieren [872].

Unter der Einwirkung von hypochloriger Säure reduziert *Staphylococcus aureus* seinen Durchmesser^[873] und exprimiert vermehrt **MsrA1** und **MsrB**, die oxidativem Stress entgegenwirken^[874,875].

Wirtsenzyme können auch durch die Sezernierung von Virulenzfaktoren direkt beeinflusst werden. **Eap**^[602] und **SSL5**^[808] können als Proteaseinhibitoren die Aktivität der neutrophilen Elastase und weiterer Enzyme einschränken. Durch das Protein **SPIN** kann *Staphylococcus aureus* die Funktion der **MPO** blockieren, indem es die Aufnahme von Wasserstoffperoxid verhindert^[876]. Aufgrund der O-Acetylierung seiner Peptidoglycane bietet die Zellwand des Bakteriums keine Angriffsfläche für die proteolytische Aktivität des Lysozyms^[877]. Die Bildung der Kapsel aus Polysacchariden wird nach der Phagozytose verstärkt. Daher ist anzunehmen, dass sie ebenfalls eine schützende Wirkung besitzen^[152]. **Hla** inhibiert, zusätzlich zu seinem toxischen Potential, die Lokalisierung von makrophagischen Mitochondrien, sodass diese die zur Tötung des Bakteriums notwendige Caspase-1 nicht ausreichend konzentrieren können^[878,879].

Darüber hinaus besitzt das Bakterium noch weitere Proteine, um sich vor oxidativen Stress oder nitrosativem Stress^[871] zu schützen, durch Oxidation^[880,881] verursachte Schäden zu reparieren^[882] und den pH-Wert des Phagolysosoms anzuheben^[883]. Letztendlich induziert der Stress die Wandlung des Bakteriums zum Phänotyp der kleine Kolonien-Variante^[669].

2.3.4.4 Direkte Manipulation von Immunzellen

Staphylococcus aureus besitzt eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, welche es ihm ermöglicht, Wirtszellen zu entschärfen, deren eigene Waffen gegen sie selbst zu verwenden oder sie so zu manipulieren, dass es die Überlebenschance des Pathogens verbessert. So verfügt es beispielsweise über Virulenzfaktoren, um fibrilläre Fallen zu zersetzen. Sie können diese in eine Substanz umwandeln, welches die Apoptose von Makrophagen initiiert^[884,885]. Auch kann es die Ausbildung dieser Fallen direkt hemmen^[599,886]. Ebenso besitzt es die Möglichkeit, Signalkaskaden von Makrophagen so zu manipulieren^[887], dass diese ihre Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen^[888] sowie reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies^[889] reduzieren. Die Signalübertragung von bestimmten *PRR* in Keratinozyten und Phagozyten wird von dem Bakterium durch die Expression von **SSL3**^[890] und **TirS**^[891] blockiert. Eine Migration und Freisetzung von neutrophilen Zellen kann durch die Sezernierung von **CHIPS**^[892,893], **FLIPr**^[894], **SeIX**^[895] und **SSL5**^[896] verhindert werden. Durch das Protein **FLIPr** und ähnliche Proteine kann der Erreger bestimmte *Fcγ*-Rezeptoren auf der Oberfläche von Leukozyten deaktivieren (Abbildung 6 E). Ohne diese Rezeptoren können diese Immunzellen keine Antikörper binden. Somit wird die Aktivierung der Effektorfunktionen verhindert. Betroffene Immunzellen sind sozusagen blind für die Antikörper-basierte Signalübertragung

und stellen für *Staphylococcus aureus* keine Gefahr mehr dar^[897]. Die Phenol-löslichen Moduline können die Ausschüttung von Zytokinen von Immunzellen so manipulieren, dass die Wirtsabwehr eingeschränkt wird und die Bakterien nicht mehr effektiv bekämpft werden können^[745].

Bei der direkten Manipulation von T-Lymphozyten durch Superantigene wird die Produktion von Antikörpern unterdrückt, indem diese eine Aktivierung der B-Zellen durch T-Helferzellen verhindern. Bei dem Kontakt der T-Zell-Rezeptoren mit den Superantigenen werden betroffene T-Zellen unabhängig von der Präsenz eines Antigens aktiviert. Werden die Zellen auf diese Art und Weise aktiviert, stehen sie nicht mehr für eine Interaktion mit den B-Zellen zur Verfügung^[733,898]. Direkt und indirekt können T-Lymphozyten auch durch die Sezernierung von Modulatoren pazifiziert werden. Das **Eap**, zum Beispiel, senkt die Verdoppelungszeit von T-Lymphozyten, vermindert deren Fähigkeit auf ein Antigen zu reagieren und verstärkt deren Polarisierung zu einer T_{H2}-Zelle^[603]. Die Virulenzfaktoren **SpA** und **PBP2a** verursachen zusätzlich zur Polarisierung von T-Lymphozyten zu T_{H2}-Zellen auch eine Polarisierung von T-Lymphozyten zu regulatorischen T-Lymphozyten. T_{H2}-Zellen sind bei der Bekämpfung von *Staphylococcus aureus* ineffektiv und aus den polarisierten Zellen entwickeln sich Gedächtniszellen. Diese werden bei einer Sekundärantwort bevorzugt aktiviert werden und verhindern, dass ein effektiver, durch T-Zellen vermittelter Schutz gegen *Staphylococcus aureus* ausgebildet werden kann^[899]. **SpA** ist auch in der Lage, als Superantigen Oberflächenimmunglobuline von B-Zellen zu blockieren, was die Antikörperproduktion verhindert und die Apoptose dieser Zellen auslöst^[900-902]. In der Wirkung als Superantigen kann das Protein ebenso in der Lunge zur starken Freisetzung von **TNFR1** und zu damit assoziierten Entzündungen führen^[903]. Bestimmte Peptidoglycane auf der Oberfläche von *Staphylococcus aureus* aktivieren **PRR**, was zu einer starken Freisetzung von **IL-10** führt. Dieses Interleukin schwächt die Effizienz von T_{H1}- und T_{H17}-Zellen ab^[904,905]. Weitere Virulenzfaktoren fördern die Differenzierung von Lymphozyten zu regulatorischen B- und T-Lymphozyten, welche Signalstoffe aussenden, um die Aktivität von anderen Lymphozyten zu reduzieren^[906-908]. **Hla** kann die Ausbildung von gewebespezifischen T-Zellen während einer Haut oder Weichgewebeeinfektion verhindern^[909]. Mukosal-assoziierte invariante T-Zellen sind besonders gegenüber dem Superantigen **SEB** anfällig, welches eine extrem starke Überreaktion mit darauffolgender Erschöpfung und Funktionslosigkeit der betroffenen Zellen verursacht^[910,911].

Eine intrazelluläre kleine Kolonien-Variante kann Mitochondrien von Wirtszellen dazu beeinflussen, ihre Glykolyse und die Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies zu verstärken. Der Schaden, welcher dadurch verursacht wird, ist groß genug um die Zelle, nicht

aber das Bakterium zu zerstören^[912,913]. Ebenso sind manche Bakterienstämme des Pathogens in der Lage, gezielt die Apoptose von neutrophilen Zellen auszulösen^[153,377].

Während einer längeren Infektion ist *Staphylococcus aureus* im Phänotyp eines Biofilms in der Lage, Makrophagen in ihre M2-Form zu polarisieren^[914,915]. Die Phagozytoseaktivität und das antimikrobielle Potential dieser Makrophagen sind im Vergleich zu einer durch T_H1-Zellen aktivierten M1-Makrophage deutlich reduziert^[916]. Zusätzlich werden die Zellen durch Mediatoren von dem Bakterium dazu aufgefordert, entzündungshemmende Zytokine auszuschütten^[917,918].

Es gibt noch viele weitere Virulenzfaktoren, welche im Repertoire von *Staphylococcus aureus* enthalten sind, um die Effizienz von Leukozyten einzuschränken^[919,920].

2.3.4.4 Resistenz gegen antimikrobielle Substanzen

Mit der Herstellung des ersten Antibiotikums Penicillin stand endlich eine Substanz, die bakterielle Infektionen effektiv bekämpfen konnte, zur Verfügung^[21,921]. Während dieses Antibiotikum 1941 noch gegen die meisten Stämme von *Staphylococcus aureus* wirksam war, zeigten die ersten Bakterien Resistenzmechanismen, die das Antibiotikum bereits drei Jahre später wirkungslos machten^[23,922]. Penicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (PRSA) wurde bereits 1948 in britischen Krankenhäusern bei 60,0 % aller mit dem Bakterium assoziierten Isolate nachgewiesen^[923] und breitete sich Anfang der 1950er Jahre als Pandemie weltweit aus^[924]. Mit der Entwicklung der semi-synthetischen Antibiotika Methicillin und Oxacillin konnten ab 1959 resistente *Staphylokokken* wieder mit großer Effizienz behandelt werden^[925] bis innerhalb eines Jahrzehnts erneut resistente Bakterienstämme weltweit in Erscheinung traten^[926-928].

Penicillin und Methicillin gehören zu den β -Lactam-Antibiotika. Ihre Wirksamkeit zeichnet sich dadurch aus, dass Enzyme wie Peptidoglycan-Transpeptidasen, die am Aufbau der bakteriellen Zellwand beteiligt sind, gehemmt werden. Ohne die Funktion dieser Enzyme kann die bakterielle Zellmembran den Kräften, die bei Zellteilung und -aufbruch auf sie einwirken, nicht standhalten^[929-931]. Seit dem Aufkommen des Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* werden die Bakterienstämme in MSSA und MRSA unterteilt. Während eine Resistenz gegen Ampicillin und Penicillin bei Methicillin-empfindlichen Bakterien nicht ungewöhnlich ist, haben Methicillin-resistente Bakterien die Neigung, Resistenzen gegen eine Vielzahl von Antibiotika^[932,933] und toxischen Substanzen wie beispielsweise Cadmium und Quecksilber^[934] zu entwickeln. Das Spektrum der Resistenzen reichte in einigen Fällen sogar so weit, dass keine wirksamen Antibiotika zur Behandlung einer schweren Infektion durch *Staphylococcus aureus* zur Verfügung standen^[935-937]. In den von Lyon *et al.* (1987)^[933] und Guo *et al.* (2020)^[938] publizierten Forschungsüberblicken sind Resistenzen von MRSA

gegenüber 29 Antibiotika sowie organischen und anorganischen Giftstoffen aufgelistet. Selbst moderne Antibiotika wie Daptomycin^[939], Linezolid^[940] und Vancomycin^[941,942], die als sehr effektiv gegen *Staphylokokken* gelten, bringen mit der Zeit resistente Bakterienstämme hervor. Diese werden mittlerweile in Daptomycin-resistenter (DRSA)^[943], Linezolid-resistenter (LRSA)^[944], Vancomycin-intermediärer (VISA)^[941,942] und Vancomycin-resistenter *Staphylococcus aureus* (VRSA)^[941] kategorisiert. Eine Zeitlinie, welche die Entwicklung von *Staphylokokken*-assoziierten Resistenzen bis hin zu VRSA zeigt, ist in Abbildung 7 dargestellt.

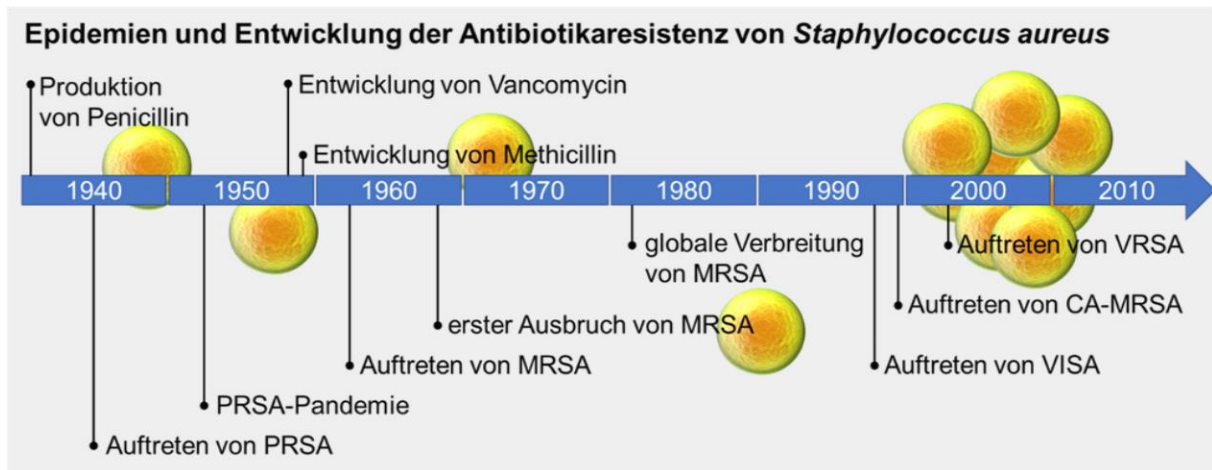


Abbildung 7: Unterhalb der Zeitlinie werden chronologisch alle Meilensteine in der Resistenzentwicklung von *Staphylococcus aureus* bis zu der Erscheinung von VRSA dargestellt. Über die Zeitlinie ist die Entwicklung der korrespondierenden Antibiotika gezeigt. Diese Illustration wurde entsprechend der Publikation von McGuiness *et al.* (2017)^[945] nachgebildet. Die genannte Publikation ist über eine internationale nicht-kommerzielle Namensnennung-Lizenz 4.0 für die Weitergabe unter gleichen Bedingungen von Creative Commons (CC BY-NC 4.0) geschützt^[d].

Die genetischen Mutationen, welche zu einer Resistenz führen, treten mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-6} bis 10^{-8} ^[946] auf und die zusammenhängenden Informationen können im Chromosom oder auf einem Plasmid vertreten sein^[22,933,947]. Ein großer Teil der genetischen Information für Resistenzen befindet sich aber vorzugsweise auf Plasmiden. Diese sind für das Bakterium nicht überlebenswichtig, weil sie regelmäßig ausgestoßen werden und daher drastischere Änderungen in ihrer Sequenz ohne Beeinträchtigung der Fitness tolerieren können^[948,949]. Ein Bakterium kann mehrere Plasmide, die eine Resistenz ermöglichen, aufnehmen. Allerdings können bestimmte Plasmide nicht koexistieren, weshalb sie in 13 Inkompatibilitätsgruppen eingeteilt werden^[950,951]. Verfügen die Plasmide über eine Integrationssequenz, können sie ihre genetische Information zum Teil oder komplett im Chromosom einfügen^[952,953]. Ist das Plasmid ein Vektor für ein Transposon oder eine Transposon-Gruppierung, kann das genetische Material auf andere Plasmide oder in das Chromosom übertragen werden^[954,955]. Durch diese Übertragung können mehrere Resistenzen gegen antimikrobielle Substanzen in das Chromosom oder auf ein Plasmid

gelangen^[952,954]. Die Informationen der Resistenzgene können durch Bakteriophagen-assoziierte Transduktion^[956], natürliche Transformation^[957,958], und durch Plasmid-^[957,959] oder Transposon-vermittelte Konjugation^[956] mit anderen *Staphylokokken* und Bakterienarten^[960] ausgetauscht werden.

Um eine Resistenz gegen einen antibiotischen Wirkstoff zu schaffen, entsteht entweder ein Mechanismus, der einen Efflux der antibakteriellen Substanz^[961,962] ermöglicht, eine Diffusion des Wirkstoffes in das Zytosol erschwert^[963] oder ihn zerstört^[964]. Auch kann das Bakterium seine eigenen Proteine verändern, damit der Wirkstoff seinen Interaktionspartner nicht mehr binden kann^[965]. Die anfängliche Resistenz gegen Penicillin wurde durch die Expression der β -Lactamase vermittelt, welches diese Klasse von Antibiotika zerstört^[964]. Unter anderem werden dieses Enzym und andere Resistenzfaktoren über extrazellulären Vesikel sezerniert, sodass ihre Wirksamkeit großflächig ausgebreitet wird^[966]. Diese Vesikel tragen wesentlich zur Resistenz des Bakteriums bei und können *in vitro* auch die Resistenz von anderen Bakterien stark erhöhen^[967,968]. Aufgrund seiner semi-synthetischen Natur kann Methicillin nicht von der β -Lactamase zerstört werden^[969]. Stattdessen modifizieren Methicillin-resistente *Staphylokokken* als Reaktion auf das Antibiotikum die Zielproteine des Wirkstoffes. Sie entwickeln auch neue Enzyme für den Prozess der Zellwandsynthese, und so kann diese dann nicht mehr durch das β -Lactam gestört werden^[970-972]. Solche Veränderungen sorgen dafür, dass alle Antibiotika, die eine Hemmung durch β -Lactam erzeugen, nicht mehr wirksam sind.

Das Glykopeptid Vancomycin bindet an zwei aufeinanderfolgenden Aminosäuren innerhalb der Peptidstruktur von Lipid II. Dadurch wird der Aufbau und die Umstrukturierung der Peptidoglycane in der Bakterienzellwand unterbunden, wodurch diese instabil wird^[973]. Bei Wahrnehmung von Vancomycin synthetisiert VRSA Enzyme, um die Herstellung von Lipid II zu unterdrücken, bestehendes Lipid II zu spalten und stattdessen eine Alternative herzustellen, dessen Struktur nicht von Vancomycin gebunden wird^[945,974]. VRSA hat seine Resistenz durch lateralen Gentransfer mit *Enterokokken* erhalten. Dessen Resistenzbildung wurde bis zu seinem Verbot, durch den in der Tierzucht eingesetzten Wachstumsverstärker Avoparcin gefördert^[975,976]. Aktuell gegen Vancomycin resistente Bakterien zeigen einen sichtbaren Verlust ihrer Fitness, wodurch ihre allgemeine Verbreitung erschwert wird^[945,977].

Seit seiner Erscheinung in den 1960er Jahren hat sich MRSA auf der ganzen Welt verbreitet^[978]. In den meisten entwickelten Ländern in Europa und Amerika wurden neue Regulationen und Überwachungsinstanzen^[979,980] eingeführt, um die Nutzung von Antibiotika zu beschränken, wodurch die Anzahl der positiven Isolate dort rückläufig ist^[16,426]. In anderen Ländern, wie beispielsweise dem Schwellenland Indien, erreichen die Inzidenzwerte von resistenten *Staphylokokken* erst noch ihren Höhepunkt^[981,982]. Die Verbreitung von VRSA hat

sich seit 2006 auf 2020 von 2,0 % auf 7,0 %, erhöht. Dabei nimmt Afrika die Spitzenposition bei dieser Verbreitung ein [983,984]. Die durch SARS-CoV-2 verursachte pandemische Situation hat den Gebrauch von Desinfektionsmittel stark erhöht. Als Resultat darauf haben sich in vielen isolierten MRSA-Stämmen Resistenzgene gegen Biozide entwickelt [985,986]. Die Mechanismen, die mit dieser Resistenz zusammenhängen, wirken sich auch auf die Wirksamkeit anderer antibiotischer Substanzen aus [985,987]. Zusätzlich zu den Resistenzen gegen Antibiotika kann *Staphylococcus aureus* die Anwesenheit von AmP wahrnehmen und entsprechende Resistenzgene aktivieren [988,989]. Durch diese Resistenzgene verfügt das Pathogen über eine natürliche Resistenz gegenüber AmP, wie beispielsweise die wirtseigenen Defensine [990], Cathelicidine [991] und den von Thrombozyten [656,992] und von neutrophilen Zellen [112] hergestellten Peptiden. Es entwickelt aber auch Resistenzen gegen AmP, welche von anderen Bakterien sezerniert werden [993]. Diese Resistenzen werden unter anderem erreicht, indem das Bakterium seine Zellmembran und Zellwand modifiziert [994,995], negative Ladungen auf seiner Oberfläche eliminiert [996,997] und seine Hydrophobizität erhöht [586]. Das Ganze wird durch einen aktiven Efflux der AmP unterstützt [989]. Ebenso gibt es resistente Varianten gegenüber Fettsäuren [998] und dem von *Staphylococcus staphylolyticus* produziertem Lysostaphin [999].

Kleine Kolonien-Varianten und Biofilme haben bereits durch ihren Phänotyp eine wirksame Resistenz gegenüber antibiotischen Substanzen und dem Immunsystem [666]. Die Resistenz der kleinen Kolonien-Variante wird durch den intrazellulären Aufenthalt und durch die reduzierten Stoffwechselkapazitäten erreicht, wodurch das Bakterium für den Wirkstoff erschwert zugänglich ist und weniger Angriffsfläche bietet [719,828]. Der Biofilm bietet den *Staphylokokken* Schutz vor antibiotischen Substanzen, physikalischen Effekten sowie dem Immunsystem und erlaubt es letztendlich auch, Nährstoffe in größerer Menge anzureichern [1000,1001]. Einige Antibiotika schaffen es nicht, den Biofilm zu infiltrieren und verlieren bereits in den ersten Schichten ihre Wirkung [1002,1003]. Auch haben die Schläfer in den tieferen Schichten der Struktur einen reduzierten Metabolismus und teilen sich nur noch selten. Dadurch ist die Anzahl an möglichen Angriffszielen für Antibiotika bei diesem Phänotyp minimiert [704]. Zusätzlich dazu verfügen Biofilme über eine erhöhte Expression an Staphyloxanthin und produzieren in den frühen Entwicklungsstufen vermehrt **KatA** [1004]. Als Bestandteil der Biofilmmatrix verändert PIA die Oberflächenladung des Biofilms und reduziert dadurch die Effektivität, mit der AmPn auf die Zellwand wirken kann [821,1005].

Mit jeder Resistenz, die sich in *Staphylococcus aureus* durch den selektiven Druck von Antibiotika etablieren kann und die keine negative Auswirkung auf die Fitness hat, wird es schwieriger, eine Infektion durch das Pathogen zu behandeln [1006,1007]. Durch den Einsatz von Antibiotika hat sich die Sterblichkeitsrate durch eine mit *Staphylococcus aureus* assoziierte

Bakteriämie halbiert. Aufgrund der wachsenden Resistenzen hat sich jedoch die Virulenz des Bakteriums erneut massiv erhöht ^[1008].

2.3.4.5 Pathologie

Hat sich das Pathogen im Wirt etabliert, treten je nach betroffener Stelle unterschiedliche Symptome auf. Zu den betroffenen Bereichen zählen unter anderem Haut, Weichteile, Blutbahn, Gelenke, innere Organe, Muskeln und Knochen ^[1009,1010]. Der Krankheitserreger kann, abhängig von der Schwere der Infektion und der Virulenzfaktoren des Bakterienstammes, zu verschiedenen Krankheitsbildern führen. Das Spektrum dieser Krankheiten umfasst leichte Hautkrankheiten wie Pickel ^[1011] und Borkenflechte ^[1012], ernstere Krankheiten wie chronische Rhinosinusitis ^[1013,1014], Geschwüre ^[1015] und Osteomyelitis ^[1016] sowie Krankheiten mit potentiell tödlichem Verlauf wie Bakteriämie ^[1017], Endokarditis ^[1018], Myokardinfarkt ^[1017] oder Lungenentzündung ^[1019]. Zusätzlich zu seinen Virulenzfaktoren führt eine Infektion durch das Pathogen zu einer generellen Hypoxie im umgebenden Wirtsgewebe ^[1020]. Toxine ^[1021,1022], Superantigene ^[1023-1025] und einige andere Virulenzfaktoren ^[1026] von *Staphylococcus aureus* besitzen das Potential, Allergien ^[1027,1028], eine Anaphylaxie ^[1028], oder immunpathologische Krankheiten wie intrinsisches Asthma ^[1023,1025,1026], atopische Dermatitis ^[490,1022], oder Rhinosinusitis ^[1024,1029] im Wirt zu entwickeln oder deren Krankheitsbild durch eine Besiedlung zu verschlimmern. Bei einigen Krankheitsbildern ist der Krankheitserreger der prädominante Verursacher. So ist er in der Hälfte aller Fälle bei Haut- und Weichgewebeeinfektionen ^[1030,1031] und bei Osteomyelitis ^[691,1032] involviert oder bei einer orthopädischen Periimplantitis ^[1033,1034] bei einem Drittel aller Fälle für eine Infektion verantwortlich. Dringt der Erreger sogar in tieferes Gewebe, Knochen oder Implantate vor, kann er einen Biofilm erzeugen, zu einer tiefsitzenden Infektion der betroffenen Stelle führen und sich von dort systemisch verbreiten ^[1035]. Eine Behandlung dieser betroffenen Stellen erweist sich als äußerst schwierig, da für diesen Zweck keine adäquaten Antibiotika zur Verfügung stehen ^[1036,1037]. Fremdkörper wie Implantate sind besonders von der Besiedlung betroffen, da die Bakterien sehr gut an Titan ^[1038] binden und sich das Adhäsionspotential im Lauf der Zeit verstärkt, wenn das Implantat mit körpereigenen Proteinen ^[1039] benetzt ist. Tatsächlich kann die für eine Infektion benötigte Infektionsdosis bei dem Bakterium auf Implantaten um den Faktor 10^5 geringer sein als in Gewebe ^[1040]. Zudem werden Implantate nicht durchblutet, weshalb weder das Immunsystem, noch antibiotische Substanzen einen guten Zugang zu einem dort etablierten Biofilm haben ^[1041-1043]. Das Krankheitsbild endet deshalb in den meisten Fällen mit einer Periimplantitis und Implantatversagen. In diesem Fall muss das Implantat entfernt und erneuert werden, damit schwerwiegende gesundheitliche Folgen verhindert werden ^[155,1036]. Solche Eingriffe selbst sind allerdings mit einem nicht unerheblichen Risiko verbunden und die Wahrscheinlichkeit, dass sie sich als wirkungslos erweisen, ist hoch ^[1044-1046]. Die Phänotypen des Biofilms und der

kleinen Kolonien-Variante werden vermehrt mit wiederkehrenden und chronisch auftretenden Krankheiten^[390,660,663] assoziiert, spielen aber auch bei Haut^[1047], Weichgewebe-^[1047], Blutbahn-^[1048,1049] und Herzinfektionen^[1050,1051] eine relevante Rolle. Gerade die chronischen Krankheiten können oftmals durch die verstärkte Immunevasion^[719] und Resilienz^[658] dieser Phänotypen nicht effektiv vom Immunsystem bekämpft werden. Zu der Förderung der chronischen Krankheiten trägt bei, dass sich eine effektive Abwehr gegen das Pathogen meist erst dann entwickelt, wenn sich langlebige Phänotypen schon längst etabliert haben^[1052].

Die häufigste Krankheit mit schwerem Verlauf nach einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* ist die Bakteriämie, bei welcher die Bakterien die Blutbahn infizieren, sich dadurch im ganzen Körper verteilen und vermehren, was zu metastatischen Infektionen führt. Eine solche Infektion kann zu Symptomen führen, die von Fieber bis zu Sepsis oder septischem Schock reichen, welche von einer Sterblichkeitsrate von bis zu 40,0 % begleitet werden^[1053]. Die Sepsis ist eine Überreaktion der Immunantwort des Betroffenen, die durch PAMPs und Superantigene verstärkt wird^[1054]. Es kommt zu einem in Kapitel 2.2.6 „**Immunsystem-assoziiertes Kollateralschaden**“ genauer beschriebenen Zytokinsturm mit eventuell tödlicher Folge. Das Alter des Patienten sowie die Art und Menge der ausgeschütteten Zytokine, Chemokine und anderen Substanzen hat einen erheblichen Einfluss darauf, ob eine Blutbahninfektion durch *Staphylococcus aureus* glimpflich verläuft, chronisch wird oder tödlich endet^[1055]. Hierbei ist auch der Zeitpunkt der Ausschüttung von Relevanz^[11]. Die in diesem Verlauf relevanten Zytokine sind in Tabelle 5 genauer ausgeführt. Dabei ist zu beachten, dass die Wirksamkeit einiger Zytokine von dem infizierten Körperbereich abhängig sein kann, wie sehr gut am Beispiel von **IL-17** zu sehen ist, welches hauptsächlich bei Weichgewebe- und Hautinfektionen eine relevante Rolle spielt^[1056-1058]. Zusätzlich zu den genannten Wirkstoffen wurde auch beobachtet, dass Patienten, die im Vergleich zu T_H1- oder regulatorischen T-Zellen einen größeren Gehalt an T_H17-Zellen aufweisen, vermehrt einen Krankheitsverlauf mit schwerwiegenderen Konsequenzen erleiden. Umgekehrt verläuft die Infektion nicht so schwer, wenn die Anzahl an regulatorischen T-Zellen größer ist. Dies lässt einen starken Einfluss des durch die T-Zellen verursachten Kollateralschadens auf die Schwere des Krankheitsverlauf vermuten^[1059].

Aufgrund der hohen Affinität und des starken Adhäsionspotentials des Krankheitserregers gegenüber Wundgewebe wird dieser häufig in Abstrichen von chronischen Wundinfektionen gefunden^[1060]. Vor allem bei Infektionen venöser Beingeschwüre wird er in 88,0 bis 93,5 % der Fälle nachgewiesen^[1061]. Infektionen bei Wunden, die in Zusammenhang mit *Staphylococcus aureus* stehen, haben eine verzögerte Wundheilung^[1062,1063]. Addiert sich das mit Krankheitsbildern auf, die bereits eine Verzögerung bei der Wundheilung verursachen, wie beispielsweise bei einem diabetischen Fuß, so kann sich die Genesungszeit sogar

verdoppeln [1064,1065]. Eine entscheidende Rolle bei der Wundheilungsstörung spielt hierbei das **Eap**, welches das **ICAM-1** auf der Oberfläche der Wirtszellen blockiert [1066,1067]. Durch die Blockade ist Leukozyten sowie den an der Wundheilung beteiligten Proteine der Zugang zu diesem Integrin verwehrt. Dadurch wird der Wundheilungsprozess am betroffenen Ort behindert [600,1068]. Ohne die Leukozyten kann keine Entzündung und nachfolgende Wundheilung am Infektionsort initiiert werden und die *Staphylokokken* am Infektionsort können nur schwerlich bekämpft werden [539,601,1069]. Der Virulenzfaktor **Efb** unterstützt diese Wundheilungsstörung, indem es eine Adhäsion von Thrombozyten und neutrophilen Zellen an entzündeten Zellen verhindert [1070].

Tabelle 5: Abhängig vom Gehalt einiger Zytokine im Blut zu Beginn und im Verlauf der Infektion kann sich der Krankheitsverlauf verschlechtern oder verbessern. Die Daten wurden aus der Publikation von Miller *et al.* (2020) [11] übernommen in Tabellenform zusammengefasst.

Relevanz von Zytokinen bei einer Bakteriämie		
Substanz	Wirkung	Relevanz
IL-10	Unterdrückung von entzündungsfördernden Zytokinen und Leukozyten, Polarisierung von T _H 2-Zellen [1071], Förderung der B-Zell-Differenzierung [51,1072]	niedrige Konzentration lindert Verlauf, hohe Konzentration verschlimmert Verlauf [447,1073,1074]
IL-1RA	Antagonist für IL-1β [51]	niedrige Konzentration lindert Verlauf [1075]
IL-1β	entzündungsfördernd [51]	frühe hohe Konzentration lindert Verlauf, niedrige Konzentration verschlimmert Verlauf [447,1073,1074]
IL-2	aktiviert T-Zellen und erhöht deren Lebensdauer [51,1076]	hohe Konzentration lindert Verlauf, niedrige Konzentration verschlimmert Verlauf [1077,1078]
IL-27	induziert Freisetzung von IL-10 , Polarisierung von T _H 1-Zellen [51,1079]	niedrige Konzentration lindert Verlauf [1075]
IL-6	entzündungsfördernd; aktiviert Lymphozyten, hemmt neutrophile Zellen [51,1080]	niedrige Konzentration lindert Verlauf, hohe Konzentration verschlimmert Verlauf [1081-1083]

Unabhängig von einer Methicillin-Resistenz wird durch das Auftauchen von MRSA ein Anstieg tödlicher Krankheiten wie nekrotische Lungenentzündung [1084,1085] und Faszitis [1086] beobachtet. Auch bildet MRSA deutlich häufiger die kleine Kolonien-Variante aus als

MSSA^[668]. In einigen besonders tragischen Fällen endete eine Infektion mit MRSA bei gesunden Kindern ohne erhöhte Anfälligkeit tödlich^[1087]. Es besteht daher die Annahme, dass MRSA, allen voran der Bakterienstamm USA300, virulenter ist als MSSA^[1088-1090]. Unter anderem wird das **PVL** vermehrt von CA-MRSA und somit auch von USA300 produziert. Dies kann eine Erklärung für die erhöhte Virulenz sein^[1091,1092]. Aufgrund der geringen Fitness der aktuellen VRSA-Varianten geht noch keine größere Gefahr durch dieses Pathogen aus. Wie der Trend aber zeigt, ist es nur eine Frage der Zeit, bis sich die Resistenz ausbreitet^[983]. Lediglich bei VISA konnte beobachtet werden, dass dieser bei der Interaktion mit Immunzellen *in vitro* und in Tierversuchen eine geringere Ausschüttung an entzündungsfördernden Substanzen als erwartet hervorgerufen hat^[1093,1094].

Durch die opportunistische Natur von *Staphylococcus aureus* besitzt es das Potential, eine bereits bestehende Infektion durch ein anderes Pathogen als Koinfektion zu verstärken. Bei einer durch das Influenza-A-Virus verursachten Lungenentzündung kann es als Sekundärinfektion auftreten und den Krankheitsverlauf und die Überlebensrate verschlechtern^[1095,1096]. Am humanen Immundefizienz-Virus erkrankte Menschen haben eine deutlich höhere Anfälligkeit gegenüber Infektionen durch *Staphylococcus aureus*^[1097]. Der Pilz *Candida albicans* verschafft dem Bakterium durch seinen Befall Angriffspunkte und *Staphylococcus aureus* kann im selben Biofilm koexistieren, was ihm zusätzlichen Schutz verleiht^[1098,1099]. *Pseudomonas aeruginosa* kann das Immunsystem der Lunge kompromittieren, sodass *Staphylococcus aureus* sich im Anschluss an die Infektion sehr gut in dem Organ einnisten kann^[1100]. Die beiden Bakterien werden bei bestimmten, durch *Staphylococcus aureus* verursachten Krankheiten oftmals gemeinsam isoliert^[1049]. Darüber hinaus wird das Bakterium auch sehr häufig bei Patienten isoliert, die an SARS-CoV-2 und einer bakteriellen Sekundärinfektion leiden^[1101].

2.3.5 Präventive Maßnahmen, Behandlung und Impfungen

Staphylococcus aureus begleitet unsere Evolution schon seit Millionen von Jahren und durch diese Koevolution ist es für den Krankheitserreger eine Leichtigkeit, wirtseigene Proteine zu manipulieren und das Immunsystem zu umgehen. Der Einsatz modernster medizinischer Mittel ist unabdingbar, um die Oberhand über das Pathogen zu gewinnen. Die adaptive Natur des Bakteriums erlaubt es der Menschheit nicht, sich dauerhaft auf bestehende Technologien zu verlassen, sondern zwingt uns, diese zu verbessern oder neue und wirksamere Verfahren zu entwickeln, damit das Wettrüsten nicht verloren wird. Gerade die erschreckende Beobachtung bei der Resistenzbildung des Pathogen zeigt, wie schnell und effektiv sich dieser an die bestehenden medizinischen Behandlungsmethoden anpassen kann^[25].

Bekämpfung und Überwachung von MRSA^[1102], neue Impfstoffe^[1103] und vor allem die Entwicklung neuer Antibiotika^[1104] sind sehr kostspielige Unterfangen. Betrachtet man aber den volkswirtschaftlichen Schaden und das durch *Staphylococcus aureus* verursachte menschliche Leid, erscheint es ohne Frage gerechtfertigt, diese hohen Kosten zu tragen^[17,33,1105].

In den folgenden Kapiteln werden medizinische Entwicklungen und Methoden aus Vergangenheit, Gegenwart und Zukunft beschrieben, die zur Bekämpfung von *Staphylococcus aureus* eingesetzt wurden, aktuell eingesetzt werden und vielversprechendes Potential für einen zukünftigen Einsatz zeigen.

2.3.5.1 Impfungen und passive Immunisierung

Die Entwicklung von Impfstoffen gegen *Staphylococcus aureus* wurde sehr lange Zeit vernachlässigt, da die Antibiotikatherapie zufriedenstellende Ergebnisse erzielte und keine geeigneten Antigene für eine effektive Impfwirkung gefunden wurden^[1106,1107]. Mit zunehmender Resistenz gegen Antibiotika wurde aber die Notwendigkeit eines Impfstoffes immer definierter. Erste Versuche Tot- und Toxoidimpfstoffe einzusetzen zeigten zwar einen erhöhten Antikörpertiter, reduzierten jedoch nicht die Anzahl der Infektionen^[1108,1109]. Verfügten die toten Bakterien über eine fibrilläre Kapsel, zeigte die Impfung in Tiermodellen erste größere Erfolge^[1110]. Polysaccharide^[1111,1112] sowie bestimmte Toxine und Proteine, die an der Oberfläche der Bakterienzellwand^[1113] präsentiert werden, wie beispielsweise *MSCRAMM*^[1114,1115], haben sich in Testmodellen als sehr gute Antigene für Impfungen und passive Immunisierungen erwiesen. Bei Adhäsinen hatte sich in manchen Fällen auch ein synergetischer Effekt gezeigt, der die Adhäsion der Bakterien verhindert und diese gleichzeitig opsonisiert hat^[1116-1118]. Bei Antigenen mit geringer Immunogenität und ohne geordnete Struktur, wie beispielsweise **FnBPA**, haben sich allerdings auch Antikörper entwickelt, welche keinen oder sogar einen nachteiligen Effekt erzeugt hatten^[1119]. Die Antikörper zeigten in diesem Fall Affinität gegen Ligand-induzierte Bindungsstellen, welche vom Protein-Ligand-Komplex präsentiert wurden und die Adhäsion des Pathogens nach erfolgreicher Bindung des Antigens zusätzlich verstärkten^[1117,1120,1121]. Deutlich erfolgreicher als konventionelle Antigene haben sich hierbei Fusionsproteine gezeigt, an welchen die Bindungsstelle des Liganden mit einem Trägerprotein fusioniert wurde. Die Antikörper, die gegen dieses fusionierte Protein erzeugt wurden, verhindern eine Bindung des Originalproteins an seinen Liganden^[1116,1117,1122]. Die Effektivität dieser Blockierung wurde zusätzlich verstärkt, wenn das Fusionsprotein vor dem Einsatz als Antigen denaturiert wurde^[1117]. Im Vergleich zum Einsatz von natürlichen Proteinen oder toten Bakterien haben sich auch rekombinante Proteine deutlich erfolgreicher darin gezeigt, Antikörper hervorzubringen, die einen Impfschutz ermöglichen könnten^[1115,1123,1124].

Trotz all dieser Versuche gibt es bis heute keinen Impfstoff, der einen signifikanten oder gar vollständigen Schutz gegen *Staphylococcus aureus* ermöglicht^[28,1125,1126]. Eines der ersten Beispiele für den fehlgeschlagenen Einsatz eines Impfstoffes gegen *Staphylococcus aureus* war *StaphVAX*[™]^[1127]. Zunächst ein vielversprechender Impfstoff mit zwei Antigenen sowie guter Effizienz und Verträglichkeit, hatte er es in der Phase-III-Studie nicht geschafft, einen konsistenten humoralen Schutz in Patienten gegen das Pathogen auszubilden^[28]. Gründe hierfür waren, dass eines der Antigene nur von 40,0 % aller Bakterienstämme von *Staphylococcus aureus* präsentiert wird und es oftmals keine effektive Antikörper hervorgebracht hat^[1127-1129]. Das zweite Antigen erzeugte zwar einen guten Impfschutz mit guter Abdeckung, erzeugte allerdings keinen effektiven Schutz gegen USA300. Im Promotor des Antigens hat sich bei diesem Bakterienstamm eine Punktmutation entwickelt, wodurch dieses nicht mehr exprimiert wurde^[1130]. Ein weiteres Problem mit beiden Antigenen war auch, dass sie von dem Bakterium erst in der stationären Phase produziert wurden, weshalb eine Infektion nicht durch den Impfstoff verhindert werden konnte^[788,1131]. Neben *StaphVAX*[™] gab es noch weitere prophylaktisch und therapeutisch getestete Impfstoffe, die es nicht geschafft haben, die Anforderungen einer klinischen Studie zu erfüllen^[28,1132,1133]. Einige Studien und Tests zur Immunisierung hatten sogar solch verheerende Effekte, dass die Überlebensrate der Patienten oder Versuchstieren bei einer Infektion deutlich verschlechtert wurde^[298,300,1077]. Ein besonders katastrophales Beispiel war hierbei der Impfstoff V710, dessen Wirkung verstärkt einen Antikörper hervorbrachte, der den Bakterien ein intrazelluläres Eindringen in Immunzellen ermöglichte^[300].

Es gibt mehrere Faktoren, welche die Ineffizienz der bisherigen Impfstoffe begründen können. Zum einen hat die Medizin nicht genug Informationen darüber, wie eine menschliche Immunantwort gegen *Staphylococcus aureus* auf molekularer Ebene abläuft^[40,1134,1135]. Bei Impfungen von Neugeborenen hat ein normalerweise wirkungsvoller Antikörper beispielsweise keine Wirkung erzielt, da das Immunsystem für die Entwicklung effizienter Antikörper noch nicht ausgereift genug war^[1136-1138]. Alle bisher genannten Versuche, die in klinischen Studien getestet wurden, haben darauf abgezielt, eine Opsonisierung des Pathogens zu erreichen^[28,1139]. Allerdings hat sich gezeigt, dass die Phagozytose durch Immunzellen *in vivo* meist bereits ohne zusätzliche Antikörper erfolgt und der fehlende Immunschutz in der mangelhaften Tötungseffizienz der assoziierten Zellen zugrunde liegt^[150,152,1140]. Zudem hatte man sich nur auf eine Immunisierung gegen den planktonischen Phänotyp des Bakteriums konzentriert, ohne die Relevanz der anderen Phänotypen zu berücksichtigen^[666,1141,1142].

Aufgrund der bisherigen geringen Effizienz von opsonisierenden Antikörpern gibt es sogar Zweifel daran, ob von körpereigenen Antikörpern mit dieser Effektorfunktion überhaupt ein vollständiger Schutz für den Wirtsorganismus gegen *Staphylococcus aureus* vermittelt werden kann. Diese schaffen es nämlich selbst bei einem hohen Titer nicht, das Bakterium einzudämmen [29,40,1143]. Diese Zweifel werden von Beobachtungen gestützt, dass Menschen mit einer kompromittierten Fähigkeit, funktionale Antikörper zu produzieren, kein signifikant erhöhtes Risiko gegen eine Infektion durch *Staphylococcus aureus* besitzen [1132,1144,1145]. Gegen diese Zweifel sprechen natürlich auftretende Antikörper bei Patienten, welche durch ihre opsonisierende Wirkung die Vernichtung des Bakteriums erfolgreich unterstützt haben. Diese Antikörper wurden bisher aber nur in Tierversuchen an dem Krankheitsbild der Bakteriämie getestet [277]. Bei einigen Impfstoffen zeigte sich während der Testphase, dass der beobachtete Schutz auf der Stimulation von T-Helferzellen anstelle einer verstärkten Opsonisierung basierte. So konnte es auch passieren, dass Patienten mit einer ungeeigneten Zusammensetzung von Zytokinen im Vollblut keinen Impfschutz entwickelten [1078,1146,1147]. Auch wurde vermehrt beobachtet, dass sich die Verteidigung gegen dieses Pathogen verstärkt auf das angeborene Immunsystem stützt [11,29,1148]. Allerdings besitzt *Staphylococcus aureus* auch hier eine Vielzahl von Möglichkeiten, die Verteidigung zu unterwandern und einer Elimination, vor allem durch phagozytische Zellen, zu entgehen [876,1149].

Das grundlegende Problem der bisherigen Impfstoffe ist daher, dass ein völlig ungeeignetes Antigen ausgewählt wurde, um ein Ziel zu erreichen, welches nicht die Lösung des Problems ist. Während die getesteten Impfstoffe *in vitro* zwar ein gutes Ergebnis erreichen konnten, waren sie für die Aufgabe in einer komplexeren Umgebung *in vivo* wirkungslos [1125,1126,1150]. Dieses Problem wird dadurch verstärkt, dass viele Studien in naiven Tiermodellen [1151,1152] oder mit kranken Testpersonen [1078,1153] durchgeführt wurden. Das Immunsystem unterscheidet sich in beiden Modellen von dem eines gesunden Menschen. Aus diesem Grund hat sich die tatsächliche Wirkung des Impfstoffes deshalb stark von den Testergebnissen aus den Studien unterschieden [1132,1154]. Diese Problematik wird dadurch verdeutlicht, dass einige Toxine des Bakteriums bei Tieren im Vergleich zum Menschen nicht denselben verheerenden Effekt haben [1155,1156]. Auch bilden Tiermodelle in einer keimfreien Laborumgebung deutlich weniger Lymphozyten aus, weshalb die Testergebnisse eines Impfstoffes sich nicht auf realistische Bedingungen übertragen lassen, wenn ein solches Modell verwendet wird [1157-1159]. Ebenso wurde nicht bedacht, dass eine der Impfung vorausgehende Exposition durch das Pathogen die Art und Weise der Immunantwort des Wirtes verändert [909,1160]. Letztendlich wurde in den meisten Studien auch kein Adjuvans eingesetzt und dessen Abwesenheit könnte ebenfalls für die Entwicklung eines Impfschutzes unentbehrlich sein [29].

Eine große Herausforderung bei der Entwicklung eines effektiven Impfstoffes ist es, dass nicht jeder Stamm von *Staphylococcus aureus* die gleichen Virulenzfaktoren besitzt und exprimiert [154,1161]. Viele dieser Virulenzfaktoren sind noch zusätzlich in ihrer Funktion redundant, sodass die fehlende Funktion eines Proteins durch die eines anderen ersetzt wird [1162]. Dadurch wird die Suche nach einem geeigneten Antigen enorm erschwert, da ein gutes Ziel für einen Impfstoff für das Pathogen unentbehrlich sein sollte. Ein geeigneter Impfstoff sollte daher im besten Fall ein großes Spektrum der überlebensnotwendigen Proteinexpression verschiedenster Bakterienstämme des Pathogens neutralisieren [252,1163]. Gesteigert wird diese Herausforderung dadurch, dass sich die natürliche Immunantwort gegen *Staphylococcus aureus* in Abhängigkeit von dem betroffenen Gewebe und dem Phänotyp stark unterscheiden kann [1164,1165]. Ein guter Ansatz, dieses Ziel zu erreichen, ist es, multivalente Impfstoffe mit gut erforschten Antigenen einzusetzen, um einen Impfschutz zu erzeugen [1148,1166]. Durch den Einsatz mehrerer Komponenten wird auf eine größere Bandbreite an Bakterienstämmen abgezielt und somit der funktionellen Redundanz der Virulenzfaktoren entgegengewirkt [1126,1167]. Mehrere solcher experimentellen Impfstoffe haben bereits ihre Wirkung *in vivo* bewiesen [28,1109,1132]. Mehr Aufmerksamkeit sollte auch daraufgelegt werden, wie sich die molekularen Mechanismen äußern, die bei einer Immunantwort des Wirtes gegen *Staphylococcus aureus* ihre Wirkung entfalten. Werden diese Mechanismen besser verstanden, erhöht sich die Chance, ein wirksames Antigen und Adjuvans für potentielle Impfstoffe zu finden [28,1168,1169]. Schlussendlich wäre es für Studien sinnvoll, Biomarker zu überwachen, welche mit den Krankheiten korrespondieren, um die tatsächliche Effizienz des Impfstoffes zu einem früheren Zeitpunkt besser zu bestimmen [29,1073,1170]

Passive Immunisierungen, die darauf abzielen, einen Krankheitsverlauf zu lindern, zeigen derweil in ihrer Funktion sehr vielversprechende Ergebnisse [29,262,820]. Diese Antikörper zielen darauf ab, Toxine und Superantigene zu neutralisieren, damit potentielle Gewebeschäden oder ein toxischer Schock vermieden werden. Auch verhindert ein solcher Wirkstoff die Erschöpfung der Immunzellen durch Superantigene und Leukotoxine [11,29]. Vor allem Anti-Toxin-Antikörper zeigen sich sehr effizient darin, ihre assoziierten Toxine zu neutralisieren [1171,1172]. Sie können in manchen Fällen sogar eine Immunität bei Kindern gegenüber dem Pathogen ermöglichen [266]. Die Nachfrage nach dieser Art von Impfstoffen ist allerdings sehr limitiert, wodurch die Entwicklung sehr eingeschränkt wird [1173].

2.3.5.2 Therapien, Präventionen und Behandlungen

Standardmäßig ist die Behandlung mit Antibiotika [1174,1175] bei einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* oder als Prophylaxe vor einem operativen Eingriff [1176,1177] bei entsprechender Indikation etabliert. In Abhängigkeit von der betroffenen Stelle, dem

Anfälligkeitsprofil des Pathogens, der Verträglichkeit des Patienten und der Verfügbarkeit werden entsprechend Tabelle 6 verschiedene Antibiotika zu diesem Zweck eingesetzt ^[1175,1178]. Antibiotika, die auf der Wirkung von β -Lactam beruhen, haben eine sehr gute Verträglichkeit, sind aber aufgrund der starken Verbreitung der Resistenz gegenüber diesem Wirkstoff meistens keine sinnvolle Option ^[1179]. Zur Behandlung von MSSA werden bevorzugt semisynthetische Penicilline oder Cephalosporine aus der ersten Generation verwendet ^[1175,1180]. Die Gabe von Vancomycin ist für durch MRSA infizierte Patienten und für Patienten mit Unverträglichkeiten gegenüber alternativen Substanzen die aktuell standardisierte Behandlungsmethode ^[1175]. Der Grund dafür ist zum einen das Vermeiden einer Resistenzbildung ^[1181] und zum anderen, weil Vancomycin bei einer Bakteriämie und anderen Diagnosen eine geringere Effektivität zeigt als andere Antibiotika ^[1182-1184]. Bei einer Infektion durch VISA müssen zusätzlich zu Vancomycin noch weitere antibiotische Substanzen verabreicht werden ^[1185]. Gegen einen Befall durch VRSA werden andere, wirkungsvollere antibiotische Substanzen wie beispielsweise Daptomycin, Linezolid und Teicoplanin eingesetzt ^[1186,1187]. Diese Substanzen zeigen eine deutlich effektivere Wirkung gegen MRSA und VRSA als Vancomycin ^[1188]. Eine Behandlung ist, selbst bei einem Pathogen ohne Resistenzen, keine Erfolgsgarantie und vom Bakterienstamm, dem Krankheitsstadium und dem Patienten abhängig ^[1189-1191].

Bei einer fortgeschrittenen Infektion und zur Beseitigung von Biofilmen sind oft aufwändigere Behandlungsmaßnahmen als die orale Verabreichung von Antibiotika notwendig, um dem Patienten zu kurieren. Zu diesen Maßnahmen zählen beispielsweise das legen einer Drainage ^[1141], ein operativer Eingriff ^[1141,1192], eine parenterale Injektion mit Antibiotika ^[1174,1192] oder eine Kombination aus den genannten Maßnahmen ^[1141,1193]. Ist die Infektion mit einem Katheter ^[1194] oder einem Implantat ^[1195] assoziiert, müssen diese gegebenenfalls entfernt werden, um die Infektion zusammen mit einer Antibiotika-Therapie zu überwinden ^[1196]. Zur Vermeidung von Implantat-assoziierten Infektionen werden ein mit antibiotischen Substanzen beladener Knochenzement oder Gipsperlen verwendet ^[1197-1199]. Das Antibiotikum muss bestimmte Kriterien erfüllen, um für den Einsatz im Material geeignet zu sein, damit es seine Wirkung nicht verliert. Aus diesem Grund wird in solchen Fällen meist Gentamycin oder Tobramycin eingesetzt ^[1179].

Um eine Infektion und die Verbreitung von *Staphylococcus aureus* und vor allem MRSA zu verhindern, können präventive Maßnahmen ergriffen werden. Zu diesen Maßnahmen zählen Standards im Gesundheitswesen ^[1200], das Tragen von Schutzkleidung, das Isolieren von infizierten Patienten und das Einhalten von Hygienerichtlinien ^[1201,1202]. Auch kann ein präventiver Abstrich bei Patienten durchgeführt werden, um eine mögliche Besiedlung im Voraus zu erkennen ^[1203]. Ebenso kann bei Personen, die mit *Staphylococcus aureus* besiedelt

sind, eine Dekolonisierung durch eine topische Anwendung von Mupirocin in der Nase durchgeführt werden ^[1204,1205]. Die Wirkung dieser Anwendung wird durch die orale Verabreichung von Rifampicin in Kombination mit Cotrimoxazol oder Ciprofloxacin und ein Bad in antimikrobieller Seife unterstützt ^[1206,1207]. Eine solche Dekolonisierung zeigte bisher aber vor allem bei MRSA nur mäßigen Erfolg, da die betroffenen Personen zeitnah erneut besiedelt wurden ^[1208,1209].

Eine Antibiotika-Therapie dauert lange und ist keine Garantie dafür, dass sich die Situation des Patienten bessert ^[938,1210,1211]. Jedes Antibiotikum hat eine unterschiedliche Erfolgsquote bei der Ausrottung von MSSA und MRSA sowie bei der Vorbeugung einer wiederkehrenden Infektion ^[1212,1213]. Das Antibiotikum Vancomycin, der aktuelle Standard gegen MRSA, wird oftmals nicht richtig dosiert und schafft es dann bei MSSA nicht, bis zum Bakterium vorzudringen oder es effizient zu bekämpfen ^[1181,1214]. Gegen MSSA zeigt beispielsweise Flucloxacillin eine enorme Erfolgsquote, die rapide sinkt, sobald das Pathogen Methicillin-resistent ist ^[1215,1216]. Genau umgekehrt verhält sich dieser Effekt bei Cotrimoxazol ^[1217]. Cotrimoxazol ist ein vor allem gegen MRSA sehr wirkungsvolles Antibiotikagemisch aus Trimethoprim und Sulfamethoxazol, welches wichtige Stoffwechselwege des Bakteriums blockiert ^[1218]. Leider hat das Antibiotikum eine sehr schlechte Verträglichkeit, was den praktischen Gebrauch einschränkt ^[1219,1220]. Daptomycin ist für Patienten gut verträglich und auch häufig therapeutisch erfolgreich, kann aber oftmals eine zeitnah wiederkehrende Infektion nicht verhindern ^[1213]. Das Oxazolidinon Linezolid zeigt einen Einbruch in der Wirksamkeit, wenn *Staphylococcus aureus* sich mit Gram-negativen Bakterien vermischt hat ^[1221]. Für besonders hartnäckige Infektionen kann als Zusatz die Verabreichung des Antibiotikums Rifampicin erfolgen. Es zeigt eine gute Wirkung gegen metabolisch sehr schwach aktive Phänotypen wie Schläfer oder die kleine Kolonien-Variante und kann daher auch chronische Infektionen effektiv bekämpfen ^[1222]. Die Chance auf einen Therapieerfolg lässt sich erhöhen, indem mehre Antibiotika miteinander kombiniert werden. Dies kann aber zu einer erhöhten Nephrotoxizität der Wirkstoffe führen ^[1223,1224]. Ein interessanter Wirkstoff für eine kombinatorische Therapie ist hierbei Nafcillin, da es das angeborene Immunsystem stimuliert ^[1225].

Wie jeder andere Arzneistoff haben auch Antibiotika, Nebenwirkungen die so schwerwiegend sein können, dass die Therapie abgebrochen werden muss. Aus diesem Grund müssen die Wirkstoffe anhand ihrer Toxizität bei der Verabreichung in der Konzentration begrenzt werden ^[1226-1228].

Tabelle 6: Abhängig von der Infektion und dem der Anfälligkeit des Bakteriums werden verschiedene Antibiotika zur Behandlung vorgeschlagen. Die Informationen für die Tabelle wurde aus der Publikation von Bamberger *et al.* (2005) übernommen [1175].

Behandlung von Infektionen durch <i>Staphylococcus aureus</i> mit Antibiotika (Stand 2005)			
Infektion	Bakterium	Antibiotika	Dauer der Therapie
einfache Hautinfektion	MSSA	Cefalexin, Dicloxacillin, Clindamycin	fünf bis sieben Tage
	MRSA	Clindamycin, Cotrimoxazol, Linezolid	
komplexe Hautinfektion	MSSA	Nafcillin, Cefazolin, Clindamycin	zwei bis vier Wochen
	MRSA	Vancomycin, Linezolid, Daptomycin	
Bakteriämie	MSSA	Nafcillin, Cefazolin, Vancomycin	zwei bis vier Wochen
	MRSA	Vancomycin, Linezolid, Daptomycin	
Katheterinfektion	MSSA	Nafcillin, Cefazolin, Vancomycin	zwei Wochen
	MRSA	Vancomycin, Linezolid, Daptomycin	
Osteomyelitis	MSSA	Nafcillin, Cefazolin, Clindamycin, Chinolon- Antibiotika plus Rifampicin	vier bis sechs Wochen
	MRSA	Vancomycin, Linezolid, Daptomycin	
Lungenentzündung	MSSA	Nafcillin, Clindamycin	zehn bis 14 Tage
	MRSA	Vancomycin, Linezolid	

2.3.5.3 Neue und unkonventionelle Behandlungen

Der hohe Anspruch an einen erfolgreichen Impfstoff gegen *Staphylococcus aureus* und die unglaubliche Widerspenstigkeit des Pathogens motivieren dazu, eine Lösung außerhalb der Standardbehandlungen zu suchen. Die dadurch motivierten unkonventionellen und kreativen Wege, eine Infektion von *Staphylococcus aureus* zu behandeln oder einen Impfschutz zu entwickeln, sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Einige alternative Wirkstoffe und Methoden, um Patienten mit einer Infektion durch *Staphylococcus aureus* zu behandeln und die Erfolgchance von Impfungen zu verbessern.

Unkonventionelle Methoden zur Bekämpfung von <i>Staphylococcus aureus</i>	
Methode	Effekt
Adjuvans: extrazelluläre Vesikel ^[740,1229]	Stimulation des angeborenen Immunsystems und T-Zellen, Ausbildung von T-Gedächtniszellen
Adjuvans: SMIP.7-10 ^[1230] oder CpG ^[1231]	Stimulation und Polarisierung von T _H 1-Zellen, Ausbildung von T-Gedächtniszellen
Anlegen von Spannung und elektrische Stimulation von Implantaten ^[1232]	Alkalisierung, Dispersion und Zerstörung von Biofilmen
Antikörper-Wirkstoff-Konjugate ^[1233,1234]	lokale Verabreichung von Antibiotika, Zerstörung von intrazellulären Bakterien
Antithrombin und Thrombozytenaggregationshemmer ^[1235]	verhindert Aufbau von fibrillärer Kapsel, Matrix und Pseudokapsel, Schutz gegen Endokarditis
Behandlung mit Bakteriophagen ^[1236,1237]	räuberische Vernichtung der Bakterien
Behandlung mit IL-12 ^[1238]	Stimulation und Polarisierung von T _H 1-Zellen
bivalente Antikörper mit Wirkung gegen Wirt und Pathogen ^[1239]	erhöhte Phagozytose durch Makrophagen
Blockierung der SOS-Antwort bei Zugabe von Antibiotika ^[1240]	verstärkte antibiotische Wirkung, verminderte Resistenzbildung
Centyrine ^[1241] und Centyrin-Hybride ^[1242]	Neutralisierung von Toxinen, Umgehung der Immunevasion
elektrochemische Gerüste ^[1243]	Zerstörung von Biofilmen durch reaktive Sauerstoffspezies und Hypohalogenite
Enzym-beladene Bakteriophagen ^[1244]	gezielte Lyse von Bakterien
Inhibition von <i>quorum sensing</i> ^[1245]	Hemmung der Virulenz
Inhibition von Staphyloxanthin ^[1246]	verhindert Resistenz gegen reaktive Sauerstoffspezies
Injektion von Antibiotika-beladenen Stammzellen ^[1247]	lokale Verabreichung von Antibiotika
Substanz-beladene Hydrogele ^[1248]	fokussierte bakterizide Aktivität
Tarn-Beschichtungen für Erythrozyten ^[1249] und Thrombozyten ^[1250]	Aufrechterhaltung der Immunabwehr, Kontakttötung, Neutralisierung von Toxinen, Schutz vor Pathogenen

2.3.5.4 Prospekt

Gegenwärtig wurden bereits neue Erkenntnisse gewonnen, die eine Entwicklung von effizienteren Impfungen und Wirkstoffen ermöglicht. Es wurde erkannt, dass T-Zellen^[907,919,1251], speziell T_H1-^[1231,1252] und T_H17-Zellen^[131,1252], deren sezernierte Zytokine^[446,1253,1254] und das angeborene Immunsystem, vor allem neutrophile Zellen^[102] und Makrophagen^[966], bei der Immunantwort gegen *Staphylococcus aureus* eine sehr wichtige Rolle spielen. Bei den T-Zellen konnte beobachtet werden, dass bei den meisten Personen bereits T-Gedächtniszellen gegen Antigene von *Staphylococcus aureus* vorhanden sind^[1251]. Diese Gedächtniszellen werden durch Populationen definiert, welche unabhängig voneinander bei einer Sekundärantwort aktiviert werden können. Diese Populationen besitzen grundlegend verschiedene Polarisierungen und unterscheiden sich in den Zytokinen, welche sie nach ihrer Aktivierung freisetzen. Welche Population bei einer Sekundärantwort aktiviert wird, ist hierbei von der Darreichungsform des Antigens abhängig. So neigen proteinogene Antigene bevorzugt dazu, T_H2-Zellen und mRNA-basierte Antigene eher T_H1-Zellen zu polarisieren^[8]. Ebenso wurde beobachtet, dass die Toxizität der Toxine voneinander abhängig sein kann, was die Möglichkeit bietet, die Effektivität mehrerer Toxine gleichzeitig durch das Blockieren von synergetischen Effekten zu reduzieren^[737]. Auch ist man sich mittlerweile im Klaren, dass *Staphylococcus aureus* sehr viele Abwehrmechanismen gegen das Immunsystem besitzt^[1255,1256] und Biofilme^[709] oder kleine Kolonien-Varianten^[659,831] als Phänotyp ausbildet und so sehr lange im Wirt überleben kann.

Zur Therapie bei einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* sind trotz der hohen Kosten bereits neue Antibiotika und antimikrobielle Wirkstoffe in der Entwicklung. Diese sind mit der Hoffnung verbunden, dass sie eine höhere Effizienz bei der Therapie zeigen und die Chance einer Resistenzbildung minimieren^[925,1257,1258]. Ein vielversprechender Kandidat für neuartige Antibiotika ist das Levonadifloxacin, welches bei guter Verträglichkeit gleich mehrere überlebensnotwendige Mechanismen des Pathogens attackiert und eine gute Wirksamkeit gegen Biofilme zeigt^[1259]. Neben neuen Antibiotika zeigen sich auch AmP als sehr effektive Substanzen, um das Pathogen^[1260,1261] und seine individuellen Phänotypen^[1262,1263] zu bekämpfen. Ebenfalls vielversprechend sind neue Methoden, welche den Wirkstoff am Wirkungsort konzentrieren^[1233,1234,1264]. Ein präziser Einsatz ermöglicht so auch die Nutzung sonst unverträglicher Substanzen wie beispielsweise Enzyme^[1244]. Ebenso wurden neue Arzneimittel zur erfolgreicherer Dekolonisierung von Patienten entwickelt^[1265]. Auch gibt es die Aussicht, antimikrobielle Substanzen mit neuen Wirkungsweisen aus anderen Grundstoffen zu beziehen, um das Spektrum an Wirkstoffen zu erweitern^[1266,1267]. Speziell gegen Biofilme wurden erst kürzlich natürliche und synthetische Wirkstoffe gefunden und entwickelt, welche vielversprechende Aussichten bei der Bekämpfung dieses Phänotypen bieten^[1142,1268,1269]. Hierbei wurden auch Antibiotika entwickelt, welche effizient gegen die

besonders widerspenstigen Schläfer wirken oder deren Anfälligkeit gegenüber antimikrobiellen Substanzen verstärken ^[1270,1271]. Unterstützend zu diesen Substanzen zeigen neue Behandlungsmethoden und Neuentwicklungen in der Nanotechnologie ^[1272] sowie spezifisch gegen Biofilme gerichtete Antikörper ^[1273,1274] eine vielversprechende Wirkung. Besonders bei der Behandlung von Implantat-assoziierten Biofilmen wurden neuartige elektrochemische Verfahren entwickelt, welche die bisher schwierige Behandlung vereinfachen und erfolgreicher machen sollen ^[1232,1275,1276]. Gegen die oftmals intrazelluläre kleine Kolonien-Variante gibt es bisher keine zugelassenen Arzneimittel mit guter Wirkung. Antikörper, welche mit antibiotischen Substanzen konjugiert sind und das Antibiotika Plectasin zeigen allerdings sehr vielversprechende Ergebnisse bei der Vernichtung dieses Phänotyps ^[1234,1277]. Darüber hinaus wurden Methoden entwickelt, um befallene Makrophagen ohne Kollateralschaden von intrazellulären Besetzern zu befreien ^[1278,1279].

Neue Impfstoffe mit multivalenten ^[1280,1281] und geeigneteren ^[1282,1283] Antigenen sowie besseren Adjuvantien ^[1230,1284] sind bereits in der Testphase oder in ihren klinischen Studien. Sehr vielversprechend sind hierbei Impfstoffe, deren Antigen auf Mechanismen abzielen oder ignorieren ^[3,1285,1286], die *Staphylococcus aureus* nutzt, um dem Immunsystem zu entgehen, in vielen Bakterienstämmen vertreten sind und sehr bereitwillig präsentiert werden ^[1287,1288]. Auch bei Impfstoffen, welche gegen Antigene wirken, die für die Aufnahme von Eisen ^[1289] und Mangan ^[1290] essenziell sind, konnten in ersten Tests eine effektive Reduzierung der Bakterienzahl festgestellt werden. Zu den neuen Impfstoffen, die aktuell erforscht werden und in der klinischen Phase sind, zählen auch einige, die auf Toxine ^[1230,1291,1292] und Superantigene ^[1293,1294] als Antigen abzielen, um dem Wirt keinen vollständigen, aber dafür zuverlässigen Schutz gegen bestimmte Krankheiten zu bieten. Unterstützend zu diesen Impfstoffen zeigen Adjuvantien, die eine Stimulation der T-Zellen ermöglichen, eine sehr gute Wirkung und erhöhen die Erfolgsquote bei diesen Impfungen ^[1147,1230,1291]. Ein besonders interessantes Ziel für eine Impfung könnten hierbei die gewebespezifischen T-Zellen sein. Sie sind sehr zahlreich, befinden sich bei Haut- und Weichgewebeeinfektionen in unmittelbarer Nähe zum Infektionsherd und die Beteiligung dieser Zellen an einer Bekämpfung gegen das Pathogen ist bereits bekannt ^[1165,1295]. Intradermale Impfungen gegen Viren zeigen bereits mit sehr wenig Antigen sehr gute Ergebnisse darin, eine entsprechende Immunantwort dieser gewebespezifischen T-Zellen zu induzieren. Sie stellen ein gutes Impfverfahren dar, um dieselbe Sicherheit auch gegen Antigene von *Staphylococcus aureus* zu erreichen ^[1296,1297]. Eine ebenso vielversprechende Wirkung hat in einigen Fällen die Impfmethode *prime and pull* gezeigt ^[1165]. Bei dieser Methode wird Antigen injiziert und T-Zellen werden gleichzeitig durch die topische Anwendung von Lockstoffen in bestimmtes Gewebe rekrutiert. In diesem Gewebe bilden sich dann größere Mengen von gewebespezifischen T-Gedächtniszellen aus, welche bei erneutem Kontakt eine schützende Sekundärantwort aktivieren ^[1298,1299]. Während T-Zellen

eine wichtige Rolle in der Immunantwort gegen *Staphylococcus aureus* spielen und auch unabhängig einer humoralen Antwort eine schützende Wirkung haben können, ist der Schlüssel zu einem effektiven Impfschutz mit großer Wahrscheinlichkeit eine kombinatorische Wirkung aus aktivierten T-Zellen und opsonisierenden oder neutralisierenden Antikörpern [1078,1146]. Während die Effizienz von den humoralen Antworten bisher nicht ausreichend war, zeigt ein neuer multivalenterer Impfstoff mit vier Antigenen in der Testphase, dass er auch unabhängig von einer T-Zell-Antwort einen effektiven Schutz erzeugen kann [1300]. Zum Zweck einer passiven Immunisierung gibt es neue, erfolgversprechende Impfungen, die hauptsächlich darauf abzielen die Schwere der Infektion zu reduzieren. Vorzugsweise sind hier ein oder mehrere Toxine [1301,1302] und Superantigene [1303,1304] von *Staphylococcus aureus* das Ziel der injizierten Antikörper. Auch sind Antikörper-Antibiotika-Konjugate vielversprechende Kandidaten für zukünftige Arzneimittel zur therapeutischen Behandlung von Infektionen [1233,1234].

Speziell T-Zell-stimulierende Impfstoffe haben in den letzten Jahren erstaunliche Fortschritte gemacht [1305]. Der Einsatz eines mRNA-Impfstoffes, eine relativ neue Technologie, die ihre Sternstunde während der SARS-CoV-2-Pandemie hatte, wurde noch nicht bei *Staphylokokken* eingesetzt [1306,1307]. Im Kampf gegen *Staphylococcus aureus*, speziell gegen die kleine Kolonien-Variante, könnte die Wirksamkeit eines solchen Impfstoffes aber sehr vielversprechend sein. Tatsächlich zeigen erste Versuche mit mRNA-basierten Impfstoffen gegen *Streptokokken* bereits sehr vielversprechende Ergebnisse [1308]. Da diese Art von Impfstoff hauptsächlich PRR, die auf RNA reagieren, aktiviert, wird eine T-Zell-Population angeregt, welche prädominant aus T_H1-Zellen und zytotoxischen T-Zellen besteht und nach ihrer Aktivierung große Mengen an **IFN- γ** freisetzt [899]. Bei T-Zell-basierten Impfstoffen ist allerdings zu bedenken, dass die Aktivierung von T-Zellen zweiseitig ist und eine Überaktivierung der T-Zellen Autoimmunerkrankungen und folgeschwere Kollateralschaden im Wirtssystem verursachen kann [733,1309,1310]. Die wichtigste und zugleich schwerste Aufgabe wird es deshalb sein, den Impfstoff so anzupassen, dass T-Zellen mit der notwendigen Potenz für einen effektiven Impfschutz aktiviert werden, ohne dabei einen schwerwiegenden nachteiligen Effekt hervorzurufen [1311].

Viele der in Kapitel 2.3.5.3 „**Neue und unkonventionelle Behandlungen**“ aufgelisteten Methoden zeigen gute Ergebnisse in der Bekämpfung des Pathogens und bieten sich als Grundlage für effektive Methoden an, um ihn zu bekämpfen. Neue pharmakologische Entwicklungen lassen eine direkte Manipulation von Immunzellen zu, um diese in ihrer Effizienz zu unterstützen oder nachteilige Effekte und Mechanismen zu unterbinden [1312-1314]. Die unglaubliche Komplexität, welche *Staphylococcus aureus* in der Interaktion mit dem Menschen zeigt, erschwert den effektiven Einsatz einer solchen Manipulation jedoch

enorm ^[1315]. Auch ist, wie bei einer T-Zell-Impfung, Vorsicht geboten, da durch die direkte Beeinflussung von Immunzellen negative Auswirkungen und Überreaktionen möglich sind ^[1316].

Eine gute Plattform, um wichtige Details über die Interaktion zwischen *Staphylococcus aureus* und Antikörpern zu erforschen, sind Phagen-Displays. Über Immun- oder Universalbibliotheken könnten effektive Antigene selektiert und die Erbinformation aus den Phagen, die an diesen Virulenzfaktoren binden, rekombinant als *scFvs* exprimiert werden ^[1142,1317]. *scFvs* können aufgrund ihrer geringen Größe tiefer in Gewebe und Biofilme eindringen und können in der rekombinanten Produktion so modifiziert werden, dass sie besser am Antigen binden ^[1318]. Ebenso können sie so entworfen werden, dass sie bispezifisch sind ^[1319-1321] und von den immunevasiven Proteinen des Pathogens ignoriert ^[1322] werden. Zusätzlich sind die *scFvs* in Unabhängigkeit zum Immunsystem in der Lage, einen bakteriziden Effekt auszuüben ^[1323-1325]. Sehr wahrscheinlich können sie in Kombination mit Vancomycin dessen Wirksamkeit verstärken und bieten deshalb eine gute Möglichkeit, bei der kombinatorischen Verabreichung Resistenzen vorzubeugen ^[1326,1327]. In dieser Funktion können sich die *scFvs* wie AmP verhalten und beispielsweise durch ihre positive Ladung die Integrität der Zellwand kompromittieren ^[1328,1329]. Durch das Potential und die Modifizierbarkeit der *scFvs*, sind sie für die Entwicklung eines wirkungsvollen passiven Impfstoffes sehr gut geeignet ^[1317,1330,1331]. Tatsächlich wurden durch ein solches Phagen-Display bei einem Panning gegen eine Universalbibliothek bereits erfolgreich drei *scFvs* gefunden, welche bei guter Verträglichkeit das Bakterienwachstum und den Infektionsverlauf in Versuchstieren signifikant einschränken konnten ^[1322].

Die Vereinfachung und Verbesserung von Sequenzierungs- und Screeningmethoden ermöglicht es, die Genetik und das Proteom von Wirt ^[1332,1333] und Pathogen ^[1333], deren Interaktion sowie molekulare Effekte von Immunzellen, welche zur Zerstörung von Krankheitserregern beitragen, besser nachzuvollziehen ^[252,1311]. Diese Informationen können grundlegend dazu beitragen, neue Mechanismen zu finden, um das Pathogen einzudämmen ^[1311,1334]. Mit der Entdeckung, dass das angeborene Immunsystem ebenfalls über ein Gedächtnis verfügt und dies einen Effekt auf den Verlauf einer Infektion haben kann, öffnet sich auch ein völlig neues Forschungsfeld, das effektive Wirkstoffe hervorbringen könnte ^[56,1335]. Das humane Mikrobiom-Projekt könnte ebenfalls dabei helfen, neue wirkungsvolle Substanzen oder Therapien zu entwickeln und die Kolonisierung sowie Infektion durch das Pathogen zu verstehen ^[1336]. Das Mikrobiom von gesunden Menschen innerhalb der Nase unterscheidet sich stark von dem eines besiedelten oder infizierten Menschen ^[449]. Bakterien innerhalb dieses Mikrobioms können sich gegenseitig beeinflussen, fördern oder behindern ^[1337]. So wurde beispielsweise schon beobachtet, dass *Bacillus subtilis* und

Staphylococcus aureus Antagonisten sind, die nicht koexistieren können^[1338]. Ebenso üben die Bakterien *Staphylococcus caprae*^[1339], *Staphylococcus epidermidis*^[1340,1341], *Staphylococcus lugdunensis*^[450], *Staphylococcus staphylolyticus*^[1342], *Streptococcus pneumoniae*^[1343,1344], *Propionibakterien*^[449] und *Pseudomonas aeruginosa*^[1345] biochemischen Einfluss auf *Staphylococcus aureus* aus. Sie dezimieren diesen oder verhindern eine Besiedlung^[1346]. Andere Bakterien, wie beispielsweise *Corynebakterien*, konkurrieren mit dem Pathogen im *Vestibulum nasi* um die Besiedlungsfläche und können diesen vertreiben^[1347,1348]. Es gibt aber auch Bakterien, die eine Kolonisierung von *Staphylococcus aureus* begünstigen^[1349]. Diese Entdeckungen könnte dabei helfen zu bestimmen, ob eine Person anfällig für eine Besiedlung ist. Auch wird dadurch die Suche nach neuen Substanzen beschleunigt, die gegen den Krankheitserreger eingesetzt werden können.

Mit Voranschreiten der Forschung werden sich neue Möglichkeiten entwickeln, um die Effizienz eines Impfstoffes zu beurteilen. Neue Biomarker^[919], Bildgebungstechniken^[1350], Organoide^[1133], bessere Diagnostik^[1272] und Tiermodelle^[1133] werden es ermöglichen die Effizienz eines Impfstoffes und Antikörpertiter von Patienten besser zu bestimmen. Bessere Tiermodelle^[1351,1352] und auf Nanotechnologie basierendes Screening^[1272,1353-1355] zeigen bereits eine deutlich verbesserte Möglichkeit zur Diagnostik und Evaluation. Jede Information, die durch die Forschung an diesem Krankheitserreger und der Interaktion mit Säugetieren erlangt wird, bringt uns ein Stück in der Entwicklung eines effektiven Schutzes weiter. Ein großer Meilenstein wird es hierbei sein, ein effektives Mittel gegen intrazellulären *Staphylococcus aureus* zu finden. Wenn dieser Punkt erreicht ist, kann sich die Forschung allerdings nicht auf ihren Lorbeeren ausruhen, da es sonst nur eine Frage der Zeit ist, bis wir im Wettrüsten gegen das Pathogen wieder in Rückstand geraten. Er wird immer mit uns koexistieren und das Bakterium hat schon mehr als einmal gezeigt, wie anpassungsfähig und flexibel es sein kann. Aus diesem Grund werden wir neue innovative Technologien brauchen, um das Pathogen im Zaum zu halten.

2.4 Das Prinzip der stochastischen Peptidarrays^[43-45,1356]

Stochastische Peptidarrays sind ein Format von kostengünstigen Arrays, in welchem die Herstellung von zufällig generierten Peptiden im ultrahochdichten Durchsatz mit Hilfe der Ein-Loch-ein-Peptid-Methode erreicht wird. Ihre Herstellung basiert auf der Beladung eines mikrostrukturierten Glasträgers mit ~ 2,8 bis ~3,2 Mio. individuellen Reaktionsräumen (Abbildung 8) durch vorgefertigte und markierte Mikropartikel, welche unter bestimmten Bedingungen Aminosäuren disseminieren. Die Größe der Mikrostrukturen ist dabei so angepasst, dass nur ein Mikropartikel in jede Kavität des Glasträgers passen kann. Mit Hilfe der Markierung lässt sich nach der Beladung überprüfen, mit welcher Aminosäure jeder

einzelne Partikel assoziiert werden kann, der eine Kavität befüllt hat. Durch anschließende Freisetzung der Aminosäuren und folgender Merrifield-Synthese kann so in mehreren Durchläufen in jeder Kavität ein individueller Peptidspot aus zufällig generierten Peptiden erzeugt werden. Bei einer so großen Anzahl von stochastisch erzeugten Peptiden ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass einige davon einen potentiell toxischen Effekt gegen Mikroorganismen aufweisen können.

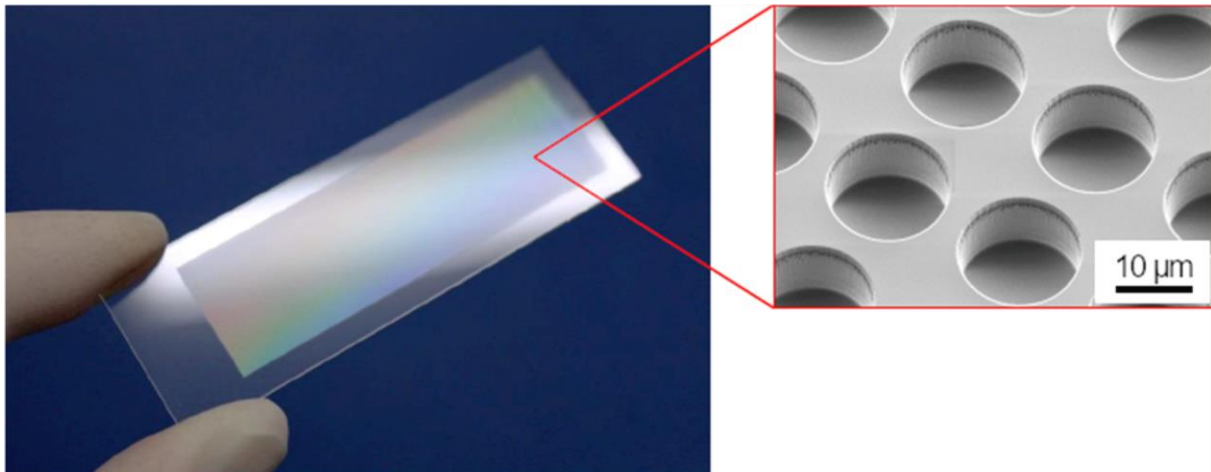


Abbildung 8: Darstellung eines mikrostrukturierten Glasträgers aus Quarzglas mit vergrößertem Ausschnitt seiner Mikrostrukturen. Die ~ 2,8 Mio. Kavitäten sind auf einer Fläche von 75,0 x 25,0 mm² durch einen Durchmesser von 12,0 µm und einer Tiefe von 10,0 µm bei einem Abstand von 8,0 µm definiert. Sie dienen als individuelle Reaktionsräume während der Peptidsynthese. Das Bild entstammt der Dissertation von Roman Popov (2018) [1356]. Es ist über eine internationale, nicht-kommerzielle Namensnennung-Lizenz 4.0 mit der Weitergabe unter gleichen Bedingungen von *Creative Commons* (CC BY-NC-SA 4.0) geschützt^[6].

Die Herstellung der stochastischen Peptidarrays selbst ist die Hauptaufgabe anderer Dissertationen. In dieser Arbeit wird die Möglichkeit überprüft, ob die Wirkung von toxischen Peptiden, welche potentiell durch den Array produziert werden, durch einen bakteriellen Reporterstamm nachgewiesen werden können.

2.4.1 Antimikrobielle Peptide

Natürlich erzeugte AmP sind in Lebewesen keine Seltenheit. So besitzt der Mensch bereits ein großes Repertoire an diesen Peptiden, um sich gegen pathogene Organismen zur Wehr zu setzen [1357,1358]. Einige synthetisch hergestellte oder natürlich isolierte Peptide, besitzen antibakterielle Aktivität wodurch sie als potentielle Antibiotika sehr vielversprechende Wirkung zeigen [1359-1361]. Daptomycin, eines der Antibiotika mit der stärksten bekannten antimikrobiellen Wirkung, beruht auf einer Peptidbasis [1362]. Auch wurde schon der Einsatz von Peptiden als wirkungsvolle Trägersubstanz gezeigt, um gekoppelt an antibiotischen Substanzen, deren Wirksamkeit zu konzentrieren [1363]. Bac8c ist ein verbessertes Derivat von Bac2A, welches in

einem Hochdurchsatz-Screening selektiert wurde. Es ist ein sehr wirkungsvolles Peptid gegen *Staphylococcus aureus* und ist ein gutes Beispiel für die Veranschaulichung, wie Hochdurchsatzverfahren dabei helfen können, neue Wirkstoffe gegen pathogene Organismen zu entdecken [1360,1364]. Die Ein-Loch-Ein-Peptid-Methode hat ein großes Potential, weitere antibiotisch wirksame Substanzen zu finden, damit der Wettlauf gegen antimikrobielle Resistenzen gewonnen wird.

2.4.2 Beladung von Bakterien in den mikrostrukturierten Träger [44,1365]

Zur Beladung der mikrostrukturierten Träger bedarf es einer speziellen Befüllungskammer (Abbildung 9) inklusive Fluidiksystem, um sicherzustellen, dass alle Kavitäten mit Bakterien gefüllt werden und während des Inkubationsprozesses nicht austrocknen. Diese Befüllungskammer wurde während der Masterarbeit von Matthias Forscher entwickelt und innerhalb der Dissertation von Zekun Zhou weiterentwickelt und verbessert, um eine Befüllung des Glasträgers mit Mikropartikeln und die Inkubation von Mikroorganismen innerhalb der Befüllungskammer zu ermöglichen. Bei der Befüllung von hydrophoben Glasträgern wird der Flüssigkeitspegel als Meniskus über die Kavitäten gezogen und dadurch ein hydrostatischer Effekt erzeugt, durch welchen die Bakterien in die Kavitäten gepresst werden.



Abbildung 9: Der Glasträger wird mit Hilfe einer Kunststoffdichtung passend zwischen zwei großen Quarzglasplatten gepresst und über Öffnungen in der Dichtung mit dem Fluidiksystem verbunden. Zwischen dem Träger und der langen Glasplatte entsteht ein Fluidikkanal, in welchem nach der Befüllung eine Kontaktfläche zwischen Mikrostrukturen und Bakteriensuspension entsteht. Das Bild wurde mit der Erlaubnis des Autors, Zekun Zhou, verändert und übernommen [44].

2.4.3 Eigenschaften des bakteriellen Reporterstammes ^[1366,1367]

Als Reporter für mögliche antibakterielle Substanzen wird das von Ahmed Zoheir, während seiner Dissertation entwickelte *RGB-S* Reporter Vektorsystem verwendet. In einem Bakterium transformiert, verleiht es diesem die Fähigkeit, fluoreszierende Proteine unter dem Einfluss einer subletalen Dosis von zytotoxischen, genotoxischen und physiologischen Stressoren zu exprimieren. Voneinander unabhängige Kombinationen von Promotoren und codierenden Genen für fluoreszierende Proteine erlauben hierbei eine präzise Unterscheidung der Stressarten. Eine optimierte Auswahl der korrelierenden Anregungs- und Emissionswellenlängen erlaubt es, alle drei Fluorophore gleichzeitig ohne Interferenzen oder ungewollten Energietransfer zu detektieren. Auf dem Plasmid ermöglicht der Regulator *rpoS*, welcher an ein rot fluoreszierendes Protein (**mRFP1**) gekoppelt ist, die Sensorik für Stress, welcher durch Nährstoffmangel ^[1368], Säure ^[1368], hydrostatischem Druck ^[1369,1370] und Dehydration ^[1371] ausgelöst wird. Über Komponenten der SOS-Antwort wird die Expression des blau fluoreszierenden Proteins (**mTagBFP2**) gesteuert, welche durch DNA-Schäden ^[1372,1373], ultraviolette Strahlung ^[1374], Alkalisierung ^[1375], Oxidierung ^[1376] und Exposition durch Bakteriophagen ^[1377] aktiviert wird. Der zytotoxische Stress wird über den σ -Faktor *rpoH* detektiert, welcher an die Produktion eines grün fluoreszierenden Proteins (**GFPmut3b**) geknüpft ist. Als Teil der Hitzeschockantwort wird es vermehrt durch ungefaltete Proteine ^[1378,1379], Hitzedenaturierung ^[1378], Alkalisierung ^[1380], Oxidierung ^[1381] und durch die umgebende Flüssigkeit verursachten hyperosmotischen Druck ^[1382] ausgelöst. Sowohl *rpoS* als auch die SOS-Antwort werden als Gegenmaßnahme auf die toxische Wirkung gegen manche Antibiotika aktiviert und sorgen im Wildtyp für Abwehrreaktionen, welche der Toxizität entgegenwirken ^[1383-1385]. Eine für das Bakterium toxische Substanz kann hierbei auch mehrere Promotoren gleichzeitig aktivieren ^[1386,1387].

Der Vektor ist ein Sensor verschiedener Stresssignale, der bereits aktiviert wird, wenn der Stressor in einer subletalen Konzentration vorliegt. Diese Signale werden in Form von fluoreszierenden Proteinen in eine messbare Form umgewandelt. Sowohl die Empfindlichkeit als auch die große Bandbreite an Stresstypen machen ihn deshalb zu einem vielversprechenden Reportersystem zum Einsatz im stochastischen Peptidarray. Die Anregungs- und Emissionsspektren der von dem Reporterstamm exprimierten Proteine sind in Diagramm 1 dargestellt.

Anregungs- und Emissionsspektren der fluoreszierenden Proteine des *RGS-S* Reporter Vektors

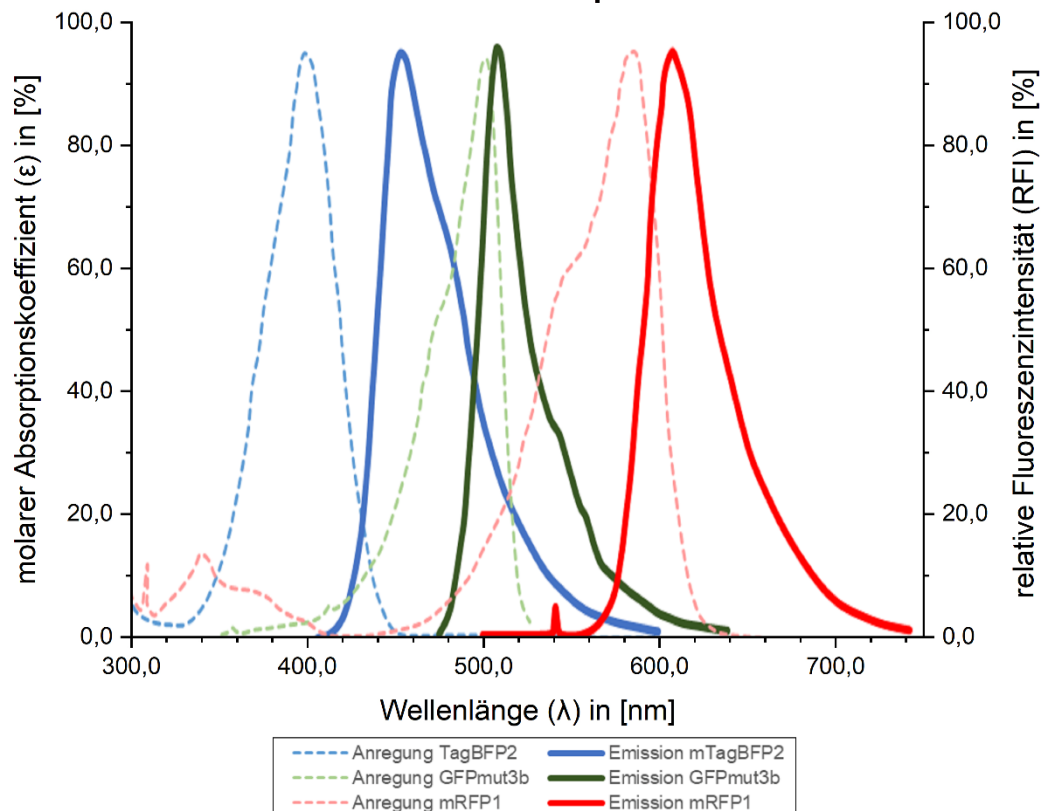


Diagramm 1: Alle Anregungs- und Absorptionswellenlängen der fluoreszierenden Proteine des *RGS-S* Reporter Vektors. Ein Bakterium, welches diesen Vektor erhält, kann unter Stresseinfluss fluoreszierende Proteine als detektierbares Signal exprimieren. Das Diagramm ist aus der Dissertation von Ahmed Zoheir mit seiner Erlaubnis entnommen und angepasst ^[1366].

3 Ziel der Arbeit

Mit dieser Arbeit soll primär dazu beigetragen werden, die Herkunft und Funktion des Anti-**Emp**-Antikörpers zu erforschen. Dieser Beitrag ermöglicht das bessere Verständnis des Verhältnisses zwischen Wirt und Pathogen und macht dieses Wissen für zukünftige Impfversuche verfügbar. Die Forschungsarbeit demonstriert hierbei die Effizienz und Möglichkeiten, welche sich durch die Analyse der molekularen Interaktion zwischen Antikörper und Epitop bieten. Sie ermöglicht es, die Korrelation der Bindungsaffinität zwischen besiedelten Patienten und Patienten ohne Besiedlung zu ermitteln. Zu diesem Zweck werden Blutseren dieser Patienten durch Immunfärbungen auf die Existenz des Antikörpers untersucht und die resultierende Signalstärke und das Signalmuster miteinander verglichen. Von Personen mit einer sehr ausgeprägten Signalstärke kann der Antikörper durch Affinitätschromatographie über seinen Antikörper-Fingerabdruck spezifisch für experimentelle Zwecke isoliert werden. In den Experimenten soll die Affinität zum Bindungspartner des Antikörpers *in vitro*, *in situ* und *in vivo* nachgewiesen werden. Durch Ultraleistungsflüssigkeitschromatographie (UPLC)-gekoppelte Massenspektrometrie (MS) von enzymatisch verdautem Antikörper wird, unterstützt durch Immunfärbung, die strukturelle Beschaffenheit der einzelnen Antikörperketten analysiert. Ebenso werden Versuche durchgeführt, um die korrespondierenden B-Zellen, welche den Antikörper exprimieren, für weitere Studienzwecke aus dem Vollblut aufzureinigen. Im Abschluss der Arbeit wird das antibakterielle Potential von Anti-**Emp** anhand eines OPTA bestimmt wird. Dieses Potential ist ein ausschlaggebender Indikator dafür, ob der Antikörper sich als aktiver Impfstoff eignet. Um es zu bestimmen, wird die Aktivität von neutrophilen Zellen gegen *Staphylococcus aureus* nach einer Opsonisierung mit dem Antikörper bestimmt. Zur Evaluierung der Wirksamkeit werden ein Bakterienstamm mit niedriger und hoher Virulenz im Vergleich untersucht. Bei dieser Evaluierung wird ebenso die Kreuzreaktivität des Antikörpers anhand eines Bakterienstammes aus einem anderen klonalen Komplex bestimmt.

Ein weiteres Ziel ist die Untersuchung des Verhaltens von Bakterien und humanen Zellen in einem mikrostrukturierten Glasträger. In einer solchen Umgebung werden sowohl Cyanobakterien mit natürlich fluoreszierendem Chlorophyll als auch mit fluoreszierendem Farbstoff markierte Bakterien untersucht. Im Anschluss werden auch ein Reporterstamm und Erythrozyten auf ihr Verhalten innerhalb der Mikrostrukturen getestet. Hierbei wird ein Verfahren entwickelt, wodurch die Testobjekte zuverlässig in die Kavitäten platziert und dort am Leben erhalten werden können. Über Mikroskope und einen speziell für die Glasträger entworfenen makrophotographischen Aufbau werden die Testobjekte während der Versuche detektiert und die Homogenität und Diffusion dokumentiert. Die Diffusion ist hierbei

ausschlaggebend für das Konzept des stochastischen Peptidarrays, da eine ungewollte Vermischung der Bestandteile zwischen den Kavitäten vermieden werden muss.

Über die Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (*MIC*) wird eine antimikrobielle Substanz bestimmt, welche bei dem Reporterstamm ein messbares Signal bei subletaler Dosis erzeugt. Dieses Peptid wird in einen konzeptionellen Beweis der Durchführbarkeit eines stochastischen Peptidarrays mit einem Photo-Linker an einen veredelten mikrostrukturierten Glasträger geknüpft. Durch Spaltung des Photo-Linkers lässt sich der Zeitpunkt kontrollieren, zu welchem sich der Reporterstamm mit dem Peptid vermischt. Eine anschließende Detektion der fluoreszierenden Proteine innerhalb der Kavitäten ermöglicht es, die Ergebnisse des konzeptionellen Beweises zu bewerten.

4 Ergebnisse

4.1 Substitutionsanalysen von Patientenseren

Substitutionsanalysen von Blutseren werden als Werkzeug verwendet, um die essenziellen Aminosäuren eines Epitops bei der Interaktion eines Antikörpers mit seinem Antigen zu bestimmen. Um diese zu ermitteln, wird das Serum eines jeden Patienten auf *PEPperCHIP*[®] Peptid-Mikroarrays inkubiert, damit die im Serum enthaltenen Anti-**Emp**-Antikörper über ihre Affinität mit den Peptidspots interagieren. Die Peptidspots sind in einem rechteckigen Array angeordnet und sie entsprechen jeweils einem Derivat der Originalsequenz oder der Originalsequenz selbst. In jedem Derivat wird an einer Position (Pos.) des Epitops die Aminosäure durch eine der 20 proteinogenen Aminosäuren festgelegt. An welcher Position die Aminosäure substituiert wird, ist durch die Zeilen des Arrays vorgegeben. Welche Aminosäure an dieser Position anstelle der originalen Aminosäure eingesetzt wurde, ist anhand der Spalte definiert. Für die Experimente wird je nach Konfiguration die Aminosäuresequenz ‚**HYVPEFKGSLPAPRV**‘ vollständig oder teilweise substituiert. In der Forschungsarbeit von Simone Rentschler wurde diese Sequenz in einer Epitopkartierung als Epitop des Anti-**Emp**-Antikörpers festgestellt ^[48].

Jeder Chip besitzt zur Kontrolle der Chipqualität zusätzlich einen Rahmen aus Peptidspots, welche abwechselnd aus Hämagglutinin- und Poliomyelitis-Epitopen bestehen. Das Poliomyelitis-Epitop entspricht hierbei einem Antigen, gegen die ein großer Anteil der menschlichen Bevölkerung Antikörper ausgebildet hat. Aus diesem Grund reagieren die meisten Patientenseren auf diese Spots, sodass diese ohne eine weitere Markierung des Hämagglutininepitops als Kontrolle der Chipqualität verwendet werden können.

Die Substitutionsanalysen von dem Epitop des Anti-**Emp**-Antikörpers werden zur Analyse in zwei unterschiedlichen Formaten eingesetzt. Um den Antikörper-Fingerabdruck, die Konsensussequenz und den individuellen Peptidspots im Detail zu ermitteln, bietet der Mikroarray in Fünfer-Konfiguration präzise Messwerte. In dieser Konfiguration wird jede Substitutionsanalyse von dem Epitop ‚**HYVPEFKGSLPAPRV**‘ in dreifacher Ausführung mit Serum eingefärbt. Das reduziert die Fehleranfälligkeit der individuellen Peptidspots und steigert die Zuverlässigkeit der Ergebnisse. Substitutionsanalysen in 16er-Konfiguration sind merklich anfälliger für Messfehler, da jede Färbung nur als Unikat durchgeführt wird. In dieser Konfiguration ist das Epitop, welches substituiert wird, auf die Sequenz ‚**VPEFKGSLP**‘ begrenzt. Sie bieten sich als kostengünstige Alternative zu der Fünfer-Konfiguration an, wenn keine präzisen Messwerte der individuellen RFI von den Peptidspots notwendig sind oder eine große Menge an parallelen Proben getestet werden muss. Die Qualität der Peptid-Mikroarrays

ist von der Produktionscharge abhängig. Deshalb lassen sich absolute Messwerte von Substitutionsanalysen verschiedener Patienten nur vergleichen, wenn alle verwendeten Arrays aus derselben Charge stammen oder auf demselben Glasträger untersucht werden.

Alle Patientenserumproben werden zur Analyse des Antikörper-Fingerabdrucks zur Primärfärbung auf Peptid-Mikroarrays in Fünfer-Konfiguration aus unterschiedlichen Chargen verwendet. Zum Vergleich der Signalstärke der Patientenserumproben untereinander werden diese parallel zur Primärfärbung in Peptid-Mikroarrays mit 16er-Konfiguration aus gleicher Charge eingesetzt. Nach den Primärfärbungen werden alle Substitutionsanalysen in der Sekundärfärbung gegen die Antikörpertypen **IgG** und **IgA** markiert. Im Anschluss an die Sekundärfärbung werden alle Substitutionsanalysen auf einem *PEPperCHIP*[®] Peptid-Mikroarray unter den gleichen Bedingungen mit Hilfe von Fluoreszenzbildgebung als Graustufenbild dokumentiert. Die dokumentierten Peptidspots werden durch den *PepSlide*[®] Analyzer unter denselben Detektionsbedingungen in Messwerte als RFU in verarbeitbare Daten umgewandelt. Hierbei wird der Median der RFI jedes einzelnen Peptidspots erfasst und mit dem Hintergrundrauschen verglichen. Jede gefärbte Substitutionsanalyse ergibt einen individuellen Antikörper-Fingerabdruck, welcher normalerweise aufgrund der zufälligen Selektion eines Antikörpers für jeden Patienten einzigartig sein sollte. Zur Darstellung in Abbildungen werden die Graustufenbilder in Falschfarben dargestellt. Für eine bessere Sichtbarkeit werden die Helligkeit und der Kontrast gleichermaßen verstärkt. Alle Sekundärfärbungen der Substitutionsanalysen in Fünfer-Konfiguration sind für **IgG** in Abbildung 10 und für **IgA** in Abbildung 11 dargestellt. Die Sekundärfärbungen der Substitutionsanalysen in 16er-Konfiguration sind für **IgG** in Abbildung 12 und für **IgA** in Abbildung 13 zusammengefasst.

Als Referenzwert der qualitativen Analyse ist in der Fünfer-Konfiguration das unveränderte Epitop von Anti-**Emp** in 45-facher Ausführung vorzufinden. Zur Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der anderen Peptidspots werden diese als Mittelwert zusammengefasst und dieser als Referenzwert für Normalisierungen verwendet. Aufgrund der chaotischen Natur von biologischen Versuchen^[1388] zeigen die individuellen RFI der einzelnen Spots eine Heterogenität auf. Das Berechnen der Standardabweichung (SA) erlaubt es, diese Heterogenität zu evaluieren und die Qualität des Ergebnisses einzuschätzen. Zeigt eine Substitutionsanalyse eines Patienten einen Defekt oder ein starkes Messartefakt, ist die SA überdurchschnittlich erhöht. Durchschnittlich liegt diese bei Substitutionsanalysen in der Fünfer-Konfiguration bei 50,0 %. Daher wird diese SA als Schwellenwert für defekte Ergebnisse verwendet. Überschreitet die SA des Mittelwerts, welcher sich aus den Signalstärken aller mit Patientenserum eingefärbten Peptidspots des originalen Epitops zusammensetzt, diese Schwelle, wird die Immunfärbung visuell begutachtet. Ist ein

Messartefakt in einem der Triplikate sichtbar, werden die Messergebnisse zutreffender Substitutionsanalysen bei der Zusammenfassung der Ergebnisse ausgeschlossen. Von individuellen Peptidspots, in welchen eine Aminosäure substituiert wird, wird ebenfalls der Mittelwert aus den Triplikaten gebildet. Zeigt ein Mittelwert eine SA von $\geq 65,0\%$, werden die Messwerte für diese Substitution eliminiert und nicht in die Zusammenfassung aufgenommen.

Für einen individuellen Vergleich der Patientenserum untereinander muss die Fluoreszenz der gesamten Substitutionsanalyse zusammengefasst werden. Zu diesem Zweck bietet es sich an, die RFI aller Peptidspots für jede Substitutionsanalyse in 16er-Konfiguration individuell als Gesamtfluoreszenzintensität (GFI) zusammenzufassen. Die GFI gibt keine präzise Aussage über die Affinität, absolute Menge oder Anzahl der involvierten Antikörper, ermöglicht aber eine Annäherung an die relative Menge an Anti-**Emp**-Antikörper, welche in jedem Patientenserum vorliegt und ermöglicht somit einen Vergleich der Seren untereinander. Auch bietet diese Zusammenfassung eine Toleranz gegenüber einer geringen Anzahl von fehlerhaften Messungen einzelner Substitutionen. Wie auch bei der Fünfer-Konfiguration werden Ergebnisse von der Zusammenfassung ausgeschlossen, wenn die SA des Mittelwertes der RFI aller Peptidspots des originalen Epitops eine bestimmte Schwelle überschreitet. Durchschnittlich zeigen die Substitutionsanalysen der 16er-Konfiguration eine SA von 53,8 %. Da die Substitutionsanalysen in dieser Konfiguration aber fehleranfälliger sind als in der Fünfer-Konfiguration, wird eine erhöhte Schwelle benötigt, damit genug Messwerte für einen sinnvollen Vergleich übrigbleiben. Die Schwelle ergibt sich daher aus der anderthalbfachen durchschnittlichen SA, welche auf 80,0 % aufgerundet wird. Jede Sekundärfärbung wird empirisch auf optische Fehler überprüft. Zeigt sich hierbei eine zu große Diskrepanz zwischen der GFI und der empirischen Evidenz, werden die Sekundärfärbungen zutreffender Seren ebenfalls aus der Zusammenfassung ausgeschlossen.

Substitutionsanalysen Patientenseren, Anti-IgG Fc *DyLight*[®] 680, Fünfer-Konfiguration

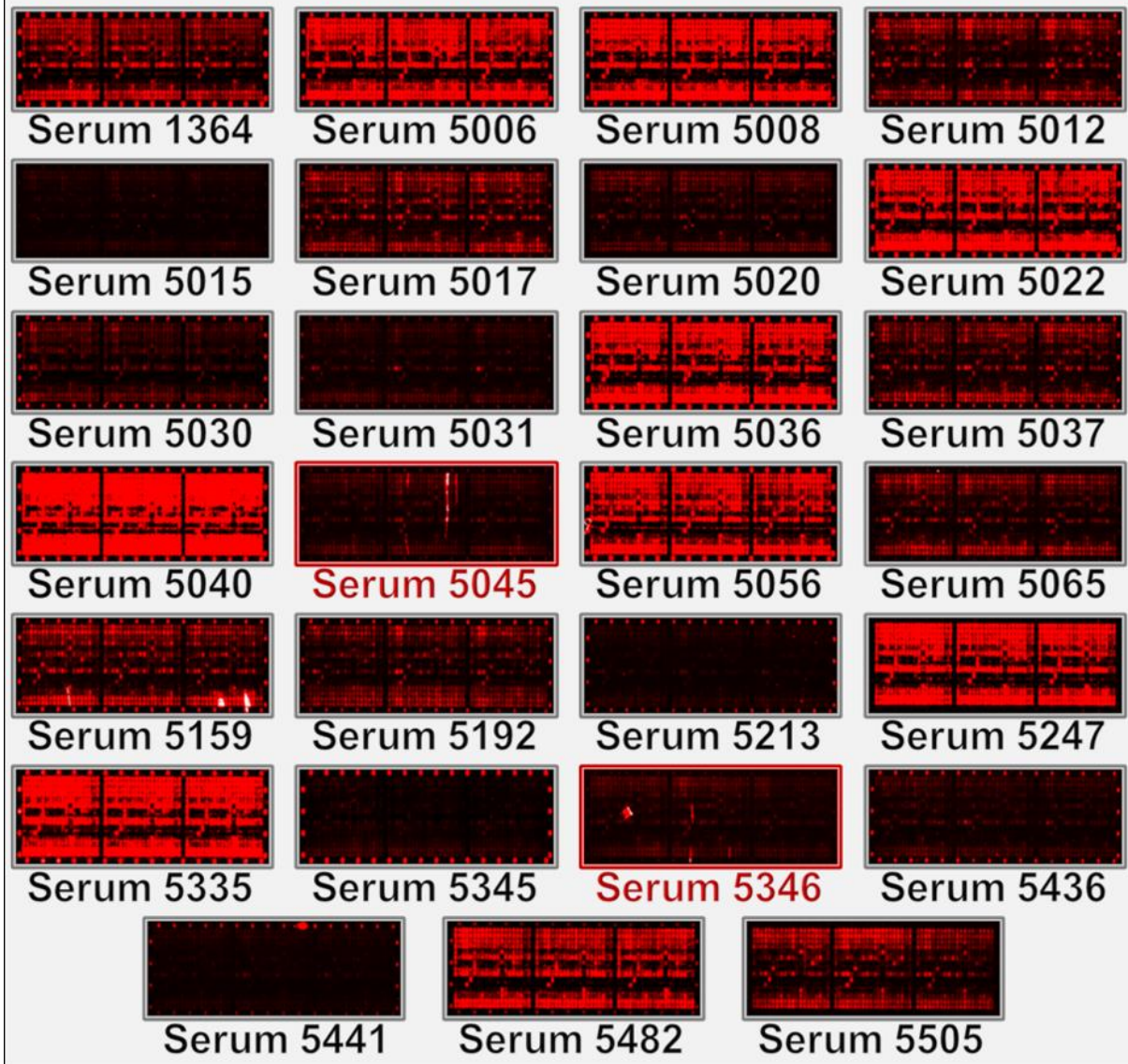


Abbildung 10: Mit Patientenseren inkubierte *PEPperCHIP*[®] Peptid-Mikroarrays auf einem Glasträger mit Fünfer-Konfiguration. Die Seren dienen als Quelle für den Primärantikörper und benetzen die Arrays in einem Verdünnungsverhältnis von 1:100. Gebundene Primärantikörper werden durch Anti-IgG Fc *DyLight*[®] 680 in der Sekundärfärbung markiert. Substitutionsanalysen, deren SA aufgrund von Messartefakten die Schwelle überschreiten, sind rot umrandet und markiert.

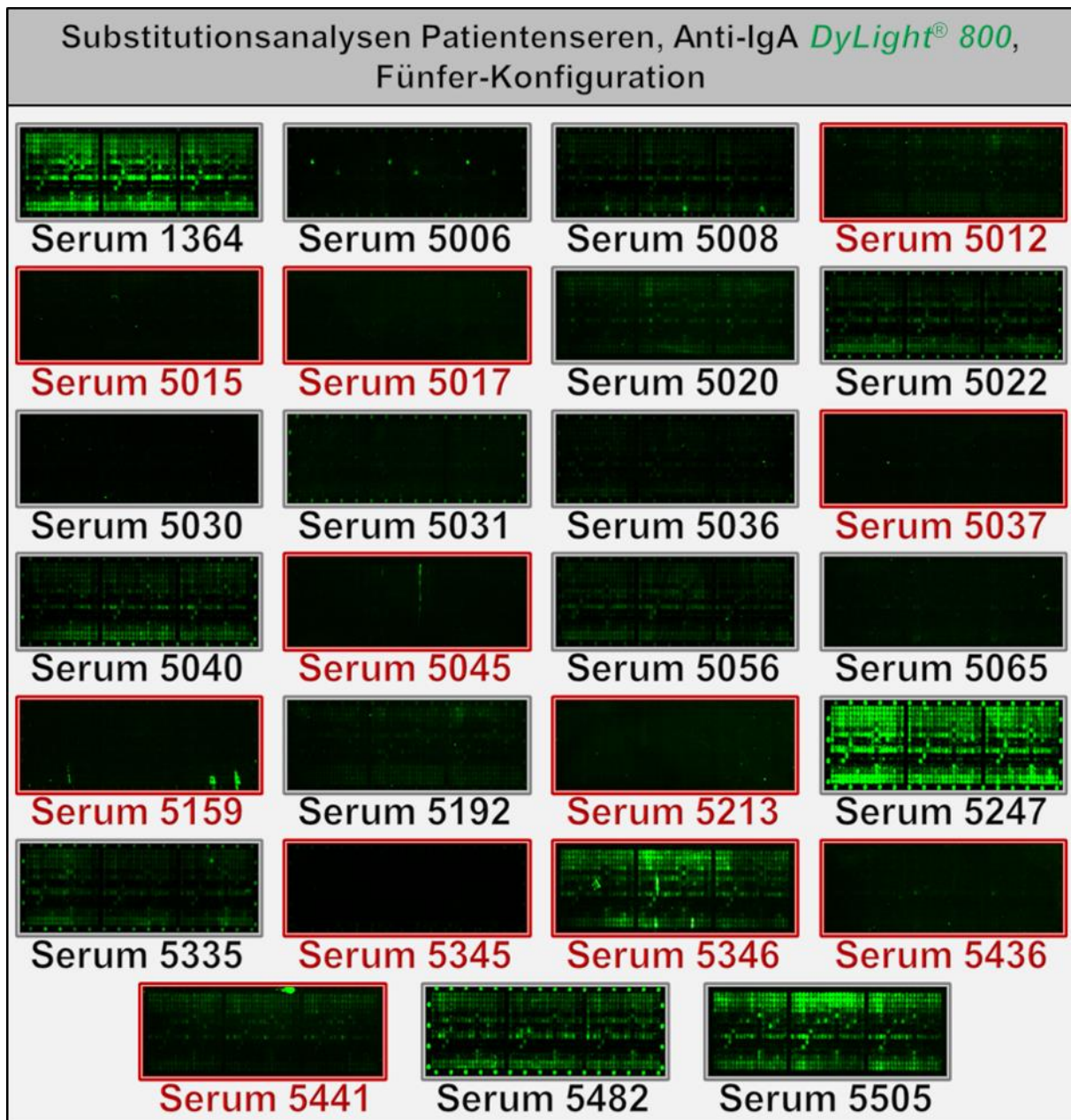


Abbildung 11: Mit Patientenseren inkubierte *PEPPERCHIP*[®] Peptid-Mikroarrays auf einem Glasträger mit Fünfer-Konfiguration. Die Seren dienen als Quelle für den Primärantikörper und benetzen die Arrays in einem Verdünnungsverhältnis von 1:100. Gebundene Primärantikörper werden durch Anti-IgA *DyLight*[®] 800 in der Sekundärfärbung markiert. Substitutionsanalysen, deren SA aufgrund von Messartefakten die Schwelle überschreiten, sind rot umrandet und markiert.

Substitutionsanalysen Patientenseren, Anti-IgG *Fc DyLight*[®] 680,
16er-Konfiguration



Abbildung 12: Mit Patientenseren inkubierte *PEPperCHIP*[®] Peptid-Mikroarrays auf einem Glasträger mit 16er-Konfiguration. Die Seren dienen als Quelle für den Primärantikörper und benetzen die Arrays in einem Verdünnungsverhältnis von 1:100. Gebundene Primärantikörper werden durch Anti-IgG *Fc DyLight*[®] 680 in der Sekundärfärbung markiert. Die Umrandung und Farbe der Arrays beschreibt folgende Charakteristika: Blau = keine Besiedlung vorhanden; Gold = Besiedlung vorhanden; Grün = unbekannter Status; Rot = Mittelwert des Epitops überschreitet Schwelle der SA oder zeigt große Diskrepanz zwischen Messwert und empirischer Evidenz.

Substitutionsanalysen Patientenseren, Anti-IgA *DyLight*[®] 800,
16er-Konfiguration



Abbildung 13: Mit Patientenseren inkubierte *PEPperCHIP*[®] Peptid-Mikroarrays auf einem Glasträger mit 16er-Konfiguration. Die Seren dienen als Quelle für den Primärantikörper und benetzen die Arrays in einem Verdünnungsverhältnis von 1:100. Gebundene Primärantikörper werden durch Anti-IgA *DyLight*[®] 800 in der Sekundärfärbung markiert. Die Umrandung und Farbe der Arrays beschreibt folgende Charakteristika: Blau = keine Besiedlung vorhanden; Gold = Besiedlung vorhanden; Grün = unbekannter Status; Rot = Mittelwert des Epitops überschreitet Schwelle der SA oder zeigt große Diskrepanz zwischen Messwert und empirischer Evidenz.

4.1.1 Analyse des Antikörper-Fingerabdrucks

Die im Vergleich zur Arbeit von Dr. Weber verhältnismäßig größere Anzahl an Patientenseren erlaubt es, ein besseres und zuverlässigeres Bild der Substitutionsanalyse des von ihr entdeckten Anti-**Emp**-Antikörpers und korrespondierendem Antikörper-Fingerabdruck ‚XPEFXGSXX‘ zu entwerfen^[43]. Zur Analyse der Antikörper-Fingerabdrücke werden *PEPPERCHIP*[®] Peptid-Mikroarrays in Fünfer-Konfiguration verwendet. Dies hat den Vorteil, dass in der Inkubationskammer für ein Serum jeweils drei identische Peptidarrays vorliegen, sodass man für jede Position einer Substitutionsanalyse drei individuelle Messwerte erhält. Entsprechend der Handhabung der Peptidarrays können sich Verunreinigungen und Artefakte bilden, welche das Messergebnis verfälschen und somit für eine weitere Auswertung invalidieren. Durch die Bestimmung der SA der Mittelwerte lassen sich solche Detektionsfehler lokalisieren und instabile Ergebnisse aussieben. Liegt der Standardfehler der Messwerte innerhalb einer Toleranzgrenze von 65,0 %, relativ zu deren Mittelwert, ist erfahrungsgemäß von einem stabilen Messwert auszugehen. Zur Auswertung einer Substitutionsanalyse werden die Mittelwerte einer jeden Substitution innerhalb des Peptidarrays mit dem Mittelwert der Originalsequenz des Epitops verglichen. Die Originalsequenz dient hierbei als Referenz für die zu erwartende Signalstärke bei der Interaktion des Anti-**Emp**-Antikörpers mit seinem tatsächlichen Antigen. Das Ziel ist es hierbei, Positionen innerhalb dieser Sequenz zu finden, an welchen nur eine geringe Anzahl an Aminosäuren ausgetauscht werden können, bevor die Interaktion zwischen Antikörper und Antigen kompromittiert wird. Diese Positionen werden als essenziell im Epitop des Antikörpers definiert und tragen maßgeblich zur Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen bei. Hierbei gibt es Positionen, die keinerlei und bedingte Toleranz gegenüber einer Substitution zeigen. Bei keiner Toleranz ist an der jeweiligen Position nur eine einzige Aminosäure als Option zulässig. Ohne diese Aminosäure kann der Antikörper sein Ziel nicht mehr binden. Ist die Toleranz bedingt, dann bleibt die Bindung bei bis zu vier unterschiedlichen Aminosäuren aufrechterhalten. Ob eine Aminosäure an einer Position Relevanz für die Bindung des Antikörpers hat, kann in der relativen Signalstärke ihrer korrespondierenden Peptidspots ermittelt werden. Ist die gemittelte Stärke des Signals hierbei geringer als 60,0 % der Signalstärke des Peptidspots, welcher das Peptid mit der Originalsequenz enthält und sich in derselben Spalte befindet, ist von keiner relevanten Rolle der Aminosäure auszugehen. Die Anzahl an Aminosäuren, welche an der jeweiligen Position zu der Ausbildung einer Bindung führen, sind für jedes getestete Serum in Tabelle 8 in Korrespondenz für Anti-**Emp-IgG** und in Tabelle 9 in Korrespondenz für Anti-**Emp-IgA** aufgelistet. Für die Bestimmung der essenziellen Positionen werden für das Epitop von Anti-**Emp-IgG** fast alle und von Anti-**Emp-IgA** mehr als die Hälfte aller getesteten Substitutionsanalysen verwendet. Die Qualität der Signale sind für Anti-**Emp-IgG** generell besser als für Anti-**Emp-IgA**.

Tabelle 8: In den Zeilen werden die Designationen der unterschiedlichen Testseren und entlang der Spalten die Anzahl an der für eine erfolgreiche Interaktion möglichen Substitutionen an der jeweiligen Position im Peptid aufgelistet. Der Modalwert beschreibt die häufigste Anzahl an Aminosäuren im gesamten Datensatz für die jeweilige Position. Für die Farbkodierung gilt folgende Legende: Grün = essenzielle Position; Gold= bedingt essenzielle Position; Rot = nicht-essenzielle Position.

Anzahl der essenziellen Aminosäuren des Epitops von Anti-Emp-IgG															
Pos.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1364	20	20	5	1	1	1	14	1	2	15	2	12	15	20	17
5006	20	20	6	1	1	1	18	2	4	15	7	12	13	20	16
5008	19	20	4	1	1	1	15	1	2	12	3	10	16	19	17
5012	20	20	3	1	1	1	12	3	1	5	1	8	13	20	20
5015	17	20	3	1	1	1	9	1	1	7	1	10	8	20	20
5017	20	20	4	1	1	1	12	1	2	11	1	14	10	19	19
5020	20	20	3	1	1	1	9	1	1	5	1	5	13	20	18
5022	20	20	9	1	1	1	15	1	2	14	2	10	14	18	14
5030	20	20	6	1	1	1	14	1	2	14	3	10	14	19	19
5031	20	20	5	1	1	1	12	1	1	9	1	8	11	20	17
5036	19	20	5	1	1	1	12	1	1	7	2	7	14	19	18
5037	20	20	3	1	1	1	5	1	1	9	1	9	12	19	15
5040	20	20	19	4	1	1	17	1	3	15	6	18	18	20	19
5056	20	20	4	1	1	1	14	1	6	13	2	7	13	18	17
5065	16	19	4	1	1	1	9	1	1	5	1	6	12	20	20
5159	16	16	5	2	1	1	10	1	1	7	1	9	6	20	16
5192	19	20	20	11	1	1	7	1	1	5	1	3	5	19	15
5213	20	20	5	1	1	1	9	1	1	6	1	4	12	19	19
5247	19	20	6	1	1	1	15	1	2	13	3	14	16	19	19
5335	20	20	4	2	1	1	14	4	3	14	3	14	15	19	18
5345	20	20	15	5	1	6	10	1	4	5	1	2	6	13	6
5436	19	20	2	1	1	1	13	1	1	6	1	10	8	20	19
5441	20	18	2	1	1	1	10	1	3	4	1	3	11	20	19
5482	20	20	6	1	1	1	15	3	3	16	2	12	15	19	19
5505	20	20	3	1	1	1	8	1	1	5	1	10	17	20	20
Modalwert	20	20	5	1	1	1	14	1	1	5	1	10	13	20	20

Tabelle 9: In den Zeilen werden die Designationen der unterschiedlichen Testseren und entlang der Spalten die Anzahl an der für eine erfolgreiche Interaktion möglichen Substitutionen an der jeweiligen Position im Peptid aufgelistet. Der Modalwert beschreibt die häufigste Anzahl an Aminosäuren im gesamten Datensatz für die jeweilige Position. Für die Farbkodierung gilt folgende Legende: Grün = essenzielle Position; Gold = bedingt essenzielle Position; Rot = nicht-essenzielle Position.

Anzahl der essenziellen Aminosäuren des Epitops von Anti-Emp-IgA															
Pos.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1364	20	20	5	1	1	1	15	1	3	15	3	11	12	16	4
5006	20	20	16	18	4	11	18	15	14	20	15	19	18	19	14
5008	19	20	3	1	1	1	15	1	2	15	4	14	16	19	14
5020	5	9	1	1	1	1	9	2	1	9	4	10	13	17	16
5022	20	20	11	1	1	1	12	1	1	14	1	6	3	1	1
5030	19	20	18	6	2	2	20	5	7	19	10	14	16	14	11
5031	20	20	20	15	1	11	20	8	17	19	16	17	18	17	8
5036	15	19	3	1	3	1	9	1	2	10	2	6	14	13	12
5040	20	19	11	1	1	1	12	1	1	7	2	8	10	12	3
5056	20	20	5	1	1	2	16	1	7	16	2	11	11	15	13
5065	11	11	10	4	2	2	15	1	3	13	3	13	16	20	19
5192	11	14	15	12	1	1	1	1	1	7	1	3	8	13	10
5247	20	20	4	2	1	1	14	2	4	14	3	11	14	19	19
5335	20	20	3	1	1	1	14	4	1	9	2	14	13	17	15
5482	19	20	3	1	1	1	11	3	2	12	1	5	12	18	18
5505	12	16	3	1	1	1	12	1	1	3	1	9	19	20	18
Modalwert	20	20	3	1	1	1	15	1	1	15	1	11	16	19	14

Die Anzahl an Aminosäuren in den Tabellen 8 und 9 vermittelt einen Überblick, wie viele Substitutionsanalysen an der jeweiligen Position essenziell, bedingt essenziell und nicht-essenziell sind. Der Modalwert gibt die in dem Testsatz wahrscheinlichste Anzahl für die jeweilige Position an. Das Epitop von Anti-**Emp-IgG** und **-IgA** hat am häufigsten essenzielle Positionen an der vierten, fünften, sechsten, achten, neunten und elften Position. Die dritte Position im Epitop ist für Anti-**Emp-IgA** häufig nur bedingt essenziell.

Nachdem die essenziellen Positionen im Epitop der Antikörper ermittelt wurden, wird die Aufmerksamkeit auf die Aminosäuren gelegt, welche diese Positionen füllen. Hierbei ist von Relevanz, wie häufig die Aminosäuren der Originalsequenz an den essenziellen und bedingt essenziellen Positionen in der Signalstärke durch andere Aminosäuren übertrumpft werden. Diese Häufigkeit wird in Tabellen 10 und 11 als Dominanz (Dom.) innerhalb aller verwendeten

Testseren dargestellt. Des Weiteren kann eine einfache Aussage über den Grad der Konservierung getroffen werden, wenn berechnet wird, wie häufig im gesamten Testsatz für Anti-**Emp-IgG** und **-IgA** die originale Aminosäure durch eine andere ersetzt werden kann. Zu dieser Berechnung wird die Anzahl der Aminosäuren, welche mindestens eine Signalstärke von 60,0 % gegenüber ihrer Referenz zeigen, zusammengefasst. Daraufhin wird der prozentuale Anteil der originalen Aminosäure an dieser Summe berechnet und in den beiden Tabellen 10 und 11 als Konservierungsgrad (Kons.) angezeigt. Je größer der Anteil der originalen Aminosäure, desto stärker ist die Aminosäure an dieser Position im Epitop konserviert. Bei einem geringen Grad ist es wahrscheinlich, dass die Aminosäure an dieser Position durch eine andere substituiert werden kann und der Antikörper diese Substitution toleriert.

Sowohl bei dem Epitop von Anti-**Emp-IgG** als auch **-IgA** zeigen die originalen Aminosäuren an allen Positionen, außer bei der dritten, eine Dominanz von über 50,0 %. Der Konservierungsgrad bei dem Epitop von Anti-**Emp-IgG** ist an der vierten Position am stärksten und zeigt an dieser Position ausnahmslos die Aminosäure der Referenz. Für das Epitop von Anti-**Emp-IgA** zeigt sich der stärkste Konservierungsgrad ebenfalls an dieser Position, allerdings sind in diesem Fall bei einigen Seren Substitutionen durch andere Aminosäuren möglich. Generell ist der Konservierungsgrad für das Epitop von Anti-**Emp-IgG** an allen Positionen größer als bei Anti-**Emp-IgA**. Hierbei ist allerdings deren bessere Signalstärke und die größere Anzahl von erfolgreichen Sekundärfärbungen zu berücksichtigen. Während Dominanz und Konservierungsgrad einfache Möglichkeiten sind, um die wichtigsten Positionen und die Relevanz der originalen Aminosäure hervorzuheben, so erlauben sie keine qualitative Aussage über den individuellen Beitrag jeder Aminosäure zur Bindungsstärke an den jeweiligen Positionen. Für diese Aussage muss die durchschnittliche Signalstärke jedes individuellen Peptidspots aus allen markierten Substitutionsanalysen berechnet werden. Da die Substitutionsanalysen der Seren aber auf sechs *PEPPERCHIP*[®] Peptid-Mikroarrays mit unterschiedlicher Manufakturqualität verteilt wurden, ist es nicht sinnvoll, absolute Werte miteinander zu vergleichen. Um die Messwerte trotzdem zusammenfassen zu können, werden sie normalisiert, indem sie zur Signalstärke der originalen Aminosäure in Relation betrachtet werden. Dies ermöglicht eine qualitative Aussage darüber, wie viel stärker oder schwächer eine Interaktion zwischen Antikörper und Antigen für jede individuelle Aminosäure bei einer Substitution im Vergleich zur Referenz ist.

Tabelle 10 In den Zeilen werden die Designationen der unterschiedlichen Testseren und entlang der Spalten die essenziellen Aminosäuren an der jeweiligen Position im Peptid aufgelistet. An jeder Position wird die Darstellung auf maximal vier Aminosäuren begrenzt. Alle Aminosäuren sind von links nach rechts entsprechend ihrer Signalstärke absteigend sortiert. Die Aminosäuren aus der Originalsequenz sind in Rot markiert.

Aminosäuren des Epitops des Anti-Emp-IgG an essenziellen Positionen						
Pos.	4	5	6	8	9	11
1364	P	E	F	G	S, A	P, V,
5006	P	E	F	G, A	A, S, T, P	E, P, A, V
5008	P	E	F	G	S, A	P, A, E
5012	P	E	F	G, E, M	S	P
5015	P	E	F	G	S	P
5017	P	E	F	G	S, A	P
5020	P	E	F	G	S	P
5022	P	E	F	G	S, A	P, A,
5030	P	E	F	G	S, A	P, E, A
5031	P	E	F	G	S	P
5036	P	E	F	G	S	P, E
5037	P	E	F	G	S	P
5040	P, V, Q, A	E	F	G	S, A, T	P, V, E, A
5056	P	E	F	G	V, S, A, I	P, V
5065	P	E	F	G	S	P
5159	P, N	E	F	G	S	P
5192	P, Q, M, V	E	F	G	S	P
5213	P	E	F	G	S	P
5247	P	E	F	G	S, A	P, A, V
5335	P, Q	E	F	G, N, Q, A	S, A, G	P, A, E
5345	P, Q, N, G	E	F, G, N, H	G	S, N, A, Q	P
5436	P	E	F	G	S	P
5441	P	E	F	G	S, A, P	P
5482	P	E	F	G, A, E	S, A, G	P, A
5505	P	E	F	G	S	P
Dom.	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	88,0 %	96,0 %
Kons.	56,8 %	100,0 %	83,3 %	75,8 %	50,0 %	51,0 %

Tabelle 11: In den Zeilen werden die Designationen der unterschiedlichen Testseren und entlang der Spalten die essenziellen Aminosäuren an der jeweiligen Position im Peptid aufgelistet. An jeder Position wird die Darstellung auf maximal vier Aminosäuren begrenzt. Alle Aminosäuren sind von links nach rechts entsprechend ihrer Signalstärke absteigend sortiert. Die Aminosäuren aus der Originalsequenz sind in Rot markiert.

Aminosäuren des Epitops des Anti-Emp-IgA an essenziellen Positionen							
Pos.	3	4	5	6	8	9	11
1364	V, I, P, T	P	E	F	G	S, A, P	P, V, E
5006	E, G, V, I	E, D, P, V	E, R, W, Q	F, D, Y, E	P, N, E, G	P, S, T, N	E, P, M, Y
5008	P, V, I	P	E	F	G	S, A	P, E, A, V
5020	V	P	E	F	G, Q	S	Q, V, P, N
5022	I, P, V, Q	P	E	F	G	S	P
5030	I, G, P, E	E, P, H, D	E, K	F, H	P, G, H, N	P, N, G, S	N, P, E, D
5031	I, P, N, T	P, N, E, H	E	F, D, M, E	G, N, V, W	S, E, V, N	P, N, T, M
5036	I, V, P	P	G, E, K	F	G	S, F	P, K
5040	P, T, I, V	P, V	E	F	G	S	P, V
5056	V, A, P, I	P	E	F, E	G	A, V, S, I	P, V
5065	E, P, I, V	E, P, N, Y	E, R	F, E	G	S, W, R	P, Y, E
5192	Q, P, M, V	M, Q, P, V	E	F	G	S	P
5247	P, V, I, Q	P, Q	E	F	G, Q	S, A, P, G	P, A, S
5335	P, V, I	P	E	F	G, N, Q, K	S	N, P
5482	V, P, I	P	E	F	E, G, A	S, A	P
5505	V, P, I	P	E	F	G	S	P
Dom.	31,3 %	75,0 %	93,8 %	100,0 %	81,3 %	81,3 %	75,0 %
Kons.	12,2 %	23,9 %	69,6 %	41,0 %	33,3 %	23,9 %	22,9 %

Die Zusammenfassung der durchschnittlichen RFI aller Peptidspots wird in einem Aminosäureblot dargestellt und für das Epitop für Anti-**Emp-IgG** in Diagramm 2 und das Epitop von Anti-**Emp-IgA** in Diagramm 3 dargestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit werden Aminosäuren, welche durchschnittlich weniger als 60,0 % RFI gegenüber der originalen Aminosäure zeigen, ignoriert. Saure Aminosäuren sind in Rot, basische in Blau, unpolare in Grau, polare in Grün und aromatische Aminosäuren in Pink eingefärbt.

Zusammengefasster Aminosäureblot Substitutionsanalysen - Anti-Emp-IgG

N = 25

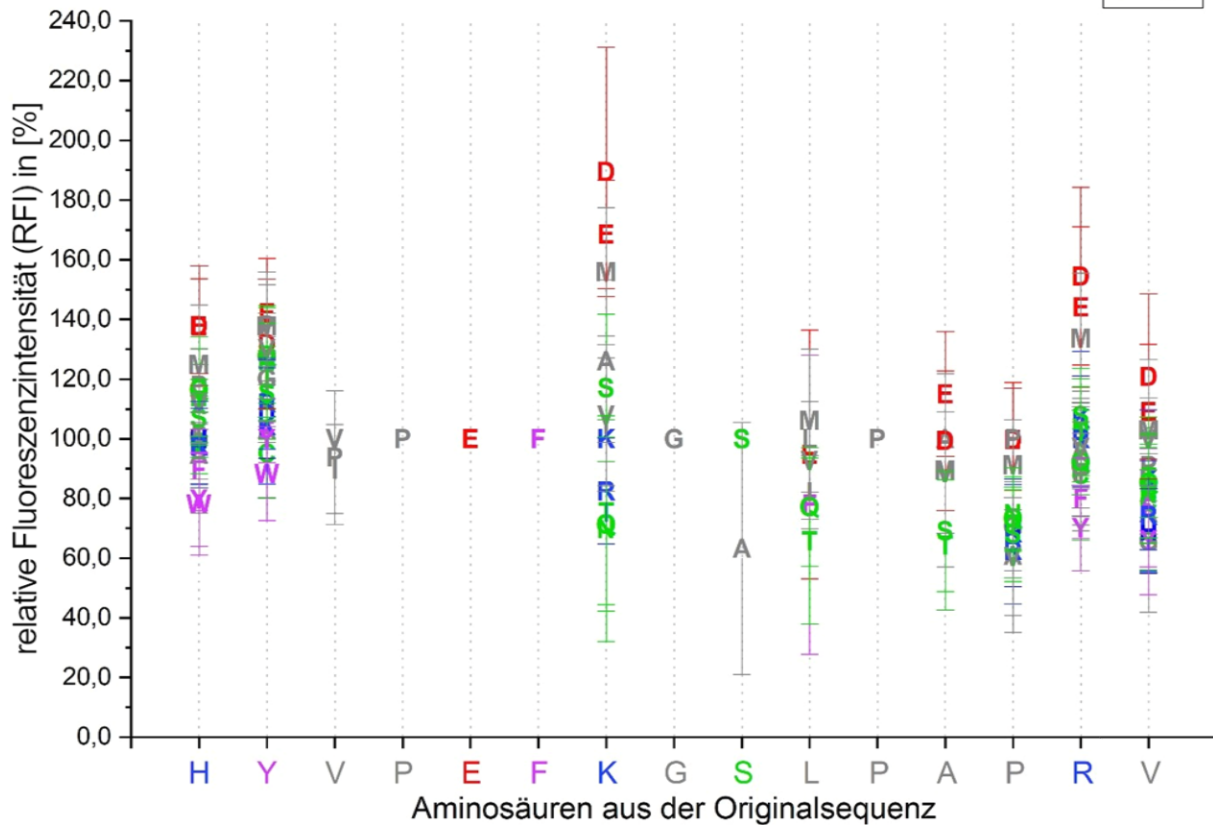


Diagramm 2: Der Aminosäureblot zeigt die durchschnittliche RFI der Sekundärfärbungen gegen **IgG** von Peptidspots deren Sequenz eine substituierte Aminosäure enthält. Die Signalstärke der Peptidspots wird hierbei in Relation zu der durchschnittlichen RFI der Peptidspots mit der originalen Peptidsequenz gesetzt. Es werden nur Aminosäuren angezeigt, deren RFI mindestens 60,0 % der originalen Aminosäure entsprechen. N = Stichprobenumfang.

Der Aminosäureblot von beiden Epitopen verdeutlicht noch einmal, dass die originale Sequenz an den essenziellen und bedingt essenziellen Positionen dominiert. Lediglich an der neunten Position bei dem Epitop für Anti-**Emp-IgG**, beziehungsweise an der achten Position für das Epitop von Anti-**Emp-IgA**, ist im Durchschnitt eine Substitution durch eine andere Aminosäure an essenziellen Positionen möglich. Die Signalstärke dieser Aminosäuren ist aber schwächer und weist eine sehr große SA auf.

An den nicht-essenziellen Positionen zeigt sich ein breites Spektrum an Aminosäuren, welche das Original ersetzen können, ohne dass die Bindung zwischen Antikörper und Epitop eingeschränkt wird. Viele dieser substituierenden Aminosäuren können die Bindungsaffinität sogar verbessern. Hierbei sind es hauptsächlich die sauren und polaren Aminosäuren, zu welchen das Paratop eine verstärkte Affinität zeigt. Bei dem Epitop von Anti-**Emp-IgG** werden mit Ausnahme der zweiten und zehnten Position die drei Substitutionen, welche die größte Signalstärke zeigen, von den beiden sauren Aminosäuren und Methionin dominiert. Da die

beiden sauren Aminosäuren eine negative Ladung besitzen, kann angenommen werden, dass diese bei der Substitution die Interaktion mit einem lokal positiv geladenen Paratop verstärken. Die einzige Besonderheit, welche die Aminosäure Methionin besitzt, ist die, dass sie über ein Schwefelatom verfügt. Cystein, welches ebenfalls ein Schwefelatom besitzt, zeigt allerdings im Vergleich zur Referenz kein auffällig starkes Signal, weshalb nicht davon auszugehen ist, dass dieses Atom maßgeblich zur Bindungsaffinität beiträgt. Methionin zeigt allerdings eine verstärkte Affinität bei der Interaktion mit aliphatischen Aminosäuren ^[1389]. Daher kann dies ein Hinweis für die Anwesenheit dieser Aminosäuren im Paratop sein. An der zweiten Position zeigen sich ebenso Prolin und Valin als sehr stabile Substitutionen. Die zehnte Position kann nicht durch die Asparaginsäure substituiert werden, zeigt aber eine gute durchschnittliche Signalstärke bei der Aminosäure Valin. Prolin hat eine starke Affinität zu aromatischen Aminosäuren ^[1390] und Valin ist eine stark hydrophobe Aminosäure. Wenn das Original durch diese beiden Aminosäuren substituiert wird, ist das ein Hinweis auf aromatische und hydrophile Aminosäuren in den hypervariablen Regionen des Antikörpers. Aromatische, basische und unpolare Aminosäuren können das Original zwar auch erfolgreich substituieren, allerdings ist die Signalstärke bei diesen Substitutionen überwiegend schwächer als bei der Referenz. Die durchschnittliche Signalstärke der Substitutionen des Epitops von Anti-**Emp-IgA** ergänzt sich mit der von Anti-**Emp-IgG** an den Positionen 13 bis 15. In den vorderen, nicht-essenziellen Positionen zeigen sich aber größere Unterschiede. In der ersten Position haben Prolin und Valin eine größere durchschnittliche Signalstärke als Methionin. An der zweiten Position dominieren die beiden sauren Aminosäuren nicht. Dafür zeigen Asparagin, Methionin, Prolin und Valin ein sehr starkes Signal. Position 7 zeigt derweil zusätzlich bei Serin und Valin eine starke RFI im Vergleich zur originalen Aminosäure. Glycin zeigt sich als dominante Aminosäure mit einer verhältnismäßig großen RFI an Position 10, und an Position 12 zeigt Valin eine größere Signalstärke als Methionin. Beide Antikörpertypen zeigen eine ähnliche Verteilung bei den durchschnittlichen Signalstärken von aromatischen, basischen, polaren, sauren und unpolaren Aminosäuren an den nicht-essenziellen Positionen, auch wenn sich das Verhältnis der Signalstärken der individuellen Aminosäuren zur Originalsequenz im Detail unterscheidet.

Erneut ist hier zu beachten, dass die Population, aus welcher die Daten gewonnen werden, für das Epitop von Anti-**Emp-IgA** nur halb so groß ist, wie bei Anti-**Emp-IgG**. Es ist daher davon auszugehen, dass das Ergebnis des Epitops von Anti-**Emp-IgG** zuverlässiger ist.

Zusammengefasster Aminosäureblot Substitutionsanalysen Anti-Emp-IgA

N = 16

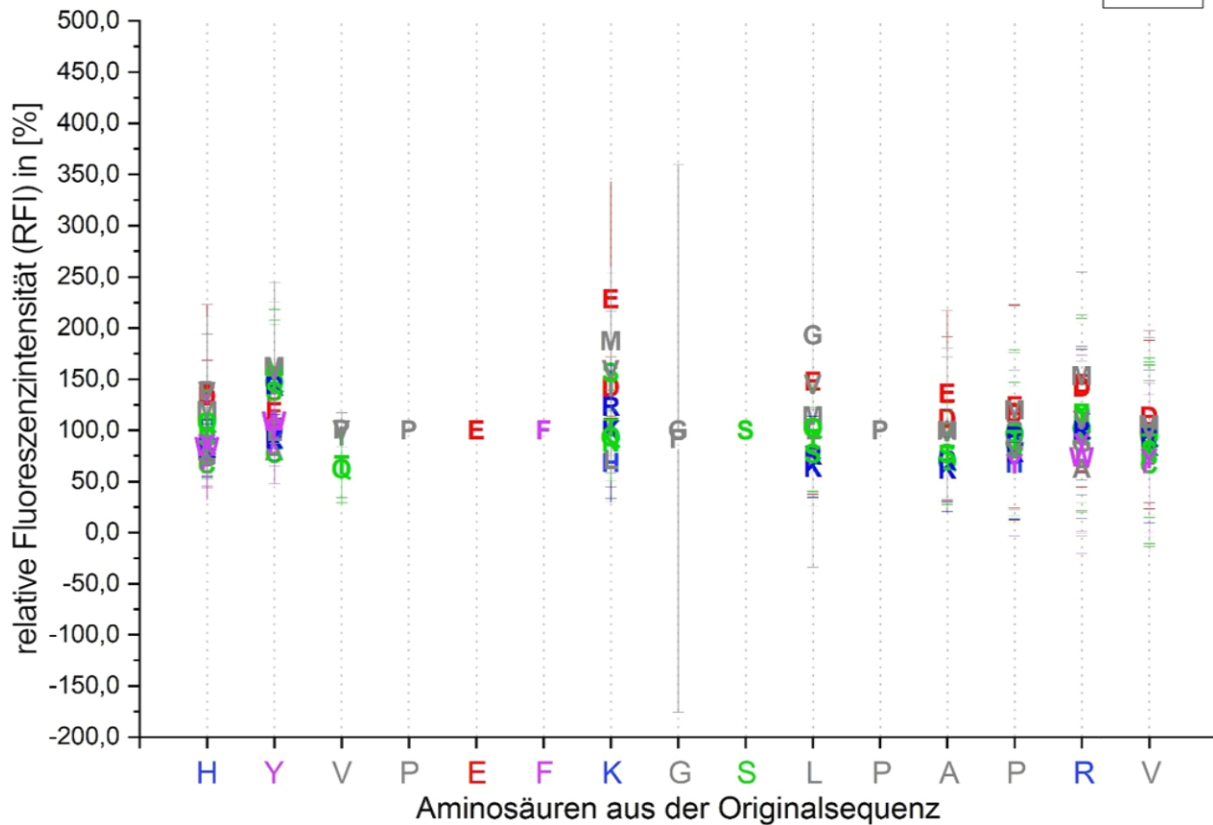


Diagramm 3: Der Aminosäureblot zeigt die durchschnittliche RFI der Sekundärfärbungen gegen **IgA** von Peptidspots deren Sequenz eine substituierte Aminosäure enthält. Die Signalstärke der Peptidspots wird hierbei in Relation zu der durchschnittlichen RFI der Peptidspots mit der originalen Peptidsequenz gesetzt. Es werden nur Aminosäuren angezeigt, deren RFI mindestens 60,0 % der originalen Aminosäure entsprechen.

Der in Dr. Webers Dissertation vorgeschlagene Antikörper-Fingerabdruck ‚XPEFXGSXX‘ kann mit einer größeren Auswahl an Testseren bestätigt werden. Die Aminosäure an der dritten Position des Epitops ist nur bei dem Epitop von Anti-**Emp-IgA** bedingt essenziell, da sie in den meisten Fällen durch einige weitere Aminosäuren substituiert werden kann. Allerdings kann die Aminosäure an der elften Position des Epitops in den meisten Fällen nicht durch eine andere Aminosäure ersetzt werden, weshalb die Ergebnisse nahelegen, diese Position in den Antikörper-Fingerabdruck als essenzielle Position aufzunehmen. Entsprechend lautet die Sequenz des Antikörper-Fingerabdrucks dann ‚XPEFXGSXP‘.

4.1.2 Konsensussequenz des Anti-Emp-Epitops

Die Substitutionsanalyse eines Epitops ermöglicht es, die Sequenz zu bestimmen, welche im untersuchten Bereich im Konsensus die größte Wahrscheinlichkeit hat, die beste Affinität gegenüber dem Antikörper zu ermöglichen. Während die originale Aminosäuresequenz des Epitops ‚**HYVPEFKGSLPAPRV**‘ an den essenziellen und bedingt essenziellen Positionen dem Optimum entspricht, verstärkt eine Substitution an den nicht-essenziellen Positionen oftmals die Interaktion zwischen Antikörper und Antigen. Die Konsensussequenz entspricht derjenigen Aminosäuresequenz, welche an jeder Position die Aminosäure enthält, welche dort im gesamten Datensatz am häufigsten die größte Signalstärke zeigt.

Die Konsensussequenz für das Epitop von Anti-**Emp-IgG** entspricht der Aminosäuresequenz ‚**EEVPEFDGSEPEEDD**‘. Bei Anti-**Emp-IgA** ergibt sich für dasselbe Epitop die Konsensussequenz ‚**E(E/P)VPEFMGSVPEPEV**‘. Beide Sequenzen geben vor, welche Aminosäuresequenz für die jeweilige Antikörperklasse am häufigsten die beste Affinität gegenüber Anti-**Emp** zeigen würde. Insgesamt unterscheiden sie sich im Fall von Anti-**Emp-IgG** in neun und im Fall von Anti-**Emp-IgA** in sieben Positionen von der Originalsequenz. Bis auf die 13. und 15. Position des Epitops von Anti-**Emp-IgA** werden nicht-essenzielle Aminosäuren in der Konsensussequenz häufiger durch eine von der Originalsequenz abweichenden Aminosäure substituiert. Saure Aminosäuren treten bei diesen Substitutionen hierbei am häufigsten auf. An den ersten beiden Positionen von beiden Epitopen ist die originale Aminosäure in keinem Serum dominant vertreten. Dasselbe gilt für die siebte Position des Epitops von Anti-**Emp-IgG**. Die Annahme liegt daher nahe, dass die Aminosäuren dieser Positionen in der Originalsequenz keinerlei Funktion besitzen, um die Interaktion zwischen Antikörper und Antigen zu unterstützen.

In Diagramm 4 ist die Konsensussequenz für das Epitop von Anti-**Emp-IgG** und in Diagramm 5 die Konsensussequenz für das Epitop von Anti-**Emp-IgA** zusammengefasst.

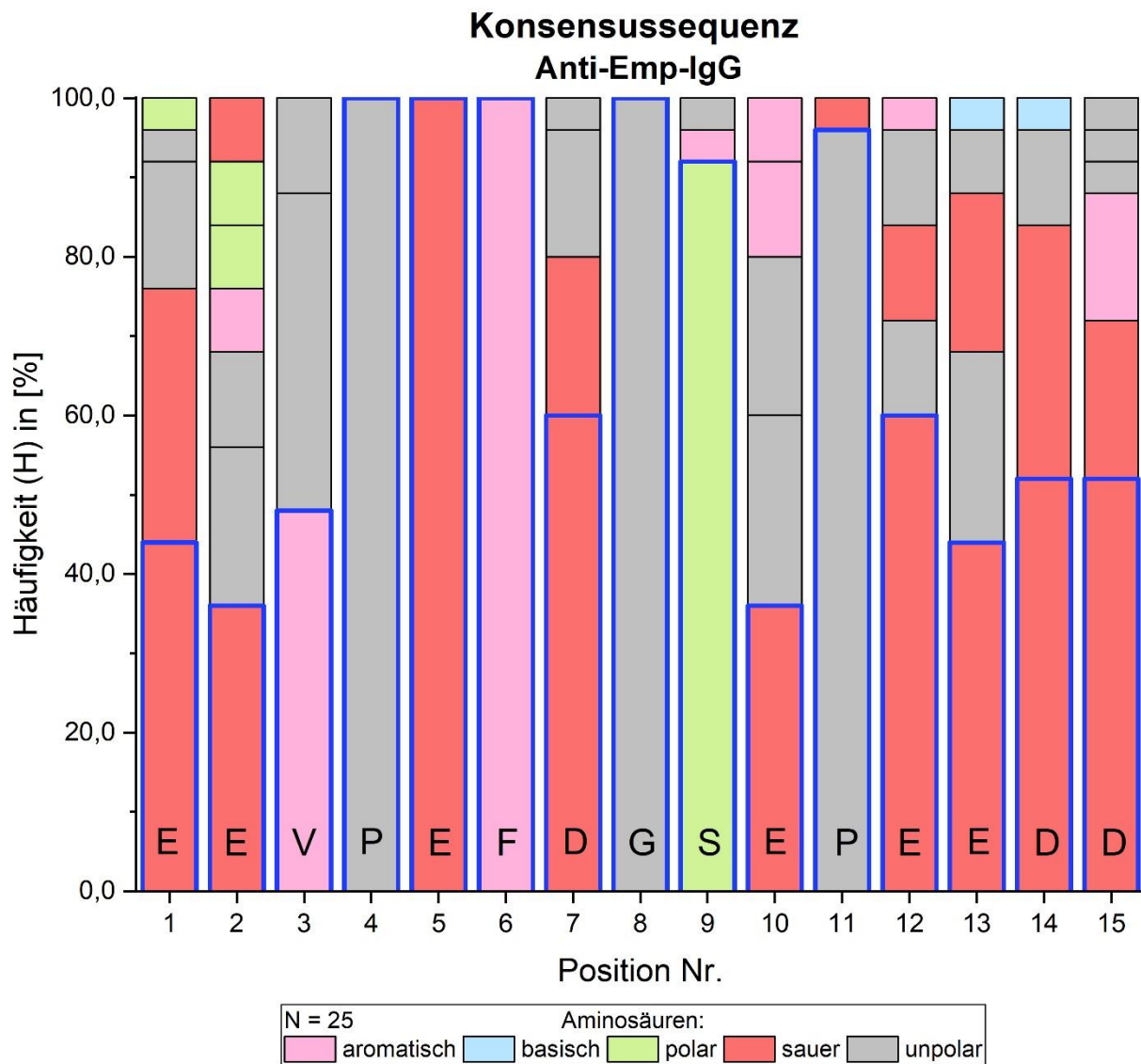


Diagramm 4: Aus den dominierenden Aminosäuren des gesamten Datensatzes lässt sich die Konsensussequenz bestimmen. Das gestapelte Diagramm ist entsprechend der Häufigkeit von unten nach oben absteigend sortiert. Der Balken mit der größten Häufigkeit ist durch eine violette Umrandung hervorgehoben. Die Konsensussequenz ist am Fuße der Stapel zusammengefasst.

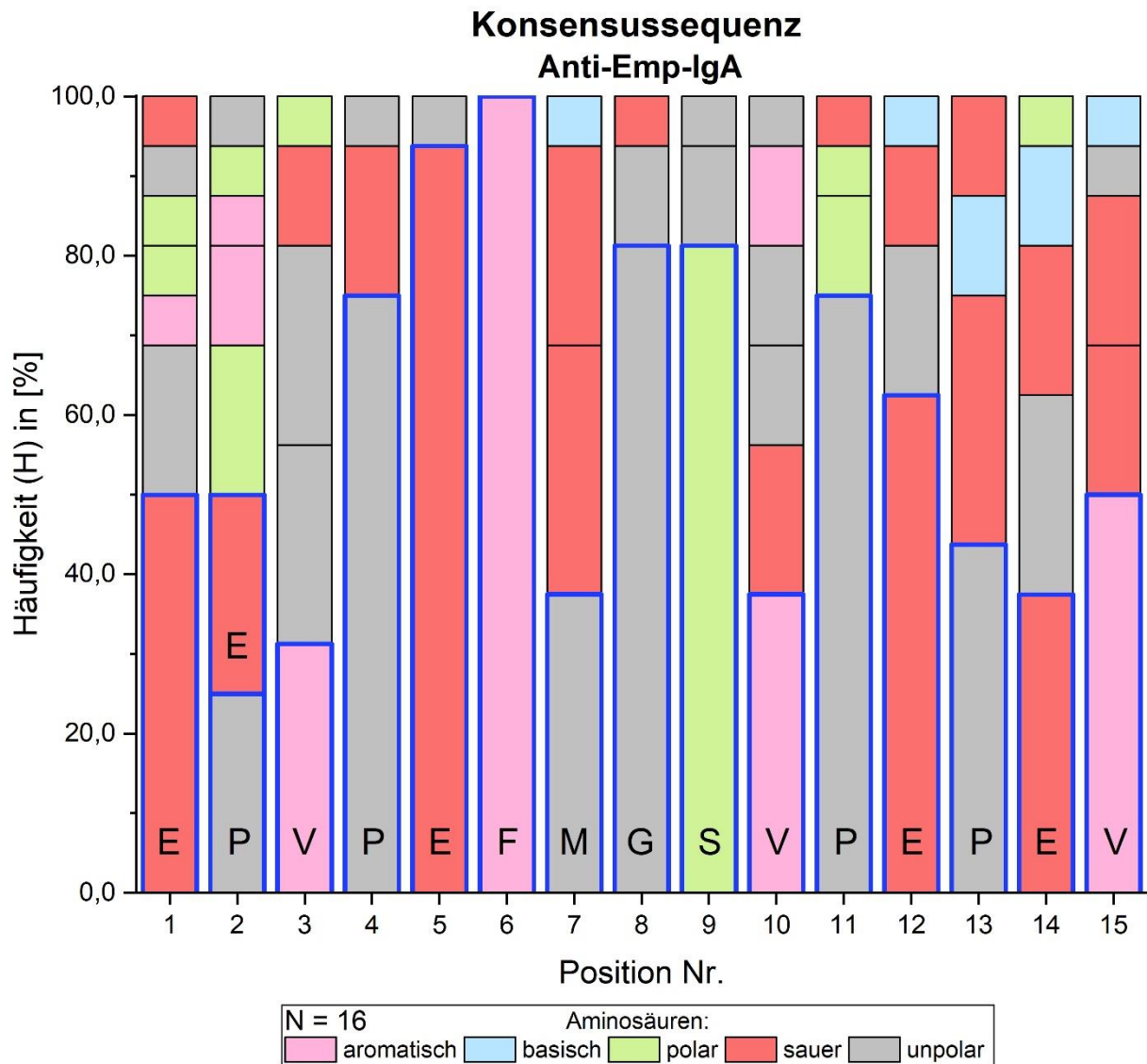


Diagramm 5: Aus den dominierenden Aminosäuren des gesamten Datensatzes lässt sich die Konsensussequenz bestimmen. Das gestapelte Diagramm ist entsprechend der Häufigkeit von unten nach oben absteigend sortiert. Der Balken mit der größten Häufigkeit ist durch eine violette Umrandung hervorgehoben. Die Konsensussequenz ist am Fuße der Stapel zusammengefasst. Gibt es zwei Balken mit demselben Wert, wird zusätzlich die konkurrierende Aminosäure im Balken darüber angegeben.

4.1.3 Vergleich der Signalstärken zwischen den Testseren

Für den Datensatz, aus dem die Seren stammen, stehen anonymisierte Charakteristika in Form von Besiedlungsstatus, Geschlecht, Alter, Konsum von Tabak und der Diagnose einer Allergie zur Verfügung. Dies bietet die Möglichkeit, eine statistische Analyse der Patienten durchzuführen, um zu überprüfen, ob die Charakteristika einen Einfluss auf die Signalstärke der Substitutionsanalyse haben. Um einen Vergleich durchzuführen, müssen die Signalstärken für jedes Serum in eine vergleichbare Form gebracht werden. Zu diesem Zweck wird die durchschnittliche Signalstärke jedes Peptidspots der Substitutionsanalyse als Mittelwert zusammengefasst und als GFI definiert. Diese GFI kann zwar keine Aussage über die Menge der Antikörper innerhalb der Testseren treffen, erlaubt es aber, die relative Affinität einzuschätzen. Somit kann diese zwischen den Testpersonen verglichen werden und es ist eine einfache statistische Analyse der anonymisierten Charakteristika im Zusammenhang mit Anti-**Emp** möglich. Alle Testseren werden als Primärfärbung auf *PEPPERCHIP*[®] Peptid-Mikroarrays in 16er-Konfiguration mit derselben Manufakturqualität inkubiert. Unterschiede, welche durch eine individuelle Qualität der Substitutionsanalysen entstehen, können daher vernachlässigt werden. In der Sekundärfärbung werden auf den Peptidspots gebundene Anti-**Emp-IgG** und **-IgA** markiert. Die Detektion von Anti-**Emp-IgA** und **-IgG** wird mit unterschiedlichen Anregungsquellen, Detektoren und Sekundärantikörpern vollzogen. Da deren Diskrepanz in der Detektionsempfindlichkeit sich mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht bestimmen lässt, kann die GFI dieser beiden Antikörpertypen nicht miteinander verglichen werden.

Nicht jedes Serum zeigt bei der Färbung von Anti-**Emp-IgA** ein ausreichendes Signal für ein sichtbares Muster. In diesen Fällen ist davon auszugehen, dass das Serum über keine passenden Antikörper verfügt, um die Substitutionsanalyse einzufärben. Bei Arrays, auf denen nach der Sekundärfärbung kein sichtbares Muster zu erkennen ist, wird der Wert der GFI deshalb auf 0,0 gesetzt. Die Informationen über jedes Serum sind in Tabelle 12 aufgelistet und werden entsprechend jedes Charakteristikums in zwei Gruppen aufgeteilt. Zwischen den beiden Gruppen, die jedem Charakteristikum zugeordnet werden, werden alle GFI durch eine einfaktorische ANOVA (*Analysis of Variance*) nach Tukey^[1391] miteinander auf signifikante Unterschiede verglichen. Bei dieser Analyse wird die Streuung der Mittelwerte betrachtet, welche sich oberhalb der errechneten SA befinden. Der q-Wert gibt hierbei an, wie weit die Mittelwerte auseinanderstreuen und steigt mit zunehmender Divergenz. Das Signifikanzniveau α gibt vor, ab welchem q-Wert der Unterschied zwischen Gruppen, in Abhängigkeit des Strichprobenumfangs, als signifikant gilt. Je kleiner das α , bei dem noch eine Signifikanz erreicht werden kann, desto zuverlässiger ist die Signifikanz.

Tabelle 12: Informationen über die individuellen Charakteristika der Spenderseren.

Patientencharakteristika					
Serum	Besiedlungsstatus	Geschlecht	Alter	Allergie	Nikotin
1364	Person besiedelt	unbekannt	unbekannt	unbekannt	unbekannt
5006	Person nicht besiedelt	männlich	25	nein	nein
5008	Person besiedelt	weiblich	24	ja	ja
5012	Person nicht besiedelt	weiblich	21	ja	nein
5015	Person nicht besiedelt	männlich	21	nein	nein
5017	Person nicht besiedelt	weiblich	21	nein	nein
5020	Person nicht besiedelt	weiblich	23	nein	nein
5022	Person nicht besiedelt	weiblich	26	ja	nein
5030	Person nicht besiedelt	weiblich	20	nein	nein
5031	Person besiedelt	weiblich	20	nein	nein
5036	Person besiedelt	weiblich	22	ja	nein
5037	Person besiedelt	weiblich	26	ja	nein
5040	Person nicht besiedelt	weiblich	21	ja	nein
5045	Person besiedelt	weiblich	30	nein	nein
5056	Person nicht besiedelt	männlich	23	ja	nein
5065	Person nicht besiedelt	männlich	25	nein	nein
5159	Person besiedelt	weiblich	26	nein	nein
5192	Person nicht besiedelt	männlich	32	ja	nein
5213	Person nicht besiedelt	weiblich	23	nein	nein
5247	Person nicht besiedelt	männlich	21	nein	nein
5335	Person besiedelt	weiblich	23	nein	nein
5345	Person besiedelt	männlich	24	nein	ja
5346	Person nicht besiedelt	männlich	24	ja	nein
5436	Person nicht besiedelt	weiblich	54	nein	nein
5441	Person nicht besiedelt	weiblich	24	nein	nein
5482	Person nicht besiedelt	männlich	28	nein	nein
5505	Person nicht besiedelt	weiblich	25	nein	nein
FS1	unbekannt	männlich	unbekannt	unbekannt	unbekannt
FS2	unbekannt	weiblich	unbekannt	unbekannt	unbekannt

Die Gruppen werden für jeden Vergleich in Gruppe A und B eingeteilt. Eine Verteilung der Gruppen ist in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: Gruppen innerhalb der Testpopulation, welche für einen statistischen Vergleich gegenübergestellt werden.

Gruppenverteilung für statistischen Vergleich der GFI			
Charakteristika	Gruppe A	Gruppe B	Diagramm
Besiedlungsstatus	Person besiedelt	Person nicht besiedelt	Diagramm 6
Geschlecht	männlich	weiblich	Diagramm 7
Allergien	Allergiker	keine bekannten Allergien	Diagramm 8
Alter	jünger als 25	25 und älter	Diagramm 9

Für einen Vergleich von Personen bezüglich ihres Tabakkonsums stehen nicht genug Raucher im Testsatz zur Verfügung. Die statistischen Ergebnisse jeder ANOVA sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Eine einfache statistische Analyse der GFI kann in Unabhängigkeit der Charakteristika durchgeführt werden. Alle Sekundärfärbungen von **IgG** zeigen eine erkennbare Substitutionsanalyse. Bei der Färbung von Anti-**Emp-IgA** wiederum sind bei vier von 23 gültigen Substitutionsanalysen kein sichtbares Signal zu erkennen, was einem Anteil von 17,4 % aller gültigen Analysen entspricht. Der Wert der GFI ist für Anti-**Emp-IgG** relativ homogen verteilt. So sind 44,4 % aller Intensitäten größer und 55,6 % niedrigerer als der Mittelwert. Der Mittelwert dieser Signale ist um 16,7 % größer als der Median. Im Vergleich ist diese Statistik für alle Anti-**Emp-IgA**-Färbungen sehr heterogen, da 21,7 % aller Werte über und 78,3 % unter dem Mittelwert liegen, was zur Folge hat, dass dieser mehr als fünfmal so hoch ist wie der Median. In der Verteilung der GFI zeigen **IgA**-assoziierte Signale eine fast zwölffach größere Varianz als **IgG**-assoziierte. Bei Personen, deren GFI von Anti-**Emp-IgA** im stärksten Viertel des gesamten Testsatzes vertreten ist, befindet sich die GFI von Anti-**Emp-IgG** am häufigsten im zweitschwächsten Viertel aller Seren. Insgesamt zeigen zwei Testpersonen eine GFI die sich jeweils bei beiden Antikörpertypen mit der Signalstärke im obersten Viertel des gesamten Testsatzes befindet. Beide Seren stammen von Patientinnen ohne Besiedlung, welche älter als 25 Jahre alt sind. Eine der Patientinnen hat eine Allergie, die andere nicht. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei drei Personen eine GFI, welche sich in der Signalstärke jeweils bei beiden Antikörpertypen im schwächsten Viertel des gesamten Testsatzes befindet. Die zugehörigen Patienten sind jünger als 25 Jahre alt und haben keine Allergien. Zwei der drei Patienten sind nicht besiedelt und weiblich, die dritte Person ist besiedelt und männlich.

Tabelle 14: Die Ergebnisse der ANOVA jedes Vergleichs im Überblick. Die Mittelwerte sind für beide Gruppen mit SA angegeben. Für jeden Vergleich wird ein q-Wert nach Tukey errechnet und entsprechend das Bestehen einer Signifikanz ermittelt.

ANOVA nach Tukey				
Vergleich	Mittelwert (SA) in RFU [%] Gruppe A	Mittelwert (SA) in RFU [%] Gruppe B	q-Wert	Signifikanz
Besiedlungsstatus IgG	1057,2 (± 62,7 %)	1075,6 (± 52,8 %)	0,1	Nein
Besiedlungsstatus IgA	1024,4 (± 215,3 %)	1389,7(± 184,8 %)	4,3 x 10 ⁻¹	Nein
Alter IgG	956,0 (± 69,5 %)	1315,9 (± 28,6 %)	2,1	Nein
Alter IgA	836,3 (± 161,7 %)	1495,8 (± 227,4 %)	8,9 x 10 ⁻¹	Nein
Allergien IgG	1468,2 (± 32,9 %)	846,8 (± 65,1 %)	4,0	bei $\alpha = 5 \times 10^{-2}$
Allergien IgA	1182,8 (± 149,0 %)	1049,4 (± 240,9 %)	1,7 x 10 ⁻¹	Nein
Geschlecht IgG	1127,9 (± 63,3 %)	1228,3 (± 58,3 %)	4,8 x 10 ⁻¹	Nein
Geschlecht IgA	944,4 (± 168,0 %)	1119,4 (± 238,5 %)	2,5 x 10 ⁻¹	Nein

In den ANOVA zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen der Allergiker und der Patienten ohne Allergie bei einem α von 5×10^{-2} . Bei dem Besiedlungsstatus zeigt Gruppe B bei der durchschnittlichen GFI für Anti-**Emp-IgG** ein um 1,7 % und für Anti-**Emp-IgA** ein um 35,7 % stärkeres Signal als Gruppe A. Beim Altersvergleich zwischen den beiden Gruppen zeigt sich bei Gruppe B der Wert für Anti-**Emp-IgG** um 37,6 % und der für Anti-**Emp-IgA** um 78,9 % erhöht. Im Vergleich zwischen den allergischen und bei Personen ohne Allergie zeigt sich eine um 73,4 % erhöhte Intensität bei dem Anti-**Emp-IgG** und eine um 12,7 % erhöhte Intensität bei dem Anti-**Emp-IgA** für die Gruppe A. Werden die GFI entsprechend der Geschlechtszugehörigkeit miteinander verglichen, zeigt sich bei der Gruppe B ein um 8,9 % größeres Signal bei Anti-**Emp-IgG** und bei Anti-**Emp-IgA** ein um 18,5 % größeres Signal als bei Gruppe A.

Die Ergebnisse zeigen, dass keine Korrelation zwischen dem Besiedlungsstatus und der Signalstärke der Substitutionsanalysen des Anti-**Emp**-Antikörpers bestehen. Als einziger signifikanter Unterschied wurde die GFI zwischen allergischen Personen und Personen ohne Allergie nachgewiesen. Bei der gesamten Analyse muss beachtet werden, dass sie ohne die für eine statistische notwendige Menge von mindestens 100 Stichproben durchgeführt wird. Die Analyse liefert deshalb nur schwache Anhaltspunkte für eine Annäherung einer möglichen Korrelation bietet aber Hinweise dafür, nach welchen Charakteristika zukünftige Stichproben ausgewählt werden sollten. Auch wurden alle besiedelten Personen nur auf nasale

Kolonisierung getestet, wodurch eine Unschärfe durch andere Kolonisierungsbereiche gegeben ist.

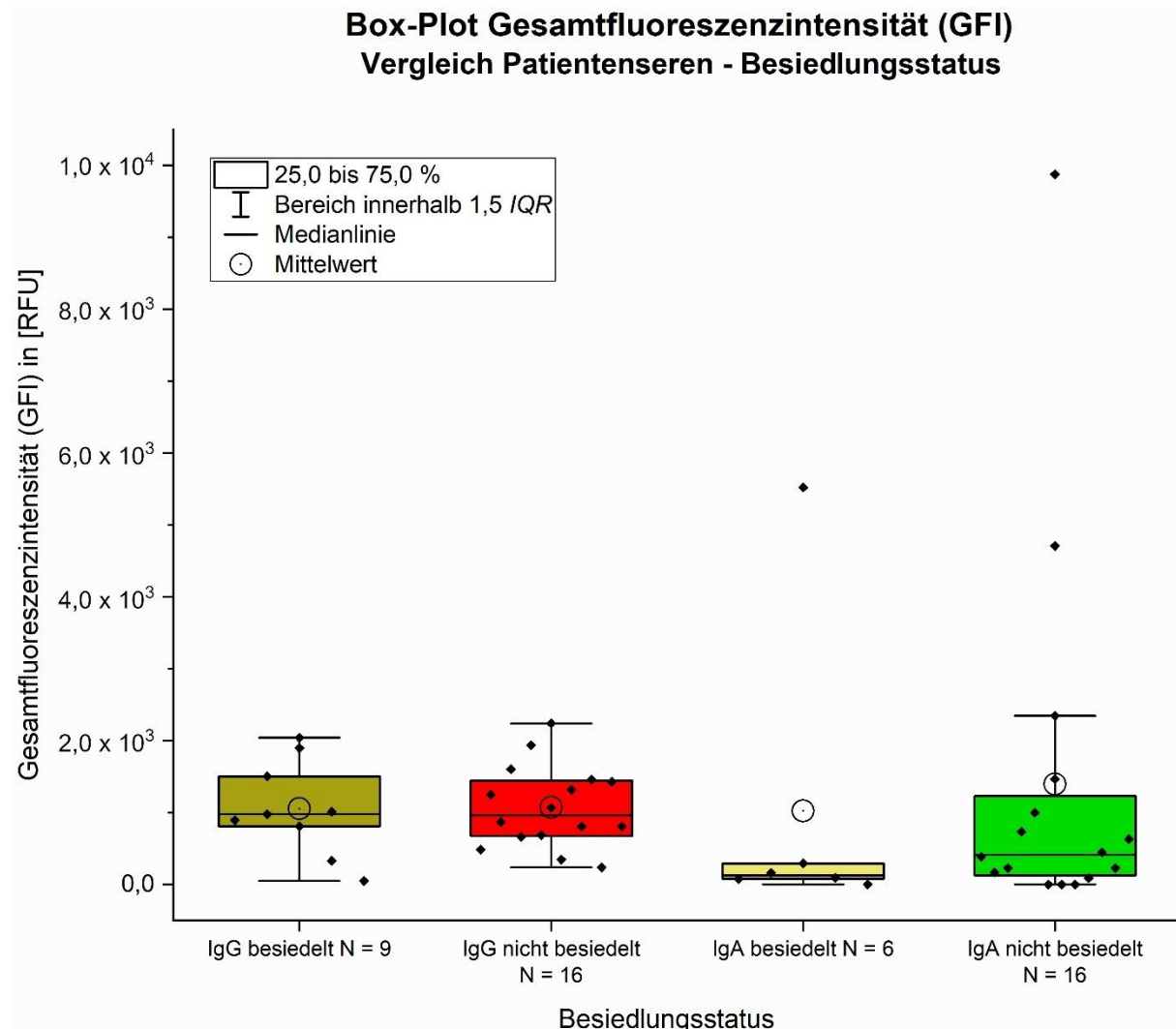


Diagramm 6: Die Verteilung der GFI der Anti-**Emp** Substitutionsanalysen im Vergleich von Patienten mit und ohne bekannter Besiedlung. Alle Werte zwischen 25,0 und 75,0 % der maximalen Intensität werden innerhalb des Rechtecks als Rauten dargestellt. Werte die außerhalb des anderthalbfachen Interquartilsabstands (*IQR*) liegen, werden als statistische Ausreißer betrachtet.

Die große SA innerhalb der Box-Plots, welche aus den GFI der mit Anti-**Emp-IgG** markierten Arrays erzeugt werden, entspricht den Erwartungen, da der individuelle Antikörpertiter innerhalb einer größeren Population sehr heterogen ist. Bei den Box-Plots, die aus den GFI der mit Anti-**Emp-IgA** markierten Arrays erstellt werden, zeigt sich derweil aufgrund der großen Heterogenität in den Antikörpertitern eine deutlich vergrößerte SA.

Box-Plot Gesamtfluoreszenzintensität (GFI) Vergleich Patientenseren - Alter

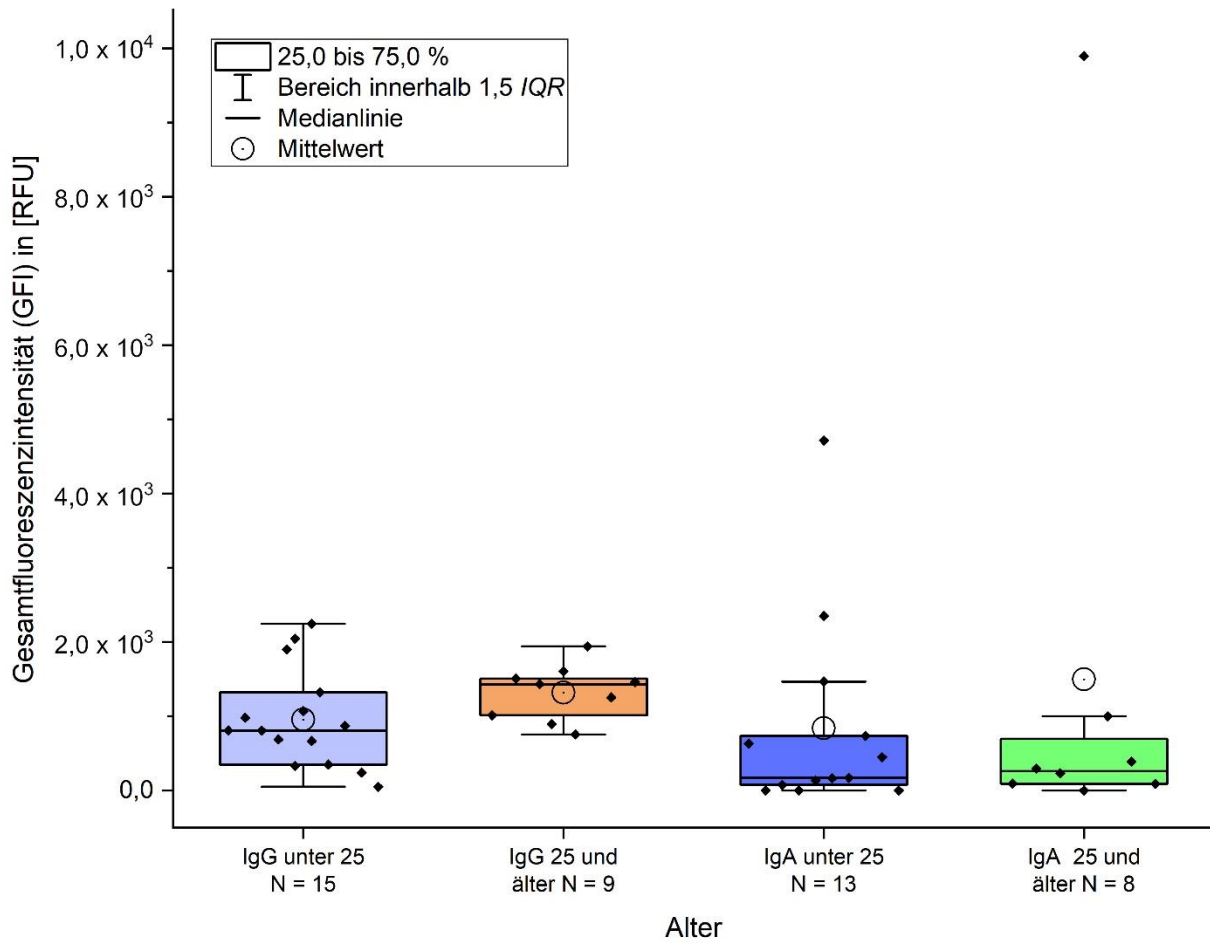


Diagramm 7: Die Verteilung der GFI der Anti-Emp Substitutionsanalysen im Vergleich von Personen die jünger und älter als 25 Jahre alt sind. Alle Werte zwischen 25,0 und 75,0 % der maximalen Intensität werden innerhalb des Rechtecks als Rauten dargestellt. Werte die außerhalb des anderthalbfachen IQR liegen, werden als statistische Ausreißer betrachtet.

Box-Plot Gesamtfluoreszenzintensität (GFI) Vergleich Patientenseren - Allergien

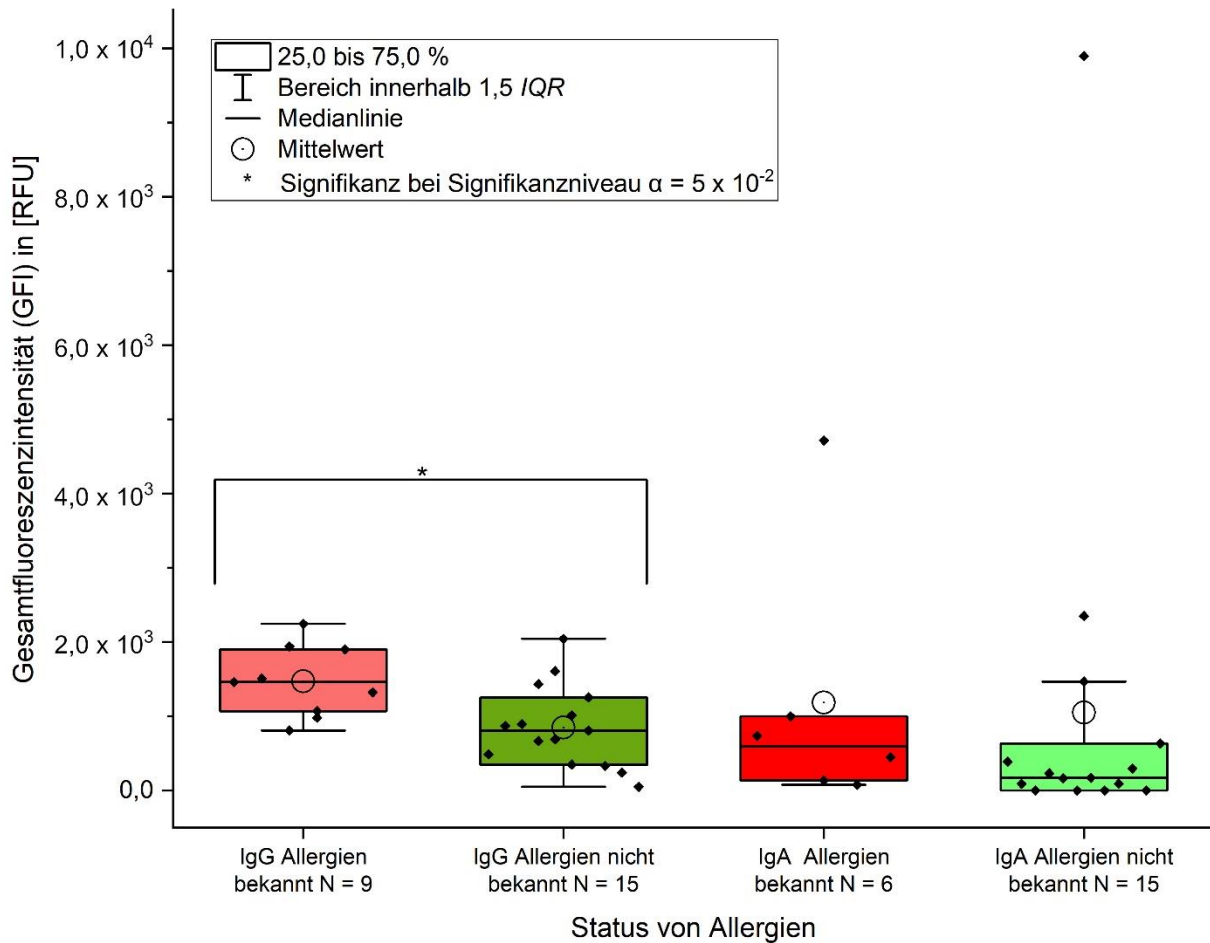


Diagramm 8: Die Verteilung der GFI der Anti-Emp Substitutionsanalysen im Vergleich von Patienten mit und ohne bekannten Allergien. Alle Werte zwischen 25,0 und 75,0 % der maximalen Intensität werden innerhalb des Rechtecks als Rauten dargestellt. Werte die außerhalb des anderthalbfachen IQR liegen, werden als statistische Ausreißer betrachtet.

Box-Plot Gesamtfluoreszenzintensität (GFI) Vergleich Patientenserum - Geschlecht

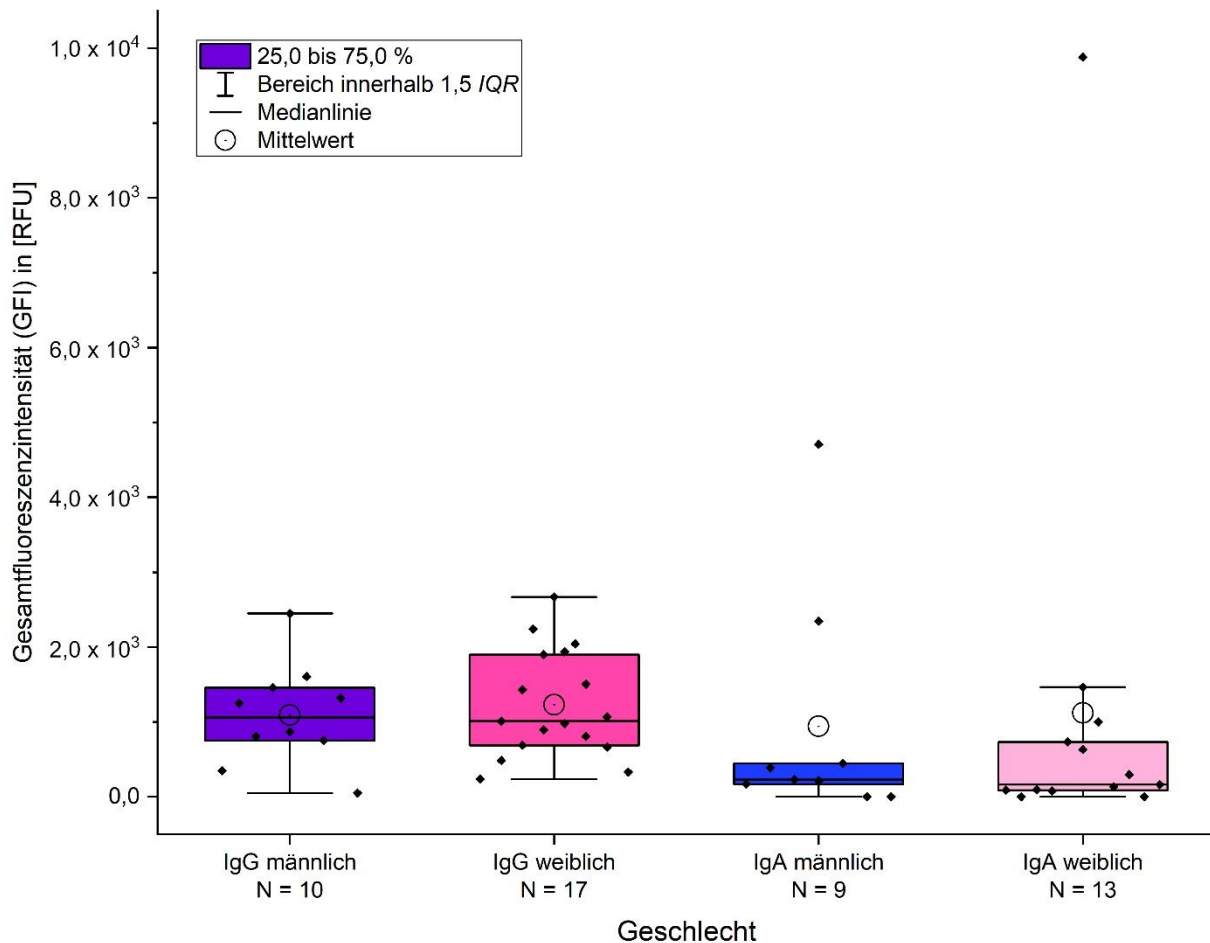


Diagramm 9: Die Verteilung der GFI der Anti-**Emp** Substitutionsanalysen im Vergleich von männlichen und weiblichen Personen. Alle Werte zwischen 25,0 und 75,0 % der maximalen Intensität werden innerhalb des Rechtecks als gedrehte Quadrate dargestellt. Werte, die außerhalb des anderthalbfachen *IQR* liegen, werden als statistische Ausreißer betrachtet.

4.1.4 Unterschiede der Gruppen in Konsensussequenz und Aminosäureblot

Durch die Einteilung der Testseren nach Gruppen in Kapitel 4.1.3 „**Vergleich der Signalstärken zwischen den Testseren**“ lässt sich die Konsensussequenz und der Aminosäureblot innerhalb dieser Gruppen auf auffällige Unterschiede untersuchen. Um die Unterschiede möglichst präzise hervorzuheben, wird nur der Datensatz aus den *PEPperCHIP*[®] Peptid-Mikroarrays in Fünfer-Konfiguration nach der Sekundärfärbung mit Anti-**IgG** Antikörpern verwendet. Die Messdaten aus der Sekundärfärbung gegen **IgA** sind für diesen Vergleich aufgrund der hohen SA zu ungenau um für diese Analyse berücksichtigt zu werden. Für jede einzelne Gruppe aus Tabelle 13 wird eine Konsensussequenz und ein Aminosäureblot erstellt und die Ergebnisse entsprechend der Paarungen gegenübergestellt.

Da die meisten Daten in diesem Vergleich keine auffälligen Unterschiede zeigen, wird der Fokus auf die hervorstechenden Differenzen begrenzt.

Alle essenziellen und bedingt essenziellen Positionen zeigen bei der Konsensussequenz die originale Aminosäure bei den entsprechenden Positionen. An einigen Positionen von nicht essenziellen Aminosäuren treten von der bisherigen Konsensussequenz **,EEVPEFDGSEPEPDD'** abweichende Aminosäuren auf. Die Differenz in der Häufigkeit ist in den meisten Fällen allerdings nur geringfügig. Zwischen besiedelten Personen und Personen ohne Besiedlung gibt es einen auffälligen Unterschied in der ersten Aminosäure der Konsensussequenz. Hier zeigen Personen ohne Besiedlung deutlich häufiger die Glutaminsäure als dominante Aminosäure. Der größte Unterschied der Konsensussequenz ist zwischen männlichen und weiblichen Testpersonen zu sehen. So liegt die Aminosäure Prolin bei weiblichen Patienten nur an zweiter Position als dominante Aminosäure vor. Ebenso ist bei den Seren von Patientinnen an der 14. Position der Konsensussequenz deutlich häufiger die Aminosäure Asparaginsäure dominant als bei männlichen Patienten.

Damit im Aminosäureblot der Gruppen ein Unterschied als auffällig gilt, muss zwischen der durchschnittlichen Signalstärke eines Peptidspots mindestens eine Differenz von 30,0 % zwischen den beiden Gruppen vorliegen. Nach diesen Kriterien zeigen besiedelte Personen bei der Substitution der Aminosäure an der zweiten Position ein um über 30,0 % stärkeres Signal, wenn die originale Aminosäure mit einem Asparagin oder Lysin getauscht wird. Dagegen zeigt das Epitop von Personen ohne Besiedlung eine um mehr als 30,0 % größere Signalstärke, wenn die Aminosäure an der 14. Position durch eine saure Aminosäure substituiert wird. Weiter ist die Signalstärke von Personen ohne Besiedlung im Vergleich zu besiedelten Personen um 31,7 % höher, wenn die Aminosäure an der 15. Position durch eine Asparaginsäure getauscht wird. Personen, die 25 Jahre alt oder älter sind, zeigen im Vergleich zu jüngeren Personen eine um 37,1 % größere Fluoreszenzintensität, wenn die Aminosäure an der siebten Position durch Asparaginsäure ersetzt wird. Der betragsmäßig größte Unterschied in der individuellen Signalstärke zeigt sich zwischen männlichen und weiblichen Patienten. Die Sekundärfärbungen von Frauen zeigen im Durchschnitt ein um 47,9 % stärkeres Signal bei der Substitution von Asparaginsäure an der siebten Position. Derweil zeigt das Serum von Männern in der Sekundärfärbung eine um fast 40,0 % erhöhte RFI, wenn die originale Aminosäure an dieser Position durch Asparagin oder Arginin substituiert wird. Bei einer Substitution durch Glutamin ist diese Differenz auf 55,4 % erhöht. Patienten mit und ohne Allergien zeigen keine auffälligen Unterschiede.

4.2 Affinitätschromatographie

Als sehr effiziente Methode, um Anti-**Emp**-Antikörper aus Blutserum zu isolieren, bietet sich die Affinitätschromatographie an. Die Methode nutzt das Epitop des **Emp**-Antikörpers als stationäre Phase um eine möglichst hohe und reine Menge des Antikörpers zu erhalten. Hierbei wird die Spezifität und Affinität zwischen Antikörper und Antigen ausgenutzt. Die Epitope werden in Form von modifiziertem Peptid als Antigen an ein kommerziell erhältliches Harz gekoppelt. Unter der Ausbildung einer Thioetherbindung wird das Cystein der modifizierten Peptide mit den Iodacetylgruppen des Harzes verknüpft. Durch Säulenhülsen wird anschließend die optimale Durchmischung zwischen Harz und Serum und die anschließende Elution gewährleistet. Zur Elution wird die Interaktion zwischen Antikörper und Epitop durch säurebasierte Denaturierung geschwächt. Hierbei wird die Funktionalität der Antikörper zu einem gewissen Grad reduziert, weshalb eine Kontrolle der Aktivität der eluierten Antikörper nach der Elution notwendig ist. Während die Spezifität zwar explizit den Anti-**Emp**-Antikörper selektiert, so ist nicht auszuschließen, dass auch weitere Antikörper mit ähnlicher Spezifität aufgereinigt werden. Diese Methode selektiert nicht nach Antikörperklasse. Da alle Antikörperklassen im Blutserum vertreten sind, ist innerhalb des Eluats ein Antikörpergemisch mit hauptsächlichem Anteil an **IgG** zu erwarten.

4.2.1 Sondierung für optimale Parameter

Das Ziel der Affinitätschromatographie ist es, eine möglichst reine und große funktionale Menge des gewünschten Antikörpers zu erhalten. Während ein Peptid, welches der Konsensussequenz entspricht, eine maximale Affinität zwischen Epitop und Antikörper gewährleisten würde, wäre durch die sehr starke Veränderung der Aminosäuresequenz mit einer stark erhöhten Anzahl an unbestimmten Kreuzreaktionen zu rechnen. Da zusätzlich die Elution des Antikörpers auf einer Abschwächung der Wechselwirkung gegenüber dem Epitop basiert, kann eine verstärkte Affinität die Ausbeute durch erhöhte Retentionswirkung sogar reduzieren.

Um den Einfluss der Retention während der Elution zu beurteilen, wird die Affinitätschromatographie deshalb mit zwei Epitopen durchgeführt. Als das Peptid mit der stärkeren Affinität wird die Originalsequenz ‚**HYVPEFKGSLPAPRV**‘ (normales Epitop) verwendet. Das zweite Peptid für diesen Versuch hat eine niedrigere Affinität als die Originalsequenz und besitzt die Aminosäuresequenz ‚**HYVPEFKGGLPAPRV**‘ (schwaches Epitop). Das Spenderserum für die Affinitätschromatographie stammt von FS2 und gemäß der zugehörigen Substitutionsanalyse entspricht die Signalstärke dieses Peptids für **IgG** nur 29,5 % und für **IgA** einen undefinierbaren Anteil des Originals.

Zur Evaluierung des durch die Elution bedingten Funktionsverlustes wird diese mit zwei verschiedenen Puffern mit einem unterschiedlichen pH-Wert (pH 2,0 und pH 3,0) durchgeführt. Um ungebundene und konkurrierende Antikörper oder Proteine mit einer geringeren Affinität aus der stationären Phase zu spülen, wird diese vor der Elution mehrfach mit Waschpuffer gespült.

4.2.1.1 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der aus dem Serum isolierten Antikörper wird nach der Elution photometrisch durch Messung der Absorption (Abs) bei OD₂₈₀ mittels einem *NanoDrop*[®] 1000 Spektralphotometer bestimmt. Entsprechend der Herstellerangaben entsprechen 1,0 Abs einer Konzentration von 1,0 mg/mL Protein. Zusätzlich zu den Proben wird der Proteingehalt von vor der Elution durchgeführten Waschschritten gemessen, um einen eventuellen Proteinverlust durch diese Schritte nachzuweisen. Bei der ersten Durchführung der Affinitätschromatographie wird im Unterschied zu der Methodik in Kapitel 8.2.1.3 „**Affinitätschromatographie**“ nur eine einzige Elution mit der Hälfte des dort angegebenen Volumens (2,5 mL) von jeder Säule durchgeführt. Waschpuffer-Formulation 1 enthält keine zusätzlichen 1,0 M Natriumchlorid und von den Waschschritten wird nur von Durchlauf 2 (DL 2) eine Probe für jedes Epitop entnommen. Außerdem wird ein zweiter Waschschritt mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) direkt nach der Probenentnahme von DL 2 durchgeführt und als weitere Probe in die Analyse mit aufgenommen. Diese zusätzliche Kontrolle erlaubt es, den Einfluss der Salzkonzentration auf die Elution abzuschätzen. Als Blindwert für die photometrischen Messungen der Proben wird Elutionspuffer verwendet. Für DL 2 wird Waschpuffer-Formulation 2 als Blindwert benutzt. Alle photometrischen Messungen in ddH₂O verwenden für diesen Zweck die gleiche Flüssigkeit ohne Probe. Alle Messwerte sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Das schwache Epitop zeigt eine deutlich größere Wirkung darin, Proteine aus der stationären Phase zu eluieren. Hierbei ist auch ein merklicher Unterschied zwischen der Elution bei einem pH-Wert von 2,0 und 3,0 zu sehen. Bei der Elution mit einem saureren pH-Wert wird mehr als das Zweifache an Protein von der Säule eluiert. Die stationäre Phase mit dem normalen Epitop zeigt bei der Elution keinen entscheidenden Unterschied zwischen den beiden pH-Werten. Dies lässt vermuten, dass der Effekt, welcher die Proteine in der stationären Phase zurückhält, in diesem Fall nicht durch den pH-Wert beeinflusst wird. Bei der erfolgreichereren der beiden Elutionen mit dem normalen Epitop wird nur 65,7 % der Menge extrahiert, welche vergleichsweise aus der stationären Phase mit dem konjugierten schwachen Epitop bei einem pH-Wert von 2,0 isoliert wurde. Destilliertes Wasser hat trotz seines niedrigen pH-Wertes nur eine minimale Elutionswirkung. Diese Wirkung ist so gering, dass die Flüssigkeit als wirksamer Waschpuffer anzuzweifeln ist, um konkurrierende Proteine zu entfernen. Der Waschpuffer

zeigt derweil eine drei- bis viermal so starke Elutionswirkung im Vergleich zu ddH₂O. Die Salzkonzentration hat daher einen deutlichen Effekt auf die Wascheffektivität. Waschpuffer-Formulation 2 eignet sich daher, um Verunreinigungen und unspezifische Proteine von der stationären Phase zu spülen.

Tabelle 15: Absorptionswerte und ungefähre Proteinmenge innerhalb der Elutionen aus der Affinitätschromatographie. Insgesamt werden drei photometrische Messungen pro Probe durchgeführt. Die SA ist in Klammer angegeben.

Absorptionsmessung OD ₂₈₀ nach Affinitätschromatographie			
Epitop	pH bei Elution	Abs bei OD ₂₈₀ (SA)	Proteinmenge in [µg/mL]
schwaches Epitop	2,0	28,3 x 10 ⁻² (± 8,9 %)	283,0
schwaches Epitop	3,0	12,3 x 10 ⁻² (± 28,5 %)	123,0
DL 2, schwaches Epitop	7,4	9,0 x 10 ⁻³ (± 33,3 %)	9,0
ddH ₂ O, schwaches Epitop	5,0	2,0 x 10 ⁻³ (± 0,0 %)	2,0
normales Epitop	2,0	1,8 x 10 ⁻¹ (± 5,6 %)	180,0
normales Epitop	3,0	18,6 x 10 ⁻² (± 25,3 %)	186,0
DL 2, normales Epitop	7,4	1,0 x 10 ⁻² (± 17,3 %)	10,0
ddH ₂ O, normales Epitop	5,0	3,0 x 10 ⁻³ (± 0,0 %)	3,0

Die Ergebnisse zeigen, dass ein pH-Wert von 2,0 notwendig ist, um eine gute Ausbeute bei der Elution zu erzielen. Ist aber die Affinität des Epitops zu stark, werden die Antikörper von der stationären Phase zurückgehalten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine temporäre Dis- und anschließende Reassoziierung der Antikörper an die Antigen-beladene stationäre Phase.

4.2.1.2 Bestimmung der Antikörperfunktion und Ausbeute

Eine photometrische Bestimmung des Proteingehalts ermöglicht es, die Menge an eluiertem Protein abzuschätzen, bietet jedoch keine Information über die Funktionalität und Affinität der isolierten Antikörper. Als Methode, um diese beiden Parameter zu untersuchen, werden alle Eluate zusammen mit dem entsprechenden Spenderserum als Primärfärbung auf einem *PEPperCHIP*[®] Peptid-Mikroarray mit Substitutionsanalysen der Aminosäuresequenz ‚HYVPEFKGSLPAPRV‘ in Fünfer-Konfiguration eingesetzt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Eluate werden diese bei der Färbung auf eine Proteinkonzentration von 1,0 µg/ml verdünnt. In der Sekundärfärbung werden alle Antikörper, welche auf den Mikroarrays binden, gegen **IgG** und **IgA** eingefärbt. Die Detektion und Auswertung der Substitutionsanalysen sowie die Darstellung der Antikörper-Fingerabdrücke erfolgt gemäß Kapitel 4.1 „**Substitutionsanalysen von Patientenseren**“ und sind für **IgG** in Abbildung 14 und für **IgA** in Abbildung 15 dargestellt.

Die SA der Signalstärken aus der Sekundärfärbung für die originale Aminosäuresequenz liegt für **IgG** durchschnittlich bei 24,8 %. Der Kontrollrahmen aus dem Epitop für Anti-Poliomyelitis-Antikörper ist nur im Serum zu erkennen. Das ist eine Andeutung dafür, dass Antikörper ohne eine Affinität gegenüber dem Epitop von **Emp** durch die Waschschriffe aus den Eluaten entfernt worden sind. Aus empirischer Sicht markieren die Sekundärantikörper bei einer Elution mit einem pH-Wert von 2,0 mehr Antikörper als bei einem pH-Wert von 3,0. Es ist auch ein deutlicher Unterschied zwischen der Affinitätschromatographie durch das schwache und normale Epitop zu erkennen. So zeigen Elutionen von stationären Phasen mit dem schwachen Epitop bei einem pH-Wert von 3,0 mehr Signalstärke als Elutionen aus stationären Phasen mit dem normalen Epitop bei einem saureren pH-Wert.

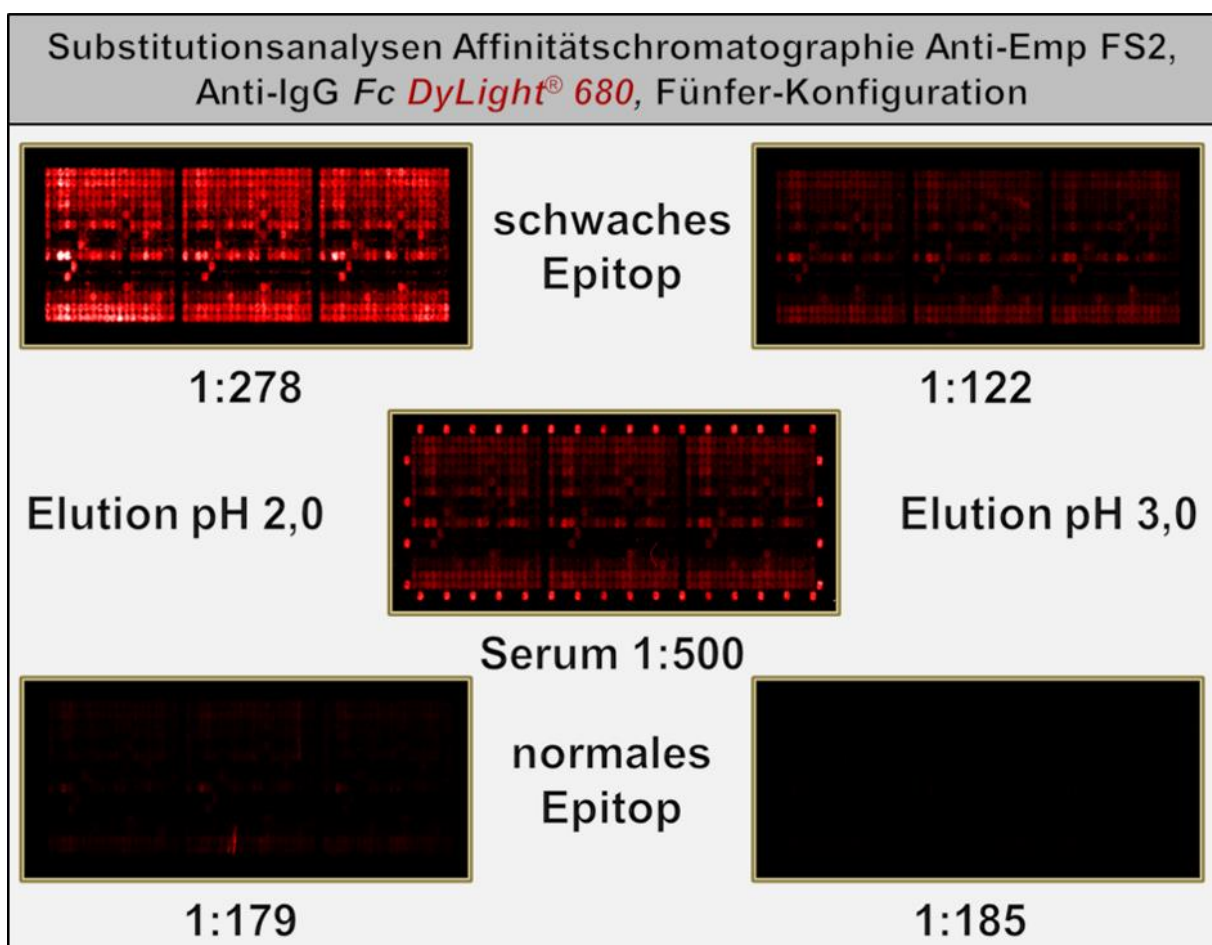


Abbildung 14: Alle Sekundärfärbungen werden in einem Verhältnis von 1:5000 durchgeführt und sind entsprechend ihrer Parameter auf der Abbildung verteilt. Oben = schwache Affinität des Epitops; Unten = normale Affinität des Epitops; Links = Elution bei pH 2,0; Rechts = Elution bei pH 3,0; Mitte = Serum. Mit Ausnahme des Serums ist der Proteingehalt bei der Primärfärbung von jeder Probe zum direkten Vergleich auf einen Proteingehalt von 1,0 µg/mL normalisiert.

Die durchschnittliche SA der Signalstärken aus der Sekundärfärbung des originalen Peptids von **IgA** liegt bei 93,6 %. Wie auch bei **IgG** zeigt sich der Kontrollrahmen der Anti-Poliomyelitis-Antikörpern nur bei dem eingefärbten Serum. Alle Messungen dieses Antikörpertyps mussten

aufgrund der niedrigen Signalstärke bei einer sehr hohen Sensitivität durchgeführt werden und weisen zwischen den Triplikaten eine sehr große Heterogenität in den Signalstärken auf. Bei der Auswertung wurden zu viele Messwerte aufgrund einer hohen SA eliminiert, weshalb eine sinnvolle Zusammenfassung dieser Ergebnisse nicht möglich ist. Eine empirische Auswertung ergibt denselben Trend, der bei der Sekundärfärbung gegen **IgG** beobachtet wurde. Allerdings ist das typische Muster der Substitutionsanalysen von Anti-**Emp** bei der Sekundärfärbung der Elution aus der stationären Phase mit dem normalen Epitop bei **IgA** nicht klar zu erkennen. Bei Elutionen von diesem Epitop zeigt sich kein deutlicher empirischer Unterschied in der Signalstärke in Abhängigkeit des pH-Werts der Elution.

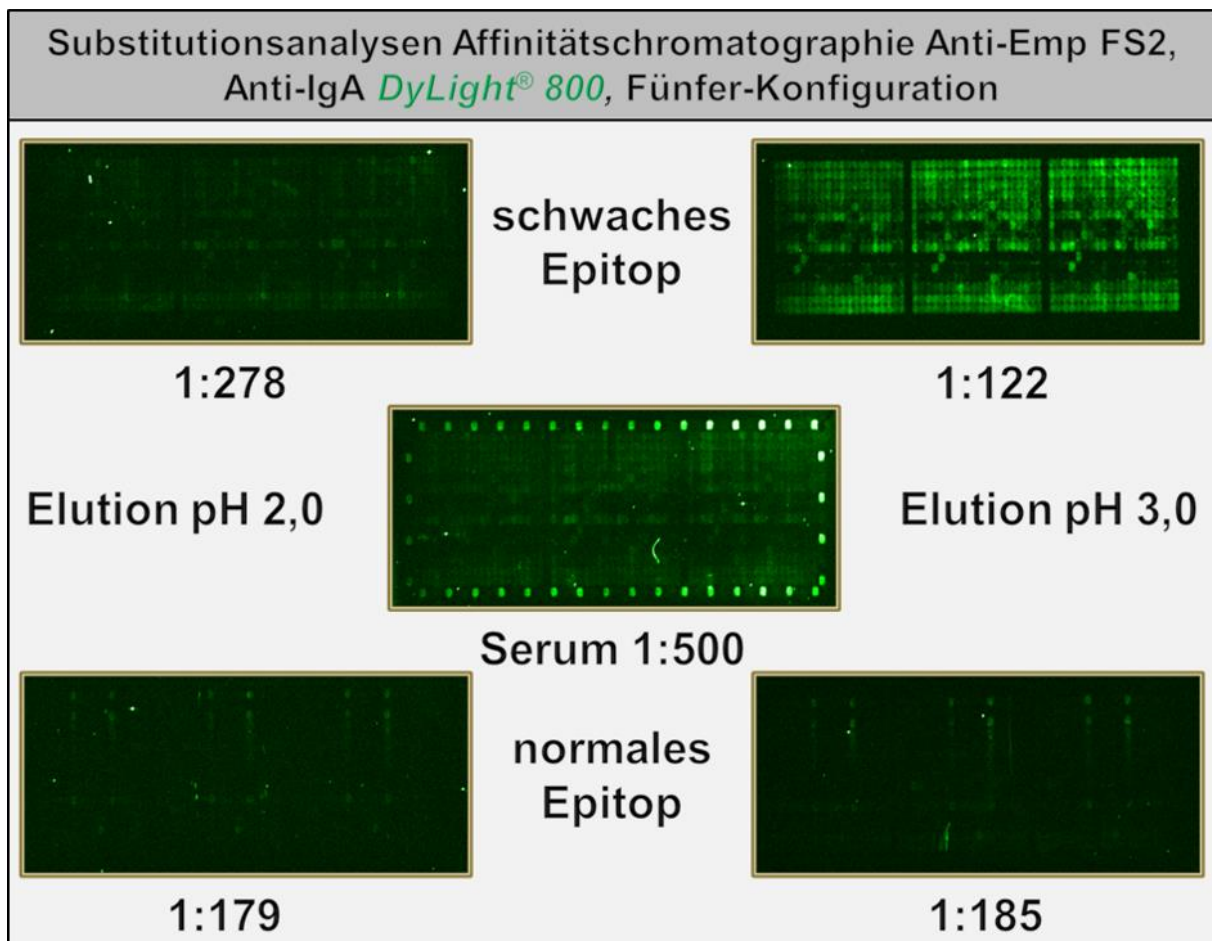


Abbildung 15: Alle Sekundärfärbungen werden in einem Verhältnis von 1:5000 durchgeführt und sind entsprechend ihrer Parameter auf der Abbildung verteilt. Oben = schwache Affinität des Epitops; Unten = normale Affinität des Epitops; Links = Elution bei pH 2,0; Rechts = Elution bei pH 3,0; Mitte = Serum. Mit Ausnahme des Serums ist der Proteingehalt bei der Primärfärbung von jeder Probe zum direkten Vergleich auf einen Proteingehalt von 1,0 µg/mL normalisiert.

Für eine Hervorhebung der Unterschiede in der Affinität wird die normalisierte RFI aller sichtbaren Peptidspots aus den Sekundärfärbungen individuell bestimmt. Die Signalstärken von Peptidspots aus der Sekundärfärbung von Eluatzen wird hierbei mit den Signalstärken von Peptidspots aus der Sekundärfärbung verglichen, welche die gleiche Position im Peptidarray

besitzen. Hierbei wird die Summe aller Peptidspots bestimmt, welche bei direktem Vergleich eine Differenz von 30,0 % oder höher in der RFI aufweisen. Das Ergebnis dieses Vergleiches wird zu der Gesamtzahl von 300 Peptidspots pro Substitutionsanalyse in Relation gesetzt und ist in Tabelle 16 aufgelistet.

Es zeigt sich ein merklicher Unterschied zwischen den Signalstärken der Sekundärfärbung des Serums und der Eluate, welche durch das normale Epitop isoliert wurden. Neben der großen Anzahl an Peptidspots mit einer unterscheidbaren Signalstärke sind es die einzigen Elutionen, welche an einigen Peptidspots ein vergleichsweise stärkeres Signal zeigen als das Serum. Besonders auffällig ist hierbei die starke Zunahme der RFI bei der Asparaginsäure, welche die Aminosäure an der siebten Position substituiert.

Tabelle 16: Anzahl der Peptidspots der individuellen Elutionen, deren RFI sich nach der Sekundärfärbung um mehr als 30,0 % von der korrespondierenden RFI der Peptidspot der Sekundärfärbung des Serums unterscheidet. Alle RFI sind als Mittelwerte der jeweiligen Triplikate zusammengefasst.

Differenz der Aminosäureblots der Affinitätschromatographie von FS2: Eluate gegen Serum ($\Delta \geq 30,0\%$)					
Eluat	Peptidspots (Signalstärke Eluat < Serum)		Peptidspots (Signalstärke Eluat > Serum)		Anzahl gesamt (relativ)
	Anzahl (relative Anzahl)	durchschn. Differenz	Anzahl (relative Anzahl)	durchschn. Differenz	
schwaches Epitop bei pH 2,0	16 (5,3 %)	40,7 %	-	-	16 (5,3 %)
schwaches Epitop bei pH 3,0	7 (2,3 %)	37,5 %	-	-	7 (2,3 %)
normales Epitop bei pH 2,0	39(13,0 %)	43,4 %	6 (2,0 %)	50,8 %	44 (15,0 %)
normales Epitop bei pH 3,0	25 (8,3 %)	46,9 %	13 (4,3 %)	63,5 %	38 (12,6 %)

Elutionen von Antikörpern, welche durch das schwache Epitop aufgereinigt wurden, zeigen bei allen merklichen Differenzen immer eine schwächere RFI als die Originalsequenz. Eine Besonderheit dabei ist es, dass es hauptsächlich die sauren Aminosäuren sind, welche bei der Substitution ein deutlich schwächeres Signal zeigen. Keine der Elutionen aus einer stationären Phase mit schwachem Epitop zeigt innerhalb der essenziellen Positionen eine Differenz von über 30,0 % zur RFI der Peptidspots, welche mit Blutserum eingefärbt wurden. Durchschnittlich liegt die Differenz an diesen Positionen bei 6,9 % für positive und -5,7 % bei negativen Differenzen. Beide Werte liegen unter der durchschnittlichen SA des originalen Peptids. Es ist anzunehmen, dass sich die hypervariablen Regionen der aufgereinigten Antikörper in Nuancen unterscheiden, was eine abweichende Affinität an den nicht-essenziellen Positionen zur Folge hat. Die geringe Differenz an den essenziellen Positionen deutet aber an, dass sowohl die Antikörper in den Elutionen als auch die Antikörper im Serum das originale Epitop mit ähnlicher Effektivität binden. Bei der Aufreinigung mit dem normalen Epitop sind in der Differenz zwischen den Peptidspots ein Betrag von über 30,0 % an einer beziehungsweise zwei Positionen für die Elution bei einem Wert von 3,0 beziehungsweise 2,0 zu beobachten. Die betreffenden Substitutionen sind an essenziellen Positionen, die einen verhältnismäßig niedrigen Konservierungsgrad haben. Paart sich dieses Detail aber mit der großen Anzahl an Differenzen, ist das ein starkes Indiz dafür, dass sich die aufgereinigten Antikörper merklich von den aus dem Serum eluierten Antikörpern unterscheiden. Für die Unterschiede in der Affinität gibt es zwei möglich Ursachen. Eine davon könnte sein, dass die durch den sauren pH-Wert bedingte Denaturierung das Paratop der Antikörper permanent umstrukturiert, sodass dieses nach der Elution eine veränderte Bindungsspezifität hat. Die zweite mögliche Ursache ist, dass es mehrere Varianten des Anti-**Emp**-Antikörpers gibt und diese bei der Elution voneinander getrennt werden. Beide Möglichkeiten schließen sich nicht gegenseitig aus und durch diese Immunfärbung lässt sich nicht bestimmen, welcher der beiden Möglichkeiten wahrscheinlicher ist.

Ein Problem, welches die Differenzen in den Signalstärken mit sich bringen, ist, dass eine Bestimmung der GFI von den Peptidarrays nicht zur Auswertung der Substitutionsanalysen durchgeführt werden kann. Die merklichen Differenzen würden eine Unschärfe im relativen Verhältnis der Signalstärken ergeben. Damit die Peptidarrays trotzdem miteinander verglichen werden können, wird eine kleinere Teilmenge an Signalen verwendet, die zwischen den Sekundärfärbungen der Elutionen und dem Serum nur eine sehr geringe Differenz in den Signalstärken zeigt. Als Teilmenge für diesen Zweck bietet sich die RFI der Peptidspots an, welche die originale Aminosäurefolge ‚HYVPEFKGSLPAPRV‘ beinhalten. Diese Peptidspots repräsentieren für jede Probe die relative Affinität des Antikörpers gegenüber dem Epitop und sind in einer ausreichenden Menge vorhanden, um eine akzeptable Fehlertoleranz zu besitzen. Folglich werden diese Spots für jede Probe als Mittelwert zusammengefasst und

untereinander verglichen. Dieser Vergleich bietet ebenfalls die Möglichkeit, die Ausbeute von funktionsfähigen Anti-**Emp**-Antikörpers in Unabhängigkeit der absoluten Proteinmenge zu berechnen, wenn sowohl der Verdünnungsfaktor als auch das Gesamtvolumen der Proben mit in die Berechnung einbezogen wird. Die Ergebnisse der Berechnung sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Berechnung der RFI aller während der Affinitätschromatographie entnommenen Proben und nachfolgende Bestimmung der relativen Ausbeute von funktionsfähigem Antikörpern im Verhältnis zum Blutserum.

Vergleich und Ausbeute verschiedener Extraktionsbedingungen				
Probe	Volumen	Verdünnungsfaktor in [x]	RFI in [RFU] mit (SA)	Ausbeute
Serum von FS2	2,5 mL	500	$1,1 \times 10^{10}$ (13,8 %)	-
schwaches Epitop bei pH 2,0	112,0 μ L	283	$9,4 \times 10^8$ (18,3 %)	8,4 %
schwaches Epitop bei pH 3,0	109,0 μ L	123	$1,0 \times 10^8$ (17,1 %)	9,1 ‰
normales Epitop bei pH 2,0	112,0 μ L	186	$4,2 \times 10^7$ (51,7 %)	3,8 ‰
normales Epitop bei pH 3,0	109,0 μ L	180	$3,7 \times 10^6$ (23,4 %)	3,3 ‰

Im direkten Vergleich zeigt die Affinitätschromatographie mit dem schwachen Epitop in der stationären Phase in Kombination mit einer Elution bei einem pH-Wert von 2,0 mit 8,4 % die beste Ausbeute. Eine Elution bei einem pH-Wert von 3,0 reduziert die Ausbeute auf 9,1 ‰. Eine deutlich schlechtere Ausbeute zeigen hierbei die Elutionen der Affinitätschromatographie mit dem normalen Epitop. Bei gleichbleibender Elution werden mit dem schwachen Epitop mehr als das 20-fache an funktionsfähigen Antikörper gewonnen. Diese Beobachtung steht im starken Kontrast zu der photometrisch bestimmten Proteinmenge aus Tabelle 15. Eine Erklärung hierfür ist, dass die Bedingungen der Affinitätschromatographie und Elution eine stark denaturierende Wirkung auf den Antikörper haben, wodurch dieser in seiner Funktion eingeschränkt wird. Des Weiteren kann auch eine Verunreinigung proteinogenen Ursprungs das Messergebnis der photometrischen Bestimmung verfälscht haben. Nichtsdestotrotz zeigt die Elution einer Affinitätschromatographie mit dem Peptid ‚**HVPEFKGGLPAPRV**‘ bei einem pH-Wert von 2,0 die besten Bedingungen für eine erfolgreiche Extraktion von Anti-**Emp**-Antikörpern aus Blutserum.

4.2.1.3 Analyse von Protein- und Antikörperbanden

Als weiterer Nachweis für die erfolgreiche Extraktion des Antikörpers und gleichzeitig gute Option, die Proben auf Verunreinigungen zu überprüfen, bietet sich die Durchführung einer Lithiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LDS-PAGE) mit anschließender Coomassie®-Brillant-Blau-Färbung oder *Western Blot* an.

Die LDS-PAGE faltet alle Proteine innerhalb der Proben auf und trennt diese entsprechend ihrer Größe voneinander. Bei reduzierenden Bedingungen wird ein Reagenz hinzugegeben, welches die Disulfidbrücken der Proteine voneinander trennt, wodurch die Quartärstruktur aufgelöst und das Protein in all seine Untergruppen aufgeteilt wird. Entsprechend bleibt diese Trennung aus, wenn auf das Reduzierungsreagenz verzichtet wird. Bei den Antikörpern hat das zur Folge, dass sie im Gel entweder als vollständiger Antikörper oder als leichte und schwere Ketten aufgetrennt werden. Bereits ohne das Reduzierungsreagenz haben LDS ^[1392] und der niedrige pH-Wert während der Elution eine denaturierende Wirkung auf die Proteine ^[1393]. Aus diesem Grund ist es möglich, dass ein geringer Anteil an Antikörpern auch in Abwesenheit des Reduzierungsreagenzes in seine Einzelketten aufgetrennt oder fragmentiert wird. Gegenteilig ist das Reduzierungsreagenz keine Garantie für eine vollständige Denaturierung, und so ist auch unter reduzierenden Bedingungen das Auftreten von vollständigen und fragmentierten Antikörpern möglich ^[1392]. Leichte Ketten sind nicht direkt miteinander verbunden und können keine Dimere bilden ^[51]. Da die Coomassie®-Brillant-Blau-Färbung alle Proteine einfärbt, sind auch die anderen Antikörperklassen sichtbar. Die Anteilsmenge von **IgE** und **IgD** sind vernachlässigbar und die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass **IgA** einen verhältnismäßig niedrigen Anteil in der Elution hat. Die schweren Ketten von **IgA** sind um ~ 5,0 kDa kleiner als **IgG₃** und ~ 5,0 kDa größer als die drei verbleibenden **IgG** Subtypen ^[51]. Es ist nicht bekannt, welcher Anteil an Anti-**Emp-IgM** sich in den Elutionen befindet. Da diese Antikörperklasse aber normalerweise über keine sehr gute Oponisierungswirkung verfügt ^[51] ist davon auszugehen, dass der Anteil an **IgM** nur marginal ist. Mit ~ 70,0 kDa besitzt diese Antikörperklasse die größten schweren Ketten ^[51]. **IgA** liegt im Blutserum nicht als Dimer vor, daher können sich nur unvollständig aufgefaltete Banden entwickeln, in welchen monomere Antikörper zurückgehalten werden ^[51]. Unvollständig aufgefaltetes **IgM** ist so groß, dass es aufgrund der Porengröße nicht aufgetrennt werden kann ^[51]. Zur Vollständigkeit werden alle Proben für die Coomassie®-Brillant-Blau-Färbungen sowohl unter reduzierenden, als auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen behandelt. Zusätzlich bietet die LDS-PAGE die Möglichkeit, Suspensionen auf ihren Proteingehalt zu untersuchen. Die Methode erlaubt es daher, einen Anteil der stationären Phase (Harz) aufzutragen, um die relative Proteinmenge zu bestimmen, welche nach der Elution auf dem Harz verbleibt. Für die Proben, welche nicht mit Reduktionsmittel behandelt werden, ist das eingefärbte Gel in Abbildung 16 präsentiert. In Abbildung 17 ist das Gel für reduzierte Proben

dargestellt. Zur Ergänzung bietet der *Western Blot* präzise Informationen darüber, welche Antikörpertypen und -ketten in den Banden vorzufinden sind. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von Sekundärantikörpern kann nur die schwere Kette von **IgA** lokalisiert werden. Der *Western Blot* wird unter reduzierenden Bedingungen in Abbildung 18 in der Sekundärfärbung gegen **IgG**, in Abbildung 19 in der Sekundärfärbung gegen **IgA** und in kombinierter Darstellung in Abbildung 20 präsentiert. *Western Blots* werden als Graustufenbilder dokumentiert und in Falschfarben dargestellt. Der Kontrast und die Helligkeit aller Abbildungen wird zur besseren Sichtbarkeit verstärkt.

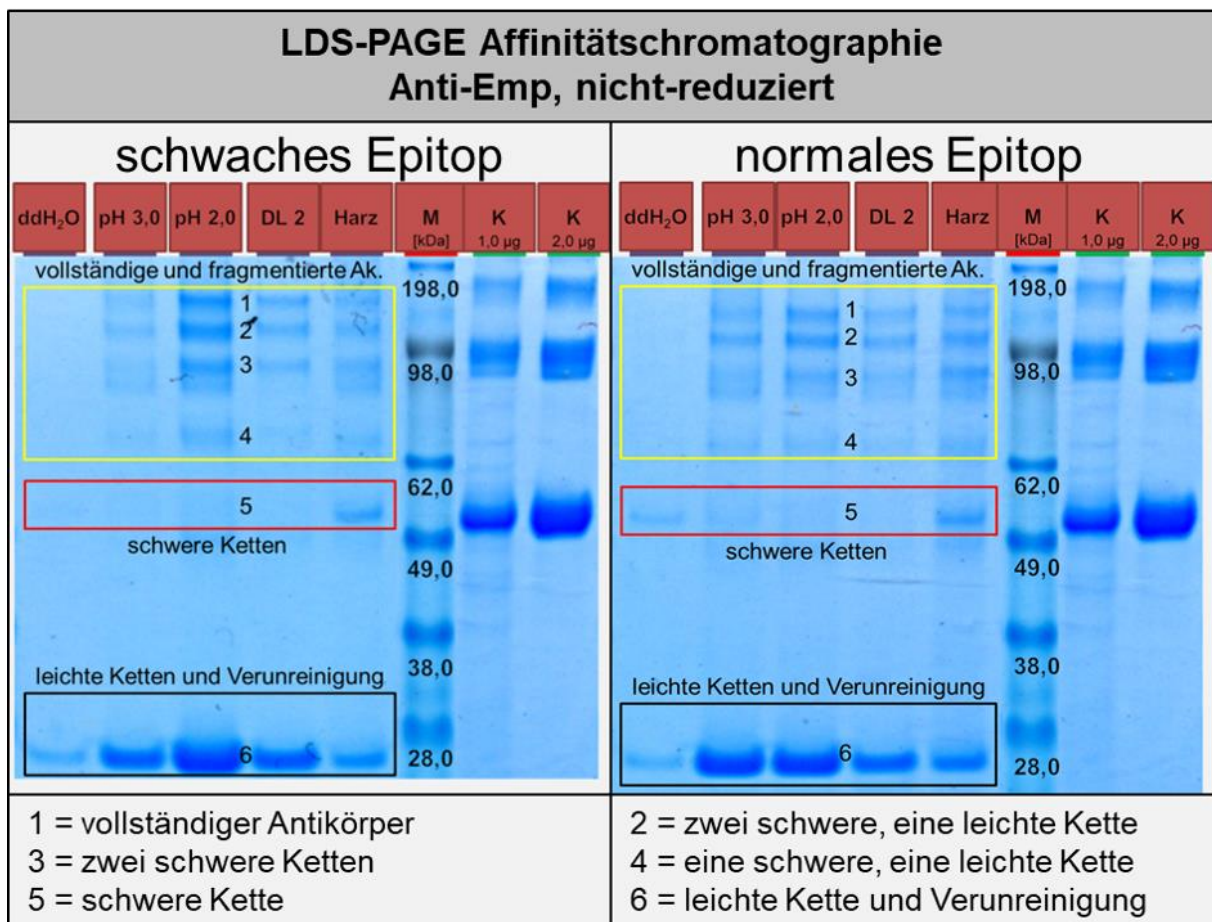


Abbildung 16: Nicht-reduzierende LDS-PAGE aller während der Affinitätschromatographie generierten Proben und stationären Phasen nach einer *Coomassie*[®]-Brillant-Blau-Färbung. Alle Proben werden in einem Volumen von 10,0 µL aufgetragen. Zusätzlich zu den Proben werden 1,0 und 2,0 µg bovines Serumalbumin (**BSA**)(K) und ein Marker für Proteingrößen (M) als Kontrollen verwendet. Die Legende beschreibt, welche Antikörper (Ak.) oder Antikörperfragmente in den nummerierten Banden mit größter Wahrscheinlichkeit zu finden sind.

Das Ergebnis der nicht-reduzierten Proben zeigt, dass die Trennschärfe der LDS-PAGE nicht ausreichend ist, um die einzelnen Antikörpertypen zuverlässig voneinander zu unterscheiden. Der *Western Blot* in Abbildung 20 demonstriert, dass eine schwere **IgG**-Kette nur unterhalb und nicht oberhalb der schweren Kette von **IgA** zu finden ist. Es ist daher auszuschließen,

dass sich in einer der Proben **IgA₃** befindet. Die Größe von **IgG_{1,2,4}** und **IgA** sind in einem nicht-reduziertem Verlauf zu ähnlich, sodass die Bandbreite der Banden zu groß ist, um diese spatial unterscheiden zu können. Eine Relevanz von **Anti-Emp-IgM** kann ausgeschlossen werden, da sich auf der Höhe der Markierung für ~ 188,0 kDa keine entsprechende Bande in unmittelbarer Nähe befindet. Weiter fällt auf, dass bei jeder Probe eine sehr große Bande auf der Höhe der Markierung von ~ 28,0 kDa aufzufinden ist. Diese Bande zeigt eine unverhältnismäßige Größe zum relativen Anteil der vollständigen und fragmentierten Antikörper und überdeckt die Bande der leichten Antikörperketten komplett.

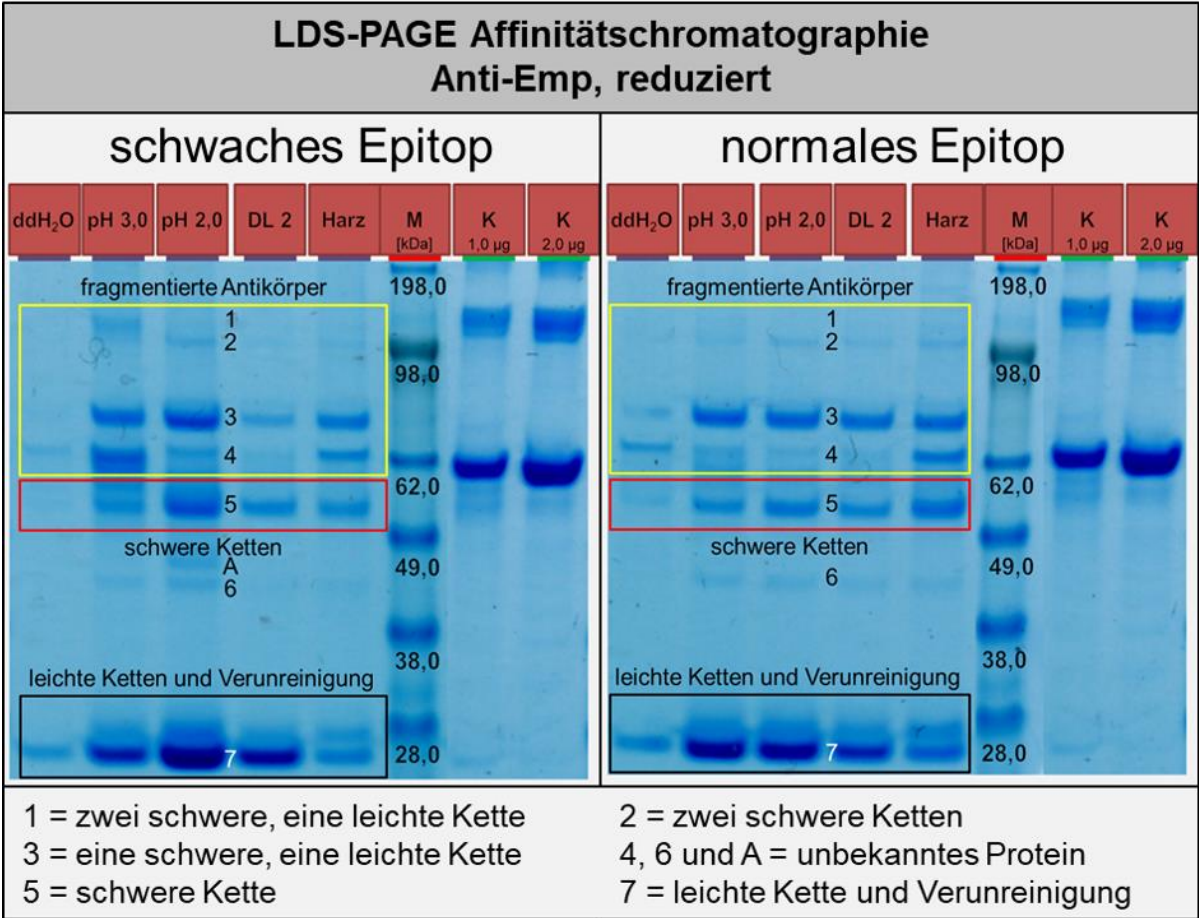


Abbildung 17: LDS-PAGE aller während der Affinitätschromatographie generierten Proben und stationären Phasen unter reduzierenden Bedingungen, nach einer *Coomassie*[®]-Brillant-Blau-Färbung. Alle Proben werden in einem Volumen von 10,0 µL aufgetragen. Zusätzlich zu den Proben werden 1,0 und 2,0 µg **BSA** und ein Marker für Proteingrößen als Kontrollen verwendet. Die Legende beschreibt, welche Antikörper oder Antikörperfragmente in den nummerierten Banden mit größter Wahrscheinlichkeit zu finden sind.

Die LDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen zeigt eine ähnlich schlechte Trennschärfe wie die LDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Während die Information aus Abbildung 20 definitiv zeigt, dass in der fünften Bande unterhalb der Markierung des Molekulargewichts von ~ 62,0 kDa, sowohl **IgA**, als auch **IgG** vorzufinden sein sollten, ist in

Abbildung 17 nur eine kohärente Bande sichtbar. Hierbei besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass die Menge an **IgA** für eine erfolgreiche *Coomassie*[®]-Brillant-Blau-Färbung schlichtweg nicht ausreichend ist. Des Weiteren ist die Anzahl an verbleibenden vollständigen Antikörpern so gering, dass diese nach der Färbung keine sichtbare Bande erzeugen.

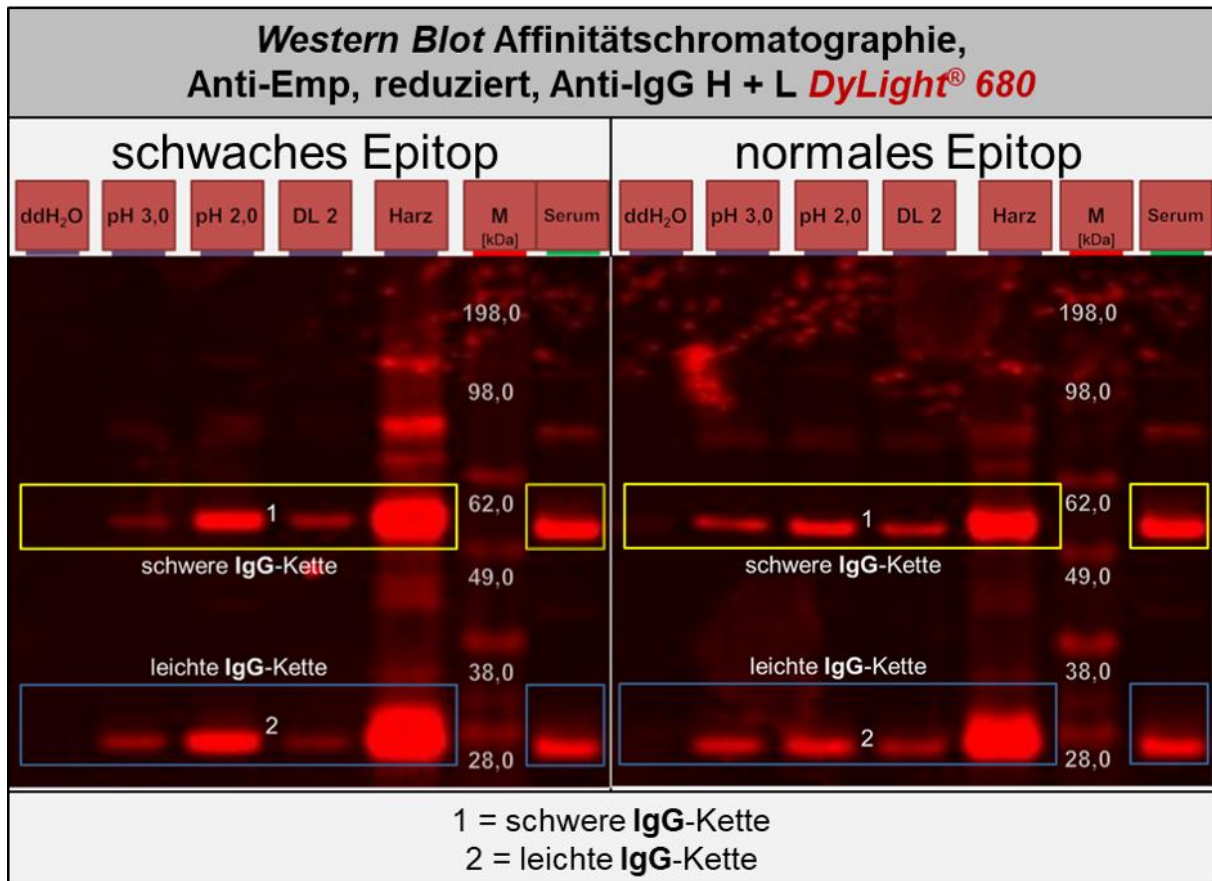


Abbildung 18: Von jeder Probe werden 2,0 μ L in einer reduzierenden LDS-PAGE verwendet. Nach der Übertragung auf eine Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) werden die Proben in einem Verhältnis von 1:5000 mit Sekundärantikörpern gegen leichte und schwere Ketten von **IgG** eingefärbt. Zusätzlich zu den Proben wird das Serum in einem Verhältnis von 1:200 und ein Marker für Proteingrößen als Kontrollen aufgetragen. Die Legende beschreibt, welche Antikörper oder Antikörperfragmente in den nummerierten Banden mit größter Wahrscheinlichkeit zu finden sind.

Bei Banden an der vierten und sechsten Position sowie Bande A, sind im Gel der Abbildung 17 über die Größe undefinierbare Fragmente der Antikörper zu sehen. Die Bande A ist bei den nicht-reduzierten Proben über alle Versuche hinweg einzigartig. In den zugehörigen *Western Blots* ist an diesen Stellen kein oder nur ein sehr schwaches Signal zu erkennen. Es ist möglich, dass es sich hierbei um während der Elution oder der Reduzierung denaturierte Antikörper handelt. In diesem Fall wurden diese Antikörper so stark denaturiert, dass sie nicht mehr durch die entsprechenden Sekundärfärbungen markiert werden können.

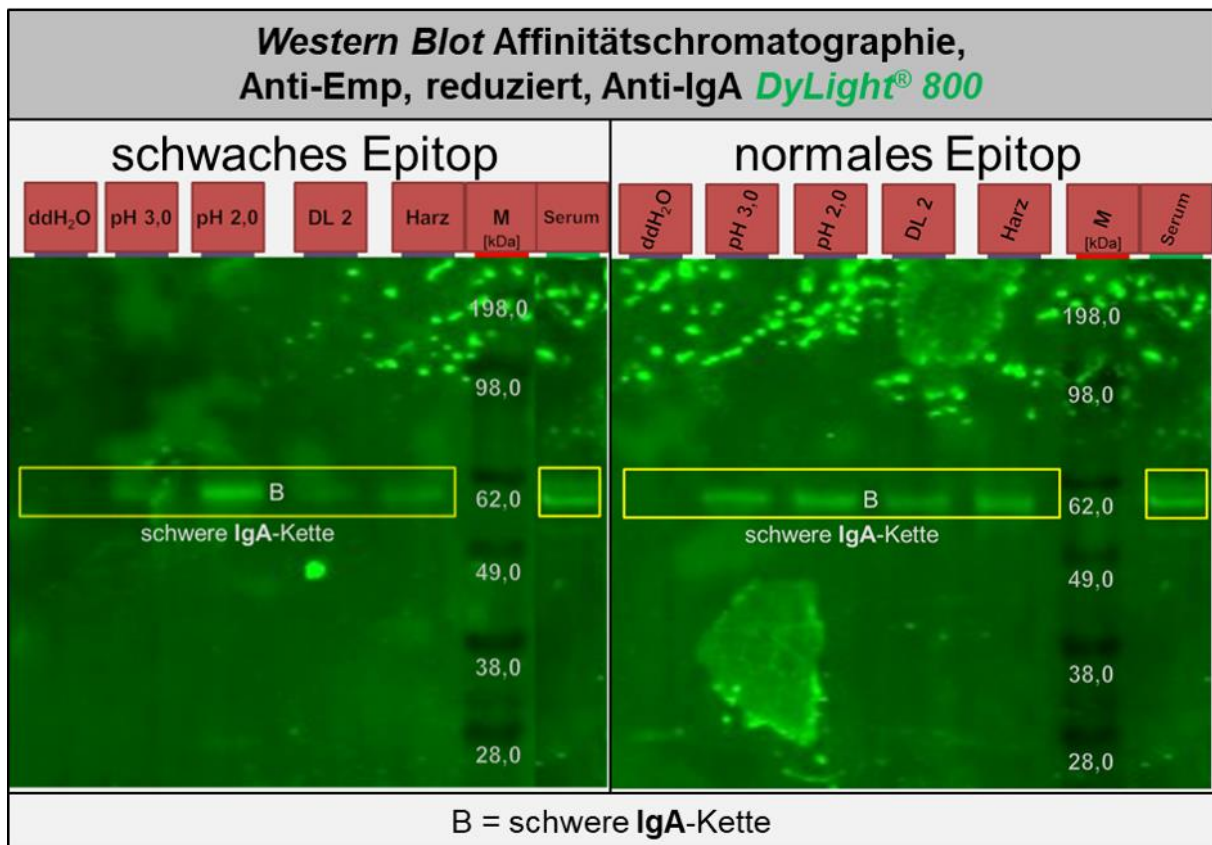


Abbildung 19: Von jeder Probe werden 2,0 µL in einer reduzierenden der LDS-PAGE verwendet. Nach der Übertragung auf eine Membran aus PVDF werden die Proben in einem Verhältnis von 1:5000 mit Sekundärantikörpern gegen schwere Ketten von **IgA** eingefärbt. Zusätzlich zu den Proben werden das Serum in einem Verhältnis von 1:200 und ein Marker für Proteingrößen als Kontrollen aufgetragen. Die Legende beschreibt, welche Antikörper oder Antikörperfragmente in den nummerierten Banden mit größter Wahrscheinlichkeit zu finden sind.

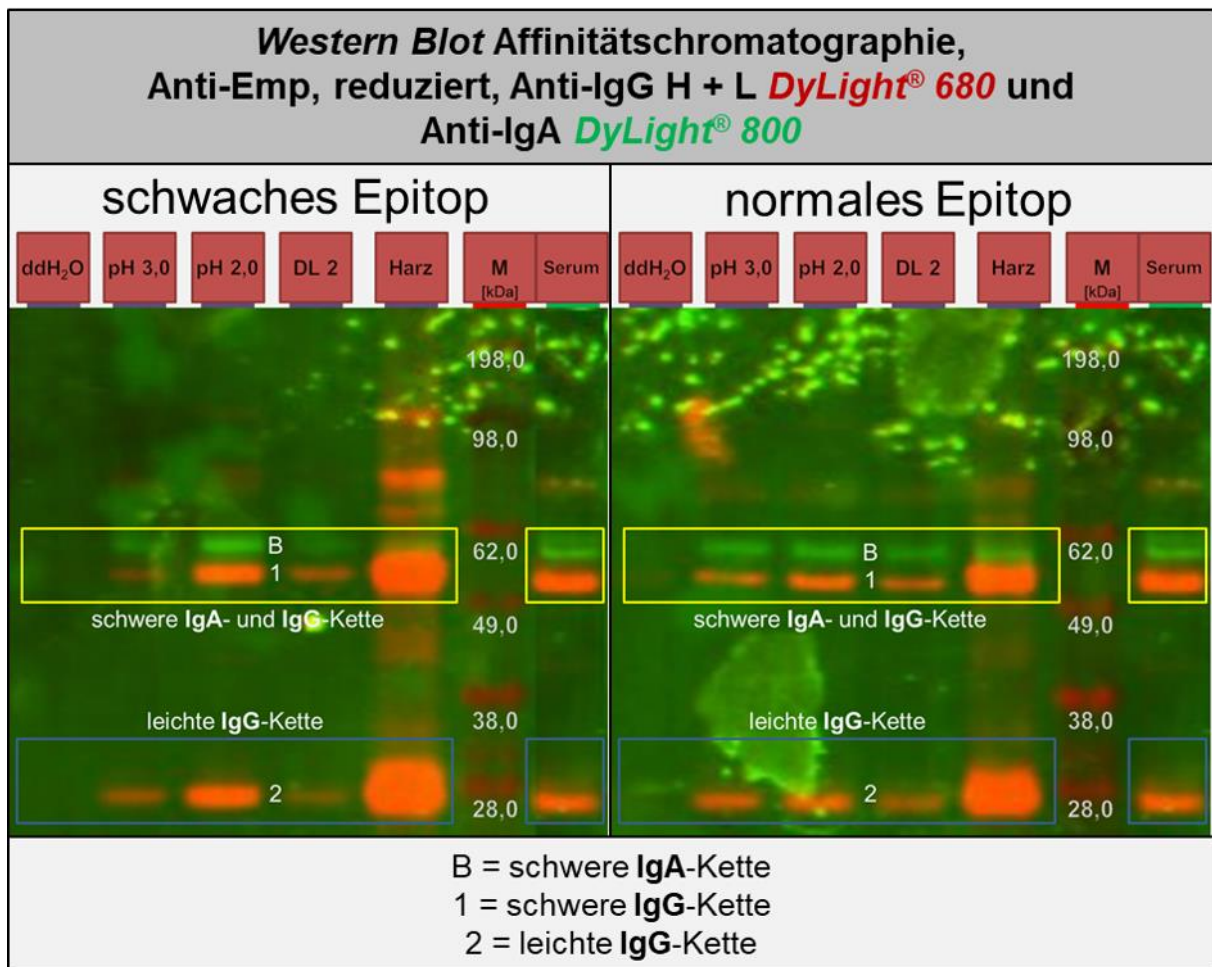


Abbildung 20: Kombination der beiden *Western Blots* aus Abbildung 18 und 19. Die Legende beschreibt, welche Antikörper oder Antikörperfragmente in den nummerierten Banden mit größter Wahrscheinlichkeit zu finden sind.

Die starke Kontamination bei einem Molekulargewicht, bei welchem die leichten Ketten der Antikörper erwartet werden, bestätigt, dass die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration durch eine Verunreinigung verfälscht wird. Gleichzeitig ist aber festzustellen, dass trotz dieser Tatsache die Elution bei einem pH-Wert von 2,0 die größte Signalstärke zeigt, wenn der Antikörper mit dem schwachen Epitop aus dem Serum aufgereinigt wird. Um diese empirische Wahrnehmung in eine messbare Größe umzuwandeln, bietet sich das Gelanalysewerkzeug^[1394] von *ImageJ*^[1395] an. Durch dieses Werkzeug kann eine eingefärbte LDS-PAGE oder ein *Western Blot* in einen zweidimensionalen Graphen umgewandelt werden, welcher die Position und die Intensität jeder Bande als Peak definiert. In diesem Prozess wird jede Bande in einer gleichgroßen Selektion markiert und die relative Pixeldichte individuell berechnet. Diese Pixeldichte wird dann als relative Intensität (RI) in einem Blot dargestellt. Dabei ist das Maximum abhängig von der Datenbreite des Gerätes, welches zur Detektion des Gels oder der Membran verwendet wurde. Zur Vereinheitlichung werden diese Darstellungen in der Dissertation als Intensitäts-Blots bezeichnet. Die Größe der Peaks wird unter gleichbleibenden Bedingungen manuell von dem Hintergrundrauschen des

Gels abgeschieden, um eine Vergleichbarkeit der individuellen Peaks aufrecht zu erhalten. Anschließend werden alle Banden der mit *Coomassie*[®]-Brillant-Blau eingefärbten LDS-PAGE und des *Western Blots* in einen vergleichbaren Intensitäts-Blots umgewandelt. Danach wird die Fläche der Peaks bestimmt. Die Nummerierung der Peaks wird entsprechend der Banden in Abbildungen 16 bis 19 definiert. Mit *Coomassie*[®]-Brillant-Blau eingefärbte Banden sind in Abbildung 21 und *Western Blots* mit der Sekundärfärbung gegen **IgG** und **IgA** in Abbildung 22, beziehungsweise Abbildung 23 dargestellt. Das Integral von jedem Peak wird von *ImageJ*^[1395] berechnet und die Messergebnisse werden in den Tabellen 18 bis 20 aufgelistet und miteinander verglichen. Aufgrund der Funktionsweise des Werkzeuges und des variierenden Hintergrundrauschens ist nur ein Vergleich von Banden möglich, welche sich auf demselben Gel befinden.

Die Ergebnisse aus dem Vergleich werden dazu verwendet, Erkenntnisse aus den vorherigen Analysen zu bestätigen und zu ergänzen. Auch liefern sie einen Schätzwert dafür, wie viel Protein und Antikörper auf der Säule verbleibt und durch die Waschschriffe eluiert wird.

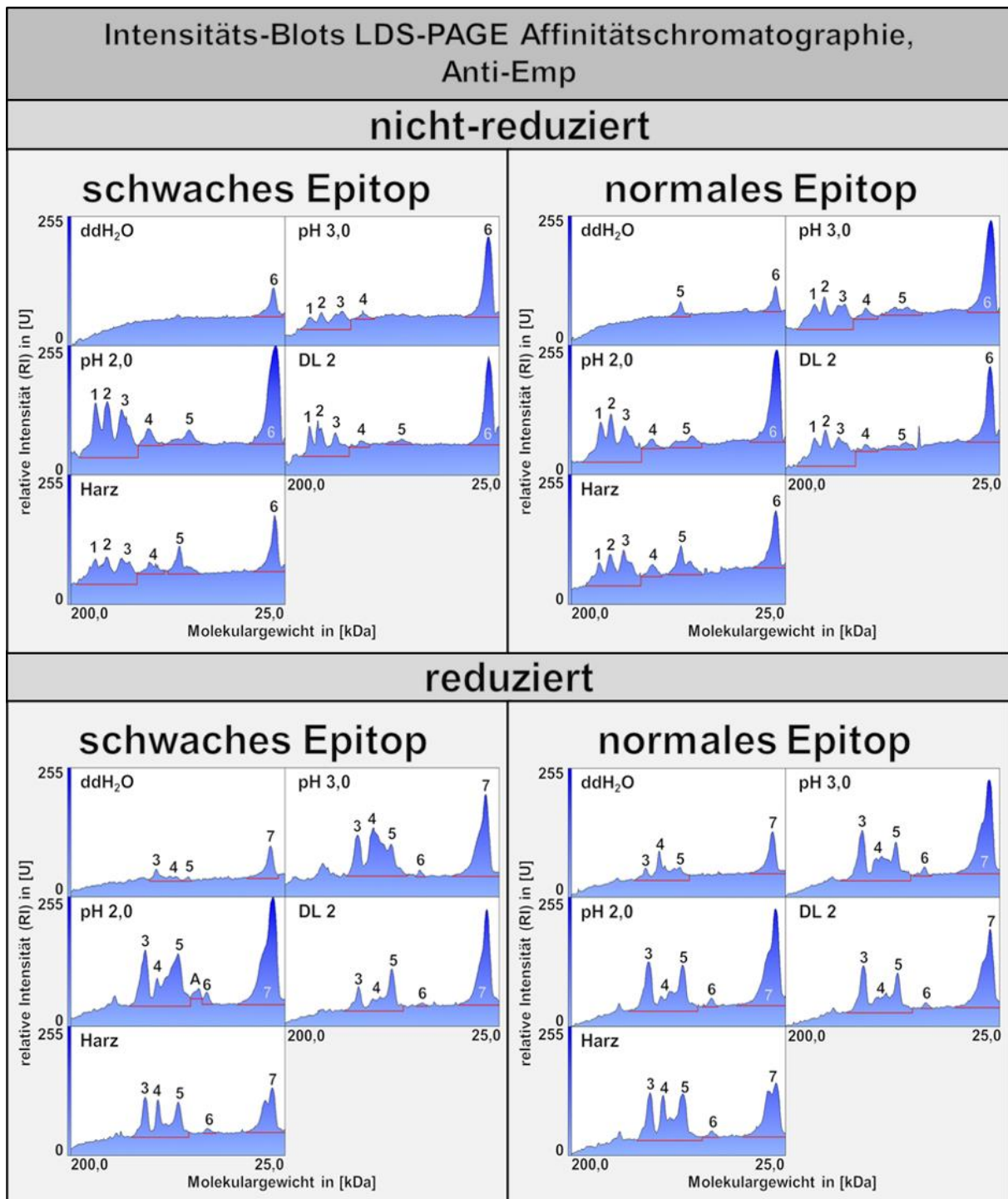


Abbildung 21: Zusammenfassung aller mit *Coomassie*[®]-Brillant-Blau eingefärbten Banden der LDS-PAGE aus den Abbildungen 16 und 17. Die Markierungen der Peaks wurden aus diesen Abbildungen übernommen. Eine rote Linie beschreibt die Abgrenzung eines Peaks gegenüber dem Hintergrundrauschen. Diese Abgrenzung wird für jeden Peak gleich gehalten, damit ein Vergleich zwischen den Proben möglich ist. Die Peaks 1 bis 3 der nicht-reduzierten Proben und Peaks 3 bis 5 der reduzierten Proben werden jeweils als gemeinsamer Peak zusammengefasst, da ihre Flächen sich teilweise überlappen.

Die Intensitäts-Blots, welche aus einer LDS-PAGE generiert werden, zeigen im Verlauf des Gels ein inkonsistentes Hintergrundrauschen, welches mit Abnahme des Molekulargewichts an Betrag zunimmt. Diese Inkonsistenz erschwert die Abgrenzung der Peaks, sodass die ersten beiden Peaks bei den reduzierten Proben nicht genau definiert werden können. Die Peaks der Proben, welche als ddH₂O deklariert sind, zeigen die geringste Größe.

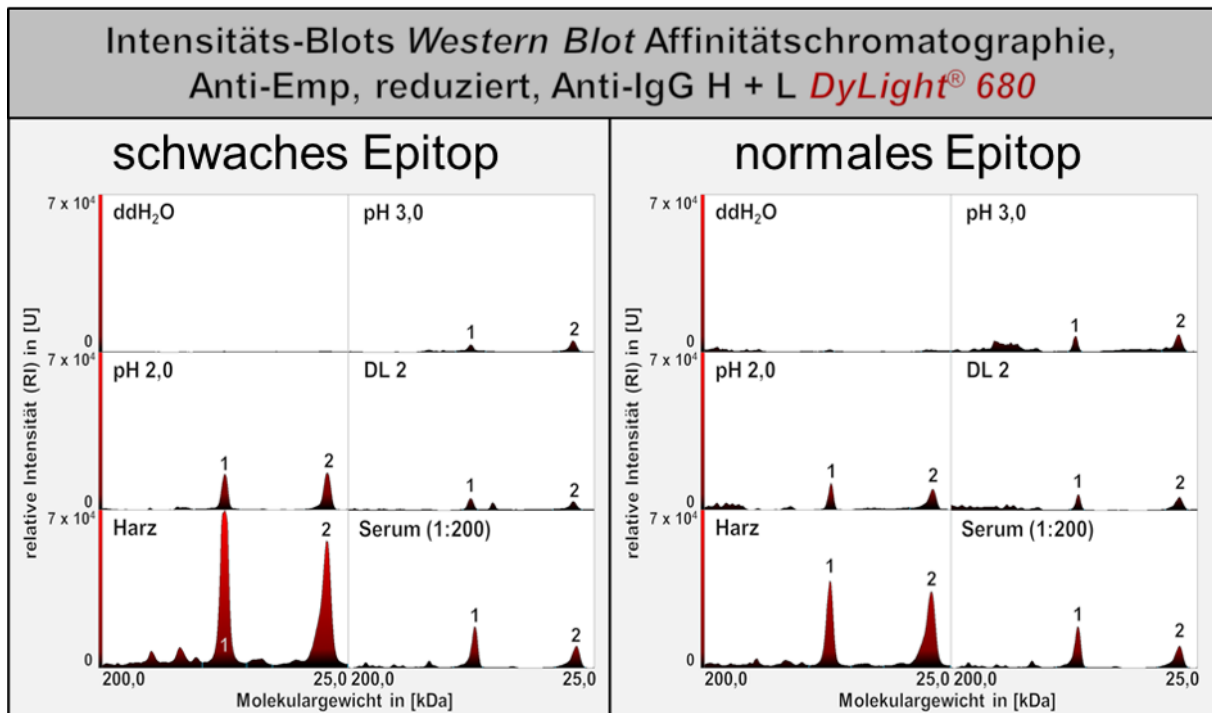


Abbildung 22: Zusammenfassung der Banden des *Western Blots* aus der Abbildung 18. Die Markierungen der Peaks wurden aus dieser Abbildung übernommen. Eine Abgrenzung zum Hintergrundrauschen ist so marginal, dass sie nicht im Blot angezeigt wird. Sie wird für jeden Peak gleich gehalten, damit ein Vergleich zwischen den Proben möglich ist.

Aufgrund der hervorragenden Signalstärke ist das Hintergrundrauschen des *Western Blots* minimal, wenn in der Sekundärfärbung **IgG** eingefärbt wird. Die Signalstärke von **IgA** ist hingegen sehr schwach, weshalb das Hintergrundrauschen stark erhöht ist und Messartefakte erkennbar sind.

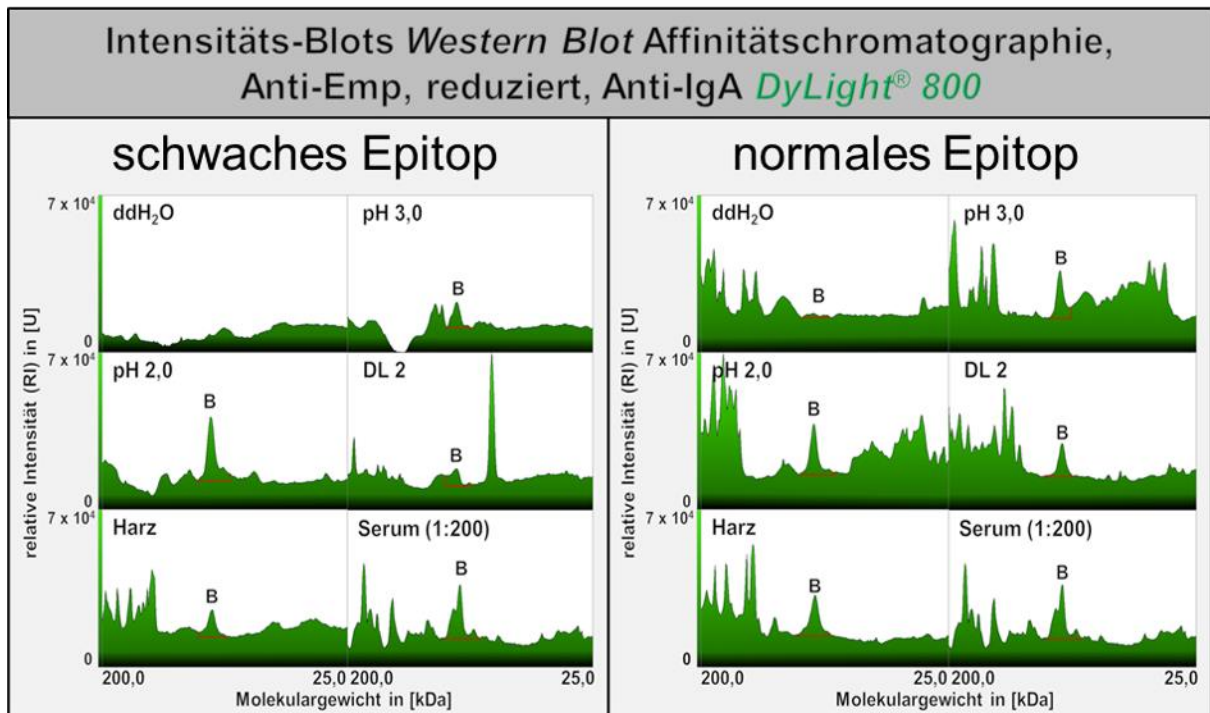


Abbildung 23: Zusammenfassung der Banden des *Western Blots* der Abbildung 19. Die Markierungen der Peaks wurden aus dieser Abbildung übernommen. Wenn sichtbar, beschreibt eine rote Linie die Abgrenzung des Peaks gegenüber dem Hintergrundrauschen. Diese Abgrenzung wird für jeden Peak gleich gehalten, damit ein Vergleich zwischen den Proben möglich ist.

Das Integral aus den ersten drei Peaks in den Intensitäts-Blots der nicht-reduzierten Proben, beschreibt die Summe von vollständigen und fragmentierten Antikörpern, welche mindestens zwei schwere Ketten enthalten. Diese umfassen auch mögliche $F(ab)_2$ -Regionen im dritten Peak. Peak 4 ergibt die Menge an Antikörperfragmenten, welche nur eine schwere und eine leichte Kette enthalten. Der fünfte Peak wird durch die Menge an einzelnen schweren Ketten sowie *Fab*- und *Fc*-Regionen definiert und der sechste Peak ist eine Referenz für die Größe der proteinogenen Verunreinigung. Nachdem die stationäre Phase mit Wasser gespült wurde, wird von beiden Epitopen eine kleine Menge der proteinogenen Verunreinigung herausgelöst. Bei dem normalen Epitop werden zusätzlich schwere Einzelketten eluiert. Während des Spülens der stationären Phase durch Waschpuffer wird, mit Ausnahme der Verunreinigung, deutlich mehr Protein in der stationären Phase mit dem normalen Peptid herausgelöst. Eine Elution mit dem pH-Wert von 3,0 hat allerdings bei der Aufreinigung mit dem normalen Epitop eine bessere Elutionswirkung als bei der Aufreinigung mit dem schwachen Epitop. Auch hier werden einzelne schwere Ketten nur aus der stationären Phase mit dem normalen Epitop herausgelöst. Die Elution mit dem pH-Wert von 2,0 zeigt bei gleichem Volumen eine deutlich größere Menge an eluiertem Protein in allen Peaks, außer in dem fünften. Im Harz verbleibt bei beiden Elution eine relative große Menge an Protein zurück.

Tabelle 18: Integrale aller Peaks aus den Intensitäts-Blots der nicht-reduzierten LDS-PAGE in Abbildung 21. Die Flächen werden zwischen den Aufreinigungen mit schwachem und normalem Epitop verglichen.

Vergleich der Peakflächen zwischen der Affinitätschromatographie mit schwachem und normalen Epitop in einer nicht-reduzierenden LDS-PAGE					
Probe	Epitop	Integral Peaks 1 bis 3	Integral Peak 4	Integral Peak 5	Integral Peak 6
ddH ₂ O	schwach	-	-	-	2,0 kPx
	normal	-	-	862,0 Px	1,3 kPx
Verhältnis $\frac{\text{schwach}}{\text{normal}}$		-	-	-	153,6 %
pH 3,0	schwach	6,2 kPx	427,0 Px	-	6,5 kPx
	normal	7,5 kPx	922,0 Px	1,5 k Px	8,5 kPx
Verhältnis $\frac{\text{schwach}}{\text{normal}}$		83,0 %	46,3 %	-	76,0 %
pH 2,0	schwach	12,4 kPx	1,4 kPx	1,6 kPx	10,3 kPx
	normal	10,0 kPx	707,0 Px	1,6 kPx	8,5 kPx
Verhältnis $\frac{\text{schwach}}{\text{normal}}$		123,7 %	199,1 %	96,9 %	121,4 %
DL 2	schwach	5,6 kPx	507,0 Px	535,0 Px	7,1 kPx
	normal	8,5 kPx	549,0 Px	944,0 Px	5,9 kPx
Verhältnis $\frac{\text{schwach}}{\text{normal}}$		66,0 %	92,4 %	56,6 %	121,5 %
Harz	schwach	7,6 kPx	1,2 kPx	2,2 kPx	14,9 kPx
	normal	7,5 kPx	924,0 Px	2,7 kPx	15,4 kPx
Verhältnis $\frac{\text{schwach}}{\text{normal}}$		101,6 %	125,1 %	82,3 %	92,2 %

Tabelle 19: Integrale aller Peaks aus den Intensitäts-Blots der LDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen in Abbildung 21. Die Flächen werden zwischen den Aufreinigungen mit schwachem und normalem Epitop verglichen.

Vergleich der Peakflächen zwischen der Affinitätschromatographie mit schwachem und normalen Epitop in einer LDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen				
Probe	Epitop	Integral Peaks 3 bis 5	Integral Peak 6	Integral Peak 7
ddH ₂ O	schwach	1,3 kPx	-	2,4 kPx
	normal	4,0 kPx	-	3,2 kPx
Verhältnis $\frac{\text{schwach}}{\text{normal}}$		33,5 %	-	75,1 %
pH 3,0	schwach	10,6 kPx	248,0 Px	8,0 kPx
	normal	9,5 kPx	484,0 Px	9,8 kPx
Verhältnis $\frac{\text{schwach}}{\text{normal}}$		111,2 %	51,2 %	82,3 %
pH 2,0	schwach	12,0 kPx	559,0 Px	12,6 kPx
	normal	9,2 Px	417,0 Px	10,4 kPx
Verhältnis $\frac{\text{schwach}}{\text{normal}}$		130,3 %	134,2	121,0 %
DL 2	schwach	5,7 kPx	168,0 Px	8,4 kPx
	normal	8,2 kPx	260,0 Px	8,1 kPx
Verhältnis $\frac{\text{schwach}}{\text{normal}}$		69,4 %	64,6 %	103,6 %
Harz	schwach	7,3 kPx	243,0 Px	4,6 kPx
	normal	10,6 kPx	347,0 Px	6,9 kPx
Verhältnis $\frac{\text{schwach}}{\text{normal}}$		69,0 %	70,1 %	67,8 %

Die ersten beiden Peaks der Intensitäts-Blots von den reduzierten Proben sind nicht eindeutig von dem Hintergrundrauschen zu unterscheiden, daher können sie nicht in den Vergleich mit aufgenommen werden. Sie enthalten hauptsächlich vollständige und fragmentierte Antikörperfragmente. Zusätzlich ist es möglich, dass Peak 2 $F(ab)_2$ -Regionen enthält. In dem Peak 3 befinden sich Antikörperfragmente, welche eine zusammenhängende leichte und schwere Kette beinhalten. Peak 4 dieser Proben beinhaltet undefinierbare Fragmente und Peak 5 enthält überwiegend einzelne schwere Ketten. Peak 5 könnte auch *Fab*- sowie *Fc*-Regionen enthalten, aufgrund des eingesetzten Reduktionsmittel sollte deren Menge allerdings geringfügig sein. Da die Integrale der Peaks 3 bis 5 im Intensitäts-Blots nicht auseinandergehalten werden können, repräsentieren sie die Menge an schweren Ketten, welche von der stationären Phase gespült werden. Die Antikörperfragmente von Peak 6 und Peak A können nicht genauer bestimmt werden. Peak A wird für die Auswertung ignoriert, da er nur ein einziges Mal während der Analyse beobachtet wird. Peak 7 ist, wie in der nicht-

reduzierten Variante, hauptsächlich durch das kontaminierende Protein definiert. Beide Elutionen sind entsprechend der Integrale aus den Intensitäts-Blots der reduzierten Proben erfolgreicher, wenn die Antikörper mit einem schwachen Epitop isoliert werden und bei Einsatz dieses Epitops bleibt auch weniger Protein im Harz zurück. Diese Ergebnisse stehen im starken Kontrast zu den Ergebnissen aus der Analyse der nicht-reduzierten Proben. Es wäre zu erwarten, dass die Ergebnisse der Intensitäts-Blots der reduzierten Proben, denen der Intensitäts-Blots der nicht-reduzierten Proben entsprechen würden, da das gleiche Probenmaterial eingesetzt wurde. Ein direkter Vergleich ist allerdings dadurch erschwert, dass die Proben unterschiedlich prozessiert wurden und die Qualität der Färbung und Bildgebung auch innerhalb desselben Geles sehr heterogen sein kann.

Intensitäts-Blots, die aus Proteinbanden einer *Coomassie*[®]-Brillant-Blau-Färbung stammen, können zwar die relative Größe dieser Banden bestimmen, aber nicht genauer definieren, welcher dieser Banden tatsächlich Antikörper enthalten. Um abzuschätzen, welche Probe und Bande die größte Anzahl an Antikörper enthält, können deshalb die Integrale der *Western Blots* aus Tabelle 20 herangezogen werden. Das Integral der Bande 1 und 2 gibt hierbei die relative Menge an schweren, beziehungsweise leichten Ketten von **IgG** an. Bande B wird mit der schweren Kette der Antikörperklasse **IgA** assoziiert. Betrachtet man die Ergebnisse, zeigt sich zunächst, dass die meisten Antikörper in den Banden der stationären Phase markiert werden. Hierbei handelt es sich um ein Vielfaches der Menge, welche in den Elutionen von der stationären Phase heruntergewaschen wird. Im Widerspruch zu den Ergebnissen der *Coomassie*[®]-Brillant-Blau-Färbung verbleibt der größte Teil von **IgG** in der stationären Phase, welche das schwache Epitop enthält. Eine Erklärung hierfür ist, dass viele Antikörper, welche durch das normale Epitop gebunden werden, während der Elution so stark denaturiert werden, dass ein Großteil davon nicht mehr durch den Sekundärantikörper gebunden werden kann. Da beide Phasen während der Elution gleichbehandelt werden, müsste die Denaturierung jedoch durch eine andere Wirkung als die des niedrigen pH-Wertes verursacht werden. Der hauptsächlichste Unterschied zwischen den beiden Epitopen ist die Affinität gegenüber dem Paratop des Antikörpers. Es ist daher nicht unwahrscheinlich, dass eine schnelle Abfolge von Dissoziation und Reassoziaton in Kombination mit dem niedrigen pH-Wert Wechselwirkungen auf den Antikörper ausübt, welche diesen zerstören. Im scheinbaren Gegensatz zu den Ergebnissen aus Tabelle 17 reinigt die Elution bei einem pH-Wert von 3,0 mehr Antikörper in der stationären Phase auf, welche das normale Epitop enthält. Allerdings wird hier die Menge an Antikörper und nicht deren Funktionsfähigkeit überprüft. Während sich also bei diesem pH-Wert durch die größere Affinität mehr Antikörper aufreinigen lässt, sind viele dieser Antikörper nicht funktionsfähig. Die Menge an Antikörpern, welche durch den Waschschrift mit Waschpuffer aus den stationären Phasen herausgewaschen wird, entspricht bei beiden Epitopen in etwa einer Elution bei einem pH-Wert von 3,0. Waschschrifte mit ddH₂O haben

gemäß vorheriger Beobachtungen eine vernachlässigbare Elutionswirkung. Weiter wird bestätigt, dass eine Elution bei einem pH-Wert von 2,0 die größte Ausbeute erreicht, wenn Anti-**Emp** zuvor in der stationären Phase mit dem schwachen Epitop zurückgehalten wird.

Tabelle 20: Die Integrale aller Peaks aus den Intensitäts-Blots in den Abbildungen 22 und 23. Die Flächen werden zwischen der Aufreinigung mit schwachem und normalem Epitop verglichen. Zur Vergleichbarkeit wird die Fläche des Serums mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und zum größten Integral ins Verhältnis gesetzt.

Vergleich der Peakflächen zwischen der Affinitätschromatographie mit schwachem und normalen Epitop in einem <i>Western Blot</i>				
Probe	Epitop	Integral Peak 1	Integral Peak 2	Integral Peak B
ddH ₂ O	schwach	134,0 Px	19,0 Px	-
	normal	181,0 Px	318,0 Px	862,0 Px
Verhältnis $\frac{\text{schwach}}{\text{normal}}$		74,0 %	6,0 %	-
pH 3,0	schwach	452,0 Px	579,0 Px	1,3 kPx
	normal	544,0 Px	1,0 kPx	2,3 kPx
Verhältnis $\frac{\text{schwach}}{\text{normal}}$		83,1 %	56,2 %	57,1 %
pH 2,0	schwach	1,8 kPx	2,0 kPx	3,7 kPx
	normal	931,0 Px	1,4 kPx ²	2,7 kPx
Verhältnis $\frac{\text{schwach}}{\text{normal}}$		192,5 %	140,8 %	140,4 %
DL 2	schwach	472,0 Px	543,0 Px	1,2 kPx
	normal	510,0 Px	718,0 Px	1,6 kPx
Verhältnis $\frac{\text{schwach}}{\text{normal}}$		92,5 %	75,6 %	75,4 %
Harz	schwach	10,0 kPx	10,3 kPx	1,5 kPx
	normal	4,4 kPx	6,0 Px	2,5 kPx
Verhältnis $\frac{\text{schwach}}{\text{normal}}$		228,7 %	172,4 %	62,3 %
Serum		382,6 kPx	264,6 kPx	625,4 kPx
$\frac{\text{schwach pH 2,0}}{\text{Serum}}$		4,7 ‰	7,4 ‰	6,0 ‰
$\frac{\text{normal pH 2,0}}{\text{Serum}}$		2,4 ‰	5,3 ‰	4,2 ‰

Die Erkenntnisse aus der ersten Aufreinigung liefern wichtige Informationen, um nachfolgende Affinitätschromatographien zu verbessern. Um die größten Menge des Antikörpers aus dem Blutserum zu isolieren, sollte die stationäre Phase mit dem schwachen Epitop ‚HYVPEFKGGLPAPRV‘ verknüpft werden. Als optimale Bedingungen für eine

Elutionswirkung hat sich ein Puffer mit dem pH-Wert von 2,0 ergeben. Da noch viel Material in der stationären Phase verbleibt, ist eine Abfolge von mehreren Elutionen mit größerem individuellen Volumen in Betracht zu ziehen. Die Kontamination, welche ein ähnliches Molekulargewicht wie leichte Antikörperketten besitzt, macht eine photometrische Bestimmung der Antikörperkonzentration unmöglich. Aus diesem Grund muss in kommenden Affinitätschromatographien eine adäquate Alternative eingesetzt werden, um die Proteinmenge zu bestimmen.

4.2.2 Optimierte Affinitätschromatographie

Eine weitere Aufreinigung der Anti-**Emp**-Antikörper wird unter optimierten Bedingungen durchgeführt. Eine Säule wird mit einer stationären Phase befüllt, welche das modifizierte Peptid ‚HYVPEFKGGLPAPRV‘ präsentiert. Insgesamt wird die Säule mit 5,0 mL Serum beladen, zweimal mit unterschiedlichen Waschpuffern vor der Elution gewaschen und gebundene Antikörper dreimal mit einem Elutionspuffer bei einem pH-Wert von 2,0 von der stationären Phase gespült. Diese Elutionen werden entsprechend ihrer Abfolge als Elution 1 (Elu 1), Elution 2 (Elu 2) und Elution 3 (Elu 3) bezeichnet. Die Antikörper innerhalb dieser Elutionen und innerhalb der Waschpuffer werden entsprechend dem vorherigen Kapitel analysiert, wobei auf die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration verzichtet wird. Anstelle der unterschiedlichen Elutionsparameter wird in dieser Durchführung der Fokus auf die Unterschiede zwischen den individuellen Elutionen gerichtet.

4.2.2.1 Bestimmung der Antikörperfunktion und Ausbeute

Für die Primärfärbung der Substitutionsanalysen werden die Verdünnungen aller Elutionen einheitlich durchgeführt. Die Durchführung der Sekundärfärbungen, die Detektion und Auswertung der Substitutionsanalysen sowie die Darstellung der Antikörper-Fingerabdrücke erfolgen gemäß den bereits bekannten Bedingungen. Eine graphische Darstellung der Graustufenbilder nach den Sekundärfärbungen ist in Abbildung 24 gezeigt. Erwartungsgemäß zeigt sich der Kontrollrand aus Poliomyelitis-Peptiden, wenn keine Elution für die Primärfärbung verwendet wird. Die SA aller Sekundärfärbungen gegen **IgG** liegen durchschnittlich bei 16,4 %. In diesem Durchlauf sind die Substitutionsanalysen mit der Färbung gegen **IgA** von deutlich besserer Qualität und erreichen eine durchschnittliche SA von 42,1 %. Die einzigen Proben dieser Färbung, deren Peptidspots aufgrund zu vieler eliminierter Messwerte nicht im Detail ausgewertet werden können, sind Elution 3 und DL 1. Der Vergleich der Aminosäureblots zwischen den Eluat und dem Serum ist in Tabelle 21 aufgelistet. Die RFI des originalen Peptids aller Proben im Vergleich für die Sekundärfärbungen und die daraus errechnete Ausbeute ist in Tabelle 22 dargestellt.

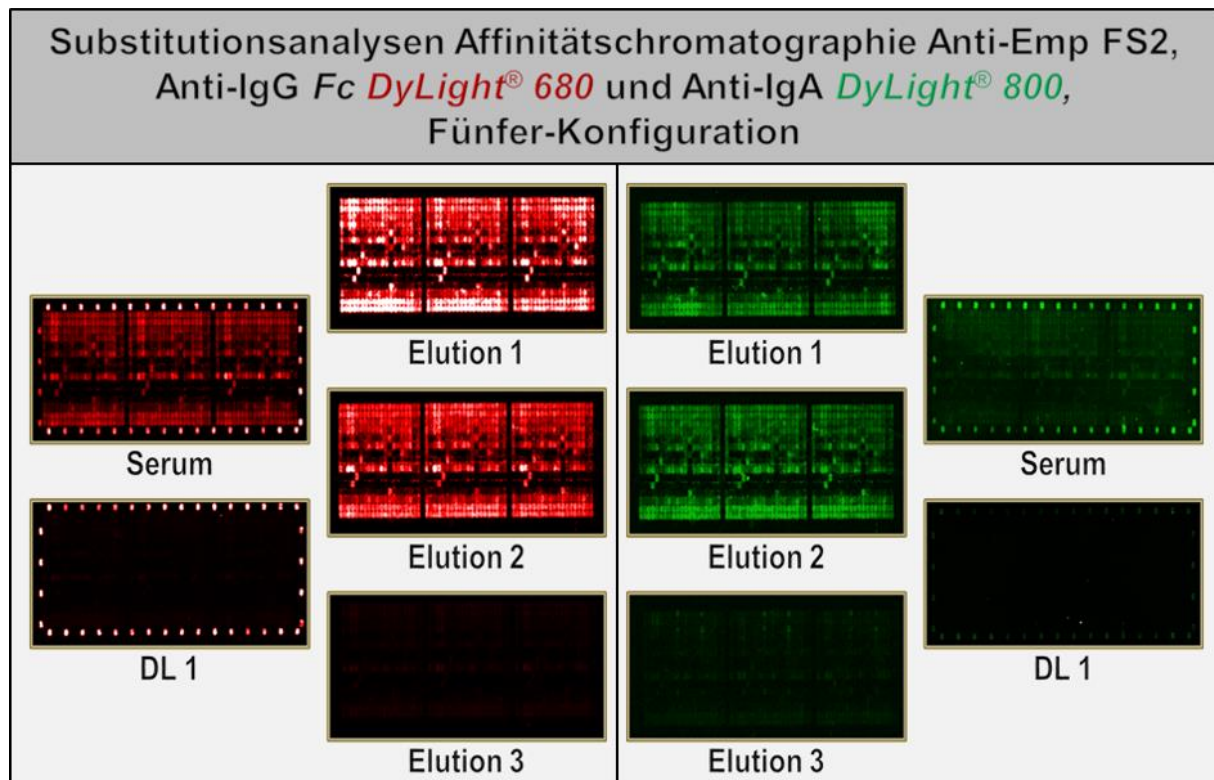


Abbildung 24: Alle Proben für die Primärfärbung sind in einem Verhältnis von 1:500 verdünnt. Die beiden Sekundärantikörper werden mit einem Verdünnungsfaktor von 1:5000 aufgetragen. Färbungen gegen **IgG** sind links und gegen **IgA** rechts abgebildet.

Vergleicht man die Aminosäureblots untereinander, so zeigt die erste Elution nach der Sekundärfärbung mit Anti-**IgG** Werte, die dem vorherigen Kapitel entsprechen. In der zweiten Elution weichen die Ergebnisse ab, da auch Peptidspots bemerkbar sind, welche eine stärkere Signalstärke als das Serum aufweisen. Besonders auffällig ist hierbei die Substitution an der achten Position der Substitutionsanalyse. Diese Position ist essenziell und zeigt in den Peptidspots, an dessen Stelle dort Cystein substituiert wird, in der zweiten Elution ein über 30,0 % stärkeres Signal als die Korrespondenz im Serum. Dasselbe ist bei der Substitution dieser Aminosäure mit einem Arginin in der dritten Elution zu beobachten. In der dritten Elution nimmt die Anzahl an Peptidspots, welche eine größere Signalstärke als die Referenz besitzen, weiter zu. Im Vergleich zeigen Substitutionsanalysen, in welchen **IgA** eingefärbt wurde, eine merkliche Differenz in der Signalstärke bei bis zu mehr als einem Drittel der Peptidspots, wenn diese mit dem Serum verglichen werden. Im Detail zeigt sich, dass die Peptidspots in den ersten drei Positionen der Aminosäuresequenz eine starke Tendenz aufweisen, ein stärkeres Signal zu besitzen, wenn sie in der Primärfärbung mit einer Elution eingefärbt werden. Gegensätzlich verhält es sich mit der Signalstärke in nachfolgenden Positionen. In allen drei Elutionsschritten stechen zwei Substitutionen an der essenziellen fünften Position hervor, deren Signalstärken sich von den mit Serum inkubierten Peptidspots an derselben Position unterscheidet. Wird an dieser Position die originale Aminosäure durch Lysin oder Arginin

ersetzt, verschlechtert sich die Signalstärke verhältnismäßig in den ersten beiden Elutionen deutlich. Diese essenzielle Position besitzt den größten Konservierungsgrad und kann nur in sehr seltenen Fällen substituiert werden. Dieser Hinweis in Kombination mit der hohen Anzahl an Differenzen zeigt, dass sich das eluierte **IgA** sehr stark von dem im Serum verfügbaren Anti-**Emp-IgA** unterscheidet. Es ist sehr wahrscheinlich, dass mehr als ein funktionsfähiges **IgA** vorliegt und diese bei der Affinitätschromatographie voneinander getrennt werden.

Tabelle 21: Anzahl der Peptidspots der individuellen Elutionen, deren RFI sich nach der Sekundärfärbung um mehr als 30,0 % von der korrespondierenden RFI der Peptidspot der Sekundärfärbung des Serums unterscheidet. Alle RFI sind als Mittelwerte der jeweiligen Triplikate zusammengefasst.

Differenz der Aminosäureblots der Affinitätschromatographie von FS2:					
Eluate gegen Serum ($\Delta \geq 30,0\%$)					
Eluat	Peptidspots (Signalstärke Eluat < Serum)		Peptidspots (Signalstärke Eluat > Serum)		Anzahl gesamt (relativ)
	Anzahl (relative Anzahl)	durchschn. Differenz	Anzahl (relative Anzahl)	durchschn. Differenz	
IgG					
Elution 1	11 (3,7 %)	42,3 %	-	-	11 (3,7 %)
Elution 2	6 (2,0 %)	40,3 %	4 (1,3 %)	31,8 %	10 (3,3 %)
Elution 3	-	-	6 (2,0 %)	43,8 %	6 (2,0 %)
DL 1	1 (3,3 %)	30,3 %	19 (6,3 %)	50,9 %	20 (6,7 %)
IgA					
Elution 1	67 (22,3 %)	46,7 %	36 (12,0 %)	45,6 %	103 (34,3 %)
Elution 2	83 (27,7 %)	45,5 %	45 (15,0 %)	58,3 %	128 (42,7 %)

Wie auch im vorherigen Kapitel gibt es zwei mögliche Erklärungen dafür, dass sich die Signalstärken der Spots innerhalb der Elutionen von denen im Serum unterscheiden. Eine Erklärung ist es, dass sich im Serum verschiedene Anti-**Emp**-Antikörper befinden, welche aufgrund ihrer unterschiedlichen Affinität eine voneinander abweichende Retentionszeit besitzen. Die zweite Erklärung ist, dass sich das Paratop des Anti-**Emp**-Antikörpers mit jeder weiteren Elution aufgrund der denaturierenden Wirkung verändert. Dementsprechend werden in den ersten Elutionen Antikörper herausgespült, welche eine niedrige Retentionszeit und ein intaktes Paratop besitzen und der Anteil an Antikörpern mit einer längeren Retentionszeit oder einem veränderten Paratop nimmt folglich mit jeder weiteren Elution zu. Die beiden genannten

Erklärungen schließen sich nicht gegenseitig aus. DL 1 besitzt zwar auch eine erhöhte Anzahl an Peptidspots mit größerer Signalstärke, allerdings sind diese hauptsächlich auf Substitutionen an den ersten beiden Positionen beschränkt. Es ist daher anzunehmen, dass die eluierten Antikörper in DL 1 und Elution 3 sich in Nuancen unterscheiden und die Retentionszeit der Antikörper innerhalb von DL 1 geringer ist als die der Antikörper in der ersten Elution. Es bestätigt die Beobachtung aus dem vorherigen Kapitel, dass der Anti-**Emp-IgG** eine gewisse Bandbreite in der Affinität gegenüber den Aminosäuren an den nicht-essenziellen Positionen des Epitops hat. Bedeutende Hinweise auf Anti-**Emp-IgG**, welche sich in der Affinität gegenüber den essenziellen Positionen unterscheiden, gibt es allerdings nicht.

Tabelle 22: Berechnung der RFI aller Proben und nachfolgende Bestimmung der relativen Ausbeute von funktionsfähigem Antikörper des Antikörpertyps **IgG** und **IgA**, im Verhältnis zum Blutserum.

Vergleich und Ausbeute aufeinanderfolgender Elutionen				
Probe	Volumen	Verdünnungsfaktor in [x]	RFI in [RFU] (SA)	Ausbeute
IgG				
Serum von FS2	5,0 mL	500	$2,1 \times 10^{10}$ (15,0 %)	-
Elution 1	175,0 μ L	500	$4,7 \times 10^9$ (16,1 %)	22,4 %
Elution 2	175,0 μ L	500	$3,1 \times 10^9$ (12,0 %)	14,8 %
Elution 3	175,0 μ L	500	$2,7 \times 10^7$ (15,1 %)	1,2 ‰
DL 1	5,0 mL	500	$2,6 \times 10^9$ (23,4 %)	12,6 %
IgA				
Serum von FS2	5,0 mL	500	$4,2 \times 10^8$ (40,1 %)	-
Elution 1	175,0 μ L	500	$1,2 \times 10^8$ (23,1 %)	29,7 %
Elution 2	175,0 μ L	500	$1,3 \times 10^8$ (24,7 %)	33,8 %

Über die Berechnung und dem Vergleich der RFI des originalen Peptids wird in den drei Elutionen eine Ausbeute von 38,4 % für Anti-**Emp-IgG** geschätzt. Die Messwerte der ersten beiden Elutionen ergeben für die Antikörperklasse **IgA** entsprechend eine Ausbeute von 63,7 % in den ersten beiden Elutionen. Entsprechend dem größeren Volumen und den optimierten Versuchsbedingungen zeigt sich eine deutlich bessere Ausbeute als in der vorherigen Aufreinigung. Die Signalstärke der Substitutionsanalyse von DL 1 zeigt auch, dass ein erheblicher Anteil funktionaler Anti-**Emp**-Antikörper durch den Waschvorgang verloren wird.

4.2.2.2 Analyse von Protein- und Antikörperbanden

Ebenso wie in dem vorherigen Kapitel werden die aus dem Serum aufgereinigten Eluate sowohl durch eine LDS-PAGE mit nachfolgender Färbung durch *Coomassie*[®]-Brillant-Blau, als auch durch einen *Western Blot* analysiert und anschließend in Intensitäts-Blots umgewandelt. Die LDS-PAGE für den *Western Blot* wird dieses Mal aber zusätzlich unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt, da Banden ermittelt werden sollen, welche vollständige und fragmentierte Antikörper enthalten. Diese Banden werden in nachfolgenden Unterkapiteln zur Annäherung der Antikörpermenge und zur Extraktion für Analysezwecke genutzt. Außerdem wird das Probenvolumen in der LDS-PAGE für den *Western Blot* erhöht, um bessere Signale nach der Sekundärfärbung zu erhalten. Das mit *Coomassie*[®]-Brillant-Blau eingefärbte Gel ist in Abbildung 25 und der zugehörige Intensitäts-Blot in Abbildung 26 gezeigt. Der mit Anti-**IgG** eingefärbte *Western Blot* wird in Abbildung 27 und die entsprechenden Intensitäts-Blots in Abbildung 28 präsentiert. Die Sekundärfärbung des *Western Blots* gegen **IgG** und deren Intensitäts-Blots werden in den Abbildungen 29 und 30 gezeigt. Eine kombinatorische Darstellung der *Western Blots* ist in Abbildung 31 dargestellt. *Western Blots* werden als Graustufenbilder detektiert und in Falschfarben dargestellt. Der Kontrast und die Helligkeit aller Abbildungen wird zur besseren Sichtbarkeit verstärkt.

Nach der Färbung der LDS-PAGE wird sichtbar, dass alle Proben die gleichen Banden enthalten, welche schon in der LDS-PAGE des vorherigen Kapitels angefärbt wurden. Bei den nicht-reduzierten Elutionen heben sich alle Banden, außer der fünften, von den Banden aller anderen Proben hervor. Dasselbe gilt, mit Ausnahme der vierten Bande, für die reduzierten Proben. Die beiden ersten Elutionen enthalten den größten Anteil an Protein, wenn das Serum nicht berücksichtigt wird. Banden, welche in den Proben der stationären Phasen eingefärbt werden, sind bei dieser Affinitätschromatographie deutlich kleiner als vergleichsweise Banden, die in den ersten beiden Elutionen zu erkennen sind. Zusammen mit der geringen Ausbeute der dritten Elution spricht das dafür, dass die neue Elutionsprozedur deutlich mehr Protein aus der stationären Phase löst und sich dadurch der maximalen Proteinmenge annähert, welche nach der Affinitätschromatographie eluiert werden kann. Auf der Phase verbleibende Proteine haben mit großer Wahrscheinlichkeit eine zu starke Wechselwirkung gegenüber dem Epitop, um sie effektiv zu eluieren. Das verunreinigende Protein, welches die Banden der leichten Antikörperketten überdeckt, ist in allen Proben deutlich zu erkennen. Besonders stark wird es allerdings während den ersten beiden Elutionen aufgereinigt. Das spricht dafür, dass dieses Protein eine Affinität gegenüber dem Epitop in der stationären Phase oder den in der stationären Phase immobilisierten Proteinen besitzt.

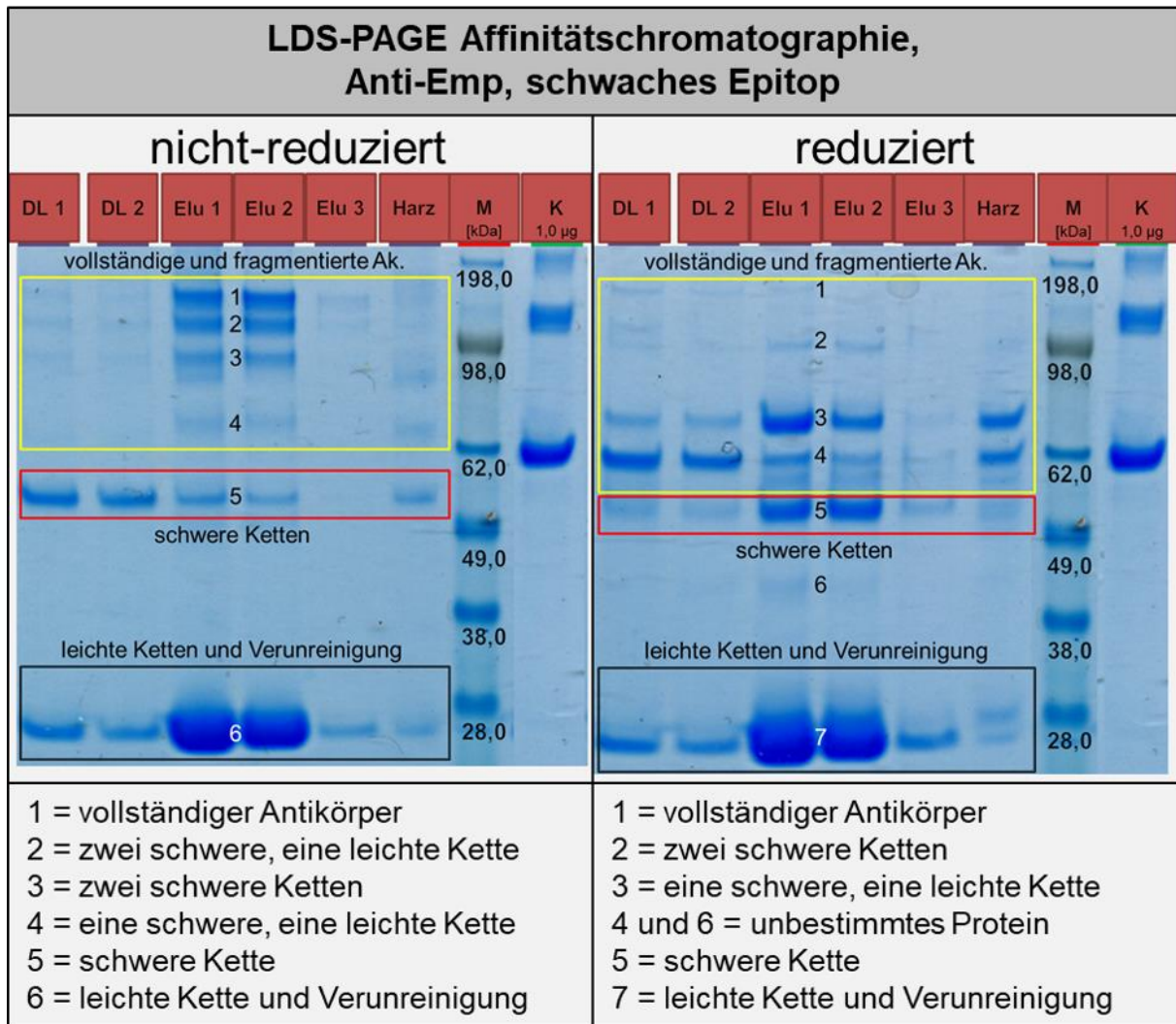


Abbildung 25: LDS-PAGE aller während der optimierten Affinitätschromatographie generierten Proben und stationären Phasen, nach einer *Coomassie*[®]-Brillant-Blau-Färbung. Von jeder Probe wird 6,0 % des Gesamtvolumens in die Taschen gefüllt. Zusätzlich werden 1,0 µg **BSA** und ein Marker für Proteingrößen als Maßstab für das Molekulargewicht als Kontrolle verwendet. Die Legende beschreibt, welche Antikörper oder Antikörperfragmente in den nummerierten Banden mit größter Wahrscheinlichkeit zu finden sind.

Der Inhalt beider Durchläufe wirkt identisch und zeigt bei den nicht-reduzierten Proben besonders große Proteinmengen bei einem Molekulargewicht, bei welchem schwere Antikörperketten sowie *Fab*- und *Fc*-Regionen erwartet werden^[51]. Diese Bande wird im *Western Blot* entsprechend dem zugehörigen Intensitäts-Blot in Abbildung 28 kaum merklich markiert. Das bedeutet, dass das Protein in dieser Bande entweder kein Antikörper ist, oder es so stark denaturiert wurde, dass der Sekundärantikörper es nicht mehr markieren kann. Aufgrund der Bandengröße kann in den reduzierten Proben der Durchläufe die vierte Bande mit diesen Fragmenten assoziiert werden. Da der Probeninhalt identisch ist, müsste diese Bande also logischerweise den gleichen Inhalt haben. Diese Bande wird nicht von den Sekundärantikörpern markiert und das Molekulargewicht, an dem sie zu finden ist, entspricht

keinem assoziierbaren Antikörperfragment. Einzelne Proteine können durch Reduzierung allerdings nicht größer werden. Möglicherweise spaltet der Effekt der Reduzierung die Proteine in diesen Banden zu weiteren Fragmenten auf. Diese könnten dann mit sich selbst, oder anderen Proteinen, interagieren, wenn die Affinität zueinander nicht durch den Einfluss von LDS oder Reduktionsmittel verhindert wird.

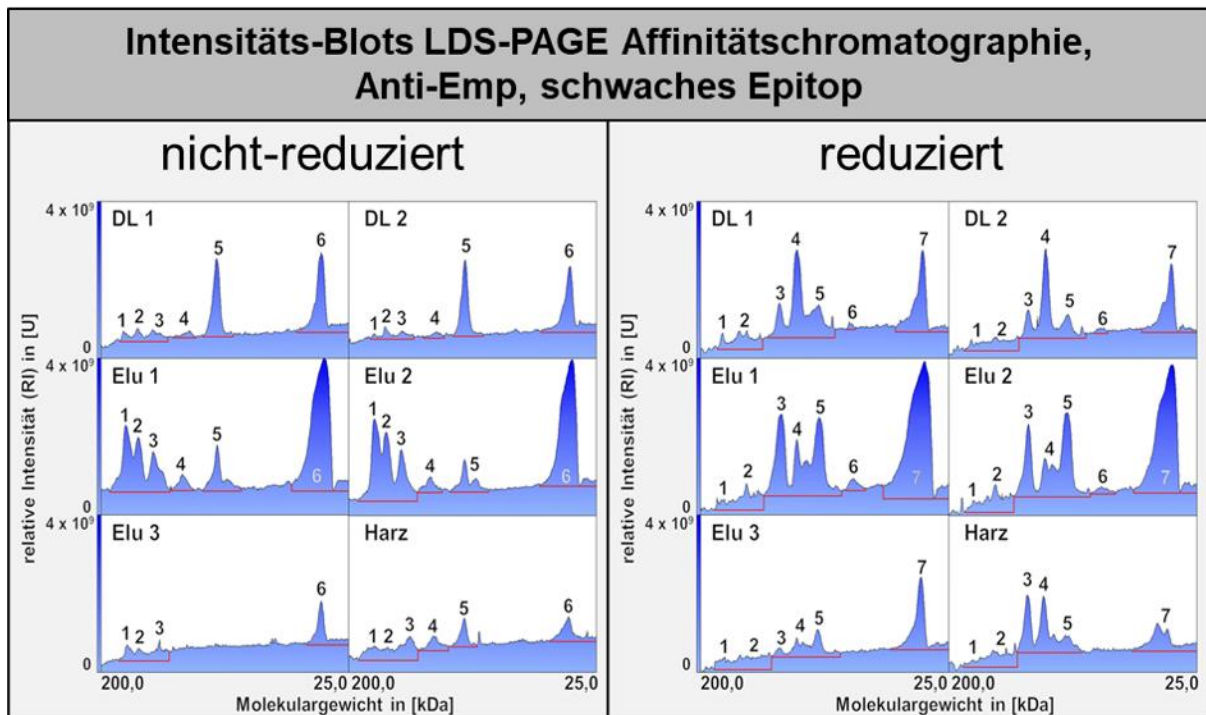


Abbildung 26: Zusammenfassung aller mit *Coomassie*[®]-Brillant-Blau eingefärbten Banden der LDS-PAGE aus der Abbildung 25. Die Markierungen der Peaks wurden aus dieser Abbildung übernommen. Eine rote Linie beschreibt die Abgrenzung des Peaks gegenüber dem Hintergrundrauschen. Diese Abgrenzung wird für jeden Peak gleich gehalten, damit ein Vergleich zwischen den Proben möglich ist. Bei den nicht-reduzierten Proben werden Peaks 1 bis 3 als gemeinsamer Peak zusammengefasst, da ihre Fläche sich teilweise überlappt. Dasselbe gilt für Peaks 1 und 2 sowie 3 bis 5 bei den reduzierten Proben.

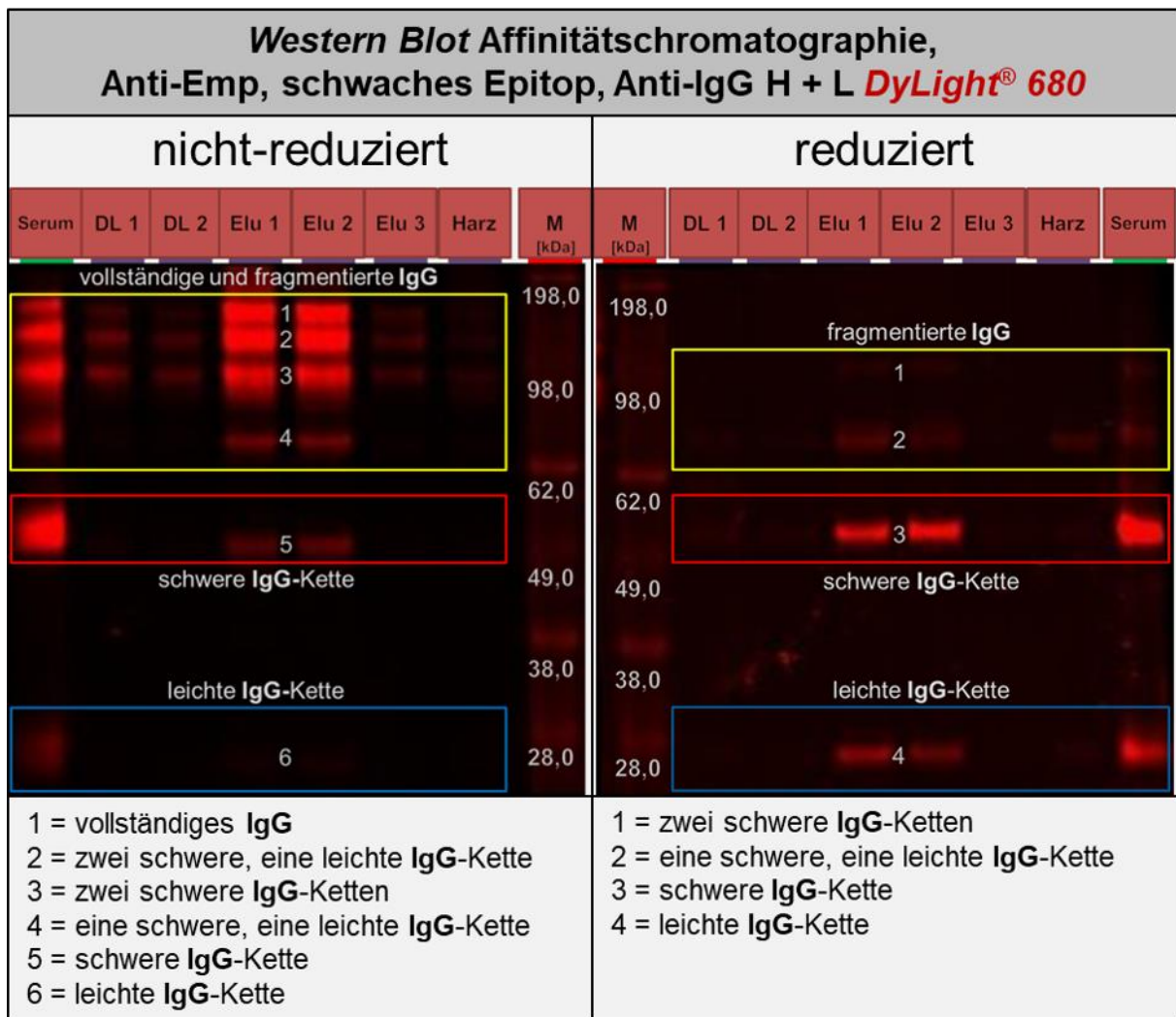


Abbildung 27: Von jeder Probe werden 4,0 µL in einer reduzierenden und nicht-reduzierenden LDS-PAGE verwendet. Nach der Übertragung auf eine Membran aus PVDF werden die Proben in einem Verhältnis von 1:5000 mit Sekundärantikörpern gegen leichte und schwere Ketten von IgG eingefärbt. Zusätzlich zu den Proben werden das Serum in einem Verhältnis von 1:100 und ein Marker für Proteingrößen als Kontrollen aufgetragen. Der linke Western Blot ist in Kontrast und Helligkeit um das Zweifache und der rechte um das Zehnfache verstärkt. Die Legende beschreibt, welche Antikörper oder Antikörperfragmente in den nummerierten Banden mit größter Wahrscheinlichkeit zu finden sind.

Um schwach markierte Banden im Western Blot zu identifizieren, werden zur Unterstützung die Informationen aus den entsprechenden Intensitäts-Blots herangezogen. Vollständige und fragmentierte Antikörper in den nicht-reduzierten Proben sind in beiden Sekundärfärbungen des Western Blots markiert und entsprechen den Erwartungen aus den Banden der LDS-PAGE. Schwere Ketten von IgG werden in jeder nicht-reduzierten Probe eingefärbt, sind aber nur bei den Elutionen deutlich zu erkennen. Schwere IgA-Ketten sind nur als schwaches Signal in den Elutionen aufzufinden.

Intensitäts-Blots *Western Blot* Affinitätschromatographie, Anti-Emp, schwaches Epitop, Anti-IgG H + L *DyLight® 680*

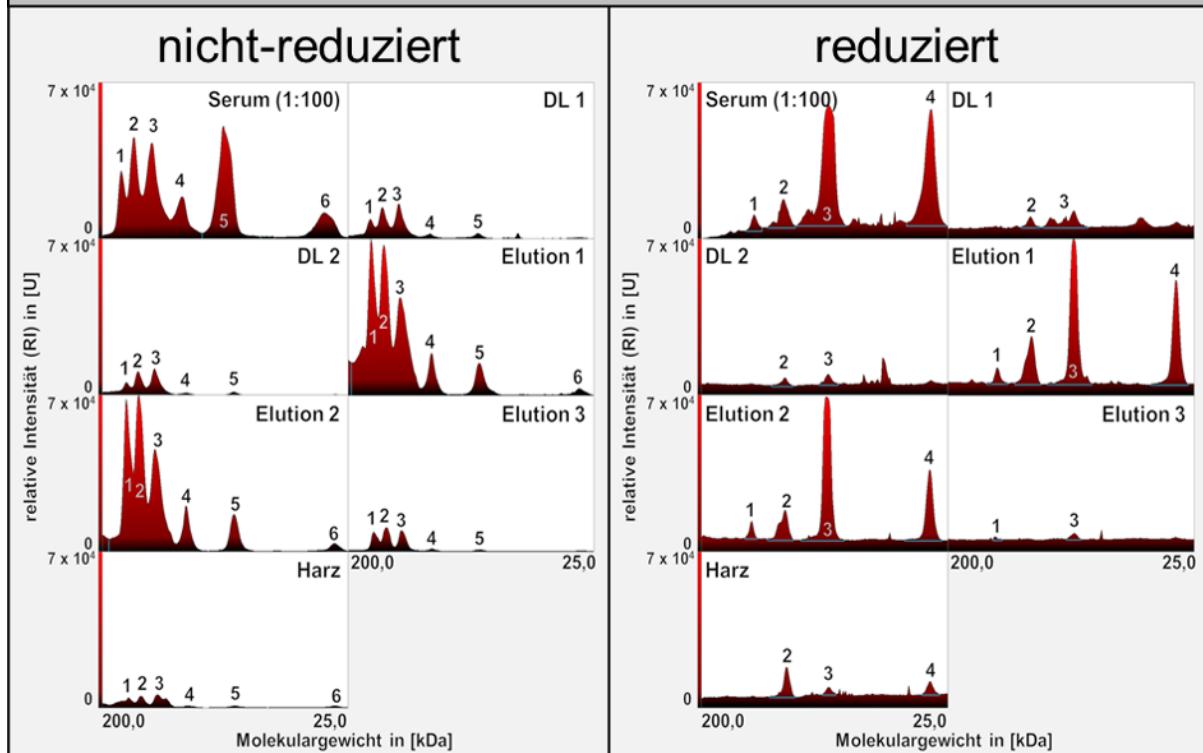


Abbildung 28: Zusammenfassung der Banden des *Western Blots* aus der Abbildung 27. Die Markierungen der Peaks wurden aus dieser Abbildung übernommen. Eine blaue Linie, wenn sichtbar, beschreibt die Abgrenzung des Peaks gegenüber dem Hintergrundrauschen. Diese Abgrenzung wird für jeden Peak gleich gehalten, damit ein Vergleich zwischen den Proben möglich ist. Bei den nicht-reduzierten Proben werden Peaks 1 bis 4 als gemeinsamer Peak zusammengefasst, da ihre Flächen sich teilweise überlappen.

In dem *Western Blot* der reduzierten Proben sind bei der Sekundärfärbung gegen **IgG** innerhalb der Proben des Serums und der ersten beiden Elutionen deutliche Banden zu erkennen, welche der schweren und leichten Antikörperkette zugeordnet werden können. Die Peaks innerhalb des Intensitäts-Blots der stationären Phase zeigen, dass auch hier die schwere und leichte Kette markiert werden. Innerhalb der dritten Elution sowie beiden Durchläufen werden nur die schweren Antikörperketten markiert. In den Proben der ersten beiden Elutionen sind zusätzlich Antikörperfragmente mit zwei schweren Ketten und einer leichten sowie schweren Kette sichtbar. Während in den Proben der Durchläufe nur die Bande mit dem aus zwei schweren Ketten bestehenden Fragmenten sichtbar ist, so ist in der Probe der dritten Elution nur die Bande zu sehen, an welcher die Fragmente markiert sind, welche aus einer schweren und leichten Kette bestehen.

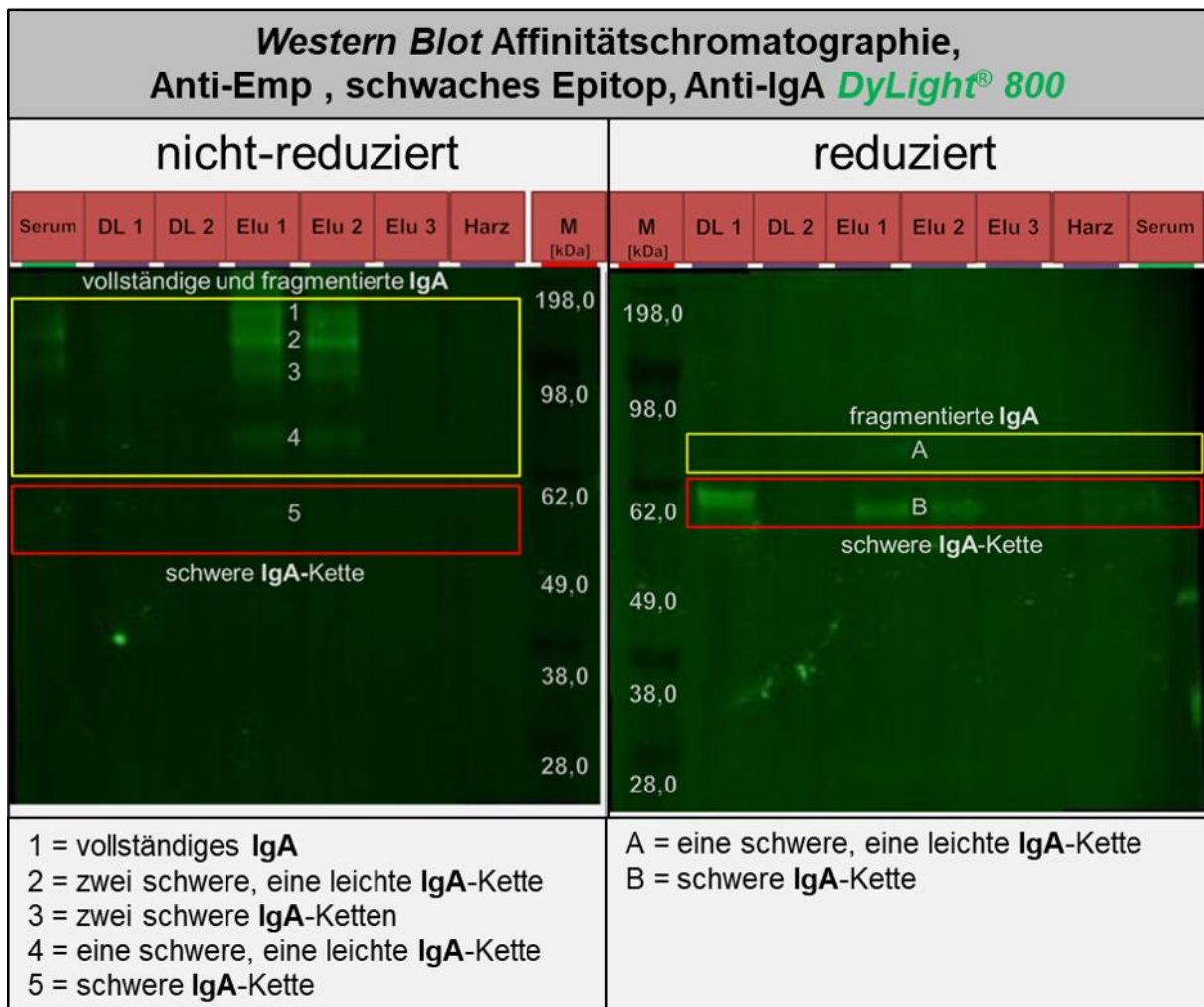


Abbildung 29: Von jeder Probe werden 4,0 µL in einer reduzierenden und nicht-reduzierenden LDS-PAGE verwendet. Nach der Übertragung auf eine Membran aus PVDF werden die Proben in einem Verhältnis von 1:5000 mit Sekundärantikörpern gegen schwere Ketten von **IgA** eingefärbt. Zusätzlich zu den Proben werden das Serum in einem Verhältnis von 1:100 und ein Marker für Proteingrößen als Kontrollen aufgetragen. Der linke *Western Blot* ist in Kontrast und Helligkeit um das Zehnfache und der rechte um das 40-fache verstärkt. Die Legende beschreibt, welche Antikörper oder Antikörperfragmente in den nummerierten Banden mit größter Wahrscheinlichkeit zu finden sind.

Die Sekundärfärbung des *Western Blots* gegen **IgA** zeigt bei DL 1 und den ersten beiden Elutionen gut sichtbare Banden bei einem Molekulargewicht, an dem die schwere Kette des Antikörpers erwartet wird. Das bedeutet, dass eine größere Menge **IgA** bei dem ersten Waschschrift von der Säule gespült wird. Hervorstechend ist hierbei, dass die Bande merklich oberhalb von den Banden der restlichen schweren Ketten von **IgA** platziert ist. Diese erhöhte Retentionszeit lässt sich durch eine Deformation des Antikörpers erklären, wodurch sich dessen Widerstand im Gel erhöht. Da diese Antikörperketten nur im reduzierten Zustand zu sehen sind, ist ihr Ursprung höchstwahrscheinlich die Gesamtmenge an vollständigen und fragmentierten Antikörpern, welcher während der Reduzierung aufgetrennt werden.

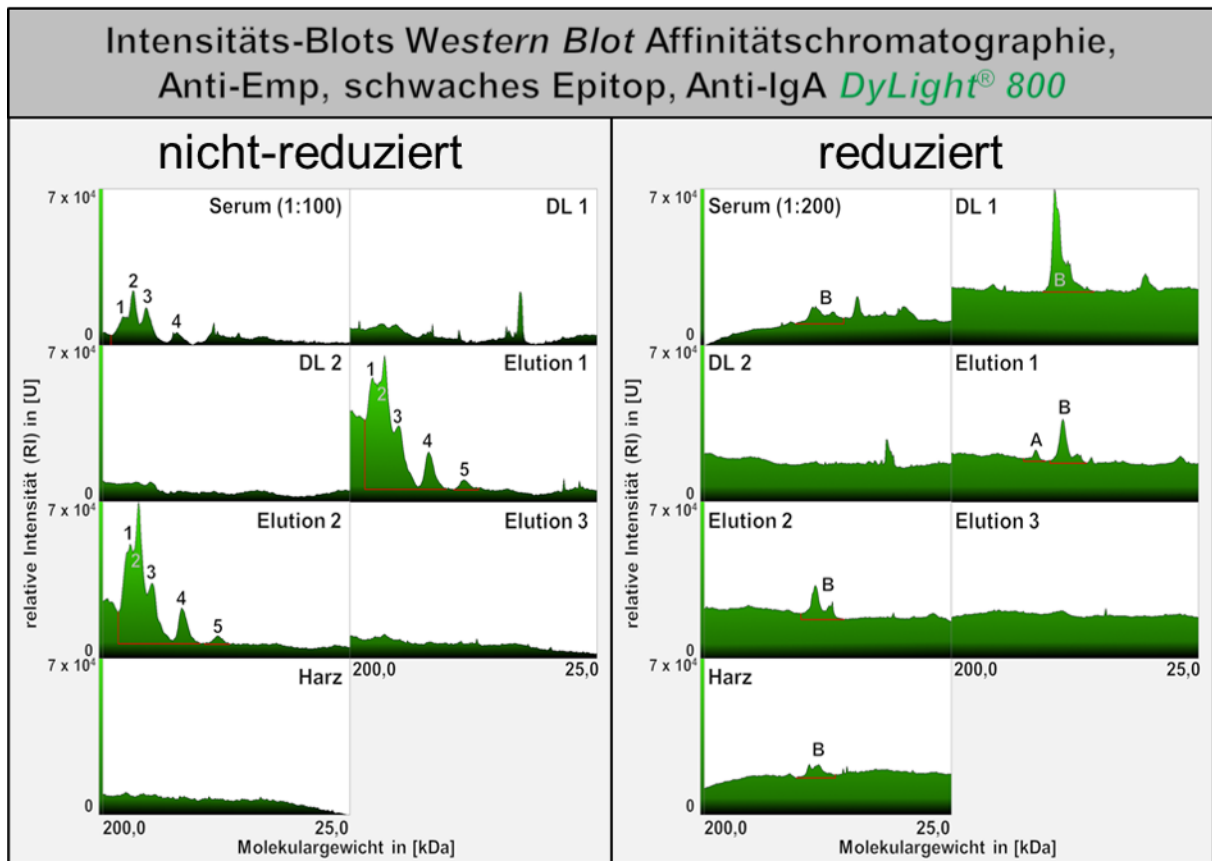


Abbildung 30: Zusammenfassung der Banden des *Western Blots* der Abbildung 29. Die Markierungen der Peaks wurden aus dieser Abbildung übernommen. Eine rote Linie, wenn sichtbar, beschreibt die Abgrenzung des Peaks gegenüber dem Hintergrundrauschen. Diese Abgrenzung wird für jeden Peak gleich gehalten, damit ein Vergleich zwischen den Proben möglich ist. Bei den nicht-reduzierten Proben werden Peaks 1 bis 4 als gemeinsamer Peak zusammengefasst, da ihre Flächen sich teilweise überlappen.

Entsprechend den Ergebnissen aus der Färbung der LDS-PAGE mit *Coomassie*[®]-Brillant-Blau enthalten beide Durchläufe Proteine mit einem ähnlichen Molekulargewicht. Eine Erklärung dafür, dass die Markierung der schweren Antikörperketten nur bei DL 1 und nicht bei DL 2 zu beobachten ist, könnte höchstwahrscheinlich sein, dass Unterschiede in den Waschpuffern dafür sorgen, dass das Epitop, welches der Sekundärantikörper erkennt, entweder erhalten bleibt oder zerstört wird. Die Puffer unterscheiden sich im pH-Wert und den Inhaltsstoffen. Das Puffersystem von Waschpuffer-Formulation 1 aus DL 1 basiert auf Tris(hydroxymethyl)aminomethan, besitzt einen pH-Wert von 8,5 und enthält Ethylendiamintetraessigsäure Dinatrium Dihydrat. Waschpuffer-Formulation 2 wird durch Hydrogenphosphate gepuffert und besitzt einen neutralen pH-Wert.

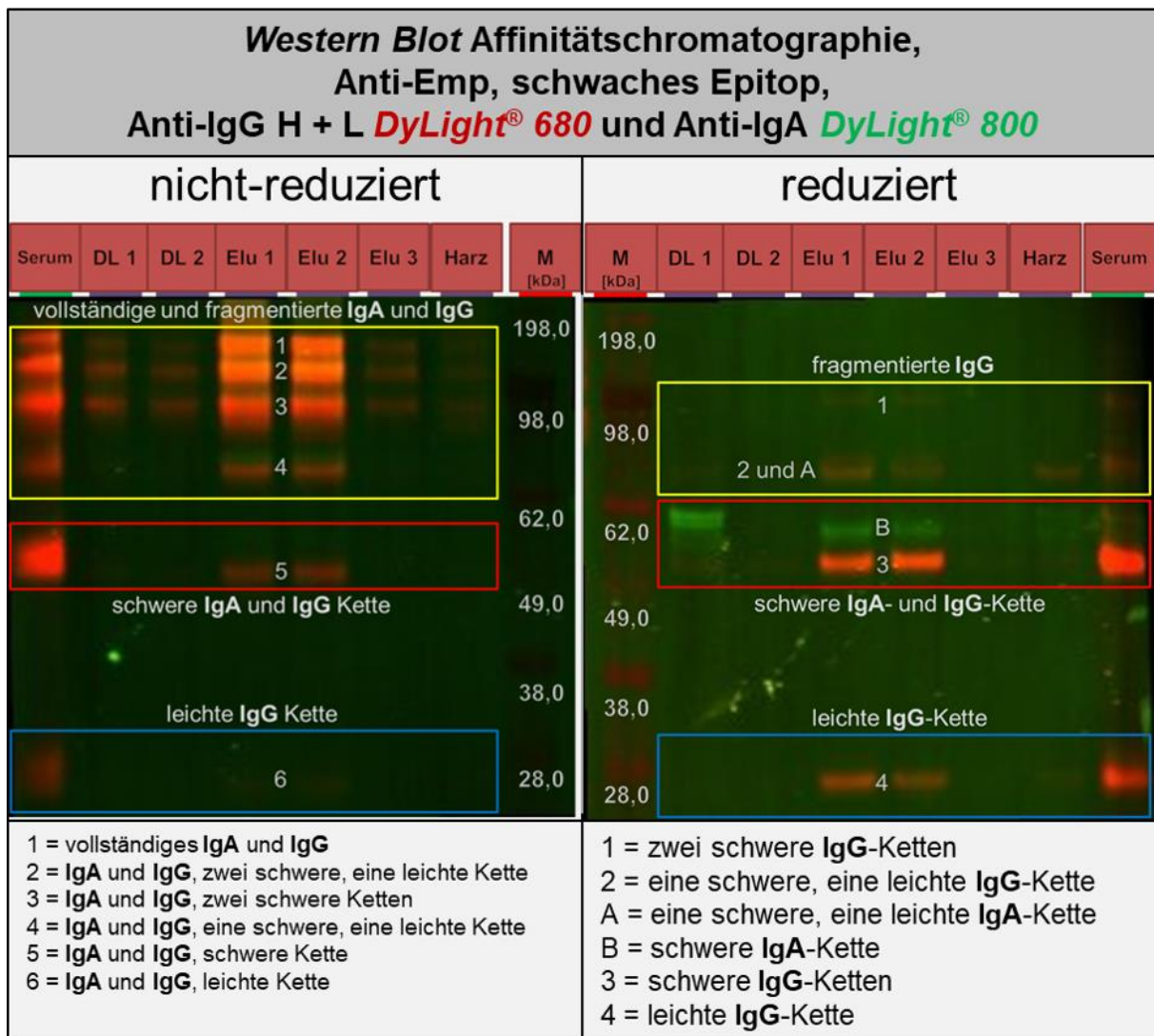


Abbildung 31: Kombination der beiden *Western Blots* aus Abbildung 27 und 29. Die Legende beschreibt, welche Antikörper oder Antikörperfragmente in den nummerierten Banden mit größter Wahrscheinlichkeit zu finden sind.

In kombinatorischer Ansicht zeigt sich erneut, dass die schweren **IgA**-Ketten oberhalb der **IgG**-Ketten liegen. Diese Differenz ist in den nicht-reduzierten Proben weniger deutlich zu erkennen, da die Banden sich aufgrund der schlechteren Trennschärfe des Gels bei einem größeren Molekulargewicht überlappen. Verhältnismäßig werden in den nicht-reduzierten Proben bei der Sekundärfärbung gegen **IgG** eine deutlich größere Menge an einzelnen schweren Ketten angefärbt, als bei der Sekundärfärbung gegen **IgA**.

Zur Evaluierung der verhältnismäßigen Größe aller Banden zwischen den Proben wird das Integral von jedem erkennbaren Peak aus den Intensitäts-Blots der Proben durch das Gelanalysewerkzeug ^[1394] von *ImageJ* ^[1395] berechnet. Die Berechnungen und Vergleiche sind für die mit *Coomassie*[®]-Brillant-Blau eingefärbter Banden in Tabelle 23 für nicht-reduzierte Proben und in Tabelle 24 für reduzierte Proben zusammengefasst. Integrale von Sekundärfärbungen des *Western Blots* gegen **IgG** werden für nicht-reduzierte Proben in

Tabelle 25 und für reduzierte Proben in Tabelle 26 aufgelistet und verglichen. Die Integrale der Sekundärfärbung gegen **IgA** werden in Tabelle 27 zusammengefasst. In diesem Kapitel ist die Größe der Banden jeder Probe von Relevanz, da die relative Proteinmenge hervorgehoben werden soll, welche durch jede Elution aufgereinigt wird. Für alle Peaks innerhalb desselben Molekulargewichts wird deshalb die Probe bestimmt, welche nach der Berechnung des Integrals die größte Fläche zeigt. Alle anderen Integrale aus Peaks mit demselben Molekulargewicht werden zu diesem ins Verhältnis gesetzt. Integrale, die sich aus den Peaks innerhalb der Sekundärfärbung des Serums ergeben, werden für die Bestimmung der größten Fläche ausgeschlossen.

Tabelle 23: Die relativen Flächen der Peaks aus den Intensitäts-Blots der nicht-reduzierten Proben der mit *Coomassie*[®]-Brillant-Blau eingefärbten LDS-PAGE in Abbildung 26, im Vergleich zum größten Peak des jeweiligen Molekulargewichts.

Vergleich der Peakflächen zwischen den nicht-reduzierten Proben der LDS-PAGE				
Probe	Verhältnis Peaks 1 bis 3	Verhältnis Peak 4	Verhältnis Peak 5	Verhältnis Peak 6
größte Fläche	Elution 2	Harz	DL 1	Elution 2
DL 1	16,3 %	34,6 %	100,0 %	34,5 %
DL 2	9,8 %	33,7 %	89,8 %	29,8 %
Elution 1	82,9 %	81,8 %	70,2 %	100,0 %
Elution 2	100,0 %	89,3 %	52,9 %	78,7 %
Elution 3	23,1 %	-	-	15,7 %
Harz	36,4 %	100,0 %	34,1 %	12,9 %

Der erste Peak im Intensitäts-Blot der nicht-reduzierten Proben stellt die relative Menge an vollständigen Antikörpern dar. Fragmentierte Antikörper werden in den Peaks 2 bis 4 repräsentiert. Hier können sich $F(ab)_2$ -Regionen im dritten Peak befinden. Die Peaks 5 und 6 entsprechen jeweils der relativen Menge an schweren, beziehungsweise leichten Antikörperketten. Peak 5 kann zusätzlich auch *Fab*- und *Fc*-Regionen enthalten und die Proteinmenge der leichten Antikörperketten im sechsten Peak wird von einer Verunreinigung mit ähnlicher Größe verschleiert. Die ersten beiden Elutionen zeigen eine große Ausbeute in allen sechs Peaks. Lediglich im vierten und fünften Peak werden sie von anderen Proben übertroffen. Die stationäre Phase zeigt eine relativ große Menge an fragmentierten Antikörpern. Da die dritte Elution keinerlei Protein enthält, welche entsprechend des Molekulargewichts mit fragmentierten Antikörpern assoziiert werden kann, ist anzunehmen, dass diese nach der zweiten Elution nicht mehr aus der stationären Phasen eluiert werden können. In beiden Durchläufen wurde eine größere Menge an Proteinen mit einem

Molekulargewicht von ~ 50,0 kDa (Peak 5) aus der stationären Phase gespült. Über die Färbung mit *Coomassie*[®]-Brillant-Blau lässt sich aber nicht genauer bestimmen, ob es sich hierbei wirklich um Antikörperfragmente oder ein anderes Protein handelt. In den anderen Peaks der Durchläufe wird bis zu einem Sechstel der Menge an Protein erreicht, welche sich in den entsprechenden Peaks der ersten beiden Elutionen befindet. Die Ausbeute der dritten Elution ist sehr gering und beträgt weniger als ein Fünftel der beiden vorangehenden Elutionen. Im Vergleich bleibt im Harz deutlich weniger Protein zurück, als bei der im vorherigen Kapitel dargestellten Affinitätschromatographie.

Tabelle 24: Die relativen Flächen der Peaks aus den Intensitäts-Blots der reduzierten Proben der mit *Coomassie*[®]-Brillant-Blau eingefärbten LDS-PAGE in Abbildung 26, im Vergleich zum größten Peak des jeweiligen Molekulargewichts.

Vergleich der Peakflächen zwischen den reduzierten Proben der LDS-PAGE				
Probe	Verhältnis Peaks 1 und 2	Verhältnis Peak 3 bis 5	Verhältnis Peak 6	Verhältnis Peak 7
größte Fläche	Elution 2	Elution 1	Elution 1	Elution 1
DL 1	76,7 %	67,7 %	27,5 %	29,0 %
DL 2	76,1 %	50,3 %	37,9 %	23,9 %
Elution 1	92,9 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
Elution 2	100,0 %	83,3 %	72,7 %	80,2 %
Elution 3	98,2 %	24,5 %	-	24,8 %
Harz	88,7 %	49,6 %	-	18,2 %

In den ersten beiden Peaks der reduzierten Proben sind verbleibende Mengen an vollständigen Antikörpern und Antikörperfragmenten aufzufinden, welche nicht vollständig reduziert wurden und mindestens zwei schwere Antikörperketten enthalten. Ebenso ist es möglich, dass sich im zweiten Peak $F(ab)_2$ -Regionen befinden. Der dritte Peak enthält Antikörperfragmente mit einer schweren und einer leichten Kette. Die Proteine sowohl im vierten als auch im sechsten Peak, können anhand ihres Molekulargewichts nicht genauer identifiziert werden. Wie auch bei den nicht-reduzierten Proben kann Peak 5 schwere Ketten sowie *Fab*- als auch *Fc*-Regionen enthalten. Der siebte Peak ist letztendlich durch leichte Antikörperketten sowie eine unbekannt proteinogene Verunreinigung definiert. Im Gegensatz zu den nicht-reduzierten Proben besitzen die ersten beiden Elutionen bei allen Peaks die größte Fläche. Das liegt daran, dass sich die größte Menge an Protein, welche in den Waschrufen von der stationären Phase gewaschen wird, im vierten Peak befindet. Dieser Peak wird bei der Berechnung der Integration mit dem dritten und fünften Peak vereint. Die Proteinmengen im dritten und fünften Peak sind in den Elutionen deutlich größer als im vierten.

Das unbestimmte Protein im vierten Peak besitzt daher nur eine geringe Affinität gegenüber der stationären Phase.

Die Werte der gemessenen Flächen in den ersten beiden Peaks liegen bei allen Proben sehr nah beieinander. Das liegt daran, dass die korrespondierenden Banden generell sehr schwach und die Peaks nur sehr schlecht definiert sind. Es handelt sich hierbei höchstwahrscheinlich um vollständige Antikörper und größere fragmentierte Antikörper, welche in jeder Probe als marginaler Rest verbleiben. Dementsprechend besitzen diese beiden Peaks nur eine geringe Relevanz für die Auswertung. Peaks, in welchen aufgrund des entsprechenden Molekulargewichts vereinzelte schwere und leichte Ketten erwartet werden, zeigen in den ersten beiden Elutionen im Vergleich zur dritten Elution ungefähr die vierfache Menge an Protein. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen in den Intensitäts-Blots der nicht-reduzierten Proben.

Tabelle 25: Die relativen Flächen der Peaks aus den Intensitäts-Blots der nicht-reduzierten Proben des *Western Blots* in Abbildung 28, im Vergleich zum größten Peak des jeweiligen Molekulargewichts. Die Flächen der Peaks des Serums werden mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und zu der jeweils größten Fläche aus den anderen Proben ins Verhältnis gesetzt.

Vergleich der Peakflächen zwischen den mit Anti-IgG markierten, nicht-reduzierten Proben des <i>Western Blots</i>			
Probe	Verhältnis Peaks 1 bis 4	Verhältnis Peak 5	Verhältnis Peak 6
größte Fläche	Elution 1	Elution 2	Elution 2
DL 1	18,1 %	15,7 %	-
DL 2	13,7 %	7,8 %	-
Elution 1	100,0 %	93,2 %	80,7 %
Elution 2	91,2 %	100,0 %	100,0 %
Elution 3	12,2 %	4,9 %	-
Harz	9,7 %	5,7 %	19,1 %
$\frac{\text{größte Fläche}}{\text{Serum}}$	1,4 %	2,2 ‰	1,9 ‰

Wie auch im vorherigen Kapitel gibt die Fläche der Peaks in den Intensitäts-Blots des *Western Blots* einen Schätzwert für die tatsächlich vorhandene Menge an Antikörper vor. Die Flächen der ersten vier Peaks der nicht-reduzierten Proben beschreiben hierbei die Menge an vollständigem und fragmentiertem **IgG**. Der fünfte Peak spiegelt die schweren **IgG**-Ketten und der sechste die leichten **IgG**-Ketten wider. Bei jedem Peak dominiert einer der beiden ersten Elutionen die Größe der Fläche. Eine größere Menge an Antikörperketten ist nur in diesen

beiden Elutionen zu beobachten. Alle anderen Proben enthalten eine vernachlässigbare Menge. Die Flächengröße der Peaks der Elutionen ist im Verhältnis zu der Flächengröße der Peaks des Serums größer als erwartet. Das ist aber mit großer Wahrscheinlichkeit auf das größere Elutionsvolumen und die optimierten Versuchsbedingungen zurückzuführen.

Tabelle 26: Die relativen Flächen der Peaks aus den Intensitäts-Blots der reduzierten Proben des *Western Blots* in Abbildung 28 im Vergleich zum größten Peak des jeweiligen Molekulargewichts. Die Flächen der Peaks des Serums werden mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und zu der jeweils größten Fläche aus den anderen Proben ins Verhältnis gesetzt.

Vergleich der Peakflächen zwischen den mit Anti-IgG markierten, reduzierten Proben des <i>Western Blots</i>				
Probe	Verhältnis Peak 1	Verhältnis Peak 2	Verhältnis Peak 3	Verhältnis Peak 4
größte Fläche	Elution 1	Elution 1	Elution 2	Elution 1
DL 1	-	17,1 %	21,1 %	-
DL 2	-	15,4 %	6,3 %	-
Elution 1	100,0 %	100,0 %	97,0 %	100,0 %
Elution 2	81,2 %	61,3 %	100,0 %	66,5 %
Elution 3	14,6 %	-	3,5 %	-
Harz	-	47,0 %	3,8 %	11,4 %
größte Fläche Serum	8,9 ‰	1,6 ‰	7,2 ‰	5,9 ‰

Die Werte der Flächen der Intensitäts-Blots, welche mit den reduzierten Proben des *Western Blots* korrespondieren und mit Anti-IgG markiert sind, bestätigen die Beobachtung aus den nicht-reduzierten Proben. Der einzige Unterschied ist, dass im zweiten Peak die Fläche des Peaks der stationären Phase deutlich größer ist. Hierbei handelt es sich um die fragmentierten Antikörper, welche auch mit der dritten Elution nicht aus dem Harz herausgelöst werden konnten.

Tabelle 27: Die relativen Flächen der Peaks aus den Intensitäts-Blots der reduzierten Proben des Western Blots in Abbildung 30, im Vergleich zum größten Peak des jeweiligen Molekulargewichts. Die Flächen der Peaks des Serums werden mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und zu der jeweils größten Fläche aus den anderen Proben ins Verhältnis gesetzt.

Vergleich der Peakflächen zwischen den mit Anti-IgA markierten Proben des <i>Western Blots</i>			
Probe	Verhältnis Peaks 1 bis 4	Verhältnis Peak 5	Verhältnis Peak B
größte Fläche	Elution 1	Elution 1	Elution 2
DL 1	-	-	100,0 %
DL 2	-	-	-
Elution 1	100,0 %	100,0 %	38,0 %
Elution 2	87,7 %	78,9 %	40,0 %
Elution 3	36,4 %	-	-
Harz	-	-	20,0 %
größte Fläche Serum	2,7 %	-	1,2 %

In den Intensitäts-Blots des *Western Blots*, welcher gegen **IgA** eingefärbt wurde, werden nur schwere **IgA**-Ketten markiert. Die Peaks 1 bis 5 stammen hierbei von nicht-reduzierten und Peak A und B von reduzierten Proben. Peak A ist nur in einer einzigen Probe enthalten und wird deshalb für die Auswertung vernachlässigt. Die ersten vier Peaks entsprechen vollständigem **IgA** und fragmentiertem **IgA**, welches mindestens zwei schwere Ketten enthält. Der fünfte Peak definiert die Fläche, in welcher einzelne schwere Ketten unter nicht-reduzierten Bedingungen zu erwarten sind. Peak B entspricht auch den einzelnen schweren **IgA**-Ketten, allerdings nur in den reduzierten Proben. Die in der Tabelle 27 dargestellte Zusammenfassung bestätigt die Beobachtung, dass der größte Teil der aufgereinigten Antikörper in den beiden ersten Elutionen aufzufinden ist. Die einzige Ausnahme ist die große Menge an schweren **IgA**-Ketten, welche im ersten Durchlauf markiert werden. Wie aber bereits erwähnt, zeigt die entsprechende Bande ein größeres Molekulargewicht als schwere **IgA**-Ketten innerhalb der Elutionen. Die gemessene Fläche der Elutionen der schweren **IgA**-Ketten ist im reduzierten Zustand im Vergleich zu der Fläche des Serums geringer als erwartet. Eine Ursache dafür kann sein, dass die geringe Signalstärke der Anti-**IgA**-Markierung die Bestimmung eines genauen Messwertes erschwert.

Die Ergebnisse der optimierten Affinitätschromatographie zeigen eine deutlich größere relative und absolute Ausbeute im Vergleich zur ersten Aufreinigung. Bei Anti-**Emp-IgG** variiert das Epitop der Antikörper in jeder Elution geringfügig. Diese Variation ist bei **IgA** vergleichsweise deutlich stärker zu beobachten. Zwei Elutionen reichen aus, um die meisten Antikörper aus der stationären Phase aufzureinigen. Während die Menge an Proteinen in diesen beiden Elutionen sehr ähnlich ist, so ist die Funktionsfähigkeit von **IgG** aus der ersten Elution deutlich besser als die in der zweiten. Bei **IgA** ist die Proteinmenge ebenfalls ungefähr gleich, aber stattdessen ist die Funktionsfähigkeit in der zweiten Elution besser. Die Ausbeute von funktionsfähigem **IgA** ist mehr als doppelt so groß wie die Ausbeute von **IgG**. In der dritten Elution ist die Ausbeute der Proteinmenge von beiden Antikörpertypen deutlich geringer als in den ersten beiden Elutionen. Auch ist die Funktion der Antikörper innerhalb dieser Elution deutlich reduziert. Auf der stationären Phase verbleibende Antikörper besitzen eine so starke Retentionszeit, dass sie höchstwahrscheinlich nicht mehr aus dem Harz herausgelöst werden können. Durch die Waschschrte geht zwar ein Teil der Anti-**Emp**-Antikörper verloren, dafür erhöht sich aber die Homogenität der Affinität gegenüber demselben Epitop. Aus diesem Grund sind die beiden Waschschrte unabdingbar.

4.2.2.3 Annäherung an die Proteinmenge über relative Intensität

Aufgrund der proteinogenen Verunreinigung ist eine photometrische Bestimmung der Proteinmenge innerhalb der Elutionen nicht sinnvoll. Die Verunreinigung ist so stark, dass der Messwert erheblich verfälscht wird. Aus diesem Grund wird eine alternative Methode zur Schätzung der Proteinkonzentration verwendet. Über die Bandengröße der **BSA**-Kontrolle kann abgeschätzt werden, wie stark eine bestimmte Proteinmenge durch das *Coomassie*[®]-Brillant-Blau eingefärbt wird. Für den Zweck der Bestimmung wird die LDS-PAGE aus der Abbildung 25 verwendet. Als geeignete Banden für die Messung der Anti-**Emp**-Antikörper bieten sich die drei Banden mit dem größten Molekulargewicht der nicht-reduzierten Proben an. Diese enthalten vollständige und fragmentierte Antikörper mit mindestens zwei schweren Antikörperketten und werden im *Western Blot* gut sichtbar markiert. Fragmente mit einer schweren und leichten Kette sowie einzelne schwere Ketten repräsentieren jeweils ein halbes Antikörpermolekül und würden die Messung deshalb verzerren. Die leichte Bande ist aufgrund der Verunreinigung nicht als Bande für die Schätzung brauchbar.

Für die Berechnung des Anti-**Emp**-Antikörpers wird die RI der **BSA**-Bande als Referenz bestimmt. Als Vergleichswert werden die drei obersten Banden der Elutionen zusammengefasst. Um die Messwerte für die relevanten Banden zu erhalten, werden diese durch das Programm *ImageJ*^[1395] innerhalb einer Selektion mit einer Größe von 65,0 x 100,0 Px ausgewählt, die Farben invertiert und der Mittelwert der RI innerhalb dieser Fläche bestimmt. Von diesem Mittelwert wird der Modalwert der Selektion subtrahiert und das

Ergebnis mit der Fläche der Selektion multipliziert. Der Modalwert entspricht hierbei dem häufigsten Wert des Hintergrundrauschens innerhalb der Selektion. Die Datenbreite von *ImageJ* ist für die Messung der Schätzwerte auf ein Maximum von 16 Bit begrenzt. Zur besseren Veranschaulichung wird von jeder Messung ein Oberflächendiagramm angefertigt. Durch den Vergleich des Produkts der Banden des Anti-**Emp**-Antikörpers mit dem der **BSA**-Bande lässt sich die Proteinmenge der Antikörper schätzen. Mit Hilfe einer Extrapolation des in der LDS-PAGE eingesetzten Volumens kann die Menge in eine Konzentration umgewandelt werden. Das Ergebnis dieser Bestimmung ist ein Schätzwert und ermöglicht es, in Ermangelung besserer Alternativen, eine ungefähre Antikörperkonzentration innerhalb der Elutionen zu bestimmen. Der Farbstoff *Coomassie*[®]-Brillant-Blau interkaliert mit bestimmten Aminosäuren der Proteine, weshalb das Molekulargewicht bei dieser Bestimmung keine Rolle spielt ^[1396]. Da die Aminosäuresequenz des Anti-**Emp**-Antikörpers nicht bekannt ist, werden eventuelle Varianzen in der Zusammensetzung der Proteine ignoriert. Angefertigte Oberflächendiagramme sind in Abbildung 32 dargestellt. Die Messergebnisse und die Berechnung zur Bestimmung der Schätzwerte sind in Tabelle 28 aufgelistet.

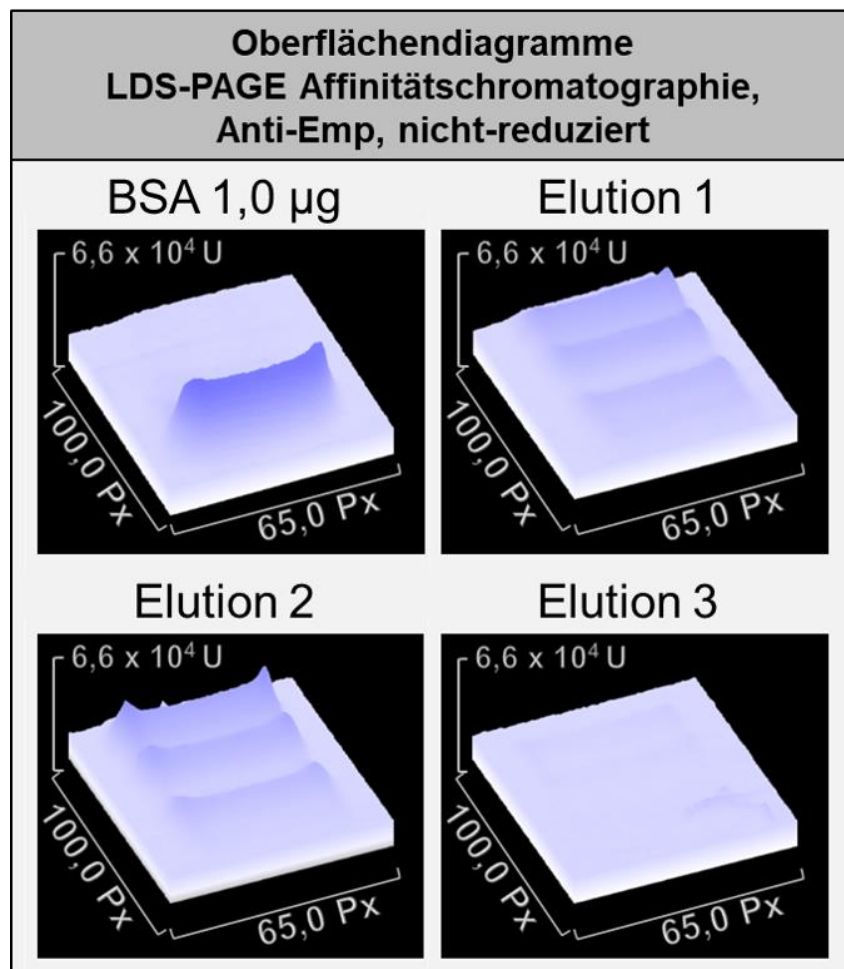


Abbildung 32: Visuelle Darstellung der Flächen, welche für eine Annäherung an die absolute Proteinmenge gemessen wurden.

Tabelle 28: Die durchschnittliche Intensität Antikörper-haltiger Banden aus der LDS-PAGE in Abbildung 25 wird mit der durchschnittlichen relativen Intensität eines Referenzproteins mit bekannter Proteinmenge verglichen.

Mengenbestimmung von Anti-Emp-Antikörper über durchschnittliche Intensität			
Probe	Gesamtintensität in [bitPx]	geschätzte Proteinmenge	geschätzte Proteinkonzentration in [µg/mL]
BSA 1,0 µg	$2,1 \times 10^7$	1,0 µg	100,0
Elution 1	$2,4 \times 10^7$	1,2 µg	115,2
Elution 2	$2,3 \times 10^7$	1,1 µg	111,1
Elution 3	$4,2 \times 10^5$	19,8 ng	2,0

Die Schätzung ergibt, dass sich in den Proben der beiden ersten Elutionen eine Menge von Antikörpern mit einem Gewicht von knapp über 1,0 µg befindet. Die Proteinkonzentration unterscheidet sich in diesen beiden Proben nur geringfügig. In der dritten Elution hingegen befinden sich weniger als 2,0 % dieser Menge. Da alle Proben nur als Unikat vorliegen, lässt sich bei dieser Schätzmethode keine SA bestimmen, wodurch die Stabilität der Messwerte nicht ermittelt werden kann.

4.2.3 Weitere Affinitätschromatographien

Im Verlauf der Dissertation wurden noch weitere Affinitätschromatographien durchgeführt und Anti-**Emp**-Antikörper für Versuchszwecke isoliert. Blutserum für die Aufreinigung wurde von den freiwilligen Spendern FS2, FS3 und FS4 unter ärztlicher Aufsicht abgenommen. Die Auswertung der nachfolgenden Aufreinigungen wird auf den Vergleich der Aminosäureblots und die Berechnung der jeweiligen Ausbeute begrenzt. In den ersten Chromatographien von FS3 und FS4 werden vier Elutionen durchgeführt, um zu überprüfen, ob noch Antikörper mit einer längeren Retentionszeit von der Säule gewaschen werden können. Die vierte Elution (Elu 4) wird allerdings nur durch eine LDS-PAGE und nachfolgender *Coomassie*[®]-Brillant-Blau im nächsten Kapitel analysiert. Das Serum, die Elutionen und DL 1 von jeder Affinitätschromatographie werden als Primärfärbung zur Markierung von *PEPPERCHIP*[®] Peptid-Mikroarrays in 16er-Konfiguration verwendet. Diese Peptidarrays enthalten eine Substitutionsanalyse des Peptids ‚HYVPEFKGSLPAPRV‘. Nach der Primärfärbung werden alle Peptidarrays mit Sekundäntikörpern gegen die Antikörpertypen **IgG** und **IgA** markiert. Auf diese Weise markierte Arrays der Proben aus der Affinitätschromatographie von FS3 und FS4, sind in den Anlagen 1 und 2 im Anhang dargestellt. Bei der letzten Aufreinigung von FS2 werden nur zwei Elutionen durchgeführt und es wird auf eine Markierung und nachfolgende Auswertung des **IgA** verzichtet. Als Vergleichswert für die Signalstärken jeder Färbung wird die RFI der Peptidspots, welche die originale Aminosäuresequenz enthalten, als Mittelwert

zusammengefasst und die zusammenhängende SA bestimmt. Überschreitet die SA hierbei 80,0 %, kann die Färbung nicht für einen Vergleich verwendet werden. Nach dieser Regel scheiden die Sekundärfärbungen gegen **IgA** der zweiten optimierten Affinitätschromatographie des Serums von FS2 für eine Auswertung aus. Die Differenzen in den Intensitäten innerhalb der Aminosäureblots der Elutionen im Vergleich zum Serum, die einen Betrag von 30,0 % oder höher besitzen, sind für die beiden Aufreinigungen von FS2 in Tabelle 29 aufgelistet. Die gleichen Differenzen sind für die Seren von FS3 und FS4 in Tabelle 30 zu finden. Da jede Substitution im Peptidarray nur als Unikat vorliegt, ist die Zuverlässigkeit der Messergebnisse geringer als bei den Peptid-Mikroarrays in Fünfer-Konfiguration. Die Ausbeute der Affinitätschromatographien sind für das Serum FS2 in Tabelle 31 und für FS3 sowie für FS4 in Tabelle 32 beschrieben.

Der Vergleich der Aminosäureblots der Affinitätschromatographien von FS2 bestätigt bisherige Ergebnisse. Peptidspots mit einer Differenz zur Referenz sind nur in geringer Zahl aufzufinden. In vereinzelt Fällen ist einer dieser Peptidspots an einer essenziellen Position. Mit jeder weiteren Elution nimmt die Anzahl an Peptidspots zu, welche ein größeres Signal als die Referenz im Serum zeigen. Im Gegensatz dazu nimmt der Anteil an vergleichsweise schwächeren Signalen ab. Der Durchlauf zeigt in allen drei Aufreinigungen im Vergleich zum Serum die größte Anzahl an Differenzen. Die Elutionen der Aufreinigung des Serums von FS3 zeigen derweil einen starken Kontrast zu den Ergebnissen, welche bei der Aufreinigung des Serums von FS2 beobachtet werden konnten. In jeder Elution bleibt die Anzahl an Differenzen gleich und das Verhältnis verschiebt sich in der zweiten und dritten Elution zu Peptidspots, welche ein schwächeres Signal als die Referenz zeigen. In der ersten Elution sind hierbei mehrere Differenzen bei Substitutionen in den letzten beiden essenziellen Positionen zu finden. In ähnlicher Form kann diese Beobachtung in der Aufreinigung von FS4 beobachtet werden. Dort verändert sich die Anzahl der Peptidspots mit größeren Differenzen nur minimal und das Verhältnis verschiebt sich mit jeder weiteren Elution hin zu Peptidspots, welche eine geringere Signalstärke als die Referenz zeigen. In allen drei Elutionen zeigen sich hierbei mehrere Differenzen bei Peptidspots, welche eine Substitution an einer essenziellen Position aufweisen. Bei dem Durchlauf von FS3 zeigen vier von fünf Peptidspots eine Differenz zur Referenz und in vielen Fällen ist der Betrag größer als 100,0 %. Der Durchlauf von FS4 weist diese Differenzen mit vergleichbarem Betrag in jedem dritten Peptidspot auf. Die große Anzahl an Differenzen zwischen Serum und den Elutionen deutet bei beiden Spendern darauf hin, dass mehrere Antikörper involviert sind, welche jeweils eine unterschiedliche Affinität gegenüber dem Epitop des Anti-**Emp**-Antikörpers besitzen. Bei den Durchläufen sind so viele prägnante Unterschiede sichtbar, sodass die Wahrscheinlichkeit groß ist, dass in den Waschsritten Anti-**Emp**-Antikörper abgeschieden werden, welche ein ähnliches, aber nicht das gleiche Epitop binden.

Tabelle 29: Anzahl der Peptidspots der individuellen Elutionen, deren RFI sich nach der Sekundärfärbung um mehr als 30,0 % von der korrespondierenden RFI der Peptidspot der Sekundärfärbung des Serums unterscheidet.

Differenz der Aminosäureblots der Affinitätschromatographie von FS2: Eluate gegen Serum ($\Delta \geq 30,0$ %)					
Eluat	Peptidspots (Signalstärke Eluat < Serum)		Peptidspots (Signalstärke Eluat > Serum)		Anzahl gesamt (relativ)
	Anzahl (relative Anzahl)	durchschn. Differenz	Anzahl (relative Anzahl)	durchschn. Differenz	
optimierte Affinitätschromatographie FS2 Nr. 2					
Elution 1	2 (1,1 %)	43,7 %	-	-	2 (1,1 %)
Elution 2	4 (2,2 %)	45,0 %	7 (3,9 %)	55,9 %	11 (6,1 %)
Elution 3	-	-	6 (3,3 %)	54,9 %	6 (3,3 %)
DL 1	5 (2,8 %)	42,7 %	8 (4,4 %)	55,1 %	13 (7,2 %)
optimierte Affinitätschromatographie FS2 Nr. 3					
Elution 1	7 (3,9 %)	34,6 %	5 (2,8 %)	106,9 %	12 (6,7 %)
Elution 2	1 (5,6 %)	40,6 %	4 (2,2 %)	59,5 %	5 (2,8 %)
DL 1	20 (11,1 %)	48,2 %	20 (11,1 %)	116,5 %	40 (22,2 %)

Sowohl Spender FS3 als auch FS4 haben im Vergleich zu FS2 eine verhältnismäßig größere Menge an **IgA**. Das vereinfacht die Auswertung dieses Antikörpertyps in den Elutionen beider Personen deutlich. Während die erste Elution des Serums von FS3 keine merklichen Unterschiede zur Signalstärke der Markierung von Anti-**IgA** in der Referenz zeigt, erhöht sich diese in der zweiten Elution um eine geringe Anzahl. Mit einer weiteren Elution verschiebt sich das Verhältnis zu Peptidspots, welche eine geringere Signalstärke als die Referenz zeigen. Der Durchlauf zeigt in Peptidspots nur Differenzen, welche geringer als die Signalstärke aus den entsprechenden Referenzspots sind. Es zeigen sich nur wenige Differenzen in den Peptidspots an essenziellen Positionen und diese unterscheiden sich nur geringfügig. Das Serum von FS4 weist zwei große Messartefakte auf, welche das Messergebnis im Detail stark verzerren und einen sinnvollen Vergleich verhindern.

Tabelle 30: Anzahl der Peptidspots der individuellen Elutionen, deren RFI sich nach der Sekundärfärbung um mehr als 30,0 % von der korrespondierenden RFI der Peptidspot der Sekundärfärbung des Serums unterscheidet.

Differenz der Aminosäureblots der Affinitätschromatographie von FS3 und FS4: Eluate gegen Serum ($\Delta \geq 30,0\%$)					
Eluat	Peptidspots (Signalstärke Eluat < Serum)		Peptidspots (Signalstärke Eluat > Serum)		Anzahl gesamt (relativ)
	Anzahl (relative Anzahl)	durchschn. Differenz	Anzahl (relative Anzahl)	durchschn. Differenz	
optimierte Affinitätschromatographie FS3					
IgG					
Elution 1	4 (2,2 %)	45,3 %	16 (8,9 %)	41,3 %	20 (11,1 %)
Elution 2	15 (8,3 %)	53,9 %	5 (2,8 %)	37,1 %	20 (11,1 %)
Elution 3	15 (8,3 %)	48,3 %	5 (2,8 %)	48,3 %	20 (11,1 %)
DL 1	6 (3,3 %)	41,2 %	135 (75,0 %)	91,5 %	141 (78,3 %)
IgA					
Elution 1	1 (5,6 %)	41,8 %	11 (6,1 %)-	47,5 %	12 (6,7 %)-
Elution 2	7 (3,9 %)	48,3 %	6 (3,3%)	38,4 %	13 (7,2 %)
Elution 3	12 (6,7 %)	45,9 %	-	-	12 (6,7 %)
DL 1	2 (1,1 %)	38,2 %	94 (52,2 %)	70,0 %	96 (53,3 %)
optimierte Affinitätschromatographie FS4					
IgG					
Elution 1	10 (55,6 %)	54,0 %	14 (7,8 %)	40,2 %	24 (13,3 %)
Elution 2	13 (7,2 %)	54,9 %	12 (6,7 %)	44,7 %	25 (13,9%)
Elution 3	19 (10,6 %)	49,7 %	4 (2,2 %)	45,7 %	23 (12,8 %)
DL 1	27 (15,0 %)	49,9%	39 (21,7 %)	86,8 %	66 (36,7 %)
IgA					
Elution 1	15 (8,3 %)	104,8 %	9 (5,0 %)	43,2 %	24 (13,3 %)
Elution 2	22 (12,2 %)	88,5 %	17 (9,4 %)	51,5 %	39 (21,7 %)
Elution 3	23 (12,8 %)	85,8 %	5 (2,8 %)	46,3 %	28 (15,6 %)
DL 1	9 (5,0 %)	126,9 %	64 (35,6 %)	70,0 %	73 (40,1 %)

Aus den Ergebnissen der Differenzen zwischen den Aminosäureblots und den Spenderseren lassen sich zwei wichtige Erkenntnisse gewinnen. Die erste Erkenntnis ist, dass das Verhältnis von Peptidspots, welche eine größere oder niedrigere Signalstärke als ihre mit Serum eingefärbte Korrespondenz zeigen, sich mit jeder Elution verändert. Die Richtung in welche dieses Verhältnis sich verschiebt und die Intensität dieser Verschiebung sind dabei von dem jeweiligen Spender abhängig. Dies ist ein starker Hinweis dafür, dass die durch sauren pH-Wert bedingte Denaturierung der Antikörper nur eine untergeordnete Rolle spielt und jede Person Anti-**Emp**-Antikörper mit einer Bandbreite an Retentionszeiten besitzt, welche entsprechend dem Elutionsvolumen in unterschiedlichen Fraktionen isoliert werden. Die unterschiedlichen Retentionszeiten und die Nuancen in der Signalstärke könnten hierbei aus einer Selektion von mehreren unterschiedlichen B-Zellen stammen, welche während dem Verlauf einer somatischen Hypermutation gefördert wurden. Die zweite und wichtigere Erkenntnis ist, dass die Differenzen im Aminosäureblot aufdecken können, ob sich die Antikörperaffinität im Eluat vom Blutserum unterscheidet. Zeigen Eluate eine größere Anzahl an Differenzen in mehreren essenziellen Positionen, ist das ein starker Hinweis dafür, dass die Affinität gegenüber dem Epitop bei eluierten Antikörpern und dem Serum verschieden ist. In diesem Fall ist davon auszugehen, dass das Serum über mehrere Antikörper verfügt, welche ähnliche, aber unterscheidbare Epitope binden können. So zeigen die Elutionen von FS2 bei der Aufreinigung von **IgG** und die Elutionen von FS3 bei der Aufreinigung von **IgA** so geringfügige Unterschiede, dass hierbei von einer sehr kleinen Bandbreite an Antikörpern auszugehen ist, welche das Epitop ‚**HYVPEFKGGLPAPRV**‘ binden. Im Unterschied hierzu zeigen aufgereinigtes Anti-**Emp-IgG** von FS3 und FS4 sowie aufgereinigtes **IgA** von FS2 und FS4 größere Unterschiede zur jeweiligen Referenz im Serum. Zusätzlich ist eine verhältnismäßig große Anzahl an Differenzen in Peptidspots der Substitutionsanalysen von Durchläufen zusammenhängender Affinitätschromatographien zu beobachten. Diese Unterschiede sind in den Substitutionsanalysen dieser Proben vermehrt an den essenziellen Positionen zu finden. Das spricht dafür, dass während der Affinitätschromatographie Antikörper mit einer Kreuzreaktivität gegenüber dem Epitop in den Durchläufen abgeschieden werden. Aus diesem Grund entsteht bei der Färbung einer Substitutionsanalyse eine größere Diskrepanz zwischen Serum und Elution. Spender, bei denen dies der Fall ist, besitzen höchstwahrscheinlich mehrere Antikörper des jeweiligen Antikörpertyps, welche das Epitop ‚**HYVPEFKGGLPAPRV**‘ binden können. Diese Antikörper sind aber polyklonal und haben nicht dieselbe Affinität, wodurch sie während der Affinitätschromatographie voneinander getrennt werden. Es gibt daher Menschen, welche Anti-**Emp**-Antikörper mit einer Bandbreite sehr enger oder sehr breit gefächerter Affinitäten besitzen.

Tabelle 31: Berechnung der RFI aller Proben der nachfolgenden, optimierten Affinitätschromatographien von FS2 und nachfolgende Bestimmung der relativen Ausbeute von funktionsfähigem Antikörper, im Verhältnis zum Blutserum.

weitere Affinitätschromatographien von Blutserum aus FS2				
Probe	Volumen	Verdünnungsfaktor in [X]	RFI in [RFU] (SA)	Ausbeute
optimierte Affinitätschromatographie FS2 Nr. 2				
IgG				
Serum	5,0 mL	200	$2,7 \times 10^9$ (17,9 %)	-
Elution 1	175,0 µl	500	$5,0 \times 10^8$ (14,8 %)	18,8 %
Elution 2	175,0 µl	500	$4,5 \times 10^8$ (17,2 %)	16,8 %
Elution 3	175,0 µl	500	$2,5 \times 10^8$ (11,5 %)	9,3 %
optimierte Affinitätschromatographie FS2 Nr. 3				
IgG				
Serum	5,0 mL	100	$8,0 \times 10^9$ (10,8 %)	-
Elution 1	175,0 µl	1000	$8,8 \times 10^8$ (27,0 %)	11,1 %
Elution 2	175,0 µl	1000	$9,2 \times 10^8$ (10,2 %)	11,4 %

Die Ausbeuten der Elutionen aus der Affinitätschromatographie des Serums von FS2 liegen zwischen 10,0 und 20,0 %. Bei der dritten Elution sinkt die Ausbeute im Falle von funktionsfähigem **IgG** auf 9,3 %.

Tabelle 32: Berechnung der RFI aller Proben der optimierten Affinitätschromatographien von FS3 und FS4. Nachfolgend wird die relative Ausbeute von funktionsfähigen Antikörpern im Verhältnis zum Blutserum bestimmt.

Affinitätschromatographien von Blutserum aus FS3 und FS4				
Probe	Volumen	Verdünnungsfaktor in [X]	RFI in [RFU] (SA)	Ausbeute
optimierte Affinitätschromatographie FS3				
IgG				
Serum	5,0 mL	200	$3,9 \times 10^9$ (10,7 %)	-
Elution 1	175,0 µl	500	$9,7 \times 10^8$ (7,0 %)	24,8 %
Elution 2	175,0 µl	500	$1,1 \times 10^9$ (12,9 %)	27,2 %
Elution 3	175,0 µl	500	$5,5 \times 10^8$ (15,8 %)	13,9 %
IgA				
Serum	5,0 mL	200	$4,1 \times 10^9$ (26,5 %)	-
Elution 1	175,0 µl	500	$4,4 \times 10^8$ (28,3 %)	10,6 %
Elution 2	175,0 µl	500	$8,5 \times 10^8$ (23,6 %)	20,7 %
Elution 3	175,0 µl	500	$4,3 \times 10^8$ (40,2 %)	10,6 %
optimierte Affinitätschromatographie FS4				
IgG				
Serum	5,0 mL	200	$6,5 \times 10^9$ (18,1 %)	-
Elution 1	175,0 µl	500	$1,2 \times 10^9$ (15,5 %)	18,1 %
Elution 2	175,0 µl	500	$9,2 \times 10^8$ (17,9 %)	14,1 %
Elution 3	175,0 µl	500	$3,0 \times 10^8$ (22,1 %)	4,6 %
IgA				
Serum	5,0 mL	200	$3,9 \times 10^9$ (15,7 %)	-
Elution 1	175,0 µl	500	$6,4 \times 10^8$ (22,4 %)	16,5 %
Elution 2	175,0 µl	500	$7,7 \times 10^8$ (43,6 %)	19,7 %
Elution 3	175,0 µl	500	$1,9 \times 10^8$ (33,9 %)	4,8 %

Die Elutionen nach der Affinitätschromatographie mit Serum von FS3 und FS4 zeigen eine Ausbeute von funktionsfähigen Antikörpern zwischen 10,0 und 30,0 %. Die dritten Elutionen zeigen vergleichsweise jeweils eine Ausbeute zwischen einem Viertel und der Hälfte der ersten Elution.

4.2.4 Optimierte Bestimmung der Proteinmenge

Die Annäherung zur Schätzung der Proteinmenge in Kapitel 4.2.2.3 „**Annäherung an die Proteinmenge über relative Intensität**“ verfügt aufgrund der Abwesenheit von mehreren Stichproben über keine bestimmbare SA. Aus diesem Grund ist eine Evaluierung der Zuverlässigkeit des Schätzwertes nicht möglich. Zur Bestimmung von zuverlässigeren Schätzwerten werden deshalb die Elutionen der Affinitätschromatographie von den Spenderseren FS3 und FS4 in einer LDS-PAGE ohne Reduktionsmittel vorbereitet und mit *Coomassie*[®]-Brillant-Blau eingefärbt. Als Referenzprotein zur Korrelation der Menge mit der Färbeintensität werden insgesamt vier Proben mit **BSA** eingesetzt. Jeweils zwei dieser Proben werden in einer Menge von 1,0 und 2,0 µg in Geltaschen gefüllt. Zusätzlich werden die vierten Elutionen aus den beiden Aufreinigungen aufgetragen und deren Proteingehalt ermittelt, um deren Elutionswirkung mit der dritten Elution zu vergleichen. Damit die Genauigkeit der Messwerte höher ist, wird die LDS-PAGE nach der Färbung mit einer Auflösung von 600 dpi und einer Datenbreite von 32 Bit dokumentiert. Die Abgrenzung der Banden vom Hintergrund wird durch die automatisierte Kontrastoptimierung des Scanners verbessert. Die mit *Coomassie*[®]-Brillant-Blau eingefärbte LDS-PAGE ist in Abbildung 33 dargestellt. Über das Gelanalysewerkzeug von *ImageJ*^[1394] werden die Banden in den dritten und vierten Elutionen in Intensitäts-Blots umgewandelt und die Integrale der resultierenden Peaks bestimmt. Die Intensitäts-Blots von den Elutionen sind in Abbildung 34 dargestellt. Da die Auflösung des Bildes der LDS-PAGE doppelt so hoch ist wie bei der vorherigen Bestimmung, wird die Messfläche für die Schätzung auf 130,0 x 200,0 Px erweitert. Von jeder Messung der durchschnittlichen relativen Intensität wird ein Oberflächendiagramm angefertigt. Diese werden gesammelt in den Abbildungen 35 und 36 präsentiert. Die tatsächlichen Messwerte und die geschätzten Proteinkonzentrationen sind in Tabelle 33 aufgelistet.

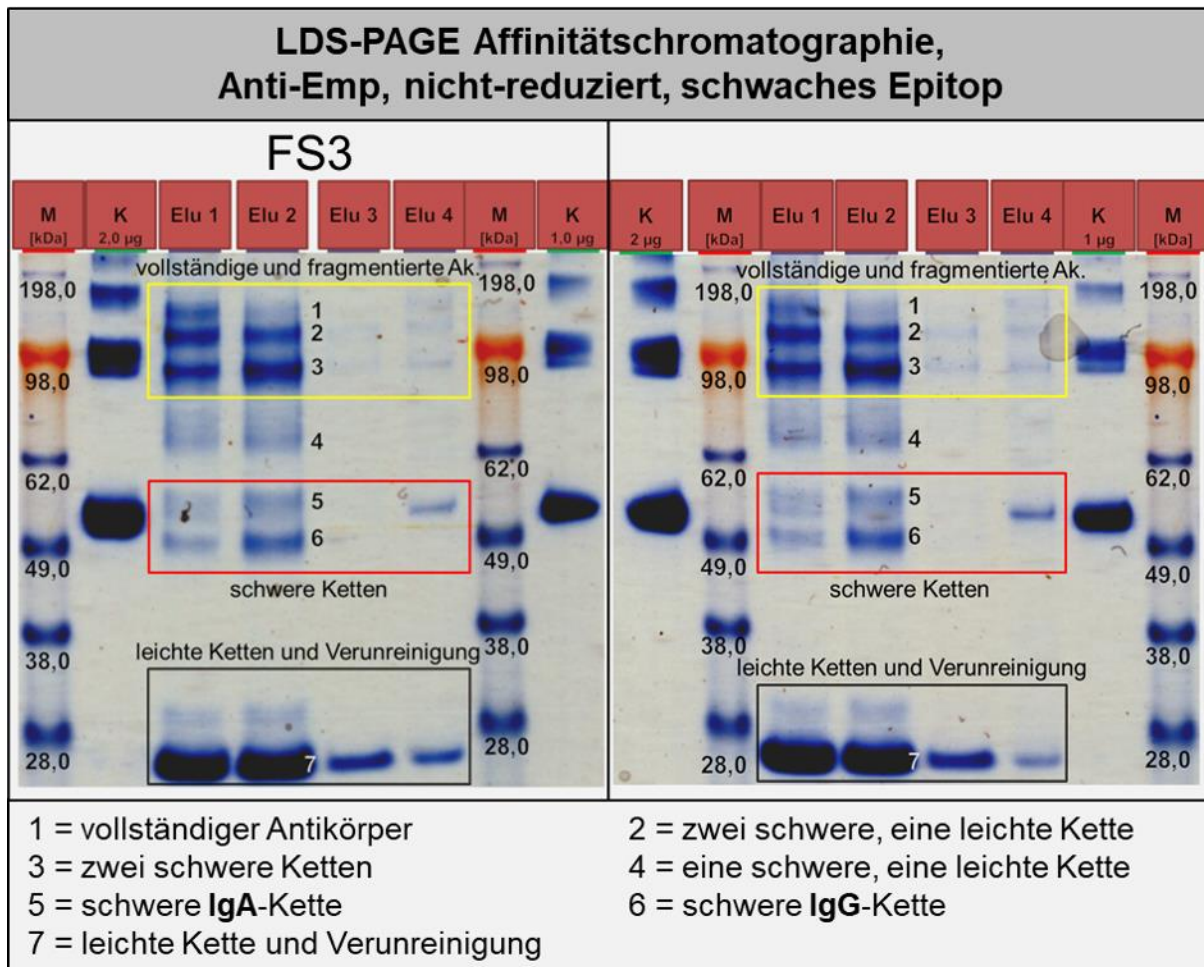


Abbildung 33: LDS-PAGE aller während der optimierten Affinitätschromatographie von den Seren von FS3 und FS4 generierten Proben, nach einer *Coomassie*[®]-Brillant-Blau-Färbung. Von jeder Probe wird 10,0 µl in eine Geltasche gefüllt. Zusätzlich zu den Proben werden jeweils zwei Proben mit 1,0 und 2,0 µg **BSA** als Referenzwert und ein Marker für Proteingrößen als Maßstab für das Molekulargewicht als Kontrollen beigefügt. Der Kontrast und die Helligkeit der Abbildung sind optimiert. Die Legende beschreibt, welche Antikörper oder Antikörperfragmente in den nummerierten Banden mit größter Wahrscheinlichkeit zu finden sind. Zur Bestimmung der Proteinmenge von Antikörpern werden alle Banden im gelben Rechteck verwendet.

Die Gelbanden, welche in den nicht-reduzierten Proben der ersten drei Elutionen durch den Farbstoff sichtbar gemacht werden, entsprechen den Erwartungen aus vorherigen Ergebnissen. Sowohl die aufgereinigten Antikörper von FS3, als auch FS4, besitzen eine große Verunreinigung mit einem Molekulargewicht, das den Erwartungen von leichten Antikörperketten entspricht. Als gut sichtbarer Unterschied ist bei der ersten, zweiten und vierten Elution eine große Bande auf der Höhe von ~ 55,0 kDa zu sehen. In den beiden Eluaten wurde im Vergleich zu dem Serum von FS2 eine viel größere Menge an **IgA** gewonnen. Diese Bande repräsentiert deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit einzelne schwere Ketten dieses Antikörpertyps. Auffällig ist hierbei, dass diese Bande bei der vierten, nicht aber bei der dritten Elution zu erkennen ist.

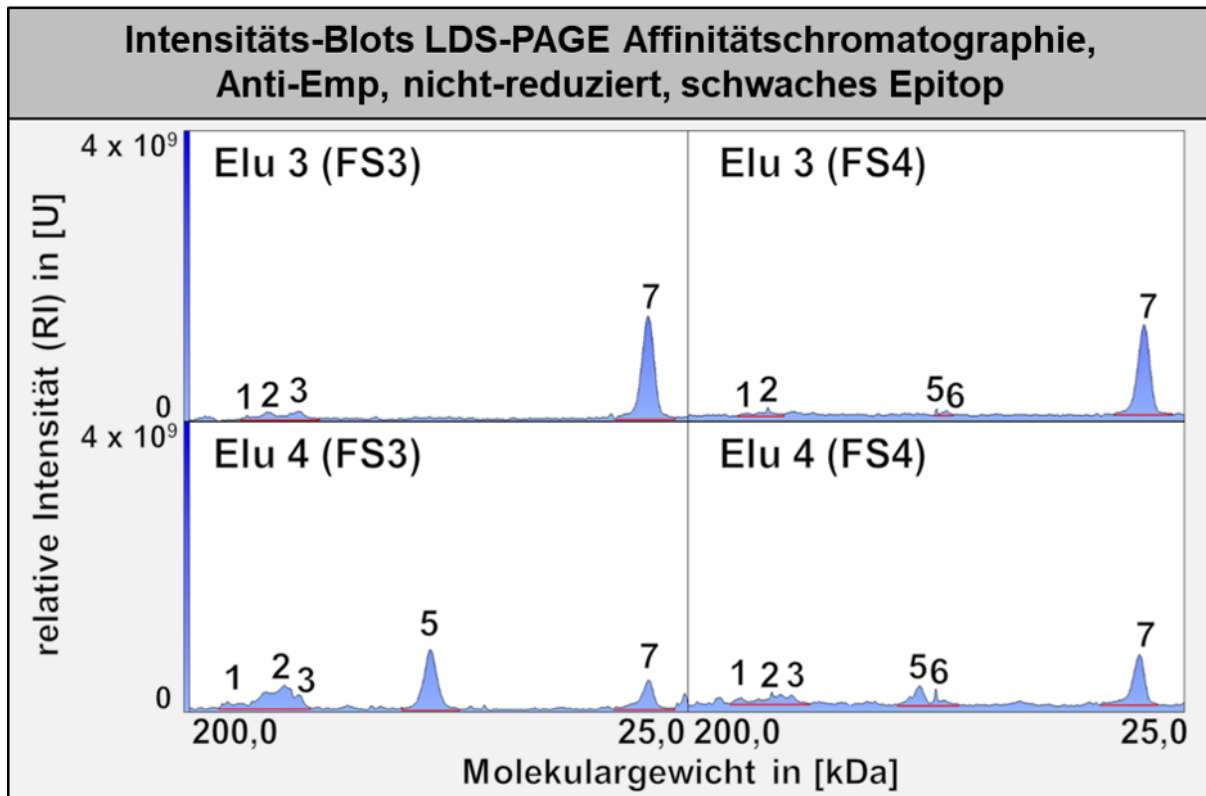


Abbildung 34: Zusammenfassung aller mit *Coomassie*[®]-Brillant-Blau eingefärbten Banden der LDS-PAGE aus der Abbildung 33. Die Markierungen der Peaks wurden aus dieser Abbildungen übernommen. Eine rote Linie beschreibt die Abgrenzung des Peaks gegenüber dem Hintergrundrauschen. Diese Abgrenzung wird für jeden Peak gleich gehalten, damit ein Vergleich zwischen den Proben möglich ist. In der Flächenberechnung werden die Peaks 1 bis 3 sowie 5 und 6 zusammengefasst, da ihre Flächen sich teilweise überlappen.

Die Flächen der Peaks in der vierten Elution sind bei beiden Seren mit Ausnahme des siebten Peaks größer als in der dritten Elution. Das bedeutet, dass in der vierten Elution weniger proteinogene Verunreinigung extrahiert wird, als in der Elution davor. Entsprechend vorheriger Analysen enthalten die ersten drei Peaks vollständige Antikörper und Antikörperfragmente mit mindestens zwei schweren Ketten und werden in einer Messfläche vereint. Diese Fläche ist bei der vierten Elution von FS3 fast dreimal so groß und bei der vierten Elution von FS4 mehr als dreimal so groß als bei der entsprechenden dritten Elution. Peaks 5 und 6 repräsentieren die extrahierte Menge an schweren **IgG**- und **IgA**-Ketten und ist nur für die Elutionen von FS4 vergleichbar, da die dritte Elution von FS3 an dieser Stelle kein sichtbares Signal zeigt. In diesem Vergleich ist die Fläche der beiden Peaks in der vierten Elution mehr als siebenmal so groß. Die Tatsache, dass die vierte Elution mehr Antikörper enthält als die Dritte und zusätzlich schwere Ketten aus der stationären Phasen extrahiert, unterstützt die Theorie, dass sich mehrere Anti-**Emp**-Antikörper im Blut befinden, welche zwar dasselbe Epitop binden, aber aufgrund ihrer abweichenden Affinität eine größere Retentionszeit besitzen. Die vergrößerte Retentionszeit sorgt dafür, dass mehr Elutionsvolumen notwendig ist, um sie von der Säule zu

spülen. Aus diesem Grund werden diese Antikörper von anderen Anti-**Emp**-Antikörpern während der Affinitätschromatographie isoliert.

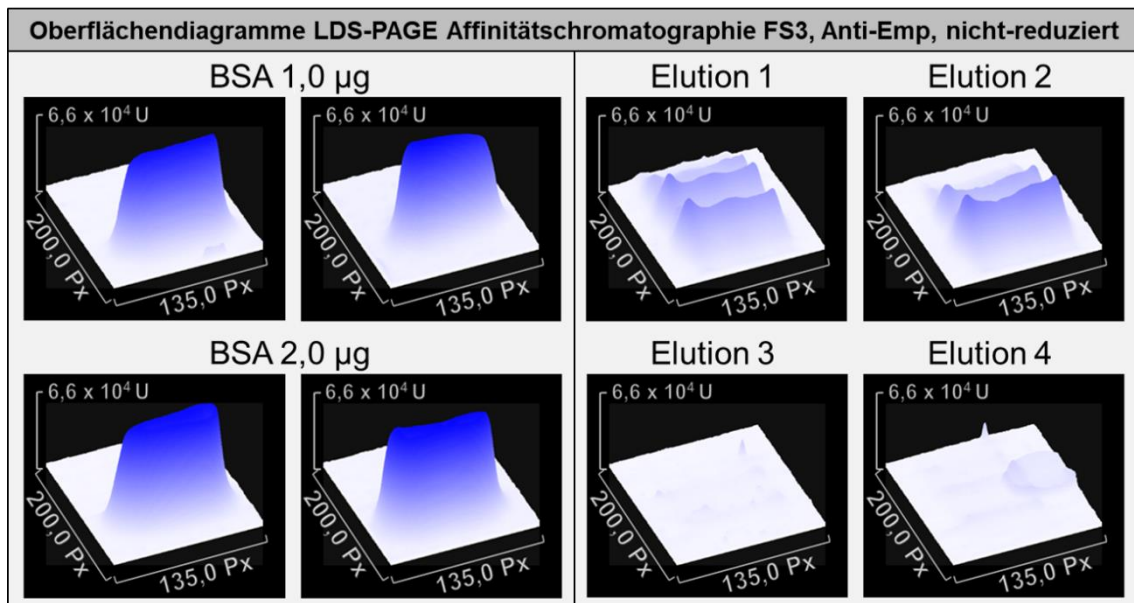


Abbildung 35: Visuelle Darstellung der Flächen, welche für eine Annäherung der absoluten Proteinmenge in den Elutionen der Affinitätschromatographie von Serum FS3 gemessen wurden. Links sind die Oberflächendiagramme der **BSA**-Proben dargestellt, welche als Referenzmenge eingesetzt wurden. Rechts sind die Oberflächendiagramme der ersten drei Banden aus den jeweiligen Elutionen abgebildet.

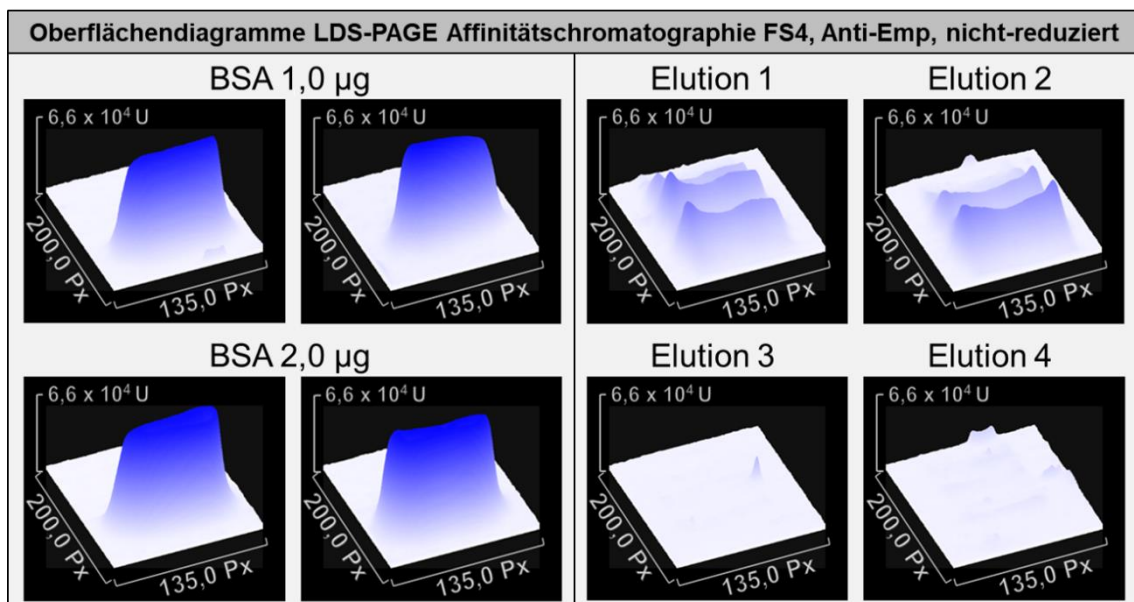


Abbildung 36: Visuelle Darstellung der Flächen, welche für eine Annäherung der absoluten Proteinmenge in den Elutionen der Affinitätschromatographie von Serum FS4 gemessen wurden. Links sind die Oberflächendiagramme der **BSA**-Proben dargestellt, welche als Referenzmenge eingesetzt wurden. Rechts sind die Oberflächendiagramme der ersten drei Banden aus den jeweiligen Elutionen abgebildet.

Tabelle 33: Die RI Antikörper-haltiger Banden aus der LDS-PAGE in Abbildung 33 wird mit der durchschnittlichen RI eines Referenzproteins mit bekannter Proteinmenge verglichen.

Mengenbestimmung von Anti-Emp-Antikörper über durchschnittliche Intensität			
Probe	Gesamtintensität in [bitPx]	geschätzte Proteinmenge	geschätzte Proteinkonzentration in [$\mu\text{g}/\text{mL}$]
BSA Mittelwert	$1,4 \times 10^8$	1,0 μg	100,0
FS3			
Elution 1	$1,8 \times 10^8$	1,3 μg	125,6
Elution 2	$1,6 \times 10^8$	1,1 μg	112,8
Elution 3	$9,4 \times 10^6$	66,2 ng	6,6
Elution 4	$2,4 \times 10^7$	167,5 ng	16,7
FS4			
Elution 1	$1,7 \times 10^8$	1,2 μg	118,1
Elution 2	$1,5 \times 10^8$	1,1 μg	108,6
Elution 3	$3,7 \times 10^6$	25,7 ng	2,6
Elution 4	$8,5 \times 10^6$	59,5 ng	5,9

In der optimierten Mengenbestimmung wird der gemessene Schätzwert für die **BSA**-Proben mit einem Gewicht von 2,0 μg halbiert. Aus diesen Werten wird dann zusammen mit den **BSA**-Proben mit einem Gewicht von 1,0 μg der Mittelwert und die SA berechnet. Der Mittelwert dient als Referenzwert, welcher der RI von 1,0 μg Protein entspricht. Die SA lässt die Stabilität der Schätzwerte bestimmen und liegt mit 13,4 % in einem akzeptablen Fehlerbereich. Die Proteinmengen, welche aus beiden Affinitätschromatographien gewonnen werden, sind sehr ähnlich und entsprechen höchstwahrscheinlich der maximalen Menge, welche von der stationären Phase eluiert werden kann ohne die Reinheit maßgeblich zu kompromittieren. Diese Vermutung wird dadurch bestärkt, dass die vorherige Mengenbestimmung mit Elutionen aus einer Affinitätschromatographie von FS2 ebenfalls sehr ähnliche Schätzwerte zeigt. Als Ergänzung zu den Ergebnissen der LDS-PAGE ist sichtbar, dass Elution 4 eine größere Proteinmenge enthält als Elution 3. Allerdings ist zu beachten, dass die vierte Elution von FS3 aufgrund eines Messartefaktes innerhalb der Messfläche einen erhöhten Schätzwert besitzt. Die Menge an vollständigen und fragmentierten Antikörpern, welche in der dritten und vierten Elution eluiert wird, ist im Vergleich gegenüber den ersten beiden Elutionen sehr gering und deshalb vernachlässigbar. Da die Schätzwerte aus mit *Coomassie*[®]-Brillant-Blau eingefärbten Banden erstellt werden, lässt sich nicht ermitteln, welche Antikörperklasse während der Elution hauptsächlich herausgelöst wird. Während alle Seren also insgesamt in ihren Elutionen ungefähr dieselbe Menge an Antikörper enthalten, unterscheidet sich der individuelle Anteil von **IgG** und **IgA**.

4.3 Charakterisierung des Anti-Emp-Antikörpers

Die erfolgreiche Aufreinigung von Anti-Emp-Antikörpern aus dem Serum ermöglicht eine präzisere Charakterisierung des Antikörpers. In diesem Kapitel werden die Isotypen der leichten und schweren Antikörperketten der eluierten Antikörper durch Immunfärbung identifiziert. Ergänzend zu der Färbung wird eine MS der Antikörper durchgeführt um die Ergebnisse aus der Färbung zu bestätigen und um die Genfamilien und Gene der variablen Domänen der Antikörper zu identifizieren.

4.3.1 Bestimmung des IgG-Subtyps

Für die Bestimmung des **IgG**-Subtyps wird eine aus dem Serum von FS2 aufgereinigte Elution für die Primärfärbung von Substitutionsanalysen des Peptids ‚HYVPEFKGSPAPRV‘ in 16er-Konfiguration verwendet. Nachfolgend werden auf den Arrays gebundene Antikörper durch Sekundäntikörper mit Spezifikationen entsprechend der vier möglichen Subtypen markiert. Das Ergebnis nach der Sekundärfärbung ist in Abbildung 37 dargestellt.

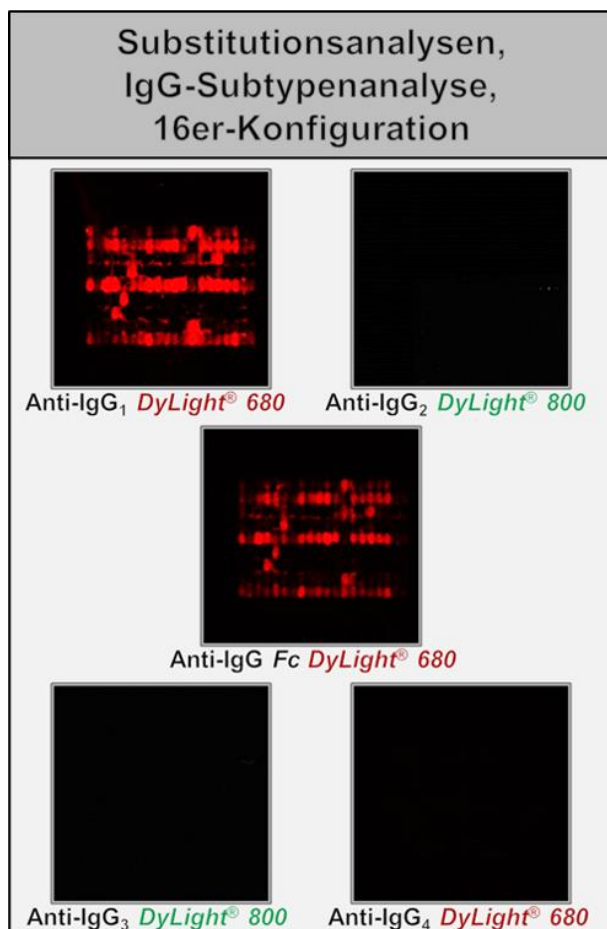


Abbildung 37: Im zentralen Array wird die Sekundärfärbung gegen **IgG** abgebildet. Oberhalb und unterhalb davon sind Sekundärfärbungen gegen spezifische Subtypen von **IgG** dargestellt. Alle Primär- und Sekundärfärbungen werden in einem Verhältnis von 1:1000 durchgeführt. Zur besseren Sichtbarkeit werden sie graphisch verstärkt und in Falschfarben dargestellt.

Das Ergebnis der Subtypenanalyse ist eindeutig, da nur die Sekundärfärbung von Anti-**IgG**₁ *DyLight*[®] 680 ein Signal zeigt. Alle sich in dem Eluat befindlichen **IgG** entsprechen daher dem Subtyp **IgG**₁. Antikörper mit dem Subtyp **IgG**₁ werden hauptsächlich als humorale Antwort auf Membranproteine und lösliche Proteine ausgebildet und werden normalerweise von einem schwächeren Signal der Subtypen **IgG**₃ und **IgG**₄ begleitet ^[1397]. Selbst wenn die restlichen gefärbten Substitutionsanalysen maximal verstärkt werden, ist bei diesen Antikörpern allerdings kein Signal sichtbar. Das bedeutet entweder, dass deren Anteil in dem Gemisch aus Anti-**Emp**-Antikörpern zu gering ist, um nachweisbar zu sein, oder dass der Ursprung des Antikörpers nicht aus einer Immunantwort stammt.

4.3.2 Bestimmung des Isotyps der leichten Kette

Die leichten Ketten eines Antikörpers gehören jeweils einem von zwei verschiedenen Isotypen an. Um nachzuprüfen, ob sich dieser Isotyp in verschiedenen Personen unterscheidet, wird das Serum von neun Testpersonen untersucht. Wie im vorherigen Kapitel werden diese Isotypen über Immunfärbung durch Markierung mit spezifischen Sekundärantikörpern bestimmt. Da die Signalstärke für die Identifizierung nicht ausschlaggebend ist, werden ergänzend zu den Substitutionsanalysen auch günstigere Peptidarrays aus eigener Herstellung verwendet. Diese Peptidarrays besitzen Peptidspots in zwei Reihen. In der oberen Reihe sind jeweils eine Kontrolle für die Epitope von typischen Antikörpern gegen Hämagglutinin und Poliomyelitis aufgetragen. Ein einzelner Peptidspot, welcher das Epitop ‚**HYVPEFKGSPAPRV**‘ enthält, befindet sich in der unteren Reihe. Bei der Immunfärbung werden beide Typen von Arrays gleichbehandelt. Dabei wird auf eine Kontrollfärbung der Hämagglutinin-Kontrollen verzichtet. Alle nach der Sekundärfärbung markierten Arrays sind in Abbildung 38 präsentiert.

Das Ergebnis der Immunfärbungen zeigt, dass alle Anti-**Emp**-Antikörper in den Seren der Testpersonen zwei leichte Ketten des Isotyps κ besitzen. Dieser Isotyp ist in menschlichen Antikörpern durchschnittlich zweimal so häufig vertreten, wie der andere Isotyp ^[51]. Da jedes getestete Serum nur einen Isotyp zeigt, wird ein zufälliger Ursprung des Antikörpers weiter ausgeschlossen. Die Wahrscheinlichkeit, dass der Antikörper aus einer Immunantwort hervorgegangen ist, reduziert sich ebenso, da eine zufällige Generation auch Anti-**Emp** mit dem κ -Isotyp bei einigen Seren hervorbringen hätte müssen. Wenn sich mehrere Antikörper mit ähnlichem Epitop in einem Serum befinden, ist entsprechend der Ergebnisse anzunehmen, dass sie eine große strukturelle Ähnlichkeit besitzen.

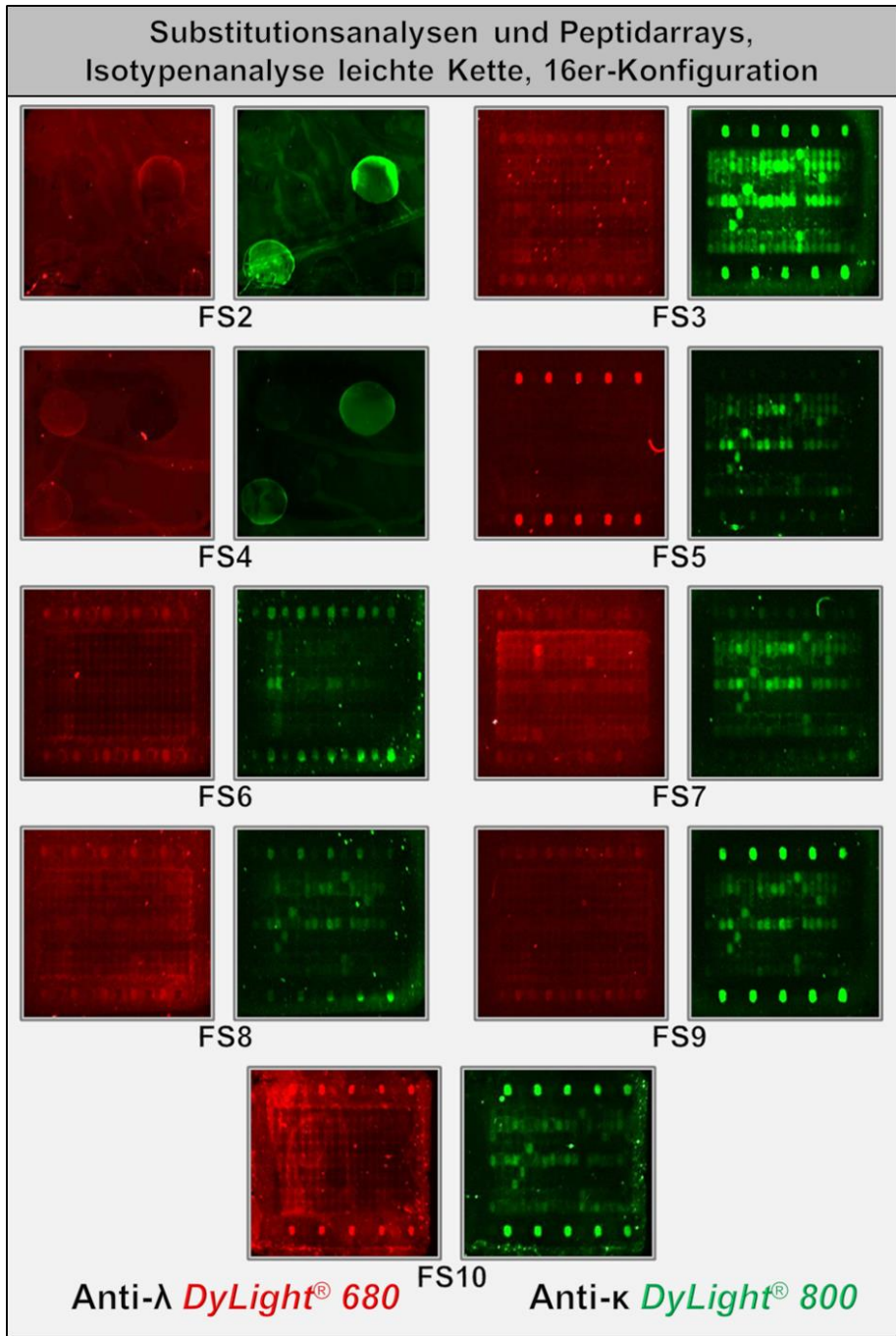


Abbildung 38: Zur Primärfärbung aller Substitutionsanalysen wird das Blutserum einer Testperson im Verhältnis von 1:200 verwendet. Sekundärfärbungen mit Anti-κ *DyLight*[®] 800 werden in einem Verhältnis von 1:1000 und Sekundärfärbungen mit Anti-λ *DyLight*[®] 680 werden in einem Verhältnis von 1:750 durchgeführt. Rot = markierte leichte λ-Ketten; Grün = markierte leichte κ-Ketten. Die Bilder sind in Falschfarben dargestellt und die mit Anti-λ markierten Arrays werden um das 50-fache verstärkt.

4.3.3 Massenspektrometrische Analyse des Anti-Emp-Antikörpers

Für eine genauere Analyse der Antikörperketten, welche dem Anti-Emp-Antikörper zugehörig sind, wird eine reduzierende LDS-PAGE mit einem aus FS2 aufgereinigten Eluat in dreifacher Ausführung durchgeführt. Aus dieser LDS-PAGE werden Gelbanden mit vollständigen (~ 150,0 kDa) und fragmentierten (~ 100,0 bis ~ 125,0 kDa) Anti-Emp-Antikörpern herausgeschnitten. Die Antikörper aus den herausgeschnittenen Gelfragmenten werden extrahiert, enzymatisch verdaut und die resultierenden Peptidfragmente durch MS bestimmt. Den identifizierten Peptiden wird anschließend über das Computerprogramm *PEAKS* die wahrscheinlichste Sequenz eines potentiell zugehörigen Proteins zugeordnet. Zusätzlich werden auch Banden der proteinogenen Verunreinigung bei einem Molekulargewicht von ~28,0 kDa auf dieselbe Art und Weise präpariert. Die LDS-PAGE und die Positionen, an welchen die Fragmente herausgeschnitten wurden, werden in Anlage 3 im Anhang präsentiert.

Über die Summe der identifizierten Peptidfragmente werden mögliche Proteine ermittelt, die sich in dem Eluat befinden könnten. Abhängig von der Menge dieser identifizierten Fragmente und des Anteils der Proteinsequenz, welchen sie abdecken, wird jedem Protein ein Zuverlässigkeitswert zugeordnet. Eine Bestimmung der konstanten Ketten der Antikörper über MS innerhalb der Elution wird in Tabelle 34 dargestellt.

Tabelle 34: Konstante Ketten innerhalb der Elution, welche durch MS bestimmt wurden.

Ergebnisse der MS für die konstanten Ketten von Anti-Emp-Antikörpern		
Isotyp	Zuverlässigkeitswert	Abdeckung in [%]
α_1	51,5	33,0
γ_1	216,0	55,0
γ_2	176,7	58,0
γ_4	127,2	32,0
μ	69,9	18,0
κ	227,3	93,0

Die Identifikation der schweren konstanten Kette zeigt eine klare Dominanz der **IgG₁**-Kette. Hierbei ist zu beachten, dass die Peptidfragmente, welche für diese Identifikation genutzt werden, die Aminosäuresequenz von **IgG₁**, **IgG₂** und **IgG₄** zu ~26,3 % abdecken. Da bis zu 92,1 % der Sequenz dieser drei Isotypen identisch sein kann, entspricht das den Erwartungen. Betrachtet man Peptide, welche nur für die Identifikation einer einzelnen konstanten Kette verwendet werden können, so können 50,3 % der Peptide exklusiv der Sequenz von **IgG₁** und 34,0 % exklusiv der Sequenz von **IgG₂** zugeordnet werden. Für **IgG₄** gibt es kein Peptidfragment, die es exklusiv bestätigt. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass in der

Elution sowohl **IgG₁**, als auch **IgG₂** vorliegen. Ergänzt man die Ergebnisse mit der Identifikation des Subtyps in Kapitel 4.3.1 „**Bestimmung des IgG-Subtyps**“, ist das Signal von **IgG₂** entweder ein Messartefakt, oder eine Verunreinigung, da innerhalb der Immunfärbung kein Signal bei diesem Subtyp zu sehen ist. Das bevorzugte Antigen von Antikörpern, welche diesen Isotypen besitzen, sind Kohlenhydrate^[1398]. Die proteinogene Natur von **Emp** macht es deshalb unwahrscheinlich, dass es sich bei diesem Peptidfragment um Bruchstücke eines gegen **Emp** gerichteten Antikörpers handelt. In der Elution sind während der MS ebenso Peptide zu finden, welche eindeutig als Fragmente von **IgA₁** und **IgM** identifiziert werden können. Diese Informationen ermöglichen es, den Subtyp der schweren Kette von Anti-**Emp-IgA** zuzuordnen und zeigen, dass durch die Affinitätschromatographie auch **IgM** aufgereinigt wurde. Es gibt allerdings keinen Beweis dafür, dass **IgM** spezifisch auf das Epitop von **Emp** bindet. Ebenso zeigen sich, wie schon in Kapitel 4.3.2 „**Bestimmung des Isotyps der leichten Kette**“, eine große Zahl von Fragmenten, welche den Isotyp κ der leichten Ketten bestätigen.

Die Identifikation der variablen Ketten erweist sich als komplizierter, da hier einige Peptide gefunden wurden, welche einer großen Anzahl an möglichen Antikörperketten zugeordnet werden können. Da diese Ketten hypervariable Regionen besitzen, werden die Peptidfragmente den bekannten, konservierten Domänen zugeteilt. Hierbei werden die Ketten sowohl einer Genfamilie, als auch dem zugehörigen Gen in dieser Familie zugeordnet. Peptide, welche zur Identifikation von variablen schweren Ketten genutzt werden, sind in Tabelle 35 dargestellt. In der Tabelle werden die einzelnen Peptide und nicht die Summe aller Peptide, welche ein Protein identifizieren, betrachtet. Aus diesem Grund unterscheiden sich die Zuverlässigkeitswerte gegenüber den Werten aus Tabelle 34.

Entsprechend der Ergebnisse aus den Kapiteln 4.1.1 „**Analyse des Antikörper-Fingerabdrucks**“ und 4.3.2 „**Bestimmung des Isotyps der leichten Kette**“ wird eine große strukturelle Ähnlichkeit der Anti-**Emp**-Antikörper erwartet. Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass eine einzige Keimbahnlinie für die Produktion des Antikörpers verantwortlich ist. In diesem Fall sollte ein eindeutiges Signal sichtbar sein. Tatsächlich zeigen die Peptidfragmente aber Hinweise auf zwei verschiedene Keimbahnlinsen. Da sich in der Elution nicht nur **IgG**, sondern auch nachweisbare Mengen an **IgM** und **IgA₁** befinden, ist es möglich, dass diese Antikörperklassen von weiteren Keimbahnlinsen sezerniert werden. Die schweren variablen Ketten, welche mit einer größeren Zuverlässigkeit bestimmt werden können, sind 3-7, 3-48 und 3OR16-9. Alle diese Antikörperketten werden durch die Peptidfragmente 1, 4 und 8 identifiziert. Das Peptidfragment 7 indiziert, dass die schwere variable Kette 3-48 der tatsächlichen variablen Kette im Anti-**Emp**-Antikörper entspricht. Dieses zusätzliche Indiz hat aber nur eine geringe Zuverlässigkeit. Als zweite Antikörperkette mit einer geringeren

Zuverlässigkeit werden in den Peptidfragmenten 2, 3, und 5 die schweren variablen Ketten 3-15 und 3-21 identifiziert. Hierbei kann zusätzlich Peptidfragment 6 nur für die Identifikation von 3-15 verwendet werden. Das spricht dafür, dass diese die schwere variable Kette in dem zweiten Antikörper ist. Die beiden Treffer für die schweren Ketten, 3-15 und 3-48, haben in ihrer Aminosäuresequenz nur eine Übereinstimmung von 77,8 % und sind daher deutlich voneinander zu unterscheiden. Da eine zweite, schwere variable Kette identifiziert werden kann, ist anzunehmen, dass auch eine zweite Keimzelllinie in der Produktion von Anti-**Emp**-Antikörpern involviert ist. Die schwere Kette mit der besseren Zuverlässigkeit assoziiert sich hierbei höchstwahrscheinlich mit der Antikörperklasse **IgG**, da diese in der Elution dominant ist. Es kann nicht definiert werden, ob die schwere Kette mit der niedrigeren Zuverlässigkeit von **IgG**, **IgA** oder **IgM** stammt. Da sich gemäß Kapitel 4.2.1.2 „**Bestimmung der Antikörperfunktion und Ausbeute**“ die aufgereinigten Antikörper nicht wesentlich in der Affinität von dem Serum von FS2 unterscheiden, ist es am wahrscheinlichsten, dass die zweite schwere variable Kette einer anderen Antikörperklasse als **IgG** zugehörig ist. Für diese Vermutung spricht auch, dass sich die Konsensussequenz von Anti-**Emp-IgA** und **IgG** entsprechend Kapitel 4.1.2 „**Konsensussequenz des Anti-Emp-Epitops**“ unterscheidet. Es ist daher anzunehmen, dass sich auch die variable Domäne der beiden Antikörpertypen unterscheidet.

Tabelle 35: Ergebnis der Analyse über MS für die schwere variable Kette. 3-48 ist in Rot und 3-15 in Grün hervorgehoben.

Ergebnisse der MS für die variablen schweren Ketten von Anti-Emp-Antikörpern			
Peptidfragment Nr.	mögliche Ketten als [Genfamilie-Gen]	Zuverlässigkeitswert	Abdeckung in [%]
1	3-7; 3-13; 3-16; 3-23; 3-35; 3-48 ; 3-64D; 3-72; 3-74; 3OR15-7; 3OR16-8; 3OR16-9; 3OR16-13	6291,0	16,0
2	3-15 ; 3-21	5360,0	16,0
3	3-15 ; 3-21	4760,0	10,9
4	3-7; 3-13; 3-21; 3-48 ; 3-72; 3OR16-9	2039,0	5,9
5	3-15 ; 3-21	1846,0	13,4
6	3-15 ; 3-35	1137,0	10,1
7	3-48	1081,0	41,6
8	3-7; 3-13; 3-21; 3-48 ; 3OR16-9	1070,0	9,4

Nach der Identifikation der schweren variablen Kette wird die leichte variable Kette auf dieselbe Art und Weise identifiziert. Alle Peptidfragmente und die entsprechend identifizierten leichten variablen Antikörperketten sind in Tabelle 36 dargestellt.

Tabelle 36: Variable leichte Ketten innerhalb der Elution, welche durch MS bestimmt wurden.

Ergebnisse der MS für die variablen leichten Ketten von Anti-Emp-Antikörpern			
Peptidfragment Nr.	mögliche Ketten in [Genfamilie-Gen]	Zuverlässigkeitswert	Abdeckung in [%]
1	2-28; 2D-28	7921,0	20,2
2	3D-20	7389,0	15,1
3	2-28; 2D-28; 2-29; 2-40; 2D-40	5495,0	10,9
4	4-1	4757,0	15,1
5	2-28; 2D-28; 2-29; 2-40; 2D-40	4643,0	10,9
6	2-29	4353,0	20,2
7	2-28; 2D-28; 2-40; 2D-40	4322,0	20,2
8	2-28; 2D-28	3952,0	7,6
9	2-28; 2D-28	3930	10,1
10	3D-20	3853,0	9,2
11	3D-20	3680,0	13,5
12	2-28; 2D-28; 2-29; 2-40; 2D-40	3646,0	11,8
13	2-28; 2D-28; 2-29; 2-40; 2D-40	2845,0	8,4
14	4-1	2396,0	14,3
15	2-28; 2D-28; 2-40; 2D-40	2316,0	12,6
16	2-28; 2D-28; 2-29; 2-40; 2D-40	2040,0	5,9
17	2-28; 2D-28; 2-40; 2D-40	1908,0	6,7
18	2-28; 2D-28; 2-29; 2-40; 2D-40	1398,0	7,6
19	4-1	1240,0	6,7

Die Peptidfragmente, welche den leichten variablen Ketten zugeordnet werden können, weisen auf insgesamt fünf Treffer hin, von welchen vier klar unterscheidbar sind. Bei den zuverlässigsten Treffern handelt es sich um die Gene 2D-28 und 2-28, deren

Aminosäuresequenzen sich nicht unterscheiden, weshalb sie als ein Treffer behandelt werden. Weitere Treffer mit einer hohen Zuverlässigkeit sind 2-29, 2D-40, 2-40, 3D-20 und 4-1. Die Aminosäuresequenz von 2D-40 und 2-40 sind identisch, wodurch die beiden Gene ebenfalls als ein einziger Treffer zählen. Zwischen den Aminosäuresequenzen dieser vier Treffer gibt es erhebliche Unterschiede, sodass die Anzahl der Treffer nicht durch Messungenauigkeiten begründet werden kann. Es ist wahrscheinlich, dass diese Ketten aus Antikörpern stammen, welche von jeweils unterschiedlichen B-Zellen produziert wurden. Wie auch bei der schweren variablen Kette ist es möglich, dass eine andere Antikörperklasse auch eine andere leichte variable Kette besitzt. Über die Messdaten können diese Ketten aber nicht zugeordnet werden. Werden die Ketten gemäß der Prädominanz der entsprechenden Antikörpertypen in der Elution zugeordnet, verfügt **IgG** über 2-28, **IgA** über 4-1 und **IgM** über 3-20/3D-20. Da es einen Treffer mehr als identifizierte Antikörpertypen gibt, müssten die Antikörper von einer Antikörperklasse durch zwei unterscheidbare B-Zellen produziert werden. Eine weitere Möglichkeit ist es, dass sich in der Elution weitere, unspezifische Antikörper befinden, welche das Ergebnis beeinflussen können. Damit diese aber in der MS als relevante Treffer erkennbar sind, müssten sie in einer nachweisbaren Konzentration vorliegen. Da γ_2 als zusätzlicher Isotyp bei der Identifizierung der schweren Ketten gefunden wurde, ist es möglich, dass ein vierter Treffer dieser Antikörperkette zugeordnet werden kann.

Über die Zusammenfassung der gesammelten Informationen lässt sich die wahrscheinlichste Zusammensetzung des Anti-**Emp-IgG** einschätzen. Entsprechend sollte er über zwei leichte Ketten des Isotyps κ , mit den variablen Ketten 2-28 verfügen. Die schweren Ketten dieses Antikörpers werden höchstwahrscheinlich durch den γ_1 -Isotyp und die variablen Ketten 3-48 definiert.

Das Gelfragment mit der proteinogenen Verunreinigung bei einem Molekulargewicht von ~ 28,0 kDa weist hauptsächlich Peptidfragmente auf, welche leichte Ketten des κ -Isotyp, menschliches Apolipoprotein A1 (**ApoA1**) und die leichte variable Kette 2-28 identifizieren. Dies bestätigt 2-28 als wahrscheinlichste leichte Kette für Anti-**Emp-IgG** und identifiziert gleichzeitig **ApoA1** als proteinogene Verunreinigung. Das tatsächliche Molekulargewicht von **ApoA1** stimmt hierbei mit dem geschätzten Molekulargewicht der Verunreinigung in der LDS-PAGE überein. Mit Rückblick auf die gewonnenen Daten aus den anderen beiden Gelfragmenten zeigt sich auch dort **ApoA1** mit einer Abdeckung von 80,0 % als Treffer mit der zweitgrößten Zuverlässigkeit. Dies kann bedeuten, dass **ApoA1** im nicht-reduzierten Zustand eine große Affinität zu dem Antikörper oder dem Epitop besitzt und die Wechselwirkungen so groß sind, dass sie den Wirkungen einer LDS-PAGE trotzen.

4.4 Überprüfung der Antikörper-Antigen-Interaktion *in vitro*

Das Gemisch aus Anti-**Emp**-Antikörpern ist mit Hilfe von Peptiden aus den Spenderseren aufgereinigt worden, welche das Epitop der Antikörper in der Aminosäuresequenz enthalten. Für dieses Antikörpergemisch muss aus diesem Grund noch der eindeutige Beweis erbracht werden, dass es auch eine Affinität gegenüber seinem natürlichen vorkommenden Epitop zeigt. Folgend werden die aufgereinigten Antikörper in der Primärfärbung gegen Proteinextrakte verschiedener Stämme von *Staphylococcus aureus* eingesetzt und diese in einem *Western Blot* markiert. Als Positivkontrolle in diesen *Western Blots* wird rekombinant in *Escherichia coli* produziertes **Emp** von *Staphylococcus aureus* USA300 mit einer Reinheit von mehr als 85,0 % eingesetzt. Als optimale Negativkontrolle wäre eine *emp*-Deletionsmutante des im *Western Blot* geprüften Wildtyps wünschenswert. Eine solche Mutante ist aber nicht verfügbar. Stattdessen werden als Kontrolle drei Stämme von *Staphylococcus aureus* verwendet (168L, 282L und KE2775), deren Epitop des Anti-**Emp**-Antikörpers eine alternative Aminosäuresequenz enthalten. Das Epitop ‚**HVVPEFQGIPAPRV**‘ (**Emp_A**) dieser Stämme unterscheidet sich an der zweiten, siebten und neunten Position von **Emp**. Die letzte dieser Positionen ist für die Interaktion zwischen dem Antikörper und seinem Epitop essenziell. Isoleucin wird nur in sehr seltenen Fällen als Substitution an dieser Position von Anti-**Emp** toleriert. In den folgenden Färbungen wird ausschließlich ein Gemisch aus Anti-**Emp**-Antikörpern verwendet, welches aus dem Blutserum von FS2 aufgereinigt wurde. Für das Serum wird entsprechend einer Substitutionsanalyse nur eine Signalstärke erwartet, welche bei dieser Substitution 6,6 % der Signalstärke des originalen Epitops entspricht. Dementsprechend sollte das **Emp_A** der drei für die Negativkontrolle ausgewählten Bakterienstämme vergleichsweise deutlich schwächer oder gar nicht von Anti-**Emp** markiert werden, als **Emp**. Als zusätzliche Kontrolle wird der Gram-positive Modellorganismus *Bacillus subtilis* (*B. sub.*) eingesetzt, um eventuell unspezifische Markierungen des Sekundärantikörpers gegen Gram-positive Bakterien aufzudecken. Als Probanden für den tatsächlichen Nachweis der Affinität der Anti-**Emp**-Antikörper werden drei Bakterienstämme verwendet (101L, *ATCC*[®] 25904[™] und USA300), welche **Emp** mit dem Epitop ‚**HVYPEFKGSPAPRV**‘ exprimieren. Von zweien dieser Stämme ist eine Evaluierung der individuellen Virulenz bekannt. Der Bakterienstamm USA300 ist einer der Stämme von *Staphylococcus aureus*, welcher die größte Virulenz besitzen ^[1088]. *ATCC*[®] 25904[™], welcher auch als Newman D2C bekannt ist, besitzt eine Punktmutation in *saeR*, welche eine Komponente des Regulators *sae* ist ^[1399]. Diese Punktmutation beeinträchtigt die Funktion des Regulators, sodass eine Vielzahl von virulenten Proteinen von dem Bakterienstamm nicht oder deutlich weniger stark exprimiert werden. Aus diesem Grund ist dieser Bakterienstamm in seiner Virulenz stark eingeschränkt.

4.4.1 LDS-PAGE und *Western Blot*

Da **Emp** in der Regel von den *Staphylokokken* erst in einem fortgeschrittenen Proliferationsstadium produziert wird^[609] werden alle Bakterien erst zu Lysaten prozessiert, wenn sie die stationäre Phase erreicht haben. Die Lysate enthalten eine größere Anzahl an unterschiedlichen Proteinen, welche bis zu diesem Zeitpunkt von den Bakterien produziert wurden. In ihnen sind hauptsächlich intra- und extrazelluläre Proteine enthalten. Sezernierte Proteine, welche anschließend nicht an der Zellwand befestigt werden, werden während der Verarbeitung abgeschieden. Für jedes Bakterienlysate wird zunächst eine reduzierende LDS-PAGE durchgeführt und die nach Größe aufgetrennten Proteine im Gel mit *Coomassie*[®]-Brillant-Blau eingefärbt. Das Ergebnis dieser Färbung ist in Abbildung 39 dargestellt und ermöglicht eine grobe Darstellung der Proteinvielfalt innerhalb der Lysate. Auf der Höhe der ~ 38,0 kDa Markierung sammelt sich eine große Menge an Proteinbanden, die als mögliches **Emp** identifiziert werden können (gelbes Rechteck). Das rekombinante Protein selbst zeigt insgesamt zwei Banden. In der ersten Bande haben sich Proteine mit einem größeren Molekulargewicht gesammelt. Die Reinheit des Proteins ist mindestens 85,0 % und somit relativ niedrig. Proteine innerhalb der ersten Bande stammen deshalb höchstwahrscheinlich aus dem Erzeugerorganismus des rekombinanten Proteins. Möglich ist es auch, dass es ein Dimer des **Emp** ist^[610], welches sich aufgrund der hohen Proteinkonzentration entwickelt und den Bedingungen der LDS-PAGE und der Reduzierung widerstanden hat. Die zweite und größere Bande sollte **Emp** als Monomer entsprechen, zeigt aber ein größeres Molekulargewicht als erwartet. Nach Herstellerangaben besitzt das rekombinante **Emp** einen Protein-*Tag*, welcher die Aufreinigung des Proteins nach der Expression erleichtert. Dieser *Tag* erhöht das Molekulargewicht des Proteins und kann für die unerwartete Verschiebung verantwortlich sein. Alle Lysate der *Staphylokokken* zeigen eine ähnliche Anzahl von Banden und Molekulargewichten, an welchen sich diese aufgetrennt haben. Das Bakterienlysate von *Bacillus subtilis* unterscheidet sich stark von diesen Banden und zeigt eine kohärente konturlose Menge an Proteinen, welche sich über die gesamte Länge des Gels verteilt. Auch wenn beide Bakterienarten dieselben Körperregionen besiedeln können^[1338], unterscheiden sich ihre Proteinzusammensetzung beträchtlich.

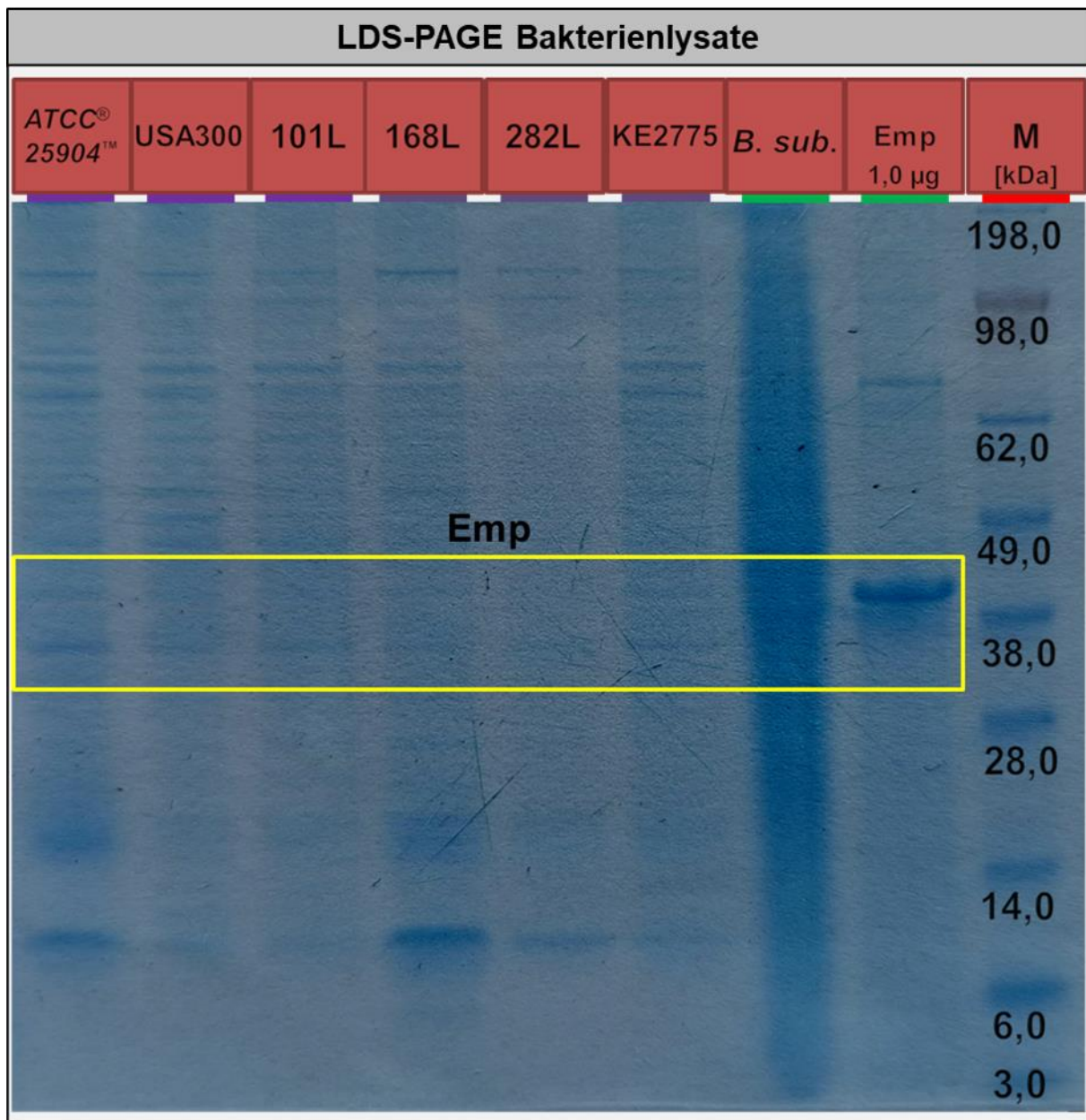


Abbildung 39: Von jedem Lysat wird 9,0 µl in eine Geltasche gefüllt. Zusätzlich zu den Proben werden 1,0 µg **Emp** und ein Marker für Proteingrößen als Maßstab für das Molekulargewicht beigelegt. Die Helligkeit und der Kontrast des Bildes sind optimiert.

Da das Signal des **IgA** in Serum und Eluaten von FS2 nur sehr schwach nachzuweisen ist, werden die Bakterienlysate im *Western Blot* nach der Primärfärbung nur gegen **IgG** eingefärbt. Ein Problem, welches sich bei der Durchführung des *Western Blots* ergeben wird, sind die von *Staphylokokken* exprimierten Immunglobulin-bindenden Proteine. Bevor die Ergebnisse des *Western Blots* feststehen, ist noch unbekannt, inwiefern die Funktionsfähigkeit dieser Proteine durch die LDS-PAGE beeinträchtigt wird. Diese Proteine können sowohl den Primär- als auch den Sekundärantikörper binden und so in der Markierung zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Bekannte Immunglobulin-bindende Proteine haben allerdings eine von der **Emp** leicht zu unterscheidende Molekularmasse, wodurch sie als solche identifiziert werden können. **Sbi**

hat ein Molekulargewicht von ~ 50,0 kDa^[1400] und bei einer Einflussnahme wird mit einer Bande auf der entsprechenden Höhe gerechnet. Die Größe von **SpA** hat in Abhängigkeit des Bakterienstammes eine Bandbreite an möglichen Größen zwischen ~ 40,0 und ~ 60,0 kDa^[1401,1402]. Mit seinen fünf Immunglobulin-bindenden Domänen hat es von den Proteinen dieser Kategorie die größte Kapazität dafür, Antikörper zu binden^[1403]. Bei dem Bakterienstamm *ATCC*[®] 25904[™] ist für **SpA** eine Größe von ~ 55,6 kDa bekannt. Mit einer solcher Größe liegt es knapp oberhalb von **Sbi**. Je nach Signalstärke und Trennschärfe könnten sich die falsch-positiven Signale dieser beiden Proteine überlappen. Zuletzt hat auch **SSL10** die Möglichkeit, Antikörper zu binden und falsche Signale zu verursachen. Für *ATCC*[®] 25904[™] liegt die Größe mit ~ 26,1 kDa^[611] unterhalb des Molekulargewichtes von **Emp**.

In *Western Blots* wird das Volumen der als Proben eingesetzten Bakterienlysate auf 5,0 µl reduziert. Die Aufnahmen werden wie in vorherigen Kapiteln in Falschfarben dargestellt. Der *Western Blot* ist in Abbildung 40 beschrieben. Mit dem Gelanalysewerkzeug von *ImageJ*^[1394] werden Intensitäts-Blots von jeder Probe und **Emp** angefertigt und das Integral jedes relevanten Peaks in diesen Intensitäts-Blots bestimmt. Die Intensitäts-Blots sind in Abbildung 41 dargestellt und die Flächenbestimmung wird in Tabelle 37 aufgelistet.

Die markierten Banden im *Western Blot* zeigen, dass die Immunglobulin-bindenden Proteine trotz LDS und Reduktionsmittel weiterhin ihre Funktion erfüllen. Es sind Banden auf der Höhe von allen drei Proteinen zu finden. Alle Bakterienlysate, bis auf das von 101L und *Bacillus subtilis*, haben eine Bande auf einer Höhe von ~ 50,0 kDa. Diese entspricht höchstwahrscheinlich **Sbi**. Die Größe dieser Banden erschwert es, eine eindeutig abgegrenzte Bande von **SpA** zu erkennen. Lediglich die Bande bei ~ 60,0 kDa aus dem Lysat von 101L zeigt eine eindeutig abgrenzbare Markierung, welche **SpA** entsprechen könnte. Alle falsch-positiven Signale, welche von **SpA** und **Sbi** stammen können, werden mit einem grauen Rechteck markiert. Des Weiteren haben alle Lysate eine markierte Bande auf einer Höhe, an welche **SSL10** erwartet werden kann. Diese werden in einem roten Rechteck eingegrenzt. KE2775 zeigt eine sehr große Bandengröße und Signalstärke bei den falsch-positiven Markierungen, was impliziert, dass dieser *Staphylococcus* eine deutlich stärkere Expression von Immunglobulin-bindenden Protein als die anderen Bakterienstämme besitzt. Das rekombinante **Emp** zeigt insgesamt drei Banden, welche durch die Sekundärfärbung eingefärbt werden. Die beiden größeren Banden ergänzen die Beobachtung aus der *Coomassie*[®]-Brillant-Blau-Färbung aus Abbildung 39. Tatsächlich wird die obere Bande durch den Primärantikörper markiert, was die Theorie unterstützt, dass es sich hierbei um ein Dimer des **Emp** handelt. In der untersten markierten Bande des rekombinanten Proteins befindet sich möglicherweise eine fehlgefaltete oder trunkierte Variante des Proteins, welche während

des Extraktionsprozesses beim Hersteller erzeugt wird. Alle Bakterienlysate, welche gemäß den Erwartungen **Emp** enthalten sollten, zeigen eine Bande, welche sich ungefähr auf der Höhe der Bande in der Positivkontrolle befindet. Die Bande der Kontrolle ist etwas höher als in den Lysaten, was der Zunahme des Molekulargewichts aufgrund des Protein-Tags entspricht. Bakterienstämme, welche **Emp_A** anstatt **Emp** exprimieren, zeigen bei dem erwarteten Molekulargewicht keine Bande. Positionen, an denen eine markierte Proteinbande von **Emp** und **Emp_A** als Monomer erwartet werden, sind durch ein hellblaues Rechteck eingegrenzt. Das Lysat von *Bacillus subtilis* zeigt keine markierte Bande. Insgesamt entspricht das Ergebnis des *Western Blots* den Erwartungen.

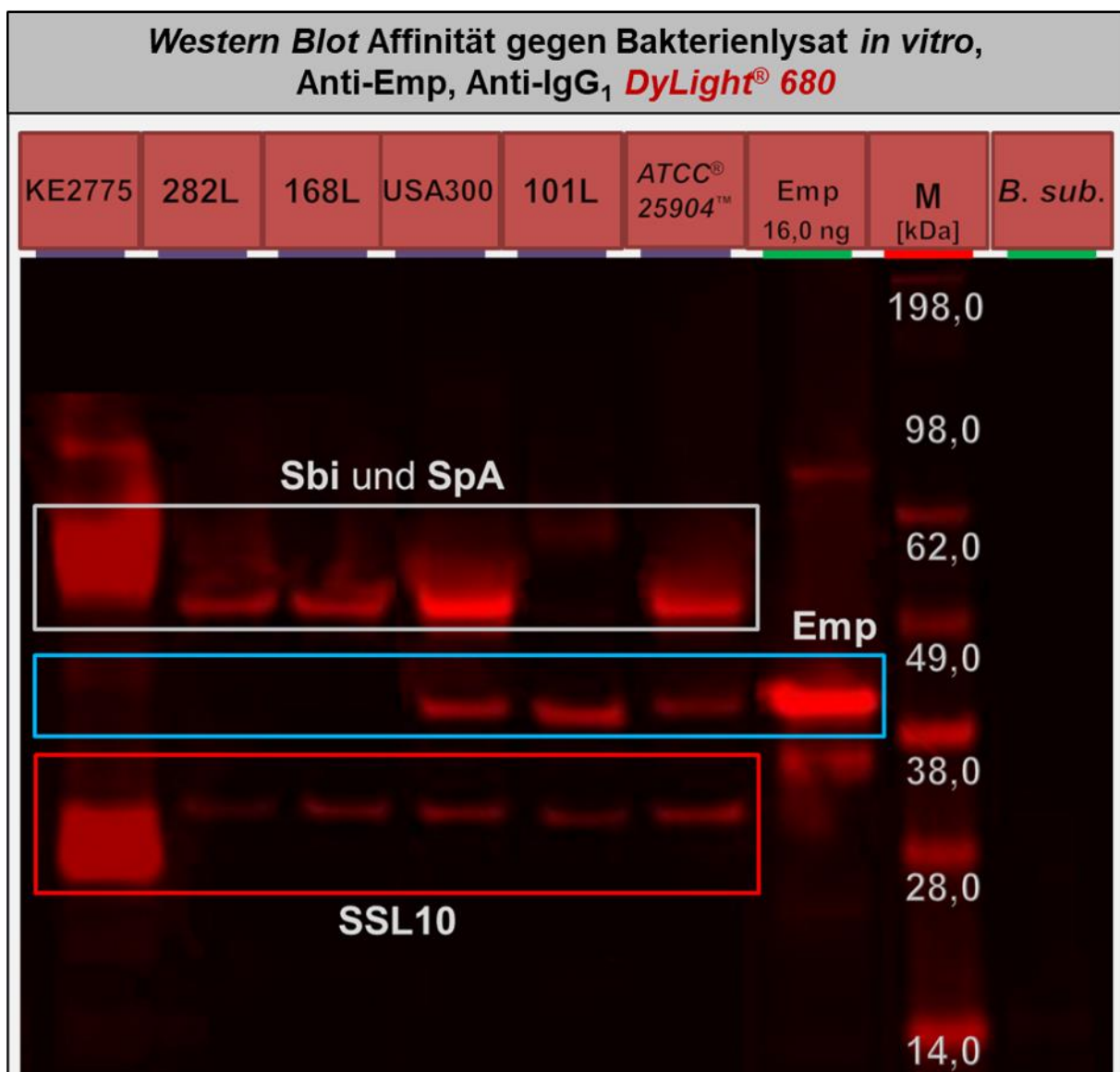


Abbildung 40: Zusätzlich zu den Proben wird **Emp** mit einer Menge von 16,0 ng und ein Marker für Proteingrößen aufgetragen. Zur Immunfärbung werden die Proben im Verhältnis von 1:500 mit Anti-**Emp** und in einem Verhältnis von 1:5000 mit Sekundärantikörpern gegen **IgG₁** eingefärbt. Kontrast und Helligkeit des *Western Blots* sind um das Zehnfache verstärkt.

Auffällig ist, dass sowohl die Banden von **Emp**, als auch die von **SSL10**, an einer höheren Position gefunden werden, als entsprechend ihrem Molekulargewicht zu erwarten wäre. Möglicherweise werden die Bakterienlysate aufgrund der großen Proteinmenge in der Probe in ihrer Auftrennung behindert, sodass die tatsächlich Proteingröße verzerrt wird. Nichtsdestotrotz lassen sich alle markierten Proteinbanden zuordnen.

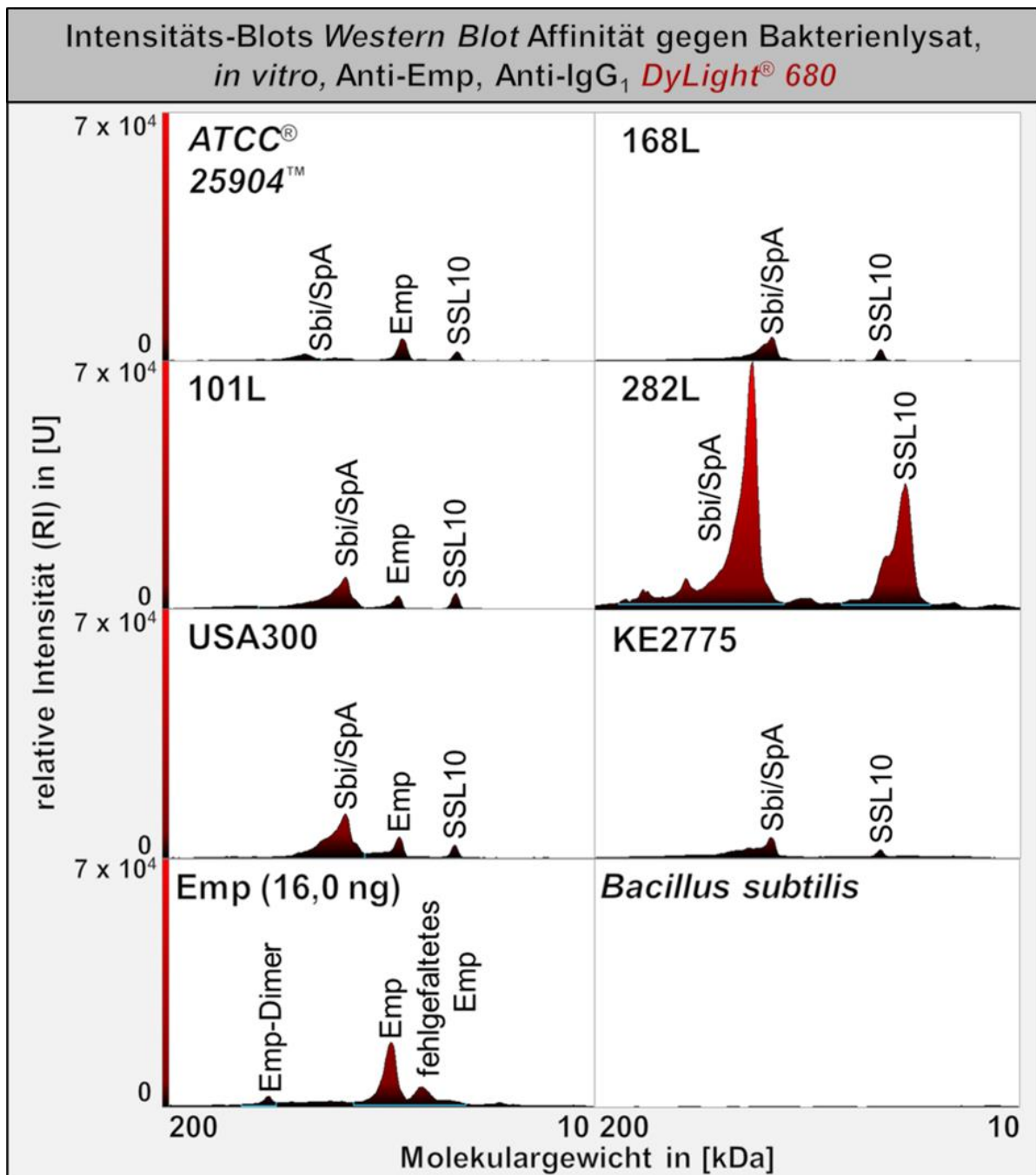


Abbildung 41: Zusammenfassung der Banden des *Western Blots* aus der Abbildung 38. Die Markierungen der Peaks wurden aus dieser Abbildung übernommen. Die Abgrenzung für jeden Peak wird gleich gehalten, damit ein Vergleich zwischen den Proben möglich ist. Bei Peaks mit größerem Hintergrundrauschen wird die Abgrenzung mit einer blauen Linie hervorgehoben. Der Peak von **Sbi** und **SpA** sowie von **Emp** und fehlgefaltetem **Emp**, werden jeweils als eine Fläche zusammengefasst.

Tabelle 37: Die relativen Flächen der Peaks aus den Intensitäts-Blots der Proben des *Western Blots* in Abbildung 41, im Vergleich zum größten Peak des jeweiligen Molekulargewichts. Die Probe von *Bacillus subtilis* wird ignoriert, da der Intensitäts-Blot keine Peaks erzeugt. Die Fläche des Peaks, welche das vermutete **Emp**-Dimer enthält, wird nicht in der Tabelle aufgeführt.

Vergleich der Peakflächen zwischen markierten Proteinbanden eines <i>Western Blots</i>			
Probe	Sbi/SpA	Emp	SSL10
größte Fläche	282L	Emp (16,0 ng)	282L
<i>ATCC</i> [®] 25904 [™]	2,9 %	17,9 %	2,8 %
101L	17,2 %	17,1 %	6,4 %
USA300	20,9 %	24,8 %	4,0 %
168L	11,0 %	-	3,2 %
282L	100,0 %	-	100,0 %
KE2775	13,3 %	-	10,1 %
Emp (16,0 ng)	-	100,0 %	-

Für den Bakterienstamm *ATCC*[®] 25904[™] wird bei allen Immunglobulin-bindenden Proteine die kleinste Fläche berechnet. Da dieser Stamm eine supprimierte Virulenz besitzt, ist die reduzierte Expression von Proteinen, welche an der Immunevasion beteiligt sind, sinnig. Vergleichsweise zeigt USA300 eine deutlich größere Fläche bei den Peaks dieser Proteine. Die mit Abstand größte Fläche der Peaks von **Sbi**, **SpA** und **SSL10** wird für 282L errechnet. Dieser Bakterienstamm kann durch seine Proteine eine große Menge an Antikörpern spezifisch binden und somit starke, falsch-positive Banden erzeugen. Bei Peaks der Banden von **Emp** zeigen 101L und *ATCC*[®] 25904[™] eine ähnlich große Fläche und USA300 eine etwas größere Fläche als die anderen beiden Bakterienstämme. Im Vergleich zur Positivkontrolle schaffen die Peaks es auf ein Sechstel, beziehungsweise einem Viertel der Fläche. Für **Emp_A** werden keine sichtbaren Banden und deshalb auch keine Peaks ermittelt. Die Fläche des Peaks für das vermutete **Emp**-Dimer entspricht 8,3 % der Fläche der Peaks des restlichen **Emp**.

Die Ergebnisse des *Western Blots* zeigen, dass das aus dem Serum von FS2 isolierte Gemisch aus Anti-**Emp**-Antikörpern das Protein des Wildtyps in allen drei Fällen erfolgreich markieren kann. Diese Markierung misslingt ebenso dreimal in Lysaten, welche **Emp_A** enthalten. Weiter fällt auf, dass Immunglobulin-bindende Proteine auch im reduzierten und denaturierten Zustand weiterhin ihre Funktion erfüllen. Durch die falsch-positiven Markierungen, welche von diesen Proteinen erzeugt werden, ist die Qualität der Ergebnisse beeinträchtigt. Zudem ist es für nachfolgende Experimente wichtig, dass die Wirkung dieser Immunglobulin-bindenden Proteine auf ein Minimum begrenzt wird. Es werden deshalb Maßnahmen ergriffen, um den störenden Einfluss zu unterdrücken.

4.4.2 Reduktion der Wirkung von Immunglobulin-bindende Proteinen

4.4.2.1 Einsatz von alternativem Sekundärantikörper

Die Intensität der durch **Sbi**, **SpA** und **SSL10** bedingten falsch-positiven Markierungen in der Sekundärfärbung können durch einen Wechsel des Sekundärantikörpers reduziert werden. Über **SpA** ist bekannt, dass die Affinität gegenüber Immunglobulinen von der Art des Spenderorganismus abhängig ist^[811]. Während diese Information für die beiden anderen Proteine noch nicht bekannt ist, sollte sich dies aber aufgrund der Wirtsspezifität von *Staphylococcus aureus* ähnlich verhalten, auch wenn sich die individuelle Affinität wahrscheinlich unterscheidet. Durch einen Wechsel des Sekundärantikörpers kann so zumindest gewährleistet werden, dass die Affinität des Proteins mit dem größten Bindungspotential gegenüber **IgG** unterdrückt wird. Der bisherig verwendete Antikörper Anti-**IgG**₁ *DyLight*[®] 680 hat einen murinen Ursprung. **SpA** zeigt gegenüber **IgG** von Mäusen eine normale bis starke Affinität^[811]. Als Alternative hierzu ist die Verwendung eines Sekundärantikörpers, welcher in einer Ziege erzeugt wurde, eine deutliche Verbesserung, denn diese können nicht mit einer ähnlichen Effizienz von **SpA** gebunden werden^[824]. Für die Sekundärfärbung in den folgenden *Western Blots* wird deshalb der Antikörper Anti-**IgG** *Fc DyLight*[®] 680 aus dem verfügbaren Repertoire gewählt, welcher diese Anforderung erfüllt. Ein zusätzlich positiver Effekt ist, dass dieser Antikörper die *Fc*-Region von menschlichen Antikörpern bindet. An dieser Region werden die Immunglobuline von **SpA** vorzugsweise gebunden^[304], wodurch immobilisierte Primärantikörper nicht mehr durch den Sekundärantikörper erkannt werden und deshalb kein falsches Signal erzeugen sollten. Der *Western Blot* wird mit dem alternativen Sekundärantikörper wiederholt und ist in Abbildung 42 dargestellt. Zusätzlich zu dem *Western Blot* werden Kontrollen integriert, welche in der Immunfärbung nur mit dem Sekundärantikörper eingefärbt werden. Diese Kontrollen umfassen **Emp**, das Lysat von *Bacillus subtilis* sowie jeweils ein Lysat eines *Staphylococcus*, welcher entweder **Emp** oder **Emp_A** exprimiert. Während der LDS-PAGE laufen diese Kontrollen parallel zu den eigentlichen Proben, werden aber nach der Übertragung auf die PVDF-Membran von diesen abgetrennt und in separaten Gefäßen eingefärbt. Die Markierungen in diesen Kontrollen sind in Abbildung 43 gezeigt und geben eine Information darüber, wie stark der Sekundärantikörper selbst von den Immunglobulin-bindenden Proteinen beeinflusst wird. Da sowohl die Proben, als auch die zusätzlichen Kontrollen dieselbe LDS-PAGE durchlaufen und auf dieselbe PVDF-Membran übertragen wurden, lassen sich die Intensitäts-Blots der Kontrollen mit denen der Proben vergleichen. Diese sind in gemeinsamer Darstellung in Abbildung 44 abgebildet. Das Ergebnis der Flächenberechnung dieser Intensitäts-Blots ist in Tabelle 38 aufgelistet.

Der zweite *Western Blot* zeigt, dass der Wechsel zu einem anderen Sekundärantikörper nicht die gewünschte Wirkung hatte. Es sind weiterhin deutliche Banden der Immunglobulinbindenden Proteine zu erkennen. Zusätzlich ist eine weitere, schwach erkennbare, Bande eines unbekannt Proteins mit einem Molekulargewicht zwischen ~ 14,0 und 28,0 kDa sichtbar. Die Positionen, an welchen dieses Protein zu erwarten sind, werden mit einem gelben Rechteck markiert.

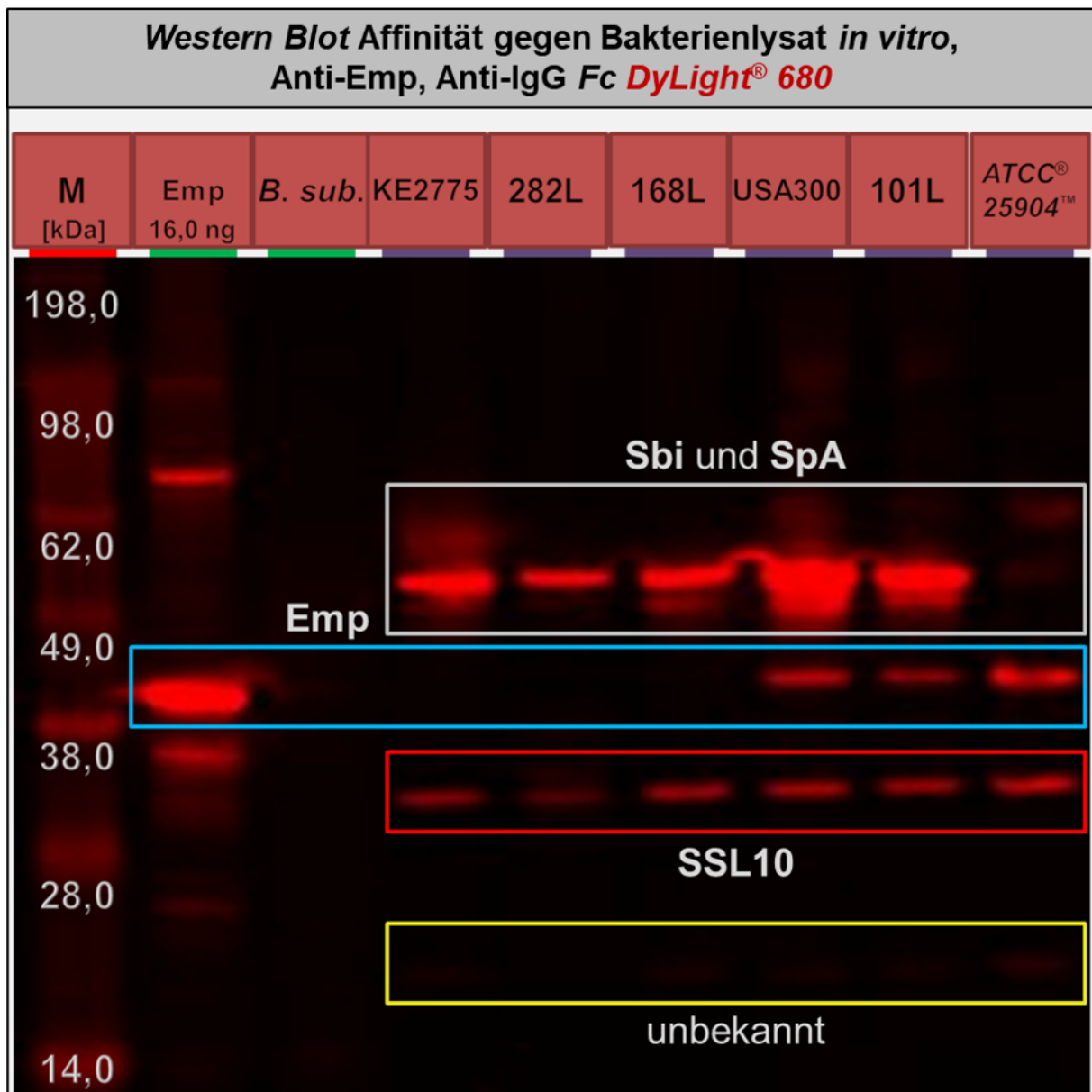


Abbildung 42: Zusätzlich zu den Proben wird **Emp** mit einer Menge von 16,0 ng und ein Marker für Proteingrößen aufgetragen. Nach der Übertragung auf eine Membran aus PVDF werden die Proben in einem Verhältnis von 1:500 mit Anti-**Emp** und in einem Verhältnis von 1:5000 mit Sekundärantikörpern gegen die *Fc*-Region von **IgG** eingefärbt. Kontrast und Helligkeit des *Western Blots* sind um das Achtfache verstärkt.

In den zusätzlichen Kontrollen, welche nur mit dem Sekundärantikörper eingefärbt wurden, wird sichtbar, dass dieser nur von **SSL10** und dem unbekanntem Protein gebunden wird. **Sbi** und **SpA** zeigen bei der Färbung durch den Sekundärantikörper fast kein Signal und besitzen eine entsprechend geringe Affinität gegenüber Antikörpern von Ziegen. Da Ziegen ein geeigneter Wirt für diese Bakterien sind ^[1404], ist es möglich, dass es sich bei dem unbekanntem Protein um ein Immunglobulin-bindendes Protein handelt, welches bevorzugt Antikörper von Ziegen neutralisiert. Die auf diesem Gebiet nur unzureichende Forschung kann die oben angeführte Hypothese allerdings nicht durch entsprechende Literatur bestätigen. Die größte Bande mit falsch-positivem Signal entspringt Primärantikörpern, welche von den Immunglobulin-bindenden Proteinen immobilisiert und anschließend durch den Sekundärantikörper markiert werden. Dies bedeutet, dass die *Fc*-Region der Primärantikörper nach der Immobilisation durch die Immunglobulin-bindenden Proteine für eine Markierung weiterhin verfügbar ist. Maßnahmen, welche also nur die Spezifität und den Ursprung des Sekundärantikörpers verändern, sind also nicht ausreichend, um die falsch-positiven Signal zu eliminieren. Die Banden auf Höhe von **Emp** verhalten sich identisch zu dem ersten *Western Blot* und somit entsprechen sie den Erwartungen. Zwischen Banden verschiedener Proben kann sich bei der Markierung mit diesem Sekundärantikörper ein bogenförmiges Artefakt zeigen, wenn sie das gleiche Molekulargewicht besitzen.

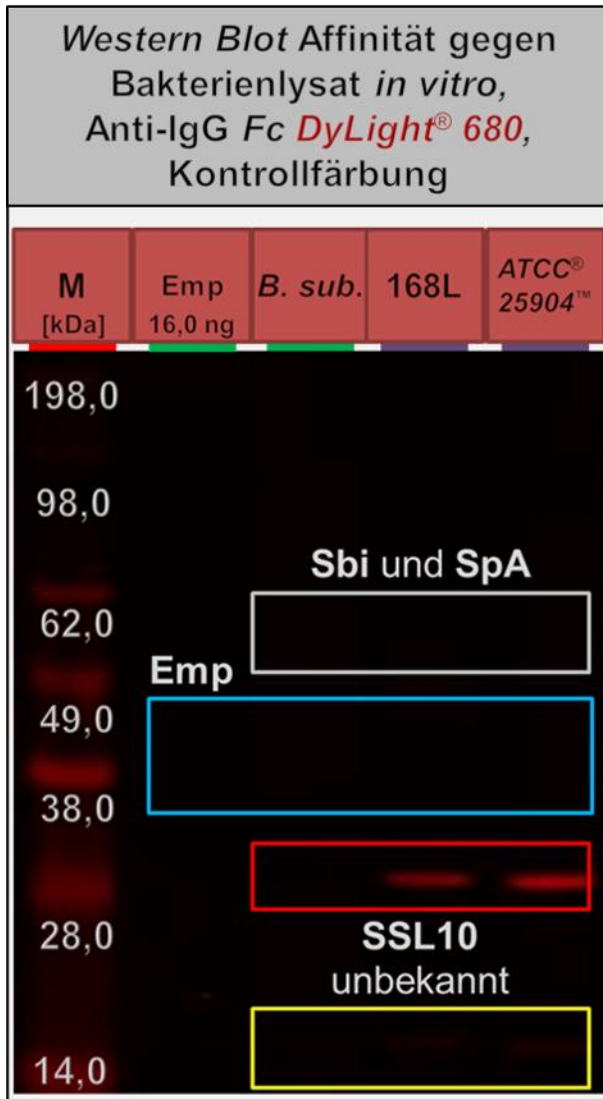


Abbildung 43: Zusätzlich zu den Proben wird **Emp** mit einer Menge von 16,0 ng und ein Marker für Proteingrößen aufgetragen. Nach der Übertragung auf eine Membran aus PVDF werden die Kontrolle von den Proben getrennt und in einem Verhältnis von 1:5000 mit Sekundärantikörpern gegen die *Fc*-Region von **IgG** eingefärbt. Kontrast und Helligkeit des *Western Blots* sind um das Achtfache verstärkt.

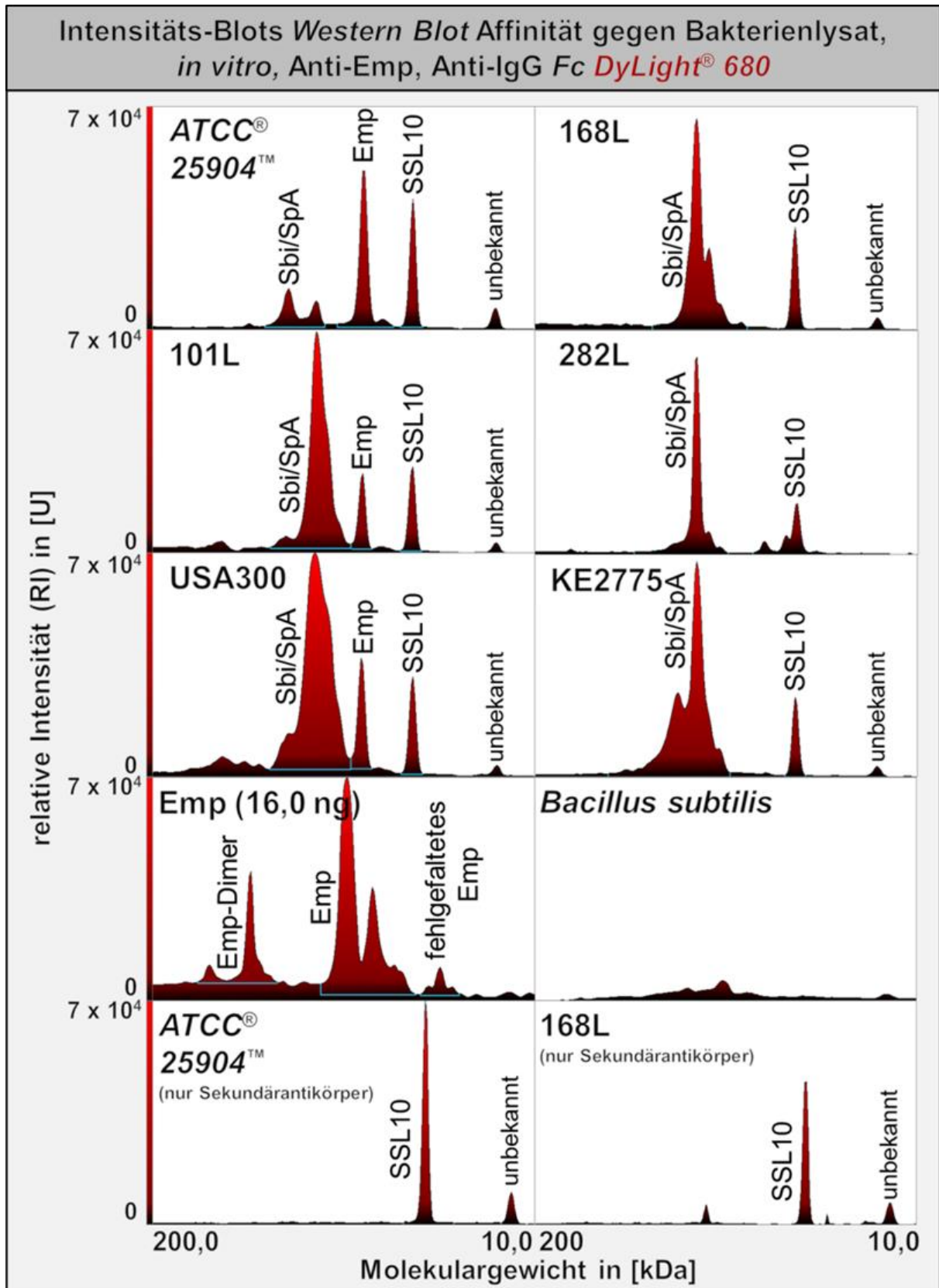


Abbildung 44: Zusammenfassung der Banden der *Western Blots* aus den Abbildungen 42 und 43. Die Markierungen der Peaks wurden aus diesen Abbildungen übernommen. Die Abgrenzung wird für jeden Peak gleich gehalten, damit ein Vergleich zwischen den Proben möglich ist. Bei Peaks mit größerem Hintergrundrauschen wird die Abgrenzung mit einer blauen Linie hervorgehoben. Der Peak von **Sbi** und **SpA** sowie von **Emp** und fehlgefaltetem **Emp**, werden jeweils in einer Fläche zusammengefasst.

Tabelle 38: Die relativen Flächen der Peaks aus den Intensitäts-Blots der Proben des *Western Blots* in Abbildung 44, im Vergleich zum größten Peak des jeweiligen Molekulargewichts. Sekundärantikörper werden mit sek. Ak. abgekürzt. Die Fläche des Peaks, welche das vermutete **Emp**-Dimer enthält, wird nicht in der Tabelle aufgeführt.

Vergleich der Peakflächen zwischen markierten Proteinbanden eines <i>Western Blots</i>				
Probe	Sbi/SpA	Emp	SSL10	unbekannt
größte Fläche	282L	Emp (16,0 ng)	ATCC® 25904™ (nur sek. AK.)	ATCC® 25904™ (nur sek. AK.)
ATCC® 25904™	12,3 %	25,9 %	60,3 %	91,1 %
ATCC® 25904™ (nur sek. Ak.)	-	-	100,0 %	100,0 %
101L	65,1 %	9,7 %	42,6 %	47,6 %
USA300	100,0 %	14,9 %	49,8 %	55,3 %
168L	56,2 %	-	50,9 %	53,8 %
168L (nur sek. AK.)	2,1 %	-	60,3 %	68,4 %
282L	32,1 %	-	50,0 %	-
KE2775	78,8 %	-	39,3 %	39,6 %
Emp (16,0 ng)	-	100,0 %	-	-

Die Probe und Kontrolle von *Bacillus subtilis* sowie die Kontrolle des **Emp** werden beim Vergleich der Fläche ignoriert, da die Intensitäts-Blots dieser Proben keine Peaks erzeugen. Im zweiten *Western Blot* unterscheidet sich die Verteilung der Flächen maßgeblich von dem ersten *Western Blot*. Das errechnete Integral aus den Peaks von **Sbi** und **SpA** zeigt dieses Mal die größte Fläche bei dem Bakterienstamm USA300. Bei den beiden Lysaten, welche als Kontrollen verwendet werden, ist diese Fläche nicht vorhanden beziehungsweise deutlich kleiner als die Fläche des größten Peaks. Die Peaks für die Proteinbanden von **SSL10** zeigen mit Ausnahme der Kontrolle von ATCC® 25904™ eine ähnliche Größe. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass das **SSL10** von diesem Bakterienstamm stärker exprimiert wird oder es eine vergleichsweise größere Affinität gegenüber dem Sekundärantikörper zeigt. Bei einer vorherigen Färbung mit Primärantikörper werden potentielle Bindungsstellen für den Sekundärantikörper blockiert, was eine nachfolgende Immobilisierung dieses Antikörpers verhindert. Da es sich bei dem Primärantikörper um ein Antikörpergemisch handelt, ist es ebenso möglich, dass nicht alle Antikörper in diesem Gemisch von dem Sekundärantikörper markiert werden können, was ein vergleichsweise reduziertes Signal zur Folge hat. Das unbekannte Protein ist in allen Lysaten, außer denen von *Bacillus subtilis* und dem Bakterienstamm 282L zu erkennen. Der *Staphylococcus* ATCC® 25904™ zeigt bei diesem Peak eine deutlich größere Fläche als die anderen Bakterienstämme. Im Gegensatz zum

vorherigen *Western Blot* zeigt *ATCC*[®] *25904*[™] bei dem Peak, welcher dem **Emp** entspricht, eine verhältnismäßig größere Fläche als die anderen beiden Bakterienstämme. Da in beiden *Western Blots* dasselbe Gemisch als Primärantikörper eingesetzt wurde, ist davon auszugehen, dass die gleichen Proteine in dieser Färbung markiert werden. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz ist die Messungengenauigkeit bei der Berechnung der Peakfläche, da die Intensitäts-Blots nur eine begrenzte Genauigkeit und Konsistenz besitzen. Die Fläche des Peaks für das vermutete **Emp**-Dimer entspricht 22,4 % der Fläche der Peaks des restlichen **Emp** und weicht somit ebenfalls von dem Verhältnis im ersten *Western Blot* ab. Der größte Unterschied ist bei dem Bakterienstamm 282L zu erkennen. Die falsch-positiven Signale der Banden des entsprechenden Bakterienlysats sind deutlich geringer als im ersten *Western Blot*. Der Wechsel des Sekundärantikörpers hatte folglich bei diesem Bakterienstamm die größte Wirkung.

4.4.2.2 Sättigung der Immunglobulin-bindenden Proteine

Der Austausch des Sekundärantikörpers zeigt nicht den erwarteten Effekt, da die falsch-positiven Signale auf der Immobilisierung von Primärantikörpern basiert. Um die Wirkung der Immunglobulin-bindenden Proteine zu unterbinden, muss eine Methode verwendet werden, welche deren Bindungsstellen permanent blockiert. Es bietet sich deshalb an, den Blockierungspuffer zu verbessern, welcher zur standardmäßigen Blockierung von unspezifischen Protein-bindenden Flächen in jedem *Western Blot* eingesetzt wird. **SpA** zeigt eine sehr große Affinität gegenüber Antikörpern von Hasen^[811]. Wird dem Blockierungspuffer also Hasenserum beigefügt, sollten die darin enthaltenen Antikörper im besten Fall alle Bindungsstellen der Immunglobulin-bindenden Proteine blockieren. In der eigentlichen Primärfärbung sollten diese Proteine dann keine weitere Kapazität besitzen, um Anti-**Emp**-Antikörper zu binden. Zur Ergänzung der Blockierung wird das Hasenserum auch in den während der Primär- und Sekundärfärbung verwendeten Färbepuffer gemischt, damit dieser einer möglichen Dissoziation zwischen Hasenantikörper und Immunglobulin-bindenden Proteinen während der Färbung entgegenwirkt. Um die Effektivität dieser Maßnahme zu überprüfen, werden die Proteine des rekombinanten **Emp** sowie eines Bakterienlysats von jeweils *ATCC*[®] *25904*[™] und 168L in doppelter Ausführung innerhalb einer LDS-PAGE voneinander aufgetrennt. Nachfolgend werden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und wie zuvor ein *Western Blot* durchgeführt. Als Blockierungspuffer wird Blockierungspuffer-Formulation 1 und als Färbepuffer Färbepuffer-Formulation 2 verwendet. Beide Reagenzien haben einen 10,0 %igen (v/v) Gehalt an Hasenserum. Als Sekundärantikörper wird Anti-IgG Fc *DyLight*[®] 680 verwendet, da die Affinität der Immunglobulin-bindenden Proteine gegenüber diesem Antikörper bekannt ist.

Einer der zwei Sätze an Proben wird während der Immunfärbung mit und der andere ohne Primärantikörper eingefärbt. Der markierte *Western Blot* dieses Versuches ist in Abbildung 45 zusammengefasst.

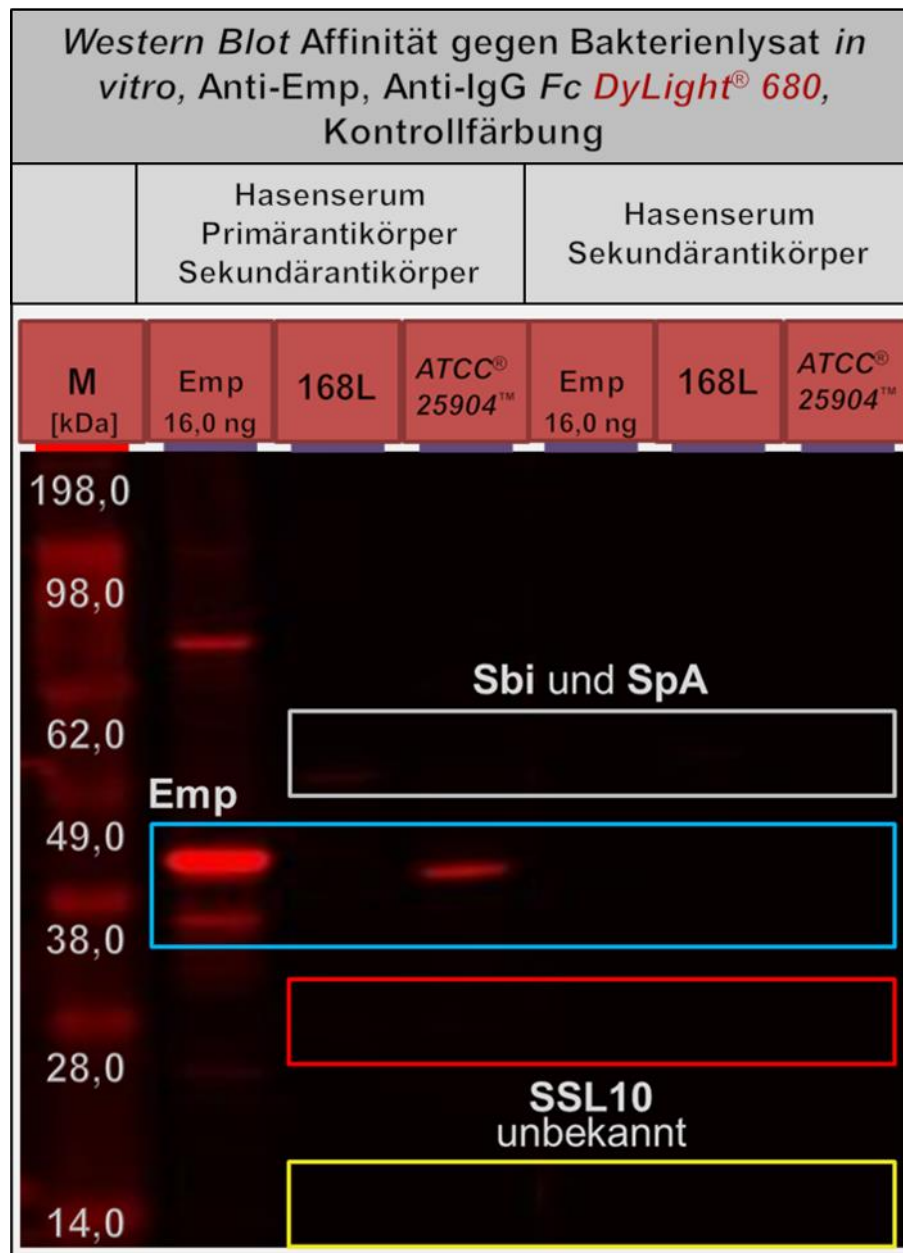


Abbildung 45: Zusätzlich zu den Proben wird zwei Mal **Emp** mit einer Menge von 16,0 ng und ein Marker für Proteingrößen aufgetragen. Nach der Übertragung auf eine Membran aus PVDF wird die Kontrolle von den Proben getrennt. Die Proben werden in einem Verhältnis von 1:500 mit Anti-**Emp** eingefärbt. Sowohl Proben als auch Kontrollen werden anschließend in einem Verhältnis von 1:5000 mit Sekundärantikörpern gegen die *Fc*-Region von **IgG** inkubiert. Kontrast und Helligkeit sind um das Achtfache verstärkt.

Innerhalb des *Western Blots* sind bei einer achtfachen Verstärkung von Helligkeit und Kontrast keine Banden der Immunglobulin-bindenden Proteine an den erwarteten Positionen zu erkennen. Bei einer größeren Verstärkung wird bei dem Lysat von 168L eine Bande auf der Höhe von ~ 50,0 kDa sichtbar. Die Blockierung der Immunglobulin-bindenden Proteine durch die Zugabe von Hasenserum in die Prozessreagenzien zeigt sich erfolgreich darin, einen Großteil der falsch-positiven Signale zu eliminieren. Entsprechend sollte das Hasenserum diese Wirkung auch bei der Durchführung von weiteren Versuchen zeigen.

Aufgrund des eindeutigen Ergebnisses wird die Erstellung eines mit dem *Western Blot* zusammenhängenden Intensitäts-Blots verzichtet.

4.4.3 Optimierter Nachweis der Affinität *in vitro*

Zum Abschluss des Affinitätsnachweises *in vitro* wird ein dritter *Western Blot* mit dem vollständigen Satz an Bakterienlysaten unter den optimierten Bedingungen durchgeführt. In einem Versuch, das verbleibende schwache falsch-positive Signale zu eliminieren, wird als Veränderung der Gehalt des Hasenserums im Blockierungspuffer auf 20,0 % (v/v) erhöht. Als Prozessreagenzien werden Blockierungspuffer- und Färbepuffer-Formulation 2 verwendet. Zur Markierung der Primärantikörper wird der Sekundärantikörper Anti-IgG Fc DyLight® 680 eingesetzt. Die sonstige Durchführung entspricht der Standardprozedur. Das Ergebnis der Sekundärfärbung ist in Abbildung 46 dargestellt. Die zugehörigen Intensitäts-Blots werden in Abbildung 47 aufgeführt und deren Flächenberechnung in Tabelle 39 aufgelistet.

Die markierten Banden des optimierten *Western Blots* zeigen, dass trotz des hohen Gehalts an Hasenserum weiterhin Banden auf der Höhe des Molekulargewichts von **Sbi** und **SpA** als falsch-positive Signale sichtbar sind. Im Vergleich wirken diese Banden aber schwächer als in den vorangegangenen *Western Blots*. Banden, an welchen das unbekannte Immunglobulin-bindende Protein die Sekundärantikörper immobilisiert hat, sind nicht mehr sichtbar. An den Positionen, an welchen zuvor Sekundärantikörper von **SSL10** immobilisiert wurden, ist nur noch bei dem Bakterienstamm 282L eine Bande sichtbar. Die Zugabe des Hasenserums hat zur Folge, dass vorher nicht beobachtete Proteinbanden mit unbekanntem Inhalt in den Lysaten der Bakterienstämme USA300, 101L, 282L und dem Bakterium *Bacillus subtilis* sichtbar sind. Das Hasenserum führt zu unerwünschten Kreuzreaktionen, welche die Spezifität der Markierung des Sekundärantikörpers beeinflussen. Wie auch im ersten und zweiten *Western Blot* zeigen nur Bakterienlysate eine Bande auf der Höhe des **Emp**, wenn die Bakterienstämme die Variante mit dem Epitop ‚HYVPEFKGSPAPRV‘ exprimieren. Stämme, welche **Emp_A** produzieren, zeigen auf dieser Höhe kein wahrnehmbares Signal

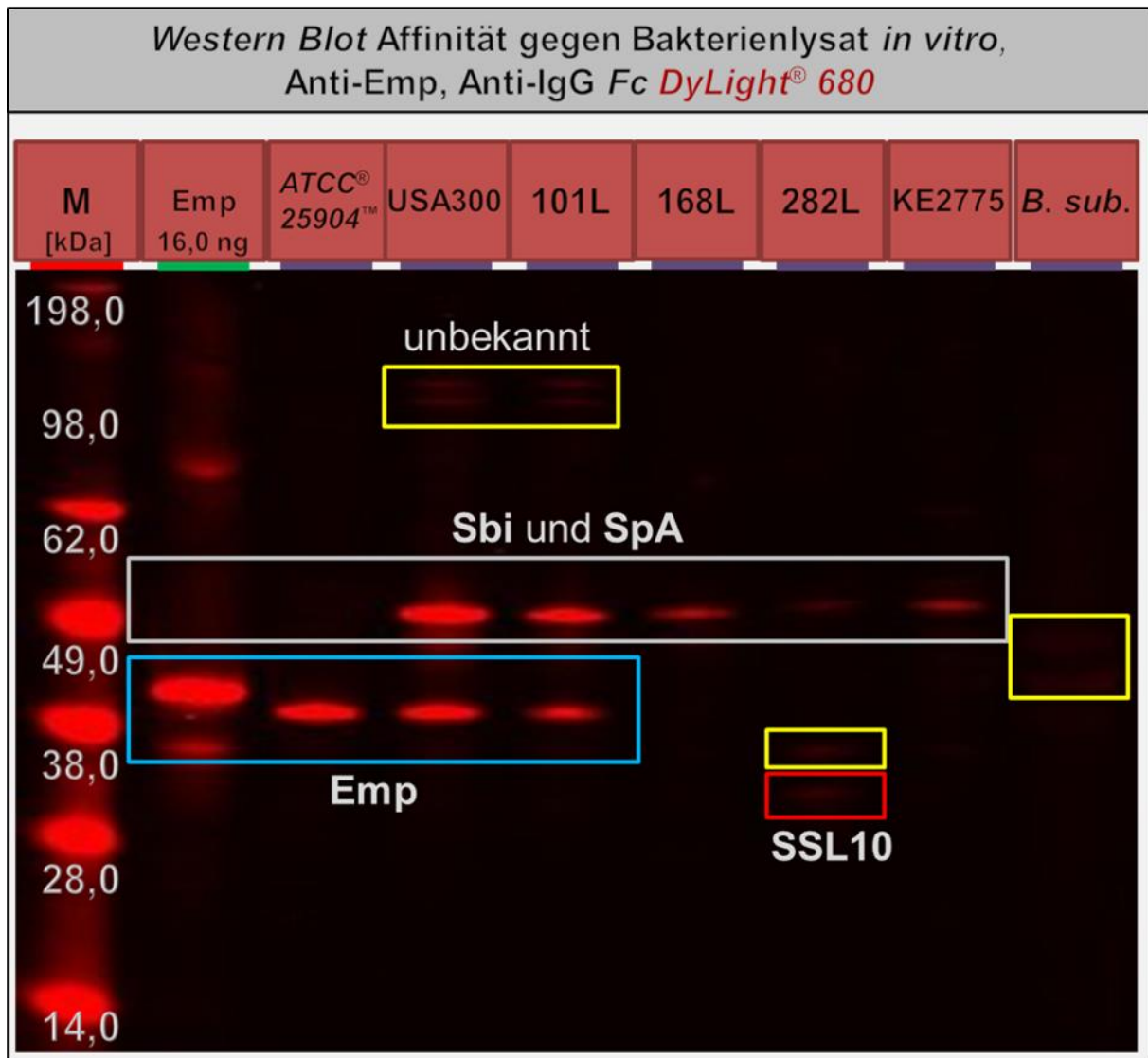


Abbildung 46: Zusätzlich zu den Proben wird **Emp** mit einer Menge von 16,0 ng und einem Marker für Proteingrößen aufgetragen. Nach der Übertragung auf eine Membran aus PVDF werden die Proben in einem Verhältnis von 1:500 mit Anti-**Emp** und in einem Verhältnis von 1:5000 mit Sekundärantikörpern gegen die *Fc*-Region von **IgG** eingefärbt. Kontrast und Helligkeit sind um das Fünffache verstärkt.

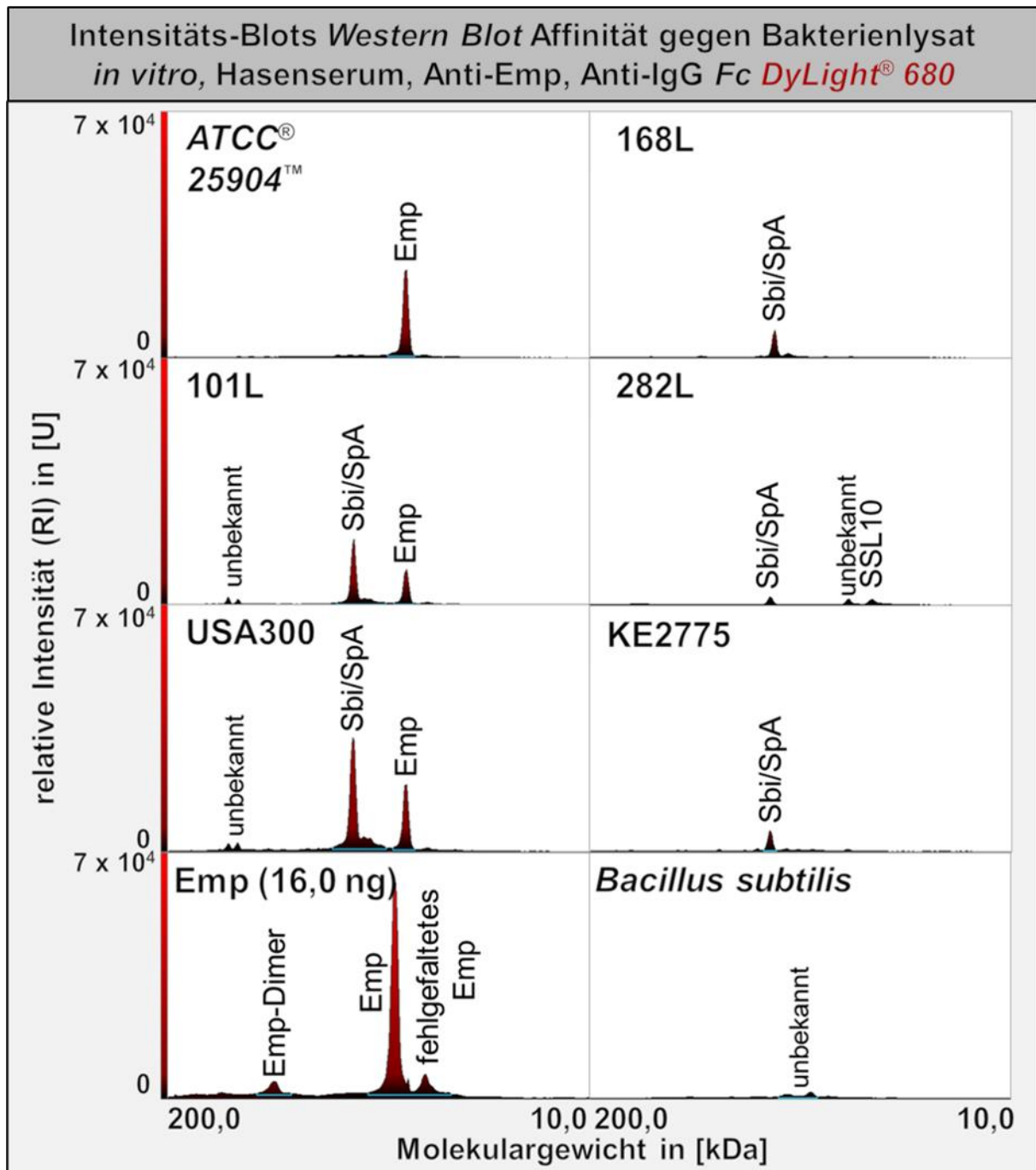


Abbildung 47: Zusammenfassung der Banden des *Western Blots* aus der Abbildung 46. Die Markierungen der Peaks wurden aus dieser Abbildung übernommen. Diese Abgrenzung wird für jeden Peak gleich gehalten, damit ein Vergleich zwischen den Proben möglich ist. Bei Peaks mit größerem Hintergrundrauschen wird die Abgrenzung mit einer blauen Linie hervorgehoben. Der Peak von **Sbi** und **SpA** sowie von **Emp** und fehlgefaltetem **Emp**, werden jeweils als eine Fläche zusammengefasst.

Tabelle 39: Die relativen Flächen der Peaks aus den Intensitäts-Blots der Proben des *Western Blots* in Abbildung 47, im Vergleich zum größten Peak des jeweiligen Molekulargewichts. Die Fläche des Peaks, welche das vermutete **Emp**-Dimer enthält, wird nicht in der Tabelle aufgeführt. Ebenso werden die Peaks von unbekanntem Proteinen nicht aufgelistet.

Vergleich der Peakflächen zwischen markierten Proteinbanden eines <i>Western Blots</i>		
Probe	Sbi/SpA	Emp
größte Fläche	USA300	Emp
<i>ATCC</i> [®] 25904 [™]	-	26,5 %
101L	48,1 %	9,8 %
USA300	100,0 %	19,9 %
168L	25,2 %	-
282L	5,7 %	-
KE2775	10,6 %	-
Emp (16,0 ng)	-	100,0 %

Die Größenverteilung der Peaks, welche mit **Emp** assoziiert werden, ähnelt den Ergebnissen aus dem zweiten *Western Blot*. Bei den Peaks, welche aus Banden generiert werden, in denen Antikörper durch **Sbi** und **SpA** immobilisiert werden, zeigen sich die Ergebnisse allerdings inkonsistent zum vorherigen *Western Blot*. Es ist möglich, dass das Hasenserum die Immunglobulin-bindenden Proteine, abhängig von der Bakterienart unterschiedlich effizient blockiert. USA300 immobilisiert die größte und *ATCC*[®] 25904[™] die geringste Menge an Antikörpern. Diese Beobachtung deckt sich mit der individuellen Virulenz dieser beiden Bakterienstämme. Das Dimer von **Emp** entspricht 7,9 % der restlichen Fläche des Proteins und ähnelt daher dem Ergebnis aus dem ersten *Western Blot*.

Zusammengefasst wurde in drei individuellen Versuchen bewiesen, dass das in der Affinitätschromatographie isolierte Gemisch aus Anti-**Emp**-Antikörpern sein Antigen im Wildtyp erfolgreich binden kann. Besitzt der Wildtyp eine abweichende Variante des Proteins mit einem Epitop, welches sich in drei Aminosäuren unterscheidet, bleibt die Interaktion von Antikörpern und dem Protein aus. Alle Bakterienlysate der untersuchten Wildtypen besitzen ein Repertoire an Immunglobulin-bindenden Proteinen, welche im reduzierten und denaturierten Zustand die Antikörper immobilisieren. Dies führt in den Versuchen zur Erzeugung von falsch-positiven Ergebnissen und wird höchstwahrscheinlich das Ergebnis weiterer Antikörper-basierter Versuche stören. Ein Wechsel des Sekundärantikörpers ist keine sinnvolle Maßnahme, um dieses Problem zu beheben, da der Ursprung für einen Großteil der falschen Signale aus immobilisierten Primärantikörpern stammt. Eine vorherige Blockierung durch Hasenserum löscht einen Großteil der falschen Signale aus.

Die vollständige Elimination kann allerdings auch bei einem hohen Anteil des Serums nicht erreicht werden. Zudem erzeugt das Serum selbst ebenfalls Störeffekte, welche zu falsch-positiven Signalen führen können.

4.5 Überprüfung der Antikörper-Antigen-Interaktion *in situ*

Der Affinitätsnachweis von Anti-**Emp** gegenüber dem rekombinanten und natürlichen Protein *in vitro* war erfolgreich. Deshalb gilt es als nächstes zu beweisen, dass das **Emp** auch direkt an seinem natürlichen Ort im Bakterium markiert werden kann. Neben der Problematik, dass die Immunglobulin-bindende Proteine erneut ein falsch-positives Signal erzeugen, könnte der Nachweis problematisch werden, da das **Emp** hauptsächlich in der fibrillären Kapsel des Bakteriums lokalisiert wird^[617]. Unter den Kultivierungsbedingungen im Labor wird diese Kapsel nicht ausgebildet, da im Nährmedium das dafür notwendige Fibrin fehlt. Da das Protein aber auch in der Zellwand nachgewiesen werden kann^[609], sollte eine Markierung durch eine Immunfärbung möglich sein.

Für die Präparation in den individuellen Kammern auf dem Glasträger werden die zwei Bakterienstämme *ATCC*[®] 25904[™] und 168L ausgewählt. Wie im vorherigen Kapitel gezeigt, wird das **Emp_A** von 168L nicht durch den Primärantikörper markiert. Da sich die Wirkung der Immunglobulin-bindenden Proteine aber nicht vollständig eliminieren lässt, ist aufgrund von falsch-positiven Signalen mit einer schwachen Markierung von 168L zu rechnen. Dieser Effekt wird durch Verwendung von Blockierungs- und Färbepuffer-Formulation 3 reduziert. In der dritten Formulation wird statt Hasenserum polyklonales **IgG** aus dem Hasen (**IgG** Hase) verwendet, um die im vorherigen Kapitel beobachteten und ungewünschten Kreuzreaktionen zu minimieren. Um den Einfluss der falsch-positiven Markierung einzuschätzen, werden zusätzlich Sekundärfärbungen ohne vorherige Primärfärbung als Kontrollen durchgeführt. Parallel zu Anti-**Emp** wird als Kontrolle ein humanisierter Anti-Proto-Onkogen-basische-Helix-Schleifen-Helix-Transkriptionsfaktor-Antikörper (Anti-**Myc**) zur Primärfärbung verwendet. Dieser Antikörper hat keinerlei Zusammenhang mit *Staphylokokken* und fungiert deshalb als Detektor für unspezifische Interaktionen. Zwei der mit *Staphylokokken* präparierten Kammern auf dem Glasträger werden zum Zweck der Hellfeldmikroskopie nicht behandelt. Für die Aufnahmen der mit Sekundärantikörper markierten Bakterien werden in jeder Kammer Bereiche auf dem Glasträger ausgesucht, an denen vereinzelt Bakterien aufzufinden sind. Eine Aufnahme mit der Lichtmikroskopie wird hierbei vermieden um den Effekt der Photobleichung^[1405] zu minimieren.

In den Abbildungen werden die mikroskopischen Aufnahmen der beiden Bakterienstämme jeweils gegenübergestellt. Die Aufnahmen aus der Hellfeldmikroskopie beider

Bakterienstämme sind in Abbildung 48 dargestellt. Kontrollfärbungen ohne Sekundärantikörper sind in Abbildung 49 abgebildet. In der Abbildung 50 sind die Aufnahmen der Bakterien zu sehen, welche in der Primärfärbung mit Anti-**Myc**-Antikörper markiert wurden. Zum Abschluss sind in der Abbildung 51 die Bilder aus der Fluoreszenzmikroskopie der mit Anti-**Emp** und Sekundärantikörper eingefärbten Bakterien zu sehen. Jede Sekundärfärbung wird in einem Verhältnis von 1:1000 durchgeführt. Alle Aufnahmen werden durch das Objektiv *Nikon Plan Fluor 40 x/0,75 PH2 DLL* bei einer Vergrößerung von 400 X aufgenommen. Zur Dokumentation der Aufnahmen wird eine Nikon *DS-Qi1Mc* mit einer Auflösung von 1,3 MPx und einer Datenbreite von 24 Bit verwendet. Die effektive Fläche von jedem Bild beträgt $7,2 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$. Alle Bilder der Fluoreszenzmikroskopie werden mit derselben Belichtungszeit und Empfindlichkeit des Photoelektronenvervielfachers durchgeführt.

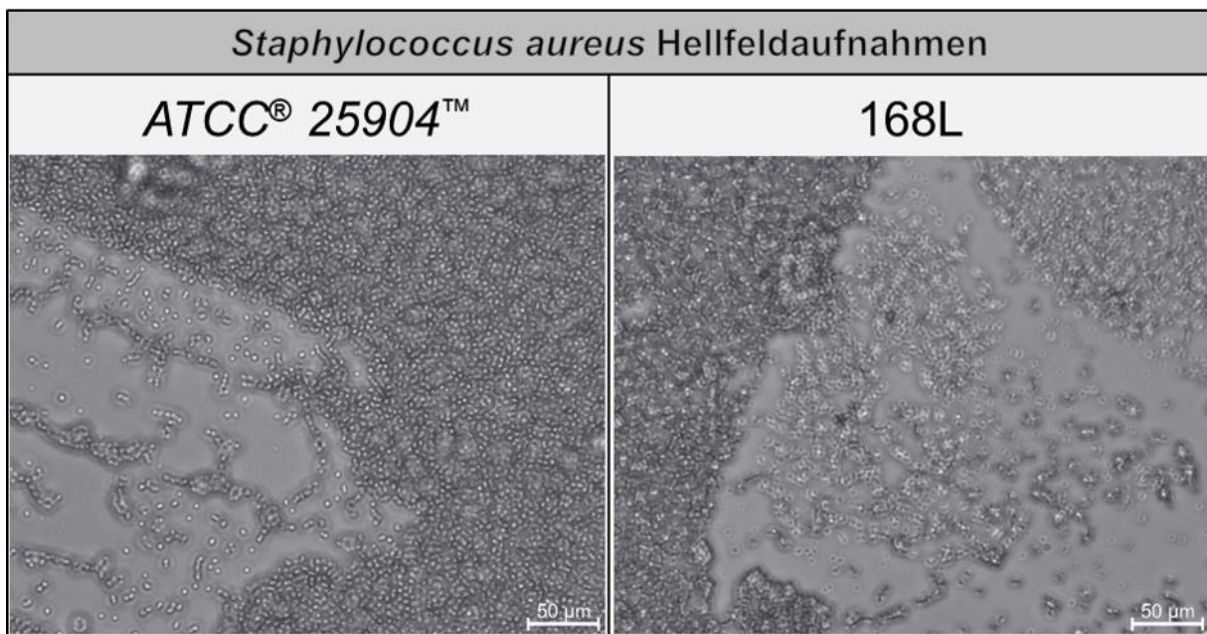


Abbildung 48: Jeweils eine Farbbildaufnahme der beiden Bakterienstämme wurde bei einer Belichtungszeit von 20 Mikrosekunden detektiert.

Die Hellfeldaufnahmen zeigen bei beiden Bakterienstämme auf der Glasoberfläche sichtbare *Staphylokokken*. Diese sind auf dem Glasträger vereinzelt vorzufinden und haben auch mehrschichtige Biofilme ausgebildet.

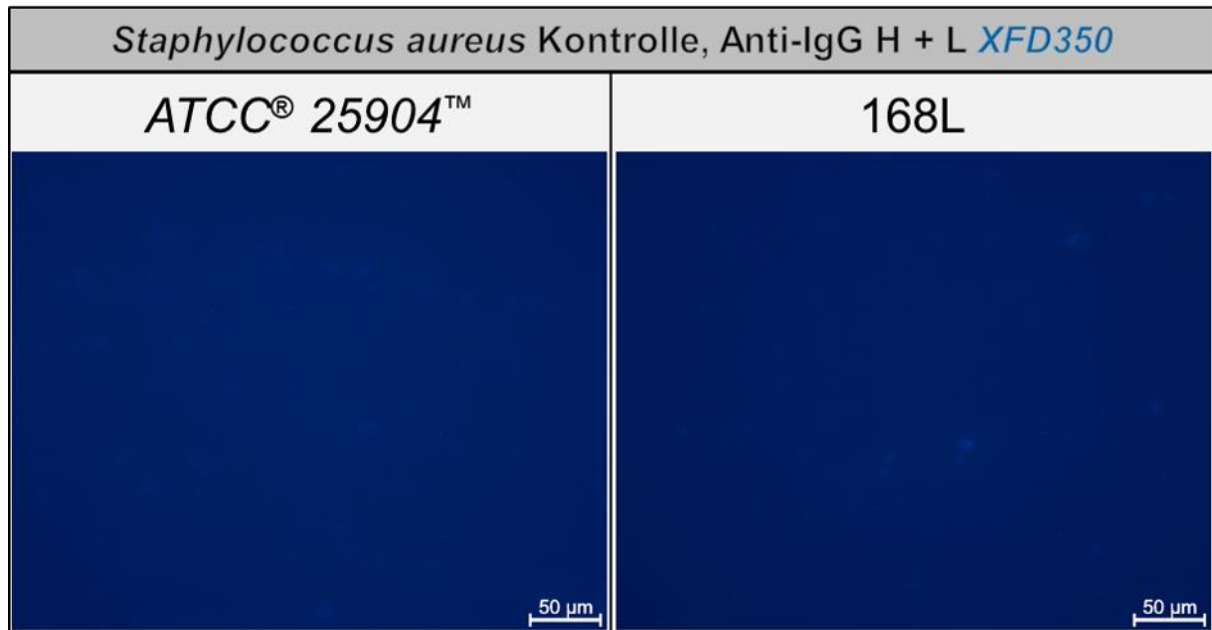


Abbildung 49: Jeweils eine Farbbildaufnahme einzelner und gruppierten *Staphylokokken* unter Anregung des Fluorophors des Sekundärantikörpers. In der Primärfärbung wird kein Antikörper verwendet.

In den Kontrollen ohne Primärantikörper von beiden Bakterienstämmen ist an einigen wenigen Positionen eine schwache Fluoreszenz zu erkennen. Genaue Konturen der Bakterien lassen sich aber nicht erkennen. Dies spricht dafür, dass beide Bakterienstämme den Sekundärantikörper immobilisieren können. Entsprechend der Ergebnisse aus Kapitel 4.4.2.1 „Einsatz von alternativem Sekundärantikörper“ sind es mit großer Wahrscheinlichkeit **SSL10** und ein bisher unbekanntes Protein, welche den Sekundärantikörper immobilisieren und deshalb ein falsch-positives Signal erzeugen.

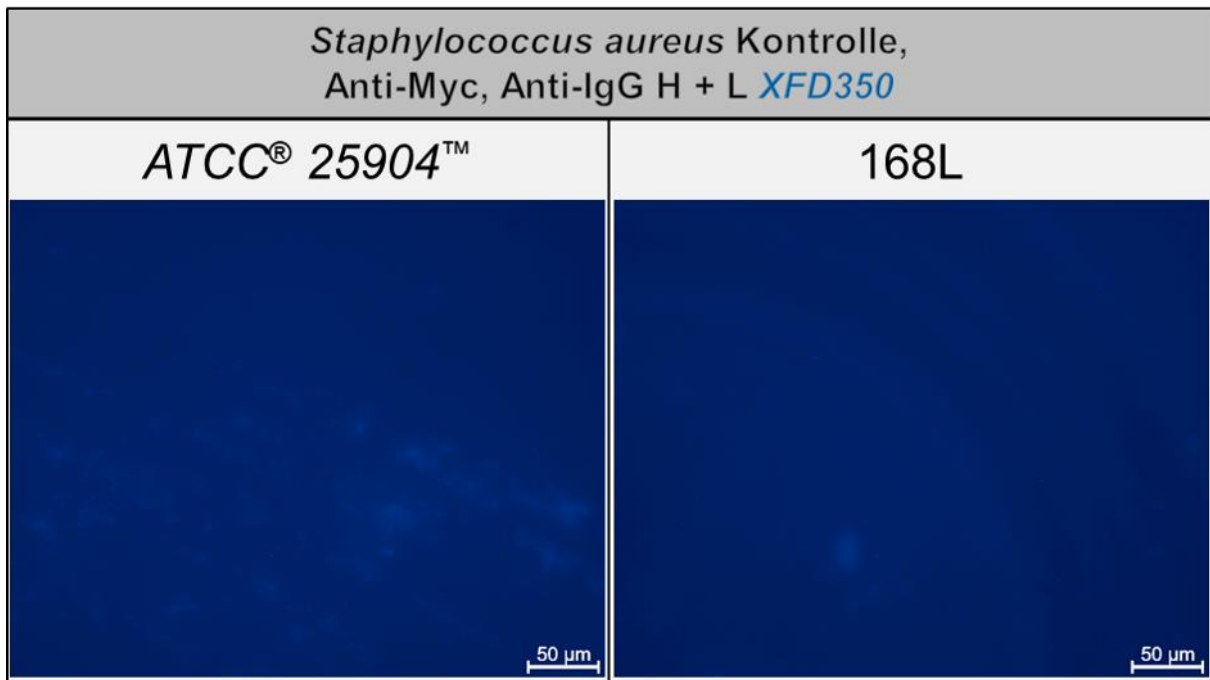


Abbildung 50: Jeweils eine Farbbildaufnahme einzelner und gruppierten *Staphylokokken* unter Anregung des Fluorophors des Sekundärantikörpers. In der Primärfärbung wird Anti-**Myc** in einer Konzentration von 15,0 µg/mL verwendet.

Ähnlich wie bei der Kontrolle ohne Primärantikörper zeigt sich bei der Primärfärbung mit Anti-**Myc** ein konturloses Leuchten in der Emissionswellenlänge des verwendeten Fluorophors. Dieses Leuchten wirkt intensiver als das in der Kontrolle ohne Primärantikörper. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Gesamtmenge an Antikörpern, welche durch die Immunglobulinbindenden Proteine immobilisiert wird, in dieser Kontrolle größer ist. Somit wird die Intensität der Fluoreszenz kumulativ gesteigert.

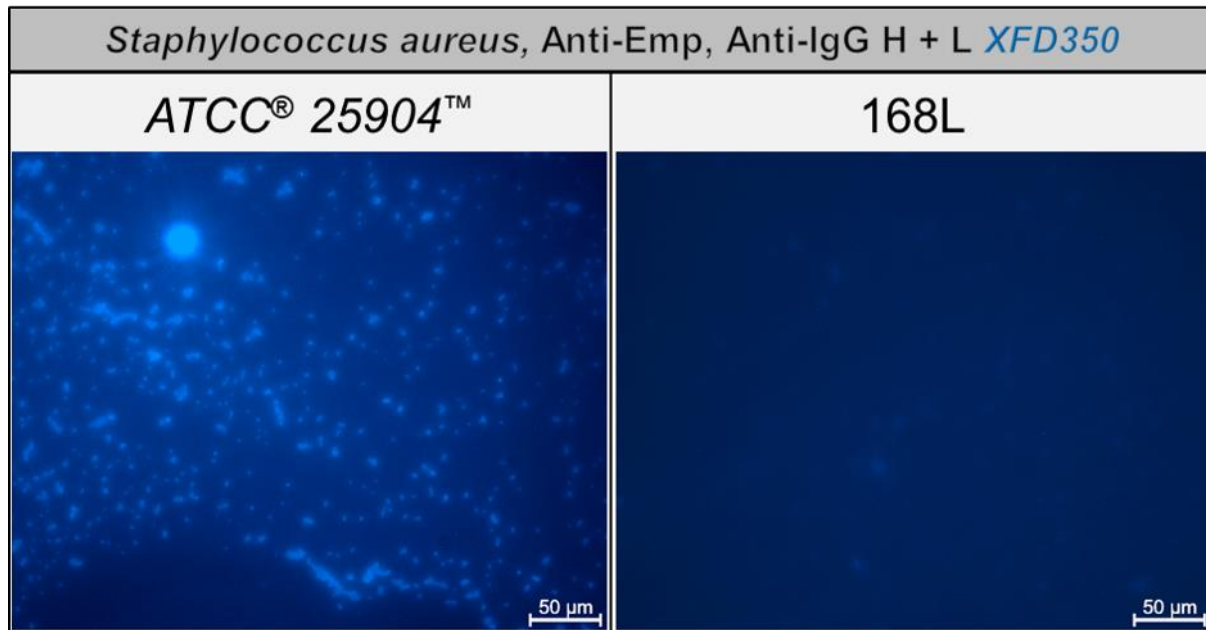


Abbildung 51: Jeweils eine Farbbildaufnahme einzelner und gruppierter *Staphylokokken* unter Anregung des Fluorophors des Sekundärantikörpers. In der Primärfärbung wird eine Elution von FS2 in einem Verhältnis von 1:500 verwendet.

In der Aufnahme der mit Anti-**Emp** und Sekundärantikörper markierten *Staphylokokken* hebt sich die Fluoreszenzintensität deutlich von allen bisherigen Aufnahmen ab. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass *Staphylococcus aureus* ATCC® 25904™ von dem Primärantikörper vermehrt opsonisiert und dieser nachfolgend durch den Sekundärantikörper markiert wird. Es sind zwar nur schwache Konturen von einzelnen Bakterien zu erkennen, aber zusammenhängende Aggregate lassen sich sehr gut bestimmen. Die Fluoreszenzmarkierung von 168L zeigt hingegen nur eine schwache Steigerung in der Signalstärke im Vergleich zu den beiden anderen Kontrollen. Das spricht für einen größeren kumulativen Effekt der gesamten Menge an immobilisierten Antikörpern.

Insgesamt ist die Differenz des Fluoreszenzsignals zwischen der Probe und den Kontrollen bei der Markierung von ATCC® 25904™ zu groß, um sie durch eine Zunahme der Menge an durch Immunglobulin-bindende Proteine immobilisiertem Antikörper zu erklären. Ebenso ist auszuschließen, dass die Bindung unspezifisch ist, da der Anti-**Myc**-Antikörper die Fluoreszenzintensität nicht merklich verstärkt hat. Das deutlich besser erkennbare Signal muss daher auf der spezifischen Interaktion des Anti-**Emp**-Antikörpers mit dem Bakterium basieren. Das Signal ist allerdings relativ schwach. Das Fehlen einer stärkeren Vergrößerung verwehrt es, die genaue Position des Proteins im Bakterium zu lokalisieren.

4.6 Interaktion zwischen ApoA1, Emp und Anti-Emp

Während der Affinitätschromatographie wurde zusammen mit dem Antikörper eine proteinogene Verunreinigung mit einem Molekulargewicht von ~ 28,0 kDa aus dem Serum aufgereinigt. Durch die massenspektrometrische Analyse in Kapitel 4.3.3 „**Massenspektrometrische Analyse des Anti-Emp-Antikörpers**“ ist bekannt, dass es sich bei diesem Protein um **ApoA1** handelt. Es wurde als sehr zuverlässiger Treffer bestätigt, was bedeutet, dass dieses Protein während der Affinitätschromatographie entweder eine Affinität gegenüber dem in der stationären Phase verwendeten Epitop oder dem Antikörper selbst besitzt. Folgend werden Versuche durchgeführt, um diese Interaktion zu überprüfen.

Im ersten Nachweis wird überprüft, ob **ApoA1** direkt mit dem Epitop interagiert. Hierfür wird aus Humanplasma aufgereinigtes **ApoA1** mit Fluorophoren konjugiert und zur direkten Markierung von Peptidspots einer Substitutionsanalyse in 16er-Konfiguration verwendet. Das Ergebnis dieser Direktmarkierung ist der Abbildung 52 zu entnehmen.

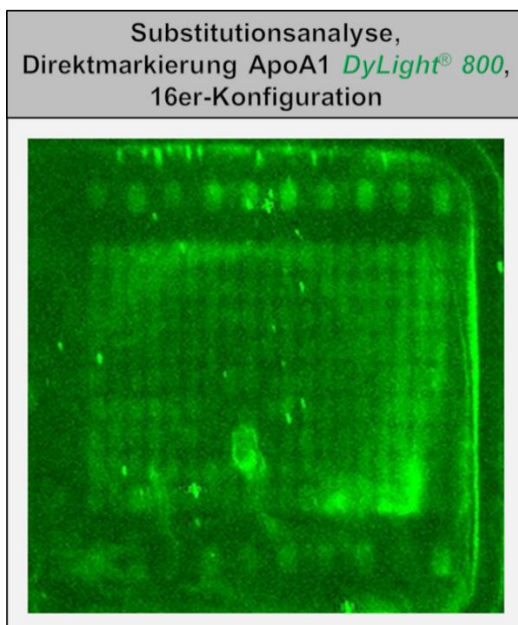


Abbildung 52: Die Substitutionsanalyse wird direkt mit 10,0 µg/mL markiertem menschlichen **ApoA1** eingefärbt. Zur besseren Sichtbarkeit werden die Helligkeit und der Kontrast des Arrays um das 50-fach verstärkt und in Falschfarben dargestellt.

Entsprechend der graphischen Verstärkung des Arrays sind nach der Direktmarkierung keine markierten Peptide zu erkennen. Es sind lediglich schwache, unspezifische Bindungen zu sehen.

Für eine weitere, ausführlichere Überprüfung werden zwei *Western Blots* durchgeführt. Die LDS-PAGE für den ersten *Western Blot* enthält Serum, DL1 und Eluat aus einer Affinitätschromatographie von FS2. Durch eine Sekundärfärbung mit einem Anti-**ApoA1**-Antikörper kann eine Interaktion des Proteins mit dem Anti-**Emp**-Antikörper, falls vorhanden,

entsprechend nachgewiesen werden. Ein *Western Blot* besitzt eine Detektionsschwelle, welche bis zu 1,0 ng Protein nachweisen kann ^[1406]. Die Menge von **ApoA1**, welche für einen effektiven Nachweis notwendig ist, ist unbekannt. Als genereller Schätzwert wird deshalb die Elution so gewählt, dass ein Wert von 5,0 ng erreicht wird. Da die Menge an **ApoA1** in der Elution nicht bekannt ist, wird die in Kapitel 4.2.2.3 „**Annäherung an die Proteinmenge über relative Intensität**“ geschätzte Menge des Anti-**Emp**-Antikörpers als Referenz gewählt. So wird für die Elution eine Verdünnung in einem Verhältnis von 1:20 gewählt, welche unter Berücksichtigung des eingesetzten Volumens entsprechend der Schätzung in der Geltasche ~ 6,0 ng des Anti-**Emp** Antikörpers enthalten sollte. In derselben Verdünnung werden sowohl das Serum als auch DL 1 eingesetzt. Damit die Referenz voraussichtlich gut sichtbar ist, wird das aus Menschen aufgereinigte **ApoA1** in einer Menge von 50,0 ng als Kontrolle verwendet. Im zweiten *Western Blot* werden während der LDS-PAGE Bakterienlysate von *ATCC*[®] 25904[™] und 168L aufgetrennt, diese zunächst mit Serum von FS2 markiert und anschließend in der Sekundärfärbung mit dem Anti-**ApoA1**-Antikörper eingefärbt. Interagieren die bakteriellen Proteine mit **ApoA1**, sollte das in diesem *Western Blot* sichtbar werden. Um die Wirkung von Immunglobulin-bindenden Proteinen zu unterbinden, wird in der Durchführung des zweiten *Western Blots* Blockierungspuffer-Formulation 1 und Färbepuffer-Formulation 2 verwendet. Beide *Western Blots* sind in Abbildung 53 zusammengefasst.

Die Ergebnisse der *Western Blots* entsprechen nicht den Erwartungen. Eine Markierung von rekombinanten **Emp** ergibt keine Ergebnisse. Bei den Bakterienlysaten, welche vor der Sekundärmarkierung mit Serum inkubiert wurden, sind mehrere deutliche Banden zu erkennen. Hierbei zeigt sich bei dem Lysat von *ATCC*[®] 25904[™] eine markierte Proteinbande bei ~ 62,0 kDa, welche in keinem der vorherigen Versuche beobachtet wurde. Das Protein in dieser Bande ist unbekannt und bindet **ApoA1** möglicherweise direkt. Bei 168L ist eine größere Proteinbande zu erkennen, welche höchstwahrscheinlich durch **Sbi** oder **SpA** immobilisierten Sekundärantikörpern entspricht. Die beiden Proteinbanden, welche bei beiden Bakterienstämmen deutlich zu erkennen sind, haben ein Molekulargewicht zwischen ~ 28,0 und 38,0 kDa. Der ungleichmäßige Verlauf der Banden und das Fehlen der **Emp**-Bande als Markierung macht die Zuordnung dieser Banden allerdings unpräzise. Entsprechend ihrer Positionen und vergleichbarer Ergebnisse aus Kapitel 4.4 „**Überprüfung der Antikörper-Antigen-Interaktion in vitro**“ ist diese Bande mit größerer Wahrscheinlichkeit dem Immunglobulin-bindenden Protein **SSL10** zuzuordnen. Ungewöhnlich ist aber das unverhältnismäßige starke Signal, welches von dieser Bande ausgeht. Ebenso haben die Ergebnisse aus Kapitel 4.4.2.2 „**Sättigung der Immunglobulin-bindenden Proteine**“ gezeigt, dass **SSL10** durch das im Blockierungs- und Färbepuffer zugeführte Serum effektiv blockiert wird.

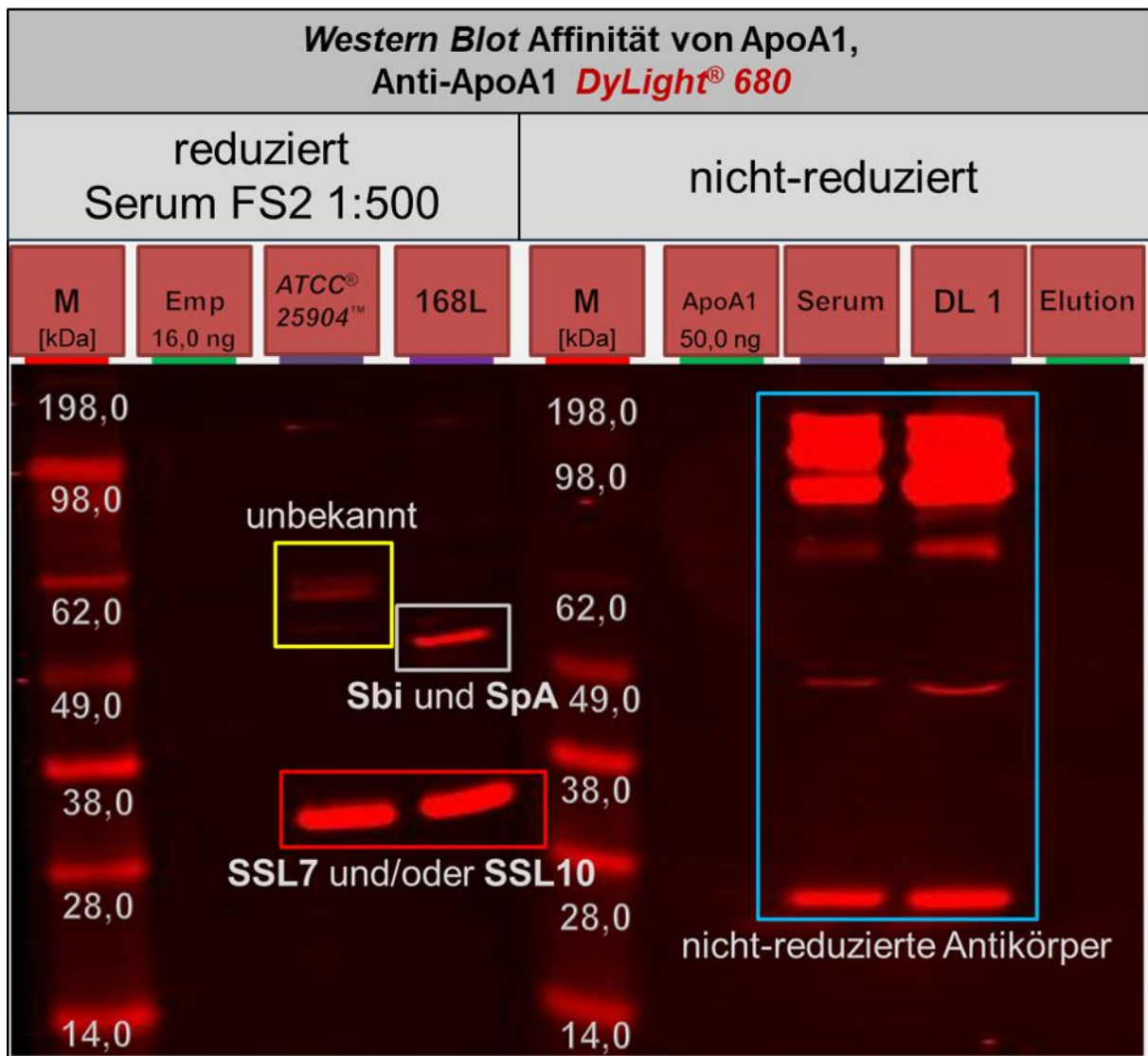


Abbildung 53: Links ist die Sekundärfärbung der mit Serum und Sekundärantikörper markierten Bakterienlysate dargestellt. Von jedem Lysat wurden 5,0 μ L eingesetzt und zusätzlich wurde in eine Tasche 16,0 ng rekombinantes **Emp** als Kontrolle pipettiert. Auf der rechten Seite ist der *Western Blot* der antikörperhaltigen Fraktionen abgebildet. Hier werden von jeder Verdünnung 1,0 μ L verwendet und zusätzlich eine Kontrolle aus 50,0 ng **ApoA1** beigefügt. Der Sekundärantikörper wird in einem Verhältnis von 1:1000 eingesetzt. Der *Western Blot* ist in Falschfarben dargestellt und Kontrast sowie Helligkeit sind um das Vierfache verstärkt.

Eine mögliche Erklärung für das starke Signal der Bande in den Bakterienlysaten findet sich möglicherweise in dem *Western Blot*, in welchen die antikörperhaltigen Proben eingesetzt wurden. Sowohl bei dem Serum als auch bei dem Durchlauf sind sechs deutliche Banden zu erkennen. Diese Banden entsprechen dem bisherigen Muster, welches sich bei der Auftrennung von nicht-reduzierten Antikörpern nach einer LDS-PAGE ergibt. Dementsprechend bindet **ApoA1** scheinbar an menschlichen Antikörpern. Vergleichsweise zeigt die Bande mit einer Größe von \sim 28,0 kDa ein stärkeres Signal als in den vorherigen Ergebnissen. Hierbei handelt es sich vermutlich tatsächlich um das im Serum befindliche, freie

ApoA1. Da das Protein nicht vollständig von den Antikörperketten getrennt wird, ist die Wechselwirkung in dieser Interaktion stark genug, um den Bedingungen einer LDS-PAGE ohne Reduktionsmittel zu trotzen. Diese Beobachtung ergänzt sich mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.3.3 „**Massenspektrometrische Analyse des Anti-Emp-Antikörpers**“, da in den Gelfragmenten der vollständigen und fragmentierten Antikörper **ApoA1** als Kontamination identifiziert wird. Aufgrund des unregelmäßigen Markers für Proteingrößen lässt sich die genaue Größe der Banden nicht ermitteln. Dies erschwert es zu bestimmen, ob und falls, wie stark die Retentionszeit der Antikörperfragmente während der LDS-PAGE durch diese Interaktion erhöht wird. Auch erlaubt es der *Western Blot* nicht zu identifizieren, ob diese Interaktion bevorzugt mit einer bestimmten Antikörperklasse stattfindet. Dementsprechend ist anzunehmen, dass das starke Signal der Bakterienlysate nicht nur von **SSL10**, sondern auch von **SSL7** stammt, welches eine starke Affinität gegenüber **IgA**^[802] und eine ähnliches Molekulargewicht wie **SSL10** besitzt^[611]. Der Einfluss des Hasenserums auf die Effektivität dieses Proteins ist nicht bekannt. Daher ist es möglich, dass ein Großteil des Signals auf immobilisiertes **IgA** zurückzuführen ist, welches mit **ApoA1** interagiert und durch den Sekundärantikörper markiert wird. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass **SSL10** oder **SSL7** eine direkte Wechselwirkung mit **ApoA1** eingehen. Hierfür gibt es aber keine bestätigende Literatur. Ebenso kann nicht ermittelt werden, ob **ApoA1** als vollständiges Protein vorliegt. Die große Abdeckung dieses Proteins, die bei der Bestimmung über MS beobachtet werden konnte, ist aber ein starker Hinweis für diese Vermutung.

Weder die Elution, noch die Kontrolle aus **ApoA1** werden während der Sekundärfärbung markiert. Da der Ursprung der Antikörper und der Kontrolle sich unterscheidet, ist es möglich, dass der Sekundärantikörper kein passendes Epitop besitzt, um das aufgereinigte **ApoA1** zu binden^[1407]. Deutlich wahrscheinlicher ist es aber, dass die in der Kontrolle und Elution verwendete Mengen zu gering für einen Nachweis sind. Sowohl der Durchlauf als auch das Serum enthalten eine große Menge an Antikörpern und **ApoA1**. Bei einem weiblichen Spender wie FS2 können die Antikörperklassen **IgA**, **IgG** und **IgM** im Blut bis zu einer Konzentration von 13,6 mg/mL^[1408] vorliegen. Für **ApoA1** kann eine Konzentration von bis zu 2,1 mg/ml erreicht werden^[1409]. Die Konzentrationen von Antikörpern ist somit schätzungsweise im Serum bis zu 118-mal so hoch wie in der Elution. Wenn davon ausgegangen wird, dass die Schätzwerte für **ApoA1** stimmen, dann ist die Konzentration im Serum vergleichsweise 18-mal so hoch. Ein Großteil der Substanzen des Serums befinden sich auch im Durchlauf, was die ähnliche Intensität der Proteinbanden in den beiden Proben erklärt. Die Magnitude in dieser Diskrepanz ist groß genug, dass es wahrscheinlich ist, dass die Menge an **ApoA1** sowohl in der Kontrolle, als auch in der Elution unterhalb der Detektionsgrenze des *Western Blots* liegen. Unterstützt wird diese Theorie durch die Information, dass **ApoA1** während der Analyse mit

MS auch in den präparierten Gelfragmenten der vollständigen Antikörper nachgewiesen wurde.

Die mäßige Qualität des *Western Blots* sowie die ausbleibende Markierung der Kontrollen, stellen die Richtigkeit der vorliegenden Ergebnisse stark in Frage. Hinzu kommt, dass in der aktuell verfügbaren Literatur keine Wechselwirkung zwischen **ApoA1** und den im Serum befindlichen Antikörpern beschrieben sind. Tatsächlich wird aber über eine mögliche Rolle von **ApoA1** in der Immunologie spekuliert^[1410]. Um eine Interaktion zwischen **ApoA1** und Antikörper im Serum zu bestätigen, müssten die Immunfärbung erneut mit besserer Qualität und sinnvolleren Kontrollen wiederholt werden. Der Fokus dieser Arbeit liegt aber nicht in der Erforschung dieser Interaktion, weshalb keine weiteren Versuche durchgeführt und beschrieben werden.

4.7 Überprüfung der Antikörperfunktion *in vivo*

In den vorherigen Kapiteln wurde sowohl die Bindung von Anti-**Emp** an **Emp** aus Wildtypen von *Staphylococcus aureus*, als auch die Affinität gegenüber vollständigen, präparierten Bakterien gezeigt. Es ist daher bewiesen, dass der Antikörper das natürlich vorkommende Protein bindet und das Bakterium erfolgreich opsonisieren kann. Allerdings ist noch unklar, ob Anti-**Emp** eine neutralisierende oder opsonisierende Wirkung auf das Bakterium hat. Um die Wirksamkeit des Antikörpers zu testen, werden deshalb komplexe und ressourcenintensive OPTA durchgeführt. In einem OPTA werden *Staphylokokken* mit Antikörpern und weiteren Substanzen zum Zweck einer Opsonisierung vermischt und anschließend mit aktivierten neutrophilen Zellen aus der *HL-60* Zelllinie inkubiert. Die Anzahl der Bakterien, welche diese gemeinsame Inkubation überleben, wird durch das Erstellen und Auswerten von Verdünnungsreihen über das klassische Tropfplattenverfahren nach Miles und Misra (1938) bestimmt^[1411]. Entsprechende Kontrollen ermöglichen es, den Einfluss jeder opsonisierenden Substanz auf die Kolonienzahl der Bakterien zu bestimmen. Der Begriff Tötungsassay ist im Falle von *Staphylokokken* allerdings irreführend, da er vorgibt, dass die Reduktion der Bakterienzahl ausschließlich durch die bakterizide Aktivität der Zellen bedingt ist. Da *Staphylococcus aureus* ein sehr komplexes Pathogen ist, welches seinen Stoffwechsel^[716] und seine Proteinexpression^[665] als Antwort auf Stress anpassen kann^[668,719,828], ist eine aktive Tötung der Bakterien durch die neutrophilen Zellen allerdings nicht garantiert. Zusätzlich besitzen *Staphylokokken* die Fähigkeit, neutrophile Zellen zu invadieren^[829] und somit einer Zerstörung zu entgehen^[150]. Wie sich das Tropfplattenverfahren auf intrazelluläre *Staphylokokken* auswirkt, ist nicht bekannt. Es ist aber davon auszugehen, dass sie gegenüber extrazellulären Bakterien aufgrund ihrer Eigenschaften ein verlangsamtes und/oder verzögertes Wachstum zeigen werden.

Zur Durchführung des OPTA wird der nach Paschall *et al.* (2019)^[162] publizierte Prozess als Vorlage verwendet und entsprechend bisheriger Ergebnisse angepasst, um die Empfindlichkeit und Effizienz des Assays zu verbessern. Eine dieser Veränderung ist es, dass anstelle von Serum aus Kaninchenbabys humanes Komplementserum (HKS) im Assay verwendet wird. Tierische Komponenten haben in vergangener Forschung bereits Ergebnisse verfälscht^[1151] und das HKS bietet sich als gute Alternative an, da es den Zellen alle notwendigen Bestandteile für eine Immunantwort liefert und den natürlichen Prozess besser simuliert. Weiterführend werden Maßnahmen ergriffen, um den immunesensitiven Eigenschaften von *Staphylococcus aureus* entgegenzuwirken. Das Bakterium wird in diesem Assay sowohl Komplemente, als auch Antikörper durch Proteasen^[814,815] und spezifische Proteine^[801,802] deaktivieren. Zur Sättigung dieser Proteine werden die Bakterien vor der Opsonisierung durch die eigentlichen Testsubstanzen mit **IgG** Hase inkubiert. Mit einer Konzentration von 2,0 mg/mL entspricht der polyklonale Antikörper aus dem Hasen ungefähr einem Drittel bis einem Achtel des im menschlichen Serum vorkommenden **IgG**^[1412] und sollte daher in dieser Funktion eine gute Wirkung erzielen. Das hitzeinaktivierte fötale Kälberserum (FKS) ist Bestandteil in allen Prozessreagenzien, welche Bakterien oder Zellen enthalten. Die darin enthaltenen Antikörper sind zwar durch die Hitze denaturiert und **SpA** hat eine geringere Aktivität gegenüber Antikörpern dieser Tierart, aber trotzdem bietet sie eine begrenzte Kapazität darin, Immunglobulin-bindende-Proteine zu sättigen^[811]. Damit diese Sättigung nicht durch die Aktivität der Proteasen neutralisiert wird, werden die Bakterien nur eine halbe statt eine volle Stunde lang mit den jeweiligen Substanzen opsonisiert. Sobald die Bakterien gemeinsam mit den Zellen kultiviert werden, dient das HKS als Quelle für zusätzliche sättigende Substanzen, da dieses sowohl Komplement, als auch Antikörper enthält. Ein weiteres größeres Problem für Durchführung des OPTA ist das toxische Potential, welches *Staphylokokken* aufgrund ihrer Expression von Leukotoxinen besitzen^[767]. Um die Wirkung dieser Toxine auf die Zellen zu begrenzen, wird der Anteil der *Staphylokokken* auf 6,0 KbE pro Zelle reduziert.

4.7.1 Wirkung der Prozesschemikalien auf *Staphylococcus aureus*

Bei der Durchführung des OPTA werden die *Staphylokokken* verschiedenen Substanzen ausgesetzt, welche bereits ohne das Einwirken von Immunzellen ihre Vitalität oder Wachstumsgeschwindigkeit beeinflussen können. Aus diesem Grund ist es essenziell, den Einfluss dieser Bestandteile auf das Wachstum der Bakterien evaluieren zu können. In einem einfachen Toxizitätstest wird die Durchführung des OPTA ohne eine Zugabe von Zellen simuliert. Hierbei wird die Konzentration der Substanzen entsprechend der tatsächlichen Bedingungen im OPTA angepasst. Die Bakterienstämme ATCC[®] 25904[™] und 168L werden während der Opsonisierungsphase mit der jeweiligen Testsubstanz vermischt. Nach Ende der

Inkubationszeit werden die Bakterien entsprechend der Substanz jeweils in eine mit Nährmedium befüllte Kavität einer Mikrotiterplatte übertragen und das Wachstum innerhalb aller Kavitäten durch periodische Messung der OD₆₀₀ in einem Lesegerät für Mikrotiterplatten bestimmt. Hat eine von den Testsubstanzen dabei einen toxischen oder neutralisierenden Effekt auf *Staphylococcus aureus*, wird die jeweilige Wachstumskurve von der Kontrolle abweichen. Als Testsubstanzen werden unter anderem Anti-**Emp** und als entsprechende Kontrollen, Anti-**Myc** und der Elutionspuffer, in welchem Anti-**Emp** gelöst ist, eingesetzt. Da die Elution, welche Anti-**Emp** enthält, auch eine größere Verunreinigung aus **ApoA1** besitzt und diese sich möglicherweise auch mit dem Antikörper assoziiert, wird der Einfluss dieses Proteins in rekombinanter Form getestet. FKS und HKS sind essenzielle Bestandteile des Assays, da sie die Zellen mit allen für die Immunabwehr notwendigen Ressourcen versorgen. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass diese Substanzen einen negativen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien haben könnten. Aus diesem Grund wird der Einfluss dieser beiden Bestandteile ebenfalls im Toxizitätstest begutachtet. Da Antikörper unabhängig von Immunzellen Komplementfaktoren binden und somit Bakterien aktiv attackieren können, werden die beiden Antikörper ebenfalls als Mixtur mit FKS und Anti-**Emp** und zusätzlich als Mixtur mit HKS getestet [51]. Das Ergebnis des Toxizitätstestes wird für die jeweiligen Bakterienstämme in den Diagrammen 10 und 11 dargestellt.

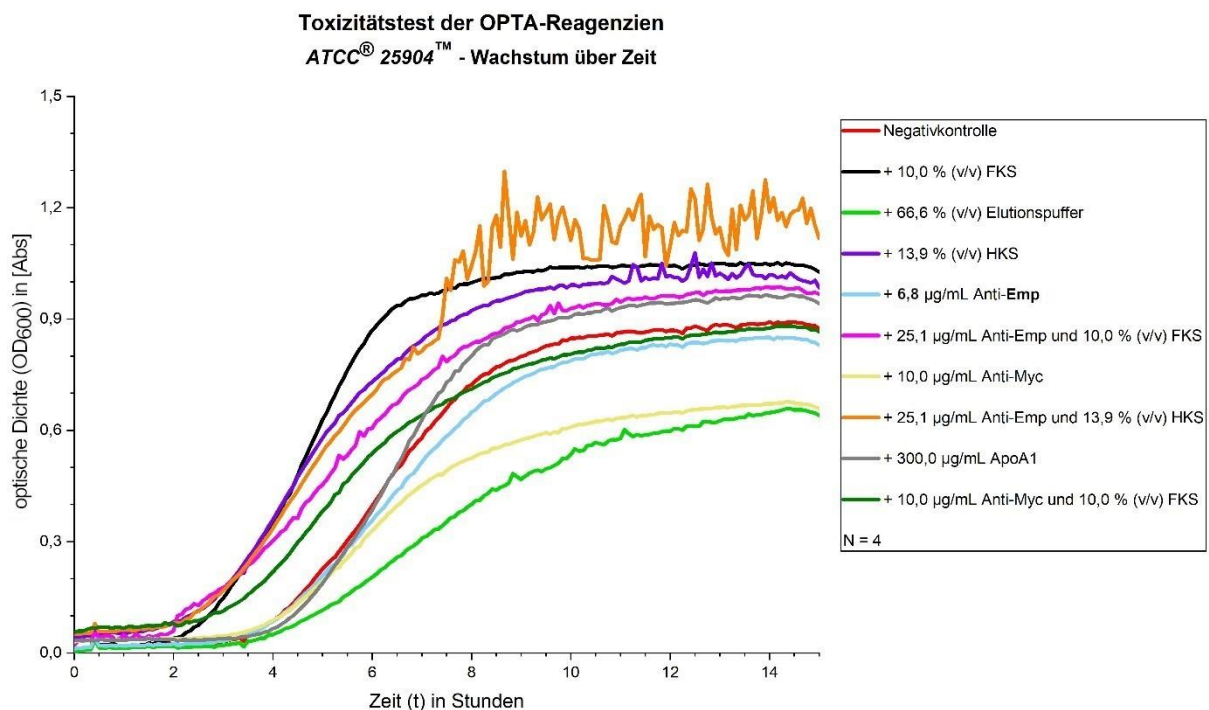


Diagramm 10: Zunahme der OD₆₀₀ innerhalb eines Zeitraums von 15 Stunden von *Staphylococcus aureus* ATCC® 25904™, nach einer anderthalbstündigen Inkubation mit den in der Legende genannten Substanzen. Alle Messwerte sind entsprechend der Messungen einer Blindprobe gegen das Nährmedium geeicht.

**Toxizitätstest der OPTA-Reagenzien
168L - Wachstum über Zeit**

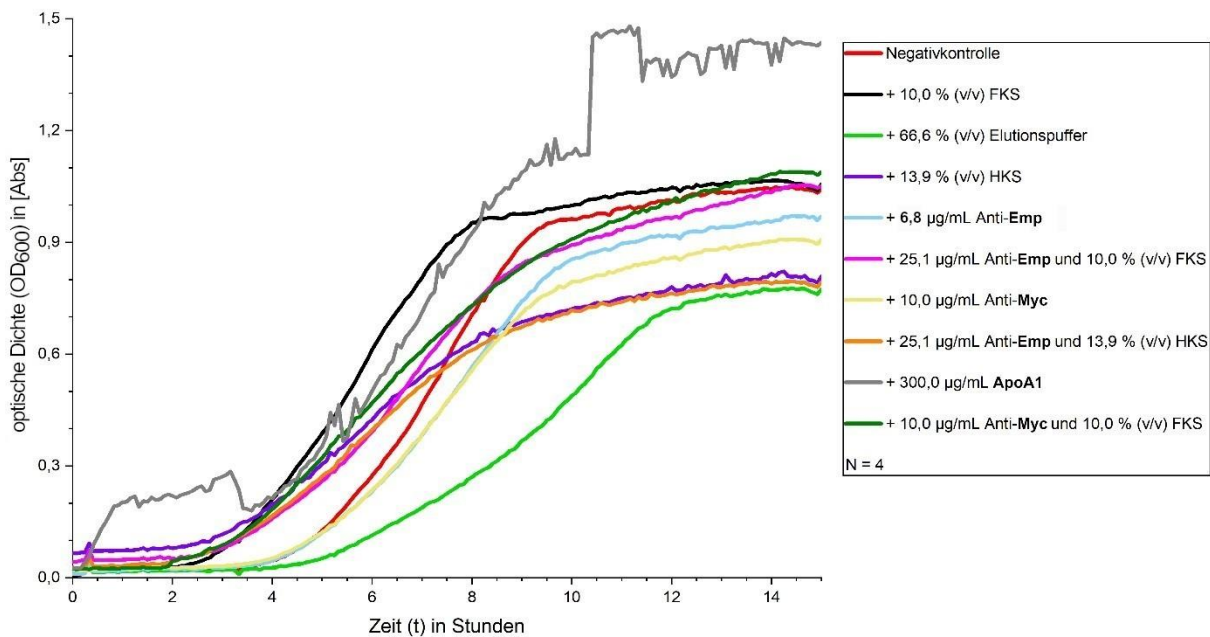


Diagramm 11: Zunahme der OD₆₀₀ innerhalb eines Zeitraums von 15 Stunden von *Staphylococcus aureus* 168L, nach einer anderthalbstündigen Inkubation mit den in der Legende genannten Substanzen. Alle Messwerte sind entsprechend der Messungen einer Blindprobe gegen das Nährmedium geeicht.

Im Toxizitätstest von *ATCC*[®] 25904[™] zeigen der Elutionspuffer und der Anti-**Myc**-Antikörper einen deutlichen negativen Einfluss auf das Wachstum. Der Anti-**Emp**-Antikörper hat ein geringfügig schlechteres Wachstum als die Kontrolle, was vermutlich auf die toxische Wirkung des Elutionspuffers zurückzuführen ist. Bei dieser geringen Effektivität ist eine neutralisierende Wirkung des Antikörpers eher unwahrscheinlich. Tatsächlich kann aber das im Elutionspuffer enthaltene Natriumcitrat antibakteriell wirken ^[1413]. Das FKS und HKS sowie **ApoA1** wirken sich wachstumsfördernd auf die Bakterien aus und werden von diesen wahrscheinlich als zusätzliche Nahrungsquelle verwendet. Der fördernde Effekt von FKS und HKS ist hierbei so stark, dass dieser die toxischen Effekte des Anti-**Myc**-Antikörpers und des Elutionspuffers in Mixturen ausgleicht. Es ist unwahrscheinlich, dass der Anti-**Myc**-Antikörper selbst den toxischen Effekt verursacht. Wahrscheinlicher ist es, dass der Puffer toxische Bestandteile wie beispielsweise Natriumazid enthält und diese das Wachstum der Bakterien limitieren. Da es sich bei diesem Antikörper nicht um ein kommerzielles Produkt handelt, lässt sich die Zusammensetzung des Puffers nicht exakt bestimmen. Der Messwert für das Gemisch aus Anti-**Emp** und HKS erreicht die Detektionsgrenze des Plattenlesegerätes, wodurch fortlaufende Messungen ungenauer werden und Messartefakte entstehen.

Der Toxizitätstest von 168L zeigt für den Elutionspuffer, Anti-**Myc** und Anti-**Emp** eine ähnliche Reduktion, wie sie bei *ATCC*[®] 25904[™] bereits beobachtet wurde. Ein verbessertes Wachstum der Bakterien wird nur bei der Zugabe von **ApoA1** beobachtet. Allerdings ist der Betrag dieser Zunahme durch ein Messartefakt verfälscht. HKS hat tatsächlich eine hemmende Wirkung auf das Wachstum des Bakteriums. Es ist anzunehmen, dass das Komplementserum Bestandteile enthält, welche toxisch auf diesen Bakterienstamm wirken oder ihn zur Reduktion seiner Teilungsrate animieren. Das FKS hat keinen direkten Einfluss auf das Wachstum des Bakteriums, scheint aber dem Bakterium zu ermöglichen, den toxischen Effekt des Anti-**Myc**-Antikörper in der Mixtur zu reduzieren.

Beide Toxizitätstests zeigen, dass die Bestandteile des OPTA einen substantiellen Einfluss auf das Wachstum und Vitalität der Bakterien haben können. Die Kontrollen in dem Assay sind allerdings so konzipiert, dass die Testsubstanzen, welche während der Opsonisierung hinzugefügt werden, die einzige sich ändernde Variable ist. Dementsprechend kann ein Unterschied in der Kolonienzahl im Normalfall auf die opsonisierende Substanz zurückgeführt werden. Bei einer zu starken Einflussnahme wird allerdings die Vitalität der Bakterien kompromittiert, wodurch sie für weitere Einflüsse anfälliger sind und das Ergebnis somit verfälscht wird. Aus diesem Grund müssen die Puffer aller während des OPTA getesteten Substanzen durch eine Entsalzungssäule mit Opsonierungspuffer getauscht werden. Das HKS lässt sich als Versuchsreagenz nicht ersetzen. Eine eventuelle Einflussnahme dieser Komponente auf das Ergebnis von 168L wird aber berücksichtigt.

4.7.2 Affinität der Prozesschemikalien gegenüber Emp

In der Durchführung des OPTA werden HKS, FKS sowie **IgG** Hase verwendet. Alle diese Substanzen haben die Möglichkeit, **Emp** direkt oder als Kreuzreaktion zu binden. Ihre Konzentration ist im Vergleich zu den Testsubstanzen zwar geringfügig, sollte aber dennoch berücksichtigt werden. Zur Überprüfung der Affinität werden diese drei Substanzen deshalb zur Primärfärbung auf jeweils einen Peptid-Mikroarray in 16er-Konfiguration aufgetragen. Als Kontrolle wird hierbei das Serum von FS3 verwendet, welches der Ursprung der Elution des Anti-**Emp**-Gemisches ist und dem Reagenz entspricht, welches während des OPTA als Testsubstanz verwendet werden soll. Aufgrund der Verfügbarkeit werden die Primärfärbung von FKS und **IgG** Hase mit Sekundärantikörpern markiert, welche mit Cy[™]3 anstelle von *DyLight*[®] 680 konjugiert sind. Aufgrund der Kompatibilität wird dieses Fluorophor mit einem anderen Gerät ausgewertet. Die markierten Peptidarrays sind in Abbildung 54 präsentiert.

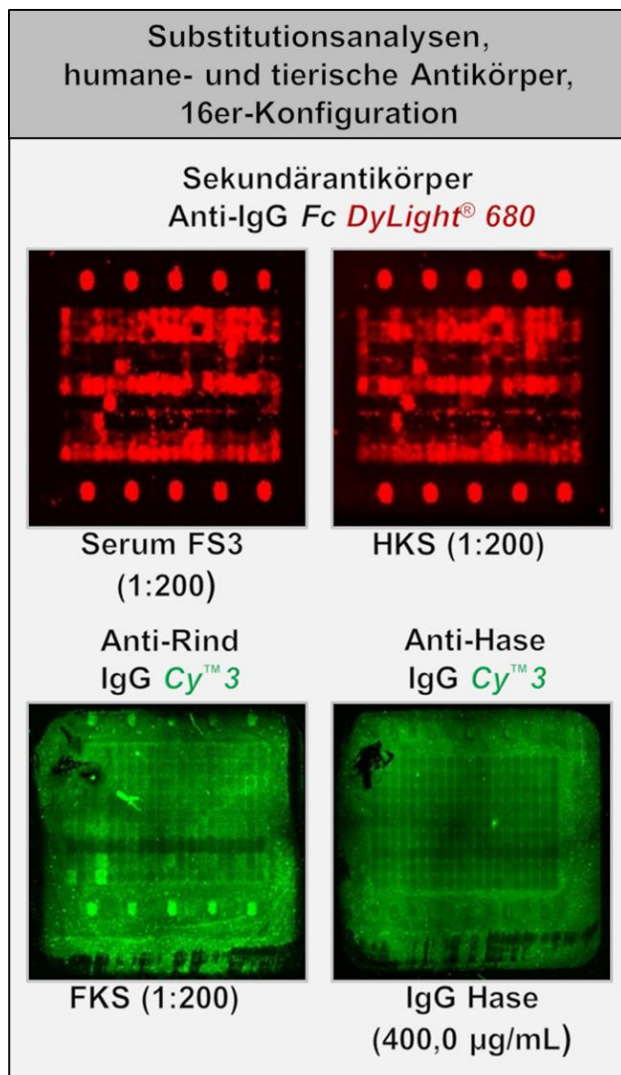


Abbildung 54: Nach der Primärfärbung werden alle Peptidarrays mit ihrem jeweiligen Sekundärantikörper in einem Verhältnis von 1:5000 eingefärbt. Die Intensitäten der oberen beiden Arrays werden als Graustufenbilder zu gleichen Bedingungen detektiert und in Messwerte umgewandelt. Zur besseren Sichtbarkeit werden alle Bilder in Falschfarben dargestellt. Zusätzlich wird Kontrast und Helligkeit der beiden unteren Arrays um das 20-fache verstärkt.

Der Peptid-Mikroarray, welcher in der Primärfärbung durch HKS markiert wurde, zeigt ein ähnlich starkes Signal wie das Serum von FS3 bei gleicher Verdünnung. Das bedeutet, dass sich im HKS tatsächlich Anti-**Emp**-Antikörper befinden und diese einen Einfluss auf den OPTA nehmen können. Um diesen Einfluss ins Verhältnis zu setzen, wird die GFI aus den Messergebnissen der Sekundärfärbungen der beiden menschlichen Seren berechnet und verglichen. Darüber hinaus wird aus den in Kapitel 4.2.3 „**Weitere Affinitätschromatographien**“ für die Ausbeute berechneten Werten bestimmt, wie stark das Eluat im Vergleich zum Serum konzentriert ist. Das HKS hat in der aktuellen Färbung der Mikroarrays eine GFI, welche 78,5 % der GFI des Serums von FS2 entspricht. Im selben Volumen ist die Signalstärke des Eluats bei der Sekundärfärbung um fast das Achtfache stärker als das Serum, aus dem es aufgereinigt wurde. Im OPTA selbst beträgt die Konzentration des HKS während der gemeinsamen Kultivierung von *HL-60* Zellen und *Staphylokokken* 13,9 % (v/v). Das Eluat mit dem Anti-**Emp**-Antikörper wird in einem Verhältnis von 1:1 verwendet. Aus dem Produkt dieser Faktoren ergibt sich, dass die Anti-**Emp**-Antikörper im HKS eine Affinität auf das **Emp** haben, welche maximal 2,8 % des eingesetzten

Eluats entsprechen. Eine so geringe Einflussnahme wird voraussichtlich durch die SA überwogen und ist deshalb vernachlässigbar. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass HKS weitere Antikörper besitzt, welche *Staphylococcus aureus* opsonisieren könnten ^[150]. Diese liegen im Test selbst aber ebenso nur in verdünnter Konzentration vor und kommen erst nach der Opsonisierung mit den Bakterien in Kontakt. Um dennoch einen möglichen Einfluss auf die Bakterien zu untersuchen, wird jedem Test eine Kontrolle beigefügt, welche die Effektivität der Zellen im Nährmedium mit HKS ohne Zugabe von weiteren Substanzen testet.

Die Färbung von **IgG** Hase bringt auch bei einer 20-fachen Verstärkung des Signals keine markierten Peptidspots hervor. Es ist deshalb nicht damit zu rechnen, dass dieses Reagenz den Versuch beeinflussen wird. Das Ergebnis von FKS hat bei derselben Signalverstärkung einen gefärbten Rahmen aus Poliomyelitis-Peptiden und weist drei Signale bei Peptiden auf, welche denen der Aminosäuresequenzen ‚HYAPEFKGSLPAPRV‘, ‚HYVEEFKGSLPAPRV‘ und ‚HYEPEFKGSLPAPRV‘ entsprechen. Alle drei dieser Peptidspots zeigen in den mit menschlichem Serum gefärbten Arrays normalerweise ein gut erkennbares Signal. Aufgrund der sehr schwachen Signalstärke ist aber nur von einer geringfügigen potentiellen Beeinflussung der Ergebnisse durch FKS auszugehen.

4.7.3 Einfacher OPTA

Um die Komplexität des OPTA zunächst zu reduzieren, werden nur die Bakterienstämme ATCC® 25904™ und 168L in dreifacher Ausführung in dem Assay untersucht. Die Bakterien werden hierbei bis zur stationären Phase kultiviert, damit sie über genug Zeit verfügen, um **Emp**, beziehungsweise **Emp_A** zu exprimieren. Als opsonisierende Substanz wird ein Eluat von FS3 in halber Konzentration verwendet. Entsprechend der Ergebnisse der Proteinbestimmung aus Kapitel 4.2.4 „Optimierte Bestimmung der Proteinmenge“ enthält dieses Eluat ein Gemisch aus Antikörpern mit einer Konzentration von 112,8 µg/mL. Es ist davon auszugehen, dass nicht alle, aber ein großer Anteil dieser Antikörper der **IgG**-Klasse zugehörig ist. Während der Affinitätschromatographie wurde ein Anteil der Antikörper irreversibel denaturiert. Mit der Annahme, dass alle Anti-**Emp**-Antikörper aus dem Serum entfernt wurden, lässt sich die Ausbeute für eine Annäherung nutzen, um die Menge an funktionsfähigen Antikörpern innerhalb des Eluats zu schätzen. Dementsprechend sollte das Gemisch bei einer Ausbeute von 27,2 % eine Konzentration von ~ 10,2 µg/mL an funktionsfähigen Antikörpern während der Opsonisierung besitzen. Dies entspricht abhängig von dem Antikörpergehalt einer Person, einem Minimum von ~ 6,7 ‰ des im Serum vorkommenden **IgG** ^[1412] oder 2,3 % der Konzentration von Antikörpern, welche durchschnittlich in einem Serum gegen *Staphylococcus aureus* gerichtet sind ^[281]. Vergleichsweise entspricht diese Antikörperkonzentration der sechsfachen Konzentration, welche für einen effektiven Schutz

gegen Tetanus benötigt wird^[1414,1415]. In dieser Menge sollte der Antikörper einen merklichen Einfluss auf die Anzahl der Bakterienkolonien haben, wenn er in seiner opsonisierenden Wirkung die Phagozytose der neutrophilen Zellen unterstützt. Um eine mögliche Wirkung von anderen Einflüssen als von der opsonisierenden Substanz auszuschließen, wird die Basis für Probe und korrespondierende Kontrolle im selben Gefäß angesetzt und erst nach der Opsonisierung voneinander getrennt. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Ansätzen ist die Zufuhr der *HL-60* Zellen in der Probe. Ein möglicher natürlicher bakterizider Einfluss der *HL-60* Zellen wird evaluiert, indem für jeden getesteten Bakterienstamm eine weitere Kontrollreihe hinzugefügt wird, in welcher außer den Zellen keine weiteren Additive beigefügt werden.

Die Bereitschaft zur Phagozytose der differenzierten Zellen wird vor dem Beginn jedes OPTA *via FACS* bestimmt. Hierbei wird der Anteil an differenzierten Zellen über das Verhältnis der an der Oberfläche präsentierten Unterscheidungsgruppen bestimmt, welche diese Zellen präsentieren. Die zwei Unterscheidungsgruppen sind in diesem Fall **CD35** und **CD71** und für eine angemessene Bereitschaft muss der Anteil von **CD35** größer als 55,0 % sein und der Anteil von **CD71** unter 20,0 % liegen^[162]. Bei diesem Assay liegt dieser Anteil bei 86,7 %, beziehungsweise 20,3 %, daher ist von einem für die Phagozytose geeignetem Gemisch an neutrophilen Zellen auszugehen. Die entsprechend Messungen des *FACS* sind in Anlage 4 im Anhang beigefügt.

Bei der Auswertung der durch Tropfplattenverfahren generierten Kulturplatten ist es nicht empfehlenswert, die Zählung verschiedener Verdünnungsreihen miteinander zu verrechnen, da die Genauigkeit dadurch reduziert wird^[1416]. Eine Auszählung wird deshalb auf die Verdünnung begrenzt, welche die größte noch zählbare Menge an Bakterienkolonien zeigt. Für gewöhnlich wird bei der Zählung das Maximum der zählbaren Menge an Kolonien auf 300,0 KbE begrenzt, da es nach diesem Punkt schwierig wird, die Kolonien eindeutig auseinander zu halten^[1417]. Moderne Kamertechnik, unterstützt durch digitale Hilfsmittel, ermöglicht aber entsprechend der Erfahrung während dieser Arbeit die eindeutige Zuordnung von mehr als 600,0 KbE. Nach der Auszählung wird für jeden Bakterienstamm die durchschnittliche Konzentration in KbE/mL berechnet. Eine Zusammenfassung der kultivierten Nährplatten ist in Abbildung 55 dargestellt. Die Hochrechnung der Auszählung wird in Diagramm 12 präsentiert. Die Nährplatten von beiden Bakterienkulturen zeigen in den beiden niedrigsten Verdünnungen an der Stelle der Innokulation gut und zahlreich entwickelte Kolonien. Beide Bakterienstämme zeigen sehr ähnliche Kolonien mit derselben Farbe. Der Tropfen, welcher zur Innokulation verwendet wurde, hat sich in einigen Platten allerdings verschoben, was die Genauigkeit der Zählung reduziert und somit die SA erhöht.

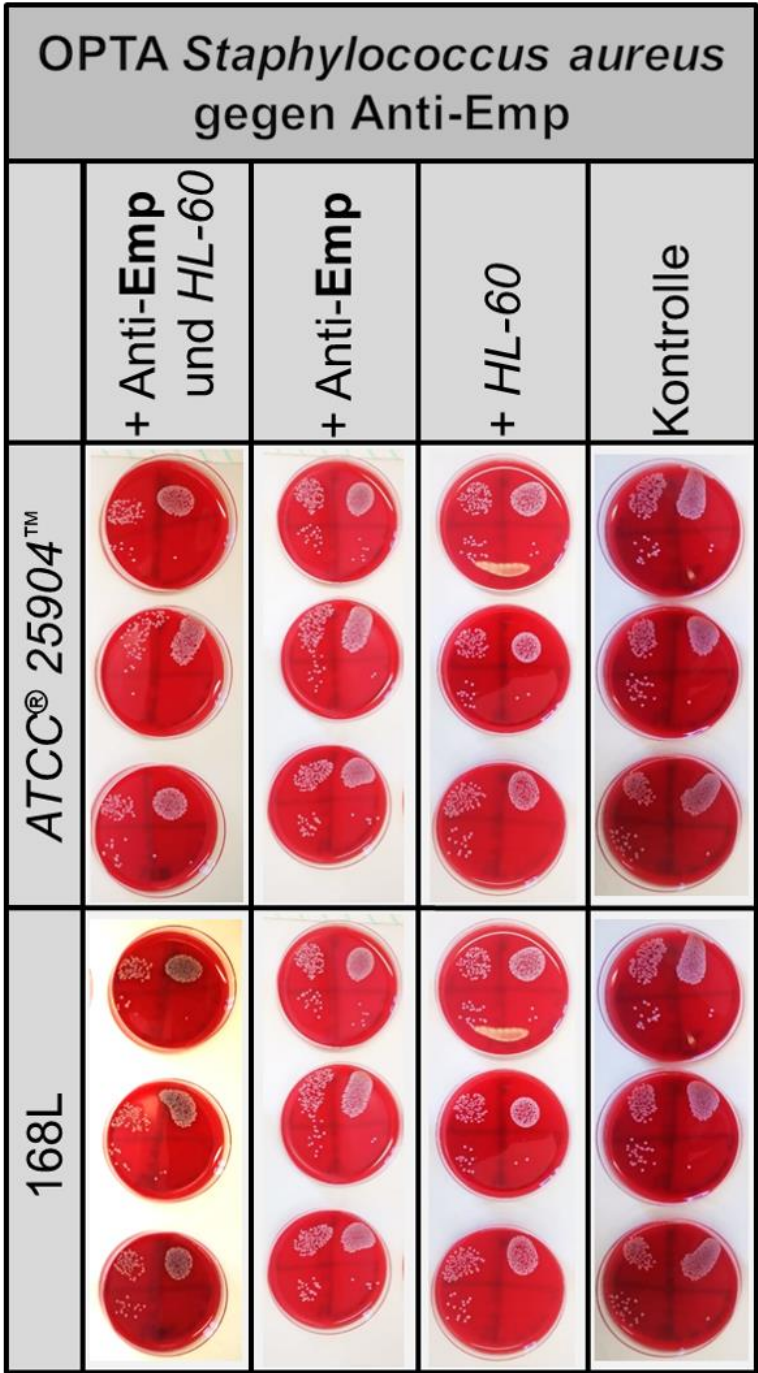


Abbildung 55: *Columbia*-Agar mit 5,0 % Schafsblut (*Columbia* Agar), bewachsen mit Kolonien von *Staphylokokken*. Die Bakteriensuspension mit der kleinsten Verdünnung hat eine Potenz von 10^{-1} und wurde im unteren rechten Viertel jeder Platte mit einem Tropfenvolumen von 50,0 μL aufgetragen. Die Potenz der für die Innokulation verwendeten Verdünnungen nimmt im Uhrzeigersinn bis zu einem maximalen Verdünnungsfaktor von 10^4 zu.

Bei der Verdünnung mit der kleinsten Potenz ist die Anzahl der Kolonien zu hoch, um diese präzise zu bestimmen. Aus diesem Grund wird für die Auswertung die Verdünnung mit einer höheren Potenz ausgewählt. Bereits auf den Kulturplatten ist ersichtlich, dass die Kontrollen eine deutlich niedrigere Kolonienzahl zeigen als die Proben. Diese Differenz ist allerdings auch in der Kontrolle zu sehen, welche nur die Aktivität der Zellen bestimmt. Es ist daher anzunehmen, dass der Einfluss der *HL-60* Zellen sich bereits ohne Opsonisierung deutlich auf die Kolonienzahl auswirkt.

Aus der Kolonienzählung wird ersichtlich, dass der Bakterienstamm *ATCC*[®] 25904[™] generell über eine kleinere Verdopplungszeit als 168L verfügt, da er deutlich mehr Kolonien ausbildet. Allerdings kann diese Beobachtung auch auf die Wirkung des HKS zurückgeführt werden, welche entsprechend Kapitel 4.7.1 „**Wirkung der Prozesschemikalien auf *Staphylococcus aureus***“ eine hemmende Wirkung auf diesen Bakterienstamm hat. Durch die Kontrollreihe, welche nur Zellen und Bakterien enthält, wird die Anzahl an Kolonien ersichtlich, welche alleinig durch die Wirkung von neutrophilen Zellen reduziert wird. Von dieser Reduktion sind beide Bakterienstämme betroffen. Hierbei wird die Anzahl an zählbaren Kolonien bei *ATCC*[®] 25904[™] um 34,6 % und bei 168L um 22,3 % reduziert. Wie bereits erwähnt, kann hierbei nicht bestimmt werden, ob die Zellen die Bakterien aktiv töten oder die Reduktion eine Reaktion der Bakterien auf die Zellen ist. Auch ist es möglich, dass eine Phagozytose, welche nicht tödlich verläuft, bereits die Kolonienzahl reduzieren kann ^[150].

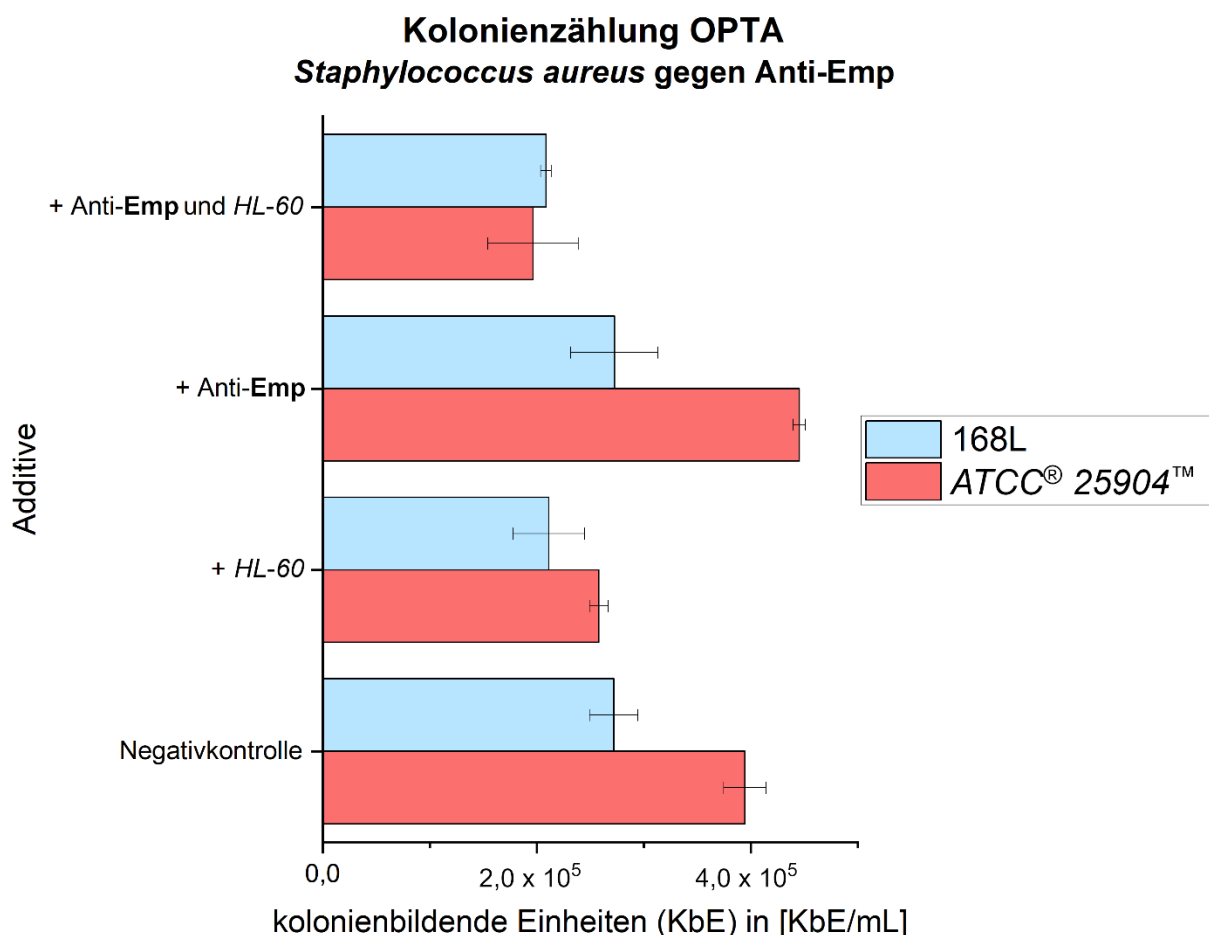


Diagramm 12: Auswertung und nachfolgende Hochzählung der Bakterienkolonien zur Berechnung der durchschnittlichen Konzentration an kolonienbildenden Einheiten der *Staphylokokken* in jeder Testreihe.

Die Zugabe des Anti-**Emp**-Antikörpers trägt zu einer kumulativen Reduktion der Kolonienzahl bei, allerdings wird diese aufgrund des Wirkens der neutrophilen Zellen in Diagramm 12 nur verfälscht dargestellt. Zum besseren Hervorheben der Wirkung der Antikörper werden die Daten deshalb zusätzlich in einem Viabilitätsdiagramm dargestellt. In diesem Diagramm wird

die errechnete Konzentration der Kolonienzahl innerhalb der Probe in Relation zu der entsprechenden Kolonienzahl in der Kontrolle gestellt. Die Differenz zwischen Probe und Kontrolle wird als Fraktion definiert, welche die durch die opsonisierende Substanz verursachte Reduktion darstellt. Die Anzahl der Kolonien in der Probe wird hierbei als die Fraktion der Bakterien betrachtet, welcher trotz der Wirkung der Substanz noch aktiv proliferieren kann. Zusätzlich wird in diesem Diagramm die relative Menge an Bakterienkolonien, deren Entwicklung durch den Einfluss der neutrophilen Zellen verhindert wurde, als weitere Fraktion dargestellt. Um zu bestimmen, ob die kombinatorische Wirkung der Zellen und Anti-**Emp** einen signifikanten Unterschied in der Kolonienzahl induziert, wird eine ANOVA mit der Anzahl der gezählten Kolonien entsprechender Proben und Kontrollen durchgeführt. Für die Kontrollen der Proben mit opsonisierenden Substanzen würden in einer ANOVA allerdings ein verfälschtes Ergebnis angezeigt werden, da der Effekt der Zellen kumulativ auf die Proben einwirkt. Um diesen Effekt in der Analyse auszuschließen, wird die Anzahl der gezählten Kolonien auf jeder mit Anti-**Emp** vermischten Kontrolle durch Interpolation auf einen Wert geschätzt, den sie haben würde, wenn sie Zellen enthalten hätte. Als Faktor für diese Interpolation wird der Koeffizient aus der Probe, welche nur Zellen enthält, und der Negativkontrolle gebildet. Die resultierenden Schätzwerte werden anschließend in der ANOVA mit den gezählten Kolonien der entsprechenden Probe verglichen. Das Viabilitätsdiagramm wird in Diagramm 13 gezeigt. Die Ergebnisse der ANOVA sind bereits in dem Diagramm integriert.

Im Viabilitätsdiagramm ist zu erkennen, dass die *HL-60* Zellen einen größeren Einfluss auf die Proliferation der Bakterien nehmen als die Anti-**Emp** Antikörper. Ihre Wirkung auf *ATCC*[®] *25904*[™] ist hierbei stärker als auf 168L. Trotz der merklichen Beteiligung der Zellen ist die entsprechende Reduktion bei 168L nicht signifikant. Dies liegt an dem relativen hohen Standardfehler der Messwerte innerhalb der ANOVA. Wirken sowohl Anti-**Emp**, als auch die Zellen auf die *Staphylokokken* ein, so ist nur bei *ATCC*[®] *25904*[™] eine signifikante Reduktion der Kolonienzahl zu beobachten. Da diese Reduktion nur bei *ATCC*[®] *25904*[™] zu beobachten ist, bedeutet das, dass Anti-**Emp** über opsonisierende Eigenschaften verfügt, welche den neutrophilen Zellen eine verbesserte Phagozytoseaktivität ermöglicht. Hat das exprimierte **Emp** nicht das korrekte Epitop, so wie es bei **Emp_A** der Fall ist, bleibt diese Reduktion aus. Die Wirkung des Anti-**Emp**-Antikörpers in Kombination mit den *HL-60* Zellen reicht allerdings nicht aus, um die Bakterien zu eliminieren. Auch wurde in veröffentlichten Studien bereits gezeigt, dass die Phagozytose von *Staphylokokken* durch neutrophile Zellen nicht zwangsläufig zu deren Zerstörung führt ^[150].

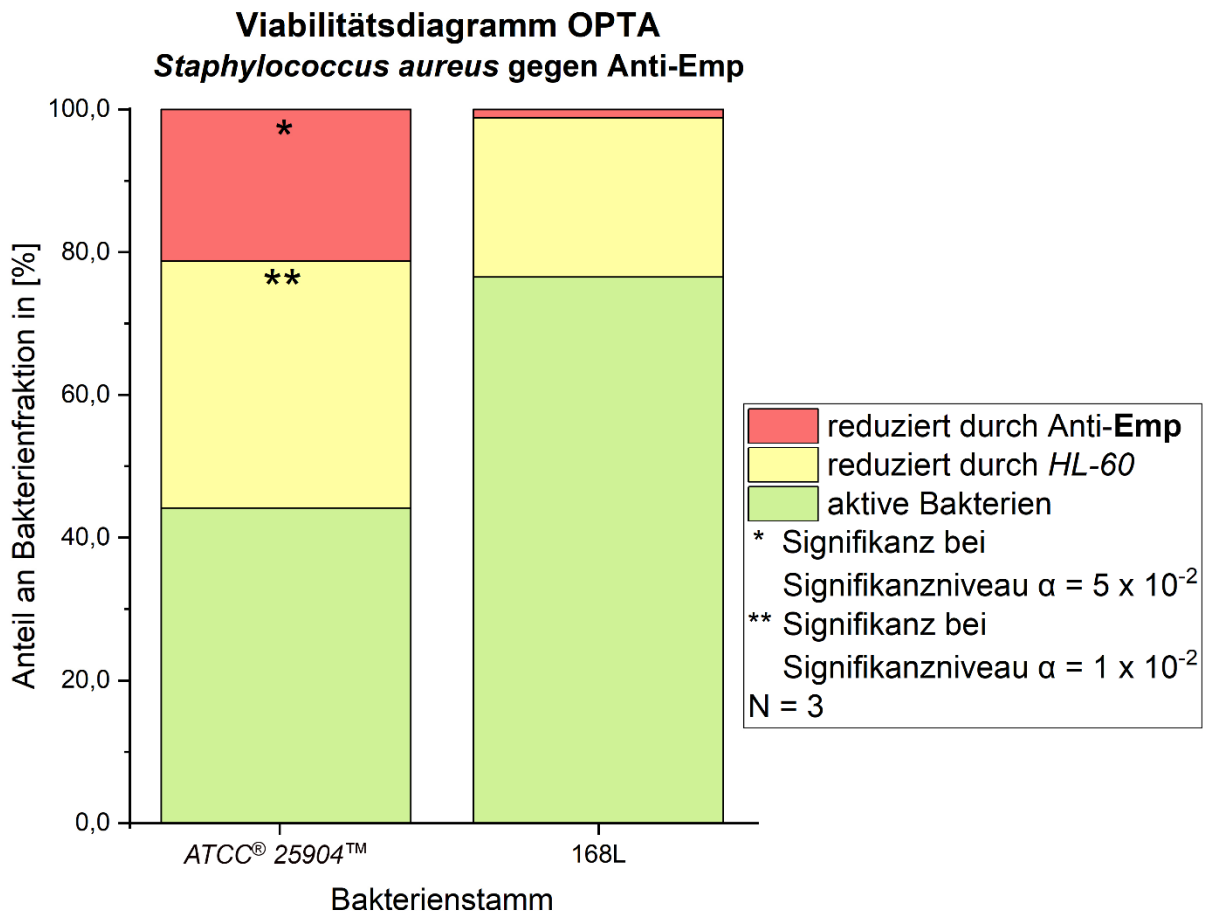


Diagramm 13: Die Differenzen in der Anzahl der Kolonien zwischen Proben und Kontrollen aus der Kolonienzählung in Diagramm 12, dargestellt als Viabilitätsdiagramm. Jede Bakterienfraktion ist als Stapel eines Säulendiagramms dargestellt. Wenn die Wirkung von *HL-60* Zellen oder Anti-Emp eine signifikante Reduktion in der Anzahl der gezählten Bakterienkulturen verursacht, wird das entsprechend an der Spitze jedes Stapels angegeben.

Der genaue Anteil an getöteten *Staphylokokken* ist über diese Methode nicht zu ermitteln. Die Methodik im Assay selbst ist sehr fehleranfällig, was sich stark auf die Ergebnisse der Triplikate auswirken kann. Entsprechend hat der über die ANOVA bestimmte Standardfehler bei nur drei Stichproben einen großen Einfluss darauf, ob ein Ergebnis als signifikant oder insignifikant eingestuft wird.

4.7.4 Komplexer OPTA

Ergänzend zu der Durchführung eines einfachen OPTA wird in einem weiteren Versuch die Komplexität des Assay erhöht. Hierbei wird ein weiterer Bakterienstamm, nämlich USA300, als Testobjekt eingeführt und die Bandbreite an Testsubstanzen für die Oponisierung erhöht. USA300 hat eine größere Virulenz als *ATCC*[®] 25904[™] [1088] und zeigt entsprechend Kapitel 4.4 „Überprüfung der Antikörper-Antigen-Interaktion *in vitro*“ eine deutlich größere Kapazität darin, durch seine Immunglobulin-bindenden Proteine Antikörper zu immobilisieren. Dementsprechend ist es im Assay schwieriger, diesen Bakterienstamm erfolgreich zu opsonisieren. Als zusätzliche Testsubstanzen werden der Anti-**Myc**-Antikörper und **ApoA1** eingesetzt. Des Weiteren wird eine zusätzliche Testreihe ohne die Zugabe von **IgG** Hase eingeführt, um die Auswirkung dieser Substanz auf die Bakterienkolonien einschätzen zu können. Die Elution aus der Affinitätschromatographie von FS3 wird wie zuvor mit einer geschätzten Konzentration von ~ 15,3 µg/mL eingesetzt. Anti-**Myc** und **ApoA1** werden in einer Konzentration von jeweils 15,0 µg/mL und 299,0 µg/mL verwendet. Der Puffer aller Substanzen wird zuvor durch eine Entsalzungssäule mit Oponisierungspuffer getauscht. In diesem Assay liegt der gemessene Anteil von **CD35** innerhalb der differenzierten neutrophilen Zellen bei 65,3 %. Der Anteil von **CD71** liegt derweil bei 16,1 %. Die entsprechenden Messungen der *FACS* sind in Anlage 5 im Anhang beigefügt. Während die Differenzierung dieser Zellen für die Durchführung des OPTA ausreichend ist, unterscheidet sie sich doch deutlich von den differenzierten Zellen, welche im einfachen OPTA eingesetzt wurden. Der reduzierte Anteil von **CD35** bedeutet, dass sich in dem Zellgemisch weniger neutrophile Zellen aus späten Entwicklungsstufen [161] befinden und im Gemisch deshalb auch intermediäre Entwicklungsstufen zu erwarten sind. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass der Einfluss der Zellen sich in diesem Assay sich von dem Einfluss der Zellen im einfachen Assay unterscheiden wird. Die durch Tropfplattenverfahren innokulierten Nährplatten werden im Zustand nach der Inkubation in Abbildung 56 gezeigt. Eine aus der Auszählung erstellte Kolonienzählung ist in Diagramm 14 dargestellt.

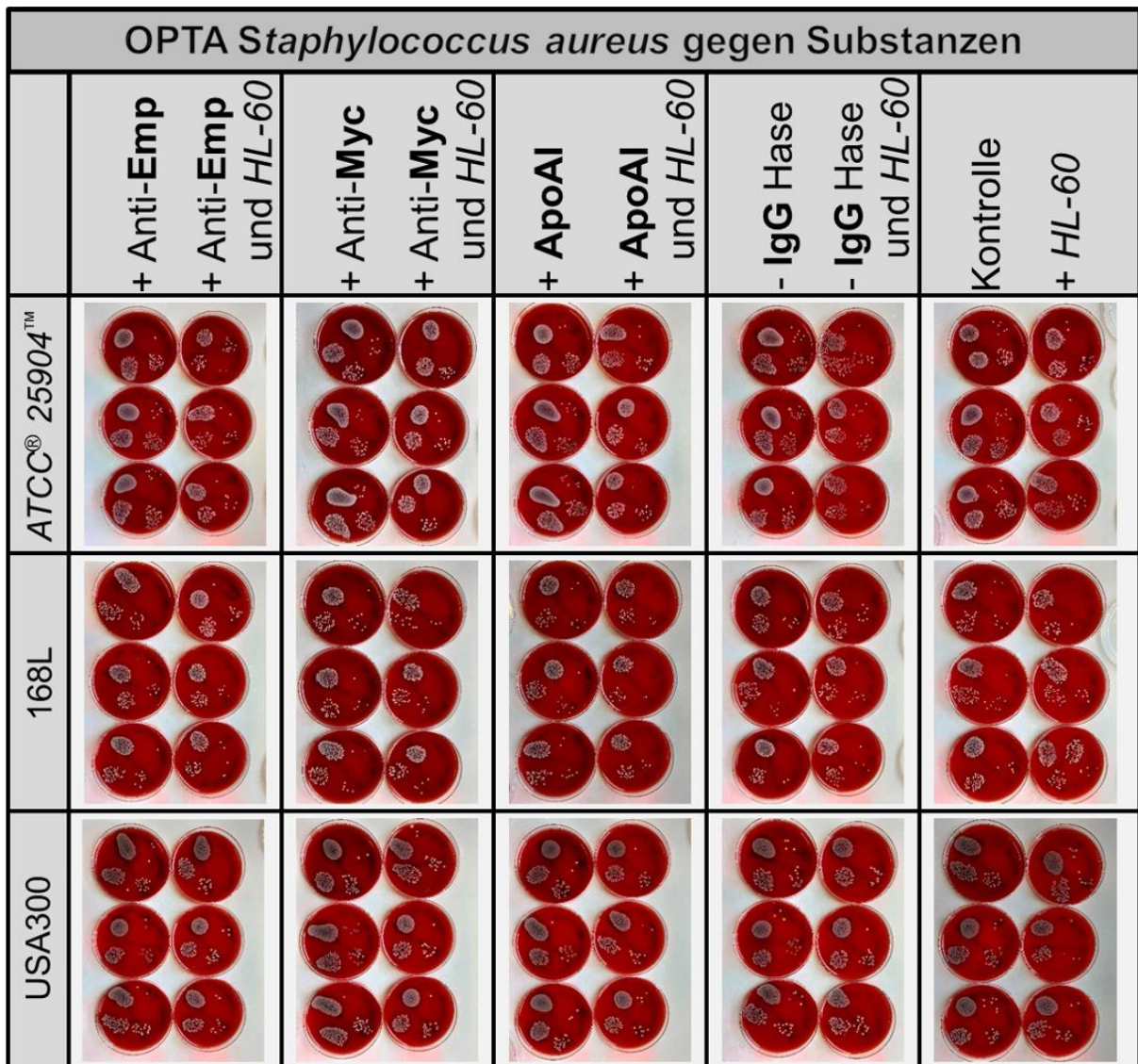


Abbildung 56: Columbia-Agar, bewachsen mit Kolonien von *Staphylokokken*. Die Bakteriensuspension mit der kleinsten Verdünnung hat eine Potenz von 10^{-1} und wurde im oberen rechten Viertel jeder Platte mit einem Tropfenvolumen von $50,0 \mu\text{L}$ aufgetragen. Die Potenz der für die Innokulation verwendeten Verdünnungen nimmt im Uhrzeigersinn bis zu einem maximalen Verdünnungsfaktor von 10^4 zu.

In diesem OPTA zeigt 168L ein deutlich reduzierteres Wachstum gegenüber den anderen beiden Bakterienstämmen. Die Bakterienkolonien von USA300 zeigen im Vergleich mit den Kolonien der anderen *Staphylokokken* eine dunklere Farbe. Das generelle Wachstum von diesem Bakterienstamm ist etwas schlechter als das von ATCC® 25904™. In den beiden Verdünnungen mit der niedrigeren Potenz sind gut entwickelte und zahlreiche Kolonien für eine Zählung vorzufinden. Für ATCC® 25904™ und USA300 werden für die Auszählung die Verdünnung mit der Potenz 10^{-2} und für 168L die Verdünnung mit der Potenz 10^{-1} ausgewählt.

Kolonienzählung OPTA *Staphylococcus aureus* gegen Substanzen

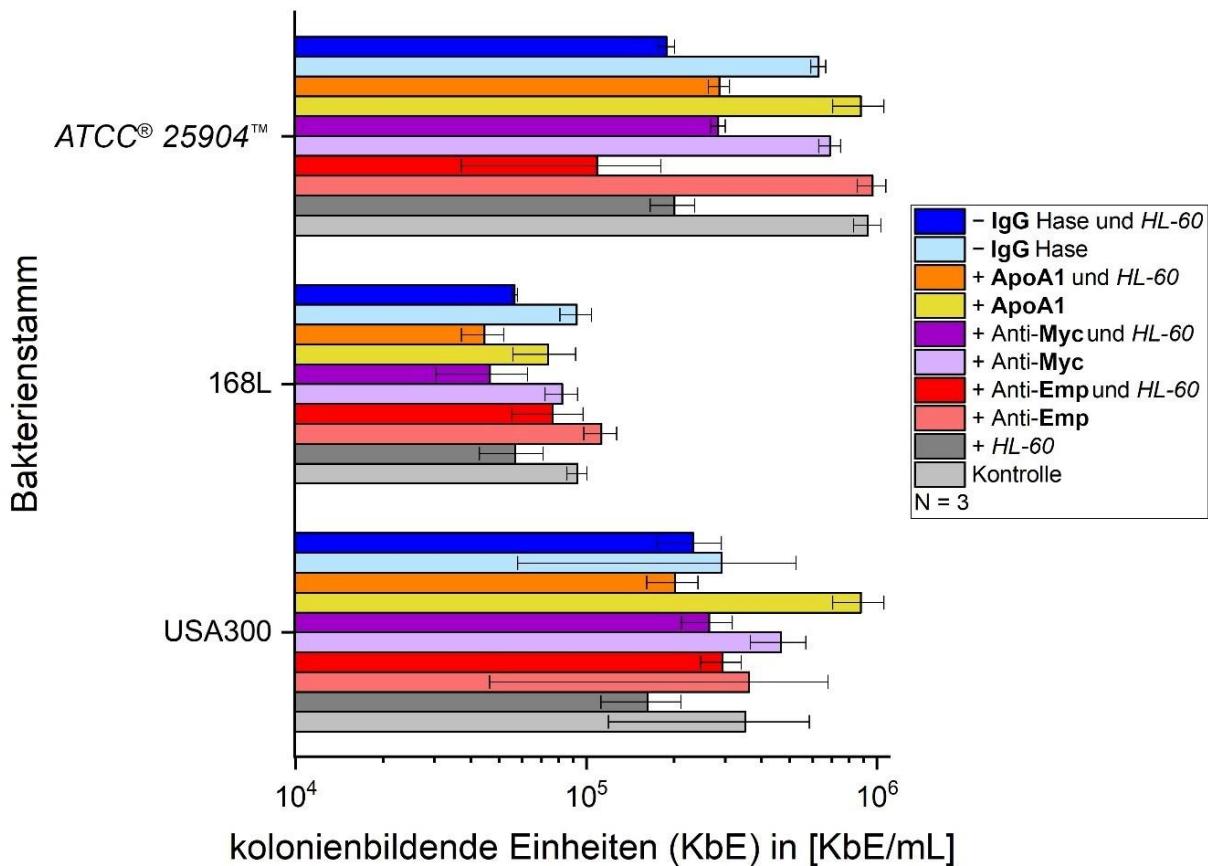


Diagramm 14: Auswertung und nachfolgende Hochzählung der Bakterienkolonien zur Berechnung der durchschnittlichen Konzentration an kolonienbildenden Einheiten der *Staphylokokken* in jeder Testreihe. Zu einer besseren Sichtbarkeit der Ergebnisse von 168L ist die X-Achse als dekadischer Logarithmus angegeben.

Bei der Auszählung der Kolonien ergibt sich für einige Triplikate eine große Heterogenität bei der Anzahl an gezählten Kolonien, welche sich sehr stark auf die SA ausübt. Die Reduktion der Kolonien, welche durch den Einfluss der *HL-60* Zellen verursacht wird, ist in diesem Assay deutlich stärker. Diese Beobachtung ist auf die im Vergleich zum ersten Assay abweichende Zusammensetzung des Gemisches aus neutrophilen Zellen zurückzuführen. So reduzieren die Zellen alleine die Anzahl der *Staphylokokken* des Bakterienstammes ATCC® 25904™ um 78,4 %. Bei 168L wird die Anzahl der Kolonien derweil um 38,8 % und bei USA300 um 54,0 % reduziert. Diese Beobachtung lässt annehmen, dass das Wachstum von *Staphylokokken*, welche **Emp_A** exprimieren, deutlich weniger durch die Zellen reduziert wird als das von **Emp**-exprimierenden Bakterien. Die geringere Reduktion der Kolonien von USA300 im Vergleich zu ATCC® 25904™ kann wahrscheinlich mit der größeren Virulenz dieses Bakterienstammes in Zusammenhang gebracht werden. Wie im vorherigen Assay wird zur besseren Übersichtlichkeit ein Viabilitätsdiagramm der Daten aus Diagramm 15 angefertigt und eine

ANOVA für jede Testreihe durchgeführt. In den ANOVA wird die Kolonienanzahl der Kontrollen wie im vorherigen Kapitel durch Interpolation angepasst.

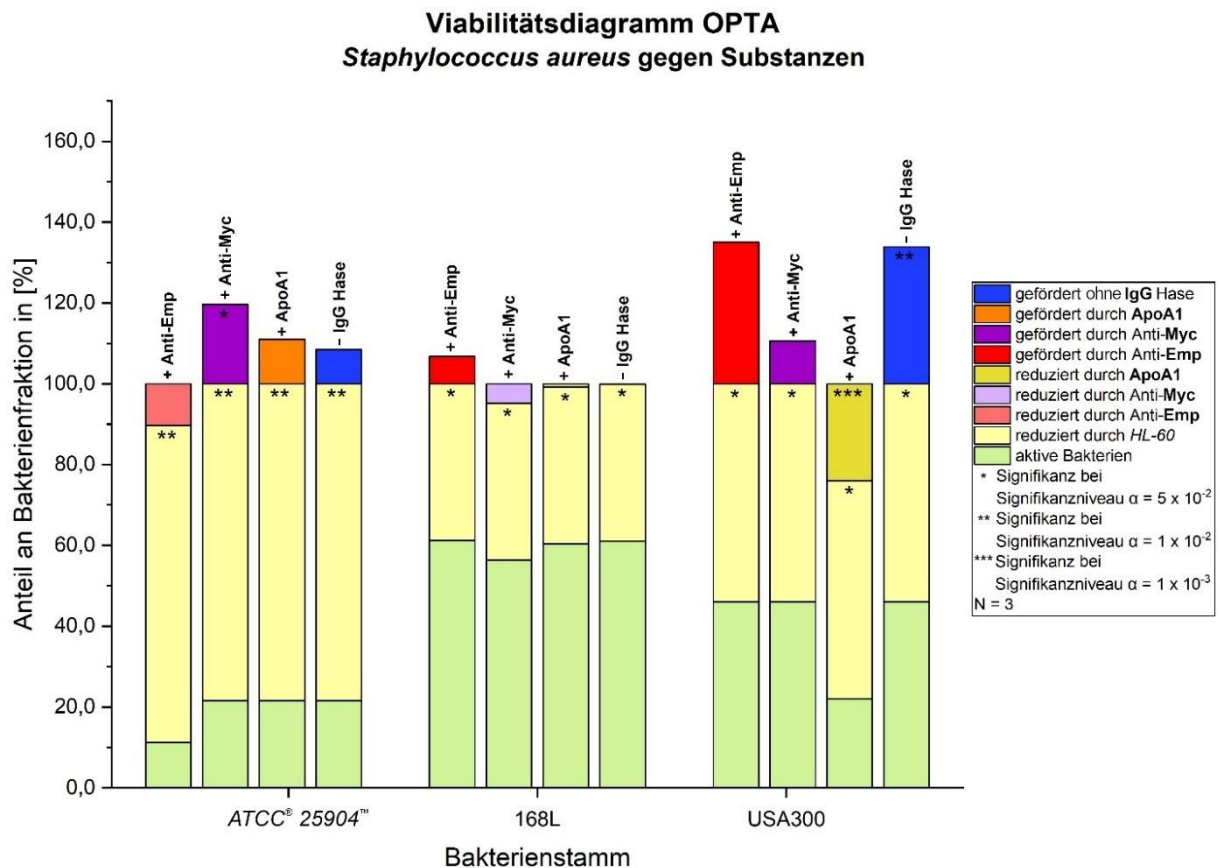


Diagramm 15: Die Differenzen in der Anzahl der Kolonien zwischen Proben und Kontrollen aus der Kolonienzählung in Diagramm 14, dargestellt als Viabilitätsdiagramm. Jede Bakterienfraktion ist als Stapel eines Säulendiagramms dargestellt. Wenn die Wirkung von *HL-60* Zellen oder den Substanzen eine signifikante Reduktion oder Zunahme in der Anzahl der gezählten Bakterienkulturen verursacht, wird das entsprechend an der Spitze jedes Stapels angegeben.

Im Gegensatz zu dem einfachen OPTA zeigen sich in der komplexen Durchführung mehrere Substanzen, welche nach der Opsonisierung zu einer Zunahme bei der Anzahl der zählbaren Kolonien führen. Bei dem Bakterienstamm *ATCC[®] 25904[™]* wirken sogar alle Substanzen, außer dem Anti-**Emp**-Antikörper, wachstumsfördernd. Tatsächlich zeigt dieses geförderte Wachstum allerdings nur bei Anti-**Myc** eine Signifikanz. Die Bakterien, welche mit Anti-**Emp** inkubiert wurden, zeigen nach der gemeinsamen Kultivierung mit Zellen dieses Mal gegenüber der Kontrolle keinen signifikanten Unterschied. Allerdings wird die Anzahl der Kolonien gegenüber der hypothetischen Anzahl aus der Interpolation halbiert. Der Grund dafür, dass die Reduktion nicht signifikant ist, ist die sehr große SA, welche sich aus der Auszählung der Triplikate ergibt. Hinzu kommt, dass aus der Testreihe mit diesem Bakterienstamm Anti-**Emp** als einzige Substanz eine Reduktion zeigt. Es ist daher davon auszugehen, dass eine

Signifikanz bei einer niedrigeren SA gegeben sein sollte und der Antikörper definitiv eine Wirkung zeigt.

Das erhöhte Wachstum, welches nach der Oponisierung mit den anderen Substanzen beobachtet werden kann, spricht dafür, dass diese Substanzen die Wirkung der Zellen geringfügig abschwächen. Es ist allerdings auch möglich, dass es sich hierbei um vernachlässigbare und durch die Methodik bedingte Unschärfe handelt. Der signifikante Unterschied bei der Zugabe von Anti-**Myc** könnte dadurch erklärt werden, dass *HL-60* Zellen das Antigen dieses Antikörpers in großer Zahl produzieren^[1418]. Während es sich hierbei zwar um ein intrazelluläres Protein handelt^[1419] kann nicht ausgeschlossen werden, dass es bei der durch Leukotoxine verursachten Zellyse für diese Antikörper zugänglich wird. Da es sich um humanisierte Antikörper handelt, könnten die neutrophilen Zellen diese sehr gut an ihren *Fc*-Rezeptoren binden, nachdem sie ein Antigen gefunden haben. Eine solche Interaktion könnte einen divergierenden Effekt auf die Effizienz der *HL-60* Zellen haben. Da sowohl Kontrolle als auch Probe des getesteten Anti-**Myc** in diesem Versuch nicht toxisch wirken, bestätigt dies, dass der Puffer, in welchem der Antikörper gelöst ist, die Ursache für das gehemmte Wachstum im Kapitel 4.7.1 „**Wirkung der Prozesschemikalien auf *Staphylococcus aureus***“ war.

168L wird von allen getesteten Bakterienstämmen am wenigsten durch die getesteten Substanzen in Kombination mit den Zellen beeinflusst. Es zeigt sich keine signifikante Änderung in der Anzahl der zählbaren Bakterienkolonien. Ebenso zeigt sich auch kein signifikanter Einfluss des Anti-**Myc**-Antikörpers. Dies kann bedeuten, dass der signifikante Effekt des Anti-**Myc**-Antikörpers bei *ATCC*® 25904™ nur Zufall gewesen ist. Auch ist es möglich, dass der abschwächende Effekt auf die Zellen bei diesem Bakterienstamm so gering ist, dass er sich nicht merklich von der SA unterscheiden lässt. Zuletzt besteht auch die Möglichkeit, dass 168L weniger toxisch auf die Zellen wirkt und deshalb nur eine geringe Menge an Antigen für Anti-**Myc** zur Verfügung steht.

Bei USA300 zeigt sich eine starke Zunahme der kolonienbildenden Einheiten bei der Zugabe von Anti-**Emp**, Anti-**Myc** und **IgG** Hase. Es spricht dafür, dass USA300, als Reaktion auf das Gemisch aus Substanz und Antikörper, die Wirkung der neutrophilen Zellen vermindert. Dies ist vermutlich auf die erhöhte Virulenz des Bakterienstammes zurückzuführen und wird in der Diskussion im Detail näher erläutert. Während die Zunahme in der Anzahl der zählbaren Kolonien zwar recht groß ist, so kann aufgrund der großen SA in der korrespondierenden Kontrolle keine Signifikanz definiert werden. Eine wirkliche Einflussnahme des Antikörpers in Kombination mit den Zellen ist deshalb in Frage zu stellen. Die Zunahme der Kolonienzahl, welche bei der Testreihe ohne **IgG** Hase beobachtet werden kann, spricht dafür, dass die

prophylaktische Absättigung der Immunglobulin-bindenden Proteine einen deutlichen Effekt auf die Überlebensrate von USA300 hat. Stehen diese Proteine nicht für die Abwehr von Antikörpern zur Verfügung, können die neutrophilen Zellen die Bakterienzahl einfacher reduzieren. Dieser Effekt ist nicht signifikant und geringfügig bei ATCC® 25904™ und nicht bei 168L zu beobachten. Es ist ein Hinweis dafür, dass die reduzierte Anzahl der kolonienbildenden Einheiten von 168L auf eine Reaktion des Bakteriums und nicht auf eine Aktion der Zellen zurückzuführen ist. Überraschenderweise zeigt sich eine deutliche und sehr signifikante Abnahme der kolonienbildenden Einheiten, wenn **ApoA1** und *HL-60* Zellen gemeinsam auf USA300 wirken. **ApoA1** ist in der Lage, Lipoteichonsäure von Gram-positiven Bakterien zu binden [1420]. In einer Veröffentlichung von Meilhac *et al.* (2020) [1410] wird deshalb angenommen, dass es zusammen mit ähnlichen Proteinen einen Beitrag in der Immunabwehr gegen Pathogene leistet. Dieser Beitrag wirkt sich aber eher hemmend auf die Aktivität der neutrophilen Zellen aus [1421]. In diesem Falle würde das bedeuten, dass eine reduzierte Aktivität der neutrophilen Zellen zu einer indirekten Reduktion der Bakterienzahl führt, da diese wahrscheinlich in einer geringeren Häufigkeit von den Bakterien zerstört und als Nährmittel verwendet werden können. Eine weitere Möglichkeit ist es auch, dass **ApoA1** die Anfälligkeit von USA300 gegenüber einer Substanz verstärkt, welche von den *HL-60* Zellen hergestellt wird [1422]. Ein solcher Effekt wäre bisher aber unbekannt. Dass USA300 bei der Mischung aus **ApoA1** und neutrophilen Zellen sich anders verhält als die anderen *Staphylokokken*, spricht dafür, dass die Wirkung dieses Proteins entweder spezifisch auf diesen Bakterienstamm wirkt oder diese von der individuellen Virulenz abhängig ist. Die Anti-**Emp**-haltige Elution enthält ebenfalls **ApoA1**, allerdings in einer geringeren Konzentration. Nach der Opsonisierung mit dem Proteingemisch wird eine Zunahme der Kolonienzahl beobachtet. Der Effekt von **ApoA1** wird daher höchstwahrscheinlich durch eine antagonistische Wirkung von Anti-**Emp** unterdrückt.

Eine Wiederholung des Versuches, welcher homogenere Ergebnisse in der Kolonienzählung erreicht, würde höchstwahrscheinlich zu einer signifikanten Differenz zwischen mit Anti-**Emp**-Antikörper opsonisierten Proben und Kontrollen führen. Aufgrund der materialintensiven Durchführung und der zu dem Zeitpunkt bedingten Verfügbarkeit von humanem Komplementserum konnten aber keine weiteren Versuche durchgeführt werden.

4.8 Ausgewählte Anti-**Emp**-scFvs aus humanem Phagen-Display

Die Aufreinigung des Anti-**Emp**-Antikörpers ist kostspielig und erzeugt nur eine begrenzte Menge des Antikörpers, welche für Versuche verwendet werden kann. Zudem ist das Serum von Menschen nur begrenzt verfügbar, da deren Bereitschaft, es wiederholt zu spenden, wenig ausgeprägt ist. Als alternative Quelle würde sich die Herstellung von rekombinanten

Antikörpern anbieten, welche eine spezifische Affinität gegen das Epitop ‚HYVPEFKGSLPAPRV‘ zeigen. Die Arbeitsgruppe von Hust *et al.* in Braunschweig besitzt unter anderem eine Spezialisierung für die Identifikation von Antigenen durch Phagen-Displays und die rekombinante Produktion von *scFvs*, welche auf diesen Antigenen binden können. In einer Kooperation hat sich die Arbeitsgruppe bereit erklärt, in einem Panning eine Bibliothek aus 1 Bill. *scFvs* aus naiven B-Zellen gegen das Epitop von Anti-**Emp** zu testen. Aus diesem Panning wurden insgesamt sechs Treffer erzielt, was 6,0 ppt der gesamten Bibliothek entspricht. Innerhalb des Pannings werden die variablen Antikörperketten dieser *scFvs* identifiziert, welche in Tabelle 40 dargestellt sind. Hierbei ist über die Genfamilie und das Gen hinaus auch der zugehörige Polymorphismus bekannt. Ebenso ist bekannt, welche zwei beziehungsweise drei Segmente während der somatischen Rekombination in der variablen Region zusammengefügt wurden.

Tabelle 40: Alle im Panning auf das Epitop reagierende *scFvs* mit detaillierter Information über ihre Zusammensetzung.

<i>scFvs</i> mit Affinität gegen ‚HYVPEFKGSLPAPRV‘					
<i>scFv</i>	schwere variable Kette als [Genfamilie-Gen*Polymorphismus]			leichte variable Kette als [Genfamilie- Gen*Polymorphismus]	
	V-Segment	D-Segment	J-Segment	V-Segment	D-Segment
LES20_A7	3-30*18	3-22*01	4*02	1-51*01	3*01
LES20_C1	3-9*01	6-6*01	4*02	3-21*02	3*01
LES20_C9	1-2*02	4-17*01	4*02	1-44*01	1*01
LES20_D8	1-46*03	3-9*01inv	4*02	6-57*01	3*01
LES7_C5	3-30*18	4-17*01	4*02	3-21*03	3*02
LES7_C8	3-33*01	4-17*01	4*02	3-21*02	3*01

Um zu bestätigen, dass diese *scFvs* tatsächlich das Antigen binden, wird eine LDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen für einen *Western Blot* vorbereitet, in welcher jede Bande mit 50,0 ng **Emp** und 200,0 ng **BSA** befüllt wird. Das **BSA** sollte hierbei als Kontrolle dienen, um unspezifische Proteinbedingungen zu detektieren. Nach dem Übertrag auf ein PVDF-Membran wird diese entsprechend ihrer Spur in einzelne Fragmente zerteilt, damit die Primärfärbung jeder Bande unabhängig voneinander durchgeführt werden kann. Da in diesem Versuch keine Bakterienlysate markiert werden, wird bevorzugt der Sekundärantikörper Anti-**IgG**₁ *DyLight*[®] 680 eingesetzt, um Artefakte bei der Sekundärfärbung zu reduzieren. Dieser ist allerdings aufgrund der Abwesenheit von schweren konstanten Ketten nicht in der

Lage, scFvs einzufärben. Aus diesem Grund werden in diesem Versuch zwei unterschiedliche Sekundärantikörper verwendet.

Um durch Sekundärantikörper verursachte falsch-positive Signale auszuschließen, werden als zusätzliche Kontrollen der beiden Antikörpern Sekundärfärbungen in Unabhängigkeit einer Primärfärbung durchgeführt. Das Ergebnis des *Western Blots* wird in Abbildung 57 dargestellt.

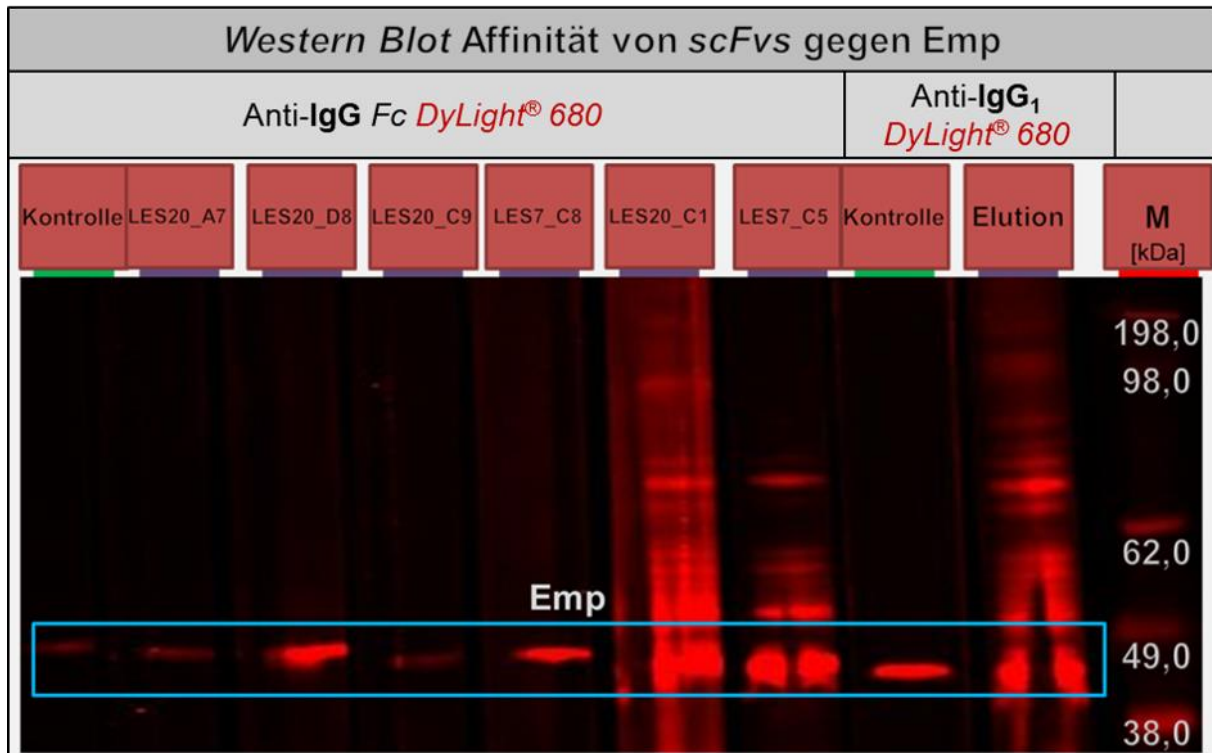


Abbildung 57: Abweichend zu den vorherigen Beschreibungen zeigen die Quadrate über jedem PVDF-Fragment den zur Markierung eingesetzten Primärantikörper. Links sind die Sekundärfärbungen der Proben zu sehen, welche zuvor in einem Verhältnis von 10,0 µg/mL mit scFvs markiert wurden. Rechts werden dieselben Proben zuvor mit einer Elution von FS2 im Verhältnis von 1:500 inkubiert. Beide Sekundärantikörper werden zur Anwendung in einem Verhältnis von 1:5000 verdünnt. Der *Western Blot* wird in Falschfarben dargestellt und Kontrast sowie Helligkeit um das Achtfache verstärkt.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass **Emp** und **BSA** sich als Gemisch sehr ungewöhnlich in einer nicht-reduzierenden LDS-PAGE verhalten. Sowohl LES20_C1, LES7_C5 und die Elution zeigen mehrere Banden in einem ähnlichen Muster. Es ist möglich, dass zwischen **Emp** und **BSA** eine bisher unbekannte Wechselwirkung stattfindet. Entsprechend der Banden müsste diese Interaktion dazu führen, dass **BSA** während des Verlaufs der LDS-PAGE fragmentiert wird und sich **Emp** mit diesen Fragmenten assoziiert. Entsprechend lässt sich nur vermuten, welche Bande vollständigem **BSA** entspricht. Für **Emp** selbst ist in allen Proben eine klar definierte Bande erkennbar. Dies beinhaltet auch die Kontrollen ohne Primärantikörper, was entweder auf die Interaktion zwischen **BSA** und **Emp** oder auf eine eventuelle Verunreinigung innerhalb der Prozesschemikalien zurückzuführen ist.

Diese Bande ist bei LES20_A7 und LES20_C9 so schwach, dass die Intensität sich nicht von der Kontrolle unterscheidet. Bei den scFvs LES20_D8 und LES7_C8 ist die Signalstärke groß genug, dass eine tatsächliche Affinität gegenüber **Emp** möglich ist. Wird aber berücksichtigt, dass jeder scFv entsprechend der Ergebnisse aus Kapitel 4.2.2.3 „**Annäherung an die Proteinmenge über relative Intensität**“ im Vergleich zu der Elution in 43-facher Konzentration eingesetzt wird, ist bei diesen schwachen Signalen keine effektive Bindung zu vermuten. Die von LES20_C1 und LES7_C5 markierten Banden, welche mit **Emp** assoziiert werden können, zeigen eine Signalstärke, welche der in der Elution markierten Bande ähnlich ist. Da auch die Signalmuster der restlichen Banden ähnlich sind, ist anzunehmen, dass diese beiden scFvs **Emp** tatsächlich effektiv binden können. Um diese Vermutung zu bestätigen, wird in einem weiteren *Western Blot* die Affinität dieser beiden scFvs gegenüber Bakterienlysaten getestet. Die für die LDS-PAGE ausgewählten Lysate stammen von ATCC® 25904™, 168L und USA300. Ihr Inhalt wird unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Entsprechend bisheriger Durchführungen wird die Wirkung von Immunglobulinbindenden Proteinen durch die Verwendung von Blockierungspuffer-Formulation 1 und Färbepuffer-Formulation 2 abgeschwächt. Um den verbleibenden Einfluss dieser Proteine zu beurteilen, wird parallel von jedem Bakterienlysate eine Kontrolle ohne Primärfärbung markiert. Der eingefärbte *Western Blot* wird in Abbildung 58 gezeigt.

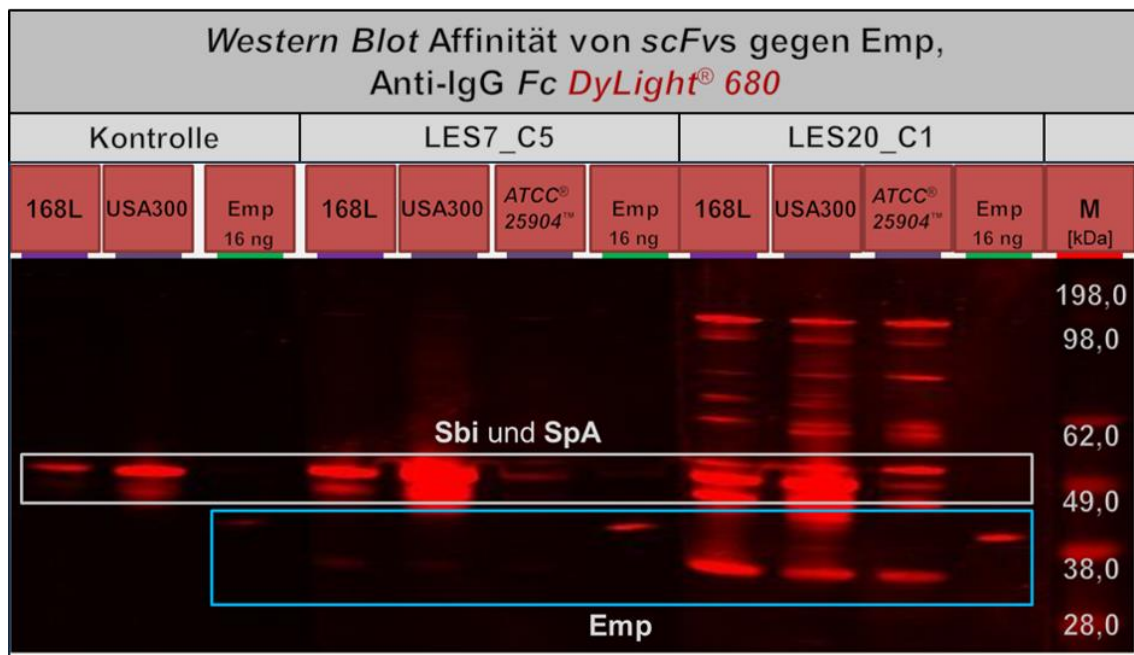


Abbildung 58: Von jedem Lysat werden 5,0 µL in einer reduzierenden LDS-PAGE verwendet. Zusätzlich zu den Proben wird **Emp** mit einer Menge von 16,0 ng und ein Marker für Proteingrößen aufgetragen. Nach der Übertragung auf eine Membran aus PVDF werden die Proben in einem Verhältnis von 1:500 mit 10,0 µg/mL eines scFv markiert und anschließend werden sowohl Proben und Kontrollen in einem Verhältnis von 1:5000 mit Sekundärantikörpern gegen die Fc-Region von **IgG** eingefärbt. Der *Western Blot* wird in Falschfarben dargestellt und Kontrast sowie Helligkeit um das Zehnfache verstärkt.

In diesem *Western Blot* ist in der Kontrollreihe ein schwaches Signal bei der Bande des **Emp** zu sehen. Dies bestätigt, dass es sich um eine Verunreinigung der Prozesschemikalien handelt und diese Beobachtung nicht im Zusammenhang mit der Interaktion von **BSA** und **Emp** steht. Wie auch in Kapitel 4.4.3 „**Optimierter Nachweis der Affinität in vitro**“ sind in der Kontrolle deutliche Banden zu sehen, welche durch die von **Sbi** oder **SpA** immobilisierten Antikörper verursacht werden. Das scFv LES7_C5 zeigt in den Banden, welche **Emp** und **Emp_A** entsprechen, nur eine sehr geringe Signalstärke, welche nicht von der Signalstärke der Kontrolle zu unterscheiden ist. Eine entsprechende Bande in dem getrennten Bakterienlysat von ATCC® 25904™ ist nicht zu erkennen. Dies steht im starken Kontrast zu der deutlich sichtbaren Bande des rekombinanten **Emp**. Die Unterschiede im natürlichen und gentechnisch hergestellten Protein sind groß genug, dass die Affinität des scFv stark abnimmt. Dass sowohl **Emp_A** als auch **Emp** durch LES7_C5 markiert wird, zeigt, dass das Epitop des Einzelkettenfragments zwar einen Abschnitt der Aminosäuresequenz des Proteins binden kann, sich aber nicht mit dem gleichen Epitop wie dem des Anti-**Emp**-Antikörpers assoziiert. LES20_C1 markiert ebenso Banden, welche **Emp** und **Emp_A** zugeordnet werden können. Die Markierung ist aber vergleichsweise stärker als die des rekombinanten Proteins. Auch hier spricht das Signal, welches bei beiden Varianten des **Emp** beobachtet werden kann, dafür,

dass LES20_C1 ein anderes Epitop als Anti-**Emp** besitzt. Über den **Emp**-Varianten hinaus interagiert das Einzelkettenfragment mit weiteren Proteinen, welche ein größeres Molekulargewicht als **Emp** aufweisen. Es bindet daher eine große Bandbreite von Proteinen, welche von *Staphylococcus aureus* exprimiert werden. Das Repertoire an möglichen Proteinen, welche von diesen Banden repräsentiert werden könnten, ist zu groß und deren Identifizierung im Rahmen der Dissertation zu aufwendig.

In zusätzlichen Primär- und Sekundärfärbungen von *PEPPERCHIP*[®] Peptid-Mikroarrays und Peptidarrays aus eigener Herstellung konnte bestätigt werden, dass LES7_C5 und LES20_C1 das Epitop ‚**HYVPEFKGSLPAPRV**‘ als gespottetes Peptid, aber nicht in der Substitutionsanalyse markieren konnten. Dies spricht dafür, dass Interaktionen zwischen den *scFvs* und dem Epitop unspezifischen Kreuzreaktionen entsprechen, welche ab einer bestimmten Peptidkonzentration auftreten. Die Daten zu diesen Arrayfärbungen sind in der Anlage 6 im Anhang zu finden.

Da der Ursprung der Fragmente naive B-Zellen sind, ist es möglich, dass es sich bei LES20_C1 um eine ursprüngliche und unspezifische Variante des Anti-**Emp**-Antikörpers handelt. Bei der Erstantwort, in welcher naive B-Zellen involviert sind, ist die Spezifität zwischen dem Antigen und dem Antikörper gering und diese wird erst während der somatische Hypermutation gereift ^[51]. Die Genfamilien und die zugehörigen Gene der variablen Ketten von LES20_C1 unterscheiden sich entsprechend der Ergebnisse aus Kapitel 4.3.3 „**Massenspektrometrische Analyse des Anti-**Emp**-Antikörpers**“ von denen des Anti-**Emp**-Antikörpers. Das ist ein Hinweis darauf, dass sich ein Epitop gegen **Emp** in Unabhängigkeit des Gens der variablen Kette entwickeln kann, unter der Annahme, dass sich die Genfamilie und das Gen des Anti-**Emp**-Antikörpers von mehreren Personen unterscheiden. Sollte sich diese Annahme aber als falsch erweisen, ist es sehr unwahrscheinlich, dass der Ursprung des aus Blutserum aufgereinigten Anti-**Emp**-Antikörper eine naive B-Zelle ist. Die Wahrscheinlichkeit von 1,0 ppt einer B-Zelle Antikörper gegen das Epitop ‚**HYVPEFKGSLPAPRV**‘ zu entwickeln, zeugt von einer sehr geringen Immunogenität dieses Epitops. Die Menge an unterschiedlichen getesteten nativen Zellen entspricht der 10⁵-fachen Menge, welche einem Menschen nach der somatischen Rekombination zur Verfügung steht ^[51]. Dementsprechend hätte nur eine von 10 000 Personen die Chance, einen Antikörper auszubilden, welcher überhaupt die Möglichkeit besitzt, durch somatische Hypermutation genau dieses Epitop auszubilden. Da Antikörper mit diesem Epitop aber mit großer Zuverlässigkeit bei fast jeder Testperson nachgewiesen werden können, ist eine zufällige Entwicklung mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit auszuschließen.

4.9 Markierung von Anti-Emp exprimierenden B-Zellen

Als erweitertes Ziel der Doktorarbeit soll versucht werden, Anti-**Emp** exprimierende B-Zellen aus dem Vollblut von freiwilligen Spendern zu isolieren. Hierzu müssen zunächst Vorversuche gestartet werden, um eine geeignete Markierung für diese Zellen zu finden. Der Ursprung des Anti-**Emp**-Antikörpers ist noch unbekannt. Hierbei kann es sich unter anderem um eine B-Gedächtniszelle, eine unkonventionelle B-Zelle oder eine Plasma-Gedächtniszelle handeln. Bei der generellen Menge an Anti-**Emp** im Blutserum ist es wahrscheinlich, dass Plasma-Gedächtniszellen oder unkonventionelle B-Zellen in der Produktion involviert sind. B-Gedächtniszellen sind generell nicht an der konstanten Produktion von Antikörpern beteiligt^[1423,1424]. Die Existenz eines korrespondierenden Zelltyps schließt aber grundsätzlich nicht die Koexistenz eines anderen Zelltyps aus. Der Anteil an peripher zirkulierenden B-Gedächtniszellen im Blut liegt bei ~ 40,0 %^[1425]. Unkonventionelle B-Zellen können ebenso im peripheren Blut gefunden werden, allerdings in deutlich geringerer Zahl^[1426]. Aufgrund ihrer Position innerhalb der Nischen sind Plasma-Gedächtniszellen mit der geringsten Wahrscheinlichkeit im Blut anzutreffen^[203]. Nach bisherigen Annahmen gehen diese Zellen nur bei einer Infektion in die Peripherie über^[242]. Entsprechend besitzen Anti-**Emp** exprimierende B-Gedächtniszellen die höchste Trefferquote, sollten sie existieren.

Perry *et al.* (2019)^[1427] haben ein Protokoll entwickelt, mit dem B-Gedächtniszellen aus einer Suspension von peripheren mononuklearen Zellen markiert und über *FACS* identifiziert werden können. Zur Markierung der Zellen werden mehrere Optionen vorgeschlagen und für ein tatsächliches Screening von B-Gedächtniszellen zwei Sekundärantikörper ausgewählt. Der erste Sekundärantikörper markiert das **CD27**, welches ein prominentes Ziel zur Markierung dieser Zellen ist^[1428]. Der Vorteil dieses Markers ist, dass durch ihn sowohl Plasmablasten^[1429], Plasmazellen^[1430], Plasma-Gedächtniszellen^[1431], als auch unkonventionelle B-Zellen^[1432] markiert werden. Somit sind alle Zellen durch das Screening abgedeckt, welche den Anti-**Emp**-Antikörper potentiell produzieren könnten. Nachteilig ist, dass darüber hinaus noch weitere Immunzellen markiert werden, welche nicht mit der Produktion von Antikörpern in Verbindung gebracht werden können. Zu diesen Zellen zählen regulatorische Plasmazellen^[1431], T-Zellen^[51] und $\gamma\delta$ T-Zellen^[1433]. Wenn angenommen wird, dass bis zu 3,0 % aller T-Zellen spezifisch auf *Staphylococcus aureus* reagieren können, ist es realistisch, dass auch ein entsprechender T-Zell-Rezeptor existiert^[1251], welcher das Epitop des Anti-**Emp** Antikörpers binden kann. Um die B-Lymphozyten von den anderen Lymphozyten zu unterscheiden, wird als zweiter Marker ein Sekundärantikörper gegen die *Fc*-Region von **IgG** verwendet. Nach Herstellerangaben ist dieser Sekundärantikörper in der Lage, die Antikörper auf der Membran von Gedächtniszellen zu markieren. Er bevorzugt hierbei Antikörper der Klasse **IgG₁** und **IgG₃** und assoziiert sich nicht mit **IgD**, **IgE** und **IgM**.

Diese Eigenschaften sollten eine gute Markierung von **IgG**-präsentierenden Zellen ermöglichen. Mit einer dritten Markierung werden alle Antikörper markiert, die mit Peptiden interagieren, welche das Epitop ‚**VPEFKGSLP**‘ in ihrer Aminosäuresequenz besitzen. Entsprechend der Publikation von Perry *et al.* (2019) ^[1427] werden diese Peptide in biotinylierter Form an mit *Oregon Green™ 488 konjugiertes NeutrAvidin™* gekoppelt, sodass sie als Tetramer vorliegen. Neben dem Antikörper sollte dieses Peptid auch in der Lage sein, mit korrespondierenden T-Zell-Rezeptoren zu interagieren, wenn diese vorhanden sind. Das Peptid selbst wird mit zwei unterschiedlichen Abstandshaltern getestet. Der Abstandshalter des ersten Peptids (*eBio-GGS₂-Emp9*) ist durch fünf Moleküle Ethylenglycol und sieben Aminosäuren definiert. Im zweiten Peptid (*eBio-βA₅-Emp9*) werden fünf Moleküle Ethylenglycol und sechs Aminosäuren im Abstandshalter verwendet. Die letzten fünf Aminosäuren im Abstandshalter sind β-Alanin (βA). Durch die Kombination der drei Marker sollte es möglich sein, B-Gedächtniszellen, welche den Anti-**Emp**-Antikörper produzieren können, zu identifizieren.

Leukozyten für die Markierung werden durch eine einfache Aufreinigung aus menschlichem Vollblut gewonnen. Während der Arbeitsschritte werden sie auf Eis gehalten, um eine unspezifische Aufnahme der Markierungsreagenzien zu vermeiden. Da nicht abgeschätzt werden kann, wie effizient der Anti-**Emp**-Antikörper in diesem Versuchsdurchlauf die Peptid-Tetramere binden wird, werden von diesen verschiedenen Konzentrationen zur Markierung eingesetzt. Während der *FACS* werden von insgesamt 50 000 Zellen Messdaten für das Vorwärts- und Seitwärtstreulicht sowie die Intensität der jeweiligen Markierung gemessen. Über das Streulicht können der Durchmesser und die Granularität der Zellen bestimmt werden. Mit der Hilfe von entsprechenden Referenzen ^[1434] werden Populationen von mononuklearen Zellen identifiziert, welche mit großer Wahrscheinlichkeit Leukozyten enthalten. Diese Zellen werden durch sogenanntes ‚*Gating*‘ mit der Software des Gerätes ausgewählt und als Subpopulation P1 markiert. In dieser Subpopulation werden anschließend durch ein weiteres *Gating* potentielle Lymphozyten ausgewählt, welche durch die Markierung mit Anti-**CD27** Phycoerythrin (**PE**) mindestens eine Signalstärke von 90,0 RFU erreichen. Diese Population wird als P2 definiert und gibt die Subpopulation an, in welcher B-Gedächtniszellen zu finden sind. In einem weiteren *Gating* werden aus dieser Population Zellen markiert, welche in dieser Markierung und der Markierung durch Anti-*sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-Fc-IgG* gekoppelt an Allophycocyanin (Anti-*Siglec-Fc-IgG APC*) mehr als 200,0 RFU erreichen. Diese Zellen werden als P3 definiert. Aus P3 werden anschließend alle Zellen bestimmt, welche durch das Peptid-Tetramer markiert werden und durch diese Markierung mindestens eine Signalstärke von 150,0 RFU aufweisen. Für die Reproduzierbarkeit wird die Auswahl der Subpopulationen bei jeder Probe gleich gehalten. Zur Veranschaulichung des *Gating* und zur Präsentation der Ergebnisse wird aufgrund der großen Datenmenge nur ein

ausgewähltes Beispiel gezeigt. Der vollständige Datensatz mit allen Ergebnissen ist zur Einsicht in den Anlagen 7 bis 15 im Anhang verfügbar. Ein Beispiel für *Gating* auf Basis des Streulichts ist in Diagramm 16 dargestellt. Der Anteil, welcher höchstwahrscheinlichen Lymphozyten enthält, wird in Diagramm 17 bestimmt. Die Auswahl von P3 wird in Diagramm 18 veranschaulicht. Das *Gating*, welches P4 definiert, wird in Diagramm 19 gezeigt. Ein sichtbarer Punkt im Diagramm entspricht einer Zelle oder mehreren Zellen mit gleichen Messwerten. Die Farbkodierung ist der finalen Einteilung der Zellen in die jeweiligen Subpopulationen angepasst. Alle Anteile der jeweiligen Populationen bei jeder Konzentration werden in Tabelle 41 aufgelistet.

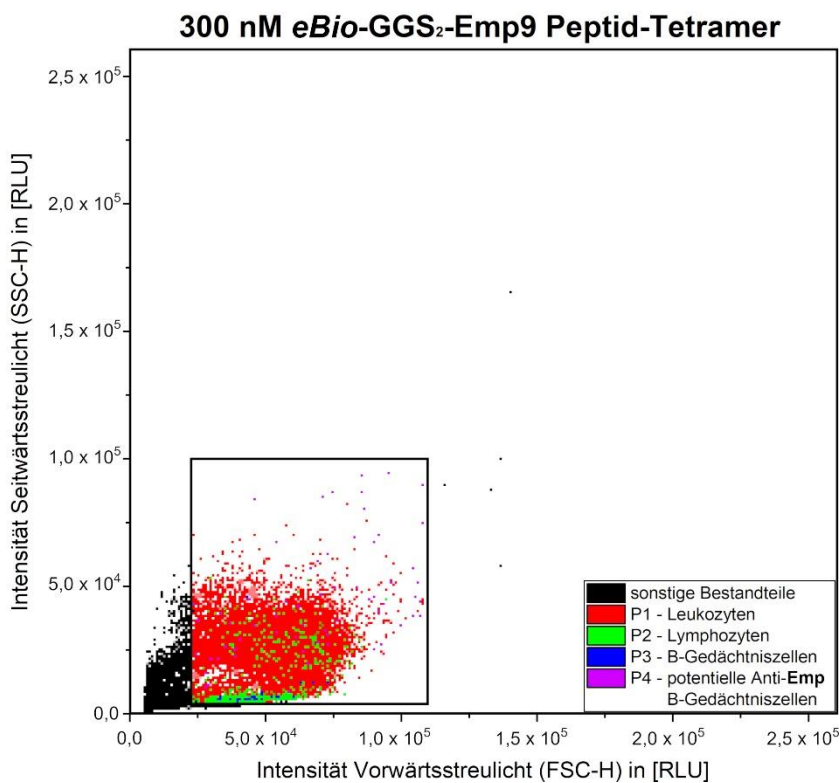


Diagramm 16: Vorwärts- und Seitwärtsstreuung von 50 000 Zellen. Im Rechteck werden Leukozyten als P1 definiert.

Diagramm 17: In P1 werden alle Zellen, deren Signalstärke des Sekundärantikörpers gegen **CD27** 90,0 RFU überschreitet, durch *Gating* als P2 definiert.

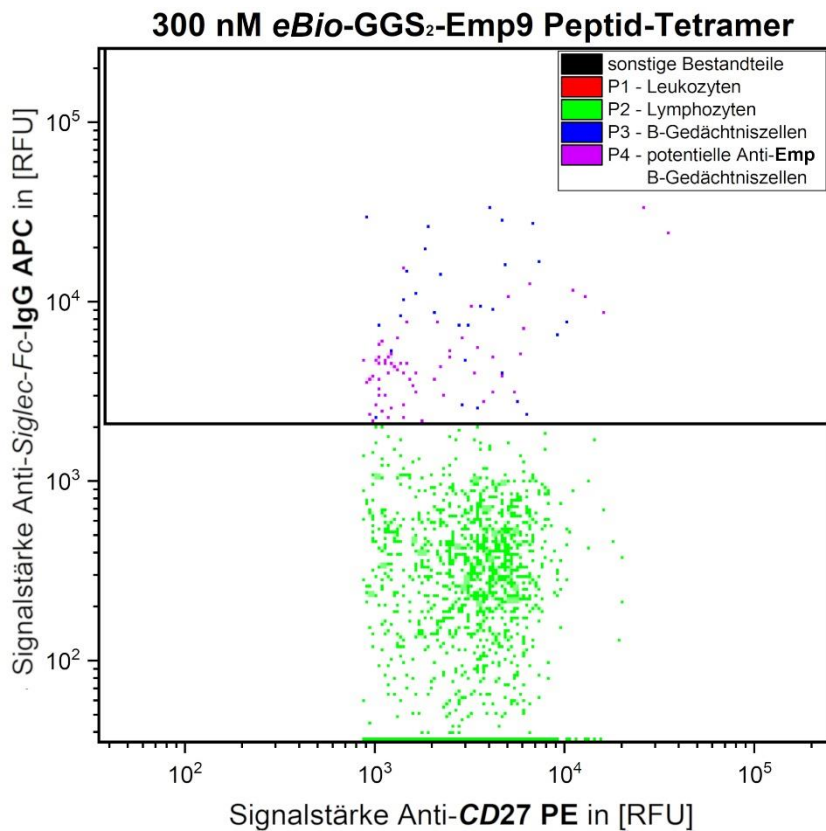
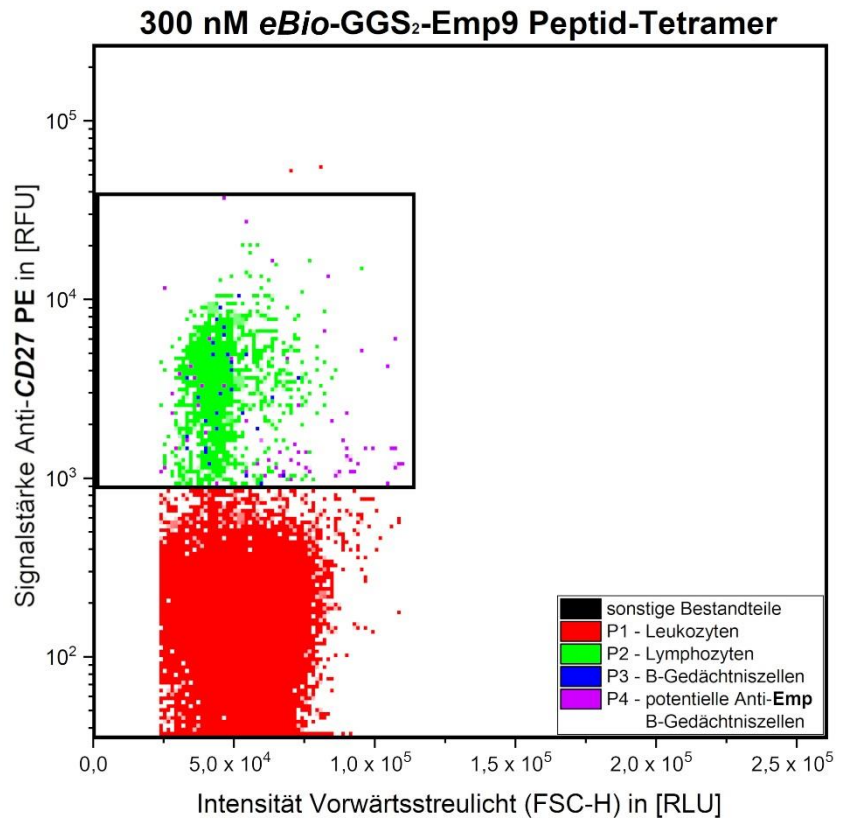


Diagramm 18: Aus P2 werden Zellen ausgewählt, welche bei der Markierung mit **Anti-Siglec-Fc-IgG APC** mindestens einen Wert von 200,0 RFU erreichen und als P3 zusammengefasst.

300 nM Peptid-Tetramer

Diagramm 19: Im letzten *Gating* werden Zellen identifiziert, welche eine Signalstärke von 150,0 RFU durch die Markierung des Peptid-Tetramers besitzen und als P4 definiert.

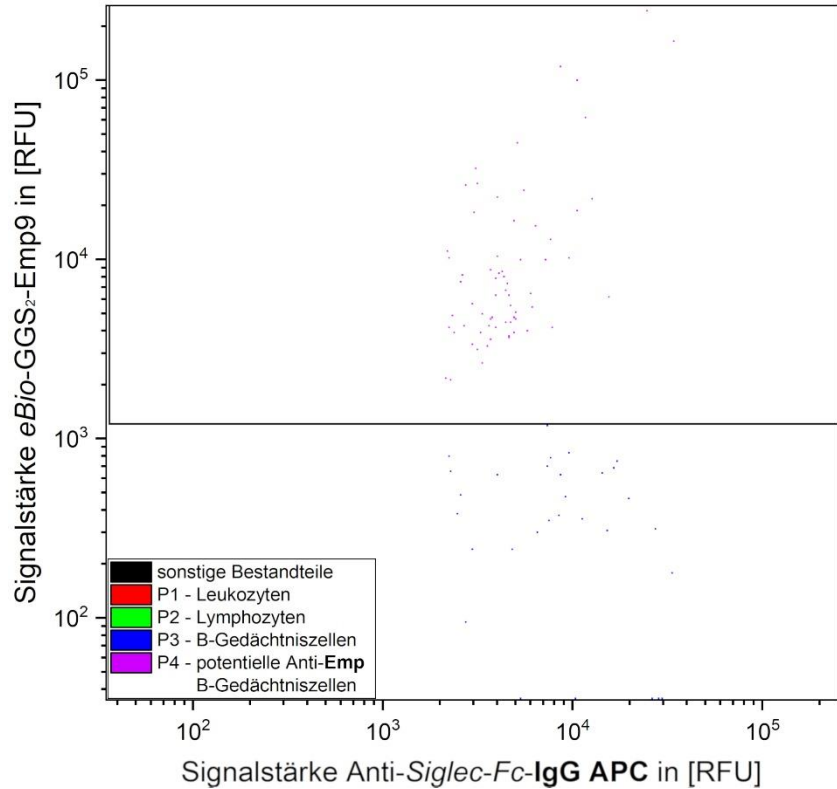


Tabelle 41: Darstellung aller Population der peripheren Blutbestandteile jeder mit *FACS* analysierten Probe.

Anzahl der Populationen nach <i>FACS</i>						
Stoffmengen konzentration (c) in [nM]	Peptid-Tetramer	Anzahl der Zellen				
		sonstige Bestandteile	P1	P2	P3	P4
600	<i>eBio-GGS₂-Emp9</i>	27,0 x 10 ⁴	23,0 x 10 ⁴	1,9 x 10 ³	90	86
	<i>eBio-βA₅-Emp9</i>	25,3 x 10 ⁴	24,7 x 10 ⁴	1,3 x 10 ³	72	60
300	<i>eBio-GGS₂-Emp9</i>	23,5 x 10 ⁴	26,5 x 10 ⁴	1,8 x 10 ³	96	76
	<i>eBio-βA₅-Emp9</i>	39,2 x 10 ⁴	10,8 x 10 ⁴	1,4 x 10 ³	43	20
150	<i>eBio-GGS₂-Emp9</i>	23,8 x 10 ⁴	26,2 x 10 ⁴	2,6 x 10 ³	5	6
	<i>eBio-βA₅-Emp9</i>	21,3 x 10 ⁴	28,7 x 10 ⁴	2,3 x 10 ³	2	2
72	<i>eBio-GGS₂-Emp9</i>	22,0 x 10 ⁴	28,0 x 10 ⁴	1,7 x 10 ³	1	1
	<i>eBio-βA₅-Emp9</i>	22,2 x 10 ⁴	27,8 x 10 ⁴	1,7 x 10 ³	1	1
36	<i>eBio-GGS₂-Emp9</i>	21,8 x 10 ⁴	28,2 x 10 ⁴	2,3 x 10 ³	0	0
	<i>eBio-βA₅-Emp9</i>	22,3 x 10 ⁴	27,7 x 10 ⁴	1,6 x 10 ³	1	1

Die Lymphozyten, welche **CD27** an ihrer Oberfläche präsentieren, sammeln sich vermehrt in zwei Gruppen. Die erste Gruppe hat einen kleineren Durchmesser als die zweite und die Varianz in der Granularität ist relativ gering. Die Zellen in der zweiten Gruppe sind zahlreicher,

größer und besitzen eine größere Varianz in der Granularität. Gemäß Perry *et al.* (2019)^[1427] entspricht die größere der beiden Gruppen den Lymphozyten. Bei der kleineren Gruppe handelt es sich aufgrund ihrer geringeren Größe und Granularität vermutlich um zerstörte Lymphozyten. Diese Verteilung ist in allen Proben zu beobachten.

Aus den Ergebnissen ist direkt sichtbar, dass in den größten beiden Konzentrationen die Anzahl der Treffer für P3 und P4 vermehrt ist. Dies hängt mit einem generellen Anstieg an Zellen zusammen, welche sich mit dem Peptid-Tetramer assoziieren. Mit der Zunahme dieser Assoziation wird auch eine zunehmende Signalstärke des Anti-*Siglec-Fc-IgG* beobachtet. Dieser Effekt kann in Diagramm 20 im direkten Vergleich betrachtet werden. Diese Beobachtung ist ungewöhnlich, da die Konzentration dieses Antikörpers in jeder Probe dieselbe ist. Da sich die Emission von *Oregon Green*[™] 488 und die Anregungswellenlängen von Allophycocyanin (**APC**) teilweise überlappen, besteht die Möglichkeit, dass die Signalstärke des Pigments durch unbeabsichtigten Förster-Resonanzenergietransfer verstärkt wird. Eine unspezifische Interaktion des Sekundärantikörpers mit dem Peptid-Tetramer ist allerdings nicht auszuschließen. Es ist aber ein starkes Zeichen dafür, dass der Fluoreszenzfarbstoff *Oregon Green*[™] 488 und das Pigment **APC** nicht für die gemeinsame Nutzung geeignet sind. Durch die konzentrationsabhängige Zunahme an Signalstärke wird die Anzahl an falsch-positiven Signalen erhöht. Eine präzise Bestimmung der Antikörper-präsentierenden Zellen ist deshalb durch die aktuell verwendeten Markierungen nicht möglich. Zwischen den beiden Peptid-Tetrameren ist mit steigender Konzentration bemerkbar, dass das Peptid mit dem Abstandshalter *eBio-GGS₂-Emp9* eine größere Assoziation zu den Zellen besitzt. Ob diese vermehrte Assoziation aber spezifisch oder unspezifisch ist, lässt sich nicht ermitteln.

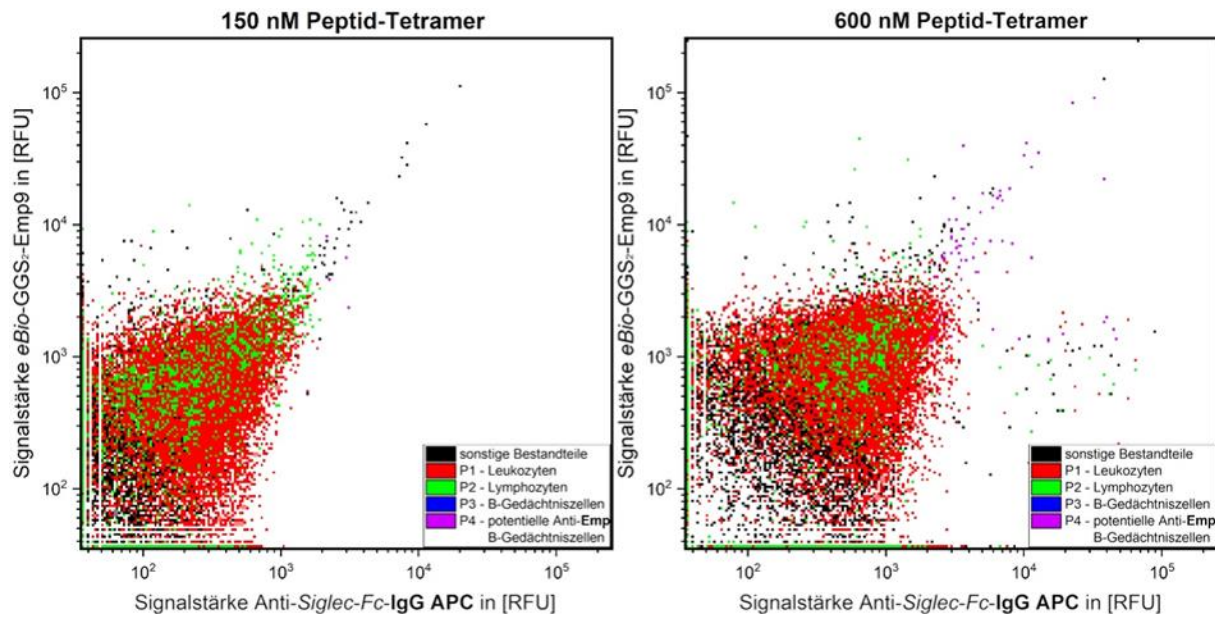


Diagramm 20: Diagramme von Zellen, welche mit 150,0 nM (rechts) beziehungsweise mit 600,0 nM (links) Peptid-Tetramer markiert werden, im Vergleich.

Es konnte eine Annäherung an potentielle B-Gedächtniszellen durch *FACS* erreicht werden, welche aber aufgrund der zunehmenden Signalstärke aus unspezifischen Bindungen ohne klares Ergebnis blieb. Für ein erfolgreiches Screening mit anschließender Sortierung zur Extraktion von B-Gedächtniszellen, welche Anti-**Emp** exprimieren, werden weitere Verbesserungen in der Durchführung und in der Analyse durch *Gating* benötigt. Das Hinzufügen zusätzlicher Kontrollen würde es ermöglichen, den Einfluss von *Oregon Green*[™] 488 auf **APC** besser einschätzen zu können. Der Einsatz von zusätzlichen Markierungen könnte eine eindeutigere Zuordnung der B-Gedächtniszellen ermöglichen und die Analyse einer größeren Zellpopulation die Trefferchance erhöhen. Zur weiteren Verbesserung könnte die Reinheit der Probe verfeinert werden, indem eine vorherige Auftrennung der Zellen durch magnetische Zellsortierung durchgeführt wird.

Aufgrund der begrenzten Zeit und des Mangels an geeigneten Spendern muss dieses Projekt allerdings außerhalb des Rahmens dieser Dissertation weitergeführt werden. Die Ergebnisse der Dissertation werden für kommende Versuche als Grundlage verwendet.

4.10 Test des *RGB-S* Reporterstammes in der Anwendung für stochastische Peptidarrays

Als weiteres Thema der Dissertation soll die Detektion toxischer Substanzen innerhalb des Formats eines ultrahochdichten stochastischen Arrays überprüft werden. Eigens für diesen Zweck wurde eine Befüllungskammer für diesen Array konzipiert. Während die Testläufe aufgrund der Verfügbarkeit nicht an einem stochastischen Array durchgeführt werden konnten, so werden Versuche durchgeführt, um die prinzipielle Möglichkeit der Detektion in diesem Format durch einen Reporterstamm nachzuweisen.

4.10.1 Befüllung und Visualisierung des mikrostrukturierten Glasträgers

Zur Befüllung des mikrostrukturierten Glasträgers, welcher die Basis des Arrays bildet, wird dieser in eine Befüllungskammer gespannt und durch ein einfaches fluidisches System mit einer Suspension aus Bakterien oder Zellen überschwemmt. Durch das kontrollierte Entleeren der Suspension aus der Kammer wird ein wandernder Meniskus ausgebildet, welcher die Bakterien oder Zellen in die Kavitäten des Glasträgers drückt. Um diesen Effekt zu erzeugen, muss der Glasträger über hydrophobe Eigenschaften verfügen, weshalb jeder Befüllung eine Silanisierung des Glasträgers vorangegangen ist. Mit dieser Methode kann eine Befüllungsrate von bis zu 98,3 % erreicht werden.

Zur Detektion der befüllten Bakterien werden drei verschiedene Systeme eingesetzt. Eine Detektion durch den *Innoscan 1100* ermöglicht es, ein Gesamtbild des mikrostrukturierten Glasträgers zu erstellen. Auf diesem Bild ist jede einzelne Kavität sichtbar, und mit Hilfe der Software *MAPIX* lässt sich ein Detektionsraster erstellen, um den Median der Signalstärke und des Hintergrundrauschens jeder einzelnen Kavität zu messen. Entsprechend ermöglicht diese Detektion die Bestimmung der Befüllungsrate und eine Aufzeichnung sowohl qualitativer als auch quantitativer Daten. Der große Nachteil dieses Systems ist allerdings, dass aufgrund des geringen Arbeitsabstandes keine Echtzeit-Aufnahmen der Bakterien innerhalb des Arrays möglich sind. Dieses Defizit kann durch das optische System nach Clemens von Bojničić-Kninski^[1435] ausglich werden, da es eine Aufnahme der Kavitäten in Echtzeit ermöglicht. Allerdings erlaubt das optische System aufgrund seiner technischen Limitierung keine digitale Auswertung der Signalstärke innerhalb der Kavitäten. Als drittes für die Auswertung verwendetes System bietet das optische Digitalmikroskop *VHX-600* eine Kombination aus Arbeitsabstand, Auflösung und Vergrößerung, welche eine hochwertige Aufnahme des Inhalts der Kavitäten im Detail erlaubt. Während die Visualisierung von Bakterien oder Zellen durch das optische Digitalmikroskop unabhängig von Markierungen funktioniert, benötigen die anderen beiden Systeme für diese Detektion eine Fluoreszenzmarkierung.

Über die drei Systeme wird in ersten Testläufen die Befüllung und die Detektion verschiedener Mikroorganismen und humanen Erythrozyten in dem mikrostrukturierten Glasträger untersucht. Ein Wildtyp von *Synechocystis spec.* besitzt als Fluoreszenzmarkierung natürliches Chlorophyll a^[1436]. Das Cyanobakterium wird nach der Befüllung durch den *Innoscan 1100* detektiert. Lebende und tote *Bacillus subtilis* werden durch den Lebendfarbstoff SYTO™ 9, beziehungsweise den Totfarbstoff Propidiumiodid markiert und in Echtzeit im optischen System aufgezeichnet. Humane Erythrozyten können aufgrund eines fehlenden Zellkerns und mangelnder Verfügbarkeit nicht durch Fluoreszenzmarkierung hervorgehoben werden. Sie werden ausschließlich durch das optische Digitalmikroskop *VHX-600* dokumentiert.

Die Aufzeichnungen aller drei Testobjekte sind als Bildausschnitte in Abbildung 59 zusammengefasst. Der Ausschnitt von *Synechocystis spec.* entspricht hierbei einer Fläche von ~ 5,6 mm². *Bacillus subtilis* wird in zwei Ausschnitten mit jeweils einer Fläche von 1,8 mm² dargestellt. Die Aufnahme mit dem Lebendfarbstoff wird mit einer ISO-Zahl von 500 und einer Belichtungszeit von einer Sekunde aufgenommen. Bei der Aufnahme mit dem Totfarbstoff wird die ISO-Zahl auf 3200 erhöht und die Belichtungszeit auf fünf Sekunden verlängert. Die Hellfeldaufnahmen der humanen Erythrozyten sind auf eine Fläche von ~ 9,0 x 10³ μm² zugeschnitten.

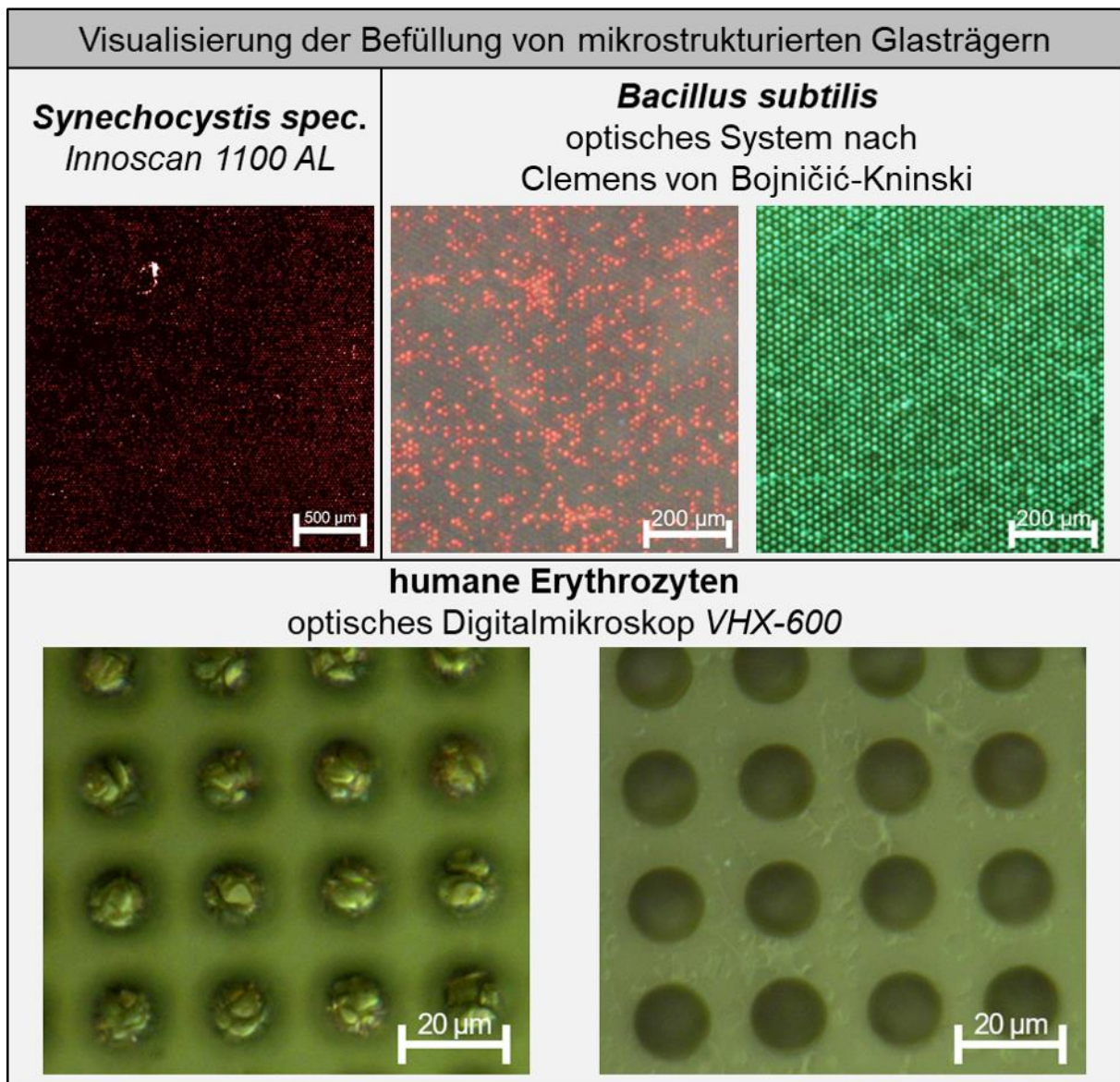


Abbildung 59: Oben links = *Synechocystis spec.* ohne Vergrößerung; Oben rechts = Durch Viabilitätsfarbstoffe markierte *Bacillus subtilis* in Kavitäten, links tot, rechts lebendig, bei einer Vergrößerung von 2 X; Unten = Mikroskopische Aufnahmen von humanen Erythrozyten, links in Kavitäten, rechts auf den Stegen des Glasträgers, bei einer Vergrößerung von 2000 X. Die Aufnahmen der fluoreszierenden Bakterien werden in Falschfarben dargestellt und deren Helligkeit um 30,0 % verstärkt.

Die Cyanobakterien wurden erfolgreich mit einer Befüllungsrate von 61,2 % in die Kavitäten gefüllt. Auf dem gesamten Glasträger sind zwei größere Artefakte und Schwankungen in der Homogenität zu erkennen, was sich in einer SA von 93,9 % äußert. Eine Ursache ist hierfür höchstwahrscheinlich eine unterschiedliche Bakterienzahl in den Kavitäten sowie Unreinheiten und Aggregationen in der verwendeten Suspension. Die Befüllung und Detektion von lebendem und totem *Bacillus subtilis* hat funktioniert. Es ist nicht möglich, die Befüllungsrate zu quantifizieren, aber empirisch ist diese bei den lebenden Bakterien besser. Humane Erythrozyten sammeln sich nach der Befüllung am Boden der Kavitäten und sind durch

Hellfeldmikroskopie gut zu erkennen. Es konnten keine Erythrozyten auf den Stegen beobachtet werden. Die Befüllungsrate und Viabilität der Erythrozyten kann aufgrund technischer Limitierung nicht genauer bestimmt werden.

4.10.2 Stressantwort des *RGB-S* Reporter gegenüber Ciprofloxacin

Um die Detektion des *RGB-S* Reporter innerhalb des mikrostrukturierten Glasträgers zu gewährleisten, muss zunächst dessen Aktivität anhand einer bereits getesteten Reaktion überprüft werden. Aus der Arbeit von Ahmed Zoheir ^[1366] ist bekannt, dass der Bakterienstamm als Antwort auf die Exposition gegen Ciprofloxacin **GFPmut3b** exprimiert. Diese Substanz wird daher dem Nährmedium des Reporterstammes in einer Konzentration von 100,0 ng/mL zur Signalerzeugung zugegeben. In der Folge wird der *RGB-S* Reporter in einen mikrostrukturierten Glasträger gefüllt und nach der Inkubationszeit durch den *Innoscan 1100* ausgewertet. Als Kontrolle wird ein paralleler Versuch unter gleichen Bedingungen ohne die Zugabe von Ciprofloxacin durchgeführt. Beide Bilder werden mit der gleichen Laserintensität, der gleichen Empfindlichkeit des Photoelektronenvervielfachers und mit denselben Filtern detektiert. Ausschnitte einer Fläche von $\sim 22,4 \text{ mm}^2$ aus den Aufzeichnungen beider mikrostrukturierten Glasträger sind in Abbildung 60 dargestellt. Ein Box-Plot aus den Messergebnissen ist in Diagramm 21 abgebildet. Die große Menge an Messdaten übersteigt die Kapazitäten von herkömmlichen Bearbeitungsprogrammen. Aus diesem Grund wird zur Erstellung des Box-Plots die Software *SAS Enterprise Guide* verwendet. Das hat zur Folge, dass sich die Darstellung dieses Diagramms sich von den bisherigen Box-Plots unterscheidet.

Beide Scans zeigen eine starke Heterogenität in ihrer Signalstärke, was zu einer sehr großen SA führt. Diese beträgt 103,1 % für die Kontrolle und 82,5 % für die mit Ciprofloxacin inkubierten Bakterien. Der Glasträger, dessen Bakterien mit Ciprofloxacin inkubiert wurden, hat eine Befüllungsrate von 97,8 % und zeigt mehrere größere und überbelichtete Artefakte, welche bei der Kontrolle nicht sichtbar sind. Im Vergleich hierzu zeigt die Kontrolle eine Befüllungsrate von 98,2 %. Insgesamt ist die GFI aller Kavitäten, welche mit Ciprofloxacin supplementierten Bakterien gefüllt sind, doppelt so groß wie bei der Kontrolle. Es ist daher davon auszugehen, dass Ciprofloxacin genug Stress auf den *RGB-S* Reporter ausübt, um eine Proteinexpression zu aktivieren. Die sehr hohe Signifikanz zwischen den beiden Scans ist auf die große Stichprobenanzahl zurückzuführen.

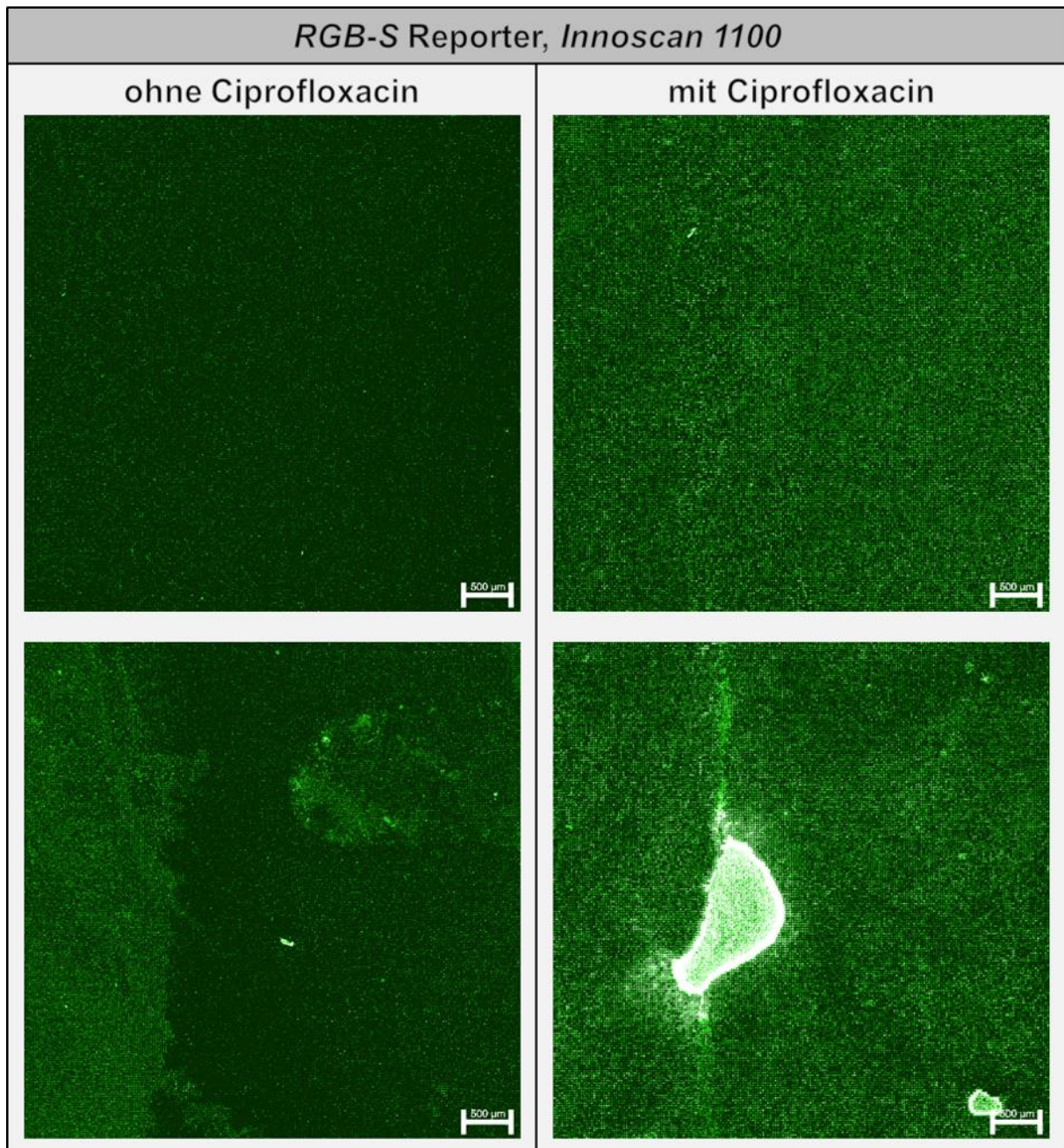


Abbildung 60: *RGS-S* Reporter nach Inkubation in einem mikrostrukturierten Glasträger mit (rechts) und ohne (links) Zugabe von Ciprofloxacin. Die Bilder sind in Falschfarben dargestellt und deren Helligkeit um 30,0 % verstärkt.

Box-Plot *RGB-S* Reporter relative Signalstärke Vergleich mit und ohne Ciprofloxacin

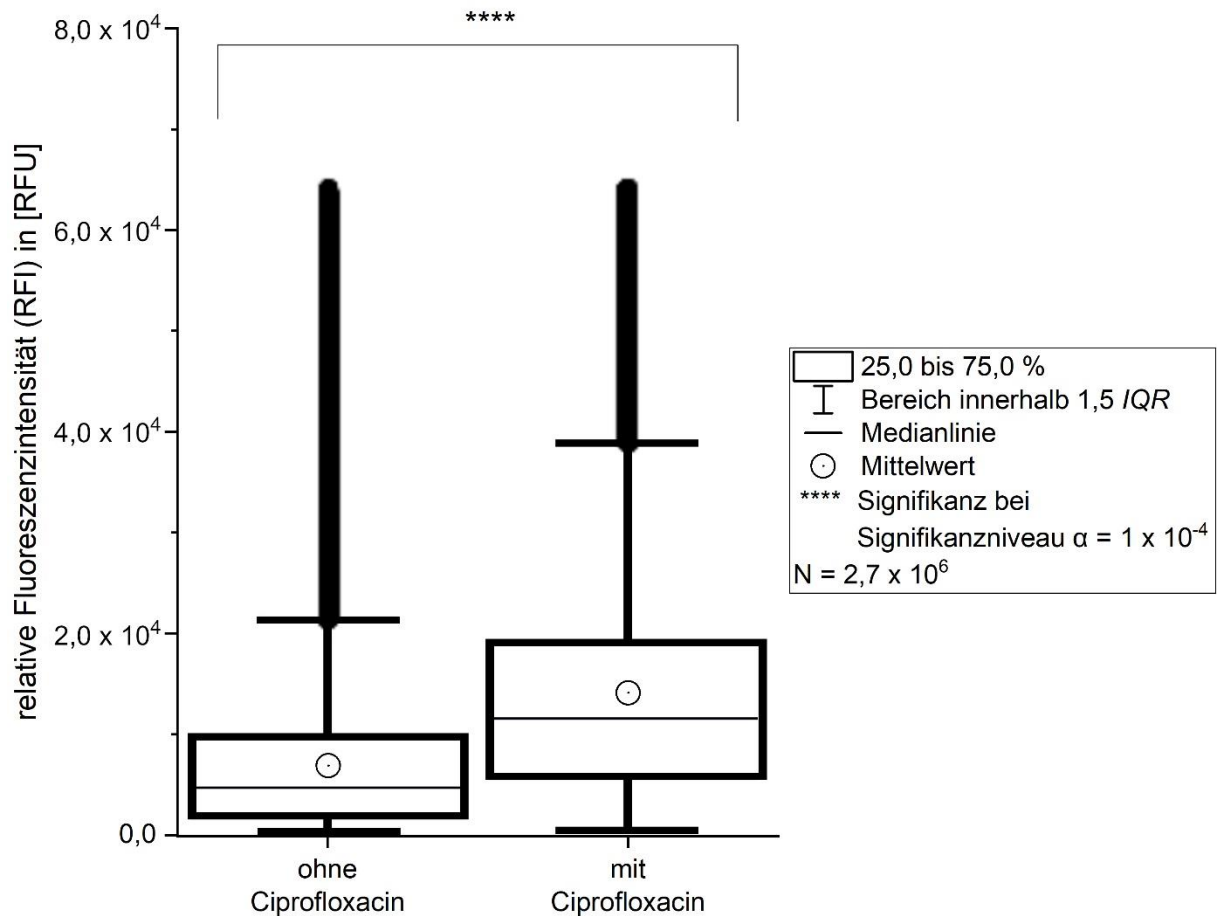


Diagramm 21: Die Darstellung im Box-Plot zeigt die Verteilung der Signalstärken von **GFPmut3b** innerhalb der mit *RGB-S* Reporter befüllten Kavitäten beider mikrostrukturierten Glasträger. Werte, die außerhalb des anderthalbfachen *IQR* liegen, werden als statistische Ausreißer betrachtet.

4.10.3 Diffusion von Bakterien innerhalb der Kavitäten

Für eine fehlerfreie Bestimmung von Kavitäten, welche gestresste Bakterien enthalten, ist es wichtig, dass diese nicht zwischen den Kavitäten diffundieren. Zur einfachen Bestimmung einer solchen Diffusion werden mikrostrukturierte Glasträger mit einer geringen Konzentration an Bakterien befüllt, welche zuvor Ciprofloxacin ausgesetzt waren. Durch das optische System wird eine Ansammlung von befüllten Kavitäten lokalisiert. Diese wird in einer Echtzeitaufnahme über die Dauer von 45 Minuten jede Minute unter gleichen Bedingungen dokumentiert. In jeder Aufzeichnung werden über das Begrenzungswerkzeug von *ImageJ*^[1395] alle Pixel hervorgehoben, welche eine Signalstärke von über 75,0 RFU besitzen. Die Gesamtzahl der Pixel wird bestimmt und der Durchschnitt der Fluoreszenzintensität dieser Pixel wird als GFI zusammengefasst. Verändert sich die Anzahl und Intensität dieser Pixel im Verlauf der Zeit merklich, so ist davon auszugehen, dass die Bakterien zwischen den Kavitäten wandern.

Die Ansammlung von befüllten Kavitäten und die entsprechende Auswahl nach der Begrenzung wird in Abbildung 61 dargestellt. Insgesamt wird hierbei eine Fläche von 45,1 mm² betrachtet. Der Mittelwert und die Fläche aller Pixel über 75,0 RFU werden in Diagramm 22 zusammengefasst.

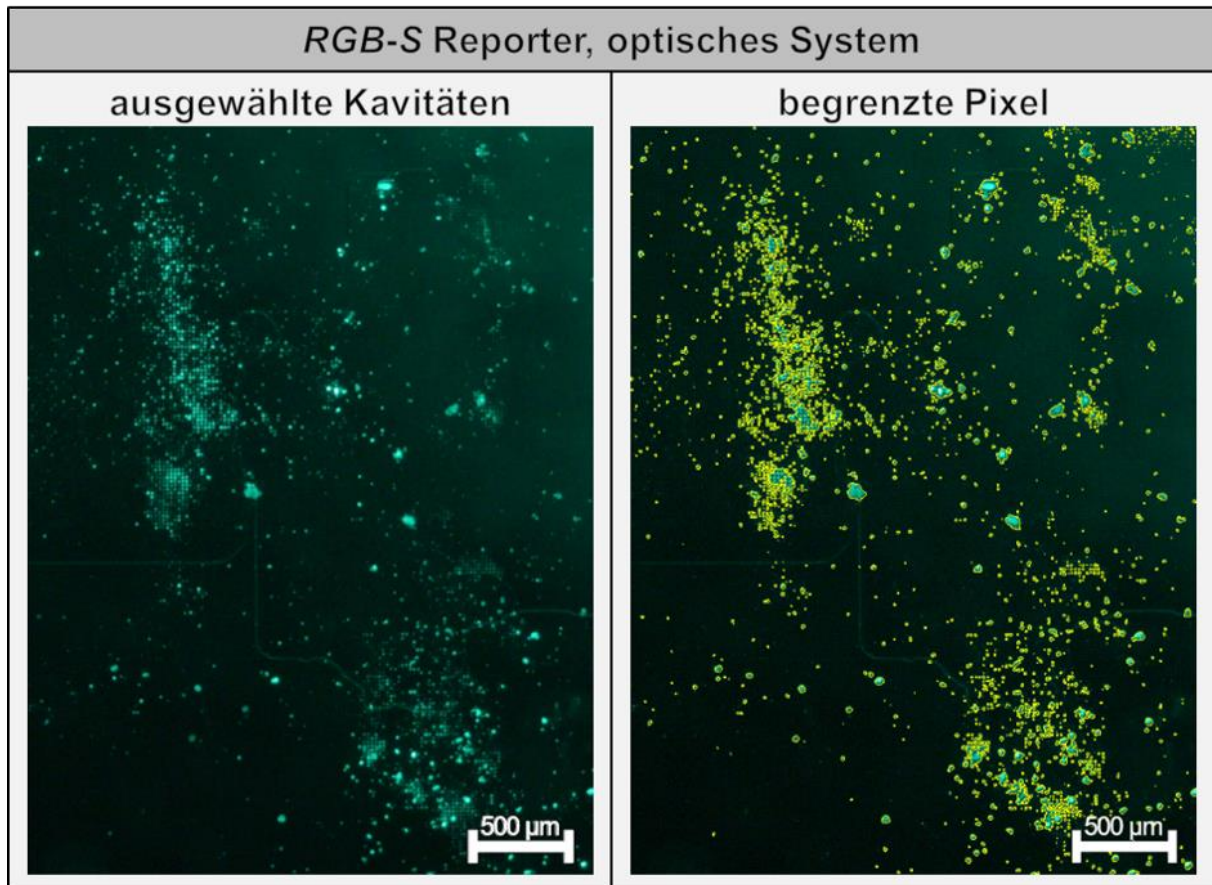


Abbildung 61: Erstes Bild einer Echtzeitaufnahme des *RGB-S* Reporters während der Inkubation in einem mikrostrukturierten Glasträger, supplementiert mit Ciprofloxacin. Auf der rechten Seite sind alle Pixel mit einer Signalstärke von mehr als 75,0 RFU in dem Bild mit einem gelben Rahmen ausgewählt.

Die Anzahl der Pixel fluktuiert bis zur 40. Minute und nimmt danach merklich ab. Bei der GFI ist ein abnehmender Trend über die Zeit zu beobachten. Dieser Trend ist allerdings so schwach, dass er auch durch Photobleichung verursacht werden kann ^[1405]. Zusammengefasst ist die Veränderung über die Zeit unmerklich und führt zu der Annahme, dass die Bakterien nicht die Möglichkeit besitzen, innerhalb der gemessenen Zeit zwischen den Kavitäten zu diffundieren. Eine Verfälschung der Messergebnisse aufgrund von motilen Bakterien ist deshalb zu vernachlässigen.

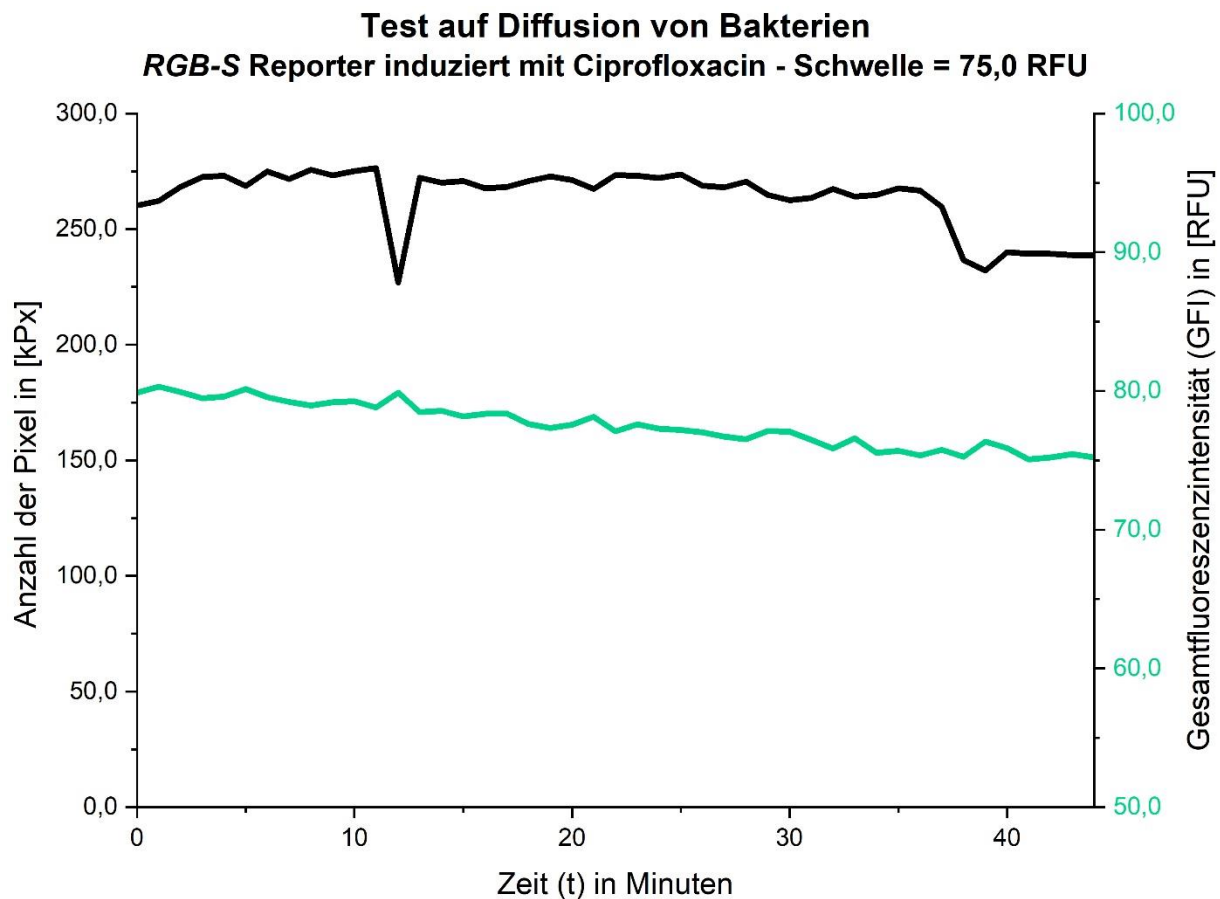


Diagramm 22: Pixelzahl und GFI des *RGB-S* Reporters im Verlauf der Zeit.

4.10.4 Bestimmung der *MIC* durch Resazurin

Um zu beweisen, dass die Detektion von toxischen Substanzen durch den *RGB-S* Reporter innerhalb eines stochastischen Array funktioniert, muss zunächst ein für den Reporter geeigneter Stressor ausgewählt werden. Dieser Stressor muss über mindestens eine Aminogruppe verfügen, damit eine Verknüpfung auf einem 10:90-Poly(ethylenglycol)methylmethacrylat-Polymethylmethacrylat-Kopolymer-Polymerfilm (10:90-PEGMA-co-PMMA-Polymerfilm), der Synthesebasis des stochastischen Arrays, möglich ist. Die drei AmP Bac8c ^[1364], MP196 ^[1437] und Pac-525 ^[1438] sowie die beiden Antibiotika Ampicillin (Amp) und Tetrazyklin (Tetrazyk) erfüllen diese Bedingung und werden deshalb als potentielle Stressoren in Betracht gezogen. Durch Inkubation des *RGB-S* Reporterstammes mit diesen Substanzen und einer nachfolgenden Viabilitätsanalyse durch Zugabe des Redoxfarbstoffes Resazurin in das Nährmedium wird die jeweilige *MIC* des Bakteriums gegenüber jeder Substanz ermittelt. Bleibt eine Substanz-bedingte Hemmung der Bakterien innerhalb der Kavitäten aus, wird der Farbstoff von diesen zu Resorufin reduziert, was durch einen deutlich sichtbaren Farbumschlag des Nährmediums von Blau zu Pink ersichtlich ist ^[1439]. Bleibt dieser Farbumschlag hingegen aus, ist die Substanzkonzentration ausreichend um das Wachstum der Bakterien zu hemmen. Eine unvollständige Katalyse bei geringer Bakterienzahl des

Farbstoffes ist möglich und resultiert in einer Mischung aus beiden Farben. Das Messergebnis der Färbung wird in Abbildung 62 gezeigt.

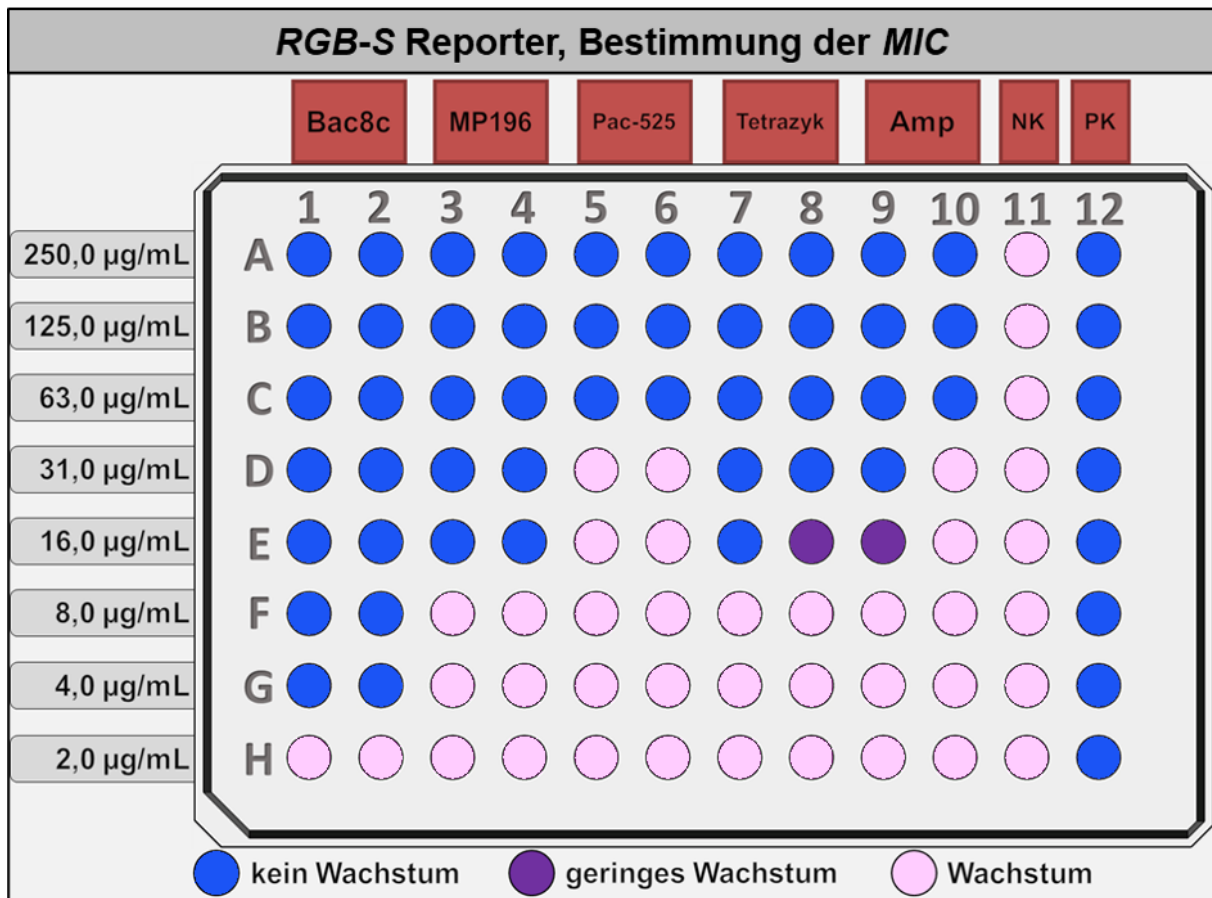


Abbildung 62: Digitale Darstellung des Farbumschlags nach der Bestimmung der MIC des RGB-S Reporterstammes von mehreren Substanzen. Die Negativkontrolle (NK) entspricht der Kontrolle ohne Substanz und mit Bakterien. Die Positivkontrolle (PK) enthält keine Bakterien.

Für die drei Peptide kann eine MIC klar bestimmt werden. Bac8c zeigt die größte Wirkung und schränkt das Wachstum der Bakterien ab einer Konzentration von 4,0 µg/mL ein. MP196 zeigt bei einer Konzentration von 16,0 µg/mL eine effektive Hemmung. Das Peptid Pac-525 wirkt ab einer Konzentration von 63,0 µg/mL hemmend und wirkt somit von den ausgewählten Peptiden am schwächsten auf den Reporterstamm. Sowohl Tetrazyklin als auch Ampicillin zeigen kein eindeutiges Ergebnis. Ersteres zeigt eine inhibitorische Konzentration zwischen einer Konzentration von 16,0 und 31,0 µg/mL. Letzteres führt ab einer Konzentration von 31,0 µg/mL, beziehungsweise 63,0 µg/mL, zu einer effektiven Hemmung.

4.10.5 Bestimmung der Stress-induzierten Expression über Zeit

Im vorherigen Kapitel konnte die Konzentration ermittelt werden, ab welcher die antibiotischen Substanzen hemmend auf den Reporterstamm wirken. Damit eine geregelte Expression der fluoreszierenden Proteine erfolgt, muss die Konzentration unterhalb dieser Schwelle liegen, aber stark genug sein, um die entsprechenden Promotoren zu aktivieren. In einem weiteren Experiment wird deshalb die relative Signalstärke dieser Proteine in einem Zeitraum von einem Tag aufgezeichnet. Hierbei wird das Bakterium verschiedenen Konzentrationen der Peptide ausgesetzt und die über die Zeit zunehmende Fluoreszenz mit einer Kontrolle verglichen. Aufgrund der ungenauen Ergebnisse werden die Antibiotika in diesem Experiment nicht berücksichtigt. Die in diesem Kapitel gezeigten Ergebnisse werden auf die Amp begrenzt, welche die Expression des *RGB-S* Reporters deutlich induzieren können. Alle weiteren Diagramme werden in den Anlagen 16 bis 21 im Anhang aufgelistet. Die Ergebnisse sind in den Diagrammen 23 bis 25 dargestellt.

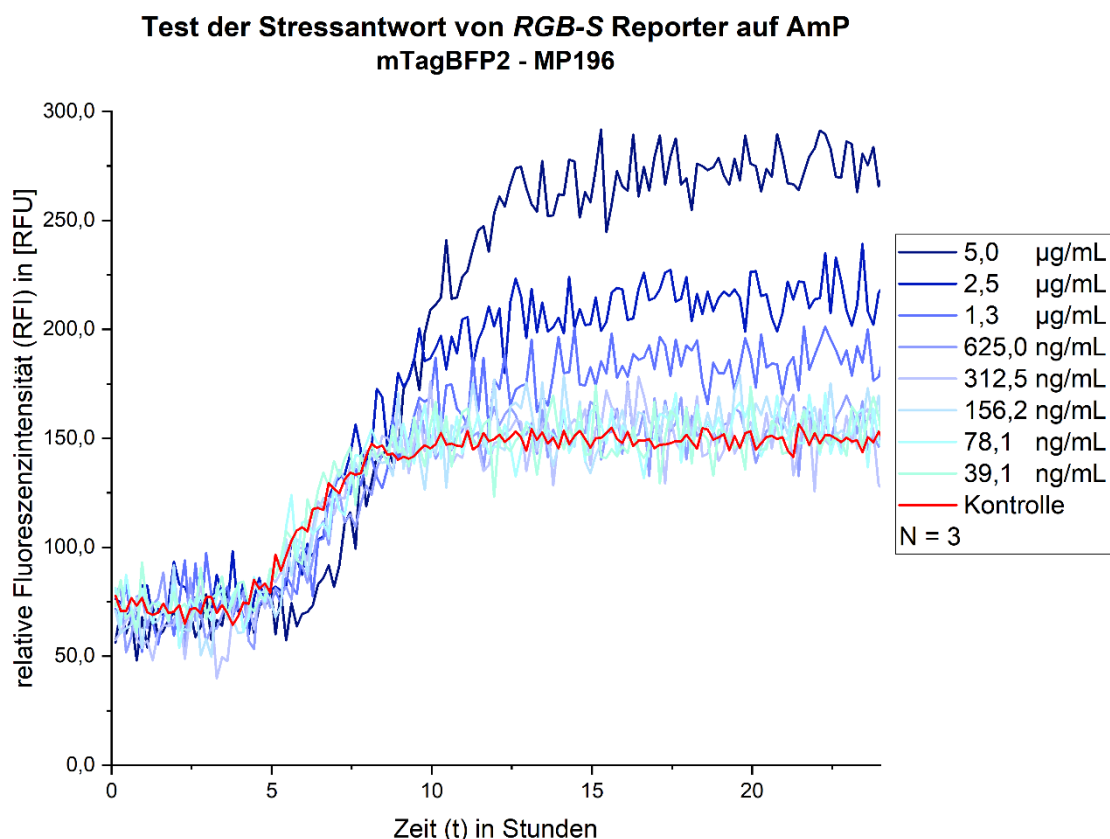


Diagramm 23: Zunahme der Fluoreszenzintensität von **mTagBFP2** im Verlauf von einem Tag, bei der Exposition des *RGB-S* Reporters mit MP196.

**Test der Stressantwort von *RGB-S* Reporter auf AmP
GFPmut3b - MP196**

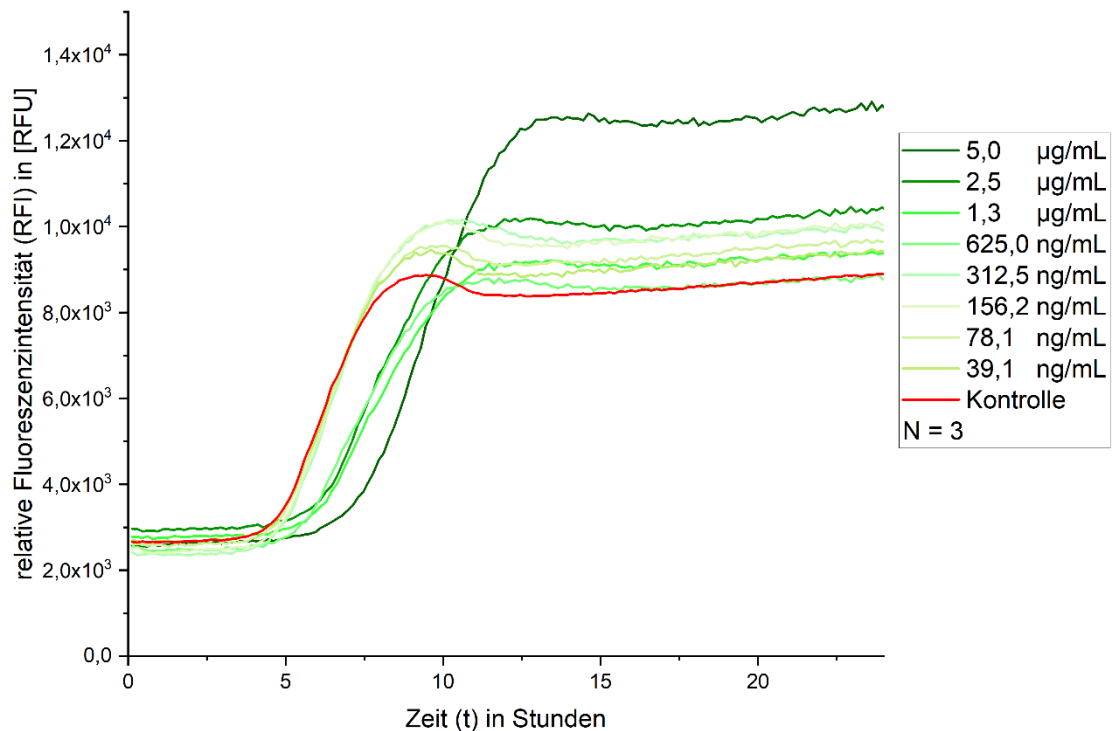


Diagramm 24: Zunahme der Fluoreszenzintensität von **GFPmut3b** im Verlauf von einem Tag, bei der Exposition des *RGB-S* Reporters mit MP196.

**Test der Stressantwort von *RGB-S* Reporter auf AmP
mRFP1 - MP196**

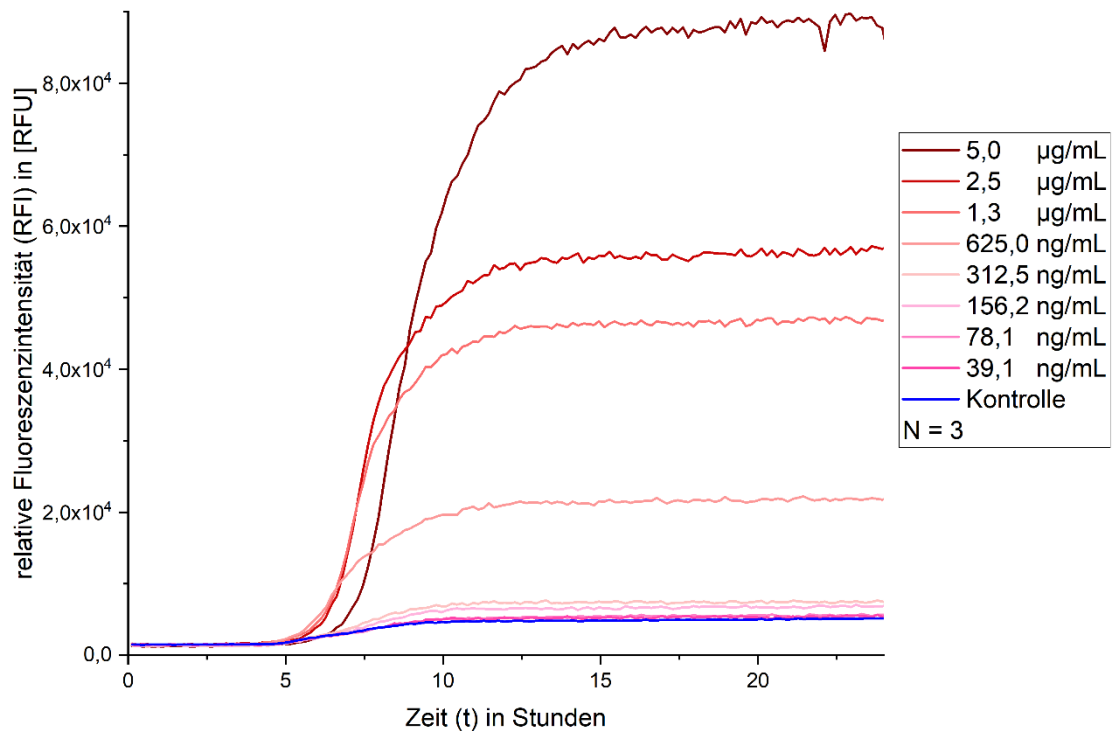


Diagramm 25: Zunahme der Fluoreszenzintensität von **mRFP1** im Verlauf von einem Tag, bei der Exposition des *RGB-S* Reporters mit MP196.

Die Expression von allen drei fluoreszierenden Proteinen wird durch das Peptid MP196 am stärksten aktiviert. Von diesen Proteinen wird aber tatsächlich nur **mRFP1** um ein Vielfaches der Kontrolle aktiviert. Es zeigt sich ein deutlich erkennbarer Anstieg der mit diesem Protein assoziierten Fluoreszenz ab einer Substanzkonzentration von 625,0 µg/mL. Das Spektrum von **mRFP1** lässt sich durch den *Innoscan 1100 AL* aufzeichnen. Somit ist das Peptid MP196 der beste Kandidat aus der verfügbaren Auswahl, um ein Signal innerhalb des mikrostrukturierten Glasträgers zu erzeugen.

4.10.6 Durchführung eines Beweises des Prinzips

Die Herstellung von mikrostrukturierten Glasträgern mit konjugierten Peptiden ist Bestandteil der Dissertation von Dr. Zekun Zhou^[44]. Er hat sich bereit erklärt, MP196 *via* eines Photo-Linkers auf einen mit 10:90-PEGMA-co-PMMA-Polymerfilm veredelten mikrostrukturierten Glasträger zu koppeln. Die maximale Beladung eines auf diese Art und Weise modifizierten Glasträgers entspricht 1,0 bis 2,0 nmol/cm². Entsprechend eigener Berechnung ergibt die Summe aus Grund- und Mantelfläche einer Kavität innerhalb eines mikrostrukturierten Glasträgers eine Fläche von 490,1 µm². Dementsprechend werden in jeder Kavität im Optimalfall bis zu 4,9 fmol des Peptids angeknüpft. Wenn für eine Schätzung davon ausgegangen wird, dass jede Kavität nach der Befüllung und während der Inkubation zur Hälfte gefüllt ist, besitzt diese ein Flüssigkeitsvolumen von 0,6 pL. Wird nach der Abspaltung des Photo-Linkers jedes Peptid in dieser Flüssigkeit gelöst, ergibt sich eine Stoffmengenkonzentration von 8,2 mMol, was einer Konzentration von 10,4 mg/mL entspricht. Allerdings ist zu beachten, dass dies ein theoretischer Wert unter optimalen Bedingungen ist. Sowohl bei der Kupplung als auch bei der Abspaltung ist nicht von einer vollständigen Umsetzung auszugehen. Ebenso ist es nicht möglich die Wirkung von physikalischen Kräften in diesem Maßstab abzuschätzen. Es gibt daher noch weitere, unbestimmte Faktoren, welche die Konzentration reduzieren können. Ein direkter Nachweis der abgespaltenen Peptide kann aufgrund einer fehlenden Detektionsmöglichkeit nicht erfolgen.

Der *RGB-S* Reporter wird durch die Befüllungskammer in die Kavitäten des modifizierten, mit dem Peptid beladenen, mikrostrukturierten Glasträgers gefüllt. Anschließend wird der Photo-Linker gespalten und das Bakterium zusammen mit dem Peptid inkubiert. Parallel hierzu wird eine Kontrolle ohne Peptid den gleichen Bedingungen ausgesetzt. Die Fluoreszenzintensität von **mRFP1** auf beiden mikrostrukturierten Glasträgern wird nach der Inkubationszeit durch den *Innoscan 1100 AL* dokumentiert. Ausschnitte mit einer Größe von ~ 22,4 mm² dieser Dokumentation sind in Abbildung 63 dargestellt. Der Box-Plot mit den Messergebnissen wird in Diagramm 26 gezeigt.

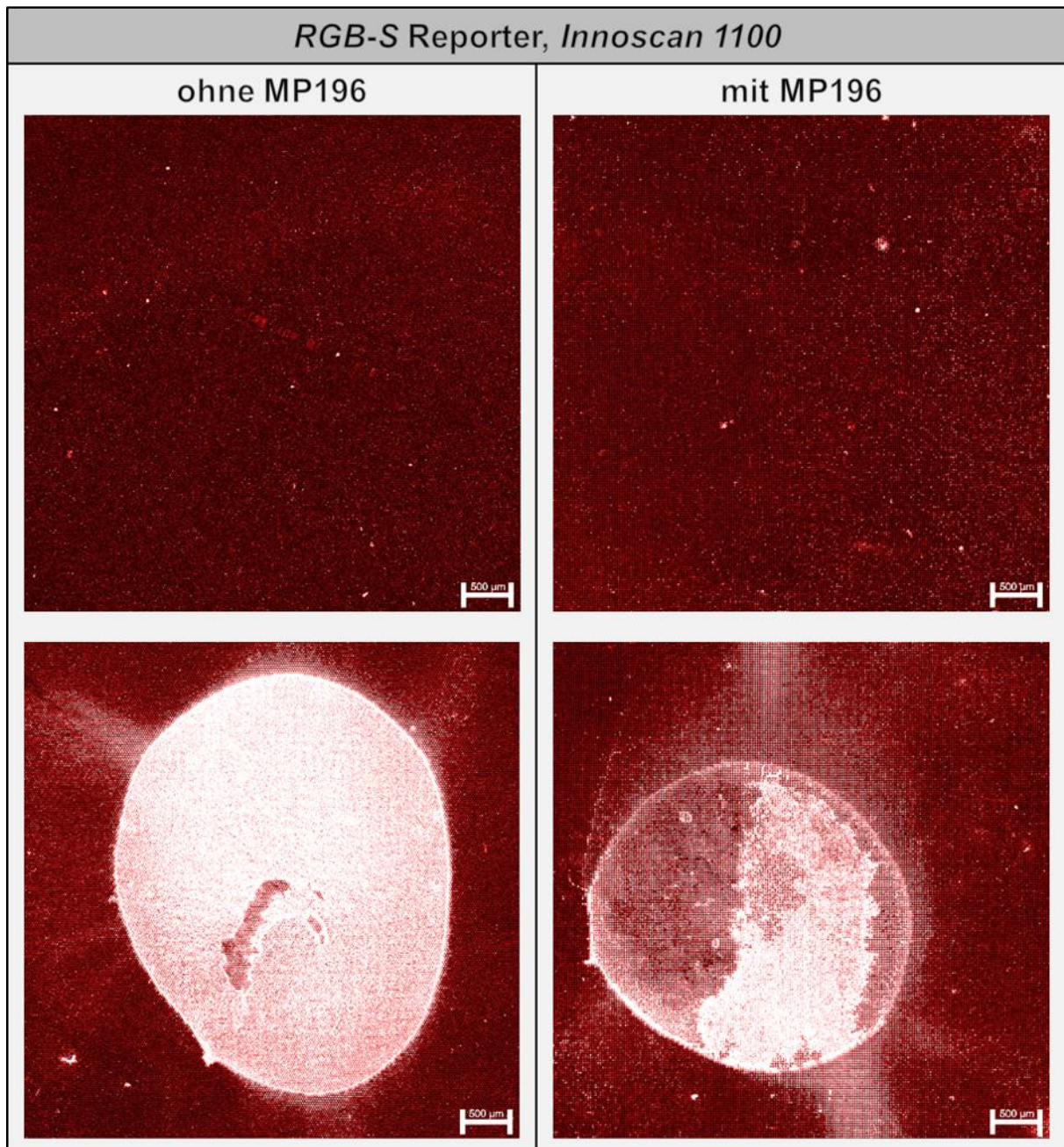


Abbildung 63: *RGB-S Reporter* nach Inkubation in einem mikrostrukturierten Glasträger mit (rechts) und ohne (links) MP196. Die Bilder sind in Falschfarben dargestellt und deren Helligkeit um 30,0 % verstärkt.

Ähnlich wie bei der Inkubation mit Ciprofloxacin zeigen beide Bilder eine starke Heterogenität. Die SA erreicht hierbei einen Anteil von 87,1 % für den Testlauf mit MP196 und 84,2 % für die Kontrolle. Hierbei sind bei beiden Glasträgern mehrere überbelichtete Artefakte zu beobachten, welche eine ähnliche Fläche einnehmen. Die Inkubation mit dem AmP hat eine Befüllungsrate von 97,8 % und zeigt eine um 10,7 % höhere GFI als die Kontrolle, welche eine Befüllungsrate von 96,0 % aufweist. Aufgrund der hohen Stichprobenzahl ergibt sich zwischen Testlauf und Kontrolle ein signifikanter Unterschied bei einem α von 1×10^{-4} . Trotz der Signifikanz ist ein eindeutiges Ergebnis anzuzweifeln. Der *RGB-S Reporter* ist während der

Durchführung erheblichem Stress ausgesetzt. Am wahrscheinlichsten wird der Stress, welcher **mRFP1** induziert durch einen Nährstoffmangel [1368] oder Dehydration [1371] ausgelöst. Ebenso ist die SA beider Dokumentationen aufgrund der heterogenen Signalverteilung sehr groß. Dies reduziert die Zuverlässigkeit der Ergebnisse.

Box-Plot *RGB-S* Reporter relative Signalstärke Vergleich mit und ohne MP196

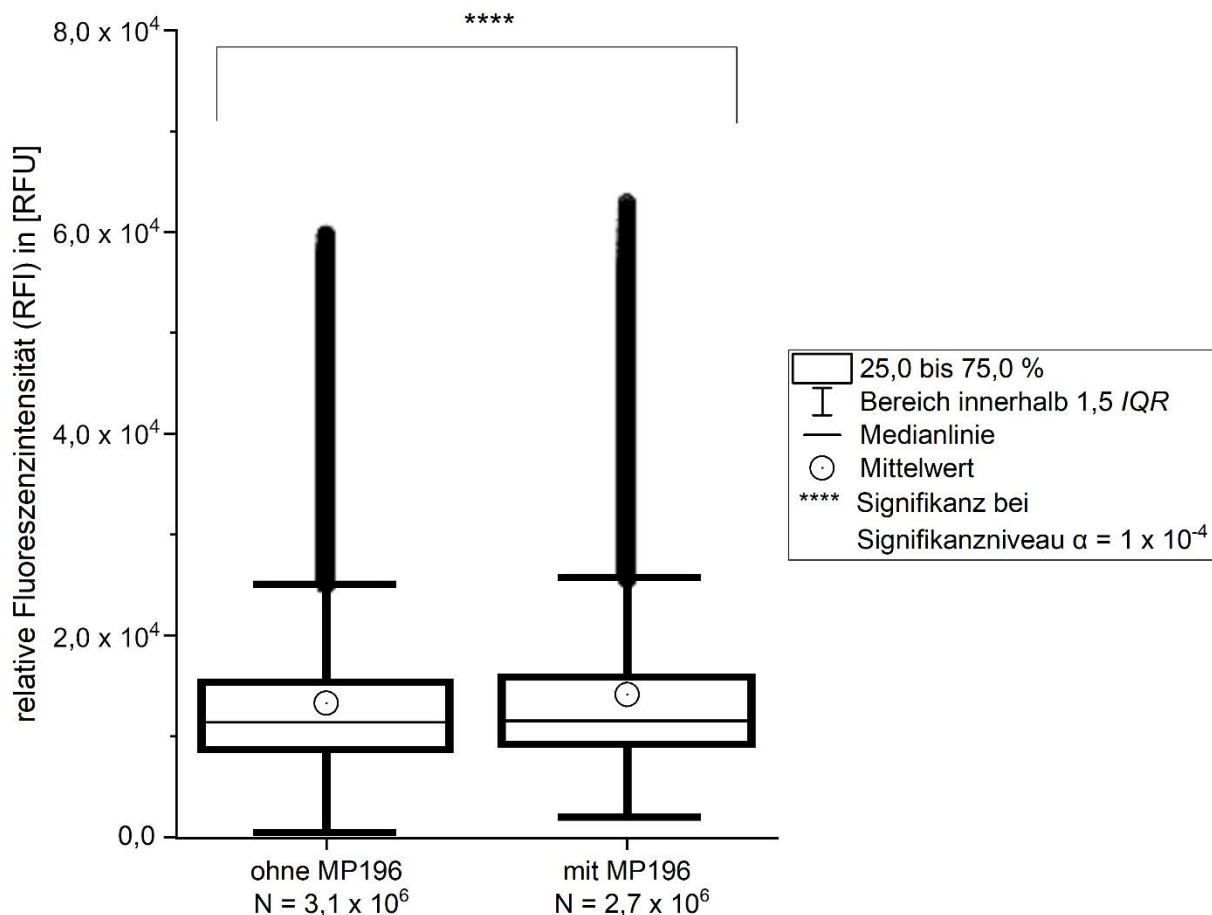


Diagramm 26: Die Darstellung im Box-Plot zeigt die Verteilung der Signalstärken von **mRFP1** innerhalb der mit *RGB-S* Reporter befüllten Kavitäten der beiden mikrostrukturierten Glaträger. Werte, die außerhalb des anderthalbfachen *IQR* liegen, werden als statistische Ausreißer betrachtet.

Der toxische Effekt von MP196 kann von dem *RGB-S* Reporter innerhalb der Kavitäten des Glaträgers nach Abspaltung der Peptide von dem Polymer durch die Expression von **mRFP1** nachgewiesen werden. Dieser erste Versuch zeigt aber größere Störquellen auf, welche die Qualität des Ergebnisses beeinflussen. Die Information über diese Störquellen kann in Zukunft dazu verwendet werden, um entsprechend Maßnahmen zu ergreifen, damit diese beseitigt werden können. Aufgrund des großen Aufwands und mangelnder Zeit konnte kein weiterer Versuch durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

In Substitutionsanalysen von mehreren Seren gegen das Epitop ‚HYVPEFKGSLPAPRV‘, konnte nach Sekundärfärbungen gezeigt werden, dass fast alle **IgG** und ungefähr die Hälfte aller **IgA** eine Affinität zu diesem Epitop besitzen. Alle Sekundärfärbungen zeigen einen sehr ähnlichen Antikörper-Fingerabdruck mit essenziellen Aminosäuren, welche fast immer an denselben Positionen zu beobachten sind. In der Signalstärke dieser Substitutionsanalyse konnte lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen Personen mit und ohne bekannten Allergien festgestellt werden.

Durch eine Affinitätschromatographie wurde der auf das Epitop ansprechende Antikörper aus mehreren Personen erfolgreich isoliert. Hierbei wurden Diskrepanzen in der Signalstärke einzelner Peptidspots von Substitutionsanalysen zwischen Eluat und Serum festgestellt, welche zur Annahme führen, dass sich die hypervariablen Regionen der eluierten Antikörper in Nuancen unterscheiden. Diese Diskrepanzen führen zu einer unterschiedlichen Retentionszeit der in der Elution befindlichen Antikörper. Die exakten Unterschiede in den Retentionszeiten sind individuell von den Testpersonen abhängig und können so groß sein, dass davon auszugehen ist, dass mehrere Antikörper mit ähnlichem, aber nicht gleichem Paratop aufgereinigt wurden. Ist die Affinität des Antikörpers gegenüber dem Epitop in der stationären Phase zu groß, reduziert das die Ausbeute von funktionsfähigen Antikörpern drastisch. Ein Anteil der gebundenen Antikörper kann auch nach mehrfacher Elution nicht von der stationären Phase getrennt werden.

Eine Charakterisierung des Antikörpers ergibt, dass sich im Eluat Antikörper befinden, welche schwere konstante Ketten besitzen, die mit **IgG₁**, **IgG₂**, **IgA₁** und **IgM** assoziiert werden können. Alle diese Antikörper besitzen eine leichte konstante Kette des κ -Isotyps. Durch MS analysierte Eluate zeigen unterschiedliche Möglichkeiten für variable Ketten. Dies spricht dafür, dass sich im Gemisch tatsächlich unterscheidbare Antikörper mit abweichender Zusammensetzung befinden. Insgesamt ist die Auswahl an potentiellen Antikörpern aber geringer, als es eine zufällige Selektion von Antikörpern vermuten lassen würde. Als wahrscheinlichste Treffer für Anti-**Emp-IgG** wird in dieser Analyse die schwere variable Kette 3-48 und die leichte variable Kette 2-28, beziehungsweise 2-28D angenommen.

Die Interaktion von Antigen und Antikörper konnte sowohl *in vitro*, als auch *in situ* am Wildtyp bewiesen werden. Hierbei hat sich gezeigt, dass Anti-**Emp** den Wildtyp nicht mehr binden kann, wenn die Sequenz im Epitop des Antigens abweicht. In beiden Nachweisen haben Immunglobulin-bindende Proteine starke Störsignale während der Analyse erzeugt, welche durch die Zugabe von unspezifischen Antikörpern reduziert werden konnten.

Im Funktionsnachweis *in vivo* wurde tatsächlich ein hemmender Effekt von Anti-**Emp** gegen *ATCC*[®] 25904[™] beobachtet. Dieser Effekt konnte sowohl bei 168L, als auch bei USA300 nicht nachgewiesen werden. 168L besitzt ein vom Epitop des Antikörpers marginal abweichendes Antigen und USA300 eine deutlich größere Virulenz als *ATCC*[®] 25904[™]. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass die individuelle Virulenz der *Staphylokokken* einen starken Einfluss auf die Effizienz der Effektorfunktion von Anti-**Emp** hat. Die Ergebnisse deuten sogar darauf hin, dass der Antikörper in Abhängigkeit von der Virulenz einen gegenteiligen Effekt besitzen könnte. Interessanterweise wurde im Rahmen dieser Dissertation eine signifikante Reduktion der KbE beobachtet, wenn USA300 mit **ApoA1** opsonisiert und anschließend neutrophilen Zellen ausgesetzt wird.

Ein Phagen-Display des Epitops ergab in einer Bibliothek, bestehend aus 1 Bill. naiver B-Zellen nur sechs tatsächliche Treffer, von denen keiner dieselbe Spezifität oder Affinität des Anti-**Emp**-Antikörpers zeigt. Die Immunogenität des Epitops ist daher sehr schwach und eine zufällige Auswahl des Antikörpers sehr unwahrscheinlich. Erste Versuche, B-Gedächtniszellen, welche diesen Antikörper exprimieren, zu isolieren, haben kein schlüssiges Ergebnis erzielt.

Die Detektion von stochastischen generierten und antibakteriellen Substanzen durch den *RGB-S* Reporter ist möglich. Allerdings benötigt die Implementierung noch mehr Entwicklungszeit.

6 Diskussion

Die Beziehung zwischen dem Menschen und *Staphylococcus aureus* als Pathogen und die Suche nach einem wirksamen Impfstoff gegen das Pathogen sind prominente Themen, welche die Forschung schon seit Jahrzehnten beschäftigt. Dementsprechend gibt es eine große Menge an Informationen, welche zum Vergleich und zur Interpretation der Ergebnisse dieser Dissertation herangezogen werden können.

Betrachtet man die große Bandbreite und Titer von gegen *Staphylokokken* gerichteten Antikörpern in den Seren einer größeren Population, so zeigen nur etwa 6,8 % davon ein niedrigen oder keinen Antikörpertiter gegen *Staphylococcus aureus*^[252]. Insofern ist es nicht außergewöhnlich, dass fast jede Person über den Anti-**Emp**-Antikörper verfügt. Bei besiedelten Personen ist die Menge der gegen das Bakterium gerichtete Antikörpern im Durchschnitt um 40,0 % höher als bei Personen ohne Besiedlung^[252]. Speziell die Antikörper, welche gegen **Emp** gerichtet sind, zeigen bei der Antikörperklasse **IgG** einen stark erhöhten Titer bei Nichtrauchern, wenn sie mit Rauchern verglichen werden^[252]. **IgA**, die dieses Protein binden, gehören durchschnittlich zu den zehn häufigsten Antikörpern, welche von Personen gegen *Staphylococcus aureus* ausgebildet werden und erreichen bei Männern vergleichsweise einen deutlich höheren Titer als bei Frauen^[252]. In den Sekundärfärbungen der Substitutionsanalysen auf den Mikroarrays hat sich jedoch keine dieser Tendenzen gezeigt. Der einzige signifikante Unterschied beim Vergleich der GFI innerhalb der Testpopulation ist, dass Personen mit einer starken Signalstärke vermehrt unter Allergien leiden. Da für *Staphylococcus aureus* bekannt ist, dass sie Allergien im Wirt fördern können^[1027,1028], kann das ein Hinweis darauf sein, dass Anti-**Emp** ein Indikator für eine durch *Staphylokokken* geförderte Allergie ist. Zu beachten ist allerdings, dass in der Färbung nur eine eingeschränkte Gruppe von Anti-**Emp**-Antikörpern untersucht wird, welche das Epitop ‚HYVPEFKGSLPAPRV‘ binden. Es besteht die Möglichkeit, dass noch weitere Anti-**Emp**-Antikörper existieren, welche ein anderes Epitop des Proteins ansprechen und nicht durch die Mikroarrays detektiert werden können. Auch ist die Bestimmung der GFI durch Substitutionsanalysen ungenauer als andere Methoden, wie beispielsweise eine Titerbestimmung des Antikörpers. Außerdem ist der Stichprobenumfang in dieser Arbeit deutlich geringer als in statistischen Untersuchung mit größerem Umfang, wie beispielsweise in der Publikation von Meyer *et al.* (2021)^[252]. Die Ergebnisse dieser Dissertation lassen sich deshalb nur schwer mit denen von anderen Publikationen vergleichen.

Die der Affinitätschromatographie folgenden Substitutionsanalysen der Elutionen zeigen, dass sich in der Affinität Unterschiede zwischen dem Serum und den daraus aufgereinigten Antikörpern ergeben können. Diese Unterschiede reichen von kleineren Varianzen in der

Signalstärke einiger Substitutionen in nicht-essenziellen Positionen bis hin zu größeren Unterschieden an essenziellen Aminosäuren des Epitops. Die Größe der Varianz ist hierbei von der individuellen Person abhängig. So zeigen die gegen das Epitop **,HYVPEFKGSLPAPRV'** gerichteten Anti-**Emp**-Antikörper bei einigen Personen eine schmale Bandbreite an Nuancen in der Affinität, welche sich auch auf die individuelle Retentionszeit innerhalb der stationären Phase auswirkt. Bei einer anderen Person ist die Bandbreite wiederum so groß, dass deutliche Unterschiede in den Signalstärken der Peptidspots mit Substitutionen an essenziellen Positionen zu sehen sind. Bei diesen Personen ist davon auszugehen, dass sie über mehrere Antikörper verfügen, die zwar das gleiche Epitop binden, diese aber aufgrund ihrer abweichenden Retentionszeit während einer Affinitätschromatographie voneinander getrennt werden. Das Epitop all dieser Antikörper ist sich daher sehr ähnlich, besitzt aber immer noch eine zufällige Komponente, welche bei jeder Person über die Bandbreite der individuellen Nuancen und Unterschiede entscheidet. Die Existenz dieser Bandbreite an Antikörpern kann durch die somatische Hypermutation bedingt sein. Da die involvierten B-Zellen innerhalb dieses Entwicklungsschrittes um das Überlebenssignal der T-Zellen konkurrieren ^[51], ist es möglich, dass sich mehr als eine Variante eines Antikörpers entwickelt, welche das Antigen gut binden kann. So können analog zueinander mehrere B-Zellen mit abweichenden Mutationen in der variablen Domäne erzeugt werden, welche die Überlebenssignale in ähnlicher Menge empfangen.

Der Ursprung des Anti-**Emp**-Antikörpers kann nicht genau ermittelt werden, da seine Eigenschaften die Kriterien von mehreren B-Zell-Typen erfüllen. Die Spezifität des Antikörpers spricht für einen T-Zell-abhängigen Entwicklungsprozess, in welchem diese durch somatische Hypermutation optimiert wird ^[38,51]. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse des Phagen-Displays aber, dass naive B-Zellen nur sehr selten auf das Antigen reagieren und eine hohe Kreuzreaktivität besitzen. Eine starke Konservierung und die Unveränderlichkeit des Antikörpers in mehreren Personen wiederum sind Eigenschaften, welche hauptsächlich von T-Zell-unabhängigen Immunantworten und unkonventionellen B-Zellen bekannt sind ^[51]. Unkonventionelle B-Zellen bilden bevorzugt Antikörper aus, welche über schwere variable Ketten aus der Genfamilie VH3 ^[328] verfügen und die als **IgG** den Subtyp **IgG₃** besitzen ^[349,350]. Entsprechend den Ergebnissen aus der MS erfüllt der Antikörper zumindest eine dieser beiden Kriterien. Natürliche Antikörper zielen aber normalerweise auf Membranbausteine ab ^[329,330] und besitzen für gewöhnlich nur eine sehr schwache Affinität ^[51].

Sowohl Plasma-Gedächtniszellen ^[232,239], als auch unkonventionelle B-Zellen ^[311,312] sind in der Lage, Antikörper zu sekretieren, und könnten somit den Titer im Serum erklären. In einer Publikation von Graf *et al.* (2019) wurde gezeigt, dass konventionelle, gereifte B-Zellen unter den richtigen Bedingungen zu unkonventionellen Zellen konvertiert werden können ^[354].

Stimmt diese Beobachtung, ist die bisher bekannte Unveränderlichkeit des Bestandes an natürlichen Antikörpern nicht gegeben. Eine B-Zelle, welche einen Antikörper mit guter Spezifität und Affinität gegen ein Antigen produziert, könnte somit zu einer unkonventionellen B-Zelle konvertiert werden und daraufhin natürliche Antikörper sezernieren. Findet diese Konvertierung in beide Richtungen statt, ist es sogar möglich, dass sowohl konventionelle als auch unkonventionelle B-Zellen, welche Anti-**Emp** sezernieren, zur gleichen Zeit bestehen können.

Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass die unterschiedlichen Populationen von B-Zellen deutlich zahlreicher und komplexer sind als angenommen ^[1431]. Es ist somit auch möglich, dass die Produktion des Anti-**Emp**-Antikörpers von B-Zellen vollzogen wird, über die zu dem aktuellen Zeitpunkt in der Forschung noch wenig bekannt ist. Tatsächlich gibt es doppelt negative B-Zellen, welche sich morphologisch von den konventionellen B-Zellen kaum unterscheiden. Diese B-Zellen präsentieren an ihrer Oberfläche weder **IgD**, noch **CD27** ^[1431]. Ein solcher Zelltyp wird von Fecteau *et al.* (2006) beschrieben und als Gedächtniszelle identifiziert ^[1440]. Die Forschungsgruppe beschreibt hierbei, dass dieser Zelltyp bis zu 4,0 % aller peripheren B-Zellen und etwa 27,0 % aller **IgG** exprimierenden Zellen ausmacht. Sie besitzen eine große strukturelle Ähnlichkeit mit normalen B-Gedächtniszellen und zeigen eine ähnliche Antigenselektion. Sie unterscheiden sich aber wesentlich in ihrer Mutationsrate und in der Expression von **IgG**-Subtypen. Die meisten der doppelt negativen B-Zellen zeigen nur eine marginal kleinere Mutationsrate als konventionelle B-Gedächtniszellen, aber ein Anteil von 13,7 % zeigt keine oder eine einzige Mutation in der Sequenz ihres Antikörpers. Bei der Expression in den Subtypen zeigt sich bei den doppelt negativen Zellen eine deutliche Verschiebung zu dem Isotyp **IgG₃**, während konventionelle B-Zellen deutlich öfter **IgG₂** exprimieren. Fecteau *et al.* (2006) vermuten aufgrund dieser Unterschiede, dass diese beiden B-Zell-Populationen unterschiedliche Funktionen besitzen und sich in ihrer Herkunft unterscheiden ^[1440]. Bezugnehmend auf Vermutungen anderer Wissenschaftler ^[1441-1443], stellen sie die Hypothese auf, dass es sich bei dieser Population um kurzlebige B-Gedächtniszellen handelt, welche sich schnell nach einer Primärinfektion bilden ^[1440]. Der Mangel an **CD27** erschwert die Kommunikation dieser Zellen mit anderen B- oder T-Lymphozyten ^[1444] und ihre Differenzierung zu Plasmazellen ^[1445]. Dementsprechend macht es diese Zellen aber auch unabhängig von der entsprechenden Inhibition, welche durch eine Interaktion zwischen **CD27** und **CD70** erzeugt werden kann ^[1446]. Zusätzlich zu der von Fecteau *et al.* (2006) ^[1440] beschriebenen Population an doppelt negativen B-Zellen wurden noch weitere, gewebespezifische B-Gedächtniszellen entdeckt, welche kein **CD27** präsentieren und eine niedrige Mutationsrate aufweisen ^[1447]. Aufgrund der niedrigen Mutationsrate, durch welche diese Zellen definiert werden, besteht eine erhebliche Wahrscheinlichkeit, dass der Ursprung des Anti-**Emp**-Antikörpers eine doppelt negative

B-Gedächtniszelle sein könnte. Tatsächlich ist die Rolle dieser Zellen in der Immunabwehr aber noch größtenteils unbestimmt^[1448]. Neue aufgrund der SARS-CoV-2-Pandemie erworbene Erkenntnisse zeigen allerdings, dass sie mit großer Wahrscheinlichkeit an der Antigenpräsentation und der Sezernierung sowohl von Chemo- und Zytokinen als auch von gegen den Körper gerichteten Antikörpern beteiligt sind^[1449]. Es ist daher nicht auszuschließen, dass sich aus diesen B-Gedächtniszellen auch Plasma-Gedächtniszellen entwickeln können, welche einen Antikörpertiter im Blut erzeugen können.

Weiterhin bleibt es ein großes Rätsel, warum die Antikörper-Fingerabdrücke von Anti-**Emp**-Antikörpern in den Substitutionsanalysen von jedem getesteten Serum eine so große Ähnlichkeit besitzen. Die Selektion von Antikörpern basiert normalerweise auf Zufall^[51], aber die bisherigen Beobachtungen bezüglich dieses Antikörpers widerspricht diesem Lehrbuchwissen. Aus aktueller Literatur lassen sich vier Theorien zusammenfassen, welche die große Ähnlichkeit in den Antikörper-Fingerabdrücken erklären können.

Nach der ersten Theorie bietet **Emp** das Epitop des Anti-**Emp**-Antikörpers bevorzugt an, wenn es eines seiner Konjugate gebunden hat. Tatsächlich wurde dies bereits bei dem *MSCRAMM* **FnBPA**, welches ähnliche Liganden besitzt, beobachtet^[1119-1121,1450]. Wenn diese Theorie zutrifft, ist aber die Frage offen, warum sich nicht auch **FnBPA** in der Arbeit von Frau Weber als hervorstechendes Epitop gezeigt hat^[42]. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine unterschiedliche Immunogenität der beiden Proteine. Zumindest aber für **IgA** ist die durchschnittliche Produktion von Antikörpern bei beiden Antigenen ähnlich^[252].

Nach der zweiten Theorie ist anzunehmen, dass der Antikörper gegen dieses Protein schon so oft die hypersomatische Rekombination durchlaufen hat, dass die involvierten B-Zellen das beste gegen dieses Protein gerichtete Epitop entwickelt haben. B-Gedächtniszellen können die somatische Hypermutation bei jeder nachfolgenden Infektion noch einmal durchlaufen^[51]. Maßgeblich hierfür ist allerdings, dass die entsprechenden Gedächtniszellen aktiviert werden. Sowohl Holtfreter *et al.* (2010)^[288], als auch Bröker *et al.* (2011)^[250] gehen von subtilen Interaktionen zwischen Pathogen und Wirt aus, welche ausreichend sind, um eine Antikörper-erzeugenden Immunreaktion auszulösen. Das Alter der Testpersonen ist innerhalb dieser Dissertation relativ ähnlich. Wenn man sich vergegenwärtigt, dass *Staphylokokken* schon sehr früh mit einem Menschen in Kontakt kommen^[413] und Plasma-Gedächtniszellen sich schon in sehr jungem Alter entwickeln können^[1451] gibt es ein großes Zeitfenster, in dem solche subtilen Reaktionen passieren könnten. Allerdings müsste es in diesem Fall zwischen besiedelten Personen und Personen ohne Besiedlung einen sichtbaren Unterschied geben, der bei den Versuchen zu dieser Dissertation aber nicht festgestellt werden konnte.

Entsprechend der dritten Theorie ist es möglich, dass die Ausbildung der Antikörper nicht durch den Menschen, sondern durch das Bakterium geprägt wird. *Staphylococcus aureus* besitzt ein großes Repertoire an Virulenzfaktoren, mit denen es Immunzellen zu seinem Vorteil manipulieren kann ^[603,914,915]. Daher ist es nicht ausgeschlossen, dass die Ähnlichkeit des Antikörper-Fingerabdrucks innerhalb einer großen Population durch einen weiteren Virulenzfaktor des Bakteriums verursacht wird, um das Immunsystem zu unterwandern. Damit dies allerdings evolutionär Sinn ergibt, müsste die Produktion des Antikörpers einen nachteiligen Effekt für den Wirt verursachen. Ob dies der Fall ist, wird weiter unten im Text zusammen mit der Funktion des Anti-**Emp**-Antikörpers diskutiert.

Die letzte mögliche Theorie nimmt an, dass die Erbinformation des Antikörpers von einer Generation auf die nächste übertragen wird. Eine solche Vererbung ist zwar bei dem Menschen noch nicht bekannt, aber tatsächlich wurde sie bereits bei Pflanzen nachgewiesen. Diese können eine transgenerationale Immunität durch epigenetische Veränderungen ihres Erbguts erreichen ^[1452]. Bei Menschen selbst sind bereits epigenetische Veränderungen in Form von Histonmodifikationen bekannt, welche von der Mutter auf die nächste Generation übertragen werden ^[1453]. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass es auch bisher unbekannte Mechanismen gibt, welche eine Vererbung von Antikörpern ermöglicht. In einer Studie nach Xu *et al.* (2015) ^[1454] wurden in einem Hochdurchsatz-Screening die viralen Antikörper im Serum von 569 verschiedenen Menschen aus vier unterschiedlichen Kontinenten durch Epitope auf Peptiden untersucht. Eine der Beobachtungen innerhalb dieses Screenings ist, dass die antiviralen Antikörper von der Mehrheit der Testpersonen die gleichen immundominanten Peptide innerhalb bestimmter Antigene erkennen. Bei einigen Antigenen zeigten sich hierbei interkulturelle Unterschiede in der Spezifität der Antikörper. Xu *et al.* ^[1454] erklärt dieses Phänomen durch jeweilig endemische Virusvarianten und Polymorphismus der in der Immunantwort beteiligten Proteine. Die Beobachtung kann aber auch ein Indiz für vererbliche Antikörper darstellen. Ob ein solcher Mechanismus existiert, auf welche Art und Weise er funktioniert und nach welchen Kriterien Antikörper für eine mögliche Vererbung selektiert werden könnten, bleibt allerdings Spekulation.

Durch weitere massenspektrometrische Analysen ^[1455] von Anti-**Emp**-Antikörpern aus zwei weiteren Spendern haben sich die schwere variable Kette 3OR16-9 und die leichte variable Kette 2D-28 und 2-28 als die wahrscheinlichsten Bestandteile der Antikörper bestätigt. Diese Daten ergänzen sich mit denen, welche in Kapitel 4.3.3 „**Massenspektrometrische Analyse des Anti-Emp-Antikörpers**“ beschrieben werden. Dies ist ein starker Hinweis dafür, dass nicht nur das Epitop, sondern auch die Struktur des Antikörpers bei mehreren Personen identisch ist. Diese Beobachtung müsste aber zunächst mit einer größeren Anzahl von Stichproben aus unterschiedlichen Spendern überprüft werden. In dem Fall, dass sich die

Beobachtung bestätigt, ist eine zufällige Selektion von Anti-**Emp** auszuschließen. Die geringe Trefferquote im Phagen-Display hebt hervor, mit welcher Seltenheit naive Zellen mit genau diesem Epitop übereinstimmen. Aufgrund dieser geringen Immunogenität besteht die Möglichkeit, dass diese variablen Ketten die beste Grundlage für die hypervariablen Regionen bieten, um genau dieses Epitop zu binden. Unterstützt wird diese Annahme durch die ubiquitäre Existenz von Antikörpern gegen bestimmte Pathogene. Die Diversität der in der somatischen Rekombination ausgewählten Gene dieser Antikörper ist für die variablen Ketten eingeschränkter, als eine zufällige Selektion vermuten lassen würde ^[1456-1458].

Die Effektivität des Anti-**Emp**-Antikörpers darin, das natürliche Immunsystem in der Bekämpfung der *Staphylokokken* zu unterstützen, konnte für einen Bakterienstamm mit niedriger Virulenz (*ATCC*[®] 25904[™]) und passendem Epitop des **Emp** gezeigt werden. Unterscheidet sich das Antigen des Wildtyps (168L) oder hat der Bakterienstamm eine größere Virulenz (USA300), bleibt dieser Effekt aus oder kehrt sich sogar um. Die Virulenz spielt also in der Effektivität des Antikörpers eine entscheidende Rolle, eine Beobachtung, welche auch schon für andere Antikörper von weiteren Publikationen bestätigt wurde ^[1459,1460]. Eine generelle Interaktion von 168L mit den *HL-60* Zellen und den getesteten Proteinen ist sehr gering, was vermuten lässt, dass es nur einen geringen Bezug zwischen 168L und dem Menschen als Wirt gibt. Die Phagozytose von opsonierten *Staphylokokken* erfolgt innerhalb von 15 Minuten und der respiratorische Schub erst eine halbe Stunde danach ^[152]. Es ist daher nicht zwingend die ausbleibende Phagozytose, sondern eher die mangelnde Tötungseffizienz von *HL-60* Zellen, weshalb USA300 überlebt ^[195,873]. Des Weiteren hat sich in den Ergebnissen der Arbeit eine große Differenz im Anteil der Immunglobulin-bindenden Proteinen zwischen *ATCC*[®] 25904[™] und USA300 gezeigt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese Proteine einen wesentlichen Beitrag darin leisten, die *Staphylokokken* vor dem humoralen Immunsystem zu schützen.

Über die Virulenz hinaus besitzen USA300 und *ATCC*[®] 25904[™] noch weitere, wesentliche Unterschiede. Beispielsweise besitzt USA300 keine Kapsel aus Polysacchariden ^[1130], welche normalerweise darin involviert ist, eine Opsonisierung zu verhindern ^[787,788]. Da dieser Bakterienstamm einer der erfolgreichsten pathogenen *Staphylokokken* ist, liegt die Vermutung nahe, dass er andere Möglichkeiten gefunden hat, um eine Opsonisierung zu verhindern ^[1461], diese keinen Einfluss mehr auf seine Überlebensfähigkeit hat, oder er sie sogar zu seinem Vorteil ausnutzen kann. Der Bakterienstamm *ATCC*[®] 25904[™] besitzt zusätzlich zu seiner reduzierten Virulenz defektes **FnBPA**, was ihm eine Internalisierung in Wirtszellen erschwert und bei ihm deshalb zu einer geringeren Überlebenschance gegenüber neutrophilen Zellen führt ^[1462]. Ein wesentlicher Unterschied zwischen *ATCC*[®] 25904[™] und USA300 ist, dass sich bei Ersterem eine Mutation in *saeR* stark auf dessen Expression von Leukotoxinen

auswirkt^[1463]. Direkt nach dem Kontakt von neutrophilen Zellen und *Staphylokokken* kommt es zwischen beiden Parteien bereits ohne eine Opsonisierung zum Austausch von toxischen Substanzen^[617]. Durch die größere Expression von Leukotoxinen durch USA300, kann dieser die Anzahl an neutrophilen Zellen effektiver als ATCC® 25904™ reduzieren, bevor diese die Toxizität erwidern können. Diese Annahme lässt sich dadurch bestätigen, dass bereits die Zellen ohne die Zugabe von opsonisierenden Substanzen die Kolonienzahl von USA300 deutlich weniger stark beeinflussen als die von ATCC® 25904™. Allerdings ist diese Erklärung noch nicht ausreichend dafür, einen gegenteiligen oder ausbleibenden Effekt des Anti-**Emp**-Antikörpers auf USA300 zu begründen. Damit der Antikörper generell einen gegenteiligen Effekt erzielen kann, muss dieser die neutrophilen Zellen in ihrer Funktion einschränken, anstatt ihre Aktivität zu verstärken. Generell gab es schon die Beobachtung, dass diverse gegen *Staphylococcus aureus* gerichtete Antikörper die Effektivität von Immunzellen verschlechtern^[298-300]. Ein ähnlicher nachteiliger Effekt kann bei Anti-**Emp** daher nicht ausgeschlossen werden. Das Antigen des Antikörpers wird in einer fibrillären Schutzschicht, welche neutrophilen Zellen abwehren soll, in der Zellwand des Bakteriums eingelagert^[617]. Die Annahme, dass der Antikörper tatsächlich die Funktion der neutrophilen Zellen behindern kann, ist daher naheliegend. Anti-**Emp** würde in diesem Fall also als Köder für die neutrophilen Zellen dienen, welcher vermehrt unter nährstoffarmen Bedingungen exprimiert wird^[621]. Bei ATCC® 25904™ würde diese Ablenkung lediglich zu einer verzögerten Phagozytose führen, diese aber nicht verhindern. Im Falle von USA300 wiederum würden die neutrophilen Zellen effektiv durch Leukotoxine zerstört werden, bevor sie auf die *Staphylokokken* einwirken können. Die zerstörten Zellen können dann anschließend von dem Bakterium als zusätzliche Nährsubstanz verwendet werden. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die positive Auswirkung des Anti-**Emp**-Antikörpers auf USA300 eine große SA besitzt. Es ist daher möglich, dass der unterstützende Effekt des Antikörpers lediglich nivelliert und nicht umgekehrt wird. Auch in diesem Fall ist aber die erhöhte Expression an Leukotoxinen die wahrscheinlichste Erklärung für die abweichenden Ergebnisse dieser beiden Bakterienstämme. Für die generelle Durchführung des OPTA gilt es allerdings zu beachten, dass die Versuchsdauer eventuell zu kurz für die *Staphylokokken* ist, um die schützende Kapsel aus Fibrin auszubilden. Die Bakterien kommen erst durch die gemeinsame Kultivierung mit Zellen mit allen dafür notwendigen Ressourcen in Kontakt. Erste Strukturen können zwar schon nach einer Stunde beobachtet werden, aber eine volle Entwicklung dieses Schutzmechanismus kann bis zu vier Stunden dauern^[701]. Hierbei ist aber nicht ausgeschlossen, dass **Emp** alleinig auf der Oberfläche von *Staphylokokken* oder früh entwickelte fibrilläre Strukturen bereits eine Behinderung der neutrophilen Zellen ermöglichen könnten.

Ein weiterer Aspekt, der bei der Auswertung der Ergebnisse des komplexen OPTA berücksichtigt werden sollte, ist der eventuelle Einfluss von **ApoA1**. Da das Protein durch die Affinitätschromatographie mit dem Antikörper aufgereinigt wurde, ist nicht auszuschließen, dass es mit dem Anti-**Emp**-Antikörper interagiert. Es kann die Aktivität von neutrophilen Zellen reduzieren^[1421]. Aus diesem Grund ist es möglich, dass es als Komplex mit einem Antikörper die Immunreaktion gegenüber bestimmten Pathogenen attenuieren kann. Weitere Ergebnisse haben bereits gezeigt, dass **ApoA1** nicht bei den Affinitätschromatographien aller Testpersonen isoliert wird^[1455]. Diese Erkenntnis erschwert das Verständnis für die Interaktion zwischen Anti-**Emp**, **ApoA1** und **Emp** noch weiter.

Nachdem gezeigt wurde, dass Anti-**Emp** die Immunantwort gegen *Staphylokokken* zumindest bei einem Bakterienstamm mit einer niedrigen Virulenz verbessern kann, stellt sich die Frage, ob es sich als Antigen für einen Impfstoff eignet. Bei einer erfolgreichen Opsonisierung bindet der Antikörper auf der fibrillären Kapsel oder der Zellwand von *Staphylokokken*. Somit kann er dabei helfen, die neutrophilen Zellen in unmittelbarer Nähe der Bakterien zu konzentrieren. Schafft es der *Staphylococcus* aber, die neutrophilen Zellen zu zerstören, aus ihren Überresten den Schutz ihrer fibrillären Kapsel zu vergrößern^[671] und sich von deren Überresten zu ernähren, ist er in der Ausführung seiner Effektorfunktionen ineffektiv. Nimmt man an, dass die neutrophilen Zellen nach einer Phagozytose nicht in der Lage sind, das Bakterium zu zerstören, so ist die generelle Effizienz eines opsonisierenden Antikörpers in Frage zu stellen, wenn dieser nur die Phagozytoseaktivität verstärkt^[195,873]. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass für diesen Zweck bereits bessere Antigene entdeckt wurden^[294] und ein rekombinanter **Emp**-Antikörper bereits einmal ohne Erfolg im murinen Modell als passiver Impfstoff getestet wurde^[626]. Auch tritt das Antigen des Anti-**Emp**-Antikörpers nicht vermehrt bei besiedelten Personen auf^[252], zeigt keine relevante Immunogenität^[249] oder ist vermehrt nach einer Infektion zu beobachten^[38]. In der Summe dieser Aussagen ist es deshalb sehr unwahrscheinlich, dass der Anti-**Emp**-Antikörper in seiner aktuellen Form einen Beitrag in der menschlichen Immunabwehr gegen *Staphylococcus aureus* leistet.

Als klassischer aktiver Impfstoff ist das Protein nicht als Antigen geeignet, da seine Antikörper nur eine bedingte Wirkung auf Bakterienstämme mit niedriger Virulenz zeigen. Bei der großen Relevanz, welche T-Zellen^[907,919,1251] und Zytokine^[441,1241,1242] in der Abwehr gegen *Staphylococcus aureus* spielen, ist es aber wahrscheinlich, dass er sich bei Zugabe der richtigen Adjuvantien als zuverlässiges Ziel für einen T-Zell-induzierten Impfstoff anbietet^[1147,1230,1291]. Aufgrund der häufigen Expression des Proteins bestehen aber wahrscheinlich bei vielen Menschen schon bestehende T-Gedächtniszellen gegen das Antigen^[1251], deren Funktionsfähigkeit bereits durch die *Staphylokokken* attenuiert wurde^[899]. Der Impfstoff müsste also so konzipiert werden, dass er eine T-Zell-Population aktiviert,

welche sich in Unabhängigkeit des aktuellen Bestandes an T-Gedächtniszellen ausbildet^[8]. Im Optimalfall könnte dieser Impfstoff eine kombinatorische Aktivierung von B- und T-Zellen fördern.

In einem Versuchsdurchlauf, welcher als Beweis des Prinzips für die Detektion von antibiotischen Substanzen innerhalb eines stochastischen Arrays dient, wurde ein signifikanter Unterschied in der Signalstärke zwischen einem durch AmP gestressten Reporterstamm und einer Kontrolle gezeigt. Dies spricht dafür, dass der *RGB-S* Reporter für einen Einsatz in diesem System geeignet ist. Allerdings wurden beträchtliche technische Mängel beobachtet, welche die Qualität der Ergebnisse stark beeinflussen. Diese müssen behoben werden, bevor der Einsatz des *RGB-S* Reporters in einem stochastischen Array sinnvoll ist. Darüber hinaus gilt es zu beachten, dass es erhebliche Unterschiede zwischen dem aktuellen Reporterstamm und *ESKAPE*-Bakterien gibt. *Escherichia coli* zeigt je nach antibiotischer Substanz eine völlig andere Anfälligkeit, als *Staphylococcus aureus*^[1464].

7 Ausblick

Nachdem viele Informationen über die Anti-**Emp**-Antikörper gesammelt wurden, sind weiterhin wichtige Fragen offen, die es zu beantworten gilt. Gibt es nur einen einzigen oder mehrere Anti-**Emp**-Antikörper mit ähnlichem Epitop? Was ist der Ursprung dieses Antikörpers? Warum ist sowohl das Epitop, als auch die Struktur dieser Antikörper in verschiedenen Personen so ähnlich? Wieso versagt die Wirkung des Antikörpers mit steigender Expression von Leukotoxinen? Um diese Fragen zu beantworten, müssen weitere Untersuchungen des Antikörpers durchgeführt werden.

Die Affinitätschromatographie zeigt Hinweise darauf, dass es bei manchen Personen mehr als einen Anti-**Emp**-Antikörper gibt. Diese Hinweise könnten über eine Titerbestimmung von Anti-**Emp** durch einen enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (*ELISA*) bestätigt werden. Hierbei könnten die Antikörpertiter von Anti-**Emp** in verschiedenen Seren gegenüber mehreren ähnlichen Epitopen bestimmt werden. Aus den Gemeinsamkeiten und Unterschieden der Ergebnisse verschiedener Seren könnte so sondiert werden, ob es sich um einen oder mehrere Antikörper handelt. Erste Versuche, ein Protokoll hierfür zu etablieren, zeigen aber nur mäßigen Erfolg^[1465].

Da die Elution auch nachweislich **IgM** enthält, wäre es sinnvoll, diese Antikörperklasse auf seine Signale in der Substitutionsanalyse zu untersuchen. Ein Hervorgehen von **IgM** aus einem Keimzentrum mit einer ähnlichen Spezifität und Affinität wie bei den anderen beiden Antikörperklassen ist möglich, aber sehr unwahrscheinlich^[186]. Wenn für **IgM** derselbe Antikörper-Fingerabdruck sichtbar ist, ist es nahezu auszuschließen, dass ein Keimzentrum in der Entwicklung dieser Antikörper involviert ist. Um Besonderheiten dieser Antikörper im Zusammenhang mit Kolonisierung und infizierten Patienten aufzudecken, müsste eine deutliche größere Personengruppe untersucht werden, um genug Stichproben für jeden möglichen Parameter vorweisen zu können. Diese Möglichkeit wird aber durch die hohen Kosten der *PEPPERCHIP*[®] Peptid-Mikroarrays und einer mangelnden Verfügbarkeit entsprechender Seren eingeschränkt.

Während die Ergebnisse des Funktionsnachweises durchaus aussagekräftig sind, könnten hier weitere Verbesserungen im Protokoll die Genauigkeit der Ergebnisse verbessern. Bisher wird nur die Tötungseffizienz von Zellen auf die Bakterien gezeigt. Um die toxische Wirkung von *Staphylokokken* auf die Zellen zu bewerten, könnte man zusätzlich die aus der gemeinsamen Kultivierung überlebenden Zellen quantifizieren. Hiermit könnte bestätigt werden, ob die Produktion von Leukotoxinen einen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse hat. Ebenso könnte der OPTA mit Deletionsmutanten von *Staphylococcus aureus*

durchgeführt werden. Eine Deaktivierung von Immunglobulin-bindenden Proteinen und Leukotoxinen würde die Komplexität des Versuches stark reduzieren. Hierbei müssten aber so viele Virulenzfaktoren ausgeschaltet werden, dass die Erzeugung einer geeigneten Mutante sehr unrealistisch ist. Außerdem würde durch eine solche Deaktivierung die tatsächliche Effektivität des Antikörpers verschleiert werden.

In der aktuellen Durchführung des Assays selbst wird nicht zwischen phagozytierten und tatsächlich getöteten Bakterien unterschieden. Durch die in der Publikation von Lu *et al.* (2014) ^[150] vorgeschlagenen Verbesserungen werden internalisierte Bakterien befreit und gruppierte Bakterien sowie Aggregationen zwischen Zellen und Bakterien aufgelöst. Dadurch würde sich die tatsächliche Anzahl an toten Bakterien und somit die Wirkung des Anti-**Emp**-Antikörpers besser evaluieren lassen. Eine Verlängerung der gemeinsamen Kultivierungszeit von Bakterien und Zellen könnte ebenso die Genauigkeit der Ergebnisse verbessern, da somit gewährleistet wäre, dass die Bakterien der gesamten Dauer des respiratorischen Schubs ausgesetzt sind ^[1466]. Hierbei muss aber berücksichtigt werden, dass dies entsprechend auch für die Exposition der Zellen gegenüber Leukotoxinen gilt. Letztendlich kann die Funktion des Antikörpers und die Rolle von Leukotoxinen in der Interaktion zwischen neutrophilen Zellen und *Staphylococcus aureus* aber nur durch bildgebende Untersuchungen eindeutig nachgewiesen werden. In einem Versuchsaufbau ähnlich wie dem von Guggenberger *et al.* (2012) ^[617] könnte der direkte Einfluss von Anti-**Emp** anhand der Reaktion von Zellen und des jeweiligen Bakterienstamms beobachtet werden. Neuartige bildgebende Techniken, wie beispielsweise die Superauflösungsmikroskopie, könnten die Qualität entsprechender Ergebnisse zusätzlich aufwerten ^[1311].

Einer der größten Herausforderungen, die es zu bewältigen gilt, ist es, den Ursprung des Antikörpers aufzuklären. Um diesen zu finden, muss zunächst erforscht werden, wann und in welchem Zustand dieser Antikörper im Menschen entwickelt wird. Zu diesem Zweck wäre es hilfreich, das Serum einer einzelnen Person ab Geburt über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Eine Substitutionsanalyse und Affinitätschromatographie könnte dabei helfen, den Ursprung des Antikörpers systematisch einzugrenzen. Das Serum der Mutter könnte hierbei in die Versuche mit einbezogen werden, um eventuelle Verwandtschaftsverhältnisse zu überprüfen. Bei der Bestimmung des Zeitpunktes müssen allerdings verschiedene Faktoren berücksichtigt werden. Eine Produktion von **IgG** und **IgA** ist bis zum sechsten Monat eingeschränkt ^[1467] und entwickelt sich erst bis zum sechsten Lebensjahr zur vollen Reife ^[1468]. Dies gilt auch für natürliche Antikörper, deren Expression sich in den beiden ersten Lebensjahren entwickelt ^[351]. Die Besonderheit ist hierbei, dass natürliches **IgG** die längste Entwicklungszeit besitzt ^[351]. Auch wurde beobachtet, dass die Ausbildung von spezifischen Antikörpern gegen *Staphylococcus aureus*, selbst bei einer Kolonisierung, nach Geburt sehr

lange dauern kann ^[293]. Die Titer von entsprechenden Antikörpern können aber bei einem Kind ohne Besiedlung und einem besiedelten Kind deutlich unterschieden werden ^[293]. Ergänzend muss berücksichtigt werden, dass sich die Entwicklung von T-Zellen im Verlauf des Wachstums verändert ^[1469], was einen Einfluss auf die Entwicklung von Anti-**Emp** haben könnte, wenn die Produktion des Antikörpers von einer T-Zelle abhängig ist. Die Komplexität der Reifung des Immunsystems könnte dabei helfen, den Ursprung von Anti-**Emp** genauer zu definieren.

Ergänzend zu den Daten von **Emp**, wäre es hilfreich, weitere Antikörper zu untersuchen, welche dieselben Auffälligkeiten wie Anti-**Emp** besitzen. Frau Dr. Weber hat in Ihrer Dissertation bereits weitere Antikörper entdeckt, welche bei Substitutionsanalysen von mehreren Seren denselben Antikörper-Fingerabdruck zeigen ^[42,46,47]. Gemeinsame Parallelen zwischen diesen Antikörpern und Anti-**Emp** könnten bei der Aufklärung des Ursprungs helfen.

Zur Überprüfung ob es eventuelle Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Anti-**Emp**-Antikörpern von verschiedenen Menschen gibt, wäre eine Isolation der mit der Produktion des Antikörpers zusammenhängenden B-Lymphozyten und eine Identifizierung der korrespondierenden DNA-Sequenz des Antikörpers aufschlussreich. Verbesserte Versuche zum Screening von korrespondierenden Zellen wurden bereits durchgeführt ^[1455]. Ob diese Versuche tatsächlich die gesuchten B-Zellen isoliert haben, muss aber noch geprüft werden. Darüber hinaus werden zum aktuellen Zeitpunkt Versuche von Kollegen unternommen, um die DNA-Sequenz durch Polymerase-Kettenreaktion anhand der bereits bekannten variablen Ketten zu identifizieren. Die Sequenz würde zum einen eine rekombinante Produktion des Antikörpers ermöglichen und somit analytische Experimente deutlich vereinfachen. Zum anderen könnten die gewonnenen Informationen mit bereits vorhandenen Datenbanken verglichen werden, um eventuelle Bezüge aufzudecken. Letztendlich wäre es sogar möglich, präzise Primer zu erstellen, um periphere mononukleäre Blutzellen verschiedener Personen auf die Anwesenheit und Diversität von Anti-**Emp**-Antikörpern zu untersuchen. Ergänzend hierzu könnte auch eine Suche nach korrespondierenden T-Zell-Rezeptoren bei der Aufklärung helfen. Mit dem Wissen, ob T-Zellen an der Selektion des Antikörpers involviert sind oder nicht, könnten die möglichen Kandidaten für den Ursprung von Anti-**Emp** bereits stark eingeschränkt werden.

Alle Daten in dieser Dissertation sprechen dafür, dass eine zufällige Selektion von Anti-**Emp**-Antikörpern nahezu unmöglich ist. Sollten durch weitere Forschungsergebnisse an diesem Thema neuartige Mechanismen entdeckt werden, welche eine Vererbung von spezifischen Antikörpern ermöglichen, würde das unser Verständnis über die Immunologie bahnbrechend verändern.

Während ein entscheidender Beitrag von Anti-**Emp** bei der Immunantwort gegen *Staphylococcus aureus* unwahrscheinlich ist, bleibt **Emp** ein interessantes Ziel für alternative Methoden. Das Protein wird vermehrt von Bakterienstämmen mit einer hohen Virulenz exprimiert und seine DNA-Sequenz ist gut konserviert^[610]. Es ist sowohl an der Entwicklung von Biofilmen^[622] als auch bei Abszessen^[621] beteiligt und zeigt entsprechend der Ergebnisse dieser Arbeit eine gute Fähigkeit zur Bindung des Epitops und zur Opsonisierung des Pathogens. Befinden sich *Staphylokokken* in der Wirtsumgebung, wird **Emp** praktisch zu jedem Zeitpunkt exprimiert und bietet sich daher als zuverlässiges Ziel an^[621]. Der Antikörper selbst könnte sich daher als gute Basis eignen, um Wirkstoffe gezielt in der Nähe von Abszessen und Biofilmen zu konzentrieren. Unter der Annahme, dass die Erbinformation der entsprechenden B-Zellen identifiziert werden kann, könnte dieser Antikörper rekombinant modifiziert werden, damit er bei der Bekämpfung gegen *Staphylococcus aureus* eine größere Effizienz besitzt. Die generelle Anfälligkeit des Antikörpers gegen Schutzmechanismen des Bakteriums könnte reduziert werden^[1322]. Der Antikörper könnte mit Antibiotika oder Substanz-beladenen Nanopartikeln gekoppelt werden, wie es bereits bei anderen Antikörpern effektiv durchgeführt wurde^[1233,1363]. Eine besondere Möglichkeit könnte sich hierbei bieten, den Aufbau der Fibrinkapsel und die durch Proteasen bedingte Dissemination^[666,704,705] von *Staphylococcus aureus* zu verhindern. Zu diesem Zweck könnten entsprechende Wirkstoffe durch an den Antikörper gekoppelte Nanopartikel gezielt in den Infektionsherd gebracht und dort sezerniert werden. Alternativ wäre es auch möglich, Anti-**Emp** zu einem bivalenten Antikörper zu modifizieren^[1319-1321], dessen zweites Antigen wichtige Komponenten in der Virulenz des Bakteriums neutralisiert. Ein gutes Beispiel hierfür sind Antikörper gegen Proteasen, welche deren Aktivität drastisch reduzieren können^[1470]. Weitere geeignete Ziele zur Neutralisierung sind Superantigene, Toxine oder Phenol-lösliche Moduline, um deren Wirkung zu reduzieren. Während der Antikörper also in seiner klassischen Funktion nur einen geringen Beitrag leisten kann, bietet die Zuverlässigkeit, mit welcher er an seinem Antigen bindet, eine Grundlage für eine große Bandbreite an potentiellen Anwendungen.

Das *RGB-S* Reportersystem synergisiert sehr gut mit den mikrostrukturierten Glasträgern und hat großes Potential in stochastischen Arrays zur Anwendung zu kommen. Bevor dies allerdings möglich ist, müssen die starke Heterogenität und der Stress, der während der Prozedur auf den Bakterienstamm wirkt, reduziert werden. Kann das *RGB-S* Reportersystem zusätzlich auf *ESKAPE*-Bakterien angepasst werden, bietet es ein revolutionäres Werkzeug, um in sehr kurzer Zeit und mit geringem Kostenaufwand sehr viele neue und wirksame antimikrobielle Substanzen zu entdecken. Diese können dabei helfen, dem größer werdenden Mangel an antibiotischen Substanzen entgegenzuwirken^[34,35]. Unabhängig davon zeigt die Befüllung der mikrostrukturierten Glasträger noch weitere Anwendungsmöglichkeiten. Da auch Zellen ohne Probleme und mit großer Effizienz in die Kavitäten gefüllt werden, bieten

sich weitere potentiellen Anwendung auf dem Gebiet der Lebenswissenschaften an. Beispielsweise können kurze Peptide auch als Kinase-Inhibitoren wirken^[1471]. Solche Wirkstoffe finden ihre Anwendung in der Krebstherapie^[1472]. Ein stochastischer Array könnte also zur Entdeckung neuer therapeutischer Wirkstoffe genutzt werden.

Über die Hauptthemen hinaus wurden noch weitere Erkenntnisse in dieser Doktorarbeit gewonnen. Durch die Versuche, die Immunglobulin-bindenden Proteine abzuschwächen, wurden neue Proteininteraktionen in *Staphylococcus aureus* entdeckt, welche mit großer Wahrscheinlichkeit spezifisch Antikörper der Ziege immobilisieren. Durch die Vermischung von **Emp** und **BSA** hat sich gezeigt, dass sich diese beiden Proteine miteinander assoziieren und ein einzigartiges Muster an Banden in einer LDS-PAGE erzeugen. Die interessanteste Entdeckung ist allerdings, dass ein Sekundärantikörper gegen Anti-**ApoA1** Immunglobuline im Serum markiert. Bisher ist keine Publikation bekannt, welche eine Interaktion von **ApoA1** und Immunglobulinen beschreibt. Da dieser Fund in der Dissertation nicht detaillierter untersucht wurde, müssen die Ergebnisse allerdings mit großer Skepsis betrachtet werden und es bedarf diesbezüglich weitere Experimente, um diese zu bestätigen. Für **ApoA1** wird eine Beteiligung in der Immunabwehr vermutet^[1410] und sie können die Aktivität von neutrophilen Zellen drosseln^[1421]. Werden diese Ergebnisse also bestätigt, könnten mit **ApoA1** assoziierte Antikörper regulatorisch auf neutrophile Zellen wirken und ihre Aktivität gegen bestimmte Antigene inhibieren. Sie hätten sozusagen den gegenteiligen Effekt von gewöhnlichen Antikörpern und würden durch Opsonisierung eine Ruhezone für neutrophile Zellen schaffen.

8 Experimenteller Teil

8.1 Material und Geräte

8.1.1 Grundausrüstung

Zur Grundausrüstung gehören essenzielle Laborgeräte, welche nicht zu analytischen Zwecken eingesetzt werden. Hierzu zählen Dampfsterilisatoren, Ein- und Mehrkanalpipetten, Eismaschinen, Gefrierschränke, Inkubatoren, Kühlschränke, Labornetzeile, Orbitalschüttler, pH-Meter, Rotationsverdampfer, Sicherheitswerkbänke, Thermoschüttler, Vortexer, Waagen, Wasseraufbereitungssysteme und Zentrifugen unterschiedlicher Hersteller sowie das Eis und ddH₂O, das sie produzieren. Ebenso sind gewöhnliche Verbrauchsmaterialien, Gefäße und Werkzeuge von verschiedenen Herstellern der Grundausrüstung zugehörig.

8.1.2 Messgeräte und Apparaturen

8.1.2.1 1290 Infinity II Flüssigchromatographiesystem

Das 1290 Infinity II Flüssigchromatographiesystem von *Agilent Technologies* wird zusammen mit der HPLC-Säule ZORBAX mit dem Säulenmaterial SB-C18, einer Porengröße von 80 Å, Partikelgröße von 5,0 µm, mit einer Länge von 250,0 mm und einem Innendurchmesser von 4,6 mm als stationäre Phase zur Auftrennung der Peptidfragmente der enzymatisch verdauten Antikörper verwendet. Das integrierte Computerprogramm *Intelligent System Emulation Technology* vom Hersteller erlaubt es, die Prozessparameter und Gradienten festzulegen.

Der Standort des Gerätes ist am Institut für Instrumentelle Analytik und Bioanalytik der Hochschule Mannheim und es wurde von Diego Yepes bedient.

8.1.2.2 CanoScan 9000F

Der Farbflachbettscanner *CanoScan 9000F* von *Canon* verfügt über eine Durchlichteinheit und eine weiße lichtemittierende Diode für sichtbares Licht als Beleuchtungsquelle. Die Scanfläche umfasst eine Fläche von 64 152,0 mm² und der 12-zeilige Detektor mit CCD-Sensor kann Farbaufnahmen oder Vorschaubilder mit einer Auflösung von 25 bis 19 200 dpi scannen. Mit dem Gerät werden eingefärbte Polyacrylamid-Gele und Membranen aus PVDF digitalisiert und die daraus resultierenden Bilder lassen sich mit einer Datenbreite von bis zu 64 Bit in Graustufen- und 48 Bit im Farbformat als *TIFF*- oder *JPG*-Datei ausgeben.

Der Standort des Gerätes ist in der Abteilung der funktionalen Genomanalyse am deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg.

8.1.2.3 *DensiCHEK plus* Densitometer

Das Messgerät von *BioMérieux* kann die Trübung einer Flüssigkeit innerhalb eines konischen Gefäßes mit einem Durchmesser von 16,0 mm als MFU messen und ist in der Lage einen Probenblindwert zu speichern. Zur Messung wird ein Minimum von 1,0 mL benötigt und das Gerät kann einen Messwert zwischen 0,0 bis 4,0 MFU zuverlässig bestimmen. Durch den Trübungswert kann die Bakteriendichte innerhalb einer Suspension quantifiziert werden.

Der Standort des Geräts befindet sich in der Abteilung für medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Heidelberg.

8.1.2.4 Digitale Pumpe *Reglo ICC*

Diese von *Ismatec* hergestellte Peristaltikpumpe verfügt über vier individuelle Roller. Durch MS/CA-Kassetten werden Schläuche des Typs *Tygon® S3™ E-LFL* mit einem reproduzierbaren Anpressdruck auf den Rollern befestigt. Die Drehrichtung, Motorleistung und resultierende Fließgeschwindigkeit jedes Rollers lässt sich individuell steuern und eine Laufzeit kann auf Zeit oder absolutes Volumen begrenzt werden. Durch die Pumpe wird die Fluidik innerhalb der Befüllungskammer gesteuert.

8.1.2.5 *DMLS* Durchlichtmikroskop

Das *DMLS* Durchlichtmikroskop von *Leica* besitzt eine Halogenbeleuchtung, um sichtbares Transmissionslicht zu erzeugen. Ebenso besitzt es eine handelsübliche Leuchtfeldblende, einen höhenverstellbaren Kondensator 0,9/1,3 mm Öl S1 mit Aperturblende sowie ein Okularpaar *L Plan 10 x/20*. In Tabelle 42 beschriebene Objektive sind im Objektivrevolver eingebaut und die Probe kann über den Probentisch in Richtung der X- oder Y-Achse bewegt werden. Mit Hilfe des Mikroskops wird die Dichte des Biofilms von *Staphylokokken* auf den Glaträgern der *ibidi* GmbH visuell überprüft.

Tabelle 42: Auflistung aller Objektive, welche bei der Anwendung des *DMLS* Durchlichtmikroskop zur Verfügung stehen.

Objektive
<i>Leica C Plan 10x/0,22 PH1</i>
<i>Leica C Plan 20x/0,40 PH1</i>
<i>Leica C Plan 40x/0,65 PH2</i>
<i>Leica C Plan HI100 x/1,25 PH3</i>

Der Standort des Mikroskops ist in der Abteilung für medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Heidelberg.

8.1.2.6 Eclipse Ti

Das *Eclipse Ti* ist ein modulares invertiertes Epifluoreszenzmikroskop von *Nikon*. Alle Module sind in Tabelle 43 aufgelistet. Zwei verschiedene Lichtquellen und Filterwürfel erlauben dem Mikroskop sowohl Bilder im Hellfeld als auch unter Anregung von verschiedenen Wellenlängen anzufertigen. Ein Filterwürfel besitzt hierbei zwei Bandpassfilter und einen dichroitischen Spiegel, die es ermöglichen das Anregungslicht einer sehr starken Lichtquelle einzugrenzen und gleichzeitig das von der Probe emittierte Licht zu filtern. Das Computerprogramm *NIS-Elements AR* erlaubt eine digitale Steuerung aller Module und eine Fernsteuerung der Monochromkamera. Die Digitalbilder werden im *ND2*-Format ausgegeben und werden zur weiteren Bearbeitung konvertiert. Das Mikroskop wird dazu verwendet um Digitalaufnahmen von an einer Glasoberfläche adhären und mit Immunfärbung markierten *Staphylokokken* zu erzeugen.

Tabelle 43: Module des *Eclipse Ti*.

Zubehör des Eclipse Ti			
CFI 10 x Okulare			
DS-Qi1Mc Monochromkamera mit bis zu 1,3 MPx			
Filterwürfel			
Nr.	Anregungsfilter Bandbreite in [nm]	Emissionsfilter Bandbreite in [nm]	Umlenkung durch dichroitische Spiegel ab [nm]
1.	352,0 bis 402,0	417,0 bis 477,0	415,0 bis 950,0
2.	464,0 bis 499,0	516,0 bis 556,0	513,0 bis 950,0
3.	540,0 bis 580,0	600,0 bis 660,0	595,0 bis ∞
Intensilight C-HGFIE mit einer C-LHGFI 130,0 W Quecksilberlampe und C-HGFIF15 Quecksilber-Fluidleiter von Nikon als Lichtquelle für die Epifluoreszenz.			
Kondensorrevolver mit den Phasenkontrastfiltern PH1, PH2, PH3			
motorisierte Z-Achse			
Objektive			
Nikon 10 x/0,25 PH1 ADL			
Nikon Plan Fluor 20 x/0,5 PH1 DLL			
Nikon Plan Fluor 40 x/0,75 PH2 DLL			
Nikon Plan Fluor ELWD 20 x/0,45 DIC L/0-2			
TI-PS100W Netzteil zur Stromversorgung der im Mikroskop eingebauten 100,0 W starken Weißlichtlampe TI-DH Dia Pillar Illuminator.			

8.1.2.7 Elmasonic S 100 H

Das *Elmasonic S 100 H* von *Elma Schmidbauer GmbH* ist ein Ultraschallbad mit einem Volumen von 9,5 L und den Dimensionen 365,0 x 278,0 x 264,0 mm³. Es erzeugt ein Ultraschall bei einer Frequenz von 37 kHz und einer Ultraschall-Spitzenleistung von 600,0 W, was bei den vorhandenen Dimensionen einer Leistung von 8,0 mW/cm² entspricht. Zusätzlich ist das Gerät in Intervallen von 5 °C mit einer Leistung von 600,0 W beheizbar, verfügt über eine Zeitschaltuhr und kann in einem Modus zur Entgasung von Flüssigkeiten eingesetzt werden. Dieses Gerät unterstützt die Reinigungsschritte der mikrostrukturierten Träger nach der Hydrophobierung.

8.1.2.8 FACSCanto™ System

Das *FACSCanto™* von *Becton Dickinson* ist ein automatisiertes System für die klinische Durchflusszytometrie. Es verfügt über ein komplexes System aus Fluidik und Optik, welches in der Lage ist, eine präzise optische Analyse von einzelnen Zellen innerhalb einer flüssigen Probe durchzuführen. Die optischen Bauteile des Systems ermöglichen die Anregung von einzelnen Zellen durch zwei monochromatische Festphasenlaser. Sie bestehen aus einem *Sapphire 488-20* von *Coherent*, mit einer Leistung von 20,0 mW, welcher eine Anregung bei 488,0 nm erzeugt und einem *1144-P* von *JDS Uniphase* mit einer Leistung von 17,0 mW, welcher eine Anregung bei 633,0 nm erzeugt. Die Emission der einzelnen Zellen wird über eine Aufstellung von dichroitischen Spiegeln auf den jeweiligen Detektor umgeleitet und von optischen Filtern eingegrenzt. Zusätzlich wird das Streulicht des *Sapphire 488-20* zur Messung des Seitwärts- und Vorwärtsstreulichtes gesammelt und auf die entsprechenden Photoelektronenvervielfacher zur Detektion gelenkt. Alle Detektoren des Messgerätes sind in Tabelle 44 aufgelistet. Die Messparameter und Bedienung des Gerätes werden über das Computerprogramm *FACSDiva™* von *Becton Dickinson* eingestellt und Messdaten werden manuell in dem Programm durch *Gating* eingegrenzt und anschließend als *JPG*-Datei extrahiert. Durch das Messgerät kann der Status der korrekten Zelldifferenzierung von *HL-60* Zellen überprüft werden. Ebenso wird es zur Detektion von immunmarkierten B-Zellen in behandeltem und unbehandeltem Vollblut verwendet.

Tabelle 44: Verfügbare Photoelektronenvervielfacher in Kombination mit den jeweiligen Anregungslasern.

Photoelektronenvervielfacher	
Anregungslaser	Detektion in [nm]
<i>Sapphire 488-20</i>	Vorwärtstreulicht 478,0 bis 498,0
<i>Sapphire 488-20</i>	Seitwärtstreulicht 478,0 bis 498,0
<i>Sapphire 488-20 r</i>	515,0 bis 545,0
<i>Sapphire 488-20 r</i>	564,0 bis 606,0
<i>Sapphire 488-20</i>	> 670,0
<i>Sapphire 488-20</i>	750,0 bis 810,0
<i>1144-P</i>	650,0 bis 670,0
<i>1144-P</i>	750,0 bis 810,0

Der Standort des Systems ist in der Abteilung für medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Heidelberg.

8.1.2.9 FLUOstar OPTIMA

Der *FLUOstar OPTIMA* von *BMG LABTECH* ist ein Lesegerät für die elektronische Auswertung von Mikrotiterplatten. Der Detektor kann eine Absorption im Messbereich zwischen 0,0 bis 3,0 Abs, mit einer Genauigkeit von $1,0 \times 10^{-2}$ Abs bestimmen. Das Detektionslimit der Fluoreszenz- und Lumineszenzintensität liegt bei 0,9 fmol beziehungsweise 50,0 amol/Kavität. Eine hochenergetische Xenon-Blitzröhre erzeugt Licht zur Messung der optischen Dichte, welches durch einen Monochromator in einem Spektrum von 240,0 bis 740,0 nm in monochromatisches Licht umgewandelt wird. In Kombination von bis zu acht *BMG-10* Filtern in einem Filterrevolver wird das Licht zur Anregung von Fluorophoren begrenzt. Das von den angeregten Proben emittierte Licht wird von acht weiteren *BMG-10* Filtern in einem zweiten Filterrevolver begrenzt. Alle im Gerät vorhandene Filter sind in Tabelle 45 aufgelistet. Eine integrierte Inkubationskammer mit Schüttelfunktion und Injektoren ermöglicht eine Kultivierung von Mikroorganismen innerhalb der Messfläche im Format einer Mikrotiterplatte und innerhalb eines Temperaturbereiches von 8 bis 45 °C.

Inkubationsbedingungen, Messparameter und Empfindlichkeit der Detektion können durch das integrierte Computerprogramm festgelegt und automatisiert werden. Eine Ausgabe der Dateien erfolgt im XLS-Format. Durch das Gerät wird das Wachstum von *Staphylokokken* im Verlauf der Zeit bestimmt.

Tabelle 45: Ausgerüstete Filterräder mit jeweils vier von acht möglichen *BMG-10* Filtern zur Begrenzung sowohl der Anregungs- als auch der Emissionswellenlängen im *FLOUstar OPTIMA*.

BMG-10 Filter	
Anregungsfilter Bandbreite in [nm]	Emissionsfilter Bandbreite in [nm]
345,0 bis 365,0	450,0 bis 470,0
534,0 bis 554,0	580,0 bis 600,0
475,0 bis 495,0	510,0 bis 530,0
574,0 bis 594,0	602,0 bis 622,0

Der Standort des Gerätes ist in der Abteilung für medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Heidelberg.

8.1.2.10 Impact II QTOF MS

Der *Impact II* von *Bruker* ermöglicht die Flugzeit-Massenspektrometrie über quadrupole Stabelektroden. Damit sollen durch Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie präparierte Peptide nach dem Verhältnis von Masse zu Ladung aufgetrennt werden. Die Messeinstellungen und angelegte Spannung werden über das Datenanalyseprogramm *TASQ*® von *Bruker* gesteuert und in Kombination mit dem Programm *PEAKS DB* von *Bioinformatics Solutions Incorporated* werden die Daten der Massenspektrometrie mit potentiellen Aminosäuresequenzen abgeglichen.

Der Standort des Gerätes ist am Institut für Instrumentelle Analytik und Bioanalytik an der Hochschule Mannheim und die Messungen wurden von Diego Yepes durchgeführt.

8.1.2.11 Innoscan 1100 AL

Die Scanplattform von *Innopsys* kann kundenspezifische *PEPperCHIP*® Peptid-Mikroarrays in Fünfer und 16er-Konfiguration und mikrostrukturierte Glasträger auswerten. Durch ein eingebautes Beladungssystem werden die Träger zur eigentlichen Detektionskammer innerhalb des Gerätes transportiert. Zur Detektion kann der Glasträger von drei verschiedenen Lasermodulen gleichzeitig mit Licht bei 488,0, 532,0 und 635,0 nm angeregt und das emittierte Licht durch verschiedene, in Tabelle 46 beschriebene, Filter eingegrenzt werden. Das eingegrenzte Licht wird dann anschließend zur Auswertung von drei analogen Sekundärelektronenvervielfachern in ein elektronisches Signal umgewandelt. Die Plattform unterstützt bis zu sieben verschiedene optische Filter und kann Aufnahmen mit einer Auflösung von 0,5 bis 40,0 µm/Px auf einer Fläche von 22,0 x 74,0 mm² anfertigen. Eine räumliche Lochblende ermöglicht einen Autofokus, der sich während der Aufnahme an die Oberfläche des Gerätes anpasst.

Laserintensität, Auswahl der Filter, Auflösung, Scangeschwindigkeit sowie Empfindlichkeit der Sekundärelektronenvervielfacher werden über die Software *MAPIX* gesteuert. Das aus dem Scan resultierende Bild wird als *TIFF*- oder *BigTIFF*-Datei ausgegeben.

Tabelle 46: Filtermodule des Innoscan 1100 AL mit dazugehöriger Anregungswellenlänge.

Verfügbare Filtermodule			
Nr.	Mittenfrequenz des Bandpassfilters in [nm]	Bandbreite in [nm]	Anregungswellenlänge in [nm]
1.	504,0	25,0	488,0
2.	520,0	5,0	488,0
3.	549,0	15,0	532,0
4.	580,0	14,0	532,0
5.	582,0	75,0	532,0
6.	615,0	20,0	532,0
7.	673,0	11,0	635,0
8.	677,0	45,0	635,0

Das Computerprogramm *MAPIX* ermöglicht es, die Bilder auszuwerten, indem es ein Selektionsgitter über die vorhandenen Signale legt. Es bestimmt sowohl Intensität als auch Hintergrundrauschen der einzelnen Ergebnisflächen innerhalb dieses Gitters entsprechend einer Datenbreite von 16 Bit in RFU.

8.1.2.12 Invertiertes *AE20* Phasenkontrastmikroskop

Das *AE20* von *Motic* verfügt über ein Quarz-Halogen-Beleuchtungssystem welches sichtbares Licht erzeugt und mit 30,0 W und 6 V betrieben wird. Es verfügt über ein Phasenzentriertes Teleskop, einen *ELWD N.A 0.30* Kondensator mit Phasenschieber und *WF 10 X/20,0 mm* Weitfeldokulare. Durch den Phasenregler kann das Mikroskop von Hellfeld auf die Phasenkontrastgrößen PH1, PH2 und PH3 eingestellt werden und durch einen Objektivtisch kann die Probe in Richtung der X- und Y-Achse manipuliert werden. Über einen Objektivrevolver wird das gewünschte Objektiv ausgewählt. Alle verfügbaren Objektive sind in Tabelle 47 aufgelistet. Durch das Mikroskop wird nach erfolgter Färbung mit Trypanblau die Anzahl von *HL-60* Zellen innerhalb einer Kultursuspension bestimmt.

Tabelle 47: Auflistung der vier am Objektivrevolver eingebauten Objektive des invertierten Phasenkontrastmikroskops AE20.

Objektive
CCIS E Plan 4 x/0,1 EPL
CCIS E Plan Phasenobjektiv 10 x/0,25 EPL PH
CCIS E Plan Phasenobjektiv 20 x/0,4 LWD PH
CCIS E Plan 40 x/0,65 EPL

Der Standort des Mikroskops ist die Abteilung für medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Heidelberg.

8.1.2.13 Jenway 7305

Das *Jenway 7305* von *Jenway*[®] ist ein Spektralphotometer für sichtbares und ultraviolettes Licht, welches durch eine Xenon-Lampe und einen Photoelektronenvervielfacher die Absorption in einem Spektrum zwischen 198,0 bis 1000,0 nm bei einer Bandbreite von 5,0 nm, einer Genauigkeit von 2,0 nm und einer Auflösung von 1,0 nm messen kann. Die Messung eines Probenblindwertes ist möglich und Messwerte werden innerhalb eines Messbereiches von -0,3 bis 2,5 Abs mit einer Genauigkeit von $1,0 \times 10^{-2}$ Abs bestimmt. Ebenso kann das Photometer Konzentrationen in gängigen Einheiten mit einer einstellbaren Empfindlichkeit zwischen -300 bis 9999 SI messen. Messparameter und Bedienung des Gerätes werden über die integrierte digitale Anzeige gesteuert. Das Photometer wird zur Bestimmung der Peptidbeladung auf den mikrostrukturierten Glaträgern und zur Messung der Zellsuspensionsdichte von *Synechocystis spec.* verwendet.

8.1.2.14 Muffelofen L24/11/B180

Der von *Nabertherm* hergestellte Muffelofen hat eine Aufnahmeleistung von 3,5 W und besitzt drei keramische Heizplatten, welche ein Beheizen des Innenraums mit einem Volumen von 24,0 L von drei verschiedenen Seiten ermöglichen. Die Temperatur im Ofen wird über Typ S-, K- und R-Sensoren geregelt und erreicht einen Maximalwert von 1100 °C. Durch den Ofen werden das Aushärten von Dichtungen aus dem Silikon Elastomer *SYLGARD*[™] 184 Polymethylmethacrylat, das Herstellen des Copolymers auf den mikrostrukturierten Glaträgern und das Schmelzen des Matrixpolymers *SLEC PLT 7552* während der Hydrophobierung ermöglicht.

8.1.2.15 NanoDrop® 1000 Spektralphotometer

Das von der *PEQLAB Biotechnologie GmbH* hergestellte Spektralphotometer ist darauf spezialisiert die Konzentration von DNA, RNA oder Proteinen innerhalb einer Flüssigkeit zu messen. Es kann die Absorption von sichtbarem Licht in einer Bandbreite von 220,0 bis 750,0 nm mit einer Genauigkeit von 1,0 nm und einer Auflösung von 3,0 nm messen. Die Messung eines Probenblindwertes ist möglich und Konzentrationen werden innerhalb eines Messbereiches von $2,0 \times 10^{-2}$ bis 75,0 Abs mit einer Genauigkeit von $3,0 \times 10^{-3}$ Abs bestimmt. Als Lichtquellen dient eine gepulste Xenon-Lampe und eine Anreihung von 2048 CCD-Elementen ermöglicht die Detektion von einer minimalen Konzentration von 2,0 ng/μL einzelsträngiger DNA. Als Besonderheit verfügt das Photometer über ein patentiertes Probehaltungssystem, welches auf Oberflächenspannung basiert und die Notwendigkeit eines Probengefäßes eliminiert. Dieses Prinzip erlaubt eine Probengröße von 1,0 μL und die Detektion von sehr konzentrierten Proben von bis zu 3,7 mg/mL DNA und 100,0 mg/mL Protein. Das Photometer wird zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Elutionen nach der Affinitätschromatographie verwendet. Der Standort des Gerätes ist in der Abteilung der funktionalen Genomanalyse am DKFZ in Heidelberg.

8.1.2.16 Odyssey Classic Imaging System

Die bildgebende Plattform von *LI-COR Biosciences* bietet eine breite optische Auswertungsmöglichkeit für Mikrotiterplatten, Membranen, Glasträger und Gelformate. Ausgestattet mit einem 25,0 x 25,0 cm² großen Scanmodul mit Fokusversatz können Aufnahmen mit einer Auflösung von 338,0 bis 21,0 μm/Px in einem Abstand von bis zu 4,0 mm vom Modul entfernt aufgenommen werden. Als Lichtquelle kommen zwei Festkörperdiodenlaser zum Einsatz, welche gleichzeitig Proben mit Licht bei einer Wellenlänge von 685,0 und 785,0 nm anregen können. Ein eingebautes Mikroskopobjektiv mit dichroitischen Spiegeln kann emittiertes Licht von den Proben unter 750,0 nm und über 810,0 nm mit zwei voneinander unabhängigen Detektoren empfangen. Durch das Programm *Image Studio™* lässt sich die Empfindlichkeit der Detektion und der Fokusversatz einstellen sowie bestimmen, welche Dioden für die Anregung eingesetzt werden. Das als Ergebnis resultierende Bild wird als *TIFF*-Datei ausgegeben. Die Plattform wird dazu verwendet, um durch Immunfärbung eingefärbte Membranen und Glasträger auszuwerten und zu digitalisieren.

Der Standort des Gerätes ist in der Abteilung der funktionalen Genomanalyse am DKFZ in Heidelberg.

8.1.2.17 Optisches Digitalmikroskop VHX-600

Das von *Keyence* produzierte Mikroskop ist mit zwei Standard-Zoomobjektiven ausgerüstet. *VH-Z20R* arbeitet mit einer Vergrößerung von 20 bis 200 X und einem Arbeitsabstand von 25,5 mm. *VH-Z500R* arbeitet mit einer Vergrößerung von 500 bis 5000 X und einem Arbeitsabstand von 4,4 mm. Das Mikroskop verfügt über eine effektive Auflösung von 54,0 MPx und kann durch Digitalzoom auf dem integrierten 15 " Bildschirm theoretisch eine 18 000-fache Vergrößerung mit Tiefenschärfe erreichen. Es ist in der Lage, Videos mit bis zu 28 BpS aufzunehmen und kann eine Probe durch ein integriertes surjektives oder bijektives Beleuchtungssystem komplett ausleuchten. Durch das integrierte Computerprogramm lassen sich absolute Längen in einem dreidimensionalen Raum sowie Volumen und Winkel bestimmen. Das Mikroskop wird dazu verwendet, um Proben innerhalb der Kavitäten des mikrostrukturierten Glasträgers zu dokumentieren.

8.1.2.18 Optisches System nach Clemens von Bojničić-Kninski ^[1435]

Während seiner Dissertation hat Clemens von Bojničić-Kninski ein optisches System zur Makrofotographie von Proben entwickelt. Das ganze System befindet sich auf einem optischen Tisch und wird von einem Mantel aus lichtundurchlässigen Stoffen umhüllt. Die Stoffe sind durch geklebte Magnetbänder an einem Rahmen aus Boschprofilen befestigt und verhindern den Eintritt von peripherem Licht in das optische System. Das optische System selbst besteht aus einem "Portal aus Boschprofilen", einem Positioniertisch *SCAN IM 130 x 100* von *Märzhäuser Wetzlar* mit motorisierten X- und Y-Achsen und einer motorisierten Linearachse, welche entweder selbst oder mit Stützen auf dem optischen Tisch befestigt ist. Auf der Unterseite des Portals ist ein *PC-E Micro Nikkor 85,0 mm 1:2,8D Tilt-und-Shift* Objektiv von *Nikon* montiert, welches das transmittierte oder emittierte Licht einer auf dem Positioniertisch befindlichen Probe einfängt. Das Licht wird anschließend durch einen Umlenkspiegel *PF20-03-P01* von *Thorlabs*, in die horizontale Ebene durch einen Langpassfilter und zwei Filterräder *HSFW* von *Edmund Optics* auf eine *D810* Spiegelreflexkamera von *Nikon* umgelenkt. Die Spiegelreflexkamera ist auf einer motorisierten Linearachse platziert. Der Positioniertisch kann manuell mit einem Joystick *Tango PCIe* von *Märzhäuser Wetzlar* gesteuert werden.

Ein spezifisch für das optische System entwickeltes Modul des Systementwicklungsprogrammes *LabVIEW 2012* von *NI™* erlaubt es, die steuerbaren Elemente innerhalb des optischen Systems zu konfigurieren. Zu diesen steuerbaren Elementen zählt eine 1-Achs-Positioniersteuerung *PS 10* der *Owis GmbH*, welche eine digitale Steuerung der motorisierten Linearachse und dadurch eine grobe Fokussierung der Spiegelreflexkamera auf die Probe ermöglicht. Durch eine manuelle Bedienung des Fokusrings des *Tilt-und-Shift-Objektivs* lässt sich der Fokus präzisieren. Ein weiteres steuerbares Element bildet eines der beiden Filterräder, dessen Position durch das Modul

gesteuert werden kann, während das andere Filtrerrad der manuellen Installation von Filtern vorbehalten ist. Das Modul ermöglicht eine ferngesteuerte Bedienung der Spiegelreflexkamera und gibt über eine Echtzeitübertragung das aktuelle Sichtfeld der Kamera wieder, um den Fokus und die Position der Probe anzupassen. Für die Kamera kann über das Modul eine Belichtungszeit zwischen 125 Mikrosekunden und 30 Sekunden und eine Lichtempfindlichkeit mit einer ISO-Zahl von 80 bis 12800 eingestellt werden. Sie verfügt über drei Bildgrößen bei einer Chipgröße von 36,0 x 24,0 mm²: groß, mittel und klein, mit einer effektiven Auflösung von jeweils 36,2, 20,3 und 9,0 MPx. Mit dem Objektiv erreicht die Kamera somit eine Gesamtauflösung von ~ 1,2, 1,7 und 2,5 Px/μm für das jeweilige Format. Die Optik der Kamera ist so konzipiert, dass sie das menschliche Sehen nachahmen soll und hat ab einer Wellenlänge von 600,0 nm einen starken Empfindlichkeitsverlust. Bilder können als *TIFF*-, *JPG*-, oder *RAW*-Datei ausgegeben werden.

Weitere mögliche Funktionen, welche das Modul aufweist, beinhalten den Vergleich verschiedener Fokuseinstellungen, eine Bildkorrektur sowie Zeitraffer und die Aufnahme eines größeren Bereiches über eine Bilderserie. Integriert in die Zeitrafferfunktion ist eine automatisierte Dokumentation der seit Start des Experiments verstrichenen Zeit. Bei der Bilderserie ist es möglich, den Startpunkt, die Größe der Überlappung, verwendete Filter, Belichtungszeit, Lichtempfindlichkeit und die Anzahl an Bilder in Richtung der X- und Y-Achse zu bestimmen. Alle im optischen System und dessen Beleuchtung verwendete Filter sind in Tabelle 48 aufgelistet. Zur Beleuchtung der Proben wird die Kaltlichtquelle *intralux*[®] 5100 mit angeschlossenem Leuchtfeld von *Volpi* verwendet. Um eine Anregung von fluoreszierenden Proben zu gewährleisten, werden die beiden hochenergetischen LED *SOLIS-445B/M* und *SOLIS-470C* verwendet. Erstere besitzt eine minimale kollimierte Ausgangsleistung von 2,9 W, eine nominale Wellenlänge von 445,0 nm und eine Halbwertsbreite von 23,0 nm. Letztere verfügt über eine minimale kollimierte Ausgangsleistung von 3,0 W, eine nominale Wellenlänge von 470,0 nm und eine Halbwertsbreite von 34,0 nm. Die Anregungswellenlängen der *SOLIS-445B/M* werden durch Filter Nr. 1 in Tabelle 48 und die der *SOLIS-470C* durch den Filter Nr. 3 in Tabelle 48 eingegrenzt. Beide Dioden werden durch Stativstangen manuell auf die Probe fokussiert und werden über die Kontrolleinheit *DC2200* von *Thorlabs* für fokussierte einkanalige lichtemittierende Dioden mit Frequenzmodulation konfiguriert. Das System wird dazu verwendet, um mit Bakterien gefüllte mikrostrukturierte Träger innerhalb und außerhalb der Befüllungskammer zu beobachten und zu dokumentieren.

Tabelle 48: Auflistung der im optischen System integrierten optischen Filter von *Edmund Optics*.

OD4 Filter		
Nr.	Filtertyp	Bandbreite in [nm]
1.	Bandpassfilter	425,0 bis 475,0
2.	Langpassfilter	> 475,0
3.	Bandpassfilter	460,0 bis 480,0
4.	Bandpassfilter	490,0 bis 510,0
5.	Bandpassfilter	500,0 bis 520,0
6.	Bandpassfilter	522,0 bis 542,0
7.	Bandpassfilter	550,0 bis 570,0
8.	Bandpassfilter	579,0 bis 599,0
9.	Bandpassfilter	622,0 bis 642,0

8.1.2.19 PixCell II

Das *PixCell II* von *Arcturus* ist ein Mikroskop zur Lasermikrodissektion von Proben und kann als Auflichtmikroskop verwendet werden. Es verfügt über eine motorisierte X- und Y-Achse und über die in Tabelle 49 gelisteten Objektive. Zusätzlich wurde eine maßgeschneiderte Halterung angefertigt, um zur Dokumentation von Proben ein kamerafähiges Mobiltelefon vor dem WH10 x/22 Okular zu fixieren. Der Positioniertisch *SCAN IM 130 x 100* von *Märzhäuser Wetzlar* lässt sich durch einen Joystick *Tango PCIe* von *Märzhäuser Wetzlar* steuern. Das Mikroskop wird zur Statusüberprüfung und Dokumentation der Befüllung von mikrostrukturierten Glaträgern mit modifiziertem Styrol-co-Acrylpolymer *SLEC PLT 7552* verwendet.

Tabelle 49: Auflistung der vier am Objektivrevolver eingebauten Objektive des *PixCell II*.

Objektive
<i>Olympus MPlan N 5 x/0,1</i>
<i>Olympus MPlan N 10 x/0,25</i>
<i>Olympus LCPlanFI 20 x/0,4</i>
<i>Olympus UPlanApo 40 x/1</i>

8.1.2.20 Synergy H1 Hybrid Multimodus-Mikrotiterplatten-Lesegerät

Das Mikrotiterplatten-Lesegerät *Synergy H1* von *BioTek Instruments GmbH* unterstützt die Analytik von Mikrotiterplatten. Der Detektor kann eine Absorption im Messbereich zwischen 0,0 bis 4,0 Abs mit einer Genauigkeit von $1,0 \times 10^{-3}$ Abs bestimmen. Das Detektionslimit der Fluoreszenz liegt beim Einsatz eines Monochromators bei 20,0 pM und beim Einsatz eines optischen Filters bei 10,0 pM bis 250,0 fM. Für Lumineszenz liegt das Detektionslimit bei

75,0 amol pro Kavität. Xenon-Blitzröhren mit einer Leistung von 5,0 bis 20,0 W erzeugen sichtbares Licht zur Messung der Absorption und zur Anregung von Fluorophoren. Ein Monochromator kann in einem Spektrum von 230,0 bis 999,0 nm in monochromatisches Licht zur Transmission mit einer Bandbreite von 4,0 nm unterhalb und 8,0 nm oberhalb einer Wellenlänge von 285,0 nm umwandeln. Zwei weitere Monochromatoren grenzen zum einen die Anregungswellenlängen für Fluorophore in einem Spektrum zwischen 250,0 bis 700,0 nm ab. Zum anderen grenzen sie das von den Fluorophoren emittierte Licht in einem Spektrum zwischen 300,0 bis 700,0 nm mit einer Bandbreite von 16,0 nm ein. Ebenso besitzt das Messgerät mehrere in Tabelle 50 aufgeführte optische Filter mit dichroitischen Spiegeln. Eine integrierte Inkubationskammer mit Schüttelfunktion erlaubt eine Kultivierung von Mikroorganismen innerhalb der Messfläche in einem Temperaturbereich von Raumtemperatur bis zu 45 °C. Zwei Injektoren ermöglichen die kontrollierte Zugabe von flüssigen Substanzen. Die Inkubationsbedingungen, Messparameter und Empfindlichkeit der Detektion während des Experiments können durch das Computerprogramm *Gen5 Data Analysis* Software von *BioTek Instruments* GmbH programmiert werden. Die Messdaten werden im XLS-Format ausgegeben. Das Messgerät wird zur quantitativen Detektion für die vom *RGB-S* Reporter exprimierte fluoreszierenden Proteinen in einer Endpunkt- und Zeitraffermessung eingesetzt.

Tabelle 50: Optische Filter zur Eingrenzung der Wellenlängen der Anregungs- und Emissionsspektren im *Synergy H1*.

Filter mit dichroitischen Spiegeln		
Anregungsfilter Bandbreite in [nm]	Emissionsfilter Bandbreite in [nm]	Umlenkung durch dichroitische Spiegel ab [nm]
365,0 bis 505,0	508,0 bis 548,0	510,0 bis 548,0
320,0 bis 400,0	420,0 bis 500,0	400,0 bis 500,0
320,0 bis 400,0	580,0 bis 660,0	400,0 bis 660,0
465,0 bis 505,0	508,0 bis 548,0	510,0 bis 548,0

Der Standort des Gerätes ist am Institut für biologische Grenzflächen 1 am Karlsruher Institut für Technologie (KIT).

8.1.2.21 VL-115.BL

Bei der *VL-115.BL* handelt es sich um eine Leuchtröhre von *Vilber Lourmat* GmbH, welche eine Fläche von bis zu 46 759,0 mm² mit Schwarzlicht bei einer Spitzenwellenlänge von 365,0 nm und einer Leistung von 15,0 W bestrahlen kann. Die Leuchtröhre ist von einem Gehäuse aus Aluminium ummantelt, besitzt zur Leistungssteigerung einen *Onduflex*-Reflektor und die Bandbreite des Lichtes reicht bis in den sichtbaren Bereich.

Während der Doktorarbeit wurde die Beleuchtung zur gezielten Abspaltung des funktionalisierten Photo-Linkers innerhalb der mikrostrukturierten Glasträger genutzt.

8.1.2.22 XCell SureLock™ Mini-Cell Elektrophorese-System mit XCell II Blotmodul

Das *XCell SureLock™ Mini-Cell* Elektrophorese-System von *Novex™* ermöglicht die Durchführung einer Gelelektrophorese mit handelsüblichen Polyacrylamid-Gelen. Der Pufferkern des Moduls fasst bis zu zwei Gele und kann durch mehrere Keile im System befestigt werden, sodass innere und äußere Pufferkammer effektiv getrennt werden. Das *XCell II Blotmodul* von *Invitrogen* wird bei der Durchführung eines *Western Blot* anstelle des Pufferkerns in dem Elektrophorese-System eingesetzt. Das Modul dient als Gehäuse und Flüssigkeitskammer für das vollständig zusammengesetzt Blotsandwich und wird auf dieselbe Art und Weise wie der Pufferkern innerhalb der Pufferkammer des Elektrophorese-Systems befestigt. Durch ein handelsübliches Labornetzgerät wird bei beiden Varianten Spannung und Stromstärke zwischen Kathode und Anode angelegt.

Der Standort des Moduls ist die Abteilung der funktionalen Genomanalyse am DKFZ in Heidelberg.

8.1.2.23 Zelldichtemessgerät *Biowave WPA CO 8000*

Das von *Biochrom GmbH* hergestellte Messgerät kann die Abs bei einer OD_{600} von einer Flüssigkeit in einer handelsüblichen Küvette bestimmen. Die Messung eines Probenblindwertes ist obligatorisch und das Gerät kann bis zu 99 Messwerte dokumentieren. Eine zuverlässige Messung ist zwischen -0,3 und 2,0 Abs mit einer Genauigkeit von $5,0 \times 10^{-2}$ Abs möglich. Durch die Absorptionmessung des Messgerätes wird die Bakteriendichte innerhalb von Bakteriensuspension approximiert.

8.1.2.24 *Zepto Modell 2 Grundgerät Typ A*

Das *Zepto Modell 2 Grundgerät Typ A* von *Diener electronic GmbH & Co. KG* besitzt eine runde Vakuumkammer aus Borosilikatglas mit einem Volumen von circa 2,6 L. Über Elektroden kann die Maschine ein Plasma bei einer Frequenz von 40 kHz mit einer Leistung von bis zu 100,0 W zünden. Die Gaszufuhr in dem Gerät wird über Nadelventile und die Leistung sowie Prozesszeit über analoge Knöpfe eingestellt. Mit Hilfe dieses Geräts werden die Siliziumdioxidmoleküle von mikrostrukturierten Glasträgern aktiviert um eine Hydrophobierung zu ermöglichen.

8.1.3 Basischemikalien

Tabelle 51: Auflistung aller in der Dissertation verwendeten Chemikalien.

Basischemikalien				
Nr.	Chemikalie	Lieferant	CAS-Nr.	Reinheit
1.	(2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat)	VWR	94790-37-1	98,0 %
2.	(3-Aminopropyl)triethoxysilan	VWR	919-30-2	100,0 %
3.	1,1,4,7,7-Pentamethyldiethylenetriamine	VWR	3030-47-5	99,0 %
4.	1-Hydroxybenzotriazol	<i>Sigma-Aldrich</i>	2592-95-2	97,0 %
5.	2-Mercaptoethanol	<i>Sigma-Aldrich</i>	60-24-2	99,0 %
6.	2-Propanol	VWR	67-63-0	98,0 %
7.	Aceton	VWR	67-64-1	99,8 %
8.	Agar für die Bakteriologie	VWR	9002-18-0	100,0 %
9.	Aluminiumsulfat Hexadecahydrat	<i>Carl Roth GmbH</i>	16828-11-8	≥98,0 %
10.	Ameisensäure	VWR	64-18-6	99,0 %
11.	Ammoniumhydrogencarbonat	VWR	1066-33-7	98,0 %
12.	Ampicillin Natriumsalz	<i>fisher scientific™</i>	69-52-3	≥ 95,0 %
13.	Argon	<i>Air Liquide</i>	7440-37-1	100,0 %
14.	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat	VWR	128625-52-5	≥ 98,5 %
15.	Bovines Serumalbumin	<i>Sigma-Aldrich</i>	9048-46-8	≥ 96,0 %
16.	Chloroform	VWR	67-66-3	99,0 %
17.	Ciprofloxacin	VWR	85721-33-1	≥ 98,0 %
18.	D(+)-Biotin	<i>Acros Organics</i>	58-85-5	99,0 %
19.	Denaturierter Alkohol	VWR	64-17-5	96,0 %
20.	Dichlormethan	VWR	75-09-2	≥ 99,0 %
21.	Diisopropylethylamin	VWR	7087-68-5	99,5 %
22.	Dimethylsulfoxid	VWR	67-68-5	99,5 %
23.	Druckluft	<i>Air Liquide</i>	132259-10-0	100,0 %
24.	Eisessig	<i>Sigma-Aldrich</i>	64-19-7	100,0 %
25.	Essigsäureanhydrid	VWR	108-24-7	≥ 99,0 %
26.	Ethanol	VWR	64-17-5	≥ 99,8 %

Nr.	Chemikalie	Lieferant	CAS-Nr.	Reinheit
27.	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat	VWR	6381-92-6	99,0 %
28.	Fmoc-Photo-Linker	Iris Biotech GmbH	162827-98-7	100,0 %
29.	Fmoc-βA	VWR	35737-10-1	≥ 99,0 %
30.	Gelatine	VWR	9000-70-8	100,0 %
31.	Getrocknetes N,N-Dimethylformamid	VWR	68-12-2	≥ 99,8 %
32.	Glycerin	Sigma-Aldrich	56-81-5	99,0 %
33.	Kaliumchlorid	VWR	7447-40-7	≥ 99,0 %
34.	Kaliumdihydrogenphosphat	VWR	7778-77-0	≥ 99,0 %
35.	Kaliumhydroxid	VWR	1310-58-3	≥ 84,0 %
36.	Kanamycinsulfat	fisher scientific™	25389-94-0	> 95,0 %
37.	Kieselgel 60 C18	Carl Roth GmbH	7631-86-9	100,0 %
38.	Kohlenstoffdioxid	Air Liquide	124-38-9	100,0 %
39.	Kupfer(I)-chlorid	fisher scientific™	7758-89-6	99,9 %
40.	Methanol	VWR	67-56-1	≥ 99,0 %
41.	Methylmethacrylat	VWR	80-62-6	≥ 99,0 %
42.	N,N-Diisopropylcarbodiimid	Sigma-Aldrich	693-13-0	99,0 %
43.	N,N-Dimethylformamid	VWR	68-12-2	99,5 %
44.	Natriumazid	VWR	26628-22-8	≥ 99,0 %
45.	Natriumchlorid	VWR	7647-14-5	≥ 99,9 %
46.	Natriumhydroxid	VWR	1310-73-2	≥ 97,0 %
47.	N-Methylimidazol	VWR	616-47-7	≥ 99,0 %
48.	n-Propyltriethoxysilan	VWR	2550-02-9	≥ 97,0 %
49.	Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH	30525-89-4	100,0 %
50.	Piperidin	VWR	110-89-4	99,0 %
51.	Poly-(ethylenglykol)-methacrylat	Sigma-Aldrich	25736-86-1	100,0 %
52.	Ponceau S Natriumsalz	Sigma-Aldrich	6226-79-5	100,0 %
53.	Resazurin Natriumsalz	Alfa Aesar	62758-13-8	100,0 %
54.	Stickstoff	Air Liquide	7727-37-9	100,0 %
55.	Tetrazyklin Hydrochlorid	Carl Roth GmbH	64-75-5	100,0 %
56.	Trichlor-(1H,1H,2H,2H- perfluoroctyl)-silan	Sigma-Aldrich	78560-45-9	97,0 %
57.	Triethylamin	VWR	121-44-8	≥ 99,0 %
58.	Triethylenglykolmonomethylether	VWR	112-35-6	≥ 99,0 %

Nr.	Chemikalie	Lieferant	CAS-Nr.	Reinheit
59.	Trifluoressigsäure	<i>Sigma-Aldrich</i>	76-05-1	≥ 99,5 %
60.	Triisobutylsilan	VWR	6485-81-0	99,0 %
61.	Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid	<i>Merck KGaA</i>	1185-53-1	≥ 99,0 %
62.	<i>Tween 20</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>	9005-64-5	40,0 %
63.	Verflüssigter Stickstoff	<i>Air Liquide</i>	7727-37-9	100,0 %
64.	wasserfreie Phosphorsäure	<i>Sigma-Aldrich</i>	7664-38-2	99,9 %
65.	wasserfreies Acetonitril	VWR	75-05-8	99,9 %
66.	wasserfreies Dichlormethan	VWR	75-09-2	≥ 99,7 %
67.	wasserfreies Dinatriumhydrogenphosphat	VWR	7558-79-4	99,0 %
68.	wasserfreies L-Cystein-Hydrochlorid	<i>Sigma-Aldrich</i>	52-89-1	≥98,0 %
69.	wasserfreies n-Hexan	VWR	110-54-3	≥ 99,0 %
70.	wasserfreies Trinatriumcitrat	<i>Merck KGaA</i>	68-04-2	≥ 99,0 %
71.	α-Bromisobuttersäurebromid	<i>Sigma-Aldrich</i>	20769-85-1	98,0 %

8.1.4 Kommerzielle Produkte

Tabelle 52: Auflistung aller in der Dissertation verwendeten kommerziellen Produkte.

Kommerzielle Produkte			
Nr.	Produkt	Lieferant	Produktnr.
1.	<i>1700 Series Gastight™</i> Spritze	<i>Hamilton™</i>	20972
2.	<i>3D-Maleimide</i> Glasträger, 25,0 x 75,0 mm ²	<i>PolyAn GmbH</i>	nicht verfügbar
3.	Adhäsiver Polymerase-Kettenreaktion- Film aus Polyester	<i>Lab Logistics Group</i>	6313398
4.	<i>BG-11-Flüssigmedium</i>	<i>Thermo Fisher Scientific</i>	A1379901
5.	<i>Blocking Buffer for Fluorescent Western Blotting (Rockland-Puffer)</i>	<i>Rockland Immunochemicals</i>	MB-070
6.	<i>BRANDplate®</i> , 96-Well-Mikrotiterplatte, <i>pureGrade™</i> S, schwarz, F-Boden aus Polystyrol	<i>BRAND</i>	10 49 81608
7.	<i>BRANDplate®</i> , 96-Well-Mikrotiterplatte, <i>pureGrade™</i> S, transparent, F-Boden aus Polystyrol	<i>BRAND</i>	10 49 81602

Nr.	Produkt	Lieferant	Produktnr.
8.	<i>BRANDplate</i> [®] , 96-Well-Mikrotiterplatte, <i>pureGrade</i> [™] S, transparent, U-Boden aus Polystyrol	<i>BRAND</i>	10 49 81600
9.	Chymotrypsin Protease	<i>Promega Corporation</i>	V1061
10.	<i>Columbia</i> -Agar	<i>Becton Dickinson Difco</i> [™]	BD 254005
11.	<i>Dulbecco's</i> phosphatgepufferte Salzlösung mit Magnesium und Calcium (<i>DPBS</i> -plus)	<i>VWR</i>	LONZ17-513F
12.	<i>Dulbecco's</i> phosphatgepufferte Salzlösung ohne Magnesium und Calcium (<i>DPBS</i> -minus)	<i>anprotec</i>	AN-BS-0002
13.	<i>eBioscience</i> [™] 1x Lysepuffer für rote Blutkörperchen	<i>Thermo Fisher Scientific</i>	00-4333-57
14.	<i>E-PAGE</i> [™] Blotting-Pads, wiederverwendbar, 8,6 cm x 13,5 cm	<i>Thermo Fisher Scientific</i>	LC2101
15.	<i>EZBlue</i> [™] <i>Coomassie</i> [®] -Brillant-Blau G-250 Gel Färbereagenz	<i>Sigma-Aldrich</i>	G1041
16.	Färbekasten für zehn Standard-Objektträger (76,0 x 26,0 mm ²)	<i>VWR</i>	631-9328
17.	<i>Foldbackklemmer mauly</i> [®] mit 32,0/13,0 mm Stapelhöhe	<i>Streit-Onlineshop</i>	5013737
18.	<i>Foldbackklemmer mauly</i> [®] mit 51,0/28,0 mm Stapelhöhe	<i>Streit-Onlineshop</i>	5021814
19.	<i>GB 001</i> Gel-Blotting-Papier	<i>Schleicher & Schuell</i>	10426370
20.	Glasplatten aus Quarzglas mit den Maßen 158,0 x 60,0 x 5,0 mm ³ und 111,0 x 60,0 x 50,0 mm ³	<i>Glasbläserei Paris</i>	nicht verfügbar
21.	Glasträger mit acht individuellen Kammern inklusive abnehmbaren Wänden	<i>ibidi GmbH</i>	80841
22.	Glu-C	<i>Promega Corporation</i>	V1651
23.	Hasenserum	<i>Gibco Corporation</i>	16120099
24.	Hitzeinaktiviertes FKS	<i>Merck KGaA</i>	N4762-100ML
25.	<i>HPLC</i> -Säule <i>ZORBAX SB-C18</i> , 80 Å, 5,0 µm, 4,6 x 250,0 mm ²	<i>Agilent Technologies</i>	AG880975-902

Nr.	Produkt	Lieferant	Produktnr.
26.	<i>Immobilon</i> [®] -FL Membranen aus PVDF, Porengröße 450,0 nm, 10,0 x 10,0 cm	<i>Merck Millipore</i>	05317
27.	<i>Invitrogen</i> [™] <i>NuPAGE</i> [™] 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure Laufpuffer (20-fach konzentriert)	<i>Thermo Fisher Scientific</i>	NP0002
28.	<i>Invitrogen</i> [™] <i>NuPAGE</i> [™] 4 bis 12,0 %ige Bis-Tris-Gelkassetten, 1,0 mm Dicke, mit 12 Taschen	<i>Thermo Fisher Scientific</i>	10247002
29.	<i>Invitrogen</i> [™] <i>NuPAGE</i> [™] 4 bis 12,0 %ige Bis-Tris-Gelkassetten, 1,0 mm Dicke, mit 15 Taschen	<i>Thermo Fisher Scientific</i>	10338442
30.	<i>Invitrogen</i> [™] <i>NuPAGE</i> [™] Antioxidans	<i>Thermo Fisher Scientific</i>	NP0005
31.	<i>Invitrogen</i> [™] <i>NuPAGE</i> [™] LDS Probenpuffer (vierfach konzentriert)	<i>Thermo Fisher Scientific</i>	11549166
32.	<i>Invitrogen</i> [™] <i>NuPAGE</i> [™] Probenreduktionsmittel (zehnfach konzentriert)	<i>Thermo Fisher Scientific</i>	NP0004
33.	<i>Invitrogen</i> [™] <i>NuPAGE</i> [™] Transferpuffer (20-fach konzentriert)	<i>Thermo Fisher Scientific</i>	NP0006
34.	Kundenspezifische Substitutionsanalysen auf <i>PEPperCHIP</i> [®] Peptid-Mikroarrays in Fünfer- und 16er-Konfiguration	<i>PEPperPRINT GmbH</i>	nicht verfügbar
35.	<i>Lightning-Link</i> [®] <i>Rapid DyLight</i> [®] 680 Konjugationsset	<i>abcam</i> [®]	ab201804
36.	<i>Lightning-Link</i> [®] <i>Rapid DyLight</i> [®] 800 Konjugationsset	<i>abcam</i> [®]	ab201806
37.	<i>LIVE/DEAD</i> [®] <i>BacLight</i> [™] Viabilitätsset für Bakterien	<i>Invitrogen</i>	L13152
38.	<i>Lysogeny Broth</i> -Bouillion nach <i>Miller</i> (<i>LB-Miller</i>)	<i>Fisher BioReagents</i> [™]	10113293
39.	Menschliches ApoA1 (1,4 mg/mL) in 10,0 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung	<i>Sigma-Aldrich</i>	A0722
40.	HKS	<i>Sigma-Aldrich</i>	S1764

Nr.	Produkt	Lieferant	Produktnr.
41.	Mikrostrukturierte Glasträger aus Quarzglas (75,0 x 25,0 x 1,0 mm ³ , Kavitäten: $\varnothing = 12,0 \mu\text{m}$, Tiefe = 10,0 μm , Versetzungsabstand = 8,0 μm , Anzahl: ~ 2,8 bis 3,2 Mio.)	AMO GmbH	nicht verfügbar
42.	Modifiziertes Styrol-co-Acrylpolymer SLEC PLT 7552 (Nanopartikel, diverse Größe)	Sekisui Chemical GmbH	nicht verfügbar
43.	MS/CA-Kassetten	Ismatec®	IS 3510
44.	NAP™ -25-Pharmacia-Biotech Säule	Sigma-Aldrich	GE17-0852-02
45.	NAP™ -5-Pharmacia-Biotec Säule	Sigma-Aldrich	GE17-0853-01
46.	Neubauer improved Zählkammer	Paul Marienfeld	0640010
47.	NeutrAvidin™ Oregon Green™ 488 Konjugat	Thermo Fisher Scientific	A6374
48.	PDMS Stanzer für die Mikrofluidik	Darwin microfluidics	LVF-KXX-04
49.	Penicillin-Streptomycin-Mix (10 000 U/mL)	Gibco Corporation	Gibco™ 15140122
50.	PEPperCHIP® Inkubationsschale in Fünfer- und 16er-Konfiguration	PEPperPRINT GmbH	nicht verfügbar
51.	Polyklonales IgG aus dem Hasen (10,0 mg/mL)	Sigma-Aldrich	PP64
52.	ProteaseMAX™ Tensid	Promega Corporation	V2071
53.	Rekombinantes Emp von <i>Staphylococcus aureus</i> USA300 aus <i>Escherichia coli</i> mit einer Reinheit $\geq 85,0 \%$	MyBioSource	MBS1482144
54.	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI 1640)	anprotec	AC-LM-0056
55.	SeeBlue™ Plus2 vorgefärbter Proteinstandard	Thermo Fisher Scientific	LC5925
56.	S-Monovette® mit Lithium-Heparin Gel, 4,0 mL	Sarstedt AG & Co. KG	04.1927
57.	S-Monovette® Serum, 7,5 mL	Sarstedt AG & Co. KG	01.1601.001
58.	SulfoLink™ Kupplungsharz	Thermo Fisher Scientific	20401
59.	Sylgard™ 184 Silikon Elastomer Kit	Dow Incorporated	1317318

Nr.	Produkt	Lieferant	Produktnr.
60.	Trypanblau-Lösung 4,0 ‰ (v/v)	<i>Sigma-Aldrich</i>	T8154
61.	Trypsin Protease	<i>Promega Corporation</i>	V5111
62.	Tryptische Soja-Bouillon Nr.2 (TSB)	<i>Omnilab</i>	SI 51228-500G-F
63.	<i>Tygon® S3™ E-LFL</i>	<i>Ismatec®</i>	GZ-96450-34
64.	<i>Zeba™ Spin</i> Entsalzungssäule, Molekulargewichtsgrenzwert 7,0 kDa, 2,0 mL	<i>Thermo Fisher Scientific</i>	89890
65.	<i>Zeba™ Spin</i> Entsalzungssäule, Molekulargewichtsgrenzwert 7,0 kDa, 5,0 mL	<i>Thermo Fisher Scientific</i>	89891
66.	<i>Zeba™ Spin</i> Entsalzungssäule, Molekulargewichtsgrenzwert 7,0 kDa, 0,5 mL	<i>Thermo Fisher Scientific</i>	89883
67.	Zellkulturflasche, Polystyrol, 250 mL, 75,0 cm ² , filter-Schraubverschluss, <i>cellstar®</i> TC, steril	<i>Sarstedt AG & Co. KG</i>	83.3911.002
68.	Zellkulturflaschen, <i>Nunclon™ Δ</i> Oberfläche, Polystyrol/Polyethylen mit hoher Dichte, steril	<i>Thermo Fisher Scientific</i>	15217915
69.	Zellsieb für 50,0 mL Röhrcchen, 40,0 µm Porengröße	<i>VWR</i>	734-0002

8.1.5 Antikörper

Tabelle 53: Auflistung aller in der Dissertation verwendeten Antikörper, mit Tabellenschlüssel.

Antikörperliste				
Tabellenschlüssel				
Nr.	Antikörpername			designierte Abkürzung
Wirt	Klonalität	Konjugation	Lieferant	Produkt Nr.
1.	Anti-Hase IgG schwere- und leichte Kette			Anti-Hase IgG Cy [™] 3
Ziege	polyklonal	Cy [™] 3	Jackson ImmunoResearch Europe LTD	111-165-003
2.	Anti-Rind IgG schwere- und leichte Kette			Anti-Rind IgG Cy [™] 3
Ziege	polyklonal	Cy [™] 3	Jackson ImmunoResearch Europe LTD	101-165-003
3.	Anti-Mensch ApoA1			Anti- ApoA1 DyLight [®] 680
Maus	monoklonal	DyLight [®] 680	antikoerper-online.de	ABIN3201833
4.	Anti-Mensch CD27			Anti- CD27 PE
Maus	monoklonal	PE	Becton Dickinson	566945
5.	Anti-Mensch CD35			Anti- CD35 PE
Maus	monoklonal	PE	Becton Dickinson	559872
6.	Anti-Mensch CD71			Anti- CD71 APC
Maus	monoklonal	APC	Becton Dickinson	561940
7.	Anti-Mensch IgA α-Globulin			Anti- IgA DyLight [®] 800
Ziege	polyklonal	DyLight [®] 800	antikoerper-online.de	ABIN611979
8.	Anti-Mensch IgG Fc-Region, kreuzabsorbiert			Anti- IgG Fc DyLight [®] 680
Ziege	polyklonal	DyLight [®] 680	Thermo Fisher Scientific	SA5-10138
9.	Anti-Mensch IgG leichte Kette κ-Isotyp			Anti-κ DyLight [®] 800
Ziege	polyklonal	DyLight [®] 800	Novus Biologicals	NBP1-75931
10.	Anti-Mensch IgG leichte Kette λ-Isotyp			Anti-λ DyLight [®] 680
Ziege	polyklonal	DyLight [®] 680	Bio-Rad Laboratories	STAR129

Tabellenschlüssel				
Nr.	Antikörpername			designierte Abkürzung
Wirt	Klonalität	Konjugation	Lieferant	Produkt Nr.
11.	Anti-Mensch IgG schwere und leichte Kette, kreuzabsorbiert			Anti- IgG H + L <i>XFD350</i>
Ziege	polyklonal	<i>XFD350</i>	<i>AAT Bioquest</i>	50154
12.	Anti-Mensch IgG schwere und leichte Kette, preabsorbiert			Anti- IgG H + L <i>DyLight[®] 680</i>
Ziege	polyklonal	<i>DyLight[®] 680</i>	<i>antikoerper-online.de</i>	ABIN6698933
13.	Anti-Mensch IgG₁ schwere Kette und Gelenkregion			Anti- IgG₁ <i>DyLight[®] 680</i>
Maus	monoklonal	<i>DyLight[®] 680</i>	<i>antikoerper-online.de</i>	ABIN135622
14.	Anti-Mensch IgG₂ Fc-Region und schwere Kette			Anti- IgG₂ <i>DyLight[®] 800</i>
Maus	monoklonal	<i>DyLight[®] 800</i>	<i>antikoerper-online.de</i>	ABIN135628
15.	Anti-Mensch IgG₃ Gelenkregion			Anti- IgG₃ <i>DyLight[®] 800</i>
Maus	monoklonal	<i>DyLight[®] 680</i>	<i>antikoerper-online.de</i>	ABIN135664
16.	Anti-Mensch IgG₄			Anti- IgG₄ <i>DyLight[®] 680</i>
Schaf	polyklonal	<i>DyLight[®] 680</i>	<i>antikoerper-online.de</i>	ABIN458176
17.	Anti-Mensch <i>Siglec-E</i> und IgG Fc-Region Fusionsprotein			Anti- <i>Siglec-Fc-IgG</i> APC
Ratte	monoklonal	APC	<i>Biolegend[®] Incorporated</i>	410712
18.	Anti- <i>Staphylococcus-Emp</i> -Antikörper			Anti- Emp
Mensch	polyklonal	keine	Affinitätschromatographie	nicht verfügbar
19.	Humanisierter Anti-Mensch Myc			Anti- Myc
Maus	monoklonal	keine	TU Braunschweig	TUN225-2C1.8
20.	<i>scFv-Fc</i> LES20_A7			LES20_A7
Mensch	monoklonal	keine	TU Braunschweig	YM116-3Y
21.	<i>scFv-Fc</i> LES20_C1			LES20_C1
Mensch	monoklonal	keine	TU Braunschweig	YM127-14Y
22.	<i>scFv-Fc</i> LES20_C9			LES20_C9
Mensch	monoklonal	keine	TU Braunschweig	YM116-4Y
23.	<i>scFv-Fc</i> LES20_D8			LES20_D8
Mensch	monoklonal	keine	TU Braunschweig	YM127-15Y

Tabellenschlüssel				
Nr.	Antikörpername			designierte Abkürzung
Wirt	Klonalität	Konjugation	Lieferant	Produkt Nr.
24.	scFv-Fc LES7_C5			LES7_5
Mensch	monoklonal	keine	TU Braunschweig	YM166-1Y
25.	scFv-Fc LES7_C8			LES7_C8
Mensch	monoklonal	keine	TU Braunschweig	YM116-2Y

8.1.6 Peptide

Tabelle 54: Auflistung aller in der Dissertation verwendeten Peptide, mit Tabellenschlüssel. Abstandshalter sind in Klammern angegeben.

Peptidliste			
Tabellenschlüssel			
Nr.	Name	Lieferant	Schutzgruppen oder Konjugate
Peptidsequenz			
1.	Bac8c	Peps4LS	C-terminales Säureamid, AmP
RIWVIWRR-NH ₂			
2.	eBio-GGS ₂ -Emp9	Peps4LS	N-terminales Biotin
Biotin-(Polyethylenglycol ₅ -E-G-G-S-G-G-S)-VPEFKGSLP			
3.	eBio-βA ₅ -Emp9	Peps4LS	N-terminales Biotin
Biotin-(Polyethylenglycol ₅ -EβA ₅)-VPEFKGSLP			
4.	Emp-C1	Peps4LS	acetyliert, C-terminales C
Acetyl-HYVPEFKGGLPAPRV-(βA-D-βA-A-A-E-E-A)-C			
5.	Emp-C2	Peps4LS	Acetyliert, C-terminales C
Acetyl-HYVPEFKGSLPAPRV-(βA-D-βA-A-A-E-E-A)-C			
6.	Fmoc-MP196	Peps4LS	N-terminale Fmoc-Schutzgruppe, geschützte Seitenketten, AmP
Fmoc-RWRWRW			
7.	Hämagglutinin-C	Peps4LS	acetyliert, C-terminales Cystein
Acetyl-YPYDVDPYAGSGC-(βA-D-βA-A-A-E-E-A)-C			
8.	MP196	Peps4LS	C-Terminales Säureamid, AmP
RWRWRW-NH ₂			

Tabellenschlüssel			
Nr.	Name	Lieferant	Schutzgruppen oder Konjugate
Peptidsequenz			
9.	Pac-525	Peps4LS	C-terminales Säureamid, AmP
KLRRWVRWI-NH ₂			
10.	Poliomyelitis-C	Peps4LS	acetyliert, C-terminales C
Acetyl-KEIPALTAVETGATN-(βA-D-βA-A-A-E-E-A)-C			

8.1.7 Zusammensetzung von Puffern, Lösungen und Nährmedien

Tabelle 55: Auflistung aller in der Dissertation verwendeten Puffer, Lösungen und Nährmedien.

Puffer, Lösungen und Nährmedien		
Nr.	Pufferbezeichnung	Zusammensetzung
1.	1,0 ‰ Gelatine-Lösung	1,0 ‰ (w/v) Gelatine gelöst in <i>DPBS</i> -plus.
2.	Abschreckpuffer	50,0 mM wasserfreies L-Cystein-Hydrochlorid gelöst in ddH ₂ O.
3.	Acetylierungsreagenz	20,0 % (v/v) Diisopropylethylamin, 10,0 % (v/v) Essigsäureanhydrid vermischt mit 70,0 % (v/v) N,N-Dimethylformamid.
4.	Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer	100,0 mM Ammoniumhydrogencarbonat gelöst in ddH ₂ O.
5.	Äußerer Laufpuffer	760,0 mL ddH ₂ O vermischt mit 40,0 mL <i>Invitrogen™ NuPAGE™</i> 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure Laufpuffer.
6.	<i>BG-11</i> -Flüssigmedium	1,5 g/L Natriumnitrat, 75,0 mg/L Magnesiumsulfat Heptahydrat, 39,0 mg/L dibasisches Kaliumphosphat, 27,0 mg/L Calciumchlorid Dihydrat, 20,0 mg/L Natriumcarbonat, 12,0 mg/L Eisenammoniumcitrat, 2,9 mg/L Borsäure, 1,8 mg/L Manganchlorid Tetrahydrat, 1,0 mg/L Ethylendiamintetraessigsäure, 391,0 µg/L Natriummolybdat Dihydrat, 222,0 µg/L Zinksulfat Heptahydrat, Kupfersulfat 79,0 µg/L gelöst in ddH ₂ O.
7.	Blockierungspuffer-Formulation 1	18,0 mL <i>Rockland</i> -Puffer vermischt mit 2,0 mL Hasenserum.
8.	Blockierungspuffer-Formulation 2	16,0 mL <i>Rockland</i> -Puffer vermischt mit 4,0 mL Hasenserum.

Nr.	Pufferbezeichnung	Zusammensetzung
9.	Blockierungspuffer-Formulation 3	1,8 mL <i>Rockland</i> -Puffer vermischt mit 200,0 µL IgG aus dem Hasen.
10.	Brom-Silan-Basis	4,7 mL (3-Aminopropyl)triethoxysilan, 2,8 mL Triethylamin vermischt mit 70,0 mL wasserfreiem Dichlormethan.
11.	Ciprofloxacin-Stammlösung	100,0 µg/mL Ciprofloxacin gelöst in ddH ₂ O.
12.	Citrate-Phosphat-Derivativ-Stabilisatorlösung (CPD-Stabilisator)	26,3 g/L Trinatriumcitrat Dihydrat, 23,2 g/L wasserfreie Glucose, 2,6 g/L Citronensäure Monohydrat, 2,5 g/L Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat gelöst in <i>aqua ad iniectabilia</i> .
13.	<i>Columbia</i> -Agar	13,5 g/L Agarose, 12,0 g/L pankreatisch verdautes Pepton aus Casein, 5,0 g/L Natriumchlorid, 5,0 g/L peptisch verdautes tierisches Gewebe, 3,0 g/L Hefeextrakt, 3,0 g/L Rindfleischextrakt und 1,0 g/L Maisstärke gelöst in ddH ₂ O, vermischt mit 5,0 % (v/v) defibriniertes Schafsblut, autoklaviert und in Petrischalen gegossen.
14.	<i>Coomassie</i> [®] -Brillant-Blau-Färbelösung	5,0 % (w/v) Aluminiumsulfat Hexadecahydrat, 2,0 % (w/v) wasserfreie Phosphorsäure und 2,0 ‰ (w/v) <i>EZBlue</i> [™] <i>Coomassie</i> [®] -Brillant-Blau G-250 Gel Färbereagenz gelöst in ddH ₂ O, vermischt mit 10,0 % (v/v) Ethanol Reihenfolge der Zugabe: Aluminiumsulfat Hexadecahydrat, Ethanol, <i>EZBlue</i> [™] <i>Coomassie</i> [®] -Brillant-Blau G-250 Gel Färbereagenz, wasserfreie Phosphorsäure.
15.	Copolymer-Basis	8,4 mL Methylmethacrylat, 2,9 mL Poly-(ethylenglykol)-methacrylat, 620,0 µL Triethylenglykolmonomethylether und 91,0 µL 1,1,4,7,7-Pentamethyldiethylenetriamine vermischt mit 37,0 mL Dimethylsulfoxid.
16.	Differenzierungsmedium für <i>HL-60</i> Zellen	89,6 mL <i>RPMI 1640</i> vermischt mit 10,0 mL hitzeinaktiviertem FKS und 600,0 µL N,N-Dimethylformamid.
17.	<i>DPBS</i> -minus	137,0 mM Natriumchlorid, 8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 2,7 mM Kaliumchlorid und 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat gelöst in ddH ₂ O.

Nr.	Pufferbezeichnung	Zusammensetzung
18.	<i>DPBS</i> -plus	137,0 mM Natriumchlorid, 8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 2,7 mM Kaliumchlorid, 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 0,9 mM wasserfreies Calciumchlorid und 0,5 mM Magnesiumchlorid Hexahydrat gelöst in ddH ₂ O.
19.	Elutionspuffer-Formulation 1	wasserfreies Trinatriumcitrat gelöst in ddH ₂ O, bis ein pH von 2,0 erreicht wird.
70.	Elutionspuffer-Formulation 2	wasserfreies Trinatriumcitrat gelöst in ddH ₂ O, bis ein pH von 3,0 erreicht wird.
20.	Entschützungs-lösung	5,0 ‰ (v/v) Diisopropylethylamin gelöst in getrocknetem N,N-Dimethylformamid.
21.	Entschützungs-lösung für Seitenketten	17,6 mL Dichlormethan, 1,2 mL Triisobutylsilan und 800,0 µL ddH ₂ O vermischt mit 20,4 mL Trifluoressigsäure.
22.	Equilibrierungs-puffer	<i>PBS</i> vermischt mit 5,0 ‰ (v/v) <i>Tween 20</i> .
23.	Extraktionspuffer	25,0 % (v/v) <i>Invitrogen™ NuPAGE™</i> LDS Probenpuffer (vierfach konzentriert) vermischt mit 75,0 % (v/v) ddH ₂ O.
24.	Färbelösung	60,0 µM Propidiumiodid und 12,0 µM <i>SYTO™ 9</i> aus dem <i>LIVE/DEAD® BacLight™</i> Viabilitätsset für Bakterien gelöst in 5,0 mL Kochsalzlösung-Formulation 2 in einem lichtgeschützten Gefäß.
25.	Färbepuffer-Formulation 1	Equilibrierungspuffer vermischt mit 10,0 % (v/v) <i>Rockland</i> -Puffer.
26.	Färbepuffer-Formulation 2	8,0 mL Färbepuffer –Formulation 1 vermischt mit 1,0 mL Hasenserum und 1,0 mL <i>Rockland</i> -Puffer.
27.	Färbepuffer-Formulation 3	Färbepuffer-Formulation 1 vermischt mit 10,0 % (v/v) polyklonales IgG aus dem Hasen.
28.	Fixierpuffer	4,0 % (w/v) Paraformaldehyd gelöst in <i>DPBS</i> -minus.
29.	Fmoc-Entschützungs-lösung	20,0 % (v/v) Piperidin vermischt mit 80,0 % (v/v) getrocknetem N,N-Dimethylformamid.
30.	Fmoc-βA-Lösung	0,1 M Fmoc-βA gelöst in wasserfreiem Dichlormethan.
31.	<i>UPLC</i> -Puffer A	1,0 ‰ (v/v) Ameisensäure vermischt mit ddH ₂ O.
32.	<i>UPLC</i> -Puffer B	1,0 ‰ (v/v) Ameisensäure vermischt mit wasserfreiem Acetonitril.

Nr.	Pufferbezeichnung	Zusammensetzung
33.	Innerer Laufpuffer	10,0 mL <i>Invitrogen™ NuPAGE™</i> 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure Laufpuffer vermischt mit 500,0 µL <i>Invitrogen™ NuPAGE™</i> Antioxidans und 179,5 mL ddH ₂ O.
34.	Kalilauge in Isopropanol	1,0 M Kaliumhydroxid gelöst in 2-Propanol.
35.	Kanamycinsulfatlösung	Kanamycinsulfat zu einer Konzentration von 50,0 mg/mL gelöst in ddH ₂ O.
36.	Kochsalzlösungs-Formulation 1	1,5 ‰ (w/v) Natriumchlorid gelöst in ddH ₂ O.
37.	Kochsalzlösungs-Formulation 2	8,5 ‰ (w/v) Natriumchlorid gelöst in ddH ₂ O.
38.	Komplementpuffer	16,7 % (v/v) HKS vermischt mit 83,3 % (v/v) Opsonierungspuffer.
39.	Kulturmedium für <i>HL-60</i> Zellen	890,0 mL <i>RPMI 1640</i> vermischt mit 100,0 mL hitzeinaktiviertem FKS und 10,0 mL Penicillin-Streptomycin-Mix.
40.	Kupplungspuffer	50,0 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan und 5,0 mM Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat gelöst in ddH ₂ O und mit Natriumhydroxid auf einen pH von 8,5 eingestellt.
41.	Lagerungspuffer	2,0 ‰ (w/v) Natriumazid gelöst in <i>PBS</i> .
42.	<i>LB-Miller</i>	10,0 g/L Natriumchlorid, 10,0 g/L Trypton und 5,0 g/L Hefeextrakt gelöst in ddH ₂ O.
43.	<i>Lysogeny Broth-Bouillion nach Miller</i> mit Agarose (<i>LB-Miller-Nährplatten</i>)	25,0 g/L <i>LB-Miller</i> gelöst und 10,0 g/L Agar für die Bakteriologie suspendiert in ddH ₂ O, autoklaviert und in Petrischalen gegossen.
44.	<i>Lysogeny Broth-Bouillion nach Miller</i> mit Kanamycin (<i>LB-Miller-Kanamycin</i>)	25,0 g/L <i>LB-Miller</i> gelöst in ddH ₂ O, vermischt mit 1,0 ‰ (v/v) Kanamycinsulfatlösung.

Nr.	Pufferbezeichnung	Zusammensetzung
45.	<i>Lysogeny Broth</i> - Bouillion nach <i>Miller</i> mit Kanamycin und Agarose (<i>LB-Miller</i> - Kanamycin- Nährplatten)	25,0 g/L <i>LB-Miller</i> gelöst in ddH ₂ O, autoklaviert und nach Abkühlzeit mit 1,0 ‰ (v/v) Kanamycinsulfatlösung vermischt und in Petrischalen gegossen.
46.	<i>Lysogeny Broth</i> - Bouillion nach <i>Miller</i> mit Kanamycin und Ciprofloxacin (<i>LB</i> - <i>Miller</i> -Kanamycin- Ciprofloxacin)	25,0 g/L <i>LB-Miller</i> gelöst in ddH ₂ O, vermischt mit 1,0 ‰ (v/v) Kanamycinsulfatlösung und 1,0 ‰ Ciprofloxacin- Stammlösung.
47.	<i>Lysogeny Broth</i> - Bouillion nach <i>Miller</i> mit Kanamycin, doppelt konzentriert (<i>LB-Miller</i> -Kanamycin- 2x)	50,0 g/L <i>LB-Miller</i> gelöst in ddH ₂ O, autoklaviert und nach Abkühlzeit mit 2,0 ‰ (v/v) Kanamycinsulfatlösung vermischt und in Petrischalen gegossen.
46.	<i>Lysogeny Broth</i> - Bouillion nach <i>Miller</i> , doppelt konzentriert (<i>LB-Miller</i> -2x)	50,0 g/L <i>LB-Miller</i> gelöst in ddH ₂ O.
47.	MS-Puffer	1,0 ‰ Trifluoressigsäure vermischt mit ddH ₂ O.
48.	Neutralisierungspuffer	1,0 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid gelöst in ddH ₂ O.
49.	Opsonierungspuffer	42,5 mL <i>DPBS</i> -plus vermischt mit 5,0 mL hitzeinaktiviertem FKS und 2,5 mL 1,0 ‰ Gelatine-Lösung.
50.	Peptid- Extraktionspuffer	5,0 % (v/v) Ameisensäure vermischt mit ddH ₂ O.
51.	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>PBS</i>)	137,0 mM Natriumchlorid, 8,1 mM wasserfreies Dinatriumhydrogenphosphat , 2,7 mM Kaliumchlorid und 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat gelöst in ddH ₂ O.
52.	<i>Ponceau S</i> - Fixierlösung	5,0 ‰ (w/v) <i>Ponceau S</i> Natriumsalz gelöst in ddH ₂ O, vermischt mit 1,0 % (v/v) Eisessig.

Nr.	Pufferbezeichnung	Zusammensetzung
53.	Protonierungspuffer	1,0 ‰ (v/v) Trifluoressigsäure vermischt mit wasserfreiem Acetonitril.
54.	Reduktionspuffer	49,8 mL PBS vermischt mit 214,0 µL 2-Mercaptoethanol .
55.	Resazurinindikator	900,0 µM Resazurin Natriumsalz gelöst in ddH ₂ O.
56.	RPMI 1640	6,0 g/L Natriumchlorid, 2,0 g/L wasserfreie D- Glukose, 800,0 mg/L zweibasisches und wasserfreies Natriumphosphat, 446,0 mg/L L-Alanyl-L-Glutamin, 400,0 mg/L Kaliumchlorid, 200,0 mg/L L-Arginin als freie Base, 100,0 mg/L Calciumnitrat-Tetrahydrat, 65,2 mg/L L-Cystein Dihydrochlorid, 50,0 mg/L wasserfreies L-Asparagin, 50,0 mg/L L-Isoleucin, 50,0 mg/L L-Leucin, 50,0 mg/L wasserfreies Magnesiumsulfat, 40,0 mg/L L-Lysin Monohydrochlorid, 35,0 mg/L Myo-Inositol, 30,0 mg/L L-Serin, 28,8 mg/L L-Tyrosin Dinatriumsalz Dihydrat, 20,0 mg/L L-Asparaginsäure, 20,0 mg/L L-Glutaminsäure, 20,0 mg/L L-Hydroxy-L-Prolin, 20,0 mg/L L-Prolin, 20,0 mg/L L-Threonin, 20,0 mg/L L-Valin, 15,0 mg/L L-Histidin, 15,0 mg/L L-Methionin, 15,0 mg/L L-Phenylalanin, 10,0 mg/L Glycin, 5,0 mg/L L-Tryptophan, 5,0 mg/L Phenolrot Natriumsalz, 3,0 mg/L Cholinchlorid, 2,0 mg/L Natriumhydrogencarbonat, 1,0 mg/L Folsäure, 1,0 mg/L reduziertes L-Glutathion, 1,0 mg/L Nicotinsäureamid, 1,0 mg/L p-Aminobenzoesäure, 1,0 mg/L Pyridoxin Hydrochlorid, 1,0 mg/L Thiamin Hydrochlorid, 250,0 µg/L Calcium D-Pantothenat, 200,0 µg/L D-Biotin, 200,0 µg/L Riboflavin und 5,0 µg/L Vitamin B12 gelöst in ddH ₂ O.
57.	Saure Phosphate, Adenin, Guanin, Glukose, Sorbit- Mannitol- Additivlösung (PAGGS-M)	10,0 g/L Mannitol, 9,4 g/L Glukose Monohydrat, 4,2 g/L Natriumchlorid, 1,4 g/L Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat, 1,3 g/L Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat, 408,0 mg/L Guanosin, 194,0 mg/L Adenin gelöst in <i>aqua ad iniectabilia</i> und vermischt mit 10,0 mL/L CPD-Stabilisator
58.	SulfoLink™ Lagerungspuffer	10,0 mM Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz gelöst in ddH ₂ O, vermischt mit 50,0 % (v/v) Glycerin und 5,0 ‰ (w/v) Natriumazid.

Nr.	Pufferbezeichnung	Zusammensetzung
59.	Transferpuffer	849,0 mL ddH ₂ O vermischt mit 100,0 mL Methanol, 50,0 mL <i>Invitrogen™ NuPAGE™</i> Transferpuffer und 1,0 mL <i>Invitrogen™ NuPAGE™</i> Antioxidans.
60.	TSB	17,0 g/L pankreatisch verdautes Pepton aus Casein, 5,0 g/L Natriumchlorid, 3,0 g/L durch Papain verdaute Soja aus Pepton, 2,5 g/L D-Glukose und 2,5 g/L Dikaliumhydrogenphosphat gelöst in ddH ₂ O.
61.	Verdauungspuffer	10,0 mM Ammoniumhydrogencarbonat gelöst in ddH ₂ O, vermischt mit 10,0 % (v/v) wasserfreiem Acetonitril und 1,0 % (v/v) <i>ProteaseMAX™</i> Tensid.
62.	Waschpuffer-Formulation 1	1,0 M Natriumchlorid, 50,0 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan und 5,0 mM Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat gelöst in ddH ₂ O und mit Natriumhydroxid auf einen pH von 8,5 eingestellt.
63.	Waschpuffer-Formulation 2	1,0 M Natriumchlorid gelöst in <i>PBS</i> .
64.	α-Bromisobuttersäurebromid-Lösung	4,6 g α-Bromisobuttersäurebromid in wasserfreiem Dichlormethan.

8.1.8 Bakterienstämme

Tabelle 56: Auflistung aller in der Dissertation verwendeten Bakterienstämme.

Bakterienstämme			
Nr.	Kennzeichnung	Art, Gattung und Stamm	Bezugsort
1.	101L_01602 (101L)	<i>Staphylococcus aureus</i> sp.	klinischer Stamm aus der Abteilung für medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Heidelberg
2.	168L_00586 (168L)	<i>Staphylococcus aureus</i> sp.	klinischer Stamm aus der Abteilung für medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Heidelberg
3.	282L_01373 (282L)	<i>Staphylococcus aureus</i> sp.	klinischer Stamm aus der Abteilung für medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Heidelberg

Nr.	Kennzeichnung	Art, Gattung und Stamm	Bezugsort
4.	ATCC® 25904™	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus Rosenbach	ATCC
5.	USA300	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus Rosenbach	kommunaler Stamm aus der Abteilung für medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Heidelberg
6.	DSM 402	<i>Bacillus subtilis</i> (Ehrenberg 1835) Cohn 1872	DSMZ
7.	DSM 498	<i>Escherichia coli</i> (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919	DSMZ
8.	KE2775_01373 (KE2775)	<i>Staphylococcus aureus</i> spec.	klinischer Stamm aus der Abteilung für medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Heidelberg
9.	RGB-S Reporter	<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655	gespendet von Ahmed Zoheir vom Institut für biologische Grenzflächen 1 am KIT
10.	Stratagene #200158	<i>Escherichia coli</i> XL1- Blue-MRF	Agilent Technologies
11.	<i>Synechocystis</i> spec.	<i>Synechocystis</i> spec. PCC6803	aus der Kultursammlung von P. V. Shestakov, gespendet von Annegret Wilde aus der Abteilung für Molekulare Genetik der Prokaryoten an der Universität Freiburg

8.1.9 Humanmaterial und Ethik

Im Rahmen des Ethikantrags S103/2019 wurden Blutseren und Vollblut von freiwilligen Spendern der Abteilung für medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Heidelberg dazu genutzt um Antikörper und Primärzellen zur experimentellen Anwendung zu gewinnen. Ebenso wurden die Blutseren aus diesem Antrag zusammen mit Patientenseren aus den Ethikanträgen 145/2009BO2 und 508/2012BO2 zu analytischen Zwecken als Primäntikörper in Substitutionsanalysen eingesetzt.

In der Anwendung des OPTA wurden neutrophile Promyelozyten der *HL-60* Zelllinie von *cell lines service* (Bestellnummer 300209) erworben.

Als Analyt in der hydrostatischen Befüllung von mikrostrukturierten Glasträgern wurden Human-Erythrozyten aus einem Erythrozytenkonzentrat zur intravenösen Infusion eines anonymen Spenders verwendet. Nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums wurde das Erythrozytenkonzentrat vom städtischen Klinikum Karlsruhe zu Forschungszwecken freigegeben. Das Konzentrat besitzt einen Hämatokriten von 0,5 bis 0,7 L/L und ein Leukozytengehalt von weniger als 1,0 Mio. pro Packungseinheit. Zur Stabilisierung der Erythrozyten ist das Konzentrat in 0,3 bis 0,4 L/L PAGGS-M suspendiert.

8.1.10 Verwendete Computerprogramme

In diesem Kapitel sind alle Computerprogramme aufgelistet, welche zusätzlich zu den gerätespezifischen Programmen in der Arbeit verwendet werden.

Eine ANOVA nach Tukey^[1391] wird durch *Origin* von *OriginLab* ermöglicht.

Der *PepSlide*[®] Analyzer von *PEPperPRINT* GmbH wird zur Auswertung von durch Immunfärbung markierte *PEPperCHIP*[®] Peptid-Mikroarrays eingesetzt.

Image Processing and Analysis in Java (ImageJ) von *National Institutes of Health*^[1395] wird dazu verwendet um Messdaten aus photographischen und gescannten Bildern zu generieren.

Über das *BLAST* von *National Center for Biotechnology Information* werden Peptidsequenzen mit globalen Datenbanken verglichen.

Zur Darstellung der Messdaten des *Innoscan 1100 AL* als Box-Plots wird das Programm *Statistical Analysis Software Enterprise Guide* von *Statistical Analysis Software Institute Incorporated* verwendet.

8.2 Präparation und Analytik von Proteinen und Peptiden

8.2.1 Affinitätschromatographie durch Epitop-Paratop-Koppelung ^[1473-1475]

8.2.1.1 Serumextraktion

Die Seren werden in der Abteilung für medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Heidelberg von freiwilligen Spendern unter ärztlicher Aufsicht durch ein Blutentnahmesystem in eine *S-Monovette*[®] abgenommen. Von jeder freiwilligen Person wird hierbei 7,5 mL Serum entnommen. Nach einer kurzen Sedimentationszeit wird es in ein steriles konisches Gefäß mit 15,0 mL Volumen übertragen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Zur Vorbereitung eines Serums für die Extraktion werden 2,5 mL der Flüssigkeit mit einer *NAP*[™]-25-*Pharmacia-Biotech* Säule entsprechend dem Herstellerprotokoll behandelt. Hierbei wird die Flüssigkeit, in welche die Serumbestandteile gelöst sind, getauscht und schlussendlich in 2,5 mL *PBS* gelöst.

8.2.1.2 Vorbereitung der stationären Phase

Als stationäre Phase für die Affinitätschromatographie wird das *SulfoLink*[™] Kupplungsharz vorbereitet. Zur Vorbereitung werden leere Hülse einer *Zeba*[™] *Spin* Entsalzungssäule mit 2,0 mL Volumen durch Stativstangen vertikal befestigt und jeweils 2,0 mL von dem in *SulfoLink* Lagerungspuffer aufgeschlammten Harz in die Säulen transferiert. Durch Gravitation werden die Säulen im Verlauf der Zeit entwässert.

In Reaktionsgefäßen werden jeweils 1,0 µg von den entsprechenden Peptiden in 2,0 mL Kupplungspuffer gelöst. Jede Lösung wird komplett in jeweils eine eingespannte Säule auf das Säulenbett aus Harz pipettiert. Anschließend werden die Säulen für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 15 UpM über Kopf rotiert, 30 Minuten sedimentiert und danach erneut eingespannt und entwässert. Nach der Entwässerung wird jede Säule mit jeweils 4,0 mL Kupplungspuffer gespült und anschließend mit 1,0 mL Abschreckpuffer befüllt. Dann werden sie für 15 Minuten bei Raumtemperatur und mit einer Geschwindigkeit von 15 UpM über Kopf rotiert, 30 Minuten sedimentiert und anschließend erneut eingespannt und entwässert. Der Entwässerung folgt ein Waschschrift. Dabei werden die Säulen mit jeweils 6,0 mL Waschpuffer-Formulation 1 gespült. Zum Abschluss werden 2,0 mL Lagerungspuffer auf jedes Säulenbett pipettiert und diese durch Invertieren der Säulen aufgeschlammmt. Der Schlamm aus den Säulen entspricht jetzt jeweils einer stationären Phase für die Affinitätschromatographie und wird zur Lagerung jeweils in die leere Hülse einer *NAP*[™]-25-*Pharmacia-Biotec* Säule gefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

8.2.1.3 Affinitätschromatographie

Als Kontaktraum für stationäre mit der mobilen Phase werden für jede Aufreinigung eine leere Säulenhülse einer *Zeba™ Spin* Entsalzungssäule mit 5,0 mL Volumen mit Stativstangen vertikal eingespannt. Die stationären Phasen werden in der *NAP™-25-Pharmacia-Biotec* Säulenhülse durch invertieren aufgeschlämmt. Von jedem aufgeschlämmten Harz werden jeweils 175,0 µL in die entsprechend eingespannte Säulenhülse pipettiert und diese anschließend entwässert. Alle Säulen werden danach mit 2,0 mL Lagerungspuffer gewaschen und schließlich mit jeweils 5,0 mL Serum befüllt. Das Serum entspricht hierbei der mobilen Phase und wird zur Interaktion mit den stationären Phasen in den Säulen für 18 Stunden bei 4 °C und bei einer Geschwindigkeit von 15 UpM über Kopf rotiert. Nach der Inkubationszeit werden die Säulen durch Stativstangen vertikal fixiert und entwässert. Alle Säulen werden dann mit 5,0 mL Waschpuffer-Formulation 1 gespült und mit 100,0 µL Waschpuffer-Formulation 2 aufgefüllt und aufgeschlämmt. Von diesem Waschschrift werden 200,0 µL Flüssigkeit für weitere Analyse Zwecke gesammelt (DL 1). Der Schlamm in den Säulen wird anschließend in jeweils eine *NAP™-5-Pharmacia-Biotec* Säule übertragen, entwässert und mit 200,0 µL Waschpuffer-Formulation 2 gewaschen. Dabei werden 200,0 µL des Waschpuffers von jeder Säule für Analyse Zwecke in einem konischen Gefäß aufgefangen (DL 2).

8.2.1.4 Elution der spezifischen Antikörper

Zur Elution werden drei konische Gefäß mit 1,5 mL Volumen für jede Säule vorbereitet und eines von diesen wird zum Auffangen des Eluats unter jeder Säule platziert. In jede Säule werden 150,0 µL des Elutionspuffer-Formulation 1 pipettiert. Die Flüssigkeit wird in den Gefäßen für fünf Minuten inkubiert und nach Ablauf der Zeit wird diese erste Fraktion von beiden Säulen in die Auffanggefäße entleert. Es folgt eine sofortige Zugabe von 25,0 µL Neutralisierungspuffer für die entleerte Fraktion aus jeder Säule. Diese Elution wird wiederholt, bis für alle Säulen jeweils drei Fraktionen vorhanden sind. Jede Fraktion wird durch Zugabe von Natriumazid auf einen Gehalt von 2,0 ‰ (w/v) dieser Substanz gebracht und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

8.2.2 Herstellung von Bakterienlysat aus Bakterien ^[609]

Es werden vier entsprechend dem Kapitel 8.4.1.1 „*Staphylokokken und Bacillus subtilis*“ vorbereitete Bakterienkulturen von jeweils 101L, 168L, 282L, *ATCC® 25904™*, *DSM 402*, *KE2775* und *USA300* zentrifugiert, der Überstand verworfen und jedes Gefäß mit 5,0 mL *DPBS*-minus aufgefüllt. Der Inhalt von Übernachtskulturen mit dem gleichen Bakterienstamm wird in einem Gefäß vereint, erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und jedes Bakterienpellet in 20,0 mL *DPBS*-minus resuspendiert. Die Gesamtbakterienzahl wird durch Messung des Trübungswerts mit Hilfe des *DensiCHEK plus* Densitometers bestimmt. Von

jedem Bakterienstamm werden 28,0 Mrd. Bakterien in ein steriles konisches Gefäß übertragen. Dieses wird anschließend zentrifugiert, fünf Minuten invertiert auf einem Tuch getrocknet und anschließend in 80,0 µL Extraktionspuffer resuspendiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Jede Zentrifugation wird für zehn Minuten bei 7700 RZB gefahren.

8.2.3 Präparation und Analyse von Proteinen

8.2.3.1 LDS-PAGE ^[1476]

Als Gel für die Elektrophorese werden 1,0 mm dicke *Invitrogen™ NuPAGE™* 4,0 bis 12,0 %ige Bis-Tris-Gelkassetten mit zwölf oder 15 Taschen verwendet. Proben werden entsprechend der Tabelle 57 vorbereitet. Bei Versuchsansätzen unter nicht-reduzierenden Bedingungen wird die Zugabe des Reduzierungsreagenzes übersprungen. Vor der Zugabe in die Geltaschen werden alle Proben für zehn Minuten auf einem Thermoschüttler bei 70 °C denaturiert und anschließend bei 13 000 RZB zentrifugiert. Eine Gelkassette wird in das *XCell SureLock™ Mini-Cell* Elektrophorese-System gespannt und sowohl die innere als auch die äußere Kammer mit dem jeweiligen Puffer (Tabelle 52 Nr. 5. und 33) aufgefüllt. Nach Befüllung der Geltaschen mit den Proben und 3,0 µL des vorgefärbten Proteinstandards *SeeBlue™ Plus2* durch eine *1700 Series Gastight™* Spritze wird die Elektrophorese für 35 Minuten bei 200 V und 500 mA durchgeführt. Zur weiteren Prozessierung werden die Gele entweder durch einen *Western Blot* auf eine *Immobilion®-FL* Membran aus PVDF übertragen oder durch eine Färbung mit *Coomassie®-Brillant-Blau* eingefärbt.

Tabelle 57: Die Probenkonsistenz der für die LDS-PAGE designierten Proben ist von dem jeweiligen Analyten abhängig. Letztendlich erreicht jede Probe ein Volumen von 20,0 µL.

Probenzusammensetzung für die LDS-PAGE	
Volumen	Reagenz
5,0 µL	<i>Invitrogen™ NuPAGE™</i> Probenpuffer (vierfach konzentriert)
0,0 bis 2,0 µL	<i>Invitrogen™ NuPAGE™</i> Probenreduktionsmittel (zehnfach konzentriert)
1,0 bis 15,0 µL	Proben mit Angabe in Gewicht (G), [KbE] oder Volumen (V):
	für <i>Coomassie®</i> -Brillant-Blau-Färbung
	10,0 µL des Eluats/der stationären Phase/des Durchlaufs oder 6,0 % des gesamten Eluats/der gesamten stationären Phase/des gesamten Durchlaufs
	3,2 Mrd. KbE von Bakterien
	1,0 bis 2,0 µg BSA
	1,0 µg rekombinantes Emp
	für <i>Western Blot</i>
	2,0 bis 4,0 µL Eluat/Durchlauf/stationäre Phase
	15,0 µL Serum in einer Verdünnung von 1:20 bis 1:200
	1,8 Mrd. KbE von Bakterien
	16,0 ng bis 50,0 ng rekombinantes Emp
	200,0 ng BSA
	50,0 ng menschliches ApoA1
	mit ddH ₂ O auf 20,0 µL auffüllen

8.2.3.2 Färbung mit *Coomassie®*-Brillant-Blau ^[1476]

Die *Coomassie®*-Brillant-Blau-Färbelösung wird nach der Publikation von Kang *et al.* (2002) ^[1477] hergestellt. Polyacrylamid-Gele werden zur Vorbereitung für die Färbung dreimal für zehn Minuten in ddH₂O gewaschen. Nach den Waschschrinen werden die Gele mindestens drei Stunden in der Färbelösung inkubiert. Gefärbte Gele werden durch den *CanoScan 9000F* digitalisiert.

8.2.3.3 *Western Blot* ^[1478-1480]

Der Transfer der Proteine auf eine *Immobilon®-FL* PVDF Membran wird mit dem *XCell II* Blotmodul innerhalb des *XCell SureLock™ Mini-Cell* Elektrophorese-System ermöglicht. Zunächst wird die Membran auf eine Fläche von 8,5 x 7,5 cm² zugeschnitten, in Methanol eingelegt, dreimal mit ddH₂O gespült und in Transferpuffer übertragen. Vier *E-PAGE™* Blotting-Schwämme, zwei *GB-001* Gel-Blotting-Papiere und das Polyacrylamid-Gel werden in Transferpuffer getränkt und zusammen mit dem Gel und der Membran zu einem Blotting-

Sandwich assembliert, welches in das Blotmodul eingesetzt wird. Das Modul wird in das Elektrophorese-System eingebaut und mit Transferpuffer befüllt. Nach dem Befüllen der äußeren Wanne mit 650,0 mL ddH₂O wird für 90 Minuten eine Spannung von 30 V bei einer Stromstärke von 500 mA angelegt. Nach dem Transfer wird die Membran bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die von der Membran absorbierten Proteine werden folgend mit *Ponceau S* eingefärbt, dokumentiert, entfärbt und anschließend per Immunfärbung ausgewertet.

8.2.3.4 Ponceau S-Färbung ^[1481]

Der Proteingehalt jedes *Western Blots* wird vor der Sekundärfärbung durch eine *Ponceau S*-Färbung bestätigt. Die Zusammensetzung der *Ponceau S*-Fixierlösung und die Färbung der Membran werden gemäß der Publikation nach Salinovich und Montelaro (1986) durchgeführt. Gefärbte Membranen werden durch ein kamerafähiges Mobiltelefon oder den *CanoScan 9000F* digitalisiert und anschließend entfärbt. Bei der Entfärbung, ebenfalls nach Salinovich, wird anstelle von destilliertem Wasser das Gel so lange mit Equilibrierungspuffer gewaschen, bis keine Färbung mehr sichtbar ist.

8.2.4 Herstellung von Peptidarrays ^[46,1482-1484]

Ein 3D-Maleimide Glasträger wird in einer *PEPperCHIP*[®] Inkubationsschale in 16er-Konfiguration fixiert. Danach werden jeweils 300,0 nL einer 100,0 µM Peptidlösung in ddH₂O (**Emp-C2**, Hämagglutinin-C, Poliomyelitis-C) in jeweils eine Ecke von jedem Reaktionsraum der Inkubationsschale pipettiert. Anschließend wird der Glasträger aus der Inkubationsschale genommen und für zwei Minuten mit Reduktionspuffer benetzt. Nach der Inkubationszeit wird der Träger jeweils drei Minuten lang zunächst mit *PBS* und dann mit ddH₂O gewaschen. In den darauffolgenden Schritten wird der gespottete Träger nacheinander jeweils fünf Minuten in Protonierungspuffer, Entschützungslösung, dreimal in Dimethylformamid und zweimal drei Minuten in Methanol inkubiert. Der Prozess wird abgeschlossen, indem der Glasträger unter einem Strom aus Argongas getrocknet und bis zur weiteren Verwendung im gleichen Gas bei 4 °C gelagert wird. Alle Wasch- und Inkubationsschritte werden auf einem Wippschüttler mit einer Umdrehungszahl von 10 UpM durchgeführt.

8.2.5 Immunfärbung

8.2.5.1 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen ^[1485]

Mit Hilfe von drei Konjugationssets von *abcam*[®] werden die in Tabelle 58 dargestellten Proteine mit Fluorophoren markiert. Die Markierung wurde streng nach der Vorschrift des jeweiligen Sets durchgeführt.

Tabelle 58: Alle durch Konjugationssets mit Fluorophor markierte Proteine.

Fluoreszenzmarkierung durch kommerzielle Konjugationssätze	
Protein	Konjugationsset
Anti-ApoA1 DyLight® 680	Lightning-Link® Rapid DyLight® 680
Anti-λ DyLight® 680	Lightning-Link® Rapid DyLight® 680
Anti-IgG ₁ DyLight® 680	Lightning-Link® Rapid DyLight® 680
Anti-IgG ₂ DyLight® 800	Lightning-Link® Rapid DyLight® 800
Anti-IgG ₃ DyLight® 800	Lightning-Link® Rapid DyLight® 800
Anti-IgG ₄ DyLight® 680	Lightning-Link® Rapid DyLight® 680
ApoA1 DyLight® 800	Lightning-Link® Rapid DyLight® 800

8.2.5.2 Immunfärbung von PVDF-Membranen ^[1479,1486,1487]

Die auf der PVDF-Membran absorbierten Proteine werden für fünf Minuten in Equilibrierungspuffer gequellt und anschließend für eine Stunde mit Blockierungspuffer gesättigt. Nach einer Waschprozedur wird der *Western Blot* mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Sobald die Inkubationszeit zu Ende ist, folgen eine weitere Waschprozedur und eine Markierung der Analyten mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde unter Ausschluss von Licht. Die Markierung wird von einer letzten Waschprozedur abgeschlossen und die PVDF-Membran wird, nachdem sie vollständig getrocknet ist, mit dem *Odyssey Classic Imaging System* ausgewertet. Bei der Färbung von Antikörpern als Analyt wird keine Färbung mit einem Primärantikörper benötigt und der Schritt kann inklusive der nachfolgenden Waschprozedur übersprungen werden. Die Waschprozedur besteht aus insgesamt vier Waschsritten, in welcher die Membran jeweils 3 Minuten lang in Färbepuffer gewaschen wird. Alle Arbeitsschritte werden auf einem Orbitalschüttler durchgeführt, welcher mit einer Geschwindigkeit von 140 UpM rotiert. Die Auswahl von Blockierungsreagenz, Färbepuffer, Primärantikörper und Sekundärantikörper ist abhängig von der individuell durchgeführten LDS-PAGE und ist der Tabelle 59 zu entnehmen.

Tabelle 59: Alle in Kombination verwendeten Blockierungsreagenzien, Färbepuffer sowie für die Primär- und Sekundärfärbung eingesetzten Antikörper, dargestellt im Zusammenhang mit dem jeweiligen Experiment.

Western Blot Immunfärbung				
Versuch	Blockierungsreagenz	Färbepuffer (Tabelle 55)	Primärantikörper (Tabelle 53)	Sekundärantikörper (Tabelle 53)
Affinität von <i>scFvs</i> gegen Emp	Tabelle 52 Nr. 5	Nr. 25	Serum FS2 (1:500) und Nr. 20 bis 25 (10,0 µg/mL)	Nr. 8 und Nr. 13 (1:5000)
Kontrollfärbung	Tabelle 52 Nr. 5	Nr. 25	-	Nr. 8 (1:5000)
Kotrollfärbung mit Hasenserum	Tabelle 55 Nr. 7	Nr. 26	-	Nr. 8 (1:5000)
LES20_C1 und LES7_C5 gegen Bakterienlysat	Tabelle 55 Nr. 7	Nr. 26	Nr. 21 und 24 (10,0 µg/mL)	Nr. 8 (1:5000)
Markierung von Anti- Emp	Tabelle 52 Nr. 5	Nr. 25	-	Nr. 7 und 18 (1:5000)
Markierung von ApoA1	Tabelle 55 Nr. 7	Nr. 26	Serum FS2 (1:500)	Nr. 3 (1:1000)
Nachweis von Emp <i>in vitro</i>	Tabelle 52 Nr. 5	Nr. 25	Nr. 18 (1:500)	Nr. 13 (1:5000)
Nachweis von Emp <i>in vitro</i> (alternativ)	Tabelle 52 Nr. 5	Nr. 25	Nr. 18 (1:500)	Nr. 8 (1:5000)
Nachweis von Emp <i>in vitro</i> (optimiert)	Tabelle 55 Nr. 8	Nr. 26	Nr. 27 (1:500)	Nr. 8 (1:5000)

8.2.5.3 Immunfärbung von Peptidarrays ^[41]

PEPperCHIP[®] Peptid-Mikroarrays werden entsprechend ihrer Konfiguration in eine passende *PEPperCHIP*[®] Inkubationsschale gespannt. 3D-Maleimide Glasträger werden ausschließlich in Inkubationsschalen mit 16er-Konfiguration fixiert. Alle zur Färbung durch die Inkubationsschale designierten Kammern werden zehn Minuten mit Equilibrierungspuffer gequellt, anschließend 30 Min lang mit *Rockland*-Puffer gesättigt und daraufhin dreimal jeweils eine Minute lang mit Färbepuffer-Formulation 1 gewaschen. Nach den Waschsritten wird die Primärantikörperlösung oder das Primärreagenz in Färbepuffer-Formulation 1 aufgetragen

und entweder zwei Stunden oder bei 4 °C über Nacht inkubiert. Der Inkubation folgen drei weitere Waschschrte mit Färbepuffer-Formulation 1 für jeweils eine Minute. Die Immunfärbung wird danach durch eine Inkubation der Flächen mit der Sekundärantikörperlösung in Färbepuffer-Formulation 1 unter Ausschluss von Licht für eine Stunde, gefolgt von drei weiteren Waschrten für jeweils eine Minute, abgeschlossen. Der Array wird nach der Färbung kurz in ddH₂O getaucht und durch einen Gasstrom aus Kohlenstoffdioxid getrocknet. Getrocknete mit *DyLight*[®] 680 oder *DyLight*[®] 800 markierte Arrays werden durch das *Odyssey Classic Imaging System* analysiert und digitalisiert. Peptidarrays, welche mit einem anderen Fluorophor markiert sind, werden durch den Fluoreszenzscanner *Innoscan 1100 AL* gescannt und digitalisiert. Wenn der Primärantikörper oder das Primärreagenz direkt mit einem Fluorophor konjugiert ist, können die Färbung mit dem Sekundärantikörper und der zugehörige Waschschrte übersprungen werden. Alle Wasch- und Inkubationsschrte werden auf einem Orbitalschüttler mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 140 UpM durchgeführt. Das Flüssigkeitsvolumen pro Kammer ist abhängig von der entsprechenden *PEPperCHIP*[®] Inkubationsschale. Bei der Fünfer-Konfiguration werden 400,0 µL und bei der 16er-Konfiguration 200,0 µL eingesetzt. Welche Proteine für die Primär- und Sekundärantikörperfärbung eingesetzt werden, ist der Tabelle 60 zu entnehmen.

Tabelle 60: Alle Arrayfärbungen mit der entsprechenden Angabe von Primär- und Sekundärantikörper, welche in den Färbelösungen verwendet wurden.

Immunfärbung von Peptidarrays		
Versuch	Primärantikörper oder -reagenz	Sekundärantikörper (Tabelle 53)
Analyse von <i>scFv-Fcs</i> mit Sekundärfärbung	Serum FS2 (1:500) und Tabelle 53 Nr. 20 bis 25 (10,0 µg/mL)	Nr. 8 (1:5000)
Bestimmung des IgG -Subtyps	Tabelle 53 Nr. 18 (1:1000)	Nr. 8 und Nr. 13 bis 16 (1:1000)
Eluate aus Affinitätschromatographien	Diverse Seren (1:500) und Tabelle 53 Nr. 18 (variierend)	Nr. 7 und 8 (1:5000)
Kontrolle von ApoA1	ApoA1 DyLight® 800 (10,0 µg/mL)	-
Kontrolle von HKS, FKS und IgG Hase	Serum FS3, Tabelle 52 Nr. 24, Nr. 40 (1:200) und Nr. 51 (400,0 µg/mL)	Nr. 1, Nr. 2 und Nr. 8 (1:5000)
Substitutionsanalysen von Seren	Serum (1:100)	Nr. 7 und 8
κ-λ-Färbung	Serum (1:200)	Nr. 9 (1:1000) und Nr. 10 (1:750)

8.2.5.4 Immunfärbung von immobilisierten *Staphylokokken*^[1488]

Der Fixierpuffer wird aus allen Kammern eines Glasträgers mit immobilisierten *Staphylokokken* entfernt und jede Kammer mit 200,0 µL Equilibrierungspuffer befüllt, für zehn Minuten inkubiert, der Puffer durch 200,0 µL Blockierungspuffer-Formulation 2 ausgetauscht und der Glasträger für 30 Minuten gesättigt. Jede Kammer wird nach dem Blockierungsschritt dreimal jeweils eine Minute lang mit 200,0 µL Färbepuffer-Formulation 3 gewaschen. Als Primärfärbung wird jeweils Anti-**Emp** in einem Verhältnis von 1:500 und Anti-**Myc** mit einer Konzentration von 15,0 µg/mL in Färbepuffer-Formulation 3 vorbereitet. Von jedem Bakterienstamm wird jeweils eine Kammer mit 200,0 µL des jeweiligen Primärantikörpers befüllt und der gesamte Glasträger wird bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dieser Inkubation wird jede Kammer drei weitere Male jeweils eine Minute lang mit Färbepuffer-Formulation 3 gewaschen. Anschließend werden die mit Primärantikörper inkubierten Kammern und jeweils eine weitere Kammer von jedem Bakterienstamm mit Anti-**IgG** H +L XFD350 in einem Verhältnis von 1:1000 in Färbepuffer-Formulation 3 unter Ausschluss von Licht für eine Stunde markiert. Nach der Markierung wird jede Kammer dreimal für jeweils eine Minute mit Färbepuffer-Formulation 3 gewaschen. Abschließend wird die Dichtung von dem Glasträger

abgezogen, der gesamte Glasträger kurz in ddH₂O getaucht, durch einen Gasstrom aus Kohlenstoffdioxid getrocknet und mit dem *Eclipse Ti* ausgewertet. Hierbei wird der Filter Nr. 1 aus Tabelle 43 verwendet. Alle Wasch-, und Inkubationsschritte werden auf einem Orbitalschüttler mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 140 UpM durchgeführt.

8.2.6 MS Analyse von Antikörpern

8.2.6.1 Fällung und Präparation des Anti-Emp-Antikörpers

Eine Elution des Anti-**Emp**-Antikörpers wird durch eine Methanol-Chloroform-Fällung nach Wessel und Flügge (1984)^[1489] von Unreinheiten befreit. 2,0 µL werden anschließend in dreifacher Ausführung durch eine präparative, nicht-reduzierende LDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt und mit *Coomassie*[®]-Brillant-Blau eingefärbt. Die Banden für vollständige und fragmentierte Antikörper sowie einzelne leichte Ketten werden anhand des Molekulargewicht entsprechend der Publikation von Liu *et al.* (2007)^[1392] identifiziert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Jedes so erzeugte Fragment wird in ein Eppendorf Tube mit einem Volumen von 1,5 mL übertragen.

Zur Entfärbung der Gelfragmente wird jedes Gefäß mit 100,0 µL einer 100,0 mM Ammoniumhydrogencarbonat in einer 1:1 Mischung aus ddH₂O und wasserfreiem Acetonitril befüllt und 30 Minuten unter gelegentlichem vortexen bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden weitere 500,0 µL wasserfreies Acetonitril hinzugefügt und bei Raumtemperatur inkubiert, bis die Gele geschrumpft und ohne Farbe sind.

8.2.6.2 Enzymatischer Verdau der Antikörper^[1490]

Es werden jeweils 20,0 µg Chymotrypsin Protease, **Glu-C** und Trypsin Protease in 1,5 mL Verdauungspuffer gelöst. Anschließend werden jeweils drei Gelfragmente mit 50,0 µL von jeweils einer der drei resultierenden Lösungen benetzt und in den folgenden 30 Minuten von den Gelfragmenten absorbiert. Jede Lösung wird aufgefüllt, sodass alle Gelfragmente komplett mit Flüssigkeit bedeckt sind. Nach 90 Minuten wird jeder Lösung 20,0 µL Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer beigemischt und die Gefäße werden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird in jedes Gefäß 100,0 µL Peptid-Extraktionspuffer pipettiert und die Peptide werden für 15 Minuten bei 37 °C aus dem Gel extrahiert. Der Überstand wird anschließend in einem konischen Gefäß mit 1,5 mL Volumen übertragen und in einer vakuumfähigen Zentrifuge bei 6700 RZB getrocknet. Das getrocknete Pellet wird in 20,0 µL MS-Puffer gelöst, fünf Minuten lang gevortext und 15 Minuten lang bei 6700 RZB zentrifugiert.

8.2.6.3 Flüssigchromatographie mit Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer ^[1491,1492]

Alle Proben werden mit einem Volumen von 5,0 µL in der Säule bei einer Temperatur von 40 °C durch einen Gradienten von 3,0 % zu 60,0 % *UPLC*-Puffer B in *UPLC*-Puffer A im Verlauf von 30 Minuten bei einer Fließgeschwindigkeit von 200,0 µL/Minute aufgetrennt. Nach der Reinigung durch *UPLC* werden die Proben in der MS im positiven Ionenmodus bei einer Kapillarspannung von 4500 V und einer Trockengaszufuhr bei 200 °C von 9,0 L/Minute und einem Verneblerdruck von 1,4 Bar in kleine Tröpfchen verwandelt und beschleunigt. Die Messung wird auf eine Massenspanne von 150-2200 m/z bei einer Spektralrate von 5 und 3 Hz durchgeführt. Das Programm *PEAKS DB* erlaubt eine Zuordnung der MS-Daten der Peptidfragmente zu bekannten Isotypen von Antikörperketten.

Alle Materialien, Geräte, Reagenzien und Protokolle wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Carsten Hopf am Institut für Instrumentelle Analytik und Bioanalytik der Hochschule Mannheim zur Verfügung gestellt.

8.2.7 *In-vitro*-Selektion des Emp-Antigens durch humanes Phagen-Display ^[1317]

Als stationäre Phase werden die Peptide *eBio*-GGS₂-Emp15, *eBio*-GGS₂-Emp9, *eBio*-β₅-Emp15, *eBio*-β₅-Emp9 nach Hust *et al.* (2007 ^[1493], 2009 ^[1494], 2011 ^[1494]) auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte fixiert. Anschließend wird die Mikrotiterplatte für das Panning von einer nach Hust *et al.* (2009 ^[1494], 2011 ^[1495]) erzeugten Bibliothek aus 1,0 Bill. *scFvs* aus naiven B-Zellen gescreent, welche in von Rondot *et al.* (2001) ^[1496] beschriebenen Hyperphagen verpackt sind. Treffer im Panning werden entsprechend Schütte *et al.* (2009) ^[1497] durch einen *ELISA* verifiziert und bioinformatisch nach Mollova *et al.* (2010) ^[1498] auf einzigartige genetische Sequenzen begrenzt. Diese einzigartigen Sequenzen werden nach Hust *et al.* (2011) ^[1495] in *Stratagene* #200158 kloniert, die entsprechenden *scFvs* von dem Bakterium exprimiert und durch immobilisierte Metallaffinitätschromatographie aufgereinigt.

Das Phagen-Display und die Auswahl geeigneter *scFvs* wurden von Prof. Dr. Michael Hust, Saskia Polten und Stephan Steinke in der Abteilung für Biotechnologie an der TU Braunschweig durchgeführt. Die resultierenden *scFvs* LES20_A7, LES20_C1, LES20_C9, LES20_D8, LES7_C5 und LES7_C8 wurden durch *Western Blot* und Immunfärbung auf Peptidarrays analysiert.

8.3 Zellbiologische Experimente

8.3.1 Kultivierung und Differenzierung von *HL-60* Zellen

8.3.1.1 Kultivierung von *HL-60* Zellen ^[1499]

Die kryokonservierten Zellen werden entsprechend der Herstellerangaben in eine aktive Kultur umgesetzt. Proliferierende *HL-60* Zellen werden drei Tage lang bei 37 °C bei einer Kohlenstoffdioxidkonzentration von 5,0 % (v/v) in 20,0 mL Kulturmedium für *HL-60* Zellen innerhalb einer Zellkulturflasche kultiviert. Nach der Inkubationszeit werden Zellkulturen in Subkulturen aufgespalten, indem jeweils 10,0 mL der Zellkultur mit 10,0 mL Kulturmedium in einer neuen Zellkulturflasche vermischt wird.

8.3.1.2 Differenzierung von *HL-60* Zellen zu aktiven neutrophilen Granulozyten ^[157]

Eine *HL-60* Zellkultur wird nach drei Tagen für acht Minuten bei 136 RZB zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in 20,0 mL Differenzierungsmedium für *HL-60* Zellen resuspendiert, in eine Kulturflasche überführt und drei bis vier Tage lang bei 37 °C bei einer Kohlenstoffdioxidkonzentration von 5,0 % (v/v) kultiviert.

8.3.1.3 Zellzahlbestimmung durch Trypanblau-Färbung ^[1500-1502]

Für die Zählung der Zellen wird 10,0 µL Zellsuspension in eine Kavität einer beliebigen 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und mit 90,0 µL einer 4,0 ‰igen (v/v) Trypanblau-Lösung vermischt. Von dieser Mischung werden 10,0 µL in eine *Neubauer improved* Zählkammer aufgetragen und mit dem invertierten *AE20* Phasenkontrastmikroskop ausgezählt.

8.3.1.4 Evaluierung der Zelldifferenzierung ^[162,1503,1504]

Zweimal 1,0 mL differenzierte und undifferenzierte Zellen werden in konische Gefäße mit 1,5 mL Volumen übertragen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Jeweils ein Pellet von undifferenzierten und differenzierten Zellen werden mit 5,0 µL Anti-**CD35 PE** und Anti-**CD71 APC** vermischt, alle Pellets für 25 Minuten bei 4 °C gelagert und anschließend in 1,0 mL *DPBS*-minus resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wird der Überstand erneut verworfen und alle Pellets in 250,0 µL *DPBS*-minus resuspendiert und durch *FACS* ausgewertet. Mit dem Programm *FACSDiva™* werden differenzierte und undifferenzierte Zellen anhand von Vorwärts- und Seitwärtstreulicht identifiziert und durch *Gating* werden differenzierte Zellen für die Analyse ausgewählt. Die Untergrenze für erfolgreich mit Anti-**CD71 APC** markierte Zellen wird bei ~125,0 RF festgelegt. Für Anti-**CD35 PE** markierte Zellen beträgt diese Untergrenze 70,0 RFU. Zellen werden bei jeder Zentrifugation acht Minuten bei 360 RZB und 4 °C zentrifugiert.

8.3.2 FACS von peripheren mononukleären Blutzellen

8.3.2.1 Blutentnahme und Lyse von Erythrozyten ^[1505,1506]

Es wird 7,0 mL Vollblut von einem freiwilligen Spender ärztlich unter der Ethiknummer S103/2019 in *S-Monovetten* mit Lithium-Heparin-Gel entnommen. Zur Lyse der roten Blutkörperchen wird für jeden Ansatz 1,0 mL des Blutes mit 10,0 mL *eBioscience*[™] 1x Lysepuffer für rote Blutkörperchen vermischt, gevortext, zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für acht Minuten bei 1300 RZB zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand von jedem Ansatz verworfen und das Pellet je nach Versuch mit 100,0 µL *DPBS*-minus resuspendiert.

8.3.2.2 Markierung von biotinylierten Peptiden durch fluoreszierendes

Avidin ^[1427,1507,1508]

Es werden 4,0 nmol der Peptide *eBio*-GG₂-Emp9 und *eBio*-βA₅-Emp9 in einem molaren Verhältnis von 9:1 mit *NeutrAvidin*[™] *Oregon Green*[™] 488 Konjugat konjugiert und mit *DPBS*-minus auf eine Stoffmengenkonzentration von 3,2 µM gebracht. Anschließend werden alle Konjugate durch eine *Zeba*[™] *Spin* Entsalzungssäule mit einem Molekulargewichtsgrenzwert von 7,0 kDa und einem Volumen von 0,5 mL entsprechend der Produkthanleitung von ungebundenen Fluorophoren befreit.

8.3.2.3 Sieben von Anti-Emp Gedächtniszellen durch FACS ^[1427,1509]

Für die Analyse mit *FACS* werden pro Ansatz 100,0 µL extrahierte periphere mononukleäre Blutzellen für zehn Minuten auf Eis gelagert, erhalten eine in Tabelle 61 beschriebene Menge an markiertem Peptid und werden für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden jeweils 5,0 µL von den Antikörpern Anti-**CD27 PE** und Anti-**Siglec-Fc-IgG APC** zu den Blutzellen gegeben und dem Gefäß 1,0 mL gekühltes *DPBS*-minus beigefügt. Alle Ansätze werden für acht Minuten bei 359 RZB und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen. Dann wird das Pellet in 250,0 µL *DPBS*-minus resuspendiert und zusammen mit ungefärbten Zellen durch *FACS* ausgewertet. Mit dem Programm *FACSDiva*[™] werden B-Lymphozyten durch Vorwärts- und Seitwärtstreulicht identifiziert und durch *Gating* werden differenzierte Zellen für die Analyse ausgewählt.

Tabelle 61: Alle verwendeten Konzentrationen der Peptid-Tetramere in der *FACS* zur Suche nach B-Gedächtniszellen.

Anzahl der Populationen nach <i>FACS</i>		
gewünschte Stoffmengenkonzentration (c) in [nM]	Peptid-Tetramer	eingesetztes Volumen von 320,0 nM Arbeitslösung in [μL]
600	<i>eBio</i> -GG _S ₂ -Emp9	1,1
	<i>eBio</i> -βA ₅ -Emp9	
300	<i>eBio</i> -GG _S ₂ -Emp9	2,2
	<i>eBio</i> -βA ₅ -Emp9	
150	<i>eBio</i> -GG _S ₂ -Emp9	4,5
	<i>eBio</i> -βA ₅ -Emp9	
72	<i>eBio</i> -GG _S ₂ -Emp9	9
	<i>eBio</i> -βA ₅ -Emp9	
36	<i>eBio</i> -GG _S ₂ -Emp9	18
	<i>eBio</i> -βA ₅ -Emp9	

8.4 Mikrobiologische Experimente

8.4.1 Kultivierungsbedingungen

8.4.1.1 *Staphylokokken* und *Bacillus subtilis*

Alle *Staphylokokken* und *DSM 402* werden jeweils in einem sterilen konischen Gefäß mit 50,0 mL Volumen in 20,0 mL TSB für 18 Stunden bei 37 °C ohne Bewegung inkubiert. Zur Erzeugung von Bakterienkolonien werden die Bakterien auf *Columbia*-Agar ausgestrichen und mit dem Deckel nach unten für 18 Stunden bei 37 °C kultiviert.

8.4.1.2 *Escherichia coli* und *RGB-S Reporter*

DSM 498 wird in einem sterilen Glaskolben in 20,0 mL *LB-Miller* für 18 Stunden bei 37 °C und 120 UpM inkubiert. Zur Erzeugung von Bakterienkolonien werden die Bakterien auf *LB-Miller*-Nährplatten ausgestrichen und mit dem Deckel nach unten für 18 Stunden bei 37 °C kultiviert.

Der *RGB-S Reporter* hat dieselben Kultivierungsbedingungen, verwendet aber *LB-Miller*-Kanamycin und *LB-Miller*-Kanamycin-Nährplatten.

8.4.1.3 *Synechocystis spec.*

Die Cyanobakterien werden in einer mit 20,0 mL BG-11-Flüssigmedium gefüllten Zellkulturflasche zwei Tage lang bei 20 °C und 120 UpM inkubiert. Während dieser Zeit werden sie mit einer Photonenstärke von 25,0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ beleuchtet.

8.4.2 Bestimmung der Bakterienzahl durch Trübungswert

Der gemessene Trübungswert einer Bakteriensuspension wird mit der Umrechnungsrate von *Escherichia coli* entsprechend Forbes *et al.* (2002) ^[1510] mit einer Rate von 0,5 MFU gleich 150,0 Mio. KbE/mL umgerechnet.

8.4.3 Immobilisierung von *Staphylokokken* auf Glasträgern ^[1511,1512]

Die *Staphylokokken* ATCC® 25904™ und 168L werden über Nacht kultiviert und anschließend für 10 Minuten bei 7700 RZB zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 20,0 mL DPBS-minus resuspendiert. Durch das *DensiCHEK plus* Densitometer wird die Trübung der Bakteriensuspensionen bestimmt und folgend eine Arbeitssuspension mit einer Bakteriendichte von 1,0 Mio. KbE/mL von jedem Bakterienstamm hergestellt. Von der Arbeitssuspension von ATCC® 25904™ werden jeweils 200,0 μL in jede Kammer der oberen Reihe und 200,0 μL der Arbeitssuspension von 168L in jede Kammer der unteren Reihe eines Glasträgers der *ibidi* GmbH mit acht individuellen Kammern pipettiert. Diese wird im Anschluss ohne Bewegung für 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird jede Kammer mit 200,0 μL DPBS-minus bei einer orbitalen Rotationsgeschwindigkeit von 140 UpM gewaschen und die Adhäsion der *Staphylokokken* durch das DMLS Durchlichtmikroskop bestätigt. Nach der Bestätigung wird jede Kammer mit 200,0 μL Fixierpuffer befüllt, mit Parafilm versiegelt und für mindestens 18 Stunden bei 4 °C inkubiert. Zur Analyse werden alle Kammern durch eine Immunfärbung markiert.

8.4.4 Test auf toxisches Potential der Versuchsreagenzien des

Tötungsassays ^[1513]

Als Testsubstanzen werden als Mischungen von Chemikalien entsprechend der Tabelle 62 vorbereitet und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Als Analyt für das toxische Potential der eingesetzten Mischungen wird jeweils eine Übernachtskultur von 168L und ATCC® 25904™ für zehn Minuten bei 7700 RZB zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 20,0 mL DPBS-plus resuspendiert. Die Gesamtbakterienzahl wird durch Messung des Trübungswerts mit Hilfe des *DensiCHEK plus* Densitometers bestimmt. Dann werden jeweils 80,0 Mio. KbE von jeder Kultur in ein konisches Gefäß gefüllt, erneut bei zehn Minuten bei 7700 RZB zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet für fünf Minuten auf einem Tuch

getrocknet. Das getrocknete Pellet wird als Bakteriensuspension in 1,0 mL *DPBS*-plus resuspendiert. Mit Ausnahme von Spalte 12 werden in einer *BRANDplate*[®]-Mikrotiterplatte (Tabelle 52 Nr. 7) die oberen vier Reihen mit 10,0 µL der Bakteriensuspension von *ATCC*[®] 25904[™] und die unteren vier Reihen mit 10,0 µL der Bakteriensuspension von 168L befüllt. Von jeder Mischung werden 20,0 µL in jede Kavität der in Tabelle 62 zugewiesenen Spalte pipettiert und mit der Bakteriensuspension vermischt. Anschließend wird die Mikrotiterplatte 90 Minuten bei 37 °C und 90 UpM inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden in jede belegte Kavität 170,0 µL TSB und in jede Kavität von Spalte 12 200,0 µL TSB gefüllt und vermischt. Die Mikrotiterplatte wird in die Inkubationskammer des *FLOUstar OPTIMA* gestellt und für 15 Stunden ohne Bewegung bei 37 °C kultiviert. In dieser Zeit wird alle fünf Minuten die OD₆₀₀ von jeder Kavität gemessen. Der Test soll die Reaktionsbedingungen des OPTA so exakt wie möglich simulieren. Als Kontrolle für unspezifische Reaktionen wird Anti-**Myc** in einer Endkonzentration von 10,0 µg/mL eingesetzt. Anti-**Emp** wird in diesem Test auf eine Endkonzentration von ~ 6,8 µg/ml eingestellt.

Tabelle 62: Verschiedene Testsubstanzen, deren toxisches Potential anhand der Wachstumsinhibition von *Staphylokokken* getestet wird. Alle Substanzen werden, wenn nicht anders angegeben, im entsprechenden Verhältnis mit *DPBS*-plus verdünnt.

Test auf toxisches Potential		
Spalte	Substanz	Konzentration
1	<i>DPBS</i> -plus (Negativkontrolle)	konzentriert
2	hitzeinaktiviertes FKS	15,0 % (v/v) des Gesamtvolumens
3	Elutionspuffer	konzentriert
4	HKS	20,9 % (v/v) des Gesamtvolumens
5	Anti- Emp in Elutionspuffer	33,0 % (v/v) des Gesamtvolumens
6	Anti- Emp in Elutionspuffer und hitzeinaktiviertes FKS.	Anti- Emp 33,0 % (v/v) des Gesamtvolumens; FKS: 15,0 % (v/v) des Gesamtvolumens
7	Anti- Myc in <i>PBS</i>	3,5 % (v/v) des Gesamtvolumens
8	Anti- Emp in Elutionspuffer und HKS	Antikörper: 33,0 % (v/v) des Gesamtvolumens; HKS: 20,9 % (v/v) des Gesamtvolumens
9	menschliches ApoA1	33,0 % (v/v) des Gesamtvolumens; Proteinkonzentration ~ 463,0 µg/mL
10	Anti- Myc in <i>PBS</i> und hitzeinaktiviertes FKS	Antikörper: 3,5 % (v/v) des Gesamtvolumens FKS: 15,0 % (v/v) des Gesamtvolumens

8.4.5 Kolorimetrische Bestimmung der *MIC* von antimikrobiellen Substanzen durch Resazurin ^[1514-1516]

Als Testsubstanzen für die Beobachtung eines inhibitorischen Effekts werden Lösungen mit einer Konzentration von 1,0 mg/mL der antibiotischen Substanzen Bac8c, MP196, Pac-525, Ampicillin Natriumsalz und Tetracyclin Hydrochlorid in ddH₂O hergestellt. Eine Übernachtskultur des *RGB-S* Reporter wird als Analyt verwendet und bei 3220 RZB zehn Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in 20,0 mL *PBS* resuspendiert. Mit dem Zelldichtemessgerät *Biowave WPA CO 8000* wird die Bakteriendichte der Bakteriensuspension bestimmt und mit *LB-Miller-Kanamycin* auf eine optische Dichte von OD₆₀₀ 0,4 eingestellt und durch vortexen vermischt. In Reihe A einer *BRANDplate*[®]-Mikrotiterplatte (Tabelle 52 Nr. 7) werden in alle Kavitäten 50,0 µL *LB-Miller-Kanamycin-2x* und in den Reihen B bis H in alle Kavitäten 50,0 µL *LB-Miller-Kanamycin* pipettiert. Die Testsubstanzen werden in doppelten Ansätzen in Reihe A durch Zugabe von 50,0 µL der jeweiligen Substanz in die Kavitäten gemischt und alle Kavitäten in Spalte 12 erhalten zusätzlich 50,0 µL *LB-Miller-Kanamycin*, um die Negativkontrolle zu vervollständigen. Durch eine Verdünnungsreihe werden 50,0 µL der Substanzen in den Spalten 1 bis 10 von Reihe A nacheinander in die alphabetisch nachfolgenden Reihen pipettiert, sodass sich die Substanzkonzentration mit jeder Reihe halbiert. Mit Abschluss der letzten Verdünnung in Reihe H werden 50,0 µL in den Spalten 1 bis 10 dieser Reihe verworfen, damit das Volumen der gesamten Verdünnungsreihe gleich ist. Jede Kavität, mit Ausnahme von Spalte 12, erhält zusätzlich 50,0 µL der Bakteriensuspension. Insgesamt wird die Konzentration der Bakteriensuspension halbiert und die der Testsubstanz geviertelt. Die Mikrotiterplatte wird einen Tag lang ohne Bewegung bei 37 °C kultiviert und nach der Inkubationszeit wird jeder Kavität 20,0 µL Resazurinindikator hinzugegeben. Die Mikrotiterplatte wird anschließend weitere zwei Stunden ohne Bewegung bei 37 °C inkubiert. Ein Farbumschlag markiert alle Kavitäten, in welchen kein bakterielles Wachstum nachgewiesen werden kann.

8.4.6 Protokoll zur Messung der Stressantwort unter Exposition von Stressoren ^[1514,1516]

Die Durchführung basiert auf der Doktorarbeit von Dr. Zoheir (2020) ^[1366] und wird an die Publikation von Berditsch *et al.* (2016) ^[1515] angepasst. Als Testsubstanzen für die Beobachtung einer Stressinduktion werden Lösungen mit einer Konzentration von 5,0 µg/mL von den antibiotischen Substanzen Bac8c, MP196 und Pac-525 in ddH₂O hergestellt. Eine Übernachtskultur des *RGB-S* Reporter wird als Analyt verwendet und mit einer Geschwindigkeit von 3220 RZB für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 10,0 mL *PBS* resuspendiert. Mit dem Zelldichtemessgerät *Biowave WPA CO 8000* wird die

Bakteriendichte der Bakteriensuspension bestimmt und mit *LB-Miller-Kanamycin* auf eine optische Dichte von $OD_{600} 2,0 \times 10^{-3}$ eingestellt und durch Vortexen vermischt. In Reihe A einer *BRANDplate*[®]-Mikrotiterplatte (Tabelle 52 Nr. 6) werden in alle Kavitäten 50,0 µL *LB-Miller-Kanamycin-2x* und in den Reihen B bis H in alle Kavitäten 50,0 µL *LB-Miller-Kanamycin* pipettiert. Die Testsubstanzen werden in dreifachen Ansätzen in Reihe A durch Zugabe von 50,0 µL der jeweiligen Substanz in die Kavitäten gemischt. Alle Kavitäten in den Spalten 10 bis 12 erhalten zusätzlich 50,0 µL *LB-Miller-Kanamycin*, um die Negativkontrolle zu vervollständigen. Durch eine Verdünnungsreihe werden 50,0 µL der Substanzen in den Spalten 1 bis 10 von Reihe A nacheinander in die alphabetisch nachfolgenden Reihen pipettiert, sodass sich die Substanzkonzentration mit jeder Reihe halbiert. Mit Abschluss der letzten Verdünnung in Reihe H werden 50,0 µL in den Spalten 1 bis 10 dieser Reihe verworfen, damit das Volumen der gesamten Verdünnungsreihe gleich ist. Jede Kavität, mit Ausnahme von Spalte 12, erhält zusätzlich 50,0 µL der Bakteriensuspension. Insgesamt wird die Konzentration der Bakteriensuspension halbiert und die der Testsubstanz geviertelt. Die Mikrotiterplatte wird mit einem adhäsiven Polymerase-Kettenreaktion-Film aus Polyester versiegelt und in der Inkubationskammer des *Synergy H1 Hybrid* Multimodus-Mikrotiterplatten-Lesegerätes einen Tag lang mit einer Orbitalfrequenz von 3,0 mm bei 282 UpM und 37 °C kultiviert. Alle zehn Minuten wird jede Kavität durch Monochromatoren bei drei verschiedenen, in Tabelle 63 dargestellten Wellenlängen angeregt und eine bestimmte Bandbreite an Emissionslicht detektiert und aufgezeichnet.

Tabelle 63: Konfiguration der Monochromatoren zur Detektion von fluoreszierenden Proteinen während einer kontrollierten Exposition des *RGB-S* Reporters mit Stressoren.

Konfiguration der Monochromatoren			
detektiertes Protein	Anregungswellenlänge in [nm]	Emissionswellenlänge in [nm]	Empfindlichkeit
blau fluoreszierendes Protein	391,0 bis 409,0	445,0 bis 463,0	50,0
grün fluoreszierendes Protein	474,0 bis 492,0	502,0 bis 520,0	100,0
rot fluoreszierendes Protein	562,0 bis 580,0	598,0 bis 616,0	150,0

8.4.7 Hydrostatische Befüllung und Auswertung der mikrostrukturierten Glasträger

8.4.7.1 Assemblierung der fluidischen Kammer ^[44,1365,1517]

Die fluidische Kammer setzt sich aus einer Dichtung, bestehend aus PDMS, zwei Glasplatten aus Quarz, entweder hydrophobiert oder unbehandelt (158,0 x 60,0 x 5,0 mm³ und 111,0 x 60,0 x 50,0 mm³), einem Wasser- und Medienreservoir sowie einem hydrophobierten mikrostrukturierten Träger aus Quarzglas zusammen. Der Glasträger wird in die Dichtung gespannt, sodass die Mikrostrukturen nach innen gewandt sind. Anschließend wird die Dichtung zwischen die beiden Glasplatten gelegt, sodass die Seite mit dem mikrostrukturierten Träger mit der kleineren Glasplatte exakt abschließt. Beide Glasplatten werden mit vier großen *Foldback*klemmern zusammengepresst. Mit einem System aus Schläuchen wird eine Seite der Befüllungskammer mit dem Medienreservoir verbunden, während die andere Seite mit dem Wasserreservoir verknüpft wird. Beide Schlauchsysteme werden in eine *MS/CA*-Kassette gespannt und diese in die digitale Pumpe *Reglo ICC* eingefügt. Das Wasserreservoir ist mit einem Magnetrührfisch ausgestattet und wird auf einen beheizbaren Magnetrührer platziert. Zur Überprüfung der korrekten Assemblierung werden 10,0 mL steriles destilliertes Wasser von dem Medienreservoir in das fluidische System geleitet.

8.4.7.2 Hydrostatische Befüllung von mikrostrukturierten Glasträgern ^[44,1365,1517]

Unmittelbar vor der Befüllung werden 10,0 mL einer Bakteriensuspension in das Medienreservoir gefüllt, die fluidische Kammer wird um einen Winkel von 45 ° geneigt und der Zugang zum Wasserreservoir mit einem *Foldback*klemmer verschlossen. Durch die peristaltische Pumpe wird die Bakteriensuspension bei einer Fließgeschwindigkeit von 600,0 µL pro Minute in die fluidische Kammer gepumpt, bis diese vollständig gefüllt ist. Die Bakterien werden dann für zweieinhalb Stunden sedimentiert. Nach der Sedimentationszeit wird der Magnetrührer auf eine Geschwindigkeit von 1250 UpM eingestellt, der Zugang zum Wasserreservoir geöffnet und die Bakteriensuspension mit einer Geschwindigkeit von 225,0 µL pro Minute in das Medienreservoir zurückgepumpt, bis keine Flüssigkeit mehr in der fluidischen Kammer vorhanden ist. Für eine weitere Detektion wird der Zugang zu beiden Reservoirs mit *Foldback*klemmern verschlossen oder der Glasträger wird aus der Kammer herausgenommen und eine Stunde lang in einer Sicherheitswerkbank getrocknet.

8.4.7.3 Präparation und Detektion von *Synechocystis spec.* ^[1518]

Zur Vorbereitung der Bakterienkultur werden 10,0 mL einer zwei Tage alten Kultur von *Synechocystis spec.* in ein steriles konisches Gefäß mit 50,0 mL Volumen gefüllt und zentrifugiert. Das Pellet wird in 10,0 mL Kochsalzlösung-Formulation 1 gelöst, erneut zentrifugiert und in 10,0 mL Kochsalzlösung-Formulation 1 resuspendiert. Die Bakteriendichte

wird durch das Spektralphotometer *Jenway 7305* bestimmt. Anschließend wird das Volumen der Bakteriensuspension mit Kochsalzlösung-Formulation 1 auf 5,0 mL aufgefüllt und die Bakteriendichte auf eine OD_{750} von 0,4 eingestellt. Die mit *Synechocystis spec.* befüllten Glasträger werden ausschließlich im getrockneten Zustand mit dem *Innoscan 1100 AL*, dem optischen Digitalmikroskop *VHX-600* und dem Mikroskop *PixCell II* detektiert. Bei einer Auswertung mit dem *Innoscan 1100 AL* wird der Glasträger bei 532,0 nm mit einer Laserenergie von 10,0 mW angeregt, das Emissionslicht mit Filter Nr. 6 in Tabelle 46 begrenzt und bei einer Empfindlichkeit von 0,1 detektiert. Alle Zentrifugationen werden für zehn Minuten bei 3220 RZB durchgeführt.

8.4.7.4 Präparation und Detektion von humanen Erythrozyten ^[1519]

Über ein Blutentnahmesystem wird das Erythrozytenkonzentrat in PAGGS-M in ein steriles konisches Gefäß übertragen und unverdünnt zur Befüllung eingesetzt. Die mit Humanerythrozyten befüllten Glasträger werden ausschließlich im getrockneten Zustand mit dem optischen Digitalmikroskop *VHX-600* und dem Mikroskop *PixCell II* ausgewertet.

8.4.7.5 Lebend-Tot-Färbung ^[1520-1522]

8.4.7.5.1 Präparation von Bakterien durch Lebend-Tot-Färbung

Zur Vorbereitung der Bakterienkultur werden 25,0 mL einer Übernachtskultur von *DSM 498* in ein steriles konisches Gefäß mit 50,0 mL Volumen gefüllt und zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 20,0 mL Kochsalzlösung-Formulation 2 durch vortexen vollständig vermischt, erneut zentrifugiert und in 10,0 mL Kochsalzlösung-Formulation 2 resuspendiert. Die Bakteriendichte wird mit dem Zelldichtemessgerät *Biowave WPA CO 8000* bestimmt und mit Kochsalzlösung-Formulation 2 auf ein Volumen von 5,0 mL und eine OD_{600} zwischen 0,5 und 0,8 eingestellt. Zur Färbung wird die Bakteriensuspension in einem Verhältnis von 1:1 mit Färbelösung vermischt und im Dunkeln für 15 Minuten inkubiert. Alle Zentrifugationen werden für 25 Minuten bei 3220 RZB durchgeführt.

8.4.7.5.2 Detektion von Bakterien durch Lebend-Tot-Färbung

Nach der Befüllung werden gefärbte Bakterien in der fluidischen Kammer oder auf dem getrockneten Glasträger im optischen System nach Clemens von Bojničić-Kninski analysiert. Die Bakterien werden mit der *SOLIS-470C* bei voller Leistung angeregt, die Emission durch einen Breitbandfilter begrenzt und letztendlich durch eine *D810* Spiegelreflexkamera detektiert. Für die Detektion des Farbstoffes *SYTO™ 9* wird Filter Nr. 5 in Tabelle 48 verwendet und die Aufnahme mit einer Belichtungszeit von 15 Sekunden und einer ISO-Zahl von 12800 durchgeführt. Für die Detektion des Farbstoffes Propidiumiodid wird Filter Nr. 9 in Tabelle 48 verwendet und die Aufnahme mit einer Belichtungszeit von 30 Sekunden bei einer ISO-Zahl von 12800 durchgeführt.

8.4.7.6 RGB-S Reporter ^[1366]

8.4.7.6.1 Präparation des RGB-S Reporters

Zur Vorbereitung der Bakterienkultur werden 20,0 mL einer Übernachtskultur des RGB-S Reporters in ein steriles konisches Gefäß mit 50,0 mL Volumen gefüllt und zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 20,0 mL PBS durch vortexen vollständig vermischt, erneut zentrifugiert und in 10,0 mL LB-Miller-Kanamycin-Ciprofloxacin oder LB-Miller-Kanamycin resuspendiert. Eine Bakteriensuspension in LB-Miller-Kanamycin-Ciprofloxacin wird zusätzlich zwei Stunden lang bei 37 °C ohne Bewegung inkubiert. Alle Zentrifugationen werden für 20 Minuten bei 3220 RZB durchgeführt.

8.4.7.6.2 Detektion des RGB-S Reporters

Nach der Befüllung werden die von dem Reporterstamm exprimierten fluoreszierenden Proteine in der fluidischen Kammer oder auf dem getrockneten Glasträger im optischen System nach Clemens von Bojničić-Kninski analysiert. Zur Detektion des blau fluoreszierenden Proteins wird der Glasträger mit der SOLIS-445B/M bei voller Leistung angeregt und das Emissionslicht ungefiltert von der D810 Spiegelreflexkamera bei einer Belichtungszeit von einer Sekunde und einer ISO-Zahl von 800 detektiert. Das grün fluoreszierende Protein wird mit der SOLIS-470C bei voller Leistung angeregt, das Emissionslicht durch Filter Nr. 5 in Tabelle 48 eingegrenzt und von der Kamera bei einer Belichtungszeit von sechs Sekunden und einer ISO-Zahl von 6000 detektiert. Für die Detektion des rot fluoreszierenden Proteins wird der Glasträger mit der SOLIS-470C bei voller Leistung angeregt, das Emissionslicht durch Filter Nr. 9 in Tabelle 48 eingegrenzt und von der Kamera bei einer Belichtungszeit von 15 Sekunden und einer ISO-Zahl von 12800 detektiert. Getrocknete Glasträger werden zusätzlich durch den Innoscan 1100 AL ausgewertet, wobei der Scanner nicht für die Detektion von blau fluoreszierenden Proteinen ausgestattet ist. Grün fluoreszierende Proteine werden bei 488,0 nm mit einer Laserenergie von 10,0 mW angeregt, das Emissionslicht mit Filter Nr. 1 in Tabelle 46 begrenzt und bei einer Empfindlichkeit von 5,0 detektiert. Die rot fluoreszierenden Proteine werden bei 532,0 nm mit einer Laserenergie von 10,0 mW angeregt, das Emissionslicht mit Filter Nr. 5 in Tabelle 46 begrenzt und bei einer Empfindlichkeit von 10,0 detektiert.

8.4.7.7 Test auf antimikrobielle Stressantwort in mikrostrukturierten Glasträgern

In dieser Variante des Experiments wird ein hydrophobierter mikrostrukturierter Glasträger verwendet. Dieser Glasträger wird zuvor entsprechend Kapitel 8.6.2 „**Oberflächensynthese von antibiotischen Peptiden auf einem modifizierten mikrostrukturierten Träger**“ zuerst mit einem Photo-Linker funktionalisiert, an dessen freien Aminogruppe das antimikrobielle Peptid MP196 geknüpft wird. Nach der Befüllung mit dem RGB-S Reporter wird die fluidische Kammer für 30 Minuten mit der Schwarzlichtlampe VL-115.BL bei voller Leistung

bestrahlt ^[1523,1524] und für 19 Stunden ohne Bewegung bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird der Glasträger aus dem fluidischen System herausgenommen und eine Stunde lang in der Sicherheitswerkbank getrocknet. Eine Auswertung des Glasträgers wird entsprechend Kapitel 8.4.7.6.2 „**Detektion des RGB-S Reporters**“ durchgeführt.

8.5 Durchführung des OPTA

8.5.1 Vorbereitung der Kulturen und Reagenzien

8.5.1.1 Vorbereitung der *Staphylokokken* ^[1525]

Als Analyten für den Assay werden jeweils eine Übernachtskultur von den *Staphylokokken* 168L, ATCC® 25904™ und USA300 in zweifacher Wiederholung zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 20,0 mL PBS-plus resuspendiert. Die Gesamtbakterienzahl wird durch Messung des Trübungswert durch das *DensiCHEK plus* Densitometer bestimmt. Für jede Bakterienart werden 1,0 Mrd. KbE in ein steriles konisches Gefäß pipettiert, zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 1,0 mL Oponisierungspuffer gevortext, bis die Bakterien komplett mit der Flüssigkeit vermischt sind.

8.5.1.2 Vorbereitung der differenzierten *HL-60* Zellen ^[162]

Eine Zellkultur von *HL-60* Zellen wird eine Woche und eine Differenzierung der Zellen drei Tage vor dem Experiment etabliert. Am Tag des Experiments wird die korrekte Differenzierung der Zellen überprüft und durch eine Trypanblau-Färbung die Anzahl von lebendigen Zellen bestimmt. Pro Testsubstanz werden 1,5 Mio. Zellen, multipliziert mit der Anzahl an Analyten, benötigt. Diese Anzahl wird für drei Minuten bei 500 RZB zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in Komplementpuffer resuspendiert, sodass sich eine Konzentration von 10,0 Mio. Zellen/mL ergibt.

8.5.1.3 Vorbereitung der Testsubstanzen und Versuchsreagenzien ^[1526]

Als Testsubstanzen für den Assay werden die Antikörper Anti-**Emp**, Anti-**Myc**, das menschliche **ApoA1** und als Prozesschemikalie polyklonales **IgG** aus dem Hasen eingesetzt. Alle vier Substanzen werden jeweils mit einer *Zeba™ Spin* Entsalzungssäule mit einem Molekulargewichtsgrenzwert von 7,0 kDa und einem Volumen von 0,5 mL entsprechend der Produkthanleitung behandelt, sodass alle Substanzen nach der Entsalzung in Oponisierungspuffer gelöst sind. Für jeden Test werden 200,0 µL von jeder Testsubstanz in der in der Tabelle 64 angegebenen Konzentration hergestellt, indem die jeweilige Substanz mit 40,0 µL polyklonalem **IgG** aus dem Hasen in Oponisierungspuffer und dem Puffer selbst verdünnt wird.

Tabelle 64: Vorbereitung der Testsubstanzen für den OPTA.

Vorbereitung der Testsubstanzen	
Substanz	Konzentration
Anti- Emp	50,0 % (v/v), ~ 15,3 µg/mL
Anti- Myc	2,2 % (v/v), ~ 15,0 µg/mL
menschliches ApoA1	21,5 % (v/v), ~ 299,0 µg/mL

8.5.2 Durchführung des OPTA

Die Bedingungen des OPTA nach Paschall *et al.* (2019) ^[162] werden entsprechend den immunesvasiven Eigenschaften von *Staphylococcus aureus* angepasst.

Aus der vorbereiteten Bakteriensuspension werden 100,0 µL verworfen, die restliche Suspension mit 100,0 µL polyklonalem **IgG** aus dem Hasen aufgefüllt und fünf Minuten stehend bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit werden für jede Testsubstanz, multipliziert mit der Anzahl an Analyten, drei in einer Reihe parallel positionierte Kavitäten einer *BRANDplate*[®]-Mikrotiterplatte (Tabelle 52 Nr. 8) mit jeweils 10,0 µL der Bakteriensuspension befüllt. Anschließend werden die Kavitäten mit jeweils 20,0 µL der entsprechenden Testsubstanz vermischt und für 30 Minuten bei 37 °C mit dieser inkubiert. Am Ende der Oponisierung werden jeweils 10,0 µL des Gemisches aus Bakterien und Substanz auf zwei weitere Reihen einer Mikrotiterplatte verteilt. In der einen Reihe wird dieses mit 50,0 µL Zellsuspension und in der anderen Reihe mit 50,0 µL Komplementpuffer vermischt. Die Mikrotiterplatte wird anschließend bei 90 UpM und 37 °C für eine Stunde lang kultiviert.

8.5.3 Analyse des OPTA ^[1411]

In einer *BRANDplate*[®]-Mikrotiterplatte (Tabelle 52 Nr. 7) werden für jede Probe vier in einer Spalte parallel positionierte Kavitäten mit jeweils 180,0 µL *DPBS*-plus befüllt. Die Flüssigkeit in der numerisch ersten Kavität wird mit 20,0 µL der jeweiligen Probe vermischt und anschließend entsprechend der DIN EN ISO 6887 ^[1527] in den Kavitäten der darunterliegenden Reihen verdünnt. Eine Nährplatte *Columbia*-Agar wird in vier Kompartimente unterteilt, und auf jedes Kompartiment werden mit im Uhrzeigersinn aufsteigender Konzentration, 50,0 µL einer Verdünnung pipettiert. Anschließend wird die Nährplatte 15 Minuten getrocknet und mit dem Deckel nach unten 18 Stunden lang bei 37 °C kultiviert.

8.5.4 Dokumentation und Auswertung ^[1411,1528]

Die Nährplatten werden nach der Kultivierungszeit mit einer Handykamera dokumentiert. Ansammlungen von Kolonien werden dann gezählt, wenn die Kolonien sichtbar auseinandergehalten werden können. Zur Auswertung werden die Kolonien mit Unterstützung von digitaler Zähl- und Zoomhilfe durch das Programm *ImageJ* ^[1395] gezählt.

8.6 Polymerherstellung und chemische Modifikation von mikrostrukturierten Glasträgern

8.6.1 Veredelung von mikrostrukturierten Glasträger mit 10:90-PEGMA-co-PMMA-Polymerfilm

Die Herstellung des Copolymers basiert auf einer Publikation von Kimani und Moratti (2006) ^[1529], welche fortlaufend durch Stadler *et al.* (2008) ^[1530] und Schirwitz (2012) ^[1531] verbessert wurde.

Die Veredelung der mikrostrukturierten Träger wurde von Dr. Andreas Klinkusch am Institut für Mikrostrukturtechnik am KIT durchgeführt.

8.6.1.1 Reinigung und Aktivierung der mikrostrukturierten Glasträger

Die mikrostrukturierten Glasträger werden in einer mit 50,0 mL in Isopropanol gelöster 1,0 M Kalilauge befüllten Färbekammer für 18 Stunden eingelegt und aktiviert, anschließend mit 50,0 mL ddH₂O gewaschen und durch eine Spritzflasche mit Aceton abgespült.

8.6.1.2 Synthese von Brom-Silan

Die Brom-Silan-Basis wird in einer Schlenkflasche angesetzt und mit flüssigem Stickstoff auf -196 °C heruntergekühlt. Tropfenweise und unter ständigem Rühren werden 30,0 mL der α -Bromisobuttersäurebromid-Lösung in die Schlenkflasche gegeben, die gesamte Flasche nach Zugabe des vollen Volumens auf Raumtemperatur erwärmt und gewartet, bis das Dichlormethan verdampft ist. Die Restsubstanz in der Schlenkflasche wird in wasserfreiem n-Hexan gelöst und für 30 Minuten gerührt. Feststoffe, welche in der Lösung ausfallen, werden unter Argongas durch eine feinporige Filternutsche herausgefiltert und das Lösungsmittel in einem Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt.

8.6.1.3 Silanisierung der mikrostrukturierten Glasoberfläche

Zur Vorbereitung für die Silanisierung werden 8,0 mM n-Propyltriethoxysilan und 2,0 mM Brom-Silan in wasserfreiem Dichlormethan gelöst, in eine Färbekammer gefüllt und die aktivierten mikrostrukturierten Glasträger für 18 Stunden unter Argongas in der Flüssigkeit

inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die Träger dreimal für fünf Minuten mit Ethanol, zweimal zwei Minuten mit Aceton in der Färbekammer gewaschen und anschließend unter einem Strom aus Argon getrocknet. Die getrockneten Glaträger werden für zwei Stunden im Muffelofen bei 110 °C gebacken.

8.6.1.4 Veredelung der mikrostrukturierten Glasoberfläche

Zur Veredelung der silanisierten Oberflächen werden in einer Schlenkflasche die Chemikalien der Copolymer-Basis vermischt, die Flasche dreimal vakuumiert und mit Argon gespült. Unter einen Gegenstrom von Argon werden 44,0 mg Kupfer(I)-chlorid beigemischt und mit dem Gemisch verrührt. Die Färbekammer mit den Glaträgern wird in einen Exsikkator gestellt, evakuiert und mit Argon gespült. Anschließend wird das Reaktionsgemisch in die Färbekammer überführt, der Exsikkator dreimal evakuiert, mit Argon gespült und für 20 Stunden zur Reaktion belassen. Nach Vervollständigung der Reaktion werden die Glaträger fünfmal fünf Minuten mit Dimethylsulfoxid, zweimal fünf Minuten mit Methanol, zweimal zehn Minuten mit ddH₂O gewaschen, mit Aceton abgespült und unter einen Luftstrom getrocknet.

8.6.1.5 Knüpfung von Fmoc-βA an Copolymer

Um die Aminosäure β-Alanin an die Oberfläche des Copolymers zu knüpfen, wird 50,0 mL Fmoc-βA-Lösung in eine Schlenkflasche gefüllt, mit 120,0 mM N,N-Diisopropylcarbodiimid vermischt, fünf Minuten lang gerührt, und anschließend 400,0 mM N-Methylimidazol zugegeben. Die Färbekammer mit den Glaträgern wird in einen Exsikkator gestellt, dieser evakuiert und mit Argon gespült. Anschließend wird das Reaktionsgemisch in die Färbekammer überführt, der Exsikkator dreimal evakuiert und mit Argon gespült und für 18 Stunden zur Reaktion belassen. Nach der Reaktionszeit werden die Glaträger für 30 Minuten mit Acetylierungsreagenz inkubiert und anschließend dreimal fünf Minuten mit N,N-Dimethylformamid, zweimal drei Minuten mit Aceton gewaschen und mit einem Strom aus Argon getrocknet. Für die weitere Verwendung werden die Glaträger unter Argon-Atmosphäre bei 4 °C gelagert.

8.6.2 Oberflächensynthese von antibiotischen Peptiden auf einem modifizierten mikrostrukturierten Träger

Die Oberflächensynthese wird aus der Dissertation von Dr. Daniela Mattes ^[1524] übernommen und von Dr. Zekun Zhou durchgeführt.

8.6.2.1 Fmoc-Entschützung ^[1524]

Eine mikrostrukturierte Glasoberfläche wird zehn Minuten lang in N,N-Dimethylformamid gequollen und anschließend für 20 Minuten in 10,0 mL Fmoc-Entschützungslösung inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird der Glasträger gewaschen und getrocknet.

8.6.2.2 Waschen und trocknen ^[1524]

Glasträger werden nach Abschluss von jedem Arbeitsschritt gewaschen und getrocknet. Hierbei werden sie dreimal für fünf Minuten in N,N-Dimethylformamid, zwei Minuten in Methanol, eine Minute in Dichlormethan gewaschen und anschließend unter einem Strom aus Argongas getrocknet.

8.6.2.3 Acetylierung von freien Aminogruppen ^[1524]

Eine mikrostrukturierte Glasoberfläche wird 30 Minuten lang in N,N-Dimethylformamid gequollen und anschließend zweimal eine Stunde in Acetylierungsreagenz inkubiert und anschließend gewaschen und getrocknet.

8.6.2.4 Seitenkettenentschützung ^[1524]

Eine mikrostrukturierte Glasoberfläche wird 30 Minuten lang in N,N-Dimethylformamid gequollen und anschließend dreimal 30 Minuten lang in Entschützungslösung für Seitenketten inkubiert. Darauf folgend wird die Glasoberfläche fünf Minuten in Dichlormethan und fünf Minuten in N,N-Dimethylformamid gewaschen. Nach den Waschsritten wird die Oberfläche noch 30 Minuten in Entschützungslösung inkubiert und anschließend gewaschen und getrocknet.

8.6.2.5 Knüpfung von Peptiden auf 10:90-PEGMA-co-PMMA-Polymerfilm ^[44,1532]

Es werden die Fmoc-Schutzgruppen einer mikrostrukturierten und veredelten Glasoberfläche entschützt und der Träger anschließend in einen Exsikkator gelegt. Dieser wird dreimal evakuiert und mit Argon gespült. Es wird eine Lösung des Fmoc-Photo-Linkers hergestellt, indem 200,0 mM des Linkers in 1,0 mL wasserfreiem N,N-Dimethylformamid gelöst und für fünf Minuten gerührt werden. Die Lösung wird anschließend mit 400,0 mM Diisopropylethylamin, 200,0 mM 1-Hydroxybenzotriazol und 200,0 mM Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat vermischt, auf die Oberfläche gegeben, der Exsikkator zweimal evakuiert, mit Argon gespült und für 16 Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird die Oberfläche gewaschen und getrocknet. Anschließend werden die verbleibenden freien Aminogruppen auf der Oberfläche acetyliert. Im Anschluss an die Acetylierung werden erneut die Fmoc-Schutzgruppen entfernt, der Träger in einen Exsikkator gelegt, dieser dreimal evakuiert und mit Argon gespült. Es wird eine Lösung von Fmoc-MP196 hergestellt, indem 200,0 mM des Peptides in 1,0 mL wasserfreiem N,N-Dimethylformamid gelöst und für fünf Minuten gerührt werden. Die Lösung wird anschließend mit 400,0 mM

Diisopropylethylamin, 200,0 mM 1-Hydroxybenzotriazol und 200,0 mM Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat gut vermischt, auf die Oberfläche gegeben, der Exsikkator zweimal evakuiert, mit Argon gespült und für 16 Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird die Oberfläche gewaschen und getrocknet. Anschließend werden die verbleibenden freien Aminogruppen auf der Oberfläche acetyliert. Die Fmoc-Schutzgruppen werden mit 1,0 mL der Fmoc-Entschützungslösung entfernt. Im letzten Schritt werden die Seitenketten der Peptide auf der Oberfläche entschützt und der Träger unter Argonatmosphäre bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

8.6.3 Hydrophobierung von Glas

8.6.3.1 Sicherung von Mikrokavitäten ^[43,44,1533]

Mit einem feinen Tuch werden in dreifacher Wiederholung Nanopartikel des Matrixpolymers *SLEC PLT 7552* in Mikrostrukturen des Glasträgers gedrückt, die Beladung mit dem *PixCell II* überprüft und bei Bedarf ergänzt. Sobald alle Kavitäten gefüllt sind wird die Glasoberfläche mit Druckluft und durch physische Interaktion mit Nitrilhandschuhen gereinigt. Der Glasträger wird anschließend unter Argon für eine Stunde bei 90 °C in einem Muffelofen gebacken, gekühlt und der ganze Prozess einmal wiederholt.

8.6.3.2 Aktivierung von mikrostrukturierten Glasträgern ^[1534]

Die Glasoberflächen werden durch das von *Zepto Modell 2* Grundgerät Typ A erzeugte Luftplasma aktiviert. Hierbei werden die Glasträger für zehn Minuten bei einem Atmosphärendruck von 250,0 mBar bei voller Leistung mit Plasma behandelt. Anschließend werden die Glasträger sofort über Dampfabscheidung hydrophobiert.

8.6.3.3 Aktivierung von Glasplatten ^[1531,1535,1536]

Glasplatten ohne Kavitäten werden für 18 Stunden in Isopropanol gelöster 1,0 M Kalilauge eingelegt und anschließend zweimal fünf Minuten in ddH₂O und fünf Minuten in Ethanol gereinigt, mit einem Luftstrom aus Argon getrocknet und für 30 Minuten in einem gasdichten und hitzebeständigem mit Argon gefüllten Behälter bei 120 °C in einem Muffelofen gebacken. Die Glasplatten werden anschließen sofort über Dampfabscheidung hydrophobiert.

8.6.3.4 Hydrophobierung durch Dampfabscheidung ^[1537]

Ein Tag vor der Hydrophobierung wird ein Exsikkator ohne Trocknungsmittel vorbereitet und für 18 Stunden evakuiert. Vor dem Öffnen wird der Exsikkator mit Argon geflutet und die aktivierten Glasträger und Glasplatten werden zusammen mit einer kleinen Petrischale in den Exsikkator gestellt. Für jeden Glasträger werden unter einem Strom aus Argon 5,0 µL und für jede Glasplatte 10,0 µL Trichlor-(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)-silan in die Petrischale gefüllt, der Exsikkator geschlossen, für eine Minute evakuiert und unter Vakuum belassen. Nach drei

Stunden wird der Exsikkator mit Raumluft geflutet und alle Glasträger und -platten für eine Minute in ddH₂O gewaschen. Anschließend wird das Glas innerhalb des *Elmasonic S 100 H mit Ultraschall* bei voller Leistung dreimal eine Minute in Ethanol, zweimal drei Minuten in Aceton und zweimal drei Minuten in Dichlormethan gewaschen. Mit einer Pasteurpipette und ddH₂O wird die Hydrophobizität der Glasteile überprüft und der Träger anschließend unter einem Strom von Argon getrocknet und bis zur Verwendung bei 4 °C unter Argon gelagert.

8.6.4 Herstellen einer Gussform aus PMMA und einer Dichtung aus

PDMS [44,1365]

Das Negativ der Dichtung wird durch die Software *Autodesk Inventor* als CAD-Zeichnung erstellt und von der betriebseigenen Werkstatt aus einem massiven Block aus PMMA in seine Form gefräst. Zur Herstellung der Form wird das *Sylgard™ 184* Silikon Elastomer Kit verwendet. Es werden 15,0 g der *Sylgard™ 184* Silikon-Elastomerbasis in einer Schale abgewogen und mit 1,9 g des Härters unter Rühren für einige Minuten vermischt. Die Mischung wird in einen Exsikkator gestellt und mehrfach evakuiert und mit Raumluft geflutet, bis alle Luftblasen aus dem Gemisch entfernt sind. Anschließend wird die Mischung in das Negativ gegossen und für 70 Minuten bei 65 °C im Muffelofen gebacken, bei Raumtemperatur abgekühlt und aus der Form genommen. Mit dem Skalpell werden überhängende Teile und der dünne Film aus PDMS in der Extrusion herausgeschnitten. Anschließend wird mit einem PDMS-Stanzer an den kurzen Seiten jeweils ein Loch für fluidische Anschlüsse geschlagen. Die Dimensionen beider Dichtungen sind 96 x 22,5 x 1,5 mm³.

9 Abkürzungen

9.1 Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
βA	β-Alanin

9.2 Chemikalien

Brom-Silan	2-Bromo-2-methyl-N-[3-(triethoxysilyl)propyl]propenamide
CPD	Citrate-Phosphat-Derivativ
Cy™ 3	<i>Cyanin™ 3</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DPBS	<i>Dulbeccos's phosphate buffered saline</i> (<i>Dulbeccos's</i> phosphatgepufferte Salzlösung)
eBio	Glutaminsäure-Biotin
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
LB	<i>lysogeny broth</i> (Lysogenie-Brühe)
LDS	Lithiumdodecylsulfat
NH ₂	Aminogruppe
PAGGS-M	Saure Phosphate, Adenin, Guanin, Glukose, Sorbit-Mannitol-Additivlösung
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEGMA-co-PMMA	Poly(ethylenglycol)methylmethacrylat-Polymethylmethacrylat-Kopolymer
PMMA	Polymethylmethacrylat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium 1640</i> (Roswell Park Gedächtnisinstitut Medium 1640)
TSB	Tryptische Soja-Bouillon

9.3 Biomoleküle, Gene und Proteine

<i>agr</i>	<i>accessory gene regulator</i>	(beitragender Genregulator)
AhpC	Alkyl Hydroperoxid-Reduktase C	
Ak.	Antikörper	
Amp	Ampicillin	
APC	Allophycocyanin	
ApoA1	Apolipoprotein A1	
Atl	<i>major autolysin</i>	(Autolysin)
Bac2A	Bactenecin 2A AS-64906	
Bac8c	Bactenecin 8c	
Bap	Biofilm-assoziiertes Protein	
BSA	bovines Serumalbumin	
C1	complement component 1	(Komplementkomponente 1)
C2	<i>complement component 2</i>	(Komplementkomponente 2)
C2a	<i>complement component 2a</i>	(Komplementkomponente 2a)
C2b	<i>complement component 2a</i>	(Komplementkomponente 2b)
C3	<i>complement component 3</i>	(Komplementkomponente 3)
C3a	<i>complement component 3a</i>	(Komplementkomponente 3a)
C3b	<i>complement component 3b</i>	(Komplementkomponente 3b)
C4	<i>complement component 4</i>	(Komplementkomponente 4)
C4a	<i>complement component 4a</i>	(Komplementkomponente 4a)
C4b	<i>complement component 4b</i>	(Komplementkomponente 4b)
C4BP	C4 binding protein	(C4 -bindendes Protein)
C5	<i>complement component 5</i>	(Komplementkomponente 5)
C5a	<i>complement component 5a</i>	(Komplementkomponente 5a)
C5b	<i>complement component 5b</i>	(Komplementkomponente 5b)
Cna	<i>collagen adhesin</i>	(Kollagenadhäsin)
CD	<i>cluster of differentiation</i>	(Unterscheidungsgruppe)
CD154	CD40-Ligand	
CD27	T-Zell Aktivierungsantigen	
CD35	Komplementrezeptor 1	
CD36	Thrombozytenglykoprotein IV	

CD70	CD27-Ligand
CD71	Transferrinrezeptor 1
CHIPS	chemotaktisch inhibitorisches Protein von <i>Staphylococcus aureus</i>
CifA	<i>clumping factor A</i> (Klumpungsfaktor A)
CifB	<i>clumping factor B</i> (Klumpungsfaktor B)
Coa	<i>staphylocoagulase</i> (Staphylokoagulase)
CP5	<i>capsular polysaccharide type 5</i> (Kapselpolysaccharid Typ 5)
CP8	<i>capsular polysaccharide type 8</i> (Kapselpolysaccharid Typ 8)
CpG	5'-Cystein-Phosphat-Guanin-3'
CXCL-12	CXC-Motiv-Chemokin 12
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSG1	Desmoglein-1
Eap	Extrazelluläres Adhärenzprotein
Ebh	Emp -Homolog
Ecb	<i>extracellular complement binding protein</i> (extrazelluläres Komplement-bindendes Protein)
eDNA	extrazelluläre Desoxyribonukleinsäure
Efb	extrazelluläres Fibrinogen-bindendes Protein
Emp	extrazelluläres Matrixprotein
<i>emp</i>	extrazelluläres Matrixprotein (Gen)
Emp_A	extrazelluläres Matrixprotein aus dem klonalen Komplex 30
ETA	Exfoliatin A
ETB	Exfoliatin B
<i>Fcγ</i> -Rezeptor	<i>Fc</i> -Rezeptor für IgG
FcγRIIA	<i>low affinity IgG receptor II-a</i> (<i>Fc</i> -Rezeptor II-a für niederaffines IgG)
FLIPr	Formyl-Peptid-ähnlicher Rezeptor 1 Inhibitor
FnBPA	Fibronektin-bindendes Protein A
FnBPB	Fibronektin-bindendes Protein B
<i>fur</i>	<i>ferric uptake regulator</i> (Regulator der Eisenaufnahme)
FKS	fötales Kälberserum
gC1qR/p33	Komplementrezeptor für C1q

GFPmut3b	grün fluoreszierendes Protein Mutation 3b
Glu-C	Endoproteinase V8
hBD-3	humanes β -Defensin-3
Hla	α -Hämolysin
Hlb	β -Hämolysin
HlgAB	γ -Hämolysin Kombination AB
HlgCB	γ -Hämolysin Kombination CB
HKS	humanes Komplementserum
Hmp	Flavohämoglobin
<i>ica</i>	<i>intracellular adhesion gene</i> (intrazelluläres Adhäsionsgen)
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i> (interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1)
IFN-γ	Interferon- γ
IgA	Immunglobulin Klasse A
IgA₁	Immunglobulin Klasse A Subtyp 1
IgD	Immunglobulin Klasse D
IgE	Immunglobulin Klasse E
IgG	Immunglobulin Klasse G
IgG₁	Immunglobulin Klasse G Subtyp 1
IgG₂	Immunglobulin Klasse G Subtyp 2
IgG₃	Immunglobulin Klasse G Subtyp 3
IgG₄	Immunglobulin Klasse G Subtyp 3
IgG Hase	IgG aus dem Hasen
IgM	Immunglobulin Klasse M
IIA-sPLA2	Phospholipase A ₂ der Säugetiergruppe IIA
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
IL-17	Interleukin 17
IL-1RA	Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist
IL-1β	Interleukin 1 β
IL-2	Interleukin 1
IL-27	Interleukin 27
IL-6	Interleukin 6

IsdA	<i>iron-regulated surface determinant A</i> (eisenregulierte Oberflächendeteminante A)
IsdB	<i>iron-regulated surface determinant B</i> (eisenregulierte Oberflächendeteminante B)
IsdH	<i>iron-regulated surface determinant H</i> (eisenregulierte Oberflächendeteminante H)
J-Kette	<i>joining-Kette</i> (Verbindungskette)
KatA	Katalase A
LukAB	Leukozidin Kombination AB
LukED	Leukozidin Kombination ED
MHC-Klasse II	Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse II
MPO	Myeloperoxidase
mRFP1	monomerisches rot fluoreszierendes Protein 1
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
MsaB	Modulator von SarA B
MsrA1	Methionin Sulfoxid-Reduktase A1
MsrB	Methionin Sulfoxid-Reduktase B
mTagBFP2	monomerisches, markiertes blau fluoreszierendes Protein 2
Myc	Proto-Onkogen-basische-Helix-Schleifen-Helix-Transkriptionsfaktor
NADPH-Oxidase	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase
NGF-β	<i>nerve growth factor β</i> (Nervenwachstumsfaktor β)
PBP2a	Penicillin-bindendes-Protein 2a
PE	Phycoerythrin
PerR	Peroxid-Operonenregulator
PIA	polysaccharidisches interzelluläres Adhäsion
PVL	Panton-Valentin-Leukozidin
<i>rbf</i>	Regulator des Biofilms
RNA	Ribonukleinsäure
<i>rpoH</i>	RNA-Polymerase Sigma-Faktor H
<i>rpoS</i>	RNA-Polymerase Sigma-Faktor S
<i>sae</i>	<i>Staphylococcus aureus exoprotein expression</i> (Exoproteinexpression von <i>Staphylococcus aureus</i>)
<i>saeR</i>	<i>Staphylococcus aureus exoprotein expression R</i> (Exoproteinexpression von <i>Staphylococcus aureus R</i>)

SarA	<i>staphylococcal accessory regulator A</i> (Hilfsregulator A von <i>Staphylococcus aureus</i>)
<i>sarA</i>	<i>staphylococcal accessory regulator A</i> (Gen) (Hilfsregulator A von <i>Staphylococcus aureus</i>)
Sbi	<i>Staphylococcus aureus binder of IgG</i> (IgG -Binder von <i>Staphylococcus aureus</i>)
SCIN	<i>staphylococcal complement inhibitor</i> (<i>Staphylokokken</i> -Komplement-Inhibitor)
SdrE	<i>serine-aspartate repeat protein E</i> (Serin-Aspartat Wiederholungsprotein E)
SEB	<i>staphylococcal enterotoxin B</i> (Enterotoxin B von <i>Staphylokokken</i>)
sek. Ak.	Sekundärantikörper
SeIX	<i>staphylococcal enterotoxin-like toxin X₁</i> (Enterotoxin-ähnliches Toxin X aus <i>Staphylokokken</i>)
<i>Siglec</i>	<i>sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin</i> (Anti-Sialinsäure-bindendes-Immunglobulin-ähnliches-Lektin)
SMIP.7-10	<i>small molecule immune potentiator 7-10</i> (kleinmolekularer Immunpotentiator 7-10)
SodA	Superoxid Dismutase A
SodM	Superoxid Dismutase M
SpA	<i>Staphylococcus aureus</i> Protein A
SPIN	<i>staphylococcal peroxidase inhibitor</i> (Peroxidase-Inhibitor von <i>Staphylokokken</i>)
<i>spx</i>	Redoxresponsiver Transkriptionsfaktor
<i>srrAB</i>	<i>staphylococcal respiratory response AB</i> (respiratorische Antwort von <i>Staphylokokken</i> AB)
SrtA	Sortase A
SSL10	<i>staphylococcal superantigen-like protein 10</i> (Superantigen-ähnliches Protein 10 von <i>Staphylokokken</i>)
SSL3	<i>staphylococcal superantigen-like protein 3</i> (Superantigen-ähnliches Protein 3 von <i>Staphylokokken</i>)
SSL5	<i>staphylococcal superantigen-like protein 5</i> (Superantigen-ähnliches Protein 5 von <i>Staphylokokken</i>)
SSL7	<i>staphylococcal superantigen-like protein 7</i> (Superantigen-ähnliches Protein 7 von <i>Staphylokokken</i>)
<i>tcaR</i>	Teicoplanin-assoziiertes örtliches Regulator
Tet38	Tetrazyklin Efflux Transporter 38

Tetrazyk	Tetrazyklin
TirS	Toll-ähnlicher und Interleukin-1 Rezeptor von <i>Staphylokokken</i>
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ1
TSST-1	toxisches Schocksyndrom-Toxin 1
VH3	schwere Variable Kette aus Genfamilie 3
vWbp	Von-Willebrand-Faktor-bindendes Protein
vWF	Von-Willebrand-Faktor
σ^B	Sigma-Faktor B

9.4 Sonstige

101L	101L_01602
168L	168L_00586
282L	282L_01373
<i>ADL</i>	<i>apodized dark low</i> (Apodisiertes dunkles Tief)
AG	Aktiengesellschaft
AmP(n)	antimikrobielle Peptide(n)
<i>ANOVA</i>	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
<i>ATCC</i>	<i>American Type Culture Collection</i> zu Deutsch: amerikanische Kulturtypensammlung
<i>B. sub.</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>BigTIFF</i>	<i>Big Tag Image File Format</i> (großes markiertes Bilddateienformat)
<i>BLAST</i>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Grundlegendes Werkzeug zur Suche und Angleichung)
B-Lymphozyt	<i>Bursa Fabricii</i> -Lymphozyt
c	Stoffmengenkonzentration
CA-	<i>community-acquired</i> (über die Kommune erhaltener)
CCD	<i>charge-coupled device</i> (ladungsgekoppeltes Bauteil)
Co. KG	Compagnie Kommanditgesellschaft
<i>DAMP</i>	<i>damage-associated molecular patterns</i> (Schadens-assoziierte molekulare Muster)
<i>DIC</i>	<i>differential interference contrast</i> (differenzieller Interferenzkontrast)
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DL 1	erster Durchlauf
DL 2	zweiter Durchlauf

<i>DLL</i>	<i>dark low low</i>	(dunkles tiefes Tief)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	
Dom.	Dominanz	
Dr.	Doktor	
DRSA-	Daptomycin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>	
durchschn.	durchschnittlich	
<i>D</i> -Segment	<i>Diversifying</i> -Segment	(diversifizierendes Segment)
Elu 1	erste Elution	
Elu 2	zweite Elution	
Elu 3	dritter Elution	
Elu 4	vierte Elution	
<i>ELWD</i>	<i>extra long working distance</i>	(extralanger Arbeitsabstand)
<i>EMBL-EBI</i>	<i>European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute</i> (Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie – Europäisches Institut für Bioinformatik)	
<i>ELISA</i>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)	
<i>ESKAPE</i>	Akronym für die Bakterienarten <i>Enterococcus faecium</i> (<i>E</i>), <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S</i>), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (<i>K</i>), <i>Acinetobacter baumannii</i> (<i>A</i>), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>P</i>) und die Gattung der <i>Enterobakterien</i> (<i>E</i>)	
<i>F(ab)₂</i>	<i>fragment, antigen binding, full</i> (Antigenbindendes Fragment, vollständig)	
<i>Fab</i>	<i>fragment, antigen binding, single</i> (Antigenbindendes Fragment, einzeln)	
<i>FACS</i>	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung oder Durchflusszytometrie	
<i>Fc</i>	<i>fragment crystallizable</i>	(kristallisierbares Fragment)
GFI	Gesamtfluoreszenzintensität	
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung	
H	Häufigkeit	
<i>HA-</i>	<i>healthcare-acquired</i> (über das Gesundheitswesen erhaltene erhaltener)	
Harz	stationäre Phase während der Affinitätschromatographie	
<i>HPLC</i>	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)	
<i>ImageJ</i>	<i>Image Processing and Analysis in Java</i> (Bildverarbeitung und Analyse in Java)	

IMT	Institut für Mikrostrukturtechnik
<i>I-TASSER</i>	<i>Iterative Threading ASSEmbly Refinement</i> (Iterative Verfeinerung durch Gewindemontage)
<i>IQR</i>	<i>interquartile range</i> (Interquartilsabstand)
<i>JPG</i>	<i>Joint Photographic Experts Group</i> (Gemeinschaftliche Fotografenexpertengruppe)
J-Segment	<i>Joining-Segment</i> (Verbindungs-Segment)
K	Kontrolle
KE2775	KE2775_01373
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
KIT	Karlsruher Institut für Technologie
Kons.	Konservierungsgrad
LRSA	Linezolid-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
M	Marker für Proteingrößen
M1 Makrophage	Typ 1 Makrophage
M2 Makrophage	Typ 2 Makrophage
<i>MAPIX</i>	<i>Microarray Image Analysis Software</i> (Analysesoftware für Mikroarraybilder)
<i>MIC</i>	<i>Minimum inhibitory concentration</i> (minimalen inhibitorischen Konzentration)
MRSA	Methicillin-resistenten <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
<i>MSCRAMM</i>	<i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i> (Mikrobielle Oberflächenkomponenten zur Erkennung von adhäsiven Matrixmolekülen)
MSSA	Methicillin-sensitiver <i>Staphylococcus aureus</i>
N	Stichprobenumfang
NK	Negativkontrolle
Nr.	Nummer
OPTA	Opsonophagozytischer Tötungsassay
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>PAMP</i>	<i>pathogen-associated molecular pattern</i> (Pathogen-assoziierte molekulares Muster)
Pos.	Position
PK	Positivkontrolle

Produktnr.	Produktnummer
Prof.	Professor
<i>PRR</i>	<i>pattern recognition receptors</i> (Mustererkennungsrezeptoren)
PRSA	Penicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>QTOF</i>	<i>quadrupole time-of-flight</i> (quadrupole Flugzeit)
RI	relative Intensität
<i>RGB-S Reporter</i>	<i>red green blue Stress Reporter</i> (rot-grün-blauer Stressreporter)
RFI	relative Fluoreszenzintensität
SA	Standardabweichung
<i>SAPS</i>	<i>School of Advanced Professional Studies</i> (Schule für erweiterte professionelle Studien)
SARS-CoV-2	Schweres akutes respiratorisches Syndrom – Coronavirus 2
<i>scFv</i>	<i>single chain variable fragment</i> (variables Einzelketten-Fragment)
<i>SERAM</i>	<i>secretable expanded repertoire adhesive molecules</i> (sekretierbare Adhäsionsmoleküle mit erweitertem Repertoire)
<i>TASQ</i> [®]	<i>target analysis for screening and quantitation</i> (Zielanalyse für Screening und Quantifizierung)
T _H 17-Zellen	Typ 17 T-Helferzellen
T _H 1-Lymphozyt	Typ 1 T-Helferzellen
T _H 2-Zellen	Typ 2 T-Helferzellen
<i>TIFF</i>	<i>Tag Image File Format</i> (markiertes Bilddateienformat)
T-Lymphozyt	Thymus-Lymphozyt
TU Braunschweig	Technische Universität Braunschweig
<i>UPLC</i>	<i>ultra performance liquid chromatography</i> (Ultraleistungsflüssigkeitschromatographie)
VISA	Vancomycin-intermediärer <i>Staphylococcus aureus</i>
VRSA	Vancomycin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
V-Segment	<i>Variable</i> -Segment (variables Segment)
XLS	Excel Spreadsheet (<i>Excel</i> Kalkulationstabelle)
~	ungefähr
≥	größer oder gleich
α	Signifikanzniveau

Δ	Differenz
ϵ	molarer Absorptionskoeffizient
λ	Wellenlänge

9.5 Einheiten

%	Prozent
(v/v)	Volumen-
(w/v)	Gewichts-
"	Zoll
°C	Celsius
$\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$	photosynthetische Photonenflussdichte
‰	Promille
‱	Promyriade
A	Ampere
Å	Ångström
Abs	Absorption
AU	<i>arbitrary unit</i> (willkürliche Einheit)
Bar	physikalische Größe für Druck
Bit	<i>binary digit</i> (Binärzahl)
bp	Basenpaare
BpS	Bilder pro Sekunde
Da	Dalton
dpi	<i>dots per inch</i> (Punkte pro Zoll)
g	Gramm
Hz	Hertz
ISO-Zahl	Internationale Messeinheit nach DIN ISO 5800:2003-11
KbE	Kolonienbildende Einheiten
L	Liter
m	Meter
M	Molar
mol	Stoffmenge
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MFU	<i>McFarland unit</i> (McFarland Einheit)

OD _x	Optische Dichte bei Wellenlänge x	
pH	<i>potential of hydrogen</i>	(Wasserstoffpotential)
ppt	<i>parts per trillion</i>	(Teile pro Billionen)
Px	Pixel	
RFU	<i>relative fluorescence units</i>	(relative Fluoreszenzeinheiten)
RLU	<i>relativ light units</i>	(relative Lichteinheit)
RZB	relative Zentrifugalbeschleunigung	
SI	<i>Système international d'unités</i> (internationale Standardeinheit)	
U	<i>units</i>	(Einheit)
UpM	Umdrehungen pro Minute	
V	Volt	
W	Watt	
X	Vergrößerungs- oder Verdünnungsfaktor	
x	Vielfaches	

9.6 Größenordnungen

MSI	Mega-	(10 ⁶)
KSI	Kilo-	(10 ³)
cSI	Centi-	(10 ⁻²)
mSI	Milli-	(10 ⁻³)
μSI	Mikro-	(10 ⁻⁶)
nSI	Nano-	(10 ⁻⁹)
pSI	Pico-	(10 ⁻¹²)
fSI	Femto-	(10 ⁻¹⁵)
aSI	Atto-	(10 ⁻¹⁸)
SI ²	Quadrat	
SI ³	Kubik	
Mio.	Millionen	
Mrd.	Milliarden	
Bill.	Billionen	

10 Literaturverzeichnis

- [1.] Maayan-Metzger, A. und Strauss, T., *et al.*, Clinical evaluation of early acquisition of *Staphylococcus aureus* carriage by newborns. *Int J Infect Dis*, 2017. **64**: p. 9-14.
- [2.] Liesenborghs, L. und Verhamme, P., *et al.*, *Staphylococcus aureus*, master manipulator of the human hemostatic system. *J Thromb Haemost*, 2018. **16**(3): p. 441-454.
- [3.] Thomsen, I. P., Liu, G. Y., Targeting fundamental pathways to disrupt *Staphylococcus aureus* survival: clinical implications of recent discoveries. *JCI Insight*, 2018. **3**(5).
- [4.] van Belkum, A., Staphylococcal colonization and infection: homeostasis versus disbalance of human (innate) immunity and bacterial virulence. *Curr Opin Infect Dis*, 2006. **19**(4): p. 339-44.
- [5.] van Belkum, A. und Melles, D. C., *et al.*, Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol*, 2009. **9**(1): p. 32-47.
- [6.] Stolz, S. J. und Davis, J. P., *et al.*, Development of serum antibody to toxic shock toxin among individuals with toxic shock syndrome in Wisconsin. *J Infect Dis*, 1985. **151**(5): p. 883-9.
- [7.] Holtfreter, S. und Roschack, K., *et al.*, *Staphylococcus aureus* carriers neutralize superantigens by antibodies specific for their colonizing strain: a potential explanation for their improved prognosis in severe sepsis. *J Infect Dis*, 2006. **193**(9): p. 1275-8.
- [8.] Uebele, J. und Stein, C., *et al.*, Antigen delivery to dendritic cells shapes human CD4(+) and CD8(+) T cell memory responses to *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathogens*, 2017. **13**(5).
- [9.] McGuinness, W. A. und Kobayashi, S. D., *et al.*, Evasion of Neutrophil Killing by *Staphylococcus aureus*. *Pathogens*, 2016. **5**(1).
- [10.] Foster, T. J. und Geoghegan, J. A., *et al.*, Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol*, 2014. **12**(1): p. 49-62.
- [11.] Miller, L. S. und Fowler, V. G., *et al.*, Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus* invasive infections: Evidence based on human immunity, genetics and bacterial evasion mechanisms. *FEMS Microbiol Rev*, 2020. **44**(1): p. 123-153.
- [12.] Lowy, F. D., *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 1998. **339**(8): p. 520-32.
- [13.] Stewardson, A. J. und Allignol, A., *et al.*, The health and economic burden of bloodstream infections caused by antimicrobial-susceptible and non-susceptible Enterobacteriaceae and *Staphylococcus aureus* in European hospitals, 2010 and 2011: a multicentre retrospective cohort study. *Euro Surveill*, 2016. **21**(33).
- [14.] El Atrouni, W. I. und Knoll, B. M., *et al.*, Temporal trends in the incidence of *Staphylococcus aureus* bacteremia in Olmsted County, Minnesota, 1998 to 2005: a population-based study. *Clin Infect Dis*, 2009. **49**(12): p. e130-8.
- [15.] Rhee, Y. und Aroutcheva, A., *et al.*, Evolving Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2015. **36**(12): p. 1417-22.
- [16.] Kourtis, A. P. und Hatfield, K., *et al.*, Vital Signs: Epidemiology and Recent Trends in Methicillin-Resistant and in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections - United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2019. **68**(9): p. 214-219.
- [17.] Rubin, R. J. und Harrington, C. A., *et al.*, The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City hospitals. *Emerging Infectious Diseases*, 1999. **5**(1): p. 9-17.
- [18.] Goetghebeur, M. und Landry, P. A., *et al.*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A public health issue with economic consequences. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2007. **18**(1): p. 27-34.
- [19.] Zhu, L., A Review of *Staphylococcus aureus* and the Emergence of Drug-Resistant Problem. *Advances in Microbiology*, 2018. **08**: p. 65-76.
- [20.] Köck, R. und Mellmann, A., *et al.*, The epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Germany. *Dtsch Arztebl Int*, 2011. **108**(45): p. 761-7.
- [21.] Dosani, S., Penicillin Man: Alexander Fleming and the Antibiotic Revolution. *BMJ*. 2005 Jan 1;330(7481):50.
- [22.] Davies, J., Davies, D., Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2010. **74**(3): p. 417-33.
- [23.] North, E. A., Christie, R., Acquired resistance of staphylococci to the action of penicillin. *Med J Aust*, 1946. **1**: p. 176-9.
- [24.] Borowski, J. und Kamieńska, K., *et al.*, Methicillin-resistant *Staphylococci*. *British Medical Journal*, 1964. **1**(5388): p. 983.
- [25.] Prestinaci, F. und Pezzotti, P., *et al.*, Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health*, 2015. **109**(7): p. 309-18.
- [26.] Nimmo, G. R., USA300 abroad: global spread of a virulent strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2012. **18**(8): p. 725-734.
- [27.] Jones Ronald, N. und Moeck, G., *et al.*, Results from Oritavancin Resistance Surveillance Programs (2011 to 2014): Clarification for Using Vancomycin as a Surrogate To Infer Oritavancin Susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016. **60**(5): p. 3174-3177.
- [28.] Bagnoli, F. und Bertholet, S., *et al.*, Inferring reasons for the failure of *Staphylococcus aureus* vaccines in clinical trials. *Front Cell Infect Microbiol*, 2012. **2**: p. 16.
- [29.] Fowler, V. G., Jr., Proctor, R. A., Where does a *Staphylococcus aureus* vaccine stand? *Clin Microbiol Infect*, 2014. **20 Suppl 5**(0 5): p. 66-75.
- [30.] Zarb, P. und Coignard, B., *et al.*, The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. *Euro Surveill*, 2012. **17**(46).
- [31.] Cassini, A. und Plachouras, D., *et al.*, Burden of Six Healthcare-Associated Infections on European Population Health: Estimating Incidence-Based Disability-Adjusted Life Years through a Population Prevalence-Based Modelling Study. *Plos Medicine*, 2016. **13**(10).
- [32.] Tattévin, P. und Schwartz, B. S., *et al.*, Concurrent epidemics of skin and soft tissue infection and bloodstream infection due to community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*, 2012. **55**(6): p. 781-8.
- [33.] Suaya, J. A. und Mera, R. M., *et al.*, Incidence and cost of hospitalizations associated with *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections in the United States from 2001 through 2009. *BMC Infect Dis*, 2014. **14**: p. 296.

- [34.] Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis. 2017, *World Health Organization*.
- [35.] Antibacterial agents in preclinical development: an open access database. 2019, *World Health Organization: Geneva*.
- [36.] Kobayashi, S. D., DeLeo, F. R., Towards a Monoclonal Antibody-Based Therapy for Prevention and Treatment of *Staphylococcus aureus* Infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 2019. **219**(6): p. 848-850.
- [37.] Gorwitz, R. J. und Kruszon-Moran, D., *et al.*, Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. *J Infect Dis*, 2008. **197**(9): p. 1226-34.
- [38.] Kolata, J. und Bode, L. G., *et al.*, Distinctive patterns in the human antibody response to *Staphylococcus aureus* bacteremia in carriers and non-carriers. *Proteomics*, 2011. **11**(19): p. 3914-27.
- [39.] Bröker, B. M. und Holtfreter, S., *et al.*, Immune control of *Staphylococcus aureus* - regulation and counter-regulation of the adaptive immune response. *Int J Med Microbiol*, 2014. **304**(2): p. 204-14.
- [40.] Proctor, R. A., Is there a future for a *Staphylococcus aureus* vaccine? *Vaccine*, 2012. **30**(19): p. 2921-2927.
- [41.] Weber, L. K. und Palermo, A., *et al.*, Single amino acid fingerprinting of the human antibody repertoire with high density peptide arrays. *Journal of Immunological Methods*, 2017. **443**: p. 45-54.
- [42.] Weber, L., Deciphering antibody fingerprints with high density peptide arrays: From methodological development toward disease etiology. 2017, *Karlsruher Institut für Technologie (KIT)*.
- [43.] Popov, R. und Shankara, G. K., *et al.*, Stochastic deposition of amino acids into microcavities via microparticles. *Scientific Reports*, 2019. **9**(1): p. 16468.
- [44.] Zhou, Z., Entwicklung einer Mikrofluidik-basierten Eine-Kavität-ein-Peptid-Methode. 2022, *Karlsruher Institut für Technologie (KIT)*.
- [45.] Althunon, D. und Breitling, F., *et al.*, Ultra-hochdichte Oligomerarrays und Verfahren zu deren Herstellung. 2015, *DPMA: Deutschland*.
- [46.] Palermo, A. und Weber, L. K., *et al.*, Identification of a Tetanus Toxin Specific Epitope in Single Amino Acid Resolution. *Biotechnol J*, 2017. **12**(10).
- [47.] Weber, L. K. und Isse, A., *et al.*, Antibody fingerprints in lyme disease deciphered with high density peptide arrays. *Engineering in life sciences*, 2017. **17**(10): p. 1078-1087.
- [48.] Rentschler, S., Investigation of the Human Antibody Response to an staphylococcal antigen with High Density Peptide Arrays. 2018, *Karlsruher Institut für Technologie: Nicht publiziert*.
- [49.] Geysen, H. M. und Rodda, S. J., *et al.*, Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *Journal of Immunological Methods*, 1987. **102**(2): p. 259-274.
- [50.] Falk, F. und Zhou, Z., *et al.*, Patientenantikörper als Informationsquelle. *BIOspektrum*, 2020. **26**: p. 556-558.
- [51.] Murphy, K., Weaver, C., *Janeway Immunologie*. 2018: *Springer*.
- [52.] Josefson, D., Bacteria killer found in sweat. *BMJ*. 2001 Nov 24;323(7323):1206.
- [53.] Li, F. und Weir, M. D., *et al.*, Effect of salivary pellicle on antibacterial activity of novel antibacterial dental adhesives using a dental plaque microcosm biofilm model. *Dent Mater*, 2014. **30**(2): p. 182-91.
- [54.] Cullen, T. W. und Schofield, W. B., *et al.*, Gut microbiota. Antimicrobial peptide resistance mediates resilience of prominent gut commensals during inflammation. *Science*, 2015. **347**(6218): p. 170-5.
- [55.] Hons, M., Sixt, M., The lymph node filter revealed. *Nature Immunology*, 2015. **16**(4): p. 338-340.
- [56.] Sherwood, E. R. und Burelbach, K. R., *et al.*, Innate Immune Memory and the Host Response to Infection. *The Journal of Immunology*, 2022. **208**(4): p. 785.
- [57.] Thammavongsa, V. und Kim, H. K., *et al.*, Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nature Reviews Microbiology*, 2015. **13**(9): p. 529-543.
- [58.] Tang, Y. Q. und Yeaman, M. R., *et al.*, Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun*, 2002. **70**(12): p. 6524-33.
- [59.] Keller, M. D. und Ching, K. L., *et al.*, Decoy exosomes provide protection against bacterial toxins. *Nature*, 2020. **579**(7798): p. 260-264.
- [60.] Cunnion, K. M., Frank, M. M., Complement activation influences *Staphylococcus aureus* adherence to endothelial cells. *Infect Immun*, 2003. **71**(3): p. 1321-7.
- [61.] Abu-Humaidan, A. H. und Elvén, M., *et al.*, Persistent Intracellular *Staphylococcus aureus* in Keratinocytes Lead to Activation of the Complement System with Subsequent Reduction in the Intracellular Bacterial Load. *Frontiers in Immunology*, 2018. **9**.
- [62.] Dancy, J. T. und Deubelbeiss, K. A., *et al.*, Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest*, 1976. **58**(3): p. 705-15.
- [63.] Bainton, D. F. und Ulliyot, J. L., *et al.*, The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med*, 1971. **134**(4): p. 907-34.
- [64.] Rørvig, S. und Honore, C., *et al.*, Ficolin-1 is present in a highly mobilizable subset of human neutrophil granules and associates with the cell surface after stimulation with fMLP. *J Leukoc Biol*, 2009. **86**(6): p. 1439-49.
- [65.] Mora-Jensen, H. und Jendholm, J., *et al.*, Technical advance: immunophenotypical characterization of human neutrophil differentiation. *J Leukoc Biol*, 2011. **90**(3): p. 629-34.
- [66.] Manley, H. R. und Keightley, M. C., *et al.*, The Neutrophil Nucleus: An Important Influence on Neutrophil Migration and Function. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 2867.
- [67.] Borregaard, N. und Kjeldsen, L., *et al.*, Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils. *J Clin Invest*, 1992. **90**(1): p. 86-96.
- [68.] Pellme, S. und Morgelin, M., *et al.*, Localization of human neutrophil interleukin-8 (CXCL-8) to organelle(s) distinct from the classical granules and secretory vesicles. *Journal of Leukocyte Biology*, 2006. **79**(3): p. 564-573.
- [69.] Pillay, J. und den Braber, I., *et al.*, In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, 2010. **116**(4): p. 625-7.
- [70.] Lahoz-Beneytez, J. und Elemans, M., *et al.*, Human neutrophil kinetics: modeling of stable isotope labeling data supports short blood neutrophil half-lives. *Blood*, 2016. **127**(26): p. 3431-8.
- [71.] Chabra, S., Fetal and Neonatal Physiology, 3rd ed. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 2005. **159**(4): p. 402-403.

- [72.] Kwon, M. S., Vergleichende Untersuchungen von Eigenschaften neutrophiler Granulozyten. *Hannover, Tierärztl. Hochsch.*, 1987.
- [73.] Amulic, B. und Cazalet, C., *et al.*, Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annual Review of Immunology*, 2012. **30**(1): p. 459-489.
- [74.] Bierman, H. R. und Kelly, K. H., *et al.*, The Pulmonary Circulation as a Source of Leucocytes and Platelets in Man. *Science*, 1951. **114**(2959): p. 276-277.
- [75.] Borregaard, N., Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 2010. **33**(5): p. 657-70.
- [76.] Nauseef, W. M., Borregaard, N., Neutrophils at work. *Nat Immunol*, 2014. **15**(7): p. 602-11.
- [77.] Xie, X. und Shi, Q., *et al.*, Single-cell transcriptome profiling reveals neutrophil heterogeneity in homeostasis and infection. *Nat Immunol*, 2020. **21**(9): p. 1119-1133.
- [78.] Sundd, P. und Gutierrez, E., *et al.*, 'Slings' enable neutrophil rolling at high shear. *Nature*, 2012. **488**(7411): p. 399-403.
- [79.] Kolaczowska, E., Kubes, P., Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(3): p. 159-75.
- [80.] Ramachandran, V. und Williams, M., *et al.*, Dynamic alterations of membrane tethers stabilize leukocyte rolling on P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(37): p. 13519-24.
- [81.] Woodfin, A. und Voisin, M. B., *et al.*, Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Curr Opin Hematol*, 2010. **17**(1): p. 9-17.
- [82.] Nourshargh, S. und Hordijk, P. L., *et al.*, Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. **11**(5): p. 366-78.
- [83.] Morikis, V. A., Simon, S. I., Neutrophil Mechanosignaling Promotes Integrin Engagement With Endothelial Cells and Motility Within Inflamed Vessels. *Frontiers in Immunology*, 2018. **9**.
- [84.] Zarbock, A., Ley, K., Neutrophil adhesion and activation under flow. *Microcirculation*, 2009. **16**(1): p. 31-42.
- [85.] Yee, J., Christou, N. V., Neutrophil priming by lipopolysaccharide involves heterogeneity in calcium-mediated signal transduction. Studies using fluo-3 and flow cytometry. *J Immunol*, 1993. **150**(5): p. 1988-97.
- [86.] Sengeløv, H. und Follin, P., *et al.*, Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *J Immunol*, 1995. **154**(8): p. 4157-65.
- [87.] Perussia, B. und Dayton, E. T., *et al.*, Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG₁ on human monocytic and myeloid cells. *Journal of Experimental Medicine*, 1983. **158**(4): p. 1092-1113.
- [88.] Repp, R. und Valerius, T., *et al.*, Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, 1991. **78**(4): p. 885-9.
- [89.] Ward, R. A. und Nakamura, M., *et al.*, Priming of the neutrophil respiratory burst involves p38 mitogen-activated protein kinase-dependent exocytosis of flavocytochrome b558-containing granules. *J Biol Chem*, 2000. **275**(47): p. 36713-9.
- [90.] Condliffe, A. M. und Davidson, K., *et al.*, Sequential activation of class IB and class IA PI3K is important for the primed respiratory burst of human but not murine neutrophils. *Blood*, 2005. **106**(4): p. 1432-40.
- [91.] Carlos, R., Eileen, U.-Q., Neutrophil Activation by Antibody Receptors, in *Neutrophils*, K. Maittham, Editor. 2018, *IntechOpen: Rijeka*. p. Ch. 3.
- [92.] Miralda, I. und Uriarte, S. M., *et al.*, Multiple Phenotypic Changes Define Neutrophil Priming. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017. **7**: p. 217.
- [93.] Baggiolini, M. und Hirsch, J. G., *et al.*, Resolution of granules from rabbit heterophil leukocytes into distinct populations by zonal sedimentation. *J Cell Biol*, 1969. **40**(2): p. 529-41.
- [94.] Bullen, J. J., Armstrong, J. A., The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leucocytes. *Immunology*, 1979. **36**(4): p. 781-91.
- [95.] Segal, A. W., Jones, O. T., The subcellular distribution and some properties of the cytochrome b component of the microbicidal oxidase system of human neutrophils. *The Biochemical journal*, 1979. **182**(1): p. 181-188.
- [96.] Hibbs, M. S., Bainton, D. F., Human neutrophil gelatinase is a component of specific granules. *J Clin Invest*, 1989. **84**(5): p. 1395-402.
- [97.] Udby, L., Borregaard, N., Subcellular fractionation of human neutrophils and analysis of subcellular markers. *Methods Mol Biol*, 2007. **412**: p. 35-56.
- [98.] Vandenbroucke-Grauls, C. M. und Thijssen, H. M., *et al.*, Interaction between human polymorphonuclear leucocytes and *Staphylococcus aureus* in the presence and absence of opsonins. *Immunology*, 1984. **52**(3): p. 427-35.
- [99.] Verbrugh, H. A. und Van Dijk, W. C., *et al.*, *Staphylococcus aureus* opsonization mediated via the classical and alternative complement pathways. A kinetic study using MgEGTA chelated serum and human sera deficient in IgG and complement factors C1s and C2. *Immunology*, 1979. **36**(3): p. 391-7.
- [100.] Schiff, D. E. und Rae, J., *et al.*, Increased phagocyte Fc gammaRI expression and improved Fc gamma-receptor-mediated phagocytosis after in vivo recombinant human interferon-gamma treatment of normal human subjects. *Blood*, 1997. **90**(8): p. 3187-94.
- [101.] Verhoef, J. und Peterson, P., *et al.*, Opsonic requirements for staphylococcal phagocytosis. Heterogeneity among strains. *Immunology*, 1977. **33**(2): p. 191-7.
- [102.] Spaan, A. N. und Surewaard, B. G., *et al.*, Neutrophils versus *Staphylococcus aureus*: a biological tug of war. *Annu Rev Microbiol*, 2013. **67**: p. 629-50.
- [103.] Sengeløv, H. und Kjeldsen, L., *et al.*, Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol*, 1993. **150**(4): p. 1535-43.
- [104.] Weiss, G., Schaible, U. E., Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Rev*, 2015. **264**(1): p. 182-203.
- [105.] Palmer, L. D., Skaar, E. P., Transition Metals and Virulence in Bacteria. *Annu Rev Genet*, 2016. **50**: p. 67-91.
- [106.] Sheldon, J. R., Skaar, E. P., Metals as phagocyte antimicrobial effectors. *Curr Opin Immunol*, 2019. **60**: p. 1-9.
- [107.] Striz, I., Trebichavský, I., Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiol Res*, 2004. **53**(3): p. 245-53.
- [108.] Zackular, J. P. und Chazin, W. J., *et al.*, Nutritional Immunity: S100 Proteins at the Host-Pathogen Interface. *J Biol Chem*, 2015. **290**(31): p. 18991-8.
- [109.] Wang, S. und Song, R., *et al.*, S100A8/A9 in Inflammation. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1298.

- [110.] Tang, X. und Basavarajappa, D., *et al.*, P2X7 Receptor Regulates Internalization of Antimicrobial Peptide LL-37 by Human Macrophages That Promotes Intracellular Pathogen Clearance. *J Immunol*, 2015. **195**(3): p. 1191-201.
- [111.] Senthilmohan, R., Kettle, A. J., Bromination and chlorination reactions of myeloperoxidase at physiological concentrations of bromide and chloride. *Arch Biochem Biophys*, 2006. **445**(2): p. 235-44.
- [112.] Koch, T. K., Novel evasion strategies of *Staphylococcus aureus* against the human innate immune response. 2013, *Friedrich-Schiller-Universität Jena*.
- [113.] Timár, C. I. und Lorincz, A. M., *et al.*, Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood*, 2013. **121**(3): p. 510-8.
- [114.] Hess, C. und Sadallah, S., *et al.*, Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *J Immunol*, 1999. **163**(8): p. 4564-73.
- [115.] Angelillo-Scherrer, A. und Weber, C., *et al.*, Leukocyte-Derived Microparticles in Vascular Homeostasis. *Circulation Research*, 2012. **110**(2): p. 356-369.
- [116.] Mesri, M., Altieri, D. C., Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem*, 1999. **274**(33): p. 23111-8.
- [117.] Watanabe, J. und Marathe, G. K., *et al.*, Endotoxins Stimulate Neutrophil Adhesion Followed by Synthesis and Release of Platelet-activating Factor in Microparticles*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(35): p. 33161-33168.
- [118.] Gasser, O., Schifferli, J. A., Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood*, 2004. **104**(8): p. 2543-8.
- [119.] Dalli, J. und Norling, L. V., *et al.*, Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood*, 2008. **112**(6): p. 2512-9.
- [120.] Pluskota, E. und Woody, N. M., *et al.*, Expression, activation, and function of integrin α M β 2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood*, 2008. **112**(6): p. 2327-2335.
- [121.] Brinkmann, V. und Reichard, U., *et al.*, Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
- [122.] Thomas, M. P. und Whangbo, J., *et al.*, Leukocyte protease binding to nucleic acids promotes nuclear localization and cleavage of nucleic acid binding proteins. *J Immunol*, 2014. **192**(11): p. 5390-7.
- [123.] Nirmala, J. G., Lopus, M., Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biol Toxicol*, 2020. **36**(2): p. 145-164.
- [124.] Monteith, A. J. und Miller, J. M., *et al.*, Neutrophil extracellular traps enhance macrophage killing of bacterial pathogens. *Sci Adv*, 2021. **7**(37): p. eabj2101.
- [125.] Clark, S. R. und Ma, A. C., *et al.*, Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*, 2007. **13**(4): p. 463-9.
- [126.] Odobasic, D. und Kitching, A. R., *et al.*, Neutrophil myeloperoxidase regulates T-cell-driven tissue inflammation in mice by inhibiting dendritic cell function. *Blood*, 2013. **121**(20): p. 4195-204.
- [127.] Manz, M. G., Boettcher, S., Emergency granulopoiesis. *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**(5): p. 302-14.
- [128.] Honda, T. und Uehara, T., *et al.*, Neutrophil left shift and white blood cell count as markers of bacterial infection. *Clin Chim Acta*, 2016. **457**: p. 46-53.
- [129.] Ley, K. und Hoffman, H. M., *et al.*, Neutrophils: New insights and open questions. *Science Immunology*, 2018. **3**(30): p. eaat4579.
- [130.] Mayer-Scholl, A. und Averhoff, P., *et al.*, How do neutrophils and pathogens interact? *Curr Opin Microbiol*, 2004. **7**(1): p. 62-6.
- [131.] Archer, N. K. und Harro, J. M., *et al.*, Clearance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage is T cell dependent and mediated through interleukin-17A expression and neutrophil influx. *Infect Immun*, 2013. **81**(6): p. 2070-5.
- [132.] Miller, L. S., Simon, S. I., Neutrophils in hot pursuit of MRSA in the lymph nodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018. **115**(10): p. 2272-2274.
- [133.] Styrts, B., Klempner, M. S., Effects of pH on killing of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by constituents of the neutrophil phagolysosome. *J Med Microbiol*, 1988. **25**(2): p. 101-7.
- [134.] Matute, J. D. und Arias, A. A., *et al.*, A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood*, 2009. **114**(15): p. 3309-15.
- [135.] Beavers, W. N. und Monteith, A. J., *et al.*, Arachidonic Acid Kills *Staphylococcus aureus* through a Lipid Peroxidation Mechanism. *mBio*, 2019. **10**(5).
- [136.] Knapp, H. R., Melly, M. A., Bactericidal effects of polyunsaturated fatty acids. *J Infect Dis*, 1986. **154**(1): p. 84-94.
- [137.] Müller, S. und Faulhaber, A., *et al.*, The endolysosomal cysteine cathepsins L and K are involved in macrophage-mediated clearance of *Staphylococcus aureus* and the concomitant cytokine induction. *Faseb j*, 2014. **28**(1): p. 162-75.
- [138.] Weinrauch, Y. und Elsbach, P., *et al.*, The potent anti-*Staphylococcus aureus* activity of a sterile rabbit inflammatory fluid is due to a 14-kD phospholipase A2. *J Clin Invest*, 1996. **97**(1): p. 250-7.
- [139.] Koprivnjak, T. und Weidenmaier, C., *et al.*, Wall teichoic acid deficiency in *Staphylococcus aureus* confers selective resistance to mammalian group IIA phospholipase A(2) and human beta-defensin 3. *Infect Immun*, 2008. **76**(5): p. 2169-76.
- [140.] Kavanaugh, J. S. und Leidal, K. G., *et al.*, Cathepsin G Degrades *Staphylococcus aureus* Biofilms. *J Infect Dis*, 2021. **223**(11): p. 1865-1869.
- [141.] Li, C. und Li, H., *et al.*, Interleukin-33 increases antibacterial defense by activation of inducible nitric oxide synthase in skin. *PLoS Pathog*, 2014. **10**(2): p. e1003918.
- [142.] Chapman, A. L. und Hampton, M. B., *et al.*, Chlorination of bacterial and neutrophil proteins during phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(12): p. 9757-62.
- [143.] Klebanoff, S. J. und Kettle, A. J., *et al.*, Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J Leukoc Biol*, 2013. **93**(2): p. 185-98.
- [144.] Parker, H. und Albrett, A. M., *et al.*, Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide. *J Leukoc Biol*, 2012. **91**(3): p. 369-76.

- [145.] Monteith Andrew, J. und Miller Jeanette, M., *et al.*, Mitochondrial Calcium Uniporter Affects Neutrophil Bactericidal Activity during *Staphylococcus aureus* Infection. *Infection and Immunity*, 2022. **90**(2): p. e00551-21.
- [146.] Meyle, E. und Stroh, P., *et al.*, Destruction of bacterial biofilms by polymorphonuclear neutrophils: relative contribution of phagocytosis, DNA release, and degranulation. *Int J Artif Organs*, 2010. **33**(9): p. 608-20.
- [147.] Hepburn, L. und Prajsnar, T. K., *et al.*, Innate immunity. A Spaetzle-like role for nerve growth factor β in vertebrate immunity to *Staphylococcus aureus*. *Science*, 2014. **346**(6209): p. 641-646.
- [148.] Brandt, S. L. und Putnam, N. E., *et al.*, Innate immunity to *S. aureus*: evolving paradigms in soft tissue and invasive infections. *The Journal of Immunology*, 2018. **200**(12): p. 3871.
- [149.] Femling, J. K. und Nauseef, W. M., *et al.*, Synergy between extracellular group IIA phospholipase A2 and phagocyte NADPH oxidase in digestion of phospholipids of *Staphylococcus aureus* ingested by human neutrophils. *J Immunol*, 2005. **175**(7): p. 4653-61.
- [150.] Lu, T. und Porter, A. R., *et al.*, Phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by human neutrophils. *J Innate Immun*, 2014. **6**(5): p. 639-49.
- [151.] Rogers, D. E., Tompsett, R., The survival of *staphylococci* within human leukocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 1952. **95**(2): p. 209-230.
- [152.] Voyich, J. M. und Braughton, K. R., *et al.*, Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. *J Immunol*, 2005. **175**(6): p. 3907-19.
- [153.] Kobayashi, S. D. und Braughton, K. R., *et al.*, Rapid neutrophil destruction following phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *J Innate Immun*, 2010. **2**(6): p. 560-75.
- [154.] McCarthy, A. J., Lindsay, J. A., Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions. *BMC Microbiology*, 2010. **10**: p. 173.
- [155.] Archer, N. K. und Mazaitis, M. J., *et al.*, *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*, 2011. **2**(5): p. 445-59.
- [156.] Gallagher, R. und Collins, S., *et al.*, Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 1979. **54**(3): p. 713-33.
- [157.] Collins, S. J. und Ruscetti, F. W., *et al.*, Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978. **75**(5): p. 2458-62.
- [158.] Breitman, T. R. und Collins, S. J., *et al.*, Replacement of serum by insulin and transferrin supports growth and differentiation of the human promyelocytic cell line, HL-60. *Exp Cell Res*, 1980. **126**(2): p. 494-8.
- [159.] Sun, H., Wang, Y., Apoptosis of human leukemic HL-60 cells induced to differentiate by treatment with RA or DMSO. *Cell Research*, 1995. **5**(2): p. 181-186.
- [160.] Dinh, H. Q. und Eggert, T., *et al.*, Coexpression of *CD71* and *CD117* Identifies an Early Unipotent Neutrophil Progenitor Population in Human Bone Marrow. *Immunity*, 2020. **53**(2): p. 319-334.e6.
- [161.] Aanei, C. M., Jacob, M. C., Veyrat-Masson, R., Picot, T., Rosenthal-Allier, M. A., Lhoumeau, A. C., Ticchioni, M., Dumezy, F., Campos Catafal, L., Database-guided Flow-cytometry for Evaluation of Bone Marrow Myeloid Cell Maturation. *J. Vis.*, 2018. **Exp.** (141)(e57867).
- [162.] Paschall, A. V. und Middleton, D. R., *et al.*, Opsonophagocytic Killing Assay to Assess Immunological Responses Against Bacterial Pathogens. *J Vis Exp*, 2019(146).
- [163.] Bello, A. B. und Kim, D., *et al.*, Engineering and Functionalization of Gelatin Biomaterials: From Cell Culture to Medical Applications. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2020. **26**(2): p. 164-180.
- [164.] Wood, W. B., Jr. und Smith, M. R., *et al.*, Studies on the mechanism of recovery in pneumococcal pneumonia : IV . The mechanism of phagocytosis in the absence of antibody. *Journal of Experimental Medicine*, 1946. **84**(4): p. 387-402.
- [165.] Ofek, I. und Goldhar, J., *et al.*, Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annual Review of Microbiology*, 1995. **49**(1): p. 239-276.
- [166.] Gordon, D. L., Rice, J. L., Opsonin-dependent and independent surface phagocytosis of *S. aureus* proceeds independently of complement and complement receptors. *Immunology*, 1988. **64**(4): p. 709-14.
- [167.] Alberts, B., Molecular biology of the cell. 2017: *WW Norton & Company*.
- [168.] Puga, I. und Cols, M., *et al.*, B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol*, 2011. **13**(2): p. 170-80.
- [169.] Roco, J. A. und Mesin, L., *et al.*, Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers. *Immunity*, 2019. **51**(2): p. 337-350.e7.
- [170.] Lange, H. und Hecht, O., *et al.*, Immunoglobulin class switching appears to be regulated by B-cell antigen receptor-specific T-cell action. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(4): p. 1016-29.
- [171.] Ho, F. und Lortan, J. E., *et al.*, Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. *Eur J Immunol*, 1986. **16**(10): p. 1297-301.
- [172.] Bortnick, A., Allman, D., What Is and What Should Always Have Been: Long-Lived Plasma Cells Induced by T Cell-Independent Antigens. *The Journal of Immunology*, 2013. **190**(12): p. 5913.
- [173.] Klein, U. und Küppers, R., *et al.*, Evidence for a Large Compartment of IgM-Expressing Memory B Cells in Humans. *Blood*, 1997. **89**(4): p. 1288-1298.
- [174.] Chong, Y. und Ikematsu, H., *et al.*, Age-related accumulation of Ig VH gene somatic mutations in peripheral B cells from aged humans. *Clinical & Experimental Immunology*, 2003. **133**(1): p. 59-66.
- [175.] Hargreaves, D. C. und Hyman, P. L., *et al.*, A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med*, 2001. **194**(1): p. 45-56.
- [176.] Nie, Y. und Waite, J., *et al.*, The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J Exp Med*, 2004. **200**(9): p. 1145-56.
- [177.] Bowman, E. P. und Kuklin, N. A., *et al.*, The Intestinal Chemokine Thymus-expressed Chemokine (CCL25) Attracts IgA Antibody-secreting Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 2002. **195**(2): p. 269-275.
- [178.] Kunkel, E. J. und Kim, C. H., *et al.*, CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells. *J Clin Invest*, 2003. **111**(7): p. 1001-10.

- [179.] Baggolini, M., Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 1998. **392**(6676): p. 565-8.
- [180.] Kunkel, E. J., Butcher, E. C., Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(10): p. 822-9.
- [181.] Cooper, E. H., Production of lymphocytes and plasma cells in the rat following immunization with human serum albumin. *Immunology*, 1961. **4**(3): p. 219-31.
- [182.] Holt, P. G. und Sedgwick, J. D., *et al.*, Long-lived IgE- and IgG-secreting cells in rodents manifesting persistent antibody responses. *Cell Immunol*, 1984. **89**(2): p. 281-9.
- [183.] Manz, R. A. und Thiel, A., *et al.*, Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature*, 1997. **388**(6638): p. 133-134.
- [184.] Hauser, A. E. und Debes, G. F., *et al.*, Chemotactic Responsiveness Toward Ligands for CXCR3 and CXCR4 Is Regulated on Plasma Blasts During the Time Course of a Memory Immune Response. *The Journal of Immunology*, 2002. **169**(3): p. 1277.
- [185.] Bortnick, A. und Chernova, I., *et al.*, Long-lived bone marrow plasma cells are induced early in response to T cell-independent or T cell-dependent antigens. *J Immunol*, 2012. **188**(11): p. 5389-96.
- [186.] Sundling, C. und Lau, A. W. Y., *et al.*, Positive selection of IgG+ over IgM+ B cells in the germinal center reaction. *Immunity*, 2021. **54**(5): p. 988-1001.e5.
- [187.] William, J. und Euler, C., *et al.*, Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science*, 2002. **297**(5589): p. 2066-70.
- [188.] Gonzalez-Quintela, A. und Alende, R., *et al.*, Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. *Clin Exp Immunol*, 2008. **151**(1): p. 42-50.
- [189.] Zwarthoff, S. A. und Widmer, K., *et al.*, C1q binding to surface-bound IgG is stabilized by C1r2s2 proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2021. **118**(26): p. e2102787118.
- [190.] Kim, J. K. und Firan, M., *et al.*, Mapping the site on human IgG for binding of the MHC class I-related receptor, FcRn. *Eur J Immunol*, 1999. **29**(9): p. 2819-25.
- [191.] Kenanova, V. und Olafsen, T., *et al.*, Tailoring the pharmacokinetics and positron emission tomography imaging properties of anti-carcinoembryonic antigen single-chain Fv-Fc antibody fragments. *Cancer Res*, 2005. **65**(2): p. 622-31.
- [192.] Jiang, D. und Ge, J., *et al.*, IgG and IgA with potential microbial-binding activity are expressed by normal human skin epidermal cells. *Int J Mol Sci*, 2015. **16**(2): p. 2574-90.
- [193.] Brandtzaeg, P. und Bjerke, K., *et al.*, Production and secretion of immunoglobulins in the gastrointestinal tract. *Ann Allergy*, 1987. **59**(5 Pt 2): p. 21-39.
- [194.] Chen, K. und Xu, W., *et al.*, Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat Immunol*, 2009. **10**(8): p. 889-98.
- [195.] Stroh, P. und Günther, F., *et al.*, Host defence against *Staphylococcus aureus* biofilms by polymorphonuclear neutrophils: oxygen radical production but not phagocytosis depends on opsonisation with immunoglobulin G. *Immunobiology*, 2011. **216**(3): p. 351-7.
- [196.] Washington, D. C., "Permissible Medical Experiments." Trials of War Criminals before the Nuremberg Military Tribunals under Control Council Law No. 10. Nuremberg October 1946 1949, U.S. Government Printing Office pp. 181-182.
- [197.] Alugupalli, K. R. und Leong, J. M., *et al.*, B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity*, 2004. **21**(3): p. 379-90.
- [198.] Haas, K. M. und Poe, J. C., *et al.*, B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity*, 2005. **23**(1): p. 7-18.
- [199.] Kurosaki, T. und Kometani, K., *et al.*, Memory B cells. *Nature Reviews Immunology*, 2015. **15**(3): p. 149-159.
- [200.] Taylor, J. J. und Pape, K. A., *et al.*, A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *J Exp Med*, 2012. **209**(3): p. 597-606.
- [201.] Kaji, T. und Ishige, A., *et al.*, Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. *J Exp Med*, 2012. **209**(11): p. 2079-97.
- [202.] McMillan, R. und Longmire, R. L., *et al.*, Immunoglobulin synthesis by human lymphoid tissues: normal bone marrow as a major site of IgG production. *J Immunol*, 1972. **109**(6): p. 1386-94.
- [203.] Ellyard, J. I. und Avery, D. T., *et al.*, Antigen-selected, immunoglobulin-secreting cells persist in human spleen and bone marrow. *Blood*, 2004. **103**(10): p. 3805-12.
- [204.] Lemke, A. und Kraft, M., *et al.*, Long-lived plasma cells are generated in mucosal immune responses and contribute to the bone marrow plasma cell pool in mice. *Mucosal Immunol*, 2016. **9**(1): p. 83-97.
- [205.] Smith, K. G. und Hewitson, T. D., *et al.*, The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur J Immunol*, 1996. **26**(2): p. 444-8.
- [206.] Slifka, M. K. und Antia, R., *et al.*, Humoral Immunity Due to Long-Lived Plasma Cells. *Immunity*, 1998. **8**(3): p. 363-372.
- [207.] Tokoyoda, K. und Egawa, T., *et al.*, Cellular Niches Controlling B Lymphocyte Behavior within Bone Marrow during Development. *Immunity*, 2004. **20**(6): p. 707-718.
- [208.] Zehentmeier, S. und Roth, K., *et al.*, Static and dynamic components synergize to form a stable survival niche for bone marrow plasma cells. *Eur J Immunol*, 2014. **44**(8): p. 2306-17.
- [209.] Mokhtari, Z. und Mech, F., *et al.*, Quantitative image analysis of cell colocalization in murine bone marrow. *Cytometry A*, 2015. **87**(6): p. 503-12.
- [210.] Xiao, C. und Calado, D. P., *et al.*, MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell*, 2007. **131**(1): p. 146-59.
- [211.] Good-Jacobson, K. L. und O'Donnell, K., *et al.*, c-Myb is required for plasma cell migration to bone marrow after immunization or infection. *Journal of Experimental Medicine*, 2015. **212**(7): p. 1001-1009.
- [212.] Lam, W. Y. und Becker, A. M., *et al.*, Mitochondrial Pyruvate Import Promotes Long-Term Survival of Antibody-Secreting Plasma Cells. *Immunity*, 2016. **45**(1): p. 60-73.
- [213.] Wang, H. und Gonzalez-Garcia, I., *et al.*, ATP-degrading ENPP1 is required for survival (or persistence) of long-lived plasma cells. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 17867.
- [214.] Shaffer, A. L. und Shapiro-Shelef, M., *et al.*, XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and

- increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity*, 2004. **21**(1): p. 81-93.
- [215.] Lam, W. Y., Bhattacharya, D., Metabolic Links between Plasma Cell Survival, Secretion, and Stress. *Trends Immunol*, 2018. **39**(1): p. 19-27.
- [216.] Kallies, A. und Hasbold, J., *et al.*, Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *J Exp Med*, 2004. **200**(8): p. 967-77.
- [217.] Joyner, C. J. und Ley, A. M., *et al.*, Generation of human long-lived plasma cells by developmentally regulated epigenetic imprinting. *Life Science Alliance*, 2022. **5**(3): p. e202101285.
- [218.] Minges Wols, H. A. und Underhill, G. H., *et al.*, The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. *J Immunol*, 2002. **169**(8): p. 4213-21.
- [219.] Cassese, G. und Arce, S., *et al.*, Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J Immunol*, 2003. **171**(4): p. 1684-90.
- [220.] Cortés, M., Georgopoulos, K., Aiolos is required for the generation of high affinity bone marrow plasma cells responsible for long-term immunity. *J Exp Med*, 2004. **199**(2): p. 209-19.
- [221.] Shapiro-Shelef, M. und Lin, K. I., *et al.*, Blimp-1 is required for maintenance of long-lived plasma cells in the bone marrow. *J Exp Med*, 2005. **202**(11): p. 1471-6.
- [222.] Winter, O. und Moser, K., *et al.*, Megakaryocytes constitute a functional component of a plasma cell niche in the bone marrow. *Blood*, 2010. **116**(11): p. 1867-75.
- [223.] Rodriguez Gomez, M. und Talke, Y., *et al.*, Basophils support the survival of plasma cells in mice. *J Immunol*, 2010. **185**(12): p. 7180-5.
- [224.] Matthes, T. und Dunand-Sauthier, I., *et al.*, Production of the plasma-cell survival factor a proliferation-inducing ligand (APRIL) peaks in myeloid precursor cells from human bone marrow. *Blood*, 2011. **118**(7): p. 1838-44.
- [225.] Chu, V. T. und Fröhlich, A., *et al.*, Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol*, 2011. **12**(2): p. 151-9.
- [226.] Tangye, S. G., Staying alive: regulation of plasma cell survival. *Trends Immunol*, 2011. **32**(12): p. 595-602.
- [227.] Chu, V. T., Berek, C., Immunization induces activation of bone marrow eosinophils required for plasma cell survival. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(1): p. 130-7.
- [228.] Belnoue, E. und Tougne, C., *et al.*, Homing and adhesion patterns determine the cellular composition of the bone marrow plasma cell niche. *J Immunol*, 2012. **188**(3): p. 1283-91.
- [229.] Ding, L., Morrison, S. J., Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature*, 2013. **495**(7440): p. 231-5.
- [230.] Jourdan, M. und Cren, M., *et al.*, IL-6 supports the generation of human long-lived plasma cells in combination with either APRIL or stromal cell-soluble factors. *Leukemia*, 2014. **28**(8): p. 1647-56.
- [231.] Kayaba, A. und Itoh-Nakadai, A., *et al.*, Bone marrow PDGFR α +Sca-1+-enriched mesenchymal stem cells support survival of and antibody production by plasma cells in vitro through IL-6. *Int Immunol*, 2018. **30**(6): p. 241-253.
- [232.] Manz, R. A. und Hauser, A. E., *et al.*, Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 367-86.
- [233.] Matsuda, Y. und Haneda, M., *et al.*, A proliferation-inducing ligand sustains the proliferation of human naïve (CD27 $^{-}$) B cells and mediates their differentiation into long-lived plasma cells in vitro via transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor and B-cell mature antigen. *Cellular Immunology*, 2015. **295**(2): p. 127-136.
- [234.] Gray, D. und Dullforce, P., *et al.*, Memory B cell development but not germinal center formation is impaired by in vivo blockade of CD40-CD40 ligand interaction. *Journal of Experimental Medicine*, 1994. **180**(1): p. 141-155.
- [235.] Bohannon, C. und Powers, R., *et al.*, Long-lived antigen-induced IgM plasma cells demonstrate somatic mutations and contribute to long-term protection. *Nature Communications*, 2016. **7**(1): p. 11826.
- [236.] González-García, I. und Rodríguez-Bayona, B., *et al.*, Increased survival is a selective feature of human circulating antigen-induced plasma cells synthesizing high-affinity antibodies. *Blood*, 2008. **111**(2): p. 741-9.
- [237.] Haaijman, J. J. und Schuit, H. R., *et al.*, Immunoglobulin-containing cells in different lymphoid organs of the CBA mouse during its lifespan. *Immunology*, 1977. **32**(4): p. 427-34.
- [238.] Terstappen, L. W. und Johnsen, S., *et al.*, Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood*, 1990. **76**(9): p. 1739-47.
- [239.] Radbruch, A. und Muehlinghaus, G., *et al.*, Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(10): p. 741-50.
- [240.] Bernasconi, N. L. und Traggiai, E., *et al.*, Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science*, 2002. **298**(5601): p. 2199-202.
- [241.] Höfer, T. und Muehlinghaus, G., *et al.*, Adaptation of humoral memory. *Immunol Rev*, 2006. **211**: p. 295-302.
- [242.] Odendahl, M. und Mei, H., *et al.*, Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood*, 2005. **105**(4): p. 1614-21.
- [243.] Xiang, Z. und Cutler, A. J., *et al.*, Fc γ R1b controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. *Nature Immunology*, 2007. **8**(4): p. 419-429.
- [244.] Tiburzy, B. und Szyska, M., *et al.*, Persistent Autoantibody-Production by Intermediates between Short-and Long-Lived Plasma Cells in Inflamed Lymph Nodes of Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita. *PLoS One*, 2013. **8**(12): p. e83631.
- [245.] Wang, W. und Rangel-Moreno, J., *et al.*, Long-Term B Cell Depletion in Murine Lupus Eliminates Autoantibody-Secreting Cells and Is Associated with Alterations in the Kidney Plasma Cell Niche. *The Journal of Immunology*, 2014. **192**(7): p. 3011.
- [246.] Ueda, Y. und Yang, K., *et al.*, Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. *J Exp Med*, 2004. **199**(1): p. 47-58.
- [247.] Cheng, Q. und Khodadadi, L., *et al.*, CXCR4-CXCL12 interaction is important for plasma cell homing and survival in NZB/W mice. *Eur J Immunol*, 2018. **48**(6): p. 1020-1029.
- [248.] Nguyen, D. C. und Garimalla, S., *et al.*, Factors of the bone marrow microniche that support human plasma cell survival and immunoglobulin secretion. *Nature Communications*, 2018. **9**(1): p. 3698.

- [249.] Verkaik, N. J. und de Vogel, C. P., *et al.*, Anti-staphylococcal humoral immune response in persistent nasal carriers and noncarriers of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of infectious diseases*, 2009. **199**(5): p. 625-632.
- [250.] Bröker, B. M., van Belkum, A., Immune proteomics of *Staphylococcus aureus*. *Proteomics*, 2011. **11**(15): p. 3221-31.
- [251.] Rigat, F. und Bartolini, E., *et al.*, Retrospective Identification of a Broad IgG Repertoire Differentiating Patients With *S. aureus* Skin and Soft Tissue Infections From Controls. *Frontiers in Immunology*, 2019. **10**.
- [252.] Meyer, T. C. und Michalik, S., *et al.*, A Comprehensive View on the Human Antibody Repertoire Against *Staphylococcus aureus* Antigens in the General Population. *Frontiers in Immunology*, 2021. **12**.
- [253.] Jacobsson, G. und Colque-Navarro, P., *et al.*, Antibody responses in patients with invasive *Staphylococcus aureus* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2010. **29**(6): p. 715-25.
- [254.] Thomsen, I. P. und Sapparapu, G., *et al.*, Monoclonal Antibodies Against the *Staphylococcus aureus* Bicomponent Leukotoxin AB Isolated Following Invasive Human Infection Reveal Diverse Binding and Modes of Action. *The Journal of Infectious Diseases*, 2017. **215**(7): p. 1124-1131.
- [255.] Wood, J. B. und Jones, L. S., *et al.*, Commercial Intravenous Immunoglobulin Preparations Contain Functional Neutralizing Antibodies against the *Staphylococcus aureus* Leukocidin LukAB (LukGH). *Antimicrob Agents Chemother*, 2017. **61**(11).
- [256.] Colque-Navarro, P. und Söderquist, B., *et al.*, Antibody response in *Staphylococcus aureus* septicaemia--a prospective study. *J Med Microbiol*, 1998. **47**(3): p. 217-25.
- [257.] Verkaik, N. J. und Boelens, H. A., *et al.*, Heterogeneity of the humoral immune response following *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2010. **29**(5): p. 509-18.
- [258.] Kumar, A. und Ray, P., *et al.*, A comparative analysis of antibody repertoire against *Staphylococcus aureus* antigens in patients with deep-seated versus superficial staphylococcal infections. *Int J Med Sci*, 2005. **2**(4): p. 129-36.
- [259.] Grumann, D. und Ruotsalainen, E., *et al.*, Characterization of infecting strains and superantigen-neutralizing antibodies in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Vaccine Immunol*, 2011. **18**(3): p. 487-93.
- [260.] Gillet, Y. und Issartel, B., *et al.*, Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*, 2002. **359**(9308): p. 753-9.
- [261.] Christensson, B. und Hedström, S. A., *et al.*, Antibody response to alpha- and beta-hemolysin from *Staphylococcus aureus* in patients with staphylococcal infections and in normals. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B*, 1983. **91**(5): p. 351-6.
- [262.] Bonventre, P. F. und Linnemann, C., *et al.*, Antibody responses to toxic-shock-syndrome (TSS) toxin by patients with TSS and by healthy staphylococcal carriers. *J Infect Dis*, 1984. **150**(5): p. 662-6.
- [263.] Gauduchon, V. und Cozon, G., *et al.*, Neutralization of *Staphylococcus aureus* Panton Valentine leukocidin by intravenous immunoglobulin in vitro. *J Infect Dis*, 2004. **189**(2): p. 346-53.
- [264.] Rasigade, J. P. und Sicot, N., *et al.*, A history of Panton-Valentine leukocidin (PVL)-associated infection protects against death in PVL-associated pneumonia. *Vaccine*, 2011. **29**(25): p. 4185-6.
- [265.] Foletti, D. und Strop, P., *et al.*, Mechanism of action and in vivo efficacy of a human-derived antibody against *Staphylococcus aureus* α -hemolysin. *J Mol Biol*, 2013. **425**(10): p. 1641-54.
- [266.] Fritz, S. A. und Tiemann, K. M., *et al.*, A serologic correlate of protective immunity against community-onset *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis*, 2013. **56**(11): p. 1554-61.
- [267.] Bavari, S. und Ulrich, R. G., *et al.*, Cross-reactive antibodies prevent the lethal effects of *Staphylococcus aureus* superantigens. *J Infect Dis*, 1999. **180**(4): p. 1365-9.
- [268.] Hammarström, L. und Persson, M. A., *et al.*, Subclass distribution of human anti-*Staphylococcus aureus* alpha toxin antibodies: suggestion of an IgG₁, IgA₁, IgG₄ switch pattern. *Scand J Immunol*, 1984. **20**(3): p. 247-50.
- [269.] Swierstra, J. und Debets, S., *et al.*, IgG₄ subclass-specific responses to *Staphylococcus aureus* antigens shed new light on host-pathogen interaction. *Infect Immun*, 2015. **83**(2): p. 492-501.
- [270.] Adhikari, R. P. und Ajao, A. O., *et al.*, Lower antibody levels to *Staphylococcus aureus* exotoxins are associated with sepsis in hospitalized adults with invasive *S. aureus* infections. *J Infect Dis*, 2012. **206**(6): p. 915-23.
- [271.] Gedbjerg, N. und LaRosa, R., *et al.*, Anti-glucosaminidase IgG in sera as a biomarker of host immunity against *Staphylococcus aureus* in orthopaedic surgery patients. *J Bone Joint Surg Am*, 2013. **95**(22): p. e171.
- [272.] Parsonnet, J. und Goering, R. V., *et al.*, Prevalence of toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1)-producing strains of *Staphylococcus aureus* and antibody to TSST-1 among healthy Japanese women. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(8): p. 2731-8.
- [273.] Bertoglio, F. und Ko, Y.-P., *et al.*, Antibodies to Coagulase of *Staphylococcus aureus* crossreact to Efb and reveal different binding of shared Fibrinogen binding repeats. *bioRxiv*, 2022: p. 2022.04.01.486801.
- [274.] de Vor, L. und van Dijk, B., *et al.*, Human monoclonal antibodies against *Staphylococcus aureus* surface antigens recognize in vitro and in vivo biofilm. *eLife*, 2022. **11**: p. e67301.
- [275.] Cerca, N. und Jefferson Kimberly, K., *et al.*, Molecular Basis for Preferential Protective Efficacy of Antibodies Directed to the Poorly Acetylated Form of Staphylococcal Poly-N-Acetyl- β -(1-6)-Glucosamine. *Infection and Immunity*, 2007. **75**(7): p. 3406-3413.
- [276.] Israel, L. und Wang, Y., *et al.*, Human Adaptive Immunity Rescues an Inborn Error of Innate Immunity. *Cell*, 2017. **168**(5): p. 789-800.e10.
- [277.] Varshney, A. K. und Kuzmicheva, G. A., *et al.*, A natural human monoclonal antibody targeting *Staphylococcus* Protein A protects against *Staphylococcus aureus* bacteremia. *PLoS One*, 2018. **13**(1): p. e0190537.
- [278.] Boero, E. und Cruz, A. R., *et al.*, Natural Human Immunity Against Staphylococcal Protein A Relies on Effector Functions Triggered by IgG₃. *Frontiers in Immunology*, 2022. **13**.
- [279.] Jendeborg, L. und Nilsson, P., *et al.*, Engineering of Fc(1) and Fc(3) from human immunoglobulin G to analyse subclass specificity for staphylococcal protein A. *J Immunol Methods*, 1997. **201**(1): p. 25-34.

- [280.] Whitehouse, J. und Flaxman, A., *et al.*, Population variation in anti-*S. aureus* IgG isotypes influences surface protein A mediated immune subversion. *Vaccine*, 2016. **34**(15): p. 1792-1799.
- [281.] Dryla, A. und Prustomersky, S., *et al.*, Comparison of antibody repertoires against *Staphylococcus aureus* in healthy individuals and in acutely infected patients. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005. **12**(3): p. 387-98.
- [282.] van Belkum, A. und Verkaik, N. J., *et al.*, Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. *J Infect Dis*, 2009. **199**(12): p. 1820-6.
- [283.] Colque-Navarro, P. und Jacobsson, G., *et al.*, Levels of antibody against 11 *Staphylococcus aureus* antigens in a healthy population. *Clin Vaccine Immunol*, 2010. **17**(7): p. 1117-23.
- [284.] Stentzel, S. und Sundaramoorthy, N., *et al.*, Specific serum IgG at diagnosis of *Staphylococcus aureus* bloodstream invasion is correlated with disease progression. *Journal of Proteomics*, 2015. **128**: p. 1-7.
- [285.] Ghasemzadeh-Moghaddam, H. und van Wamel, W., *et al.*, Humoral immune consequences of *Staphylococcus aureus* ST239-associated bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2018. **37**(2): p. 255-263.
- [286.] Sharma-Kuinkel, B. K. und Tkaczyk, C., *et al.*, Associations of pathogen-specific and host-specific characteristics with disease outcome in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremic pneumonia. *Clin Transl Immunology*, 2019. **8**(7): p. e01070.
- [287.] Holtfreter, S. und Nguyen, T. T., *et al.*, Human immune proteome in experimental colonization with *Staphylococcus aureus*. *Clin Vaccine Immunol*, 2009. **16**(11): p. 1607-14.
- [288.] Holtfreter, S. und Kolata, J., *et al.*, Towards the immune proteome of *Staphylococcus aureus* - The anti-*S. aureus* antibody response. *Int J Med Microbiol*, 2010. **300**(2-3): p. 176-92.
- [289.] Pujol, M. und Peña, C., *et al.*, Nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia among nasal carriers of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains. *Am J Med Sci*, 1996. **100**(5): p. 509-16.
- [290.] von Eiff, C. und Becker, K., *et al.*, Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med*, 2001. **344**(1): p. 11-6.
- [291.] Wertheim, H. F. und Vos, M. C., *et al.*, Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet*, 2004. **364**(9435): p. 703-5.
- [292.] Votintseva, A. A. und Miller, R. R., *et al.*, Multiple-strain colonization in nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 2014. **52**(4): p. 1192-200.
- [293.] Verkaik, N. J. und Lebon, A., *et al.*, Induction of antibodies by *Staphylococcus aureus* nasal colonization in young children. *Clinical Microbiology and Infection*, 2010. **16**(8): p. 1312-1317.
- [294.] Clarke, S. R. und Brummell, K. J., *et al.*, Identification of In Vivo-Expressed Antigens of *Staphylococcus aureus* and Their Use in Vaccinations for Protection against Nasal Carriage. *The Journal of Infectious Diseases*, 2006. **193**(8): p. 1098-1108.
- [295.] Vollmers, H. P., Brändlein, S., Natural IgM antibodies: The orphaned molecules in immune surveillance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006. **58**(5): p. 755-765.
- [296.] Chu, Q. und Ludtke, J. J., *et al.*, The acquisition of narrow binding specificity by polyspecific natural IgM antibodies in a semi-physiological environment. *Mol Immunol*, 2008. **45**(5): p. 1501-13.
- [297.] Peacock, S. J. und de Silva, I., *et al.*, What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends Microbiol*, 2001. **9**(12): p. 605-10.
- [298.] Yoong, P., Pier, G. B., Antibody-mediated enhancement of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(5): p. 2241-6.
- [299.] Skurnik, D. und Merighi, M., *et al.*, Animal and human antibodies to distinct *Staphylococcus aureus* antigens mutually neutralize opsonic killing and protection in mice. *J Clin Invest*, 2010. **120**(9): p. 3220-33.
- [300.] Nishitani, K. und Ishikawa, M., *et al.*, IsdB antibody-mediated sepsis following *S. aureus* surgical site infection. *JCI Insight*, 2020. **5**(19).
- [301.] Hermos, C. R. und Yoong, P., *et al.*, High levels of antibody to panton-valentine leukocidin are not associated with resistance to *Staphylococcus aureus*-associated skin and soft-tissue infection. *Clin Infect Dis*, 2010. **51**(10): p. 1138-46.
- [302.] Hawkins, J. und Kodali, S., *et al.*, A recombinant clumping factor A-containing vaccine induces functional antibodies to *Staphylococcus aureus* that are not observed after natural exposure. *Clin Vaccine Immunol*, 2012. **19**(10): p. 1641-50.
- [303.] Kim, H. K. und Cheng, A. G., *et al.*, Nontoxicogenic protein A vaccine for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in mice. *J Exp Med*, 2010. **207**(9): p. 1863-70.
- [304.] Pauli, N. T. und Kim, H. K., *et al.*, *Staphylococcus aureus* infection induces protein A-mediated immune evasion in humans. *J Exp Med*, 2014. **211**(12): p. 2331-9.
- [305.] Kim, H. K. und Falugi, F., *et al.*, Protein A suppresses immune responses during *Staphylococcus aureus* bloodstream infection in guinea pigs. *mBio*, 2015. **6**(1).
- [306.] van der Kooi-Pol, M. M. und Veenstra-Kyuchukova, Y. K., *et al.*, High genetic diversity of *Staphylococcus aureus* strains colonizing patients with epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol*, 2012. **21**(6): p. 463-6.
- [307.] García-Pérez, A. N. und de Jong, A., *et al.*, From the wound to the bench: exoproteome interplay between wound-colonizing *Staphylococcus aureus* strains and co-existing bacteria. *Virulence*, 2018. **9**(1): p. 363-378.
- [308.] van der Kooi-Pol, M. M. und de Vogel, C. P., *et al.*, High anti-staphylococcal antibody titers in patients with epidermolysis bullosa relate to long-term colonization with alternating types of *Staphylococcus aureus*. *J Invest Dermatol*, 2013. **133**(3): p. 847-850.
- [309.] Romero Pastrana, F. und Neef, J., *et al.*, Human antibody responses against non-covalently cell wall-bound *Staphylococcus aureus* proteins. *Scientific Reports*, 2018. **8**(1): p. 3234.
- [310.] Hayakawa, K. und Hardy, R. R., *et al.*, The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J Exp Med*, 1983. **157**(1): p. 202-18.
- [311.] Hayakawa, K. und Hardy, R. R., *et al.*, Immunoglobulin-bearing B cells reconstitute and maintain the murine Ly-1 B cell lineage. *Eur J Immunol*, 1986. **16**(10): p. 1313-6.
- [312.] Herzenberg, L. A. und Kantor, A. B., *et al.*, Layered Evolution in the Immune System. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1992. **651**(1): p. 1-9.

- [313.] Stall, A. M. und Adams, S., *et al.*, Characteristics and Development of the Murine B-1b (Ly-1 B Sister) Cell Population. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1992. **651**(1): p. 33-43.
- [314.] Lalor, P. A. und Herzenberg, L. A., *et al.*, Feedback regulation of murine Ly-1 B cell development. *Eur J Immunol*, 1989. **19**(3): p. 507-13.
- [315.] Kantor, A. B. und Merrill, C. E., *et al.*, An unbiased analysis of V(H)-D-J(H) sequences from B-1a, B-1b, and conventional B cells. *J Immunol*, 1997. **158**(3): p. 1175-86.
- [316.] Brändlein, S. und Pohle, T., *et al.*, Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans. *Cancer Res*, 2003. **63**(22): p. 7995-8005.
- [317.] Shulzhenko, N. und Morgun, A., *et al.*, Crosstalk between B lymphocytes, microbiota and the intestinal epithelium governs immunity versus metabolism in the gut. *Nat Med*, 2011. **17**(12): p. 1585-93.
- [318.] Avrameas, S., Autopolyreactivity Confers a Holistic Role in the Immune System. *Scand J Immunol*, 2016. **83**(4): p. 227-34.
- [319.] Lobo, P. I., Role of Natural Autoantibodies and Natural IgM Anti-Leucocyte Autoantibodies in Health and Disease. *Front Immunol*, 2016. **7**: p. 198.
- [320.] Berland, R., Wortis, H. H., Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 253-300.
- [321.] Panda, S. und Zhang, J., *et al.*, Natural IgG antibodies provide innate protection against ficolin-opsonized bacteria. *Embo j*, 2013. **32**(22): p. 2905-19.
- [322.] Stoel, M. und Jiang, H. Q., *et al.*, Restricted IgA repertoire in both B-1 and B-2 cell-derived gut plasmablasts. *J Immunol*, 2005. **174**(2): p. 1046-54.
- [323.] Palma, J. und Tokarz-Deptuła, B., *et al.*, Natural antibodies - facts known and unknown. *Cent Eur J Immunol*, 2018. **43**(4): p. 466-475.
- [324.] Grönwall, C., Silverman, G. J., Natural IgM: beneficial autoantibodies for the control of inflammatory and autoimmune disease. *J Clin Immunol*, 2014. **34** Suppl 1(0 1): p. S12-21.
- [325.] Griffin, D. O. und Holodick, N. E., *et al.*, Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+CD27+CD43+CD70-. *Journal of Experimental Medicine*, 2011. **208**(1): p. 67-80.
- [326.] Kroese, F. G. und Ammerlaan, W. A., *et al.*, Evidence that intestinal IgA plasma cells in mu, kappa transgenic mice are derived from B-1 (Ly-1 B) cells. *Int Immunol*, 1993. **5**(10): p. 1317-27.
- [327.] Rothstein, T. L. und Griffin, D. O., *et al.*, Human B-1 cells take the stage. *Ann N Y Acad Sci*, 2013. **1285**: p. 97-114.
- [328.] Brezinschek, H. P. und Brezinschek, R. I., *et al.*, Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. *The Journal of Immunology*, 1995. **155**(1): p. 190.
- [329.] Stäger, S. und Alexander, J., *et al.*, Natural antibodies and complement are endogenous adjuvants for vaccine-induced CD8+ T-cell responses. *Nat Med*, 2003. **9**(10): p. 1287-92.
- [330.] Panda, S., Ding, J. L., Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. *J Immunol*, 2015. **194**(1): p. 13-20.
- [331.] Merbl, Y. und Zucker-Toledano, M., *et al.*, Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics. *J Clin Invest*, 2007. **117**(3): p. 712-8.
- [332.] Ochsenbein, A. F. und Fehr, T., *et al.*, Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science*, 1999. **286**(5447): p. 2156-9.
- [333.] Tsimikas, S. und Brilakis, E. S., *et al.*, Relationship of IgG and IgM autoantibodies to oxidized low density lipoprotein with coronary artery disease and cardiovascular events. *J Lipid Res*, 2007. **48**(2): p. 425-33.
- [334.] Ravandi, A. und Boekholdt, S. M., *et al.*, Relationship of IgG and IgM autoantibodies and immune complexes to oxidized LDL with markers of oxidation and inflammation and cardiovascular events: results from the EPIC-Norfolk Study. *J Lipid Res*, 2011. **52**(10): p. 1829-36.
- [335.] Kyaw, T. und Tay, C., *et al.*, B1a B lymphocytes are atheroprotective by secreting natural IgM that increases IgM deposits and reduces necrotic cores in atherosclerotic lesions. *Circ Res*, 2011. **109**(8): p. 830-40.
- [336.] Madi, A. und Bransburg-Zabary, S., *et al.*, The natural autoantibody repertoire in newborns and adults: a current overview. *Adv Exp Med Biol*, 2012. **750**: p. 198-212.
- [337.] Martin, F. und Oliver, A. M., *et al.*, Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity*, 2001. **14**(5): p. 617-29.
- [338.] Kaminski, D. A., Stavnezer, J., Enhanced IgA Class Switching in Marginal Zone and B1 B Cells Relative to Follicular/B2 B Cells. *The Journal of Immunology*, 2006. **177**(9): p. 6025.
- [339.] Enghard, P., und Humrich, J. Y., *et al.*, Class switching and consecutive loss of dsDNA-reactive B1a B cells from the peritoneal cavity during murine lupus development. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(6): p. 1809-18.
- [340.] Roy, B. und Shukla, S., *et al.*, Somatic hypermutation in peritoneal B1b cells. *Molecular Immunology*, 2009. **46**(8): p. 1613-1619.
- [341.] Vollmers, H. P. und Dämmrich, J., *et al.*, Apoptosis of stomach carcinoma cells induced by a human monoclonal antibody. *Cancer*, 1995. **76**(4): p. 550-8.
- [342.] Vollmers, H. P., Brändlein, S., Nature's best weapons to fight cancer. Revival of human monoclonal IgM antibodies. *Hum Antibodies*, 2002. **11**(4): p. 131-42.
- [343.] Rodriguez-Zhurbenko, N. und Quach, T. D., *et al.*, Human B-1 Cells and B-1 Cell Antibodies Change With Advancing Age. *Frontiers in Immunology*, 2019. **10**.
- [344.] Nagele, E. P. und Han, M., *et al.*, Natural IgG autoantibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender, and disease. *PLoS One*, 2013. **8**(4): p. e60726.
- [345.] Watts, R. A., Isenberg, D. A., Autoantibodies and antibacterial antibodies: from both sides now. *Ann Rheum Dis*, 1990. **49**(12): p. 961-5.
- [346.] Gunti, S., Notkins, A. L., Polyreactive Antibodies: Function and Quantification. *J Infect Dis*, 2015. **212** Suppl 1(Suppl 1): p. S42-6.
- [347.] Born, W. K. und Huang, Y., *et al.*, A Special Connection between $\gamma\delta$ T Cells and Natural Antibodies? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2016. **64**(6): p. 455-462.
- [348.] Schwartz-Albiez, R. und Monteiro, R. C., *et al.*, Natural antibodies, intravenous immunoglobulin and their role in autoimmunity, cancer and inflammation. *Clin Exp Immunol*, 2009. **158** Suppl 1(Suppl 1): p. 43-50.
- [349.] Sidman, C. L. und Shultz, L. D., *et al.*, Production of immunoglobulin isotypes by Ly-1+ B cells in viable motheaten and normal mice. *Science*, 1986. **232**(4756): p. 1423-5.

- [350.] Solvason, N. und Lehuen, A., *et al.*, An embryonic source of Ly1 but not conventional B cells. *Int Immunol*, 1991. **3**(6): p. 543-50.
- [351.] Hamanova, M. und Chmelikova, M., *et al.*, Anti-Gal IgM, IgA and IgG natural antibodies in childhood. *Immunology Letters*, 2015. **164**(1): p. 40-43.
- [352.] Skurnik, D. und Kropec, A., *et al.*, Natural antibodies in normal human serum inhibit *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide vaccine efficacy. *Clin Infect Dis*, 2012. **55**(9): p. 1188-97.
- [353.] Clarke, S. H., Arnold, L. W., B-1 cell development: evidence for an uncommitted immunoglobulin (Ig)M+ B cell precursor in B-1 cell differentiation. *J Exp Med*, 1998. **187**(8): p. 1325-34.
- [354.] Graf, R. und Seagal, J., *et al.*, BCR-dependent lineage plasticity in mature B cells. *Science*, 2019. **363**(6428): p. 748-753.
- [355.] Luo, Y. und Wang, J., *et al.*, Single-cell genomics identifies distinct B1 cell developmental pathways and reveals aging-related changes in the B-cell receptor repertoire. *Cell & Bioscience*, 2022. **12**(1): p. 57.
- [356.] Pschyrembel, W., Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 2011. 2010: *Walter de Gruyter*.
- [357.] Lin, J. H. und Walter, P., *et al.*, Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annu Rev Pathol*, 2008. **3**: p. 399-425.
- [358.] Low, M. und Infantino, S., *et al.*, Targeting plasma cells: are we any closer to a panacea for diseases of antibody-secreting cells? *Immunol Rev*, 2016. **270**(1): p. 78-94.
- [359.] Fernández, T. D. und Gómez, E., *et al.*, Differential Plasma-cell evolution is linked with Dermatophagoides pteronyssinus immunotherapy response. *Scientific Reports*, 2015. **5**(1): p. 14482.
- [360.] Asrat, S. und Kaur, N., *et al.*, Chronic allergen exposure drives accumulation of long-lived IgE plasma cells in the bone marrow, giving rise to serological memory. *Science Immunology*, 2020. **5**(43): p. eaav8402.
- [361.] Zuidischerwoude, M., van Sriel, A. B., The origin of IgE memory and plasma cells. *Cellular & Molecular Immunology*, 2012. **9**(5): p. 373-374.
- [362.] Partrick, D. A. und Moore, F. A., *et al.*, Neutrophil priming and activation in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *New Horiz*, 1996. **4**(2): p. 194-210.
- [363.] Jacobi, J. und Sela, S., *et al.*, Priming of polymorphonuclear leukocytes: a culprit in the initiation of endothelial cell injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **290**(5): p. H2051-8.
- [364.] Raverdeau, M. und Cunningham, S. P., *et al.*, $\gamma\delta$ T cells in cancer: a small population of lymphocytes with big implications. *Clinical & Translational Immunology*, 2019. **8**(10): p. e01080.
- [365.] Parker, D. und Ryan, C. L., *et al.*, CD4+ T cells promote the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *J Infect Dis*, 2015. **211**(5): p. 835-45.
- [366.] Mueller, K. L., For vaccines, CD4+ T cells can spell trouble. *Science Signaling*, 2015. **8**(360): p. ec18-ec18.
- [367.] Karazum, H. und Haudenschild, C. C., *et al.*, Lethal CD4 T Cell Responses Induced by Vaccination Against *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *J Infect Dis*, 2017. **215**(8): p. 1231-1239.
- [368.] Chousterman, B. G. und Swirski, F. K., *et al.*, Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol*, 2017. **39**(5): p. 517-528.
- [369.] Hotchkiss, R. S. und Moldawer, L. L., *et al.*, Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers*, 2016. **2**: p. 16045.
- [370.] Tisoncik, J. R. und Korth, M. J., *et al.*, Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2012. **76**(1): p. 16-32.
- [371.] Vitale, G. und Mion, F., *et al.*, Regulatory B cells: Evidence, developmental origin and population diversity. *Molecular Immunology*, 2010. **48**(1): p. 1-8.
- [372.] Fillatreau, S., Regulatory plasma cells. *Current Opinion in Pharmacology*, 2015. **23**: p. 1-5.
- [373.] Müller, K. P. und Schumacher, J., *et al.*, Half-life of antigen/major histocompatibility complex class II complexes in vivo: intra- and interorgan variations. *Eur J Immunol*, 1993. **23**(12): p. 3203-7.
- [374.] Watson, R. W. und Redmond, H. P., *et al.*, Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of *Escherichia coli*. *J Immunol*, 1996. **156**(10): p. 3986-92.
- [375.] Kobayashi, S. D. und Voyich, J. M., *et al.*, Global changes in gene expression by human polymorphonuclear leukocytes during receptor-mediated phagocytosis: cell fate is regulated at the level of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(10): p. 6901-6.
- [376.] Kobayashi, S. D. und Voyich, J. M., *et al.*, Gene expression profiling provides insight into the pathophysiology of chronic granulomatous disease. *J Immunol*, 2004. **172**(1): p. 636-43.
- [377.] Kennedy, A. D., DeLeo, F. R., Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res*, 2009. **43**(1-3): p. 25-61.
- [378.] Kitchen, E. und Rossi, A. G., *et al.*, Demonstration of reversible priming of human neutrophils using platelet-activating factor. *Blood*, 1996. **88**(11): p. 4330-7.
- [379.] Summers, C. und Singh, N. R., *et al.*, Pulmonary retention of primed neutrophils: a novel protective host response, which is impaired in the acute respiratory distress syndrome. *Thorax*, 2014. **69**(7): p. 623-9.
- [380.] N, A. G. und Bensinger, S. J., *et al.*, Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. *Immunity*, 2009. **31**(2): p. 245-58.
- [381.] Kumar, V., Sharma, A., Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol*, 2010. **10**(11): p. 1325-34.
- [382.] Stark, M. A. und Huo, Y., *et al.*, Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*, 2005. **22**(3): p. 285-94.
- [383.] Chessa, D. und Ganau, G., *et al.*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Virulence Strains as Causative Agents of Persistent Infections in Breast Implants. *PLoS One*, 2016. **11**(1): p. e0146668.
- [384.] Fabio Bagnoli, R. R., *Staphylococcus aureus* - Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis. Vol. 1. 2017: *Springer*. 540.
- [385.] Sakwinska, O. und Giddey, M., *et al.*, *Staphylococcus aureus* host range and human-bovine host shift. *Appl Environ Microbiol*, 2011. **77**(17): p. 5908-15.
- [386.] Haag, A. F. und Fitzgerald, J. R., *et al.*, *Staphylococcus aureus* in Animals. *Microbiol Spectr*, 2019. **7**(3).
- [387.] Heilmann, C., Adhesion mechanisms of staphylococci. *Adv Exp Med Biol*, 2011. **715**: p. 105-23.
- [388.] Tong, S. Y. und Davis, J. S., *et al.*, *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*, 2015. **28**(3): p. 603-61.

- [389.] Plouin-Gaudon, I. und Clement, S., *et al.*, Intracellular residency is frequently associated with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *Rhinology*, 2006. **44**(4): p. 249-54.
- [390.] Tan, N. C. und Cooksley, C. M., *et al.*, Small-colony variants and phenotype switching of intracellular *Staphylococcus aureus* in chronic rhinosinusitis. *Allergy*, 2014. **69**(10): p. 1364-71.
- [391.] Lowy, F. D., Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(9): p. 1265-73.
- [392.] Ranganathan, N. und Johnson, R., *et al.*, The general stress response of *Staphylococcus aureus* promotes tolerance of antibiotics and survival in whole human blood. *Microbiology*, 2020. **166**(11): p. 1088-1094.
- [393.] Tigabu, A., Getaneh, A., *Staphylococcus aureus*, ESKAPE Bacteria Challenging Current Health Care and Community Settings: a Literature Review. *Clin Lab*, 2021. **67**(7).
- [394.] Ogston, A., Microcococcus Poisoning. *J Anat Physiol*, 1882. **17**(Pt 1): p. 24-58.
- [395.] Billroth, T., von Mundy, J., Ueber den Transport der im Felde Verwundeten und Kranken (etc.). 1874: *Carl Gerold's Sohn*.
- [396.] Orenstein, A. The Discovery and Naming of *Staphylococcus aureus*. 2006.
- [397.] Longman, T. I., The Baker Illustrated Bible Dictionary. 2013: *Baker Books*.
- [398.] Thompson, D. V., The materials and techniques of medieval painting. Vol. 327. 1956: *Courier Corporation*.
- [399.] Gunnar, B., Trojanische Pferde für Krankenhauskeime. 2016, *Universität Würzburg*.
- [400.] Lewis, C. T., Harper's Latin Dictionary: A New Latin Dictionary Founded on the Translation of Freund's Latin-German Lexicon. 1891: *Harper & brothers*.
- [401.] Feil, E. J. und Cooper, J. E., *et al.*, How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J Bacteriol*, 2003. **185**(11): p. 3307-16.
- [402.] Otto, M., *Staphylococcus aureus* colonization of the skin and antimicrobial peptides. *Expert Rev Dermatol*, 2010. **5**(2): p. 183-195.
- [403.] Sakr, A. und Brégeon, F., *et al.*, *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. *Front Microbiol*, 2018. **9**: p. 2419.
- [404.] Knox, J. und Uhlemann, A. C., *et al.*, *Staphylococcus aureus* infections: transmission within households and the community. *Trends Microbiol*, 2015. **23**(7): p. 437-44.
- [405.] Solberg, C. O., Spread of *Staphylococcus aureus* in hospitals: causes and prevention. *Scand J Infect Dis*, 2000. **32**(6): p. 587-95.
- [406.] Scallan, E. und Hoekstra, R. M., *et al.*, Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis*, 2011. **17**(1): p. 7-15.
- [407.] Wu, S. und Huang, J., *et al.*, Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated From Retail Vegetables in China. *Frontiers in Microbiology*, 2018. **9**.
- [408.] Armstrong-Esther, C. A., Smith, J. E., Carriage patterns of *Staphylococcus aureus* in a healthy non-hospital population of adults and children. *Annals of Human Biology*, 1976. **3**(3): p. 221-227.
- [409.] Williams, R. E., Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev*, 1963. **27**(1): p. 56-71.
- [410.] Eriksen, N. H. und Espersen, F., *et al.*, Carriage of *Staphylococcus aureus* among 104 healthy persons during a 19-month period. *Epidemiol Infect*, 1995. **115**(1): p. 51-60.
- [411.] Kluytmans, J. A., Wertheim, H. F., Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. *Infection*, 2005. **33**(1): p. 3-8.
- [412.] Kluytmans, J. und van Belkum, A., *et al.*, Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev*, 1997. **10**(3): p. 505-20.
- [413.] Peacock, S. J. und Justice, A., *et al.*, Determinants of acquisition and carriage of *Staphylococcus aureus* in infancy. *J Clin Microbiol*, 2003. **41**(12): p. 5718-25.
- [414.] Leshem, E. und Maayan-Metzger, A., *et al.*, Transmission of *Staphylococcus aureus* from mothers to newborns. *Pediatr Infect Dis J*, 2012. **31**(4): p. 360-3.
- [415.] Wertheim, H. F. und Melles, D. C., *et al.*, The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*, 2005. **5**(12): p. 751-62.
- [416.] Mulcahy, M. E., McLoughlin, R. M., Host-Bacterial Crosstalk Determines *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization. *Trends Microbiol*, 2016. **24**(11): p. 872-886.
- [417.] Wertheim, H. F. und Verveer, J., *et al.*, Effect of mupirocin treatment on nasal, pharyngeal, and perineal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(4): p. 1465-7.
- [418.] Albrecht, V. S. und Limbago, B. M., *et al.*, *Staphylococcus aureus* Colonization and Strain Type at Various Body Sites among Patients with a Closed Abscess and Uninfected Controls at U.S. Emergency Departments. *J Clin Microbiol*, 2015. **53**(11): p. 3478-84.
- [419.] Cluzet, V. C. und Gerber, J. S., *et al.*, Duration of Colonization and Determinants of Earlier Clearance of Colonization With Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, 2015. **60**(10): p. 1489-1496.
- [420.] Reagan, D. R. und Doebbeling, B. N., *et al.*, Elimination of coincident *Staphylococcus aureus* nasal and hand carriage with intranasal application of mupirocin calcium ointment. *Ann Intern Med*, 1991. **114**(2): p. 101-6.
- [421.] Parras, F. und Guerrero, M. C., *et al.*, Comparative study of mupirocin and oral cotrimoxazole plus topical fusidic acid in eradication of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995. **39**(1): p. 175-9.
- [422.] Noble, W. C. und Williams, R. E., *et al.*, Some aspects of nasal carriage of *staphylococci*. *J Clin Pathol*, 1964. **17**(1): p. 79-83.
- [423.] Ritchie, S. R. und Isdale, E., *et al.*, The turnover of strains in intermittent and persistent nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. *J Infect*, 2016. **72**(3): p. 295-301.
- [424.] Aly, R. und Shinefield, H. I., *et al.*, Bacterial adherence to nasal mucosal cells. *Infect Immun*, 1977. **17**(3): p. 546-9.
- [425.] Huang, S. S., Platt, R., Risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after previous infection or colonization. *Clin Infect Dis*, 2003. **36**(3): p. 281-5.
- [426.] Dantes, R. und Mu, Y., *et al.*, National burden of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections, United States, 2011. *JAMA Intern Med*, 2013. **173**(21): p. 1970-8.
- [427.] Cyr, D. D. und Allen, A. S., *et al.*, Evaluating genetic susceptibility to *Staphylococcus aureus* bacteremia in African Americans using admixture mapping. *Genes & Immunity*, 2017. **18**(2): p. 95-99.

- [428.] Kinsman, O. S. und McKenna, R., *et al.*, Association between histocompatibility antigens (HLA) and nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*, 1983. **16**(2): p. 215-20.
- [429.] van den Akker, E. L. und Nouwen, J. L., *et al.*, *Staphylococcus aureus* nasal carriage is associated with glucocorticoid receptor gene polymorphisms. *J Infect Dis*, 2006. **194**(6): p. 814-8.
- [430.] Emonts, M. und Uitterlinden, A. G., *et al.*, Host polymorphisms in interleukin 4, complement factor H, and C-reactive protein associated with nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and occurrence of boils. *J Infect Dis*, 2008. **197**(9): p. 1244-53.
- [431.] Ruimy, R. und Angebault, C., *et al.*, Are host genetics the predominant determinant of persistent nasal *Staphylococcus aureus* carriage in humans? *The Journal of Infectious Diseases*, 2010. **202**(6): p. 924-934.
- [432.] Ye, Z. und Vasco, D. A., *et al.*, Genome wide association study of SNP-, gene-, and pathway-based approaches to identify genes influencing susceptibility to *Staphylococcus aureus* infections. *Frontiers in Genetics*, 2014. **5**.
- [433.] Shukla, S. K. und Rose, W., *et al.*, Complex host genetic susceptibility to *Staphylococcus aureus* infections. *Trends Microbiol*, 2015. **23**(9): p. 529-36.
- [434.] DeLorenze, G. N. und Nelson, C. L., *et al.*, Polymorphisms in HLA Class II Genes Are Associated With Susceptibility to *Staphylococcus aureus* Infection in a White Population. *J Infect Dis*, 2016. **213**(5): p. 816-23.
- [435.] Krogman, A. und Tilahun, A., *et al.*, HLA-DR polymorphisms influence in vivo responses to staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1 in a transgenic mouse model. *Hla*, 2017. **89**(1): p. 20-28.
- [436.] Olsen, K. und Falch, B. M., *et al.*, *Staphylococcus aureus* nasal carriage is associated with serum 25-hydroxyvitamin D levels, gender and smoking status. The Tromsø Staph and Skin Study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012. **31**(4): p. 465-73.
- [437.] Liu, C. M. und Price, L. B., *et al.*, *Staphylococcus aureus* and the ecology of the nasal microbiome. *Science Advances*. **1**(5): p. e1400216.
- [438.] Erikstrup, L. T. und Dinh, K. M., *et al.*, Cohort description: The Danish Blood Donor *Staphylococcus aureus* Carriage Study. *Clin Epidemiol*, 2019. **11**: p. 885-900.
- [439.] Winkler, J. und Block, C., *et al.*, Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: correlation with hormonal status in women. *J Infect Dis*, 1990. **162**(6): p. 1400-2.
- [440.] Zanger, P. und Nurjadi, D., *et al.*, Hormonal contraceptive use and persistent *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Clin Infect Dis*, 2012. **55**(12): p. 1625-32.
- [441.] Nouwen, J., Determinants, risks & dynamics of staphylococcus aureus nasal carriage. 2004, *Erasmus University Rotterdam*.
- [442.] Bourke, C. D. und Berkley, J. A., *et al.*, Immune Dysfunction as a Cause and Consequence of Malnutrition. *Trends Immunol*, 2016. **37**(6): p. 386-398.
- [443.] Afessa, B., Peters, S. G., Major complications following hematopoietic stem cell transplantation. *Semin Respir Crit Care Med*, 2006. **27**(3): p. 297-309.
- [444.] Nurjadi, D. und Herrmann, E., *et al.*, Impaired β -Defensin Expression in Human Skin Links DEFB1 Promoter Polymorphisms With Persistent *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage. *The Journal of Infectious Diseases*, 2013. **207**(4): p. 666-674.
- [445.] Nippe, N. und Varga, G., *et al.*, Subcutaneous infection with *S. aureus* in mice reveals association of resistance with influx of neutrophils and Th2 response. *J Invest Dermatol*, 2011. **131**(1): p. 125-32.
- [446.] Nurjadi, D. und Kain, M., *et al.*, Ratio of T-Helper Type 1 (Th1) to Th17 Cytokines in Whole Blood Is Associated With Human β -Defensin 3 Expression in Skin and Persistent *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage. *J Infect Dis*, 2016. **214**(11): p. 1744-1751.
- [447.] Rose, W. E. und Shukla, S. K., *et al.*, Increased Endovascular *Staphylococcus aureus* Inoculum Is the Link Between Elevated Serum Interleukin 10 Concentrations and Mortality in Patients With Bacteremia. *Clin Infect Dis*, 2017. **64**(10): p. 1406-1412.
- [448.] Pynnonen, M. und Stephenson, R. E., *et al.*, Hemoglobin Promotes *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization. *PLoS Pathogens*, 2011. **7**(7): p. e1002104.
- [449.] Frank, D. N. und Feazel, L. M., *et al.*, The Human Nasal Microbiota and *Staphylococcus aureus* Carriage. *PLoS One*, 2010. **5**(5): p. e10598.
- [450.] Zipperer, A. und Konnerth, M. C., *et al.*, Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature*, 2016. **535**(7613): p. 511-6.
- [451.] Aly, R. und Shinefield, H. R., *et al.*, Role of teichoic acid in the binding of *Staphylococcus aureus* to nasal epithelial cells. *J Infect Dis*, 1980. **141**(4): p. 463-5.
- [452.] Foster, T. J., McDevitt, D., Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*: their possible roles in virulence. *FEMS Microbiol Lett*, 1994. **118**(3): p. 199-205.
- [453.] Gong, J. Q. und Lin, L., *et al.*, Skin colonization by *Staphylococcus aureus* in patients with eczema and atopic dermatitis and relevant combined topical therapy: a double-blind multicentre randomized controlled trial. *Br J Dermatol*, 2006. **155**(4): p. 680-7.
- [454.] Demos, M. und McLeod, M. P., *et al.*, Recurrent furunculosis: a review of the literature. *Br J Dermatol*, 2012. **167**(4): p. 725-32.
- [455.] Immergluck, L. C. und Jain, S., *et al.*, Risk of Skin and Soft Tissue Infections among Children Found to be *Staphylococcus aureus* MRSA USA300 Carriers. *West J Emerg Med*, 2017. **18**(2): p. 201-212.
- [456.] Breuer, K. und S, H. A., *et al.*, *Staphylococcus aureus*: colonizing features and influence of an antibacterial treatment in adults with atopic dermatitis. *Br J Dermatol*, 2002. **147**(1): p. 55-61.
- [457.] Boguniewicz, M., Leung, D. Y., Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunol Rev*, 2011. **242**(1): p. 233-46.
- [458.] Hedström, S. A., Recurrent staphylococcal furunculosis. Bacteriological findings and epidemiology in 100 cases. *Scand J Infect Dis*, 1981. **13**(2): p. 115-9.
- [459.] Decker, M. D. und Lybarger, J. A., *et al.*, An outbreak of staphylococcal skin infections among river rafting guides. *Am J Epidemiol*, 1986. **124**(6): p. 969-76.
- [460.] Berman, D. S. und Schaefer, S., *et al.*, *Staphylococcus aureus* colonization in intravenous drug abusers, dialysis patients, and diabetics. *J Infect Dis*, 1987. **155**(4): p. 829-31.
- [461.] Laudien, M. und Gadola, S. D., *et al.*, Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and endonasal activity in Wegener's granulomatosis as compared to rheumatoid arthritis and chronic Rhinosinusitis with nasal polyps. *Clin Exp Rheumatol*, 2010. **28**(1 Suppl 57): p. 51-5.

- [462.] Gittelman, P. D. und Jacobs, J. B., *et al.*, *Staphylococcus aureus* nasal carriage in patients with rhinosinusitis. *The Laryngoscope*, 1991. **101**(7): p. 733-737.
- [463.] Raviglione, M. C. und Mariuz, P., *et al.*, High *Staphylococcus aureus* nasal carriage rate in patients with acquired immunodeficiency syndrome or AIDS-related complex. *Am J Infect Control*, 1990. **18**(2): p. 64-9.
- [464.] Abdullahi, I. N. und Issaoui, R., *et al.*, Prevalence and genetic lineages of *Staphylococcus aureus* nasal colonization and urinary tract infection among people living with HIV/AIDS in Nigeria: A systematic review. *IJID Regions*, 2022. **4**: p. 17-24.
- [465.] Amir, M. und Paul, J., *et al.*, Nasopharyngeal carriage of *Staphylococcus aureus* and carriage of tetracycline-resistant strains associated with HIV-seropositivity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1995. **14**(1): p. 34-40.
- [466.] Menne, E. N. und Sonabend, R. Y., *et al.*, *Staphylococcus aureus* infections in pediatric patients with diabetes mellitus. *J Infect*, 2012. **65**(2): p. 135-41.
- [467.] Davies, S. J. und Ogg, C. S., *et al.*, *Staphylococcus aureus* nasal carriage, exit-site infection and catheter loss in patients treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). *Perit Dial Int*, 1989. **9**(1): p. 61-4.
- [468.] Luzar, M. A. und Coles, G. A., *et al.*, *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *N Engl J Med*, 1990. **322**(8): p. 505-9.
- [469.] Grothe, C. und Taminato, M., *et al.*, Prophylactic treatment of chronic renal disease in patients undergoing peritoneal dialysis and colonized by *Staphylococcus aureus*: a systematic review and meta-analysis. *BMC Nephrology*, 2016. **17**(1): p. 115.
- [470.] Gabryszewski, S. J. und Wong Fok Lung, T., *et al.*, Metabolic Adaptation in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019. **61**(2): p. 185-197.
- [471.] Kahl, B. und Herrmann, M., *et al.*, Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis*, 1998. **177**(4): p. 1023-9.
- [472.] Besier, S. und Smaczny, C., *et al.*, Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Microbiol*, 2007. **45**(1): p. 168-72.
- [473.] Mitchell, G. und Grondin, G., *et al.*, Infection of polarized airway epithelial cells by normal and small-colony variant strains of *Staphylococcus aureus* is increased in cells with abnormal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function and is influenced by NF- κ B. *Infect Immun*, 2011. **79**(9): p. 3541-51.
- [474.] Schwartbeck, B. und Birtel, J., *et al.*, Dynamic in vivo mutations within the *ica* operon during persistence of *Staphylococcus aureus* in the airways of cystic fibrosis patients. *PLoS Pathogens*, 2016. **12**(11): p. e1006024.
- [475.] Akil, N., Muhlebach, M. S., Biology and management of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 2018. **53**(S3): p. S64-s74.
- [476.] Tuazon, C. U., Sheagren, J. N., Increased rate of carriage of *Staphylococcus aureus* among narcotic addicts. *J Infect Dis*, 1974. **129**(6): p. 725-7.
- [477.] Kirmani, N. und Tuazon, C. U., *et al.*, Carriage rate of *Staphylococcus aureus* among patients receiving allergy injections. *Ann Allergy*, 1980. **45**(4): p. 235-7.
- [478.] Weinke, T. und Schiller, R., *et al.*, Association between *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization and septicemia in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1992. **11**(11): p. 985-9.
- [479.] Utay, N. S. und Roque, A., *et al.*, MRSA Infections in HIV-Infected People Are Associated with Decreased MRSA-Specific Th1 Immunity. *PLoS Pathogens*, 2016. **12**(4): p. e1005580.
- [480.] Bonilla, F. A., Geha, R. S., 12. Primary immunodeficiency diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2003. **111**(2, Supplement 2): p. S571-S581.
- [481.] Na, M. und Jarneborn, A., *et al.*, Deficiency of the Complement Component 3 but Not Factor B Aggravates *Staphylococcus aureus* Septic Arthritis in Mice. *Infect Immun*, 2016. **84**(4): p. 930-939.
- [482.] Puel, A. und Picard, C., *et al.*, Recurrent staphylococcal cellulitis and subcutaneous abscesses in a child with autoantibodies against IL-6. *J Immunol*, 2008. **180**(1): p. 647-54.
- [483.] Guttman-Yassky, E. und Lowes, M. A., *et al.*, Low expression of the IL-23/Th17 pathway in atopic dermatitis compared to psoriasis. *J Immunol*, 2008. **181**(10): p. 7420-7.
- [484.] Casanova, J. L. und Abel, L., *et al.*, Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annu Rev Immunol*, 2011. **29**: p. 447-91.
- [485.] White, C. J., Gallin, J. I., Phagocyte defects. *Clin Immunol Immunopathol*, 1986. **40**(1): p. 50-61.
- [486.] Lorenz, E. und Mira, J. P., *et al.*, A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun*, 2000. **68**(11): p. 6398-401.
- [487.] Miller, L. S., Cho, J. S., Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. *Nature Reviews Immunology*, 2011. **11**(8): p. 505-518.
- [488.] Picard, C. und Puel, A., *et al.*, Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science*, 2003. **299**(5615): p. 2076-9.
- [489.] Picard, C. und von Bernuth, H., *et al.*, Clinical features and outcome of patients with IRAK-4 and MyD88 deficiency. *Medicine (Baltimore)*, 2010. **89**(6): p. 403-425.
- [490.] Kim, J. und Kim, B. E., *et al.*, Interactions Between Atopic Dermatitis and *Staphylococcus aureus* Infection: Clinical Implications. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2019. **11**(5): p. 593-603.
- [491.] Ma, C. S. und Chew, G. Y., *et al.*, Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3. *J Exp Med*, 2008. **205**(7): p. 1551-7.
- [492.] Minegishi, Y. und Saito, M., *et al.*, Molecular explanation for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome. *J Exp Med*, 2009. **206**(6): p. 1291-301.
- [493.] Netea, M. G. und Kullberg, B. J., *et al.*, Severely impaired IL-12/IL-18/IFN γ axis in patients with hyper IgE syndrome. *Eur J Clin Invest*, 2005. **35**(11): p. 718-21.
- [494.] Byrd, A. L. und Deming, C., *et al.*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strain diversity underlying pediatric atopic dermatitis. *Sci Transl Med*, 2017. **9**(397).
- [495.] Cho, S. H. und Strickland, I., *et al.*, Preferential binding of *Staphylococcus aureus* to skin sites of Th2-mediated inflammation in a murine model. *J Invest Dermatol*, 2001. **116**(5): p. 658-63.

- [496.] Machura, E. und Mazur, B., *et al.*, *Staphylococcus aureus* skin colonization in atopic dermatitis children is associated with decreased IFN-gamma production by peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells. *Pediatr Allergy Immunol*, 2008. **19**(1): p. 37-45.
- [497.] Burgey, C. und Kern, W. V., *et al.*, Differential induction of innate defense antimicrobial peptides in primary nasal epithelial cells upon stimulation with inflammatory cytokines, Th17 cytokines or bacterial conditioned medium from *Staphylococcus aureus* isolates. *Microb Pathog*, 2016. **90**: p. 69-77.
- [498.] Zanger, P. und Nurjadi, D., *et al.*, Persistent nasal carriage of *Staphylococcus aureus* is associated with deficient induction of human beta-defensin 3 after sterile wounding of healthy skin in vivo. *Infect Immun*, 2011. **79**(7): p. 2658-62.
- [499.] Brown, A. F. und Leech, J. M., *et al.*, *Staphylococcus aureus* Colonization: Modulation of Host Immune Response and Impact on Human Vaccine Design. *Front Immunol*, 2014. **4**: p. 507.
- [500.] Ammerlaan, H. S. und Harbarth, S., *et al.*, Secular trends in nosocomial bloodstream infections: antibiotic-resistant bacteria increase the total burden of infection. *Clin Infect Dis*, 2013. **56**(6): p. 798-805.
- [501.] Williams, R. E. O. und Blowers, R., *et al.*, Hospital Infection, Causes and Prevention. *Hospital Infection, Causes and Prevention.*, 1960.
- [502.] Bassett, H. F. und Ferguson, W. G., *et al.*, Sources of staphylococcal infection in surgical wound sepsis. *J Hyg (Lond)*, 1963. **61**(1): p. 83-94.
- [503.] Pittet, D., Wenzel, R. P., Nosocomial Bloodstream Infections: Secular Trends in Rates, Mortality, and Contribution to Total Hospital Deaths. *Archives of Internal Medicine*, 1995. **155**(11): p. 1177-1184.
- [504.] Korol, E. und Johnston, K., *et al.*, A systematic review of risk factors associated with surgical site infections among surgical patients. *PLoS One*, 2013. **8**(12): p. e83743.
- [505.] Anderson, D. J. und Arduino, J. M., *et al.*, Variation in the type and frequency of postoperative invasive *Staphylococcus aureus* infections according to type of surgical procedure. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 2010. **31**(7): p. 701-709.
- [506.] Cooper, B. S. und Medley, G. F., *et al.*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and the community: Stealth dynamics and control catastrophes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004. **101**(27): p. 10223-10228.
- [507.] Luzar, M. A., Exit-site infection in continuous ambulatory peritoneal dialysis: a review. *Perit Dial Int*, 1991. **11**(4): p. 333-40.
- [508.] Mangram, A. J. und Horan, T. C., *et al.*, Guideline for Prevention of Surgical Site Infection, 1999. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Am J Infect Control*, 1999. **27**(2): p. 97-132; quiz 133-4; discussion 96.
- [509.] Curtis, L. T., Prevention of hospital-acquired infections: review of non-pharmacological interventions. *J Hosp Infect*, 2008. **69**(3): p. 204-19.
- [510.] Munckhof, W., Antibiotics for surgical prophylaxis. *NPS Medicinwise*, 2005.
- [511.] Kaye, K. S. und Schmit, K., *et al.*, The effect of increasing age on the risk of surgical site infection. *J Infect Dis*, 2005. **191**(7): p. 1056-62.
- [512.] Fakhri, M. G. und Sharma, M., *et al.*, Increase in the rate of sternal surgical site infection after coronary artery bypass graft: a marker of higher severity of illness. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2007. **28**(6): p. 655-60.
- [513.] Hardtstock, F. und Heinrich, K., *et al.*, Burden of *Staphylococcus aureus* infections after orthopedic surgery in Germany. *BMC Infect Dis*, 2020. **20**(1): p. 233.
- [514.] L'Héritiau, F. und Lucet, J. C., *et al.*, Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and familial transmission. *Jama*, 1999. **282**(11): p. 1038-9.
- [515.] Davis, M. F. und Iverson, S. A., *et al.*, Household transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci. *The Lancet Infectious Diseases*, 2012. **12**(9): p. 703-716.
- [516.] Uhlemann, A.-C. und Dordel, J., *et al.*, Molecular tracing of the emergence, diversification, and transmission of *S. aureus* sequence type 8 in a New York community. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014. **111**(18): p. 6738-6743.
- [517.] Calfee, D. P. und Durbin, L. J., *et al.*, Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among household contacts of individuals with nosocomially acquired MRSA. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2003. **24**(6): p. 422-6.
- [518.] Mollema, F. P. und Richardus, J. H., *et al.*, Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to household contacts. *J Clin Microbiol*, 2010. **48**(1): p. 202-7.
- [519.] Nerby, J. M. und Gorwitz, R., *et al.*, Risk factors for household transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Infect Dis J*, 2011. **30**(11): p. 927-32.
- [520.] Uhlemann, A.-C. und Knox, J., *et al.*, The Environment as an Unrecognized Reservoir for Community-Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* USA300: A Case-Control Study. *PLoS One*, 2011. **6**(7): p. e22407.
- [521.] Knox, J. und Uhlemann, A. C., *et al.*, Environmental contamination as a risk factor for intra-household *Staphylococcus aureus* transmission. *PLoS One*, 2012. **7**(11): p. e49900.
- [522.] Eells, S. J. und David, M. Z., *et al.*, Persistent environmental contamination with USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other pathogenic strain types in households with *S. aureus* skin infections. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2014. **35**(11): p. 1373-82.
- [523.] Cook, H. A. und Furuya, E. Y., *et al.*, Heterosexual Transmission of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, 2007. **44**(3): p. 410-413.
- [524.] Johansson, P. J. und Gustafsson, E. B., *et al.*, High prevalence of MRSA in household contacts. *Scand J Infect Dis*, 2007. **39**(9): p. 764-8.
- [525.] Jones, T. F. und Creech, C. B., *et al.*, Family Outbreaks of Invasive Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 2006. **42**(9): p. e76-e78.
- [526.] Carrel, M. und Perencevich, E. N., *et al.*, USA300 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 2000-2013. *Emerg Infect Dis*, 2015. **21**(11): p. 1973-80.
- [527.] Macal, C. M. und North, M. J., *et al.*, Modeling the transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a dynamic agent-based simulation. *Journal of Translational Medicine*, 2014. **12**(1): p. 124.

- [528.] Knox, J. und Uhlemann, A.-C., *et al.*, Environmental Contamination as a Risk Factor for Intra-Household *Staphylococcus aureus* Transmission. *PLOS ONE*, 2012. **7**(11): p. e49900.
- [529.] Miller, L. G., Diep, B. A., Colonization, Fomites, and Virulence: Rethinking the Pathogenesis of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 2008. **46**(5): p. 752-760.
- [530.] Bancroft, E. A., Antimicrobial resistance: it's not just for hospitals. *Jama*, 2007. **298**(15): p. 1803-4.
- [531.] Campbell, K. M. und Vaughn, A. F., *et al.*, Risk factors for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in an outbreak of disease among military trainees in San Diego, California, in 2002. *J Clin Microbiol*, 2004. **42**(9): p. 4050-3.
- [532.] Eveillard, M. und de Lassence, A., *et al.*, Evaluation of a strategy of screening multiple anatomical sites for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at admission to a teaching hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2006. **27**(2): p. 181-4.
- [533.] Miller, L. G. und Eells, S. J., *et al.*, *Staphylococcus aureus* colonization among household contacts of patients with skin infections: risk factors, strain discordance, and complex ecology. *Clin Infect Dis*, 2012. **54**(11): p. 1523-35.
- [534.] Joh, D. und Wann, E. R., *et al.*, Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. *Matrix Biol*, 1999. **18**(3): p. 211-23.
- [535.] Clawson, C. C. und Rao, G. H., *et al.*, Platelet interaction with bacteria. IV. Stimulation of the release reaction. *Am J Pathol*, 1975. **81**(2): p. 411-20.
- [536.] Chaffey, N., Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. Molecular biology of the cell. 4th edn. 2003: Oxford University Press.
- [537.] Patti, J. M. und Allen, B. L., *et al.*, MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual Review of Microbiology*, 1994. **48**(1): p. 585-617.
- [538.] Que, Y. A. und François, P., *et al.*, Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. *Infect Immun*, 2001. **69**(10): p. 6296-302.
- [539.] Chavakis, T. und Wiechmann, K., *et al.*, *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost*, 2005. **94**(2): p. 278-85.
- [540.] Geoghegan, J. A., Foster, T. J., Cell Wall-Anchored Surface Proteins of *Staphylococcus aureus*: Many Proteins, Multiple Functions. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017. **409**: p. 95-120.
- [541.] Bischoff, M. und Dunman, P., *et al.*, Microarray-based analysis of the *Staphylococcus aureus* *sigmaB* regulon. *J Bacteriol*, 2004. **186**(13): p. 4085-99.
- [542.] Hammer, N. D., Skaar, E. P., Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* iron acquisition. *Annu Rev Microbiol*, 2011. **65**: p. 129-47.
- [543.] Baur, S. und Rautenberg, M., *et al.*, A Nasal Epithelial Receptor for *Staphylococcus aureus* WTA Governs Adhesion to Epithelial Cells and Modulates Nasal Colonization. *PLoS Pathogens*, 2014. **10**(5): p. e1004089.
- [544.] Mazmanian, S. K. und Liu, G., *et al.*, *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science*, 1999. **285**(5428): p. 760-3.
- [545.] Oh, K. B. und Oh, M. N., *et al.*, Inhibition of sortase-mediated *Staphylococcus aureus* adhesion to fibronectin via fibronectin-binding protein by sortase inhibitors. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006. **70**(1): p. 102-6.
- [546.] Deivanayagam, C. C. und Wann, E. R., *et al.*, A novel variant of the immunoglobulin fold in surface adhesins of *Staphylococcus aureus*: crystal structure of the fibrinogen-binding MSCRAMM, clumping factor A. *Embo j*, 2002. **21**(24): p. 6660-72.
- [547.] Deisenhofer, J., Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry*, 1981. **20**(9): p. 2361-2370.
- [548.] Boyle, M. D., Bacterial Immunoglobulin-Binding Proteins: Applications in Immunotechnology. 2014: Academic Press.
- [549.] Ponnuraj, K. und Bowden, M. G., *et al.*, A "dock, lock, and latch" structural model for a staphylococcal adhesin binding to fibrinogen. *Cell*, 2003. **115**(2): p. 217-28.
- [550.] Bowden, M. G. und Heuck, A. P., *et al.*, Evidence for the "dock, lock, and latch" ligand binding mechanism of the staphylococcal microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) SdrG. *J Biol Chem*, 2008. **283**(1): p. 638-647.
- [551.] Wertheim, H. F. und Walsh, E., *et al.*, Key role for clumping factor B in *Staphylococcus aureus* nasal colonization of humans. *PLoS Med*, 2008. **5**(1): p. e17.
- [552.] Walsh, E. J. und O'Brien, L. M., *et al.*, Clumping factor B, a fibrinogen-binding MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) adhesin of *Staphylococcus aureus*, also binds to the tail region of type I cytokeratin 10. *J Biol Chem*, 2004. **279**(49): p. 50691-9.
- [553.] Mulcahy, M. E. und Geoghegan, J. A., *et al.*, Nasal Colonisation by *Staphylococcus aureus* Depends upon Clumping Factor B Binding to the Squamous Epithelial Cell Envelope Protein Loricrin. *PLoS Pathogens*, 2012. **8**(12): p. e1003092.
- [554.] Clarke, S. R. und Andre, G., *et al.*, Iron-regulated surface determinant protein A mediates adhesion of *Staphylococcus aureus* to human corneocyte envelope proteins. *Infect Immun*, 2009. **77**(6): p. 2408-16.
- [555.] Flock, M., Flock, J. I., Rebinding of extracellular adherence protein Eap to *Staphylococcus aureus* can occur through a surface-bound neutral phosphatase. *J Bacteriol*, 2001. **183**(13): p. 3999-4003.
- [556.] Gross, M. und Cramton, S. E., *et al.*, Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect Immun*, 2001. **69**(5): p. 3423-6.
- [557.] Schneewind, O., Missiakas, D. M., Staphylococcal Protein Secretion and Envelope Assembly. *Microbiol Spectr*, 2019. **7**(4).
- [558.] Tager, M., Studies on the nature and the purification of the coagulase-reacting factor and its relation to prothrombin. *Journal of Experimental Medicine*, 1956. **104**(5): p. 675-686.
- [559.] Pozzi, C. und Bagnoli, F., *et al.*, *Staphylococcus aureus* coagulase R domain, a new evasion mechanism and vaccine target. *J Exp Med*, 2016. **213**(3): p. 292.

- [560.] Hussain, M. und Hagggar, A., *et al.*, Insertional inactivation of Eap in *Staphylococcus aureus* strain Newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts. *Infect Immun*, 2002. **70**(6): p. 2933-40.
- [561.] Hagggar, A. und Hussain, M., *et al.*, Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect Immun*, 2003. **71**(5): p. 2310-7.
- [562.] McDevitt, D. und Francois, P., *et al.*, Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 1994. **11**(2): p. 237-48.
- [563.] Ashraf, S. und Cheng, J., *et al.*, Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* interacts with AnnexinA2 on mammary epithelial cells. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 40608.
- [564.] Ganesh, V. K. und Rivera, J. J., *et al.*, A structural model of the *Staphylococcus aureus* ClfA-fibrinogen interaction opens new avenues for the design of anti-staphylococcal therapeutics. *PLoS Pathog*, 2008. **4**(11): p. e1000226.
- [565.] Hair, P. S. und Ward, M. D., *et al.*, *Staphylococcus aureus* clumping factor A binds to complement regulator factor I and increases factor I cleavage of C3b. *J Infect Dis*, 2008. **198**(1): p. 125-33.
- [566.] Hair, P. S. und Echague, C. G., *et al.*, Clumping factor A interaction with complement factor I increases C3b cleavage on the bacterial surface of *Staphylococcus aureus* and decreases complement-mediated phagocytosis. *Infect Immun*, 2010. **78**(4): p. 1717-27.
- [567.] George, N. P. und Wei, Q., *et al.*, *Staphylococcus aureus* adhesion via Spa, ClfA, and SdrCDE to immobilized platelets demonstrates shear-dependent behavior. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(10): p. 2394-400.
- [568.] Siboo, I. R. und Cheung, A. L., *et al.*, Clumping factor A mediates binding of *Staphylococcus aureus* to human platelets. *Infect Immun*, 2001. **69**(5): p. 3120-7.
- [569.] O'Brien, L. und Kerrigan, S. W., *et al.*, Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. *Molecular Microbiology*, 2002. **44**(4): p. 1033-1044.
- [570.] Diep, B. A. und Gill, S. R., *et al.*, Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 2006. **367**(9512): p. 731-9.
- [571.] Su Y., W. S., Li Y. R414Z6 R414Z6_STAAU. *UniProt* 2012.
- [572.] Keane, F. M. und Loughman, A., *et al.*, Fibrinogen and elastin bind to the same region within the A domain of fibronectin binding protein A, an MSCRAMM of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 2007. **63**(3): p. 711-23.
- [573.] Burke, F. M. und Di Poto, A., *et al.*, The A domain of fibronectin-binding protein B of *Staphylococcus aureus* contains a novel fibronectin binding site. *Febs j*, 2011. **278**(13): p. 2359-71.
- [574.] Sinha, B. und Francois, P., *et al.*, Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect Immun*, 2000. **68**(12): p. 6871-8.
- [575.] Peacock, S. J. und Foster, T. J., *et al.*, Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiology*, 1999. **145** (Pt 12): p. 3477-3486.
- [576.] Herman-Bausier, P. und Pietrocola, G., *et al.*, Fibrinogen Activates the Capture of Human Plasminogen by Staphylococcal Fibronectin-Binding Proteins. *mBio*, 2017. **8**(5).
- [577.] Heilmann, C. und Niemann, S., *et al.*, *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein (FnBP)-mediated adherence to platelets, and aggregation of platelets induced by FnBPA but not by FnBPB. *J Infect Dis*, 2004. **190**(2): p. 321-9.
- [578.] Miajlovic, H. und Loughman, A., *et al.*, Both complement- and fibrinogen-dependent mechanisms contribute to platelet aggregation mediated by *Staphylococcus aureus* clumping factor B. *Infect Immun*, 2007. **75**(7): p. 3335-43.
- [579.] Houston, P. und Rowe, S. E., *et al.*, Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infect Immun*, 2011. **79**(3): p. 1153-65.
- [580.] Dziewanowska, K. und Patti, J. M., *et al.*, Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect Immun*, 1999. **67**(9): p. 4673-8.
- [581.] Fitzgerald, J. R. und Loughman, A., *et al.*, Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* mediate activation of human platelets via fibrinogen and fibronectin bridges to integrin GPIIb/IIIa and IgG binding to the Fcγ3R1a receptor. *Mol Microbiol*, 2006. **59**(1): p. 212-30.
- [582.] Baba, T. und Takeuchi, F., *et al.*, Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*, 2002. **359**(9320): p. 1819-27.
- [583.] Clarke, S. R. und Wiltshire, M. D., *et al.*, IsdA of *Staphylococcus aureus* is a broad spectrum, iron-regulated adhesin. *Mol Microbiol*, 2004. **51**(5): p. 1509-19.
- [584.] Taylor, J. M., Heinrichs, D. E., Transferrin binding in *Staphylococcus aureus*: involvement of a cell wall-anchored protein. *Mol Microbiol*, 2002. **43**(6): p. 1603-14.
- [585.] Miajlovic, H. und Zapotoczna, M., *et al.*, Direct interaction of iron-regulated surface determinant IsdB of *Staphylococcus aureus* with the GPIIb/IIIa receptor on platelets. *Microbiology*, 2010. **156**(Pt 3): p. 920-928.
- [586.] Clarke, S. R. und Mohamed, R., *et al.*, The *Staphylococcus aureus* surface protein IsdA mediates resistance to innate defenses of human skin. *Cell Host Microbe*, 2007. **1**(3): p. 199-212.
- [587.] Clarke, S. R., Foster, S. J., IsdA protects *Staphylococcus aureus* against the bactericidal protease activity of apolactoferrin. *Infect Immun*, 2008. **76**(4): p. 1518-26.
- [588.] Grigg, J. C. und Ukpabi, G., *et al.*, Structural biology of heme binding in the *Staphylococcus aureus* Isd system. *J Inorg Biochem*, 2010. **104**(3): p. 341-8.
- [589.] Zapotoczna, M. und Jevnikar, Z., *et al.*, Iron-regulated surface determinant B (IsdB) promotes *Staphylococcus aureus* adherence to and internalization by non-phagocytic human cells. *Cell Microbiol*, 2013. **15**(6): p. 1026-41.
- [590.] Santos-Júnior, C. D. und Veríssimo, A., *et al.*, The recombination dynamics of *Staphylococcus aureus* inferred from spA gene. *BMC Microbiology*, 2016. **16**(1): p. 143.
- [591.] Nguyen, T. und Ghebrehiwet, B., *et al.*, *Staphylococcus aureus* protein A recognizes platelet gC1qR/p33: a novel mechanism for staphylococcal interactions with platelets. *Infect Immun*, 2000. **68**(4): p. 2061-8.

- [592.] Cedergren, L. und Andersson, R., *et al.*, Mutational analysis of the interaction between staphylococcal protein A and human IgG₁. *Protein Eng*, 1993. **6**(4): p. 441-8.
- [593.] Graille, M. und Stura, E. A., *et al.*, Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(10): p. 5399-404.
- [594.] Gómez, M. I. und O'Seaghda, M., *et al.*, *Staphylococcus aureus* protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains. *J Biol Chem*, 2006. **281**(29): p. 20190-6.
- [595.] O'Seaghda, M. und van Schooten, C. J., *et al.*, *Staphylococcus aureus* protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions. *Febs j*, 2006. **273**(21): p. 4831-41.
- [596.] Hawiger, J. und Steckley, S., *et al.*, *Staphylococci*-induced human platelet injury mediated by protein A and immunoglobulin G Fc fragment receptor. *J Clin Invest*, 1979. **64**(4): p. 931-7.
- [597.] Merino, N. und Toledo-Arana, A., *et al.*, Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 2009. **191**(3): p. 832-43.
- [598.] McGavin, M. H. und Krajewska-Pietrasik, D., *et al.*, Identification of a *Staphylococcus aureus* extracellular matrix-binding protein with broad specificity. *Infect Immun*, 1993. **61**(6): p. 2479-85.
- [599.] Eisenbeis, J. und Saffarzadeh, M., *et al.*, The *Staphylococcus aureus* Extracellular Adherence Protein Eap Is a DNA Binding Protein Capable of Blocking Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018. **8**.
- [600.] Palma, M. und Haggar, A., *et al.*, Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J Bacteriol*, 1999. **181**(9): p. 2840-5.
- [601.] Chavakis, T. und Hussain, M., *et al.*, *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med*, 2002. **8**(7): p. 687-93.
- [602.] Stapels, D. A. und Ramyar, K. X., *et al.*, *Staphylococcus aureus* secretes a unique class of neutrophil serine protease inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(36): p. 13187-92.
- [603.] Lee, L. Y. und Miyamoto, Y. J., *et al.*, The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. *J Clin Invest*, 2002. **110**(10): p. 1461-71.
- [604.] Bodén, M. K., Flock, J. I., Cloning and characterization of a gene for a 19 kDa fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 1994. **12**(4): p. 599-606.
- [605.] Wade, D. und Palma, M., *et al.*, Identification of functional domains in Efb, a fibrinogen binding protein of *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **248**(3): p. 690-5.
- [606.] Palma, M. und Shannon, O., *et al.*, Extracellular fibrinogen-binding protein, Efb, from *Staphylococcus aureus* blocks platelet aggregation due to its binding to the alpha-chain. *J Biol Chem*, 2001. **276**(34): p. 31691-7.
- [607.] Lee, L. Y. und Höök, M., *et al.*, Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. *J Infect Dis*, 2004. **190**(3): p. 571-9.
- [608.] Palma, M. und Nozohoor, S., *et al.*, Lack of the extracellular 19-kilodalton fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus* decreases virulence in experimental wound infection. *Infection and Immunity*, 1996. **64**(12): p. 5284-5289.
- [609.] Hussain, M. und Becker, K., *et al.*, Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. *J Bacteriol*, 2001. **183**(23): p. 6778-86.
- [610.] Geraci, J. und Neubauer, S., *et al.*, The *Staphylococcus aureus* extracellular matrix protein (Emp) has a fibrous structure and binds to different extracellular matrices. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 13665.
- [611.] Baba, T. und Bae, T., *et al.*, Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. *J Bacteriol*, 2008. **190**(1): p. 300-10.
- [612.] Heilmann, C. und Herrmann, M., *et al.*, Platelet-binding domains in 2 fibrinogen-binding proteins of *Staphylococcus aureus* identified by phage display. *J Infect Dis*, 2002. **186**(1): p. 32-9.
- [613.] KAWABATA, S.-i. und Morita, T., *et al.*, Enzymatic properties of staphylothrombin, an active molecular complex formed between staphylocoagulase and human prothrombin. *The Journal of Biochemistry*, 1985. **98**(6): p. 1603-1614.
- [614.] Loof, T. G. und Goldmann, O., *et al.*, *Staphylococcus aureus*-induced clotting of plasma is an immune evasion mechanism for persistence within the fibrin network. *Microbiology*, 2015. **161**(Pt 3): p. 621-627.
- [615.] Bjerketorp, J. und Nilsson, M., *et al.*, A novel von Willebrand factor binding protein expressed by *Staphylococcus aureus* The GenBank accession number for the sequence reported in this paper is AY032850. *Microbiology*, 2002. **148**(7): p. 2037-2044.
- [616.] Bjerketorp, J. und Jacobsson, K., *et al.*, The von Willebrand factor-binding protein (vWbp) of *Staphylococcus aureus* is a coagulase. *FEMS Microbiol Lett*, 2004. **234**(2): p. 309-14.
- [617.] Guggenberger, C. und Wolz, C., *et al.*, Two Distinct Coagulase-Dependent Barriers Protect *Staphylococcus aureus* from Neutrophils in a Three Dimensional in vitro Infection Model. *PLoS Pathogens*, 2012. **8**(1): p. e1002434.
- [618.] Hijazi, K., Almebairik, N., Gould, I. Oggioni, M. KAB2187904.1. *National Library of Medicine* 2019 [cited 2022].
- [619.] de Allori, M. und iacute, *et al.*, Antimicrobial Resistance and Production of Biofilms in Clinical Isolates of Coagulase-Negative *Staphylococcus* Strains. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2006. **29**(8): p. 1592-1596.
- [620.] Ma, X. und Sun, D., *et al.*, Epidemiological and molecular characterization of *Staphylococcus haemolyticus* strains, from a hematology ward, with decreased susceptibility to glycopeptides. *Canadian Journal of Microbiology*, 2011. **57**: p. 476-84.
- [621.] Johnson, M. und Cockayne, A., *et al.*, Iron-regulated biofilm formation in *Staphylococcus aureus* Newman requires ica and the secreted protein Emp. *Infect Immun*, 2008. **76**(4): p. 1756-65.
- [622.] Harraghy, N. und Kormanec, J., *et al.*, sae is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp. *Microbiology*, 2005. **151**(6): p. 1789-1800.

- [623.] Wittekind, M. A. und Frey, A., *et al.*, The novel protein ScrA acts through the SaeRS two-component system to regulate virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 2022. **117**(5): p. 1196-1212.
- [624.] Johnson, M. und Cockayne, A., *et al.*, Iron-responsive regulation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* involves *fur*-dependent and *fur*-independent mechanisms. *J Bacteriol*, 2005. **187**(23): p. 8211-5.
- [625.] Ravipaty, S., Reilly, J. P., Comprehensive characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* COL secretome by two-dimensional liquid chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 2010. **9**(9): p. 1898-919.
- [626.] Cheng, A. G. und Kim, H. K., *et al.*, Genetic requirements for *Staphylococcus aureus* abscess formation and persistence in host tissues. *Faseb j*, 2009. **23**(10): p. 3393-404.
- [627.] Kalinka, J. und Hachmeister, M., *et al.*, *Staphylococcus aureus* isolates from chronic osteomyelitis are characterized by high host cell invasion and intracellular adaptation, but still induce inflammation. *International Journal of Medical Microbiology*, 2014. **304**(8): p. 1038-1049.
- [628.] Liao, S.-M. und Du, Q.-S., *et al.*, The multiple roles of histidine in protein interactions. *Chemistry Central Journal*, 2013. **7**(1): p. 44.
- [629.] Barnhart, M. M., Chapman, M. R., Curli Biogenesis and Function. *Annual Review of Microbiology*, 2006. **60**(1): p. 131-147.
- [630.] Ganz, T., Nemeth, E., Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(8): p. 500-10.
- [631.] Arvidson, S., Tegmark, K., Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2001. **291**(2): p. 159-170.
- [632.] Clarke, S. R., Foster, S. J., Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Adv Microb Physiol*, 2006. **51**: p. 187-224.
- [633.] Anwar, S. und Prince, L. R., *et al.*, The rise and rise of *Staphylococcus aureus*: laughing in the face of granulocytes. *Clin Exp Immunol*, 2009. **157**(2): p. 216-24.
- [634.] Riya, M. und Anjali, P., *et al.*, Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*, in *Insights Into Drug Resistance in Staphylococcus aureus*, A. Amjad, Editor. 2021, *IntechOpen: Rijeka*. p. Ch. 5.
- [635.] Saïd-Salim, B. und Mathema, B., *et al.*, Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2003. **24**(6): p. 451-5.
- [636.] Watts, A. und Ke, D., *et al.*, *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. *Infect Immun*, 2005. **73**(6): p. 3502-11.
- [637.] Cheung, A. L. und Bayer, A. S., *et al.*, Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2004. **40**(1): p. 1-9.
- [638.] Tuchscher, L. und Pöllath, C., *et al.*, Clinical *S. aureus* Isolates Vary in Their Virulence to Promote Adaptation to the Host. *Toxins (Basel)*, 2019. **11**(3).
- [639.] Juttukonda, L. J. und Berends, E. T. M., *et al.*, Dietary Manganese Promotes Staphylococcal Infection of the Heart. *Cell Host Microbe*, 2017. **22**(4): p. 531-542.e8.
- [640.] Detilleux, J. C., Neutrophils in the war against *Staphylococcus aureus*: predator-prey models to the rescue. *J Dairy Sci*, 2004. **87**(11): p. 3716-24.
- [641.] Pishchany, G. und McCoy, A. L., *et al.*, Specificity for human hemoglobin enhances *Staphylococcus aureus* infection. *Cell Host Microbe*, 2010. **8**(6): p. 544-50.
- [642.] Yarwood, J. M., Schlievert, P. M., Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin Invest*, 2003. **112**(11): p. 1620-5.
- [643.] Steinhuber, A. und Goerke, C., *et al.*, Molecular architecture of the regulatory Locus *sae* of *Staphylococcus aureus* and its impact on expression of virulence factors. *J Bacteriol*, 2003. **185**(21): p. 6278-86.
- [644.] Geiger, T. und Goerke, C., *et al.*, The virulence regulator *Sae* of *Staphylococcus aureus*: promoter activities and response to phagocytosis-related signals. *J Bacteriol*, 2008. **190**(10): p. 3419-28.
- [645.] Nicholas, R. O. und Li, T., *et al.*, Isolation and characterization of a *sigB* deletion mutant of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 1999. **67**(7): p. 3667-9.
- [646.] Rachid, S. und Ohlsen, K., *et al.*, Alternative transcription factor *sigma(B)* is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. *J Bacteriol*, 2000. **182**(23): p. 6824-6.
- [647.] Frees, D. und Sørensen, K., *et al.*, Global virulence regulation in *Staphylococcus aureus*: pinpointing the roles of ClpP and ClpX in the *sar/agr* regulatory network. *Infect Immun*, 2005. **73**(12): p. 8100-8.
- [648.] Cheung, A. L., Zhang, G., Global regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus* by the *SarA* protein family. *Front Biosci*, 2002. **7**: p. d1825-42.
- [649.] Münzenmayer, L. und Geiger, T., *et al.*, Influence of *Sae*-regulated and *Agr*-regulated factors on the escape of *Staphylococcus aureus* from human macrophages. *Cell Microbiol*, 2016. **18**(8): p. 1172-83.
- [650.] Dunman, P. M. und Murphy, E., *et al.*, Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *J Bacteriol*, 2001. **183**(24): p. 7341-53.
- [651.] Rutherford, S. T., Bassler, B. L., Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. **2**(11).
- [652.] Le, K. Y., Otto, M., Quorum-sensing regulation in *staphylococci*-an overview. *Front Microbiol*, 2015. **6**: p. 1174.
- [653.] Traber, K. E. und Lee, E., *et al.*, *agr* function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology*, 2008. **154**(Pt 8): p. 2265-2274.
- [654.] Pollitt, E. J. und West, S. A., *et al.*, Cooperation, quorum sensing, and evolution of virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 2014. **82**(3): p. 1045-51.
- [655.] He, L. und Le, K. Y., *et al.*, Resistance to leukocytes ties benefits of quorum sensing dysfunctionality to biofilm infection. *Nat Microbiol*, 2019. **4**(7): p. 1114-1119.
- [656.] Fowler, V. G., Jr. und Sakoulas, G., *et al.*, Persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with *agr* dysfunction and low-level in vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein. *J Infect Dis*, 2004. **190**(6): p. 1140-9.
- [657.] Novick, R. P., Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol*, 2003. **48**(6): p. 1429-49.
- [658.] Bui, L. M. und Conlon, B. P., *et al.*, Antibiotic tolerance and the alternative lifestyles of *Staphylococcus aureus*. *Essays Biochem*, 2017. **61**(1): p. 71-79.

- [659.] Edwards, A. M., Phenotype switching is a natural consequence of *Staphylococcus aureus* replication. *J Bacteriol*, 2012. **194**(19): p. 5404-12.
- [660.] Tuchscher, L., Löffler, B., *Staphylococcus aureus* dynamically adapts global regulators and virulence factor expression in the course from acute to chronic infection. *Curr Genet*, 2016. **62**(1): p. 15-7.
- [661.] Kittinger, C. und Toplitsch, D., et al., Phenotypic Stability of *Staphylococcus Aureus* Small Colony Variants (SCV) Isolates from Cystic Fibrosis (CF) Patients. *Int J Environ Res Public Health*, 2019. **16**(11).
- [662.] Post, V. und Wahl, P., et al., Phenotypic and genotypic characterisation of *Staphylococcus aureus* causing musculoskeletal infections. *International Journal of Medical Microbiology*, 2014. **304**(5): p. 565-576.
- [663.] Tuchscher, L. und Geraci, J., et al., *Staphylococcus aureus* Regulator Sigma B is Important to Develop Chronic Infections in Hematogenous Murine Osteomyelitis Model. *Pathogens*, 2017. **6**(3).
- [664.] Kussell, E. und Kishony, R., et al., Bacterial persistence: a model of survival in changing environments. *Genetics*, 2005. **169**(4): p. 1807-14.
- [665.] Proctor, R. A. und Kriegeskorte, A., et al., *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Front Cell Infect Microbiol*, 2014. **4**: p. 99.
- [666.] Guo, H. und Tong, Y., et al., Biofilm and Small Colony Variants-An Update on *Staphylococcus aureus* Strategies toward Drug Resistance. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(3).
- [667.] McLaughlin, R. A., Hoogewerf, A. J., Interleukin-1 β -induced growth enhancement of *Staphylococcus aureus* occurs in biofilm but not planktonic cultures. *Microbial Pathogenesis*, 2006. **41**(2): p. 67-79.
- [668.] Bui, L. M. G. und Turnidge, J. D., et al., The induction of *Staphylococcus aureus* biofilm formation or Small Colony Variants is a strain-specific response to host-generated chemical stresses. *Microbes Infect*, 2015. **17**(1): p. 77-82.
- [669.] Painter, K. L. und Strange, E., et al., *Staphylococcus aureus* adapts to oxidative stress by producing H₂O₂-resistant small-colony variants via the SOS response. *Infect Immun*, 2015. **83**(5): p. 1830-44.
- [670.] Balaban, N. Q. und Merrin, J., et al., Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, 2004. **305**(5690): p. 1622-5.
- [671.] Cheng, A. G. und DeDent, A. C., et al., A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation. *Trends Microbiol*, 2011. **19**(5): p. 225-32.
- [672.] Kobayashi, S. D. und Malachowa, N., et al., Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses. *Am J Pathol*, 2015. **185**(6): p. 1518-27.
- [673.] Bubeck Wardenburg, J. und Williams, W. A., et al., Host defenses against *Staphylococcus aureus* infection require recognition of bacterial lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(37): p. 13831-6.
- [674.] Lam, G. T. und Sweeney, F. J., Jr., et al., Abscess-forming factor(s) produced by *Staphylococcus aureus*. II. Abscess formation and immunity by a *Staphylococcus* and its mutants. *J Bacteriol*, 1963. **86**(1): p. 87-91.
- [675.] Gorbach, S. L., Good and laudable pus. *J Clin Invest*, 1995. **96**(6): p. 2545.
- [676.] Chan, W. C. und Coyle, B. J., et al., Virulence regulation and quorum sensing in staphylococcal infections: competitive AgrC antagonists as quorum sensing inhibitors. *J Med Chem*, 2004. **47**(19): p. 4633-41.
- [677.] Peetermans, M. und Vanassche, T., et al., Plasminogen activation by staphylokinase enhances local spreading of *S. aureus* in skin infections. *BMC Microbiology*, 2014. **14**: p. 310.
- [678.] Feng, Y. und Zou, L., et al., Bone marrow MyD88 signaling modulates neutrophil function and ischemic myocardial injury. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010. **299**(4): p. C760-9.
- [679.] Cho, J. S. und Guo, Y., et al., Neutrophil-derived IL-1 β is sufficient for abscess formation in immunity against *Staphylococcus aureus* in mice. *PLoS Pathog*, 2012. **8**(11): p. e1003047.
- [680.] Otto, M., Staphylococcal Biofilms. *Microbiol Spectr*, 2018. **6**(4).
- [681.] Toledo-Arana, A. und Merino, N., et al., *Staphylococcus aureus* develops an alternative, ica-independent biofilm in the absence of the arlRS two-component system. *J Bacteriol*, 2005. **187**(15): p. 5318-29.
- [682.] Fournier, B. und Klier, A., et al., The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 2001. **41**(1): p. 247-61.
- [683.] Cramton, S. E. und Ulrich, M., et al., Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun*, 2001. **69**(6): p. 4079-85.
- [684.] Cue, D. und Lei, M. G., et al., Rbf promotes biofilm formation by *Staphylococcus aureus* via repression of icaR, a negative regulator of icaADBC. *J Bacteriol*, 2009. **191**(20): p. 6363-73.
- [685.] Ulrich, M. und Bastian, M., et al., The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces ica gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions. *Mol Microbiol*, 2007. **65**(5): p. 1276-87.
- [686.] Jefferson, K. K. und Pier, D. B., et al., The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the ica locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 2004. **186**(8): p. 2449-56.
- [687.] Pamp, S. J. und Frees, D., et al., Spx is a global effector impacting stress tolerance and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 2006. **188**(13): p. 4861-70.
- [688.] Lasa, I., Penadés, J. R., Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in Microbiology*, 2006. **157**(2): p. 99-107.
- [689.] Donlan, R. M., Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis*, 2001. **7**(2): p. 277-81.
- [690.] Ferguson, B. J., Stolz, D. B., Demonstration of biofilm in human bacterial chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol*, 2005. **19**(5): p. 452-7.
- [691.] Lew, D. P., Waldvogel, F. A., Osteomyelitis. *Lancet*, 2004. **364**(9431): p. 369-79.
- [692.] Buzón-Durán, L. und Alonso-Calleja, C., et al., Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. *Food Microbiol*, 2017. **65**: p. 294-301.
- [693.] Mack, D. und Fischer, W., et al., The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol*, 1996. **178**(1): p. 175-83.

- [694.] Maira-Litrán, T. und Kropec, A., *et al.*, Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect Immun*, 2002. **70**(8): p. 4433-40.
- [695.] Arciola, C. R. und Campoccia, D., *et al.*, Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cell Infect Microbiol*, 2015. **5**: p. 7.
- [696.] Whitchurch, C. B. und Tolker-Nielsen, T., *et al.*, Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 2002. **295**(5559): p. 1487.
- [697.] Steinberger, R. E., Holden, P. A., Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 2005. **71**(9): p. 5404-10.
- [698.] Larsen, P. und Nielsen, J. L., *et al.*, Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. *Environ Microbiol*, 2007. **9**(12): p. 3077-90.
- [699.] Hussain, M. und Wilcox, M. H., *et al.*, The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol Rev*, 1993. **10**(3-4): p. 191-207.
- [700.] Cucarella, C. und Tormo, M. A., *et al.*, Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 2004. **72**(4): p. 2177-85.
- [701.] Vanassche, T. und Peetermans, M., *et al.*, The Role of Staphylothrassin-Mediated Fibrin Deposition in Catheter-Related *Staphylococcus aureus* Infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 2013. **208**(1): p. 92-100.
- [702.] Mann, E. E. und Rice, K. C., *et al.*, Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One*, 2009. **4**(6): p. e5822.
- [703.] Kohler, C. und von Eiff, C., *et al.*, A defect in menadione biosynthesis induces global changes in gene expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 2008. **190**(19): p. 6351-64.
- [704.] Lewis, K., Persister Cells. *Annual Review of Microbiology*, 2010. **64**(1): p. 357-372.
- [705.] Waters, E. M. und Rowe, S. E., *et al.*, Convergence of *Staphylococcus aureus* Persister and Biofilm Research: Can Biofilms Be Defined as Communities of Adherent Persister Cells? *PLoS Pathogens*, 2016. **12**(12): p. e1006012.
- [706.] Brady, R. A. und Leid, J. G., *et al.*, Identification of *Staphylococcus aureus* proteins recognized by the antibody-mediated immune response to a biofilm infection. *Infection and Immunity*, 2006. **74**(6): p. 3415-3426.
- [707.] Xu, Y. und Maltesen, R. G., *et al.*, In vivo gene expression in a *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection characterized by RNA sequencing and metabolomics: a pilot study. *BMC Microbiology*, 2016. **16**(1): p. 80.
- [708.] Lei, M. G. und Gupta, R. K., *et al.*, Proteomics of *Staphylococcus aureus* biofilm matrix in a rat model of orthopedic implant-associated infection. *PLoS One*, 2017. **12**(11): p. e0187981.
- [709.] Boles, B. R., Horswill, A. R., Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog*, 2008. **4**(4): p. e1000052.
- [710.] Lauderdale, K. J. und Boles, B. R., *et al.*, Interconnections between Sigma B, agr, and proteolytic activity in *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *Infect Immun*, 2009. **77**(4): p. 1623-35.
- [711.] Proctor, R., Respiration and Small Colony Variants of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology Spectrum*, 2019. **7**(3): p. 7.3.22.
- [712.] Tuchscher, L. und Löffler, B., *et al.*, Persistence of *Staphylococcus aureus*: Multiple Metabolic Pathways Impact the Expression of Virulence Factors in Small-Colony Variants (SCVs). *Front Microbiol*, 2020. **11**: p. 1028.
- [713.] Tuchscher, L. und Bischoff, M., *et al.*, Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate *Staphylococcus aureus* Adaptation during Chronic Infections. *PLoS Pathog*, 2015. **11**(4): p. e1004870.
- [714.] Sendi, P., Proctor, R. A., *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol*, 2009. **17**(2): p. 54-8.
- [715.] Kahl, B. C., Small colony variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus*--a bacterial survival strategy. *Infect Genet Evol*, 2014. **21**: p. 515-22.
- [716.] Kahl, B. C. und Belling, G., *et al.*, Thymidine-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* exhibit gross morphological and ultrastructural changes consistent with impaired cell separation. *J Clin Microbiol*, 2003. **41**(1): p. 410-3.
- [717.] Bui, L. M. und Hoffmann, P., *et al.*, Prolonged growth of a clinical *Staphylococcus aureus* strain selects for a stable small-colony-variant cell type. *Infect Immun*, 2015. **83**(2): p. 470-81.
- [718.] Singh, R. und Ray, P., *et al.*, Enhanced production of exopolysaccharide matrix and biofilm by a menadione-auxotrophic *Staphylococcus aureus* small-colony variant. *J Med Microbiol*, 2010. **59**(Pt 5): p. 521-527.
- [719.] Proctor, R. A. und von Eiff, C., *et al.*, Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nature Reviews Microbiology*, 2006. **4**(4): p. 295-305.
- [720.] Hirschhausen, N. und Block, D., *et al.*, Extended *Staphylococcus aureus* persistence in cystic fibrosis is associated with bacterial adaptation. *Int J Med Microbiol*, 2013. **303**(8): p. 685-92.
- [721.] Masoud-Landgraf, L. und Zarfel, G., *et al.*, Analysis and Characterization of *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants Isolated From Cystic Fibrosis Patients in Austria. *Curr Microbiol*, 2016. **72**(5): p. 606-11.
- [722.] Kriegeskorte, A. und Grubmüller, S., *et al.*, *Staphylococcus aureus* small colony variants show common metabolic features in central metabolism irrespective of the underlying auxotrophism. *Front Cell Infect Microbiol*, 2014. **4**: p. 141.
- [723.] Tuchscher, L. und Medina, E., *et al.*, *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol Med*, 2011. **3**(3): p. 129-41.
- [724.] Hoffman, L. R. und Déziel, E., *et al.*, Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(52): p. 19890-5.
- [725.] Cheng, N. C. und Wang, J. T., *et al.*, Necrotizing fasciitis caused by *Staphylococcus aureus*: the emergence of methicillin-resistant strains. *Ann Plast Surg*, 2011. **67**(6): p. 632-6.
- [726.] Todd, J. K., Toxic shock syndrome. *Clin Microbiol Rev*, 1988. **1**(4): p. 432-46.
- [727.] Farrell, A. M., Staphylococcal scalded-skin syndrome. *Lancet*, 1999. **354**(9182): p. 880-881.
- [728.] Wang, R. und Braughton, K. R., *et al.*, Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med*, 2007. **13**(12): p. 1510-4.
- [729.] Peschel, A., Otto, M., Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat Rev Microbiol*, 2013. **11**(10): p. 667-73.
- [730.] Aman, M. J., Adhikari, R. P., Staphylococcal bicomponent pore-forming toxins: targets for prophylaxis and immunotherapy. *Toxins (Basel)*, 2014. **6**(3): p. 950-72.

- [731.] Spaan, A. N. und van Strijp, J. A. G., *et al.*, Leukocidins: staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors. *Nature Reviews Microbiology*, 2017. **15**(7): p. 435-447.
- [732.] Fraser, J. D., Proft, T., The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunol Rev*, 2008. **225**: p. 226-43.
- [733.] Spaulding, A. R. und Salgado-Pabón, W., *et al.*, Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clin Microbiol Rev*, 2013. **26**(3): p. 422-47.
- [734.] Gyles, C. L., Prescott, John F., Songer, J. Glenn, Thoen, Charles O., Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Edition, Fourth ed. 2010: *Blackwell Publishing*
- [735.] Hébert, G. A., Hancock, G. A., Synergistic hemolysis exhibited by species of staphylococci. *J Clin Microbiol*, 1985. **22**(3): p. 409-15.
- [736.] Cheung, G. Y. und Duong, A. C., *et al.*, Direct and synergistic hemolysis caused by *Staphylococcus* phenol-soluble modulins: implications for diagnosis and pathogenesis. *Microbes Infect*, 2012. **14**(4): p. 380-6.
- [737.] Perret, M. und Badiou, C., *et al.*, Cross-talk between *Staphylococcus aureus* leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner. *Cell Microbiol*, 2012. **14**(7): p. 1019-36.
- [738.] Yoong, P., Torres, V. J., Counter inhibition between leukotoxins attenuates *Staphylococcus aureus* virulence. *Nature Communications*, 2015. **6**(1): p. 8125.
- [739.] Gase, K. und Ferretti, J. J., *et al.*, Identification, cloning, and expression of the CAMP factor gene (*cfa*) of group A streptococci. *Infect Immun*, 1999. **67**(9): p. 4725-31.
- [740.] Wang, X. und Thompson, C. D., *et al.*, Release of *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles and their application as a vaccine platform. *Nature Communications*, 2018. **9**(1): p. 1379.
- [741.] Wang, X. und Eagen, W. J., *et al.*, Orchestration of human macrophage NLRP3 inflammasome activation by *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020. **117**(6): p. 3174-3184.
- [742.] Nakagawa, S. und Matsumoto, M., *et al.*, *Staphylococcus aureus* Virulent PSM α Peptides Induce Keratinocyte Alarmin Release to Orchestrate IL-17-Dependent Skin Inflammation. *Cell Host Microbe*, 2017. **22**(5): p. 667-677.e5.
- [743.] Joo, H. S. und Cheung, G. Y., *et al.*, Antimicrobial activity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is caused by phenol-soluble modulin derivatives. *J Biol Chem*, 2011. **286**(11): p. 8933-40.
- [744.] Periasamy, S. und Joo, H.-S., *et al.*, How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012. **109**(4): p. 1281-1286.
- [745.] Schreiner, J. und Kretschmer, D., *et al.*, *Staphylococcus aureus* phenol-soluble modulin peptides modulate dendritic cell functions and increase in vitro priming of regulatory T cells. *J Immunol*, 2013. **190**(7): p. 3417-26.
- [746.] Hodille, E. und Cuerq, C., *et al.*, Delta Hemolysin and Phenol-Soluble Modulins, but Not Alpha Hemolysin or Pantone-Valentine Leukocidin, Induce Mast Cell Activation. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016. **6**: p. 180.
- [747.] Richardson, J. R. und Armbruster, N. S., *et al.*, PSM Peptides From Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Impair the Adaptive Immune Response via Modulation of Dendritic Cell Subsets in vivo. *Frontiers in Immunology*, 2019. **10**.
- [748.] Kretschmer, D. und Gleske, A. K., *et al.*, Human formyl peptide receptor 2 senses highly pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe*, 2010. **7**(6): p. 463-73.
- [749.] Bhakdi, S., Tranum-Jensen, J., Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev*, 1991. **55**(4): p. 733-51.
- [750.] Bubeck-Wardenburg, J., Schneewind, O., Vaccine protection against *Staphylococcus aureus* pneumonia. *J Exp Med*, 2008. **205**(2): p. 287-94.
- [751.] Nygaard, T. K. und Pallister, K. B., *et al.*, Alpha-toxin induces programmed cell death of human T cells, B cells, and monocytes during USA300 infection. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e36532.
- [752.] Bantel, H. und Sinha, B., *et al.*, alpha-Toxin is a mediator of *Staphylococcus aureus*-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling. *J Cell Biol*, 2001. **155**(4): p. 637-48.
- [753.] Frank, K. M. und Zhou, T., *et al.*, Host response signature to *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin implicates pulmonary Th17 response. *Infect Immun*, 2012. **80**(9): p. 3161-9.
- [754.] Kebaier, C. und Chamberland, R. R., *et al.*, *Staphylococcus aureus* α -hemolysin mediates virulence in a murine model of severe pneumonia through activation of the NLRP3 inflammasome. *J Infect Dis*, 2012. **205**(5): p. 807-17.
- [755.] Powers, Michael E. und Becker, Russell E. N., *et al.*, Synergistic Action of *Staphylococcus aureus* α -Toxin on Platelets and Myeloid Lineage Cells Contributes to Lethal Sepsis. *Cell Host & Microbe*, 2015. **17**(6): p. 775-787.
- [756.] Hermann, I. und R  th, S., *et al.*, *Staphylococcus aureus* hemolysin A disrupts cell-matrix adhesions in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015. **52**(1): p. 14-24.
- [757.] Eiffler, I. und Behnke, J., *et al.*, *Staphylococcus aureus* α -toxin-mediated cation entry depolarizes membrane potential and activates p38 MAP kinase in airway epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2016. **311**(3): p. L676-L685.
- [758.] Goldmann, O. und Tuchscher, L., *et al.*, α -Hemolysin enhances *Staphylococcus aureus* internalization and survival within mast cells by modulating the expression of β 1 integrin. *Cellular Microbiology*, 2016. **18**(6): p. 807-819.
- [759.] Olson, R. und Nariya, H., *et al.*, Crystal structure of staphylococcal LukF delineates conformational changes accompanying formation of a transmembrane channel. *Nat Struct Biol*, 1999. **6**(2): p. 134-40.
- [760.] Liu, J. und Kozhaya, L., *et al.*, Structure-based discovery of a small-molecule inhibitor of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* virulence. *J Biol Chem*, 2020. **295**(18): p. 5944-5959.
- [761.] Guillet, V. und Roblin, P., *et al.*, Crystal Structure of Leucotoxin S Component. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**: p. 41028-41037.
- [762.] Yamashita, K. und Kawai, Y., *et al.*, Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal γ -hemolysin reveals the β -barrel pore formation mechanism by two components. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(42): p. 17314-9.
- [763.] Yamashita, D. und Sugawara, T., *et al.*, Molecular basis of transmembrane beta-barrel formation of staphylococcal pore-forming toxins. *Nature Communications*, 2014. **5**(1): p. 4897.
- [764.] Trstenjak, N. und Milić, D., *et al.*, Molecular mechanism of leukocidin GH-integrin CD11b/CD18 recognition and species specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020. **117**(1): p. 317-327.

- [765.] Badarau, A. und Rouha, H., *et al.*, Context matters: The importance of dimerization-induced conformation of the LukGH leukocidin of *Staphylococcus aureus* for the generation of neutralizing antibodies. *MAbs*, 2016. **8**(7): p. 1347-1360.
- [766.] Reyes-Robles, T. und Alonzo, F., *et al.*, *Staphylococcus aureus* Leukotoxin ED Targets the Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2 to Kill Leukocytes and Promote Infection. *Cell Host & Microbe*, 2013. **14**(4): p. 453-459.
- [767.] DuMont, A. L. und Yoong, P., *et al.*, *Staphylococcus aureus* elaborates leukocidin AB to mediate escape from within human neutrophils. *Infect Immun*, 2013. **81**(5): p. 1830-41.
- [768.] Martínez-Aguilar, G. und Avalos-Mishaan, A., *et al.*, Community-acquired, methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children. *Pediatr Infect Dis J*, 2004. **23**(8): p. 701-6.
- [769.] Blaine, K. P. und Tuohy, M. J., *et al.*, Progression to bacteremia in critical care patients colonized with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing Panton-Valentine leukocidin. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2010. **68**(1): p. 28-33.
- [770.] Genestier, A. L. und Michallet, M. C., *et al.*, *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest*, 2005. **115**(11): p. 3117-27.
- [771.] Hensler, T. und König, B., *et al.*, Leukotriene B4 generation and DNA fragmentation induced by leukocidin from *Staphylococcus aureus*: protective role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and G-CSF for human neutrophils. *Infect Immun*, 1994. **62**(6): p. 2529-35.
- [772.] Graves, S. F. und Kobayashi, S. D., *et al.*, Sublytic concentrations of *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin alter human PMN gene expression and enhance bactericidal capacity. *J Leukoc Biol*, 2012. **92**(2): p. 361-74.
- [773.] Muñoz-Planillo, R. und Franchi, L., *et al.*, A critical role for hemolysins and bacterial lipoproteins in *Staphylococcus aureus*-induced activation of the Nlrp3 inflammasome. *J Immunol*, 2009. **183**(6): p. 3942-8.
- [774.] Holzinger, D. und Geldon, L., *et al.*, *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin induces an inflammatory response in human phagocytes via the NLRP3 inflammasome. *Journal of Leukocyte Biology*, 2012. **92**(5): p. 1069-1081.
- [775.] Melehani, J. H. und James, D. B. A., *et al.*, *Staphylococcus aureus* Leukocidin A/B (LukAB) Kills Human Monocytes via Host NLRP3 and ASC when Extracellular, but Not Intracellular. *PLoS Pathogens*, 2015. **11**(6): p. e1004970.
- [776.] Li, Y. und Xiao, Q., *et al.*, Extracellular Vesicles: Emerging Therapeutics in Cutaneous Lesions. *Int J Nanomedicine*, 2021. **16**: p. 6183-6202.
- [777.] Schlievert, P. M., Staphylococcal enterotoxin B and toxic-shock syndrome toxin-1 are significantly associated with non-menstrual TSS. *Lancet*, 1986. **1**(8490): p. 1149-50.
- [778.] Murray, P. R. und Rosenthal, K. S., *et al.*, Medical microbiology E-book. 2020: Elsevier Health Sciences.
- [779.] Davis, J. P. und Chesney, P. J., *et al.*, Toxic-shock syndrome: epidemiologic features, recurrence, risk factors, and prevention. *N Engl J Med*, 1980. **303**(25): p. 1429-35.
- [780.] Ross, A., Shoff, H. W., *Staphylococcal Scalded Skin Syndrome*. StatPearls Publishing, 2022.
- [781.] Lamand, V. und Dauwalder, O., *et al.*, Epidemiological data of staphylococcal scalded skin syndrome in France from 1997 to 2007 and microbiological characteristics of *Staphylococcus aureus* associated strains. *Clin Microbiol Infect*, 2012. **18**(12): p. E514-21.
- [782.] Handler, M. Z., Schwartz, R. A., Staphylococcal scalded skin syndrome: diagnosis and management in children and adults. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2014. **28**(11): p. 1418-1423.
- [783.] Ladhani, S. und Joannou, C. L., *et al.*, Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin Microbiol Rev*, 1999. **12**(2): p. 224-42.
- [784.] Patel, G. K., Finlay, A. Y., Staphylococcal scalded skin syndrome: diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol*, 2003. **4**(3): p. 165-75.
- [785.] Otto, M., *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr Opin Microbiol*, 2014. **17**: p. 32-7.
- [786.] Berends, E. T. und Dekkers, J. F., *et al.*, Distinct localization of the complement C5b-9 complex on Gram-positive bacteria. *Cell Microbiol*, 2013. **15**(12): p. 1955-68.
- [787.] Gilbert, I., Dissociation in an Encapsulated *Staphylococcus*. *J Bacteriol*, 1931. **21**(3): p. 157-60.
- [788.] O'Riordan, K., Lee, J. C., *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev*, 2004. **17**(1): p. 218-34.
- [789.] Thomas, S. und Liu, W., *et al.*, The Complex Fibrinogen Interactions of the *Staphylococcus aureus* Coagulases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019. **9**.
- [790.] Werdan, K. und Dietz, S., *et al.*, Mechanisms of infective endocarditis: pathogen-host interaction and risk states. *Nat Rev Cardiol*, 2014. **11**(1): p. 35-50.
- [791.] Palmqvist, N. und Patti, J. M., *et al.*, Expression of staphylococcal clumping factor A impedes macrophage phagocytosis. *Microbes Infect*, 2004. **6**(2): p. 188-95.
- [792.] Higgins, J. und Loughman, A., *et al.*, Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. *FEMS Microbiol Lett*, 2006. **258**(2): p. 290-6.
- [793.] Flick, M. J. und Du, X., *et al.*, Genetic elimination of the binding motif on fibrinogen for the *S. aureus* virulence factor ClfA improves host survival in septicemia. *Blood*, 2013. **121**(10): p. 1783-94.
- [794.] McAdow, M. und Kim, H. K., *et al.*, Preventing *Staphylococcus aureus* sepsis through the inhibition of its agglutination in blood. *PLoS Pathog*, 2011. **7**(10): p. e1002307.
- [795.] Kang, M. und Ko, Y. P., *et al.*, Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway. *J Biol Chem*, 2013. **288**(28): p. 20520-31.
- [796.] Hair, P. S. und Wagner, S. M., *et al.*, Complement regulator C4BP binds to *Staphylococcus aureus* and decreases opsonization. *Mol Immunol*, 2012. **50**(4): p. 253-61.
- [797.] Woehl, J. L. und Stapels, D. A. C., *et al.*, The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* inhibits the classical and lectin pathways of complement by blocking formation of the C3 proconvertase. *J Immunol*, 2014. **193**(12): p. 6161-6171.
- [798.] Amdahl, H. und Haapasalo, K., *et al.*, Staphylococcal protein Ecb impairs complement receptor-1 mediated recognition of opsonized bacteria. *PLoS One*, 2017. **12**(3): p. e0172675.

- [799.] Kuipers, A. und Stapels, D. A. C., *et al.*, The *Staphylococcus aureus* polysaccharide capsule and Efb-dependent fibrinogen shield act in concert to protect against phagocytosis. *Microbiology*, 2016. **162**(7): p. 1185-1194.
- [800.] Visai, L. und Yanagisawa, N., *et al.*, Immune evasion by *Staphylococcus aureus* conferred by iron-regulated surface determinant protein IsdH. *Microbiology*, 2009. **155**(Pt 3): p. 667-679.
- [801.] Burman, J. D. und Leung, E., *et al.*, Interaction of Human Complement with Sbi, a Staphylococcal Immunoglobulin-binding Protein: Indications of a novel mechanism of complement evasion by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. **283**(25): p. 17579-17593.
- [802.] Atkins, K. L. und Burman, J. D., *et al.*, *S. aureus* IgG-binding proteins SpA and Sbi: Host specificity and mechanisms of immune complex formation. *Molecular Immunology*, 2008. **45**(6): p. 1600-1611.
- [803.] Sharp, J. A. und Echague, C. G., *et al.*, *Staphylococcus aureus* surface protein SdrE binds complement regulator factor H as an immune evasion tactic. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e38407.
- [804.] Zhang, Y. und Wu, M., *et al.*, *Staphylococcus aureus* SdrE captures complement factor H's C-terminus via a novel 'close, dock, lock and latch' mechanism for complement evasion. *Biochem J*, 2017. **474**(10): p. 1619-1631.
- [805.] Falugi, F. und Kim Hwan, K., *et al.*, Role of Protein A in the Evasion of Host Adaptive Immune Responses by *Staphylococcus aureus*. *mBio*, 2013. **4**(5): p. e00575-13.
- [806.] Bestebroer, J. und Aerts, P. C., *et al.*, Functional basis for complement evasion by staphylococcal superantigen-like 7. *Cell Microbiol*, 2010. **12**(10): p. 1506-16.
- [807.] Langley, R. und Wines, B., *et al.*, The staphylococcal superantigen-like protein 7 binds IgA and complement C5 and inhibits IgA-Fc alpha RI binding and serum killing of bacteria. *J Immunol*, 2005. **174**(5): p. 2926-33.
- [808.] Itoh, S. und Hamada, E., *et al.*, Staphylococcal superantigen-like protein 10 (SSL10) binds to human immunoglobulin G (IgG) and inhibits complement activation via the classical pathway. *Mol Immunol*, 2010. **47**(4): p. 932-8.
- [809.] Patel, D. und Wines, B. D., *et al.*, Specificity of Staphylococcal Superantigen-Like Protein 10 toward the Human IgG₁ Fc Domain. *The Journal of Immunology*, 2010. **184**(11): p. 6283.
- [810.] Forsgren, A., Protein A from *Staphylococcus aureus*. 8. Production of protein A by bacterial and L-forms of *S. aureus*. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 1969. **75**(3): p. 481-90.
- [811.] Frank, M., Antibody binding to Protein A and Protein G beads. *Molecular Biology Protocols*, Oklahoma City, 2001.
- [812.] Bae, T., Schneewind, O., The YSIRK-G/S Motif of Staphylococcal Protein A and Its Role in Efficiency of Signal Peptide Processing. *Journal of Bacteriology*, 2003. **185**(9): p. 2910-2919.
- [813.] DeDent, A. und Bae, T., *et al.*, Signal peptides direct surface proteins to two distinct envelope locations of *Staphylococcus aureus*. *Embo j*, 2008. **27**(20): p. 2656-68.
- [814.] Prokešová, L. und Potužníková, B., *et al.*, Cleavage of human immunoglobulins by serine proteinase from *Staphylococcus aureus*. *Immunology Letters*, 1992. **31**(3): p. 259-265.
- [815.] Murphy, J. und Ramezanpour, M., *et al.*, *Staphylococcus Aureus* V8 protease disrupts the integrity of the airway epithelial barrier and impairs IL-6 production in vitro. *The Laryngoscope*, 2018. **128**(1): p. E8-E15.
- [816.] Jin, T. und Bokarewa, M., *et al.*, *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol*, 2004. **172**(2): p. 1169-76.
- [817.] Sieprawska-Lupa, M. und Mydel, P., *et al.*, Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. **48**(12): p. 4673-9.
- [818.] Rooijackers, S. H. M. und Ruyken, M., *et al.*, Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nature Immunology*, 2005. **6**(9): p. 920-927.
- [819.] Sultan, A. R. und Swierstra, J. W., *et al.*, Production of Staphylococcal Complement Inhibitor (SCIN) and Other Immune Modulators during the Early Stages of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation in a Mammalian Cell Culture Medium. *Infect Immun*, 2018. **86**(8).
- [820.] Ruotsalainen, E. und Kardén-Lilja, M., *et al.*, Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* bacteraemia and endocarditis among injection drug users and nonaddicts: host factors, microbiological and serological characteristics. *J Infect*, 2008. **56**(4): p. 249-56.
- [821.] Vuong, C. und Voyich, J. M., *et al.*, Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol*, 2004. **6**(3): p. 269-75.
- [822.] O'Gara, J. P., *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 2007. **270**(2): p. 179-188.
- [823.] Richman, D. D. und Cleveland, P. H., *et al.*, The binding of staphylococcal protein A by the sera of different animal species. *J Immunol*, 1982. **128**(5): p. 2300-5.
- [824.] Page, M., Thorpe, R., Purification of IgG using protein A or protein G. *The protein protocols handbook*, 1996: p. 733-734.
- [825.] Clement, S. und Vaudaux, P., *et al.*, Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *J Infect Dis*, 2005. **192**(6): p. 1023-8.
- [826.] Alder, K. D. und Lee, I., *et al.*, Intracellular *Staphylococcus aureus* in bone and joint infections: A mechanism of disease recurrence, inflammation, and bone and cartilage destruction. *Bone*, 2020. **141**: p. 115568.
- [827.] Proctor, R. A. und van Langevelde, P., *et al.*, Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*, 1995. **20**(1): p. 95-102.
- [828.] Tuchscher, L. und Heitmann, V., *et al.*, *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *J Infect Dis*, 2010. **202**(7): p. 1031-40.
- [829.] Thwaites, G. E., Gant, V., Are bloodstream leukocytes Trojan Horses for the metastasis of *Staphylococcus aureus*? *Nat Rev Microbiol*, 2011. **9**(3): p. 215-22.
- [830.] Flannagan, R. S. und Heit, B., *et al.*, Intracellular replication of *Staphylococcus aureus* in mature phagolysosomes in macrophages precedes host cell death, and bacterial escape and dissemination. *Cell Microbiol*, 2016. **18**(4): p. 514-35.
- [831.] Jorch, S. K. und Surewaard, B. G., *et al.*, Peritoneal GATA6+ macrophages function as a portal for *Staphylococcus aureus* dissemination. *J Clin Invest*, 2019. **129**(11): p. 4643-4656.

- [832.] Edwards, A. M. und Potts, J. R., *et al.*, *Staphylococcus aureus* host cell invasion and virulence in sepsis is facilitated by the multiple repeats within FnBPA. *PLoS Pathog.* 2010. **6**(6): p. e1000964.
- [833.] Sinha, B. und François, P. P., *et al.*, Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cell Microbiol.* 1999. **1**(2): p. 101-17.
- [834.] Bur, S. und Preissner, K. T., *et al.*, The *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein promotes bacterial internalization by keratinocytes independent of fibronectin-binding proteins. *J Invest Dermatol.* 2013. **133**(8): p. 2004-12.
- [835.] Hirschhausen, N. und Schlesier, T., *et al.*, A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. *Cell Microbiol.* 2010. **12**(12): p. 1746-64.
- [836.] Truong-Bolduc, Q. C. und Bolduc, G. R., *et al.*, Role of the Tet38 Efflux Pump in *Staphylococcus aureus* Internalization and Survival in Epithelial Cells. *Infect Immun.* 2015. **83**(11): p. 4362-72.
- [837.] Truong-Bolduc, Q. C. und Khan, N. S., *et al.*, Tet38 Efflux Pump Affects *Staphylococcus aureus* Internalization by Epithelial Cells through Interaction with CD36 and Contributes to Bacterial Escape from Acidic and Nonacidic Phagolysosomes. *Infect Immun.* 2017. **85**(2).
- [838.] Sinha, B., Herrmann, M., Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by *Staphylococcus aureus*. *Thromb Haemost.* 2005. **94**(2): p. 266-77.
- [839.] von Eiff, C. und Becker, K., *et al.*, Intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants within keratinocytes: a cause for antibiotic treatment failure in a patient with darier's disease. *Clin Infect Dis.* 2001. **32**(11): p. 1643-7.
- [840.] O'Keefe, K. M. und Wilk, M. M., *et al.*, Manipulation of Autophagy in Phagocytes Facilitates *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection. *Infect Immun.* 2015. **83**(9): p. 3445-57.
- [841.] Dai, Y. und Gao, C., *et al.*, Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Uses the VraSR Regulatory System to Modulate Autophagy for Increased Intracellular Survival in Macrophage-Like Cell Line RAW264.7. *Frontiers in Microbiology.* 2019. **10**.
- [842.] Gresham, H. D. und Lowrance, J. H., *et al.*, Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol.* 2000. **164**(7): p. 3713-22.
- [843.] Moldovan, A., Fraunholz, M. J., In or out: Phagosomal escape of *Staphylococcus aureus*. *Cellular Microbiology.* 2019. **21**(3): p. e12997.
- [844.] Baker, J. und Sitthisak, S., *et al.*, Copper stress induces a global stress response in *Staphylococcus aureus* and represses *sa*e and *agr* expression and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2010. **76**(1): p. 150-60.
- [845.] Flannagan, R. S. und Kuiack, R. C., *et al.*, *Staphylococcus aureus* Uses the GraXRS Regulatory System To Sense and Adapt to the Acidified Phagolysosome in Macrophages. *mBio.* 2018. **9**(4).
- [846.] Murphy, G. R. und Dunstan, R. H., *et al.*, Alterations in amino acid metabolism during growth by *Staphylococcus aureus* following exposure to H(2)O(2) - A multifactorial approach. *Heliyon.* 2018. **4**(5): p. e00620.
- [847.] Sen, S. und Sirobhusanam, S., *et al.*, Growth-Environment Dependent Modulation of *Staphylococcus aureus* Branched-Chain to Straight-Chain Fatty Acid Ratio and Incorporation of Unsaturated Fatty Acids. *PLoS One.* 2016. **11**(10): p. e0165300.
- [848.] Chang, W. und Small, D. A., *et al.*, Global transcriptome analysis of *Staphylococcus aureus* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol.* 2006. **188**(4): p. 1648-59.
- [849.] Zapotoczna, M. und Riboldi, G. P., *et al.*, Mobile-Genetic-Element-Encoded Hypertolerance to Copper Protects *Staphylococcus aureus* from Killing by Host Phagocytes. *mBio.* 2018. **9**(5).
- [850.] Karavolos, M. H. und Horsburgh, M. J., *et al.*, Role and regulation of the superoxide dismutases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology.* 2003. **149**(Pt 10): p. 2749-2758.
- [851.] Garcia, Y. M. und Barwinska-Sendra, A., *et al.*, A Superoxide Dismutase Capable of Functioning with Iron or Manganese Promotes the Resistance of *Staphylococcus aureus* to Calprotectin and Nutritional Immunity. *PLoS Pathogens.* 2017. **13**(1): p. e1006125.
- [852.] Coady, A. und Xu, M., *et al.*, The *Staphylococcus aureus* ABC-Type Manganese Transporter MntABC Is Critical for Reinitiation of Bacterial Replication Following Exposure to Phagocytic Oxidative Burst. *PLoS One.* 2015. **10**(9): p. e0138350.
- [853.] Handke Luke, D. und Gribenko Alexey, V., *et al.*, MntC-Dependent Manganese Transport Is Essential for *Staphylococcus aureus* Oxidative Stress Resistance and Virulence. *mSphere.* 2018. **3**(4): p. e00336-18.
- [854.] Modun, B. und Evans Robert, W., *et al.*, Receptor-Mediated Recognition and Uptake of Iron from Human Transferrin by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity.* 1998. **66**(8): p. 3591-3596.
- [855.] Beasley Federico, C. und Marolda Cristina, L., *et al.*, *Staphylococcus aureus* Transporters Hts, Sir, and Sst Capture Iron Liberated from Human Transferrin by Staphyloferrin A, Staphyloferrin B, and Catecholamine Stress Hormones, Respectively, and Contribute to Virulence. *Infection and Immunity.* 2011. **79**(6): p. 2345-2355.
- [856.] Grim, K. P. und San Francisco, B., *et al.*, The Metallophore Staphylopine Enables *Staphylococcus aureus* To Compete with the Host for Zinc and Overcome Nutritional Immunity. *mBio.* 2017. **8**(5).
- [857.] Radin, J. N. und Zhu, J., *et al.*, Synergy between Nutritional Immunity and Independent Host Defenses Contributes to the Importance of the MntABC Manganese Transporter during *Staphylococcus aureus* Infection. *Infect Immun.* 2019. **87**(1).
- [858.] Burlak, C. und Hammer, C. H., *et al.*, Global analysis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exoproteins reveals molecules produced in vitro and during infection. *Cell Microbiol.* 2007. **9**(5): p. 1172-90.
- [859.] Kubica, M. und Guzik, K., *et al.*, A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One.* 2008. **3**(1): p. e1409.
- [860.] Kenny, J. G. und Ward, D., *et al.*, The *Staphylococcus aureus* response to unsaturated long chain free fatty acids: survival mechanisms and virulence implications. *PLoS One.* 2009. **4**(2): p. e4344.

- [861.] Krute, C. N. und Ridder, M. J., *et al.*, Inactivation of the exogenous fatty acid utilization pathway leads to increased resistance to unsaturated fatty acids in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 2019. **165**(2): p. 197-207.
- [862.] Pandey, S. und Sahukhal, G. S., *et al.*, The msaABC Operon Regulates the Response to Oxidative Stress in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 2019. **201**(21).
- [863.] Cosgrove, K. und Coutts, G., *et al.*, Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 2007. **189**(3): p. 1025-35.
- [864.] Das, D. und Saha, S. S., *et al.*, Intracellular survival of *Staphylococcus aureus*: correlating production of catalase and superoxide dismutase with levels of inflammatory cytokines. *Inflamm Res*, 2008. **57**(7): p. 340-9.
- [865.] Liu, G. Y. und Essex, A., *et al.*, *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med*, 2005. **202**(2): p. 209-15.
- [866.] Clauditz, A. und Resch, A., *et al.*, Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. *Infect Immun*, 2006. **74**(8): p. 4950-3.
- [867.] Packer, L., alpha-Lipoic acid: a metabolic antioxidant which regulates NF-kappa B signal transduction and protects against oxidative injury. *Drug Metab Rev*, 1998. **30**(2): p. 245-75.
- [868.] Grosser, M. R. und Weiss, A., *et al.*, Regulatory Requirements for *Staphylococcus aureus* Nitric Oxide Resistance. *J Bacteriol*, 2016. **198**(15): p. 2043-55.
- [869.] Bang, I. S. und Liu, L., *et al.*, Maintenance of nitric oxide and redox homeostasis by the salmonella flavohemoglobin hmp. *J Biol Chem*, 2006. **281**(38): p. 28039-47.
- [870.] Gonçalves, V. L. und Nobre, L. S., *et al.*, Flavohemoglobin requires microaerophilic conditions for nitrosative protection of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett*, 2006. **580**(7): p. 1817-21.
- [871.] Richardson, A. R. und Libby, S. J., *et al.*, A Nitric Oxide-Inducible Lactate Dehydrogenase Enables *Staphylococcus aureus* to Resist Innate Immunity. *Science*, 2008. **319**(5870): p. 1672-1676.
- [872.] van Sorge, N. M. und Beasley, F. C., *et al.*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterial nitric-oxide synthase affects antibiotic sensitivity and skin abscess development. *J Biol Chem*, 2013. **288**(9): p. 6417-26.
- [873.] Abid, N. und Maalej, S., *et al.*, Morphological and physiological changes of *Staphylococcus aureus* exposed to hypochlorous acid. *Letters in Applied Microbiology*, 2004. **38**(3): p. 245-250.
- [874.] Singh, V. K., Moskovitz, J., Multiple methionine sulfoxide reductase genes in *Staphylococcus aureus*: expression of activity and roles in tolerance of oxidative stress. *Microbiology*, 2003. **149**(Pt 10): p. 2739-2747.
- [875.] Singh, K., Singh, V. K., Expression of Four Methionine Sulfoxide Reductases in *Staphylococcus aureus*. *Int J Microbiol*, 2012. **2012**: p. 719594.
- [876.] de Jong, N. W. M. und Ramyar, K. X., *et al.*, Immune evasion by a staphylococcal inhibitor of myeloperoxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. **114**(35): p. 9439-9444.
- [877.] Bera, A. und Herbert, S., *et al.*, Why are pathogenic *staphylococci* so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 2005. **55**(3): p. 778-87.
- [878.] Cohen, T. S. und Boland, M. L., *et al.*, *S. aureus* Evades Macrophage Killing through NLRP3-Dependent Effects on Mitochondrial Trafficking. *Cell Rep*, 2018. **22**(9): p. 2431-2441.
- [879.] Krause, K. und Daily, K., *et al.*, Caspase-11 counteracts mitochondrial ROS-mediated clearance of *Staphylococcus aureus* in macrophages. *EMBO Rep*, 2019. **20**(12): p. e48109.
- [880.] Cassat, James E., Skaar, Eric P., Iron in Infection and Immunity. *Cell Host & Microbe*, 2013. **13**(5): p. 509-519.
- [881.] Nobre, L. S., Saraiva, L. M., Role of the Siderophore Transporter SirABC in the *Staphylococcus aureus* Resistance to Oxidative Stress. *Current Microbiology*, 2014. **69**(2): p. 164-168.
- [882.] Carvalho, S. M. und de Jong, A., *et al.*, The *Staphylococcus aureus* alpha-Acetolactate Synthase ALS Confers Resistance to Nitrosative Stress. *Front Microbiol*, 2017. **8**: p. 1273.
- [883.] Jubrail, J. und Morris, P., *et al.*, Inability to sustain intraphagolysosomal killing of *Staphylococcus aureus* predisposes to bacterial persistence in macrophages. *Cell Microbiol*, 2016. **18**(1): p. 80-96.
- [884.] Thammavongsa, V. und Missiakas, D. M., *et al.*, *Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. *Science*, 2013. **342**(6160): p. 863-6.
- [885.] Winstel, V. und Schneewind, O., *et al.*, *Staphylococcus aureus* Exploits the Host Apoptotic Pathway To Persist during Infection. *mBio*, 2019. **10**(6): p. e02270-19.
- [886.] Kolaczowska, E. und Jenne, C. N., *et al.*, Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 6673.
- [887.] Watanabe, I. und Ichiki, M., *et al.*, TLR2-Mediated Survival of *Staphylococcus aureus* in Macrophages: A Novel Bacterial Strategy against Host Innate Immunity. *The Journal of Immunology*, 2007. **178**(8): p. 4917.
- [888.] Graczyk, J. P. und Harvey, C. J., *et al.*, A Lipoylated Metabolic Protein Released by *Staphylococcus aureus* Suppresses Macrophage Activation. *Cell Host Microbe*, 2017. **22**(5): p. 678-687.e9.
- [889.] Graczyk James, P., Alonzo, F., *Staphylococcus aureus* Lipoic Acid Synthesis Limits Macrophage Reactive Oxygen and Nitrogen Species Production To Promote Survival during Infection. *Infection and Immunity*, 2019. **87**(10): p. e00344-19.
- [890.] Bardoel, B. W. und Vos, R., *et al.*, Evasion of Toll-like receptor 2 activation by staphylococcal superantigen-like protein 3. *J Mol Med (Berl)*, 2012. **90**(10): p. 1109-20.
- [891.] Askarian, F. und van Sorge, N. M., *et al.*, A *Staphylococcus aureus* TIR domain protein virulence factor blocks TLR2-mediated NF-kB signaling *Journal of Innate Immunity*, 2014. **6**(4): p. 485-498.
- [892.] de Haas, C. J. und Veldkamp, K. E., *et al.*, Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J Exp Med*, 2004. **199**(5): p. 687-95.

- [893.] Postma, B. und Poppelier, M. J., *et al.*, Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor *The Journal of Immunology*, 2004. **172**(11): p. 6994.
- [894.] Prat, C. und Bestebroer, J., *et al.*, A New Staphylococcal Anti-Inflammatory Protein That Antagonizes the Formyl Peptide Receptor-Like 1. *The Journal of Immunology*, 2006. **177**(11): p. 8017.
- [895.] Tuffs, S. W. und James, D. B. A., *et al.*, The *Staphylococcus aureus* superantigen SEIX is a bifunctional toxin that inhibits neutrophil function. *PLoS Pathog*, 2017. **13**(9): p. e1006461.
- [896.] Bestebroer, J. und Poppelier, M. J., *et al.*, Staphylococcal superantigen-like 5 binds PSGL-1 and inhibits P-selectin-mediated neutrophil rolling. *Blood*, 2007. **109**(7): p. 2936-43.
- [897.] Stemerding, A. M. und Köhl, J., *et al.*, *Staphylococcus aureus* Formyl Peptide Receptor-like 1 Inhibitor (FLIPr) and Its Homologue FLIPr-like Are Potent FcγR Antagonists That Inhibit IgG-Mediated Effector Functions. *The Journal of Immunology*, 2013. **191**(1): p. 353-362.
- [898.] Fraser, J. und Arcus, V., *et al.*, Superantigens - powerful modifiers of the immune system. *Mol Med Today*, 2000. **6**(3): p. 125-32.
- [899.] Uebele, J. und Stein, C., *et al.*, Antigen delivery to dendritic cells shapes human CD4+ and CD8+ T cell memory responses to *Staphylococcus aureus*. *PLOS Pathogens*, 2017. **13**(5): p. e1006387.
- [900.] Goodyear, C. S., Silverman, G. J., Death by a B cell superantigen: in vivo VH-targeted apoptotic supraclonal B cell deletion by a staphylococcal toxin. *Journal of Experimental Medicine*, 2003. **197**(9): p. 1125-1139.
- [901.] Palmqvist, N. und Silverman, G. J., *et al.*, Bacterial cell wall-expressed protein A triggers supraclonal B-cell responses upon in vivo infection with *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect*, 2005. **7**(15): p. 1501-11.
- [902.] Kobayashi, S. D., DeLeo, F. R., *Staphylococcus aureus* protein A promotes immune suppression. *mBio*, 2013. **4**(5): p. e00764-13.
- [903.] Gómez, M. I. und Lee, A., *et al.*, *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nature Medicine*, 2004. **10**(8): p. 842-848.
- [904.] Chau, T. A. und McCully, M. L., *et al.*, Toll-like receptor 2 ligands on the staphylococcal cell wall downregulate superantigen-induced T cell activation and prevent toxic shock syndrome. *Nat Med*, 2009. **15**(6): p. 641-8.
- [905.] Frodermann, V. und Chau, T. A., *et al.*, A modulatory interleukin-10 response to staphylococcal peptidoglycan prevents Th1/Th17 adaptive immunity to *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*, 2011. **204**(2): p. 253-62.
- [906.] Ou, L. S. und Goleva, E., *et al.*, T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. **113**(4): p. 756-63.
- [907.] Ziegler, C. und Goldmann, O., *et al.*, The dynamics of T cells during persistent *Staphylococcus aureus* infection: from antigen-reactivity to in vivo anergy. *EMBO Mol Med*, 2011. **3**(11): p. 652-66.
- [908.] Lee, J. und Park, N., *et al.*, Induction of Immunosuppressive CD8(+)/CD25(+)/FOXP3(+) Regulatory T Cells by Suboptimal Stimulation with Staphylococcal Enterotoxin C1. *J Immunol*, 2018. **200**(2): p. 669-680.
- [909.] Lee, B. und Olaniyi, R., *et al.*, *Staphylococcus aureus* toxin suppresses antigen-specific T cell responses. *J Clin Invest*, 2020. **130**(3): p. 1122-1127.
- [910.] Grimaldi, D. und Le Bourhis, L., *et al.*, Specific MAIT cell behaviour among innate-like T lymphocytes in critically ill patients with severe infections. *Intensive Care Med*, 2014. **40**(2): p. 192-201.
- [911.] Shaler, C. R. und Choi, J., *et al.*, MAIT cells launch a rapid, robust and distinct hyperinflammatory response to bacterial superantigens and quickly acquire an anergic phenotype that impedes their cognate antimicrobial function: Defining a novel mechanism of superantigen-induced immunopathology and immunosuppression. *PLoS Biology*, 2017. **15**(6): p. e2001930.
- [912.] Arts, R. J. und Novakovic, B., *et al.*, Glutaminolysis and Fumarate Accumulation Integrate Immunometabolic and Epigenetic Programs in Trained Immunity. *Cell Metab*, 2016. **24**(6): p. 807-819.
- [913.] Wong Fok Lung, T. und Monk, I. R., *et al.*, *Staphylococcus aureus* small colony variants impair host immunity by activating host cell glycolysis and inducing necroptosis. *Nat Microbiol*, 2020. **5**(1): p. 141-153.
- [914.] Thurlow, L. R. und Hanke, M. L., *et al.*, *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. *J Immunol*, 2011. **186**(11): p. 6585-96.
- [915.] Peng, K.-T. und Hsieh, C.-C., *et al.*, *Staphylococcus aureus* biofilm elicits the expansion, activation and polarization of myeloid-derived suppressor cells in vivo and in vitro. *PLoS One*, 2017. **12**(8): p. e0183271.
- [916.] Röszer, T., The M2 Macrophage. Vol. 86. 2020: Springer.
- [917.] Gries, C. M. und Bruger, E. L., *et al.*, Cyclic di-AMP Released from *Staphylococcus aureus* Biofilm Induces a Macrophage Type I Interferon Response. *Infect Immun*, 2016. **84**(12): p. 3564-3574.
- [918.] Aldrich, A. L. und Heim, C. E., *et al.*, TLR2 and caspase-1 signaling are critical for bacterial containment but not clearance during craniotomy-associated biofilm infection. *Journal of Neuroinflammation*, 2020. **17**(1): p. 114.
- [919.] Bröker, B. M. und Mrochen, D., *et al.*, The T Cell Response to *Staphylococcus aureus*. *Pathogens*, 2016. **5**(1).
- [920.] Teymournejad, O., Montgomery, C. P., Evasion of Immunological Memory by *S. aureus* Infection: Implications for Vaccine Design. *Frontiers in Immunology*, 2021. **12**.
- [921.] Gaynes, R., The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerg Infect Dis*, 2017.
- [922.] Barber, M., Staphylococcal infection due to penicillin-resistant strains. *Br Med J*, 1947. **2**(4534): p. 863-5.
- [923.] Barber, M., Rozwadowska-Dowzenko, M., Infection by penicillin-resistant *staphylococci*. *Lancet*, 1948. **2**(6530): p. 641-4.
- [924.] Rountree, P. M., Freeman, B. M., Infections caused by a particular phage type of *Staphylococcus aureus*. *Med J Aust*, 1955. **42**(5): p. 157-61.
- [925.] Hutchings, M. I. und Truman, A. W., *et al.*, Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 2019. **51**: p. 72-80.
- [926.] Rountree, P. M., Beard, M. A., Hospital strains of *Staphylococcus aureus*, with particular reference to methicillin-resistant strains. *Medical Journal of Australia*, 1968. **2**(26): p. 1163-1168.

- [927.] O'Toole, R. D. und Drew, W. L., *et al.*, An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Observations in hospital and nursing home. *Jama*, 1970. **213**(2): p. 257-63.
- [928.] Rountree, P. M., Vickery, A. M., Further observation on the methicillin-resistant staphylococci. *Medical Journal of Australia*, 1973. **1**(21): p. 1030-1034.
- [929.] Abraham, E. P. und Chain, E., *et al.*, Further observations on penicillin. *Lancet*, 1941. **238**(6155): p. 177-189.
- [930.] Waxman, D. J., Strominger, J. L., Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annu Rev Biochem*, 1983. **52**: p. 825-69.
- [931.] Frère, J. M., Joris, B., Penicillin-sensitive enzymes in peptidoglycan biosynthesis. *Crit Rev Microbiol*, 1985. **11**(4): p. 299-396.
- [932.] Lacey, R. W., Antibiotic resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance. *Bacteriol Rev*, 1975. **39**(1): p. 1-32.
- [933.] Lyon, B. R., Skurray, R., Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol Rev*, 1987. **51**(1): p. 88-134.
- [934.] Lacey, R. W., Chopra, I., Genetic Studies of A Multi-Resistant Strain of *Staphylococcus Aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 1974. **7**(2): p. 285-297.
- [935.] Pavillard, R. und Harvey, K., *et al.*, Epidemie of hospital-acquired infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in major Victorian hospitals. *Medical Journal of Australia*, 1982. **1**(11): p. 451-454.
- [936.] Cafferkey, M. T. und Hone, R., *et al.*, Gentamicin and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in dublin hospitals: clinical and laboratory studies. *Journal of Medical Microbiology*, 1983. **16**(2): p. 117-127.
- [937.] Schaefer, S. und Jones, D., *et al.*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in New York City hospitals: inter-hospital spread of resistant strains of type 88. *J Clin Microbiol*, 1984. **20**(3): p. 536-8.
- [938.] Guo, Y. und Song, G., *et al.*, Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020. **10**.
- [939.] Sabat, A. J. und Tinelli, M., *et al.*, Daptomycin Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Strain With Novel Non-synonymous Mutations in the *mprF* and *vraS* Genes: A New Insight Into Daptomycin Resistance. *Front Microbiol*, 2018. **9**: p. 2705.
- [940.] Tian, Y. und Li, T., *et al.*, Mechanisms of linezolid resistance in *staphylococci* and *enterococci* isolated from two teaching hospitals in Shanghai, China. *BMC Microbiology*, 2014. **14**(1): p. 292.
- [941.] Weinstein, R. A., Fridkin, S. K., Vancomycin-Intermediate and -Resistant *Staphylococcus aureus*: What the Infectious Disease Specialist Needs to Know. *Clinical Infectious Diseases*, 2001. **32**(1): p. 108-115.
- [942.] Charles, P. G. und Ward, P. B., *et al.*, Clinical features associated with bacteremia due to heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*, 2004. **38**(3): p. 448-51.
- [943.] Fujita, J. und Maeda, Y., *et al.*, Structural Flexibility of an Inhibitor Overcomes Drug Resistance Mutations in *Staphylococcus aureus* FtsZ. *ACS Chem Biol*, 2017. **12**(7): p. 1947-1955.
- [944.] Endimiani, A. und Blackford, M., *et al.*, Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* after prolonged treatment of cystic fibrosis patients in Cleveland, Ohio. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. **55**(4): p. 1684-92.
- [945.] McGuinness, W. A. und Malachowa, N., *et al.*, Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med*, 2017. **90**(2): p. 269-281.
- [946.] Saunders, J. R., Genetics and evolutions of antibiotics resistance. *British Medical Bulletin*, 1984. **40**(1): p. 54-60.
- [947.] Lacey, R. W., Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and *Streptococci*. *British Medical Bulletin*, 1984. **40**(1): p. 77-83.
- [948.] Clowes, R. C., Molecular structure of bacterial plasmids. *Bacteriol Rev*, 1972. **36**(3): p. 361-405.
- [949.] Ponciano, J. M. und De Gelder, L., *et al.*, The population biology of bacterial plasmids: a hidden Markov model approach. *Genetics*, 2007. **176**(2): p. 957-68.
- [950.] Iordănescu, S., Surdeanu, M., New incompatibility groups of *Staphylococcus aureus* plasmids. *Plasmid*, 1980. **4**(3): p. 256-60.
- [951.] Poston, S., Naidoo, J., Genetics and antimicrobial drug resistance in the staphylococci. *Staphylococci and staphylococcal infections*, 1983. **1**: p. 63-119.
- [952.] Cohen, S. N., Transposable genetic elements and plasmid evolution. *Nature*, 1976. **263**(5580): p. 731-8.
- [953.] Iida, S. und Meyer, J., *et al.*, Prokaryotic IS elements. In "Mobile Genetic Elements"(JA, Shapiro, Ed.). *Frontiers in Molecular Biology*, 1983.
- [954.] Kleckner, N., Transposable elements in prokaryotes. *Annu Rev Genet*, 1981. **15**: p. 341-404.
- [955.] Levy, S. B., Microbial resistance to antibiotics. An evolving and persistent problem. *Lancet*, 1982. **2**(8289): p. 83-8.
- [956.] McCarthy, A. J. und Loeffler, A., *et al.*, Extensive Horizontal Gene Transfer during *Staphylococcus aureus* Co-colonization In Vivo. *Genome Biology and Evolution*, 2014. **6**(10): p. 2697-2708.
- [957.] Lindberg, M., Novick, R. P., Plasmid-specific transformation in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 1973. **115**(1): p. 139-45.
- [958.] Rudin, L. und Sjöström, J. E., *et al.*, Factors affecting competence for transformation in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 1974. **118**(1): p. 155-64.
- [959.] Lacey, R. W., Evidence for Two Mechanisms of Plasmid Transfer in Mixed Cultures of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 1980. **119**(2): p. 423-435.
- [960.] McDonnell, R. W. und Sweeney, H. M., *et al.*, Conjugational transfer of gentamicin resistance plasmids intra- and interspecifically in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1983. **23**(1): p. 151-60.
- [961.] Piddock, L. J., Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev*, 2006. **19**(2): p. 382-402.
- [962.] Costa, S. S. und Viveiros, M., *et al.*, Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *Open Microbiol J*, 2013. **7**: p. 59-71.
- [963.] Nguyen Van, J. C., Gutmann, L., [Resistance to antibiotics caused by decrease of the permeability in gram-negative bacteria]. *Presse Med*, 1994. **23**(11): p. 522, 527-31.
- [964.] Sabath, L. D., Mechanisms of Resistance to Beta-lactam Antibiotics in Strains of *Staphylococcus aureus*. *Annals of Internal Medicine*, 1982. **97**(3): p. 339-344.
- [965.] Alekshun, M. N., Levy, S. B., Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 2007. **128**(6): p. 1037-50.

- [966.] Pidwill, G. R. und Gibson, J. F., *et al.*, The Role of Macrophages in *Staphylococcus aureus* Infection. *Frontiers in Immunology*, 2021. **11**.
- [967.] Kim, S. W. und Seo, J. S., *et al.*, Significant increase in the secretion of extracellular vesicles and antibiotics resistance from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* induced by ampicillin stress. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 21066.
- [968.] Kumaraswamy, M. und Wiull, K., *et al.*, Bacterial Membrane-Derived Vesicles Attenuate Vancomycin Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms*, 2021. **9**(10).
- [969.] Walker, S., Walker, S. R., Trends and changes in drug research and development. 1988: *Springer*.
- [970.] Smith, P. F., Wilkinson, B. J., Differential methicillin susceptibilities of peptidoglycan syntheses in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 1981. **148**(2): p. 610-7.
- [971.] Georgopapadakou, N. H. und Smith, S. A., *et al.*, Penicillin-binding proteins in a *Staphylococcus aureus* strain resistant to specific beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 1982. **22**(1): p. 172-5.
- [972.] Ubukata, K. und Yamashita, N., *et al.*, Occurrence of a beta-lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant *staphylococci*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1985. **27**(5): p. 851-7.
- [973.] Zeng, D. und Debabov, D., *et al.*, Approved Glycopeptide Antibacterial Drugs: Mechanism of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016. **6**(12).
- [974.] Bugg, T. D. und Wright, G. D., *et al.*, Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry*, 1991. **30**(43): p. 10408-15.
- [975.] Arthur, M. und Molinas, C., *et al.*, Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol*, 1993. **175**(1): p. 117-27.
- [976.] Bager, F. und Madsen, M., *et al.*, Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prev Vet Med*, 1997. **31**(1-2): p. 95-112.
- [977.] Cheung, G. Y. C. und Bae, J. S., *et al.*, Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 2021. **12**(1): p. 547-569.
- [978.] Barqawi, H. J. A., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and evolutionary dynamics 2014 LAP LAMBERT Academic Publishing.
- [979.] Diekema, D. J. und Pfaller, M. A., *et al.*, Twenty-Year Trends in Antimicrobial Susceptibilities Among *Staphylococcus aureus* From the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Open Forum Infect Dis*, 2019. **6**(Suppl 1): p. S47-s53.
- [980.] Baede, V. O. und David, M. Z., *et al.*, MRSA surveillance programmes worldwide: moving towards a harmonised international approach. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2022. **59**(3): p. 106538.
- [981.] Patil, S. S. und Suresh, K. P., *et al.*, Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in India: A Systematic Review and Meta-analysis. *Oman Med J*, 2022. **37**(4): p. e440.
- [982.] OneHealthTrust. ResistanceMap: Antibiotic resistance.: *OneHealthTrust* 2022 [cited 2022 10.11.2022].
- [983.] Gould, I. M., VRSA-doomsday superbug or damp squib? *Lancet Infect Dis*, 2010. **10**(12): p. 816-8.
- [984.] Wu, Q. und Sabokroo, N., *et al.*, Systematic review and meta-analysis of the epidemiology of vancomycin-resistance *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 2021. **10**(1): p. 101.
- [985.] Chen, B. und Han, J., *et al.*, Biocide-tolerance and antibiotic-resistance in community environments and risk of direct transfers to humans: Unintended consequences of community-wide surface disinfecting during COVID-19? *Environ Pollut*, 2021. **283**: p. 117074.
- [986.] Sabry, W. und Al-Dakhkhni, M. Y. S., *et al.*, Detection of Biocides Resistance Genes among Clinical Isolates of Both Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive Strains of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Arts*, 2021. **3**(3): p. 1602-1610.
- [987.] Merchel Piovesan Pereira, B. und Wang, X., *et al.*, Biocide-Induced Emergence of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli*. *Front Microbiol*, 2021. **12**: p. 640923.
- [988.] Li, M. und Lai, Y., *et al.*, Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(22): p. 9469-74.
- [989.] Li, M. und Cha, D. J., *et al.*, The antimicrobial peptide-sensing system of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 2007. **66**(5): p. 1136-47.
- [990.] Midorikawa, K. und Ouhara, K., *et al.*, *Staphylococcus aureus* susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes. *Infect Immun*, 2003. **71**(7): p. 3730-9.
- [991.] Peschel, A., Sahl, H.-G., The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 2006. **4**(7): p. 529-536.
- [992.] Dhawan, V. K. und Yeaman, M. R., *et al.*, Phenotypic resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein in vitro is correlated with enhanced virulence in experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 1997. **65**(8): p. 3293-9.
- [993.] Joo, H. S., Otto, M., Mechanisms of resistance to antimicrobial peptides in *staphylococci*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1848**(11 Pt B): p. 3055-61.
- [994.] Peschel, A. und Jack, R. W., *et al.*, *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J Exp Med*, 2001. **193**(9): p. 1067-76.
- [995.] Ernst, C. M. und Kuhn, S., *et al.*, The lipid-modifying multiple peptide resistance factor is an oligomer consisting of distinct interacting synthase and flippase subunits. *mBio*, 2015. **6**(1).
- [996.] Peschel, A. und Otto, M., *et al.*, Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem*, 1999. **274**(13): p. 8405-10.
- [997.] Collins, L. V. und Kristian, S. A., *et al.*, *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *J Infect Dis*, 2002. **186**(2): p. 214-9.
- [998.] Alnaseri, H. und Arsic, B., *et al.*, Inducible Expression of a Resistance-Nodulation-Division-Type Efflux Pump in *Staphylococcus aureus* Provides Resistance to Linoleic and Arachidonic Acids. *J Bacteriol*, 2015. **197**(11): p. 1893-905.
- [999.] Kusuma, C. und Jadanova, A., *et al.*, Lysostaphin-resistant variants of *Staphylococcus aureus* demonstrate reduced fitness in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. **51**(2): p. 475-82.

- [1000.] Kanwar, I. und Sah, A. K., *et al.*, Biofilm-mediated Antibiotic-resistant Oral Bacterial Infections: Mechanism and Combat Strategies. *Curr Pharm Des*, 2017. **23**(14): p. 2084-2095.
- [1001.] Craft, K. M. und Nguyen, J. M., *et al.*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. *Medchemcomm*, 2019. **10**(8): p. 1231-1241.
- [1002.] De Beer, D. und Srinivasan, R., *et al.*, Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol*, 1994. **60**(12): p. 4339-44.
- [1003.] Singh, R. und Ray, P., *et al.*, Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Antimicrob Chemother*, 2010. **65**(9): p. 1955-8.
- [1004.] Resch, A. und Rosenstein, R., *et al.*, Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl Environ Microbiol*, 2005. **71**(5): p. 2663-76.
- [1005.] Vuong, C. und Kocianova, S., *et al.*, A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem*, 2004. **279**(52): p. 54881-6.
- [1006.] Richter, D. und Brenner, T., *et al.*, Infektionen durch multiresistente Erreger. *Der Anaesthesist*, 2019. **68**(10): p. 711-730.
- [1007.] Schulz-Stübner, S., Antibiotic Stewardship in Arztpraxis und Ambulanz. 2020: Springer.
- [1008.] Skinner, D., Keefer, C. S., Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*: A study of one hundred and twenty-two cases and a review of the literature concerned with experimental infection in animals. *Archives of Internal Medicine*, 1941. **68**(5): p. 851-875.
- [1009.] Liew, Y. K. und Awang Hamat, R., *et al.*, Comparative Exoproteomics and Host Inflammatory Response in *Staphylococcus aureus* Skin and Soft Tissue Infections, Bacteremia, and Subclinical Colonization. *Clin Vaccine Immunol*, 2015. **22**(5): p. 593-603.
- [1010.] Oliveira, W. und Silva, P., *et al.*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants. *Journal of Hospital Infection*, 2017. **98**.
- [1011.] Khorvash, F. und Abdi, F., *et al.*, *Staphylococcus aureus* in Acne Pathogenesis: A Case-Control Study. *N Am J Med Sci*, 2012. **4**(11): p. 573-6.
- [1012.] Shiromi, P. und Hewawasam, R. P., *et al.*, Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Two Sri Lankan Lichens, *Parmotrema rampoddense*, and *Parmotrema tinctorum* against Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021. **2021**: p. 9985325.
- [1013.] Stephenson, M. F. und Mfuna, L., *et al.*, Molecular characterization of the polymicrobial flora in chronic rhinosinusitis. *J Otolaryngol Head Neck Surg*, 2010. **39**(2): p. 182-7.
- [1014.] Foreman, A., Wormald, P. J., Different biofilms, different disease? A clinical outcomes study. *Laryngoscope*, 2010. **120**(8): p. 1701-6.
- [1015.] Dunyach-Remy, C. und Ngba Essebe, C., *et al.*, *Staphylococcus aureus* Toxins and Diabetic Foot Ulcers: Role in Pathogenesis and Interest in Diagnosis. *Toxins (Basel)*, 2016. **8**(7).
- [1016.] Olson, M. E., Horswill, A. R., *Staphylococcus aureus* osteomyelitis: bad to the bone. *Cell Host Microbe*, 2013. **13**(6): p. 629-31.
- [1017.] McNamara, J. F. und Harris, P. N. A., *et al.*, Acute Myocardial Infarction and Community-acquired *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection: An Observational Cohort Study. *Clin Infect Dis*, 2021. **73**(9): p. e2647-e2655.
- [1018.] Røder, B. L. und Wandall, D. A., *et al.*, Clinical features of *Staphylococcus aureus* endocarditis: a 10-year experience in Denmark. *Arch Intern Med*, 1999. **159**(5): p. 462-9.
- [1019.] Clark, S. B., Hicks, M. A., Staphylococcal Pneumonia. 2022: StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- [1020.] Lone, A. G. und Atci, E., *et al.*, *Staphylococcus aureus* induces hypoxia and cellular damage in porcine dermal explants. *Infect Immun*, 2015. **83**(6): p. 2531-41.
- [1021.] Berube, B. J., Bubeck Wardenburg, J., *Staphylococcus aureus* α -toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins (Basel)*, 2013. **5**(6): p. 1140-66.
- [1022.] Nakamura, Y. und Oscherwitz, J., *et al.*, *Staphylococcus* δ -toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. *Nature*, 2013. **503**(7476): p. 397-401.
- [1023.] Barnes, P. J., Intrinsic asthma: not so different from allergic asthma but driven by superantigens? *Clin Exp Allergy*, 2009. **39**(8): p. 1145-51.
- [1024.] Bachert, C., Zhang, N., Chronic rhinosinusitis and asthma: novel understanding of the role of IgE 'above atopy'. *Journal of Internal Medicine*, 2012. **272**(2): p. 133-143.
- [1025.] Davis, M. F. und Peng, R. D., *et al.*, *Staphylococcus aureus* colonization is associated with wheeze and asthma among US children and young adults. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2015. **135**(3): p. 811-813.e5.
- [1026.] Stentzel, S. und Teufelberger, A., *et al.*, Staphylococcal serine protease-like proteins are pacemakers of allergic airway reactions to *Staphylococcus aureus*. *J Allergy Clin Immunol*, 2017. **139**(2): p. 492-500.e8.
- [1027.] Gould, H. J. und Takhar, P., *et al.*, The allergic march from *Staphylococcus aureus* superantigens to immunoglobulin E. *Chem Immunol Allergy*, 2007. **93**: p. 106-136.
- [1028.] Tsilochristou, O. und du Toit, G., *et al.*, Association of *Staphylococcus aureus* colonization with food allergy occurs independently of eczema severity. *J Allergy Clin Immunol*, 2019. **144**(2): p. 494-503.
- [1029.] Foreman, A. und Holtappels, G., *et al.*, Adaptive immune responses in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated chronic rhinosinusitis. *Allergy*, 2011. **66**(11): p. 1449-56.
- [1030.] Moet, G. J. und Jones, R. N., *et al.*, Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007. **57**(1): p. 7-13.
- [1031.] Stephens, J. M. und Gao, X., *et al.*, Economic burden of inpatient and outpatient antibiotic treatment for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* complicated skin and soft-tissue infections: a comparison of linezolid, vancomycin, and daptomycin. *Clinicoecon Outcomes Res*, 2013. **5**: p. 447-57.
- [1032.] Zuluaga, A. F. und Galvis, W., *et al.*, Etiologic diagnosis of chronic osteomyelitis: a prospective study. *Arch Intern Med*, 2006. **166**(1): p. 95-100.
- [1033.] Arciola, C. R. und An, Y. H., *et al.*, Etiology of Implant Orthopedic Infections: A Survey on 1027 Clinical Isolates. *The International Journal of Artificial Organs*, 2005. **28**(11): p. 1091-1100.
- [1034.] Montanaro, L. und Speziale, P., *et al.*, Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics. *Future Microbiol*, 2011. **6**(11): p. 1329-49.
- [1035.] Josse, J. und Valour, F., *et al.*, Interaction Between Staphylococcal Biofilm and Bone: How Does the Presence of Biofilm Promote Prosthesis Loosening? *Front Microbiol*, 2019. **10**: p. 1602.

- [1036.] Costerton, J. W. und Montanaro, L., *et al.*, Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs*, 2005. **28**(11): p. 1062-8.
- [1037.] Heitz-Mayfield, L. J., Lang, N. P., Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontol 2000*, 2010. **53**: p. 167-81.
- [1038.] Harris, L., Richards, R., *Staphylococcus aureus* adhesion to different treated titanium surfaces: Selected papers from the 18th European Conference on Biomaterials (ESB2003), Stuttgart, Germany, 2003. (Guest Editors: Michael Doser and Heinrich Planck). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2004. **15**.
- [1039.] Herrmann, M. und Vaudaux, P. E., *et al.*, Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J Infect Dis*, 1988. **158**(4): p. 693-701.
- [1040.] Quave, C. L. und Estévez-Carmona, M., *et al.*, Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e28737.
- [1041.] Baldoni, D. und Haschke, M., *et al.*, Linezolid alone or combined with rifampin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in experimental foreign-body infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. **53**(3): p. 1142-8.
- [1042.] Tande, A. J., Patel, R., Prosthetic joint infection. *Clin Microbiol Rev*, 2014. **27**(2): p. 302-45.
- [1043.] Cornell, R. S., What you should know about biofilm and implants. *Podiatry Today*, 2015. **28**(8).
- [1044.] Dutta, S. R. und Passi, D., *et al.*, Risks and complications associated with dental implant failure: Critical update. *Natl J Maxillofac Surg*, 2020. **11**(1): p. 14-19.
- [1045.] Zhu, M. F. und Kim, K., *et al.*, Success Rates of Debridement, Antibiotics, and Implant Retention in 230 Infected Total Knee Arthroplasties: Implications for Classification of Periprosthetic Joint Infection. *J Arthroplasty*, 2021. **36**(1): p. 305-310.e1.
- [1046.] Goud, A. L. und Harlianto, N. I., *et al.*, Reinfection rates after one- and two-stage revision surgery for hip and knee arthroplasty: a systematic review and meta-analysis. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2021.
- [1047.] Xiao, N. und Yang, J., *et al.*, Community-associated *Staphylococcus aureus* PVL(+) ST22 predominates in skin and soft tissue infections in Beijing, China. *Infect Drug Resist*, 2019. **12**: p. 2495-2503.
- [1048.] Proctor, R. A. und Balwit, J. M., *et al.*, Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections. *Infect Agents Dis*, 1994. **3**(6): p. 302-12.
- [1049.] Kahl, B. C. und Becker, K., *et al.*, Clinical Significance and Pathogenesis of Staphylococcal Small Colony Variants in Persistent Infections. *Clin Microbiol Rev*, 2016. **29**(2): p. 401-27.
- [1050.] Spanu, T. und Romano, L., *et al.*, Recurrent ventriculoperitoneal shunt infection caused by small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*, 2005. **41**(5): p. e48-52.
- [1051.] Herrmann, M., Antimicrobial effects promoting biofilm formation and persistent disease: the role of a DNA-binding regulator, SarA, in staphylococcal endocarditis. *J Infect Dis*, 2014. **209**(8): p. 1153-5.
- [1052.] Prabhakara, R. und Harro, J., *et al.* Immune response to *Staphylococcus aureus* biofilm infections. in *5th ASM Conference on Biofilms. Cancun, Mexico*. 2009.
- [1053.] Fowler, V. G. und Holland, T. L., *et al.*, Clinical approach to *Staphylococcus aureus* bacteremia in adults. *Waltham, MA: UpToDate*, 2013.
- [1054.] Askarian, F. und Wagner, T., *et al.*, *Staphylococcus aureus* modulation of innate immune responses through Toll-like (TLR), (NOD)-like (NLR) and C-type lectin (CLR) receptors. *FEMS Microbiol Rev*, 2018. **42**(5): p. 656-671.
- [1055.] van Hal, S. J. und Jensen, S. O., *et al.*, Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clin Microbiol Rev*, 2012. **25**(2): p. 362-86.
- [1056.] Cho, J. S. und Pietras, E. M., *et al.*, IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *J Clin Invest*, 2010. **120**(5): p. 1762-73.
- [1057.] Montgomery, C. P. und Daniels, M., *et al.*, Protective immunity against recurrent *Staphylococcus aureus* skin infection requires antibody and interleukin-17A. *Infect Immun*, 2014. **82**(5): p. 2125-34.
- [1058.] Marchitto, M. C. und Dillen, C. A., *et al.*, Clonal V γ 6+V δ 4+ T cells promote IL-17-mediated immunity against *Staphylococcus aureus* skin infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2019. **116**(22): p. 10917-10926.
- [1059.] Greenberg, J. A. und Hrusch, C. L., *et al.*, Distinct T-helper cell responses to *Staphylococcus aureus* bacteremia reflect immunologic comorbidities and correlate with mortality. *Critical Care*, 2018. **22**(1): p. 107.
- [1060.] Gjødsbøl, K. und Christensen, J. J., *et al.*, Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int Wound J*, 2006. **3**(3): p. 225-31.
- [1061.] Hansson, C. und Hoborn, J., *et al.*, The microbial flora in venous leg ulcers without clinical signs of infection. Repeated culture using a validated standardised microbiological technique. *Acta Derm Venereol*, 1995. **75**(1): p. 24-30.
- [1062.] Edwards, R., Harding, K. G., Bacteria and wound healing. *Curr Opin Infect Dis*, 2004. **17**(2): p. 91-6.
- [1063.] Schierle, C. F. und De la Garza, M., *et al.*, Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model. *Wound Repair Regen*, 2009. **17**(3): p. 354-9.
- [1064.] Bowling, F. L. und Jude, E. B., *et al.*, MRSA and diabetic foot wounds: contaminating or infecting organisms? *Curr Diab Rep*, 2009. **9**(6): p. 440-4.
- [1065.] Boulton, A. J., The pathway to foot ulceration in diabetes. *Med Clin North Am*, 2013. **97**(5): p. 775-90.
- [1066.] Madsen, S. M. und Westh, H., *et al.*, Bacterial colonization and healing of venous leg ulcers. *Apmis*, 1996. **104**(12): p. 895-9.
- [1067.] Grimble, S. A. und Magee, T. R., *et al.*, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in patients undergoing major amputation. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2001. **22**(3): p. 215-8.
- [1068.] Nagaoka, T. und Kaburagi, Y., *et al.*, Delayed wound healing in the absence of intercellular adhesion molecule-1 or L-selectin expression. *Am J Pathol*, 2000. **157**(1): p. 237-47.
- [1069.] Chavakis, T. und Wiechmann, K., *et al.*, *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium. *Thromb Haemost*, 2005. **94**(08): p. 278-285.
- [1070.] Shannon, O., Flock, J. I., Extracellular fibrinogen binding protein, Efb, from *Staphylococcus aureus* binds to platelets and inhibits platelet aggregation. *Thromb Haemost*, 2004. **91**(4): p. 779-89.

- [1071.] Laouini, D. und Alenius, H., *et al.*, IL-10 is critical for Th2 responses in a murine model of allergic dermatitis. *J Clin Invest*, 2003. **112**(7): p. 1058-66.
- [1072.] Heine, G. und Drozdenko, G., *et al.*, Autocrine IL-10 promotes human B-cell differentiation into IgM- or IgG-secreting plasmablasts. *European Journal of Immunology*, 2014. **44**(6): p. 1615-1621.
- [1073.] Rose, W. E. und Eickhoff, J. C., *et al.*, Elevated serum interleukin-10 at time of hospital admission is predictive of mortality in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Infect Dis*, 2012. **206**(10): p. 1604-11.
- [1074.] Volk, C. F. und Burgdorf, S., *et al.*, Interleukin (IL)-1 β and IL-10 Host Responses in Patients With *Staphylococcus aureus* Bacteremia Determined by Antimicrobial Therapy. *Clin Infect Dis*, 2020. **70**(12): p. 2634-2640.
- [1075.] Guimaraes, A. O. und Cao, Y., *et al.*, A Prognostic Model of Persistent Bacteremia and Mortality in Complicated *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection. *Clin Infect Dis*, 2019. **68**(9): p. 1502-1511.
- [1076.] Bachmann, M. F., Oxenius, A., Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Rep*, 2007. **8**(12): p. 1142-1148.
- [1077.] Fowler, V. G. und Allen, K. B., *et al.*, Effect of an investigational vaccine for preventing *Staphylococcus aureus* infections after cardiothoracic surgery: a randomized trial. *Jama*, 2013. **309**(13): p. 1368-78.
- [1078.] McNeely, T. B. und Shah, N. A., *et al.*, Mortality among recipients of the Merck V710 *Staphylococcus aureus* vaccine after postoperative *S. aureus* infections: an analysis of possible contributing host factors. *Hum Vaccin Immunother*, 2014. **10**(12): p. 3513-6.
- [1079.] Iwasaki, Y. und Fujio, K., *et al.*, Interleukin-27 in T cell immunity. *Int J Mol Sci*, 2015. **16**(2): p. 2851-63.
- [1080.] Jones, S. A., Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*, 2005. **175**(6): p. 3463-8.
- [1081.] Söderquist, B. und Sundqvist, K. G., *et al.*, Kinetics of serum levels of interleukin-6 in *Staphylococcus aureus* septicemia. *Scand J Infect Dis*, 1992. **24**(5): p. 607-12.
- [1082.] McNicholas, S. und Talento, A. F., *et al.*, Cytokine responses to *Staphylococcus aureus* bloodstream infection differ between patient cohorts that have different clinical courses of infection. *BMC Infect Dis*, 2014. **14**: p. 580.
- [1083.] Chantratita, N. und Tandhavanant, S., *et al.*, TLR4 genetic variation is associated with inflammatory responses in Gram-positive sepsis. *Clin Microbiol Infect*, 2017. **23**(1): p. 47.e1-47.e10.
- [1084.] Francis, J. S. und Doherty, M. C., *et al.*, Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton-Valentine leukocidin genes. *Clin Infect Dis*, 2005. **40**(1): p. 100-7.
- [1085.] Gonzalez, B. E. und Hulten, K. G., *et al.*, Pulmonary manifestations in children with invasive community-acquired *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis*, 2005. **41**(5): p. 583-90.
- [1086.] Miller, L. G. und Perdreau-Remington, F., *et al.*, Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. *N Engl J Med*, 2005. **352**(14): p. 1445-53.
- [1087.] (CDC), C. f. D. C. a. P., Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* — Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 1999. **48**(32): p. 707-10.
- [1088.] Li, M. und Diep, B. A., *et al.*, Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(14): p. 5883-8.
- [1089.] Carrillo-Marquez, M. A. und Hulten, K. G., *et al.*, *Staphylococcus aureus* pneumonia in children in the era of community-acquired methicillin-resistance at Texas Children's Hospital. *Pediatr Infect Dis J*, 2011. **30**(7): p. 545-50.
- [1090.] Thurlow, L. R. und Joshi, G. S., *et al.*, Virulence strategies of the dominant USA300 lineage of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2012. **65**(1): p. 5-22.
- [1091.] Zhang, C. und Guo, L., *et al.*, Presence of the Panton-Valentine Leukocidin Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Is Associated with Severity and Clinical Outcome of Hospital-Acquired Pneumonia in a Single Center Study in China. *PLoS One*, 2016. **11**(6): p. e0156704.
- [1092.] Takadama, S. und Nakaminami, H., *et al.*, Dissemination of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in multiple hospitals in Tokyo, Japan. *Clin Microbiol Infect*, 2018. **24**(11): p. 1211.e1-1211.e7.
- [1093.] Howden, B. P. und Smith, D. J., *et al.*, Different bacterial gene expression patterns and attenuated host immune responses are associated with the evolution of low-level vancomycin resistance during persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *BMC Microbiology*, 2008. **8**: p. 39.
- [1094.] Cameron, D. R. und Lin, Y. H., *et al.*, Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates are attenuated for virulence when compared with susceptible progenitors. *Clin Microbiol Infect*, 2017. **23**(10): p. 767-773.
- [1095.] Mulcahy, M. E., McLoughlin, R. M., *Staphylococcus aureus* and Influenza A Virus: Partners in Coinfection. *mBio*, 2016. **7**(6).
- [1096.] Jeannoel, M. und Casalegno, J. S., *et al.*, Synergistic Effects of Influenza and *Staphylococcus aureus* Toxins on Inflammation Activation and Cytotoxicity in Human Monocytic Cell Lines. *Toxins (Basel)*, 2018. **10**(7).
- [1097.] Ferreira Dde, C. und Silva, G. R., *et al.*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in HIV patients: risk factors associated with colonization and/or infection and methods for characterization of isolates - a systematic review. *Clinics (Sao Paulo)*, 2014. **69**(11): p. 770-6.
- [1098.] Peters, B. M. und Jabra-Rizk, M. A., *et al.*, Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus* -*Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2010. **59**(3): p. 493-503.
- [1099.] Kong, E. F. und Tsui, C., *et al.*, Commensal Protection of *Staphylococcus aureus* against Antimicrobials by *Candida albicans* Biofilm Matrix. *mBio*, 2016. **7**(5).
- [1100.] Hotterbeekx, A. und Kumar-Singh, S., *et al.*, In vivo and In vitro Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017. **7**.
- [1101.] Mahmoudi, H., Bacterial co-infections and antibiotic resistance in patients with COVID-19. *GMS hygiene and infection control*, 2020. **15**.

- [1102.] Herr, C. E. und Heckrodt, T. H., *et al.*, Additional costs for preventing the spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and a strategy for reducing these costs on a surgical ward. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2003. **24**(9): p. 673-8.
- [1103.] Gouglas, D. und Thanh Le, T., *et al.*, Estimating the cost of vaccine development against epidemic infectious diseases: a cost minimisation study. *The Lancet Global Health*, 2018. **6**(12): p. e1386-e1396.
- [1104.] Towse, A. und Hoyle, C. K., *et al.*, Time for a change in how new antibiotics are reimbursed: Development of an insurance framework for funding new antibiotics based on a policy of risk mitigation. *Health Policy*, 2017. **121**(10): p. 1025-1030.
- [1105.] Zhen, X. und Lundborg, C. S., *et al.*, Clinical and economic impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a multicentre study in China. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 3900.
- [1106.] Rogers, D., Melly, M. A., Speculations on the immunology of staphylococcal infections. *New York Academy of Sciences. Annals*, 1965. **128**(1): p. 274-284.
- [1107.] Fattom, A. I., Naso, R., Staphylococcal vaccines: a realistic dream. *Ann Med*, 1996. **28**(1): p. 43-6.
- [1108.] Poole-Warren, L. A. und Hallett, M. D., *et al.*, Vaccination for prevention of CAPD associated staphylococcal infection: results of a prospective multicentre clinical trial. *Clin Nephrol*, 1991. **35**(5): p. 198-206.
- [1109.] Stranger-Jones, Y. K. und Bae, T., *et al.*, Vaccine assembly from surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(45): p. 16942-7.
- [1110.] Watson, D. L., Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in ewes. *Research in Veterinary Science*, 1988. **45**(1): p. 16-21.
- [1111.] Lee, J. C. und Park, J. S., *et al.*, Protective efficacy of antibodies to the *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide in a modified model of endocarditis in rats. *Infection and Immunity*, 1997. **65**(10): p. 4146-4151.
- [1112.] McKenney, D. und Pouliot, K. L., *et al.*, Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science*, 1999. **284**(5419): p. 1523-7.
- [1113.] Balaban, N. und Goldkorn, T., *et al.*, Regulation of *Staphylococcus aureus* pathogenesis via target of RNAIII-activating Protein (TRAP). *J Biol Chem*, 2001. **276**(4): p. 2658-67.
- [1114.] Schennings, T. und Heimdahl, A., *et al.*, Immunization with fibronectin binding protein from *Staphylococcus aureus* protects against experimental endocarditis in rats. *Microbial Pathogenesis*, 1993. **15**(3): p. 227-236.
- [1115.] Mamo, W. und Jonsson, P., *et al.*, Opsonization of *Staphylococcus aureus* with a fibronectin-binding protein antiserum induces protection in mice. *Microbial Pathogenesis*, 1995. **19**(1): p. 49-55.
- [1116.] Luk, J. M. und Flock, J. I., *et al.*, Detection in rabbit sera of blocking antibodies against staphylococcal fibronectin-binding protein by enzyme-linked immunosorbent assay. *FEMS Microbiol Immunol*, 1989. **1**(8-9): p. 505-10.
- [1117.] Ciborowski, P. und Flock, J.-I., *et al.*, Immunological response to a *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein. *Journal of Medical Microbiology*, 1992. **37**(6): p. 376-381.
- [1118.] Flock, J.-I., Extracellular-matrix-binding proteins as targets for the prevention of *Staphylococcus aureus* infections. *Molecular Medicine Today*, 1999. **5**(12): p. 532-537.
- [1119.] Casolini, F. und Visai, L., *et al.*, Antibody Response to Fibronectin-Binding Adhesin FnbpA in Patients with *Staphylococcus aureus* Infections. *Infection and Immunity*, 1998. **66**(11): p. 5433-5442.
- [1120.] House-Pompeo, K. und Xu, Y., *et al.*, Conformational Changes in the Fibronectin Binding MSCRAMMs Are Induced by Ligand Binding (*). *Journal of Biological Chemistry*, 1996. **271**(3): p. 1379-1384.
- [1121.] Penkett, C. J. und Redfield, C., *et al.*, NMR analysis of main-chain conformational preferences in an unfolded fibronectin-binding protein 11 Edited by A. R. Fersht. *Journal of Molecular Biology*, 1997. **274**(2): p. 152-159.
- [1122.] Brennan Frank, R. und Bellaby, T., *et al.*, Chimeric Plant Virus Particles Administered Nasally or Orally Induce Systemic and Mucosal Immune Responses in Mice. *Journal of Virology*, 1999. **73**(2): p. 930-938.
- [1123.] Rozalska, B., Wadström, T., Protective Opsonic Activity of Antibodies against Fibronectin-Binding Proteins (FnBPs) of *Staphylococcus aureus*. *Scandinavian Journal of Immunology*, 1993. **37**(5): p. 575-580.
- [1124.] Nilsson, I. M. und Patti, J. M., *et al.*, Vaccination with a recombinant fragment of collagen adhesin provides protection against *Staphylococcus aureus*-mediated septic death. *The Journal of clinical investigation*, 1998. **101**(12): p. 2640-2649.
- [1125.] Projan, S. J. und Nesen, M., *et al.*, Staphylococcal vaccines and immunotherapy: to dream the impossible dream? *Curr Opin Pharmacol*, 2006. **6**(5): p. 473-9.
- [1126.] Daum, R. S., Spellberg, B., Progress toward a *Staphylococcus aureus* vaccine. *Clin Infect Dis*, 2012. **54**(4): p. 560-7.
- [1127.] Fattom, A. I. und Horwith, G., *et al.*, Development of StaphVAX™, a polysaccharide conjugate vaccine against *S. aureus* infection: from the lab bench to phase III clinical trials. *Vaccine*, 2004. **22**(7): p. 880-887.
- [1128.] Cook, J. und Hepler, R., *et al.*, *Staphylococcus aureus* capsule type 8 antibodies provide inconsistent efficacy in murine models of staphylococcal infection. *Hum Vaccin*, 2009. **5**(4): p. 254-63.
- [1129.] Fattom, A. und Matalon, A., *et al.*, Efficacy profile of a bivalent *Staphylococcus aureus* glycoconjugated vaccine in adults on hemodialysis: Phase III randomized study. *Hum Vaccin Immunother*, 2015. **11**(3): p. 632-41.
- [1130.] Montgomery, C. P. und Boyle-Vavra, S., *et al.*, Comparison of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pulsotypes USA300 and USA400 in a rat model of pneumonia. *J Infect Dis*, 2008. **198**(4): p. 561-70.
- [1131.] Schaffer, A. C., Lee, J. C., Vaccination and passive immunisation against *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*, 2008. **32** Suppl 1: p. S71-8.
- [1132.] Jansen, K. U. und Girgenti, D. Q., *et al.*, Vaccine review: "Staphylococcus aureus vaccines: Problems and prospects". *Vaccine*, 2013. **31**(25): p. 2723-2730.
- [1133.] Clegg, J. und Soldaini, E., *et al.*, *Staphylococcus aureus* Vaccine Research and Development: The Past, Present and Future, Including Novel Therapeutic Strategies. *Frontiers in Immunology*, 2021. **12**.
- [1134.] Patti, J. M., Will we ever see the approval of a *Staphylococcus aureus* vaccine? *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2011. **9**(10): p. 845-6.

- [1135.] Proctor, R. A., Challenges for a universal *Staphylococcus aureus* vaccine. *Clin Infect Dis*, 2012. **54**(8): p. 1179-86.
- [1136.] Kotiranta-Ainamo, A. und Rautonen, J., *et al.*, Imbalanced cytokine secretion in newborns. *Biol Neonate*, 2004. **85**(1): p. 55-60.
- [1137.] Chelvarajan, R. L. und Collins, S. M., *et al.*, Defective macrophage function in neonates and its impact on unresponsiveness of neonates to polysaccharide antigens. *J Leukoc Biol*, 2004. **75**(6): p. 982-94.
- [1138.] Maródi, L., Innate cellular immune responses in newborns. *Clin Immunol*, 2006. **118**(2-3): p. 137-44.
- [1139.] Ohlsen, K., Lorenz, U., Immunotherapeutic strategies to combat staphylococcal infections. *Int J Med Microbiol*, 2010. **300**(6): p. 402-10.
- [1140.] Kapral, F. A., Shayegani, M. G., Intracellular survival of *staphylococci*. *J Exp Med*, 1959. **110**(1): p. 123-38.
- [1141.] Brady, R. A. und Leid, J. G., *et al.*, Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2008. **52**(1): p. 13-22.
- [1142.] Raafat, D. und Otto, M., *et al.*, Fighting *Staphylococcus aureus* Biofilms with Monoclonal Antibodies. *Trends Microbiol*, 2019. **27**(4): p. 303-322.
- [1143.] Nanra, J. S. und Buitrago, S. M., *et al.*, Capsular polysaccharides are an important immune evasion mechanism for *Staphylococcus aureus*. *Hum Vaccin Immunother*, 2013. **9**(3): p. 480-7.
- [1144.] Aboelela, S. W. und Saiman, L., *et al.*, Effectiveness of barrier precautions and surveillance cultures to control transmission of multidrug-resistant organisms: a systematic review of the literature. *Am J Infect Control*, 2006. **34**(8): p. 484-94.
- [1145.] Dhalla, F., Misbah, S. A., Secondary antibody deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2015. **15**(6): p. 505-13.
- [1146.] Misstear, K. und McNeela, E. A., *et al.*, Targeted nasal vaccination provides antibody-independent protection against *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*, 2014. **209**(9): p. 1479-84.
- [1147.] Monaci, E. und Mancini, F., *et al.*, MF59- and Al(OH)₃-Adjuvanted *Staphylococcus aureus* (4C-Staph) Vaccines Induce Sustained Protective Humoral and Cellular Immune Responses, with a Critical Role for Effector CD4 T Cells at Low Antibody Titers. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 439.
- [1148.] Spellberg, B., Daum, R., Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Semin Immunopathol*, 2012. **34**(2): p. 335-48.
- [1149.] Rigby, K. M., DeLeo, F. R., Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. *Semin Immunopathol*, 2012. **34**(2): p. 237-59.
- [1150.] Dunman, P. M., Nesen, M., Passive immunization as prophylaxis: when and where will this work? *Curr Opin Pharmacol*, 2003. **3**(5): p. 486-96.
- [1151.] Seok, J. und Warren, H. S., *et al.*, Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(9): p. 3507-12.
- [1152.] Holtfreter, S. und Radcliff, F. J., *et al.*, Characterization of a Mouse-Adapted *Staphylococcus aureus* Strain. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e71142.
- [1153.] Fagan, R. und Lessa, F., *et al.*, Estimates of Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection Rates by Specific Population Groups. 2012, IDSA.
- [1154.] Löffler, B. und Hussain, M., *et al.*, *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog*, 2010. **6**(1): p. e1000715.
- [1155.] Bubeck Wardenburg, J. und Palazzolo-Ballance, A. M., *et al.*, Panton-Valentine leukocidin is not a virulence determinant in murine models of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease. *J Infect Dis*, 2008. **198**(8): p. 1166-70.
- [1156.] Spaan, A. N. und Schiepers, A., *et al.*, Differential interaction of the staphylococcal toxins Panton-Valentine leukocidin and γ -hemolysin CB with human C5a receptors. *The Journal of Immunology*, 2015. **195**(3): p. 1034-1043.
- [1157.] Kim, H. K. und Missiakas, D., *et al.*, Mouse models for infectious diseases caused by *Staphylococcus aureus*. *J Immunol Methods*, 2014. **410**: p. 88-99.
- [1158.] Beura, L. K. und Hamilton, S. E., *et al.*, Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature*, 2016. **532**(7600): p. 512-516.
- [1159.] Diep Binh, A. und Le Vien, T. M., *et al.*, Improved Protection in a Rabbit Model of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Necrotizing Pneumonia upon Neutralization of Leukocidins in Addition to Alpha-Hemolysin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016. **60**(10): p. 6333-6340.
- [1160.] Leech, J. M. und Dhariwala, M. O., *et al.*, Toxin-Triggered Interleukin-1 Receptor Signaling Enables Early-Life Discrimination of Pathogenic versus Commensal Skin Bacteria. *Cell Host Microbe*, 2019. **26**(6): p. 795-809.e5.
- [1161.] Ryding, U. und Flock, J. I., *et al.*, Expression of collagen-binding protein and types 5 and 8 capsular polysaccharide in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*, 1997. **176**(4): p. 1096-9.
- [1162.] Tam, K., Torres, V. J., *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiol Spectr*, 2019. **7**(2).
- [1163.] Mazmanian, S. K. und Ton-That, H., *et al.*, Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 2001. **40**(5): p. 1049-57.
- [1164.] Luna, B. M. und Nielsen, T. B., *et al.*, Vaccines targeting *Staphylococcus aureus* skin and bloodstream infections require different composition. *PLoS One*, 2019. **14**(6): p. e0217439.
- [1165.] Clegg, J. und Soldaini, E., *et al.*, Targeting Skin-Resident Memory T Cells via Vaccination to Combat *Staphylococcus aureus* Infections. *Trends Immunol*, 2021. **42**(1): p. 6-17.
- [1166.] Scully, I. L. und Liberator, P. A., *et al.*, Covering all the Bases: Preclinical Development of an Effective *Staphylococcus aureus* Vaccine. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 109.
- [1167.] DeDent, A. und Kim, H. K., *et al.*, Exploring *Staphylococcus aureus* pathways to disease for vaccine development. *Semin Immunopathol*, 2012. **34**(2): p. 317-33.
- [1168.] DeLeo, F. R. und Diep, B. A., *et al.*, Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. *Infect Dis Clin North Am*, 2009. **23**(1): p. 17-34.
- [1169.] Tseng, C. W. und Kyme, P. A., *et al.*, Innate Immune Dysfunctions in Aged Mice Facilitate the Systemic Dissemination of Methicillin-Resistant *S. aureus*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e41454.
- [1170.] van Dissel, J. T. und van Langevelde, P., *et al.*, Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet*, 1998. **351**(9107): p. 950-3.
- [1171.] Adhikari, R. P. und Karazum, H., *et al.*, Novel structurally designed vaccine for *S. aureus* α -hemolysin: protection against bacteremia and pneumonia. *PLoS One*, 2012. **7**(6): p. e38567.

- [1172.] Uppalapati, S. R. und Kingston, J. J., *et al.*, Generation and characterization of an intergeneric bivalent alpha domain fusion protein α CS from *Clostridium perfringens* and *Staphylococcus aureus* for concurrent diagnosis and therapeutic applications. *J Appl Microbiol*, 2012. **113**(2): p. 448-58.
- [1173.] Spaulding, A. R. und Lin, Y. C., *et al.*, Immunity to *Staphylococcus aureus* secreted proteins protects rabbits from serious illnesses. *Vaccine*, 2012. **30**(34): p. 5099-109.
- [1174.] Tice, A. D. und Rehm, S. J., *et al.*, Practice guidelines for outpatient parenteral antimicrobial therapy. IDSA guidelines. *Clin Infect Dis*, 2004. **38**(12): p. 1651-72.
- [1175.] Bamberger, D. M., Boyd, S. E., Management of *Staphylococcus aureus* infections. *American family physician*, 2005. **72**(12): p. 2474-2481.
- [1176.] DasGupta, R., Grabe, M., Preoperative antibiotics before endourologic surgery: current recommendations. *Journal of endourology*, 2009. **23**(10): p. 1567-1570.
- [1177.] Bratzler, D. W., Houck, P. M., Antimicrobial prophylaxis for surgery: an advisory statement from the National Surgical Infection Prevention Project. *Clin Infect Dis*, 2004. **38**(12): p. 1706-15.
- [1178.] Havey, T. C. und Fowler, R. A., *et al.*, Duration of antibiotic therapy for critically ill patients with bloodstream infections: A retrospective cohort study. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2013. **24**(3): p. 129-37.
- [1179.] Rao, N. und Ziran, B. H., *et al.*, Treating osteomyelitis: antibiotics and surgery. *Plast Reconstr Surg*, 2011. **127** Suppl 1: p. 177s-187s.
- [1180.] Stryjewski, M. E. und Szczech, L. A., *et al.*, Use of vancomycin or first-generation cephalosporins for the treatment of hemodialysis-dependent patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis*, 2007. **44**(2): p. 190-6.
- [1181.] Chang, F. Y. und Peacock, J. E., Jr., *et al.*, *Staphylococcus aureus* bacteremia: recurrence and the impact of antibiotic treatment in a prospective multicenter study. *Medicine (Baltimore)*, 2003. **82**(5): p. 333-9.
- [1182.] Fowler, V. G., Jr. und Sanders, L. L., *et al.*, Outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia according to compliance with recommendations of infectious diseases specialists: experience with 244 patients. *Clin Infect Dis*, 1998. **27**(3): p. 478-86.
- [1183.] Hidayat, L. K. und Hsu, D. I., *et al.*, High-dose vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: efficacy and toxicity. *Arch Intern Med*, 2006. **166**(19): p. 2138-44.
- [1184.] Kollef, M. H., Limitations of vancomycin in the management of resistant staphylococcal infections. *Clin Infect Dis*, 2007. **45** Suppl 3: p. S191-5.
- [1185.] Werth, B. J. und Vidailac, C., *et al.*, Novel combinations of vancomycin plus ceftaroline or oxacillin against methicillin-resistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous VISA. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013. **57**(5): p. 2376-9.
- [1186.] Loomba, P. S. und Taneja, J., *et al.*, Methicillin and Vancomycin Resistant *S. aureus* in Hospitalized Patients. *J Glob Infect Dis*, 2010. **2**(3): p. 275-83.
- [1187.] Salimi, A. und Talaie, H., *et al.*, Teicoplanin as an anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* agent in infections of severely poisoned intensive care unit patients/ Tehran- Iran. *Acta Biomed*, 2014. **84**(3): p. 189-95.
- [1188.] Xu, Y. und Wang, B., *et al.*, In vitro activity of vancomycin, teicoplanin, linezolid and daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected from Chinese hospitals in 2018–2020. *Infection and Drug Resistance*, 2021. **14**: p. 5449.
- [1189.] Bassetti, M. und Melica, G., *et al.*, Gram-positive bacterial resistance. A challenge for the next millennium. *Panminerva Med*, 2002. **44**(3): p. 179-84.
- [1190.] Deasy, J., The antibiotic challenge: changing clinical management of infections. *Jaapa*, 2009. **22**(5): p. 22-6.
- [1191.] Akins, P. T. und Belko, J., *et al.*, Perioperative management of neurosurgical patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Neurosurg*, 2010. **112**(2): p. 354-61.
- [1192.] Osmon, D. R., Berbari, E. F., Outpatient intravenous antimicrobial therapy for the practicing orthopaedic surgeon. *Clin Orthop Relat Res*, 2002(403): p. 80-6.
- [1193.] Elkins, J. M. und Kates, S., *et al.*, General Assembly, Diagnosis, Definitions: Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections. *J Arthroplasty*, 2019. **34**(2s): p. S181-s185.
- [1194.] Mermel, L. A. und Farr, B. M., *et al.*, Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. *Clin Infect Dis*, 2001. **32**(9): p. 1249-72.
- [1195.] Harrington, G. und Russo, P., *et al.*, Surgical-site infection rates and risk factor analysis in coronary artery bypass graft surgery. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2004. **25**(6): p. 472-6.
- [1196.] Zimmerli, W. und Widmer, A. F., *et al.*, Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group. *Jama*, 1998. **279**(19): p. 1537-41.
- [1197.] Klemm, K., [Gentamicin-PMMA-beads in treating bone and soft tissue infections (author's transl)]. *Zentralbl Chir*, 1979. **104**(14): p. 934-42.
- [1198.] Wahlig, H., Dingeldein, E., Antibiotics and bone cements. Experimental and clinical long-term observations. *Acta Orthop Scand*, 1980. **51**(1): p. 49-56.
- [1199.] Hickok, N. J., Shapiro, I. M., Immobilized antibiotics to prevent orthopaedic implant infections. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012. **64**(12): p. 1165-76.
- [1200.] Boyce, J. M. und Havill, N. L., *et al.*, Do infection control measures work for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2004. **25**(5): p. 395-401.
- [1201.] Cooper, B. S. und Stone, S. P., *et al.*, Isolation measures in the hospital management of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): systematic review of the literature. *Bmj*, 2004. **329**(7465): p. 533.
- [1202.] Cepeda, J. A. und Whitehouse, T., *et al.*, Isolation of patients in single rooms or cohorts to reduce spread of MRSA in intensive-care units: prospective two-centre study. *Lancet*, 2005. **365**(9456): p. 295-304.
- [1203.] Bauer, A. und Grünewald, M., *et al.*, Ambulatory screening and decontamination to prevent *Staphylococcus aureus* complications in patients undergoing elective surgery (STAUfrei): study protocol for a controlled intervention study. *BMC Infect Dis*, 2020. **20**(1): p. 95.
- [1204.] Doebbeling, B. N. und Reagan, D. R., *et al.*, Long-term efficacy of intranasal mupirocin ointment. A prospective cohort study of *Staphylococcus aureus* carriage. *Arch Intern Med*, 1994. **154**(13): p. 1505-8.

- [1205.] Allegranzi, B. und Bischoff, P., *et al.*, New WHO recommendations on preoperative measures for surgical site infection prevention: an evidence-based global perspective. *Lancet Infect Dis*, 2016. **16**(12): p. e276-e287.
- [1206.] Deshpande, L. M. und Fix, A. M., *et al.*, Emerging elevated mupirocin resistance rates among staphylococcal isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000): correlations of results from disk diffusion, Etest and reference dilution methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2002. **42**(4): p. 283-90.
- [1207.] Buehlmann, M. und Frei, R., *et al.*, Highly effective regimen for decolonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriers. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2008. **29**(6): p. 510-6.
- [1208.] Loeb, M. B. und Main, C., *et al.*, Antimicrobial drugs for treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization. *Cochrane Database Syst Rev*, 2003(4): p. Cd003340.
- [1209.] Wertheim, H. F. und Vos, M. C., *et al.*, Mupirocin prophylaxis against nosocomial *Staphylococcus aureus* infections in nonsurgical patients: a randomized study. *Ann Intern Med*, 2004. **140**(6): p. 419-25.
- [1210.] McKinnon, P. S., Davis, S. L., Pharmacokinetic and pharmacodynamic issues in the treatment of bacterial infectious diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2004. **23**(4): p. 271-88.
- [1211.] Mitchell, D. H., Howden, B. P., Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Intern Med J*, 2005. **35 Suppl 2**: p. S17-24.
- [1212.] Sidi, V. und Roilides, E., *et al.*, Comparison of efficacy and safety of teicoplanin and vancomycin in children with antineoplastic therapy-associated febrile neutropenia and gram-positive bacteremia. *J Chemother*, 2000. **12**(4): p. 326-31.
- [1213.] Fowler, V. G., Jr. und Boucher, H. W., *et al.*, Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med*, 2006. **355**(7): p. 653-65.
- [1214.] Finch, R., Gram-positive infections: lessons learnt and novel solutions. *Clinical Microbiology and Infection*, 2006. **12**(s8): p. 3-8.
- [1215.] Leder, K. und Turnidge, J. D., *et al.*, The clinical efficacy of continuous-infusion flucloxacillin in serious staphylococcal sepsis. *J Antimicrob Chemother*, 1999. **43**(1): p. 113-8.
- [1216.] Mehtar, S. und Drabu, Y., *et al.*, A comparative study between teicoplanin alone and flucloxacillin, plus or minus fusidic acid, in the treatment of serious infections caused by methicillin-susceptible gram-positive bacteria. *Chemotherapy*, 1995. **41**(5): p. 412-9.
- [1217.] Markowitz, N. und Quinn, E. L., *et al.*, Trimethoprim-sulfamethoxazole compared with vancomycin for the treatment of *Staphylococcus aureus* infection. *Ann Intern Med*, 1992. **117**(5): p. 390-8.
- [1218.] Masters, P. A. und O'Bryan, T. A., *et al.*, Trimethoprim-Sulfamethoxazole Revisited. *Archives of Internal Medicine*, 2003. **163**(4): p. 402-410.
- [1219.] Lawson, D. H., Jick, H., Adverse reactions to cotrimoxazole in hospitalized medical patients. *Am J Med Sci*, 1978. **275**(1): p. 53-7.
- [1220.] Coppy, M. und Duret, S., *et al.*, Adverse drug reactions induced by cotrimoxazole: Still a lot of preventable harm. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2022. **36**(2): p. 421-426.
- [1221.] Tack, K. und Wilcox, M., *et al.* Linezolid vs. vancomycin or oxacillin/dicloxacillin for the treatment of catheter-related bloodstream infections (CRBSI). in *47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago (IL)*. 2007.
- [1222.] Perlroth, J. und Kuo, M., *et al.*, Adjunctive use of rifampin for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review of the literature. *Arch Intern Med*, 2008. **168**(8): p. 805-19.
- [1223.] Hu, Y. und Liu, A., *et al.*, Combinations of β -lactam or aminoglycoside antibiotics with plectasin are synergistic against methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 2015. **10**(2): p. e0117664.
- [1224.] Geriak, M. und Haddad, F., *et al.*, Clinical Data on Daptomycin plus Ceftaroline versus Standard of Care Monotherapy in the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019. **63**(5).
- [1225.] Sakoulas, G. und Okumura, C. Y., *et al.*, Nafcillin enhances innate immune-mediated killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Molecular Medicine*, 2014. **92**(2): p. 139-149.
- [1226.] Drew, R. H. und Perfect, J. R., *et al.*, Treatment of methicillin-resistant staphylococcus aureus infections with quinupristin-dalfopristin in patients intolerant of or failing prior therapy. For the Synercid Emergency-Use Study Group. *J Antimicrob Chemother*, 2000. **46**(5): p. 775-84.
- [1227.] Holmes, N. E. und Tong, S. Y., *et al.*, Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: vancomycin and beyond. *Semin Respir Crit Care Med*, 2015. **36**(1): p. 17-30.
- [1228.] Ramos-Martín, V. und Johnson, A., *et al.*, Pharmacodynamics of teicoplanin against MRSA. *J Antimicrob Chemother*, 2017. **72**(12): p. 3382-3389.
- [1229.] Choi, S. J. und Kim, M.-H., *et al.*, Active Immunization with Extracellular Vesicles Derived from *Staphylococcus aureus* Effectively Protects against Staphylococcal Lung Infections, Mainly via Th1 Cell-Mediated Immunity. *PLoS One*, 2015. **10**(9): p. e0136021.
- [1230.] Bagnoli, F. und Fontana, M. R., *et al.*, Vaccine composition formulated with a novel TLR7-dependent adjuvant induces high and broad protection against *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(12): p. 3680-5.
- [1231.] Brown, A. F. und Murphy, A. G., *et al.*, Memory Th1 Cells Are Protective in Invasive *Staphylococcus aureus* Infection. *PLoS Pathogens*, 2015. **11**(11): p. e1005226.
- [1232.] Ehrensberger, M. T. und Tobias, M. E., *et al.*, Cathodic voltage-controlled electrical stimulation of titanium implants as treatment for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* periprosthetic infections. *Biomaterials*, 2015. **41**: p. 97-105.
- [1233.] Zhou, C. und Cai, H., *et al.*, Sustained activity of novel THIOMAB antibody-antibiotic conjugate against *Staphylococcus aureus* in a mouse model: Longitudinal pharmacodynamic assessment by bioluminescence imaging. *PLoS One*, 2019. **14**(10): p. e0224096.
- [1234.] Lehar, S. M. und Pillow, T., *et al.*, Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. *Nature*, 2015. **527**(7578): p. 323-328.
- [1235.] Veloso, T. R. und Que, Y.-A., *et al.*, Prophylaxis of Experimental Endocarditis With Antiplatelet and Antithrombin Agents: A Role for Long-term Prevention of Infective Endocarditis in Humans? *The Journal of Infectious Diseases*, 2015. **211**(1): p. 72-79.

- [1236.] 2019 antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline. 2019, *World Health Organization*.
- [1237.] Hatfull, G. F. und Dedrick, R. M., *et al.*, Phage Therapy for Antibiotic-Resistant Bacterial Infections. *Annu Rev Med*, 2022. **73**: p. 197-211.
- [1238.] Boyce, B. M. und Lindsey, B. A., *et al.*, Additive effects of exogenous IL-12 supplementation and antibiotic treatment in infection prophylaxis. *J Orthop Res*, 2012. **30**(2): p. 196-202.
- [1239.] Gyimesi, E. und Bankovich, A. J., *et al.*, *Staphylococcus aureus* bound to complement receptor 1 on human erythrocytes by bispecific monoclonal antibodies is phagocytosed by acceptor macrophages. *Immunol Lett*, 2004. **95**(2): p. 185-92.
- [1240.] Mo, C. Y. und Manning, S. A., *et al.*, Systematically Altering Bacterial SOS Activity under Stress Reveals Therapeutic Strategies for Potentiating Antibiotics. *mSphere*, 2016. **1**(4).
- [1241.] Chan, R. und Buckley, P. T., *et al.*, Identification of biologic agents to neutralize the bicomponent leukocidins of *Staphylococcus aureus*. *Sci Transl Med*, 2019. **11**(475).
- [1242.] Diem, M. D. und Hyun, L., *et al.*, Selection of high-affinity Centyrin FN3 domains from a simple library diversified at a combination of strand and loop positions. *Protein Eng Des Sel*, 2014. **27**(10): p. 419-29.
- [1243.] Raval, Y. S. und Mohamed, A., *et al.*, Hydrogen Peroxide-Generating Electrochemical Scaffold Activity against Trispecies Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020. **64**(4).
- [1244.] Jun, S. Y. und Jang, I. J., *et al.*, Pharmacokinetics and Tolerance of the Phage Endolysin-Based Candidate Drug SAL200 after a Single Intravenous Administration among Healthy Volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017. **61**(6).
- [1245.] Yin, S. L. und Chang, Y. J., *et al.*, [Research progress of new antibacterial drugs that target bacterial quorum sensing systems]. *Yao Xue Xue Bao*, 2011. **46**(6): p. 613-21.
- [1246.] Gao, P. und Davies, J., *et al.*, Dehydrosqualene Desaturase as a Novel Target for Anti-Virulence Therapy against *Staphylococcus aureus*. *mBio*, 2017. **8**(5).
- [1247.] Yoshitani, J. und Kabata, T., *et al.*, Combinational therapy with antibiotics and antibiotic-loaded adipose-derived stem cells reduce abscess formation in implant-related infection in rats. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 11182.
- [1248.] Johnson, C. T. und Sok, M. C. P., *et al.*, Lysostaphin and BMP-2 co-delivery reduces *S. aureus* infection and regenerates critical-sized segmental bone defects. *Science Advances*. **5**(5): p. eaaw1228.
- [1249.] Zhang, Y. und Zhang, J., *et al.*, Erythrocyte membrane-coated nanogel for combinatorial antivirulence and responsive antimicrobial delivery against *Staphylococcus aureus* infection. *J Control Release*, 2017. **263**: p. 185-191.
- [1250.] Huang, R. und Cai, G. Q., *et al.*, Platelet membrane-camouflaged silver metal-organic framework drug system against infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Nanobiotechnology*, 2021. **19**(1): p. 229.
- [1251.] Kolata, J. B. und Kühbandner, I., *et al.*, The Fall of a Dogma? Unexpected High T-Cell Memory Response to *Staphylococcus aureus* in Humans. *J Infect Dis*, 2015. **212**(5): p. 830-8.
- [1252.] Lin, L. und Ibrahim, A. S., *et al.*, Th1-Th17 Cells Mediate Protective Adaptive Immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* Infection in Mice. *PLoS Pathogens*, 2009. **5**(12): p. e1000703.
- [1253.] Narita, K. und Hu, D. L., *et al.*, Role of interleukin-17A in cell-mediated protection against *Staphylococcus aureus* infection in mice immunized with the fibrinogen-binding domain of clumping factor A. *Infect Immun*, 2010. **78**(10): p. 4234-42.
- [1254.] Zielinski, C. E. und Mele, F., *et al.*, Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β . *Nature*, 2012. **484**(7395): p. 514-8.
- [1255.] Serruto, D. und Rappuoli, R., *et al.*, Molecular mechanisms of complement evasion: learning from *staphylococci* and *meningococci*. *Nat Rev Microbiol*, 2010. **8**(6): p. 393-9.
- [1256.] Kim, H. K. und Thammavongsa, V., *et al.*, Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol*, 2012. **15**(1): p. 92-9.
- [1257.] Corey, G. R. und Wilcox, M. H., *et al.*, CANVAS 1: the first Phase III, randomized, double-blind study evaluating ceftaroline fosamil for the treatment of patients with complicated skin and skin structure infections. *J Antimicrob Chemother*, 2010. **65** Suppl 4: p. iv41-51.
- [1258.] Wilcox, M. H. und Corey, G. R., *et al.*, CANVAS 2: the second Phase III, randomized, double-blind study evaluating ceftaroline fosamil for the treatment of patients with complicated skin and skin structure infections. *J Antimicrob Chemother*, 2010. **65** Suppl 4: p. iv53-iv65.
- [1259.] Bhagwat, S. S. und Nandanwar, M., *et al.*, Levonadifloxacin, a Novel Broad-Spectrum Anti-MRSA Benzoquinolizine Quinolone Agent: Review of Current Evidence. *Drug Des Devel Ther*, 2019. **13**: p. 4351-4365.
- [1260.] Mohamed, M. F. und Abdelkhalek, A., *et al.*, Evaluation of short synthetic antimicrobial peptides for treatment of drug-resistant and intracellular *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, 2016. **6**(1): p. 29707.
- [1261.] Hernández-Aristizábal, I., Ocampo-Ibáñez, I. D., Antimicrobial Peptides with Antibacterial Activity against Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains: Classification, Structures, and Mechanisms of Action. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(15).
- [1262.] Stempel, N. und Strehmel, J., *et al.*, Potential application of antimicrobial peptides in the treatment of bacterial biofilm infections. *Curr Pharm Des*, 2015. **21**(1): p. 67-84.
- [1263.] Kang, J. und Dietz, M. J., *et al.*, Antimicrobial peptide LL-37 is bactericidal against *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS One*, 2019. **14**(6): p. e0216676.
- [1264.] Li, M. und Zou, P., *et al.*, Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling of Pharmaceutical Nanoparticles. *Aaps J*, 2017. **19**(1): p. 26-42.
- [1265.] Plc, D. P., Effect of Exeporfinium Chloride (XF-73) Gel on Nasal *S. aureus* in Patients at Risk of Post-op Staphylococcal Infection. 2022, *U.S. National Library of Medicine: ClinicalTrials.gov*.
- [1266.] Senhorinho, G. und Ross, G., *et al.*, Cyanobacteria and eukaryotic microalgae as potential sources of antibiotics. *Phycologia*, 2015. **54**.
- [1267.] Ahire, J. J. und Kashikar, M. S., *et al.*, Identification and characterization of antimicrobial peptide produced by indigenously isolated *Bacillus paralicheniformis* UBBLi30 strain. *3 Biotech*, 2020. **10**(3): p. 112.
- [1268.] Mishra, R. und Panda, A. K., *et al.*, Natural Antibiofilm Agents: Strategies to Control Biofilm-Forming Pathogens. *Front Microbiol*, 2020. **11**: p. 566325.

- [1269.] An, A. Y. und Choi, K. G., *et al.*, An Overview of Biological and Computational Methods for Designing Mechanism-Informed Anti-biofilm Agents. *Front Microbiol*, 2021. **12**: p. 640787.
- [1270.] Brötz-Oesterhelt, H. und Beyer, D., *et al.*, Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. *Nature Medicine*, 2005. **11**(10): p. 1082-1087.
- [1271.] Conlon, B. P. und Nakayasu, E. S., *et al.*, Activated ClpP kills persists and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature*, 2013. **503**(7476): p. 365-370.
- [1272.] Hulme, J., Application of Nanomaterials in the Prevention, Detection, and Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Pharmaceutics*, 2022. **14**(4).
- [1273.] Skurnik, D. und Cywes-Bentley, C., *et al.*, The exceptionally broad-based potential of active and passive vaccination targeting the conserved microbial surface polysaccharide PNAG. *Expert Review of Vaccines*, 2016. **15**(8): p. 1041-1053.
- [1274.] Visperas, A. und Santana, D., *et al.*, Current treatments for biofilm-associated periprosthetic joint infection and new potential strategies. *Journal of Orthopaedic Research*, 2022. **40**(7): p. 1477-1491.
- [1275.] Nodzo, S. und Tobias, M., *et al.*, Cathodic Electrical Stimulation Combined With Vancomycin Enhances Treatment of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Implant-associated Infections. *Clin Orthop Relat Res*, 2015. **473**(9): p. 2856-64.
- [1276.] Canty, M. und Luke-Marshall, N., *et al.*, Cathodic voltage-controlled electrical stimulation of titanium for prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii* biofilm infections. *Acta Biomater*, 2017. **48**: p. 451-460.
- [1277.] Brinch, K. S. und Sandberg, A., *et al.*, Plectasin shows intracellular activity against *Staphylococcus aureus* in human THP-1 monocytes and in a mouse peritonitis model. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. **53**(11): p. 4801-8.
- [1278.] Xiong, M. H. und Li, Y. J., *et al.*, Bacteria-responsive multifunctional nanogel for targeted antibiotic delivery. *Adv Mater*, 2012. **24**(46): p. 6175-80.
- [1279.] Sémiramoth, N. und Di Meo, C., *et al.*, Self-assembled squalenoylated penicillin bioconjugates: an original approach for the treatment of intracellular infections. *ACS Nano*, 2012. **6**(5): p. 3820-31.
- [1280.] Anderson, A. S. und Miller, A. A., *et al.*, Development of a multicomponent *Staphylococcus aureus* vaccine designed to counter multiple bacterial virulence factors. *Hum Vaccin Immunother*, 2012. **8**(11): p. 1585-94.
- [1281.] Inoue, M. und Yonemura, T., *et al.*, Safety, tolerability, and immunogenicity of a novel 4-antigen *Staphylococcus aureus* vaccine (SA4Ag) in healthy Japanese adults. *Hum Vaccin Immunother*, 2018. **14**(11): p. 2682-2691.
- [1282.] Kurokawa, K. und Takahashi, K., *et al.*, The staphylococcal surface-glycopolymer wall teichoic acid (WTA) is crucial for complement activation and immunological defense against *Staphylococcus aureus* infection. *Immunobiology*, 2016. **221**(10): p. 1091-101.
- [1283.] Wacker, M. und Wang, L., *et al.*, Prevention of *Staphylococcus aureus* infections by glycoprotein vaccines synthesized in *Escherichia coli*. *J Infect Dis*, 2014. **209**(10): p. 1551-61.
- [1284.] Roy Chowdhury, R. und Fitch, R. W., *et al.*, Efficacy of phytol-derived diterpenoid immunoadjuvants over alum in shaping the murine host's immune response to *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*, 2013. **31**(8): p. 1178-86.
- [1285.] Kim, H. K. und Emolo, C., *et al.*, Protein A-specific monoclonal antibodies and prevention of *Staphylococcus aureus* disease in mice. *Infect Immun*, 2012. **80**(10): p. 3460-70.
- [1286.] Chen, X. und Schneewind, O., *et al.*, Engineered human antibodies for the opsonization and killing of *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2022. **119**(4): p. e2114478119.
- [1287.] McAdow, M. und DeDent Andrea, C., *et al.*, Coagulases as Determinants of Protective Immune Responses against *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, 2012. **80**(10): p. 3389-3398.
- [1288.] Varrone, J. J. und de Mesy Bentley, K. L., *et al.*, Passive immunization with anti-glucosaminidase monoclonal antibodies protects mice from implant-associated osteomyelitis by mediating opsonophagocytosis of *Staphylococcus aureus* megaclusters. *J Orthop Res*, 2014. **32**(10): p. 1389-96.
- [1289.] Klimka, A. und Mertins, S., *et al.*, Epitope-specific immunity against *Staphylococcus aureus* coproporphyrinogen III oxidase. *npj Vaccines*, 2021. **6**(1): p. 11.
- [1290.] Anderson, A. S. und Scully, I. L., *et al.*, *Staphylococcus aureus* Manganese Transport Protein C Is a Highly Conserved Cell Surface Protein That Elicits Protective Immunity Against *S. aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Infectious Diseases*, 2012. **205**(11): p. 1688-1696.
- [1291.] Mancini, F. und Monaci, E., *et al.*, One Dose of *Staphylococcus aureus* 4C-Staph Vaccine Formulated with a Novel TLR7-Dependent Adjuvant Rapidly Protects Mice through Antibodies, Effector CD4+ T Cells, and IL-17A. *PLoS One*, 2016. **11**(1): p. e0147767.
- [1292.] Aman, M. J., Integrated BioTherapeutics. *Hum Vaccin Immunother*, 2018. **14**(6): p. 1308-1310.
- [1293.] Yeaman, M. R. und Filler, S. G., *et al.*, Applying Convergent Immunity to Innovative Vaccines Targeting *Staphylococcus aureus*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 463.
- [1294.] Venkatasubramaniam, A. und Adhikari, R. P., *et al.*, TBA225, a fusion toxoid vaccine for protection and broad neutralization of staphylococcal superantigens. *Scientific Reports*, 2019. **9**(1): p. 3279.
- [1295.] Hendriks, A. und Mnich, M. E., *et al.*, *Staphylococcus aureus*-Specific Tissue-Resident Memory CD4+ T Cells Are Abundant in Healthy Human Skin. *Frontiers in Immunology*, 2021. **12**.
- [1296.] Kenney, R. T. und Frech, S. A., *et al.*, Dose sparing with intradermal injection of influenza vaccine. *N Engl J Med*, 2004. **351**(22): p. 2295-301.
- [1297.] Moon, S. und Wang, Y., *et al.*, Dose sparing and enhanced immunogenicity of inactivated rotavirus vaccine administered by skin vaccination using a microneedle patch. *Vaccine*, 2013. **31**(34): p. 3396-402.
- [1298.] Shin, H., Iwasaki, A., A vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells. *Nature*, 2012. **491**(7424): p. 463-467.
- [1299.] Gopinath, S. und Lu, P., *et al.*, Cutting Edge: The Use of Topical Aminoglycosides as an Effective Pull in "Prime and Pull" Vaccine Strategy. *The Journal of Immunology*, 2020. **204**(7): p. 1703.

- [1300.] Levy, J. und Licini, L., *et al.*, Safety and immunogenicity of an investigational 4-component *Staphylococcus aureus* vaccine with or without AS03B adjuvant: Results of a randomized phase I trial. *Hum Vaccin Immunother*, 2015. **11**(3): p. 620-31.
- [1301.] François, B. und Mercier, E., *et al.*, Safety and tolerability of a single administration of AR-301, a human monoclonal antibody, in ICU patients with severe pneumonia caused by *Staphylococcus aureus*: first-in-human trial. *Intensive Care Med*, 2018. **44**(11): p. 1787-1796.
- [1302.] François, B. und Jafri, H. S., *et al.*, Efficacy and safety of suvratoxumab for prevention of *Staphylococcus aureus* ventilator-associated pneumonia (SAATELLITE): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, phase 2 pilot trial. *Lancet Infect Dis*, 2021. **21**(9): p. 1313-1323.
- [1303.] Boles, J. W. und M. Pitt, M. L., *et al.*, Generation of protective immunity by inactivated recombinant staphylococcal enterotoxin B vaccine in nonhuman primates and identification of correlates of immunity. *Clinical Immunology*, 2003. **108**(1): p. 51-59.
- [1304.] Morefield, G. L. und Hawkins, L. D., *et al.*, Synthetic Toll-like receptor 4 agonist enhances vaccine efficacy in an experimental model of toxic shock syndrome. *Clin Vaccine Immunol*, 2007. **14**(11): p. 1499-504.
- [1305.] Panagioti, E. und Klenerman, P., *et al.*, Features of Effective T Cell-Inducing Vaccines against Chronic Viral Infections. *Frontiers in Immunology*, 2018. **9**.
- [1306.] Jackson, L. A. und Anderson, E. J., *et al.*, An mRNA vaccine against SARS-CoV-2—preliminary report. *New England journal of medicine*, 2020.
- [1307.] Mulligan, M. J. und Lyke, K. E., *et al.*, Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature*, 2020. **586**(7830): p. 589-593.
- [1308.] Maruggi, G. und Chiarot, E., *et al.*, Immunogenicity and protective efficacy induced by self-amplifying mRNA vaccines encoding bacterial antigens. *Vaccine*, 2017. **35**(2): p. 361-368.
- [1309.] Marwaha, A. und Leung, N., *et al.*, TH17 Cells in Autoimmunity and Immunodeficiency: Protective or Pathogenic? *Frontiers in Immunology*, 2012. **3**.
- [1310.] Fajgenbaum, D. C., June, C. H., Cytokine Storm. *N Engl J Med*, 2020. **383**(23): p. 2255-2273.
- [1311.] Watson, K. und Russell, C. D., *et al.*, Developing Novel Host-Based Therapies Targeting Microbicidal Responses in Macrophages and Neutrophils to Combat Bacterial Antimicrobial Resistance. *Frontiers in Immunology*, 2020. **11**.
- [1312.] Gradisar, H. und Keber, M. M., *et al.*, MD-2 as the target of curcumin in the inhibition of response to LPS. *J Leukoc Biol*, 2007. **82**(4): p. 968-74.
- [1313.] Shuto, T. und Ono, T., *et al.*, Curcumin decreases toll-like receptor-2 gene expression and function in human monocytes and neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **398**(4): p. 647-52.
- [1314.] Bewley, M. A. und Budd, R. C., *et al.*, Opsonic Phagocytosis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Is Enhanced by Nrf2 Agonists. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018. **198**(6): p. 739-750.
- [1315.] Preston, J. A. und Bewley, M. A., *et al.*, Alveolar Macrophage Apoptosis-associated Bacterial Killing Helps Prevent Murine Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019. **200**(1): p. 84-97.
- [1316.] Han, S., Mallampalli, R. K., The acute respiratory distress syndrome: from mechanism to translation. *J Immunol*, 2015. **194**(3): p. 855-60.
- [1317.] Roth, K. D. R. und Wenzel, E. V., *et al.*, Developing Recombinant Antibodies by Phage Display Against Infectious Diseases and Toxins for Diagnostics and Therapy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021. **11**.
- [1318.] Li, B. und Fouts, A. E., *et al.* In vitro affinity maturation of a natural human antibody overcomes a barrier to in vivo affinity maturation. in *MAbs*. 2014. Taylor & Francis.
- [1319.] Kontermann, R. E., Brinkmann, U., Bispecific antibodies. *Drug discovery today*, 2015. **20**(7): p. 838-847.
- [1320.] Tkaczyk, C. und Kasturirangan, S., *et al.*, Multimechanistic monoclonal antibodies (MAbs) targeting *Staphylococcus aureus* alpha-toxin and clumping factor A: activity and efficacy comparisons of a MAb combination and an engineered bispecific antibody approach. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2017. **61**(8): p. e00629-17.
- [1321.] Ahamadi-Fesharaki, R. und Fateh, A., *et al.*, Single-Chain Variable Fragment-Based Bispecific Antibodies: Hitting Two Targets with One Sophisticated Arrow. *Mol Ther Oncolytics*, 2019. **14**: p. 38-56.
- [1322.] Soltanmohammadi, B. und Piri-Gavgani, S., *et al.*, Bactericidal fully human single-chain fragment variable antibodies protect mice against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Clinical & Translational Immunology*, 2021. **10**(7): p. e1302.
- [1323.] LaRocca, T. J. und Holthausen, D. J., *et al.*, The bactericidal effect of a complement-independent antibody is osmolytic and specific to *Borrelia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(26): p. 10752-7.
- [1324.] Wang, M. und Zhang, Y., *et al.*, Anti-*Staphylococcus aureus* single-chain variable region fragments provide protection against mastitis in mice. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016. **100**(5): p. 2153-62.
- [1325.] Richard, G. und MacKenzie, C. R., *et al.*, Antibody Binding to the O-Specific Antigen of *Pseudomonas aeruginosa* O6 Inhibits Cell Growth. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020. **64**(4).
- [1326.] Mohamed, M. F. und Hamed, M. I., *et al.*, Targeting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with short salt-resistant synthetic peptides. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014. **58**(7): p. 4113-22.
- [1327.] Shinohara, D. R. und Menegucci, T. C., *et al.*, Synergistic activity of polymyxin B combined with vancomycin against carbapenem-resistant and polymyxin-resistant *Acinetobacter baumannii*: first in vitro study. *J Med Microbiol*, 2019. **68**(3): p. 309-315.
- [1328.] Richard, G., Investigating the bactericidal mechanism of anti-LPS antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* serotype O6. 2017, University of Guelph.
- [1329.] Xie, X. und McLean, M. D., *et al.*, Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity- and complement-dependent cytotoxicity-independent bactericidal activity of an IgG against *Pseudomonas aeruginosa* O6ad. *J Immunol*, 2010. **184**(7): p. 3725-33.
- [1330.] Saeed, A. F. und Wang, R., *et al.*, Antibody engineering for pursuing a healthier future. *Frontiers in Microbiology*, 2017. **8**: p. 495.
- [1331.] Dübel, S. und Hust, M., *et al.*, Rekombinante Antikörper. 2019: Springer.
- [1332.] Shalem, O. und Sanjana, N. E., *et al.*, Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014. **343**(6166): p. 84-87.

- [1333.] Li, B. und Clohisey, S. M., *et al.*, Genome-wide CRISPR screen identifies host dependency factors for influenza A virus infection. *Nature Communications*, 2020. **11**(1): p. 164.
- [1334.] Brown, D., Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void? *Nat Rev Drug Discov*, 2015. **14**(12): p. 821-32.
- [1335.] Netea, M. G. und Joosten, L. A., *et al.*, Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*, 2016. **352**(6284): p. aaf1098.
- [1336.] Huttenhower, C. und Gevers, D., *et al.*, Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 2012. **486**(7402): p. 207-214.
- [1337.] Krismer, B. und Weidenmaier, C., *et al.*, The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. *Nat Rev Microbiol*, 2017. **15**(11): p. 675-687.
- [1338.] Cohut, M. The probiotic that kills antibiotic-resistant bacteria. 2018.
- [1339.] Paharik, A. E. und Parlet, C. P., *et al.*, Coagulase-Negative Staphylococcal Strain Prevents *Staphylococcus aureus* Colonization and Skin Infection by Blocking Quorum Sensing. *Cell Host Microbe*, 2017. **22**(6): p. 746-756.e5.
- [1340.] Iwase, T. und Uehara, Y., *et al.*, *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature*, 2010. **465**(7296): p. 346-9.
- [1341.] Sugimoto, S. und Iwamoto, T., *et al.*, *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *J Bacteriol*, 2013. **195**(8): p. 1645-55.
- [1342.] Schindler, C. A., Schuhardt, V. T., Lysostaphin: A new bacteriolytic agent for the *Staphylococcus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1964. **51**(3): p. 414-21.
- [1343.] Regev-Yochay, G. und Trzcinski, K., *et al.*, Interference between *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: In vitro hydrogen peroxide-mediated killing by *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, 2006. **188**(13): p. 4996-5001.
- [1344.] Selva, L. und Viana, D., *et al.*, Killing niche competitors by remote-control bacteriophage induction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(4): p. 1234-8.
- [1345.] Machan, Z. A. und Taylor, G. W., *et al.*, 2-Heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide, an antistaphylococcal agent produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1992. **30**(5): p. 615-623.
- [1346.] Lee, J. und Zilm, P. S., *et al.*, Novel Research Models for *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCV) Development: Co-pathogenesis and Growth Rate. *Frontiers in Microbiology*, 2020. **11**.
- [1347.] Uehara, Y. und Nakama, H., *et al.*, Bacterial interference among nasal inhabitants: eradication of *Staphylococcus aureus* from nasal cavities by artificial implantation of *Corynebacterium sp. J Hosp Infect*, 2000. **44**(2): p. 127-33.
- [1348.] Lina, G. und Boutite, F., *et al.*, Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of Staphylococcal *agr* alleles. *Appl Environ Microbiol*, 2003. **69**(1): p. 18-23.
- [1349.] Wollenberg Michael, S. und Claesen, J., *et al.*, *Propionibacterium*-Produced Coproporphyrin III Induces *Staphylococcus aureus* Aggregation and Biofilm Formation. *mBio*, 2014. **5**(4): p. e01286-14.
- [1350.] Robles-Medranda, C., Confocal endomicroscopy: Is it time to move on? *World J Gastrointest Endosc*, 2016. **8**(1): p. 1-3.
- [1351.] Knop, J. und Hanses, F., *et al.*, *Staphylococcus aureus* Infection in Humanized Mice: A New Model to Study Pathogenicity Associated With Human Immune Response. *The Journal of Infectious Diseases*, 2015. **212**(3): p. 435-444.
- [1352.] Tseng, C. W. und Biancotti, J. C., *et al.*, Increased Susceptibility of Humanized NSG Mice to Pantone-Valentine Leukocidin and *Staphylococcus aureus* Skin Infection. *PLoS Pathogens*, 2015. **11**(11): p. e1005292.
- [1353.] Kumar, N. und Kulkarni, K., *et al.*, Preparation and characterization of maghemite nanoparticles from mild steel for magnetically guided drug therapy. *J Mater Sci Mater Med*, 2017. **28**(8): p. 116.
- [1354.] Mocan, T. und Matea, C. T., *et al.*, Development of nanoparticle-based optical sensors for pathogenic bacterial detection. *Journal of Nanobiotechnology*, 2017. **15**(1): p. 25.
- [1355.] Krishnan, T. und Wang, H. N., *et al.*, Smartphone-Based Device for Colorimetric Detection of MicroRNA Biomarkers Using Nanoparticle-Based Assay. *Sensors (Basel)*, 2021. **21**(23).
- [1356.] Popov, R., Process Development for Manufacturing Stochastic Peptide Microarrays. 2018, *Karlsruher Institut für Technologie (KIT)*.
- [1357.] Hancock, R. E., Chapple, D. S., Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. **43**(6): p. 1317-23.
- [1358.] Brogden, K. A., Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 2005. **3**(3): p. 238-50.
- [1359.] Vaara, M. und Siikanen, O., *et al.*, A novel polymyxin derivative that lacks the fatty acid tail and carries only three positive charges has strong synergism with agents excluded by the intact outer membrane. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010. **54**(8): p. 3341-6.
- [1360.] Zapotoczna, M. und Forde, É., *et al.*, Eradication of *Staphylococcus aureus* Biofilm Infections Using Synthetic Antimicrobial Peptides. *J Infect Dis*, 2017. **215**(6): p. 975-983.
- [1361.] Colagiorgi, A. und Festa, R., *et al.*, Rapid biofilm eradication of the antimicrobial peptide 1018-K6 against *Staphylococcus aureus*: A new potential tool to fight bacterial biofilms. *Food Control*, 2020. **107**: p. 106815.
- [1362.] Pokorny, A., Almeida, P. F., The Antibiotic Peptide Daptomycin Functions by Reorganizing the Membrane. *J Membr Biol*, 2021. **254**(1): p. 97-108.
- [1363.] Hussain, S. und Joo, J., *et al.*, Antibiotic-loaded nanoparticles targeted to the site of infection enhance antibacterial efficacy. *Nat Biomed Eng*, 2018. **2**(2): p. 95-103.
- [1364.] Hilpert, K. und Volkmer-Engert, R., *et al.*, High-throughput generation of small antibacterial peptides with improved activity. *Nat Biotechnol*, 2005. **23**(8): p. 1008-12.
- [1365.] Forschner, M., Konzeptionierung und Fertigung einer Apparatur zur Befüllung, Inkubation und Analyse von mikrostrukturbasierten Peptidarrays für High-throughput Screenings. 2018, *Karlsruher Institut für Technologie*.
- [1366.] Zoheir, A. E., Stress response and adaptive evolution of bacteria in microfluidic systems. 2020, *Karlsruher Institut für Technologie (KIT)*.
- [1367.] Zoheir, A. E. und Sobol, M. S., *et al.*, A genetically-encoded three-colour stress biosensor reveals multimodal response at single cell level and spatiotemporal dynamics of biofilms. *bioRxiv*, 2022: p. 2022.09.23.509207.
- [1368.] Battesti, A. und Majdalani, N., *et al.*, The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol*, 2011. **65**: p. 189-213.

- [1369.] Charoenwong, D. und Andrews, S., *et al.*, Role of *rpoS* in the development of cell envelope resilience and pressure resistance in stationary-phase *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2011. **77**(15): p. 5220-9.
- [1370.] Gayán, E. und Cambré, A., *et al.*, RpoS-independent evolution reveals the importance of attenuated cAMP/CRP regulation in high hydrostatic pressure resistance acquisition in *E. coli*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 8600.
- [1371.] Chen, A. I., Goulian, M., A network of regulators promotes dehydration tolerance in *Escherichia coli*. *Environ Microbiol*, 2018. **20**(3): p. 1283-1295.
- [1372.] Radman, M., SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Sci*, 1975. **5a**: p. 355-67.
- [1373.] Simmons, L. A. und Foti, J. J., *et al.*, The SOS Regulatory Network. *EcoSal Plus*, 2008. **3**(1).
- [1374.] Krishna, S. und Maslov, S., *et al.*, UV-Induced Mutagenesis in *Escherichia coli* SOS Response: A Quantitative Model. *PLoS Computational Biology*, 2007. **3**(3): p. e41.
- [1375.] Costa de Oliveira, R. und Laval, J., *et al.*, Induction of SOS and adaptive responses by alkylating agents in *Escherichia coli* mutants deficient in 3-methyladenine-DNA glycosylase activities. *Mutat Res*, 1987. **183**(1): p. 11-20.
- [1376.] Goerlich, O. und Quillardet, P., *et al.*, Induction of the SOS response by hydrogen peroxide in various *Escherichia coli* mutants with altered protection against oxidative DNA damage. *J Bacteriol*, 1989. **171**(11): p. 6141-7.
- [1377.] Higashitani, N. und Higashitani, A., *et al.*, SOS induction in *Escherichia coli* by single-stranded DNA of mutant filamentous phage: monitoring by cleavage of LexA repressor. *J Bacteriol*, 1995. **177**(12): p. 3610-2.
- [1378.] Straus, D. B. und Walter, W. A., *et al.*, The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of sigma 32. *Nature*, 1987. **329**(6137): p. 348-51.
- [1379.] Richmond, C. S. und Glasner, J. D., *et al.*, Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res*, 1999. **27**(19): p. 3821-35.
- [1380.] Taglicht, D. und Padan, E., *et al.*, An alkaline shift induces the heat shock response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1987. **169**(2): p. 885-7.
- [1381.] Kogoma, T., Yura, T., Sensitization of *Escherichia coli* cells to oxidative stress by deletion of the *rpoH* gene, which encodes the heat shock sigma factor. *J Bacteriol*, 1992. **174**(2): p. 630-2.
- [1382.] Bianchi, A. A., Baneyx, F., Hyperosmotic shock induces the sigma32 and sigmaE stress regulons of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 1999. **34**(5): p. 1029-38.
- [1383.] Newmark, K. G. und O'Reilly, E. K., *et al.*, Genetic analysis of the requirements for SOS induction by nalidixic acid in *Escherichia coli*. *Gene*, 2005. **356**: p. 69-76.
- [1384.] Maiques, E. und Ubeda, C., *et al.*, beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 2006. **188**(7): p. 2726-9.
- [1385.] Baharoglu, Z. und Krin, E., *et al.*, RpoS plays a central role in the SOS induction by sub-lethal aminoglycoside concentrations in *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet*, 2013. **9**(4): p. e1003421.
- [1386.] Bernier, S. P. und Lebeaux, D., *et al.*, Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin. *PLoS Genet*, 2013. **9**(1): p. e1003144.
- [1387.] Dapa, T. und Fleurier, S., *et al.*, The SOS and RpoS Regulons Contribute to Bacterial Cell Robustness to Genotoxic Stress by Synergistically Regulating DNA Polymerase Pol II. *Genetics*, 2017. **206**(3): p. 1349-1360.
- [1388.] Lorenz, E. N., Hama, K., The essence of chaos. *Pure and Applied Geophysics*, 1996. **147**(3): p. 598-599.
- [1389.] Gómez-Tamayo, J. C. und Codomí, A., *et al.*, Analysis of the interactions of sulfur-containing amino acids in membrane proteins. *Protein Science*, 2016. **25**(8): p. 1517-1524.
- [1390.] Zondlo, N. J., Aromatic-proline interactions: electronically tunable CH/π interactions. *Acc Chem Res*, 2013. **46**(4): p. 1039-49.
- [1391.] Tukey, J. W., Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. *Biometrics*, 1949. **5**(2): p. 99-114.
- [1392.] Liu, H. und Gaza-Bulsecu, G., *et al.*, Characterization of lower molecular weight artifact bands of recombinant monoclonal IgG₁ antibodies on non-reducing SDS-PAGE. *Biotechnology Letters*, 2007. **29**(11): p. 1611-1622.
- [1393.] Dunbar, J. und Yennawar, H. P., *et al.*, The effect of denaturants on protein structure. *Protein Sci*, 1997. **6**(8): p. 1727-33.
- [1394.] Stael, S. und Miller, L. P., *et al.*, Detection of Damage-Activated Metacaspase Activity/Activities by Western Blot in Plants, in *Plant Proteases and Plant Cell Death: Methods and Protocols*, M. Klemenčič, S. Stael, and P.F. Huesgen, Editors. 2022, Springer US: New York, NY. p. 127-137.
- [1395.] Schneider, C. A. und Rasband, W. S., *et al.*, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 2012. **9**(7): p. 671-675.
- [1396.] de Moreno, M. R. und Smith, J. F., *et al.*, Mechanism studies of coomassie blue and silver staining of proteins. *J Pharm Sci*, 1986. **75**(9): p. 907-11.
- [1397.] Ferrante, A. und Beard, L. J., *et al.*, IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. *Pediatr Infect Dis J*, 1990. **9**(8 Suppl): p. S16-24.
- [1398.] Siber, G. R. und Schur, P. H., *et al.*, Correlation between serum IgG-2 concentrations and the antibody response to bacterial polysaccharide antigens. *N Engl J Med*, 1980. **303**(4): p. 178-82.
- [1399.] Sause, W. E. und Copin, R., *et al.*, *Staphylococcus aureus* Strain Newman D2C Contains Mutations in Major Regulatory Pathways That Cripple Its Pathogenesis. *J Bacteriol*, 2017. **199**(24).
- [1400.] Smith, E. J. und Visai, L., *et al.*, The Sbi protein is a multifunctional immune evasion factor of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 2011. **79**(9): p. 3801-9.
- [1401.] Cheung, A. L. und Bayer, A. S., *et al.*, Analysis by gel electrophoresis, Western blot, and peptide mapping of protein A heterogeneity in *Staphylococcus aureus* strains. *Infect Immun*, 1987. **55**(4): p. 843-7.
- [1402.] Shakeri, F. und Shojai, A., *et al.*, Spa Diversity among MRSA and MSSA Strains of *Staphylococcus aureus* in North of Iran. *Int J Microbiol*, 2010. **2010**.
- [1403.] Cronin, U. P. und Girardeaux, L., *et al.*, Protein A-Mediated Binding of *Staphylococcus* spp. to Antibodies in Flow Cytometric Assays and Reduction of This Binding by Using Fc Receptor Blocking Reagent. *Appl Environ Microbiol*, 2020. **86**(17).

- [1404.] Lima, M. C. und de Barros, M., *et al.*, Profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from goat persistent mastitis before and after treatment with enrofloxacin. *BMC Microbiology*, 2020. **20**(1): p. 127.
- [1405.] Diaspro, A. und Chirico, G., *et al.*, Photobleaching, in *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*, J.B. Pawley, Editor. 2006, Springer US: Boston, MA. p. 690-702.
- [1406.] Roy, J. und Jain, N., *et al.*, Chapter 5 - Small RNA proteome as disease biomarker: An incognito treasure of clinical utility, in *AGO-Driven Non-Coding RNAs*, B. Mallick, Editor. 2019, Academic Press. p. 101-136.
- [1407.] Goodman, S. L., The antibody horror show: an introductory guide for the perplexed. *N Biotechnol*, 2018. **45**: p. 9-13.
- [1408.] Oyeyinka, G. O. und Salimonu, L. S., *et al.*, Range of normal serum immunoglobulin (IgG, IgA and IgM) values in Nigerians. *Afr J Med Med Sci*, 1984. **13**(3-4): p. 169-76.
- [1409.] Reynoso-Villalpando, G. L. und Sevillano-Collantes, C., *et al.*, ApoB/ApoA1 ratio and non-HDL-cholesterol/HDL-cholesterol ratio are associated to metabolic syndrome in patients with type 2 diabetes mellitus subjects and to ischemic cardiomyopathy in diabetic women. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición (English ed.)*, 2019. **66**(8): p. 502-511.
- [1410.] Meilhac, O. und Tanaka, S., *et al.*, High-Density Lipoproteins Are Bug Scavengers. *Biomolecules*, 2020. **10**(4): p. 598.
- [1411.] Miles, A. A. und Misra, S. S., *et al.*, The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hyg (Lond)*, 1938. **38**(6): p. 732-49.
- [1412.] Kardar, G. A. und Shams, S. H., *et al.*, Normal value of immunoglobulins IgA, IgG, and IgM in Iranian healthy adults, measured by nephelometry. *J Immunoassay Immunochem*, 2003. **24**(4): p. 359-67.
- [1413.] Nagaoka, S. und Murata, S., *et al.*, Antimicrobial activity of sodium citrate against *Streptococcus pneumoniae* and several oral bacteria. *Lett Appl Microbiol*, 2010. **51**(5): p. 546-51.
- [1414.] Gowin, E. und Wysocki, J., *et al.*, Does vaccination ensure protection? Assessing diphtheria and tetanus antibody levels in a population of healthy children: A cross-sectional study. *Medicine (Baltimore)*, 2016. **95**(49): p. e5571.
- [1415.] Schauer, U. und Stemberg, F., *et al.*, Levels of antibodies specific to tetanus toxoid, *Haemophilus influenzae* type b, and pneumococcal capsular polysaccharide in healthy children and adults. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003. **10**(2): p. 202-7.
- [1416.] Hedges, A. J., Estimating the precision of serial dilutions and viable bacterial counts. *Int J Food Microbiol*, 2002. **76**(3): p. 207-14.
- [1417.] Herigstad, B. und Hamilton, M., *et al.*, How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microbiol Methods*, 2001. **44**(2): p. 121-9.
- [1418.] Shima, H. und Nakayasu, M., *et al.*, Loss of the MYC gene amplified in human HL-60 cells after treatment with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase or with dimethyl sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(19): p. 7442-5.
- [1419.] Maheswaran, S. und Lee, H., *et al.*, Intracellular association of the protein product of the c-myc oncogene with the TATA-binding protein. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(2): p. 1147-52.
- [1420.] Lotz, S. und Aga, E., *et al.*, Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2. *J Leukoc Biol*, 2004. **75**(3): p. 467-77.
- [1421.] Furlaneto, C. J. und Ribeiro, F. P., *et al.*, Apolipoproteins A-I and A-II downregulate neutrophil functions. *Lipids*, 2002. **37**(9): p. 925-928.
- [1422.] Hamamoto, H. und Panthee, S., *et al.*, Serum apolipoprotein A-I potentiates the therapeutic efficacy of lysocin E against *Staphylococcus aureus*. *Nat Commun*, 2021. **12**(1): p. 6364.
- [1423.] Manz, R. A. und Löhning, M., *et al.*, Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. *Int Immunol*, 1998. **10**(11): p. 1703-11.
- [1424.] Pritz, T. und Lair, J., *et al.*, Plasma cell numbers decrease in bone marrow of old patients. *European Journal of Immunology*, 2015. **45**(3): p. 738-746.
- [1425.] Klein, U. und Rajewsky, K., *et al.*, Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med*, 1998. **188**(9): p. 1679-89.
- [1426.] Veneri, D. und Ortolani, R., *et al.*, Expression of CD27 and CD23 on peripheral blood B lymphocytes in humans of different ages. *Blood Transfus*, 2009. **7**(1): p. 29-34.
- [1427.] Perry, S. T. und Keogh, E., *et al.*, Single-cell Screening Method for the Selection and Recovery of Antibodies with Desired Specificities from Enriched Human Memory B Cell Populations. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 2019(150): p. e59809.
- [1428.] Agematsu, K., Memory B cells and CD27. *Histol Histopathol*, 2000. **15**(2): p. 573-6.
- [1429.] Ettinger, R. und Sims, G. P., *et al.*, IL-21 Induces Differentiation of Human Naive and Memory B Cells into Antibody-Secreting Plasma Cells1. *The Journal of Immunology*, 2005. **175**(12): p. 7867-7879.
- [1430.] Agematsu, K. und Nagumo, H., *et al.*, Generation of Plasma Cells From Peripheral Blood Memory B Cells: Synergistic Effect of Interleukin-10 and CD27/CD70 Interaction. *Blood*, 1998. **91**(1): p. 173-180.
- [1431.] Sanz, I. und Wei, C., *et al.*, Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. *Frontiers in Immunology*, 2019. **10**.
- [1432.] Perez-Andres, M. und Grosserichter-Wagener, C., *et al.*, The nature of circulating CD27+CD43+ B cells. *J Exp Med*, 2011. **208**(13): p. 2565-6.
- [1433.] Ribot, J. C. und deBarros, A., *et al.*, CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon- γ - and interleukin 17-producing $\gamma\delta$ T cell subsets. *Nature Immunology*, 2009. **10**(4): p. 427-436.
- [1434.] van Putten, W. L. und de Vries, W., *et al.*, Quantification of fluorescence properties of lymphocytes in peripheral blood mononuclear cell suspensions using a latent class model. *Cytometry*, 1993. **14**(1): p. 86-96.
- [1435.] von Bojničić-Kninski, C., Entwicklung von optischen Systemen für die kombinatorische Materialablagerung und die großflächige Detektion im Rahmen von Hochdurchsatzverfahren. 2018, *Karlsruher Institut für Technologie (KIT)*.
- [1436.] Orzechowska, A. und Fiedor, J., *et al.*, Light Energy Driven Nanocommunications With FRET in Photosynthetic Systems. *IEEE Access*, 2021. **9**: p. 44490-44501.
- [1437.] Wenzel, M. und Chiriac, A. I., *et al.*, Small cationic antimicrobial peptides delocalize peripheral membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014. **111**(14): p. E1409-E1418.

- [1438.] Qi, X. und Zhou, C., *et al.*, Novel short antibacterial and antifungal peptides with low cytotoxicity: Efficacy and action mechanisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010. **398**(3): p. 594-600.
- [1439.] P. Candeias, L. und P. S. MacFarlane, D., *et al.*, The catalysed NADH reduction of resazurin to resorufin. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1998(11): p. 2333-2334.
- [1440.] Fecteau, J. F. und Côté, G. v., *et al.*, A New Memory CD27-IgG+ B Cell Population in Peripheral Blood Expressing VH Genes with Low Frequency of Somatic Mutation¹. *The Journal of Immunology*, 2006. **177**(6): p. 3728-3736.
- [1441.] Blink, E. J. und Light, A., *et al.*, Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization. *Journal of Experimental Medicine*, 2005. **201**(4): p. 545-554.
- [1442.] Inamine, A. und Takahashi, Y., *et al.*, Two waves of memory B-cell generation in the primary immune response. *Int Immunol*, 2005. **17**(5): p. 581-9.
- [1443.] Dörner, T., Radbruch, A., Selecting B cells and plasma cells to memory. *J Exp Med*, 2005. **201**(4): p. 497-9.
- [1444.] Lens, S. M. A. und Tesselaar, K., *et al.*, Control of lymphocyte function through CD27-CD70 interactions. *Seminars in Immunology*, 1998. **10**(6): p. 491-499.
- [1445.] Borst, J. und Hendriks, J., *et al.*, CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. *Current Opinion in Immunology*, 2005. **17**(3): p. 275-281.
- [1446.] Nolte, M. A. und Arens, R., *et al.*, Immune activation modulates hematopoiesis through interactions between CD27 and CD70. *Nature Immunology*, 2005. **6**(4): p. 412-418.
- [1447.] Ehrhardt, G. R. und Hsu, J. T., *et al.*, Expression of the immunoregulatory molecule FcRH4 defines a distinctive tissue-based population of memory B cells. *J Exp Med*, 2005. **202**(6): p. 783-91.
- [1448.] Sachinidis, A., Garyfallos, A., Double Negative (DN) B cells: A connecting bridge between rheumatic diseases and COVID-19? *Mediterr J Rheumatol*, 2021. **32**(3): p. 192-199.
- [1449.] Farris, A. D., Guthridge, J. M., Overlapping B cell pathways in severe COVID-19 and lupus. *Nature Immunology*, 2020. **21**(12): p. 1478-1480.
- [1450.] Huesca, M. und Sun, Q., *et al.*, Synthetic peptide immunogens elicit polyclonal and monoclonal antibodies specific for linear epitopes in the D motifs of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein, which are composed of amino acids that are essential for fibronectin binding. *Infect Immun*, 2000. **68**(3): p. 1156-63.
- [1451.] Jahnsen, F. L. und Bækkevold, E. S., *et al.*, Do Long-Lived Plasma Cells Maintain a Healthy Microbiota in the Gut? *Trends Immunol*, 2018. **39**(3): p. 196-208.
- [1452.] Cooper, A., Ton, J., Immune priming in plants: from the onset to transgenerational maintenance. *Essays Biochem*, 2022. **66**(5): p. 635-646.
- [1453.] Daxinger, L., Whitelaw, E., Transgenerational epigenetic inheritance: more questions than answers. *Genome Res*, 2010. **20**(12): p. 1623-8.
- [1454.] Xu, G. J. und Kula, T., *et al.*, Viral immunology. Comprehensive serological profiling of human populations using a synthetic human virome. *Science*, 2015. **348**(6239): p. aaa0698.
- [1455.] Heckmann, J., Charakterisierung eines humanen Antikörpers gerichtet gegen das extrazelluläre Matrixbindepotein von *Staphylococcus aureus*. 2022, *Karlsruher Institut für Technologie*.
- [1456.] Silverman, G. J., Lucas, A. H., Variable region diversity in human circulating antibodies specific for the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. Preferential usage of two types of VH3 heavy chains. *J Clin Invest*, 1991. **88**(3): p. 911-20.
- [1457.] Adderson, E. E. und Shackelford, P. G., *et al.*, Restricted Ig H chain V gene usage in the human antibody response to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide. *J Immunol*, 1991. **147**(5): p. 1667-74.
- [1458.] Huang, D. F. und Olee, T., *et al.*, Sequence analyses of three immunoglobulin G anti-virus antibodies reveal their utilization of autoantibody-related immunoglobulin Vh genes, but not V lambda genes. *J Clin Invest*, 1992. **90**(6): p. 2197-208.
- [1459.] Tranchemontagne, Z. R. und Camire, R. B., *et al.*, *Staphylococcus aureus* Strain USA300 Perturbs Acquisition of Lysosomal Enzymes and Requires Phagosomal Acidification for Survival inside Macrophages. *Infect Immun*, 2016. **84**(1): p. 241-53.
- [1460.] White, M. J. und Boyd, J. M., *et al.*, Phosphatidylinositol-specific phospholipase C contributes to survival of *Staphylococcus aureus* USA300 in human blood and neutrophils. *Infect Immun*, 2014. **82**(4): p. 1559-71.
- [1461.] Boyle-Vavra, S. und Li, X., *et al.*, USA300 and USA500 clonal lineages of *Staphylococcus aureus* do not produce a capsular polysaccharide due to conserved mutations in the cap5 locus. *mBio*, 2015. **6**(2).
- [1462.] Grundmeier, M. und Hussain, M., *et al.*, Truncation of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* strain Newman leads to deficient adherence and host cell invasion due to loss of the cell wall anchor function. *Infect Immun*, 2004. **72**(12): p. 7155-63.
- [1463.] Giraudo, A. T. und Cheung, A. L., *et al.*, The sae locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Archives of Microbiology*, 1997. **168**(1): p. 53-58.
- [1464.] van den Honert, M. S. und Gouws, P. A., *et al.*, A Preliminary Study: Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from the Meat and Feces of Various South African Wildlife Species. *Food Sci Anim Resour*, 2021. **41**(1): p. 135-144.
- [1465.] Chandra, A., Optimization of parameters for ELISA of BSA-conjugated Emp peptides and anti-Emp antibody present in human serum. 2021, *Karlsruher Institut für Technologie*.
- [1466.] VanderVen, B. C. und Yates, R. M., *et al.*, Intraphagosomal Measurement of the Magnitude and Duration of the Oxidative Burst. *Traffic*, 2009. **10**(4): p. 372-378.
- [1467.] Siegrist, C. A., Aspinall, R., B-cell responses to vaccination at the extremes of age. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(3): p. 185-94.
- [1468.] Nielsen, S. C. A. und Roskin, K. M., *et al.*, Shaping of infant B cell receptor repertoires by environmental factors and infectious disease. *Sci Transl Med*, 2019. **11**(481).
- [1469.] Knolle, J. und Pierau, M., *et al.*, Children From the Age of Three Show a Developmental Switch in T-Cell Differentiation. *Frontiers in Immunology*, 2020. **11**.
- [1470.] Calander, A.-M. und Dubin, G., *et al.*, *Staphylococcus aureus* infection triggers production of neutralizing, V8 protease-specific antibodies. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2008. **52**(2): p. 267-272.

- [1471.] Glass, D. B. und Cheng, H.-C., *et al.*, Primary structural determinants essential for potent inhibition of cAMP-dependent protein kinase by inhibitory peptides corresponding to the active portion of the heat-stable inhibitor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 1989. **264**(15): p. 8802-8810.
- [1472.] Bhullar, K. S. und Lagarón, N. O., *et al.*, Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Molecular Cancer*, 2018. **17**(1): p. 48.
- [1473.] Palmer, J. L., Nisonoff, A., Reduction and Reoxidation of a Critical Disulfide Bond in the Rabbit Antibody Molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 1963. **238**(7): p. 2393-2398.
- [1474.] Jocelyn, P., Biochemistry of the SH Group. The Occurrence, Chemical Properties, Metabolism and Biological Function of Thiols and Disulfides, pp. 94-115. 1972: *Academic Press, New*.
- [1475.] Koniev, O., Wagner, A., Developments and recent advancements in the field of endogenous amino acid selective bond forming reactions for bioconjugation. *Chemical Society Reviews*, 2015. **44**(15): p. 5495-5551.
- [1476.] Laemmli, U. K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
- [1477.] Kang, D.-H. und Gho, Y.-S., *et al.*, Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2002. **23**(11): p. 1511-1512.
- [1478.] Renart, J. und Reiser, J., *et al.*, Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(7): p. 3116-20.
- [1479.] Towbin, H. und Staehelin, T., *et al.*, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
- [1480.] Burnette, W. N., "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 1981. **112**(2): p. 195-203.
- [1481.] Salinovich, O., Montelaro, R. C., Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 1986. **156**(2): p. 341-347.
- [1482.] Nair, D. P. und Podgórski, M., *et al.*, The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry. *Chemistry of Materials*, 2014. **26**(1): p. 724-744.
- [1483.] Szymczak, L. C. und Kuo, H. Y., *et al.*, Peptide Arrays: Development and Application. *Anal Chem*, 2018. **90**(1): p. 266-282.
- [1484.] Palermo, A. und Thelen, R., *et al.*, Vertical Scanning Interferometry for Label-Free Detection of Peptide-Antibody Interactions. *High Throughput*, 2019. **8**(2).
- [1485.] Oliver, C., Jamur, M. C., Immunocytochemical methods and protocols. 2010: *Springer*.
- [1486.] Coons, A. H., The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody. *The Journal of Immunology*, 1942. **45**(3): p. 159.
- [1487.] Mahmood, T., Yang, P.-C., Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 2012. **4**(9): p. 429.
- [1488.] Pogliano, K. und Harry, E., *et al.*, Visualization of the subcellular location of sporulation proteins in *Bacillus subtilis* using immunofluorescence microscopy. *Molecular Microbiology*, 1995. **18**(3): p. 459-470.
- [1489.] Wessel, D., Flügge, U. I., A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*, 1984. **138**(1): p. 141-3.
- [1490.] Shevchenko, A. und Tomas, H., *et al.*, In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, 2006. **1**(6): p. 2856-2860.
- [1491.] Livesay, E. A. und Tang, K., *et al.*, Fully automated four-column capillary LC-MS system for maximizing throughput in proteomic analyses. *Anal Chem*, 2008. **80**(1): p. 294-302.
- [1492.] Karpievitch, Y. V. und Polpitiya, A. D., *et al.*, Liquid Chromatography Mass Spectrometry-Based Proteomics: Biological and Technological Aspects. *Ann Appl Stat*, 2010. **4**(4): p. 1797-1823.
- [1493.] Hust, M. und Dübel, S., *et al.*, Selection of recombinant antibodies from antibody gene libraries. *Methods Mol Biol*, 2007. **408**: p. 243-55.
- [1494.] Hust, M. und Steinwand, M., *et al.*, Improved microtitre plate production of single chain Fv fragments in *Escherichia coli*. *N Biotechnol*, 2009. **25**(6): p. 424-8.
- [1495.] Hust, M. und Meyer, T., *et al.*, A human scFv antibody generation pipeline for proteome research. *Journal of Biotechnology*, 2011. **152**(4): p. 159-170.
- [1496.] Rondot, S. und Koch, J., *et al.*, A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nature Biotechnology*, 2001. **19**(1): p. 75-78.
- [1497.] Schütte, M. und Thullier, P., *et al.*, Identification of a Putative Crf Splice Variant and Generation of Recombinant Antibodies for the Specific Detection of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One*, 2009. **4**(8): p. e6625.
- [1498.] Mollova, S. und Retter, I., *et al.*, Analysis of Single Chain Antibody Sequences Using the VBASE2 Fab Analysis Tool, in *Antibody Engineering*. 2010, *Springer*. p. 3-10.
- [1499.] Collins, S. J. und Gallo, R. C., *et al.*, Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature*, 1977. **270**(5635): p. 347-349.
- [1500.] Vierordt, K. v., Neue Methode der quantitativen mikroskopischen Analyse des Blutes. *Arch. physiol. Heilk.*, 1852. **11**: p. 26-46.
- [1501.] Ehrlich, P., u. K. Shiga: Farbtherapeutische Versuche bei Trypanosomenerkrankung. Berlin. *Klin. Wochenschr*, 1904. **41**(329): p. 362.
- [1502.] Tennant, J. R., Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation*, 1964. **2**(6).
- [1503.] Blair, O. C. und Carbone, R., *et al.*, Differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells: simultaneous determination of phagocytic activity and cell cycle distribution by flow cytometry. *Cytometry*, 1986. **7**(2): p. 171-7.
- [1504.] Dittrich, W., Gohde, W., Flow-through chamber for photometers to measure and count particles in a dispersion medium. 1973, *USPTO: USA*.
- [1505.] Hedin, S., Über die Permeabilität der Blutkörperchen. *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 1897. **68**(5): p. 229-338.

- [1506.] Chernyshev, A. V. und Tarasov, P. A., *et al.*, Erythrocyte lysis in isotonic solution of ammonium chloride: Theoretical modeling and experimental verification. *Journal of Theoretical Biology*, 2008. **251**(1): p. 93-107.
- [1507.] Heitzmann, H., Richards, F. M., Use of the avidin-biotin complex for specific staining of biological membranes in electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1974. **71**(9): p. 3537-41.
- [1508.] Rao, S. V. und Anderson, K. W., *et al.*, Determination of the Extent of Protein Biotinylation by Fluorescence Binding Assay. *Bioconjugate Chemistry*, 1997. **8**(1): p. 94-98.
- [1509.] Ault, K. A. und Antin, J. H., *et al.*, Phenotype of recovering lymphoid cell populations after marrow transplantation. *J Exp Med*, 1985. **161**(6): p. 1483-502.
- [1510.] Forbes, B. A. und Sahm, D. F., *et al.*, Diagnostic microbiology. 2007: *Mosby St Louis*.
- [1511.] Elder, B. L. und Boraker, D. K., *et al.*, Whole-bacterial cell enzyme-linked immunosorbent assay for *Streptococcus sanguis* fimbrial antigens. *J Clin Microbiol*, 1982. **16**(1): p. 141-4.
- [1512.] Zantl, R., Horn, E., Sample chamber with parting plate. 2016, *Google Patents*.
- [1513.] Monod, J., The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 1949. **3**(1): p. 371-394.
- [1514.] Wiegand, I. und Hilpert, K., *et al.*, Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 2008. **3**(2): p. 163-175.
- [1515.] Berditsch, M. und Lux, H., *et al.*, Therapeutic Potential of Gramicidin S in the Treatment of Root Canal Infections. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2016. **9**(3).
- [1516.] Clinical, Institute, L. S., Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2017: *Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA*.
- [1517.] Dautel, S., Makrophotographischer Nachweis von biolumineszenten und fluoreszent gefärbten Bakterien in mikrostrukturierten Trägern. 2019, *Karlsruher Institut für Technologie*.
- [1518.] Kalaji, H. M. und Schansker, G., *et al.*, Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynth Res*, 2017. **132**(1): p. 13-66.
- [1519.] Hooke, R., Robert Hooke's Micrographia of 1665 and 1667. *JR Coll Physicians Edinb*, 2010. **40**: p. 374-6.
- [1520.] Roth, B. L. und Millard, P. J., *et al.*, Fluorescent assay for bacterial gram reaction. 1996, *USPTO: USA*.
- [1521.] Deng, Y. und Wang, L., *et al.*, Optimization of staining with SYTO 9/propidium iodide: interplay, kinetics and impact on *Brevibacillus brevis*. *BioTechniques*, 2020. **69**(2): p. 88-98.
- [1522.] Millard, P. J. und Roth, B. L., *et al.*, Fluorescent viability assay using cyclic-substituted unsymmetrical cyanine dyes. 1996, *USPTO: USA*.
- [1523.] Guillier, F. und Orain, D., *et al.*, Linkers and cleavage strategies in solid-phase organic synthesis and combinatorial chemistry. *Chem Rev*, 2000. **100**(6): p. 2091-158.
- [1524.] Mattes, D. S., Synthese von Peptiden, Peptoiden und Protein-ähnlichen Strukturen im μ Arrayformat. 2018, *Karlsruher Institut für Technologie (KIT)*.
- [1525.] Missiakas, D. M., Schneewind, O., Growth and laboratory maintenance of *Staphylococcus aureus*. *Curr Protoc Microbiol*, 2013. **Chapter 9**: p. Unit 9C.1.
- [1526.] Porath, J., Flodin, P., Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature*, 1959. **183**(4676): p. 1657-9.
- [1527.] DIN EN ISO 6887-1:2017-07 Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen - Teil 1: Allgemeine Regeln für die Herstellung von Erstverdünnungen und Dezimalverdünnungen; Deutsche Fassung
- [1528.] Reed, R. W., Reed, G. B., "Drop Plate" method of counting viable bacteria. *Canadian Journal of Research*, 1948. **26e**(6): p. 317-326.
- [1529.] Kimani, S. M., Moratti, S. C., Synthesis of Five-Arm Star Polymers with an Inositol Core by Atom Transfer Radical Polymerisation at Ambient Temperature. *Macromolecular Rapid Communications*, 2006. **27**(22): p. 1887-1893.
- [1530.] Stadler, V. und Kirmse, R., *et al.*, PEGMA/MMA copolymer graftings: generation, protein resistance, and a hydrophobic domain. *Langmuir*, 2008. **24**(15): p. 8151-7.
- [1531.] Schirwitz, C., Purification of peptides in high-complexity arrays. 2012, *Universität Heidelberg*.
- [1532.] Striffler, J., Replikation von μ -Peptidarrays. 2014, *Karlsruher Institut für Technologie*.
- [1533.] Loeffler, F. F. und Foertsch, T. C., *et al.*, High-flexibility combinatorial peptide synthesis with laser-based transfer of monomers in solid matrix material. *Nature Communications*, 2016. **7**(1): p. 11844.
- [1534.] Terpilowski, K., Rymuszka, D., Surface properties of glass plates activated by air, oxygen, nitrogen and argon plasma. *Glass Physics and Chemistry*, 2016. **42**(6): p. 535-541.
- [1535.] Molchanov, V. S., Prikhid'ko, N. E., Corrosion of silicate glasses by alkaline solutions Communication 4. Corrosion of glasses by solutions of various hydroxides. *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR, Division of chemical science*, 1958. **7**(8): p. 893-897.
- [1536.] Park, S.-J., Jung, W.-Y., KOH activation and characterization of glass fibers-supported phenolic resin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003. **265**(2): p. 245-250.
- [1537.] Jönsson, U. und Olofsson, G., *et al.*, Chemical vapour deposition of silanes. *Thin Solid Films*, 1985. **124**(2): p. 117-123.

11 Bilderlizenzen

[a] <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>

[b] Lizenznummer 5504740918558 (erworben über *RightsLink* am 09.03.2023)

[c] <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.de>

[d] <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/deed.de>

12 Anhang

12.1 Publikationen und Konferenzbeiträge

- 1/2024 Portable dielectrophoresis for biology: ADEPT facilitates cell trapping, separation, and interactions
Publikation akzeptiert, DOI wird noch vergeben
Co-Autor
- 9/2023 Investigation of the antiadhesive properties of biomimetic titanium nanostructures in fluidic flow
DOI : 10.1515/cdbme-2023-1180
Co-Autor
- 9/2023 *Fabrication of biomimetic antibacterial titanium surfaces by hydrothermal oxidation* DOI : 10.1515/cdbme-2023-1178
Co-Autor
- 10/2021 *Ubiquitous anti-S. aureus antibody*
Präsentation
URI 2021
- 11/2020 *Polyaramid-Based Flexible Antibacterial Coatings Fabricated Using Laser-Induced Carbonization and Copper Electroplating*
DOI: 10.1021/acsami.0c13058
Co-Autor
- 9/2020 Patientenantikörper als Informationsquelle
DOI: 10.1007/s12268-020-1440-0
Autor
- 05/2017 *Characterization of Phormidium strains from the North Sea and the Mediterranean Sea for biotechnological applications*
DOI: 10.1016/j.procbio.2017.05.015
Co-Autor

12.2 Danksagungen

In dieser Widmung möchte ich allen Personen danken, ohne welche die Durchführung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre. Besonderen Dank gilt hierbei Prof. Dr. Breitling und Prof. Dr. Lamparter für die Themenstellung und die wissenschaftliche Begleitung durch dieses sehr umfangreiche Forschungsgebiet.

Ein großer Dank gilt allen Kooperationspartnern, welche dieses Projekt unterstützt haben. Dr. Bischoff und Jürgen Kretschmer möchte ich für die sehr lehrreiche Zeit in der Abteilung der funktionalen Genomanalyse am DKFZ und der großartigen wissenschaftlichen Unterstützung danken. Mein besonderer Dank gilt auch der Abteilung für medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Heidelberg. Ohne die dort verfügbare Infrastruktur und zur Verfügung gestellten Ressourcen sowie das große Repertoire an klinischen Bakterienstämmen wäre die Durchführung dieser Dissertation nicht möglich gewesen. Aus dem Team dieser Abteilung möchte ich besonders Dr. Nurjadi, Dr. Hildebrand und Aline Sähr danken, welche mich und meine Experimente durch Wissen und Erfahrung unterstützt haben. Weiterer Dank gilt Herrn Yepes aus dem Institut für Instrumentelle Analytik und Bioanalytik an der Hochschule Mannheim für die massenspektrometrische Analyse des Anti-**Emp** Antikörpers. Vielen Dank auch an Dr. Fülöp für die Auskunft über die technischen Details der verwendeten Geräte. Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Hust, Stephan Steinke und Saskia Polten aus der Abteilung für medizinische Biotechnologie an der technischen Universität in Braunschweig für die Durchführung des Phagen-Displays bedanken. Dem Team des Instituts für biologische Grenzflächen 1 am KIT möchte ich für die Bereitstellung der Labore und wissenschaftliche Hilfe danken. Speziellen Dank gilt hierbei Dr. Zoheir für Bereitstellung des *RGB-S* Reporters. Ebenso möchte ich Dr. Babii aus dem Team des Instituts für biologische Grenzflächen 2 für die Bereitstellung von technischer Hilfe in der Durchführung von mikrobiologischen Versuchen danken. Vielen Dank auch an die *PEPperPRINT* GmbH, welche die für das Projekt nötige Peptid-Mikroarrays und die zur Analyse notwendige Software zur Verfügung gestellt hat. Vielen Dank hierbei auch an Dr. Felgenhauer für die Bereitstellung der zur Auswertung notwendigen Masken.

Ich möchte mich bei den Organisatoren der *BioInterfaces International Graduate School* bedanken. Die Kursangebote und die Vernetzung, welche ich durch die Teilnahme erhalten habe, waren sehr wertvoll. Ein besonderer Dank hierbei gilt meinem *Thesis Advisory Committee*, Prof. Dr. Breitling, Prof. Dr. Lamparter und Dr. Rabe für die Begleitung meiner Dissertation.

Während der Dissertation habe ich die Arbeit von vielen Studenten begleitet und wurde tatkräftig von Hilfswissenschaftlern unterstützt. Mein Dank gilt hierbei Annika Fischer, Ayan Chandra, Gero Käser, Hannah Altenbach, Helen Abeln, Ivana Ladan, Jessica Heckman und Stefanie Dautel.

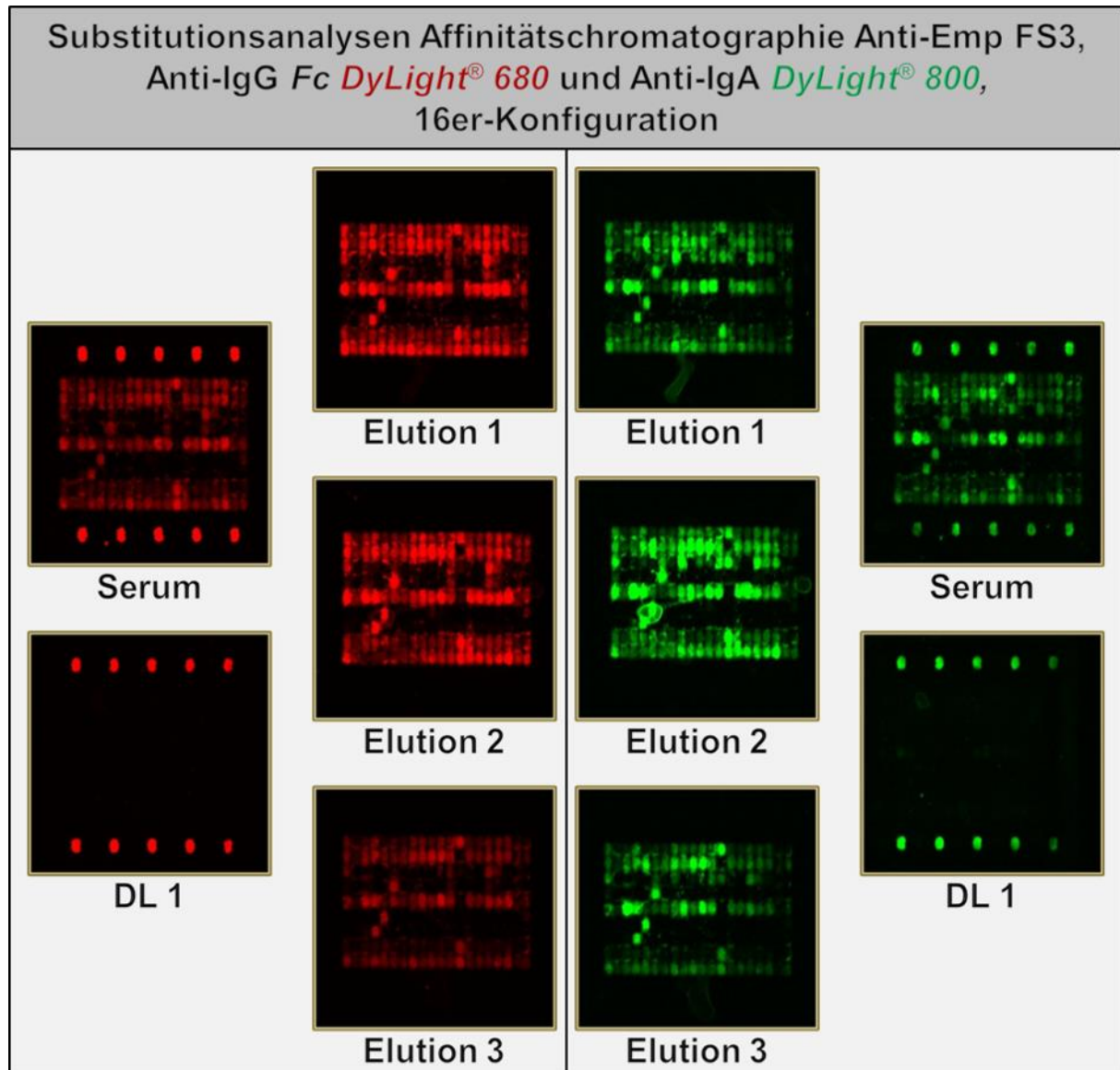
Meine Kollegen und Mitdoktoranden am Institut für Mikrostrukturtechnik, insbesondere der Arbeitsgruppe Breitling, möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen. Sie haben mich in fünf Jahren gemeinsamer Zusammenarbeit begleitet und haben meine Zeit am Institut zu einer sehr erinnerungswürdigen und angenehmen Erfahrung gemacht. Insbesondere möchte ich mich hierbei bei Dr. Daniela Mattes und Dr. Laura Weber für die wissenschaftliche Unterstützung, vor allem in der Anfangszeit, bedanken. Die wissenschaftliche Arbeit von Dr. Weber und Frau Rentschler haben die Grundlage für diese Dissertation geschaffen und dies gebührt besonderen Dank. Vielen Dank speziell an Dr. Andreas Klinkusch, Dr. Clemens von Bojničić-Kninski, Dr. Daniela Mattes, Dr. Laura Weber, Dr. Zekun Zhou, Anna Zakhurdaeva, Julia Schulte-Hermann und Karin Herbst für die Zusammenarbeit und technische Unterstützung im Rahmen der Dissertation.

Besonderen Dank gilt den Personen, die sich bereit erklärt haben die Korrekturlesung der Doktorarbeit zu übernehmen. Vielen Dank an Dr. Benjamin Bitterer, Dr. Tobias Bantle, Dr. Zekun Zhou, Chaoyu Wu, Clarine Gedigk, Julia Schulte-Hermann und Martin Schäfer.

Vielen Dank an meinen Bruder für die Hilfe in der Bedienung der Software *Statistical Analysis Software Enterprise Guide*.

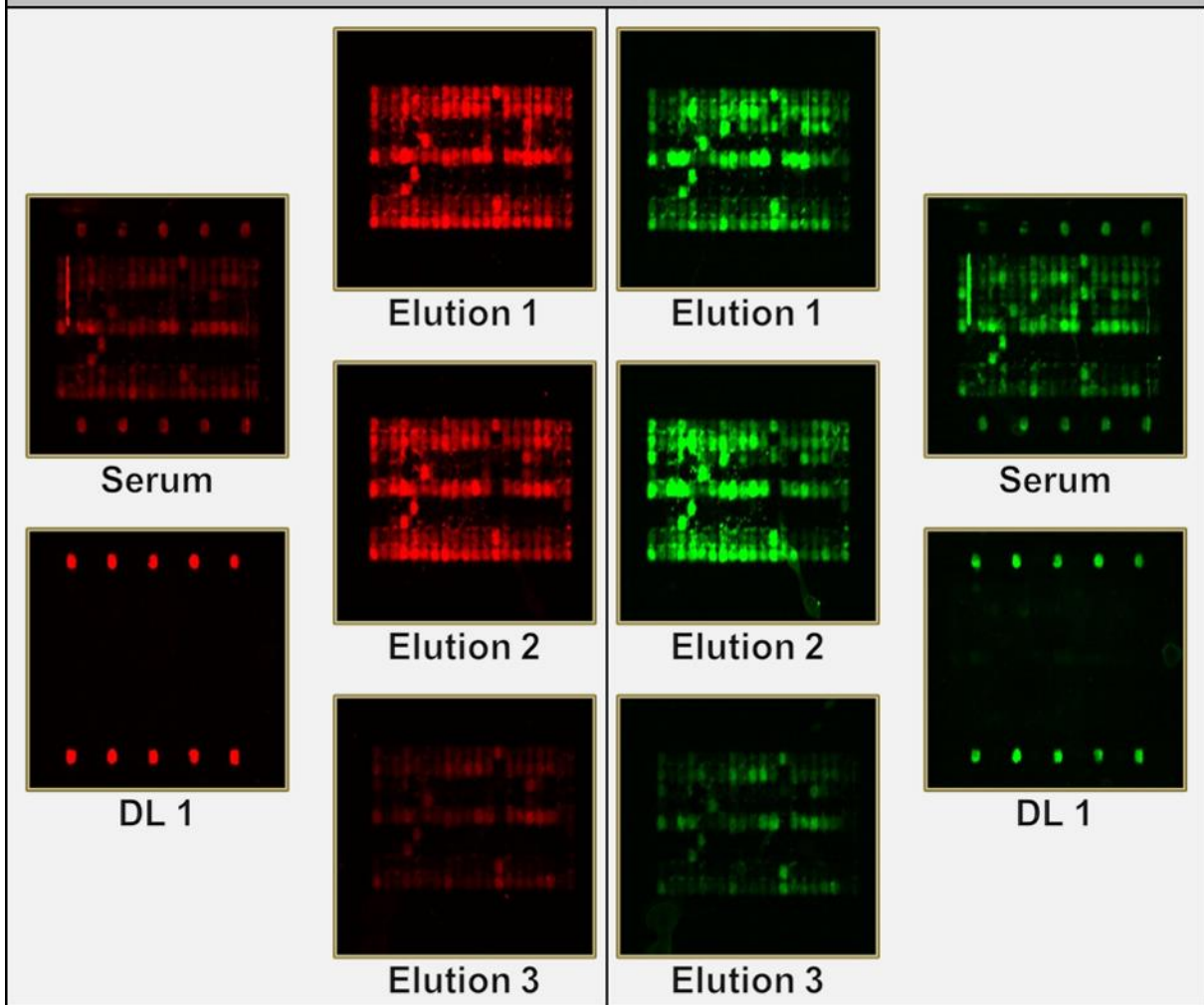
Der größte Dank gilt meiner Familie. Die Dissertation hat sich im Verlauf dieser fünf Jahren in ein Megaprojekt verwandelt, welches sehr viel Zeit und Ressourcen verlangt hat. Vielen Dank an meine Frau und meine Kinder, welche mich durch diese fordernde Zeit begleitet und Motivation gespendet haben.

12.3 Anlagen

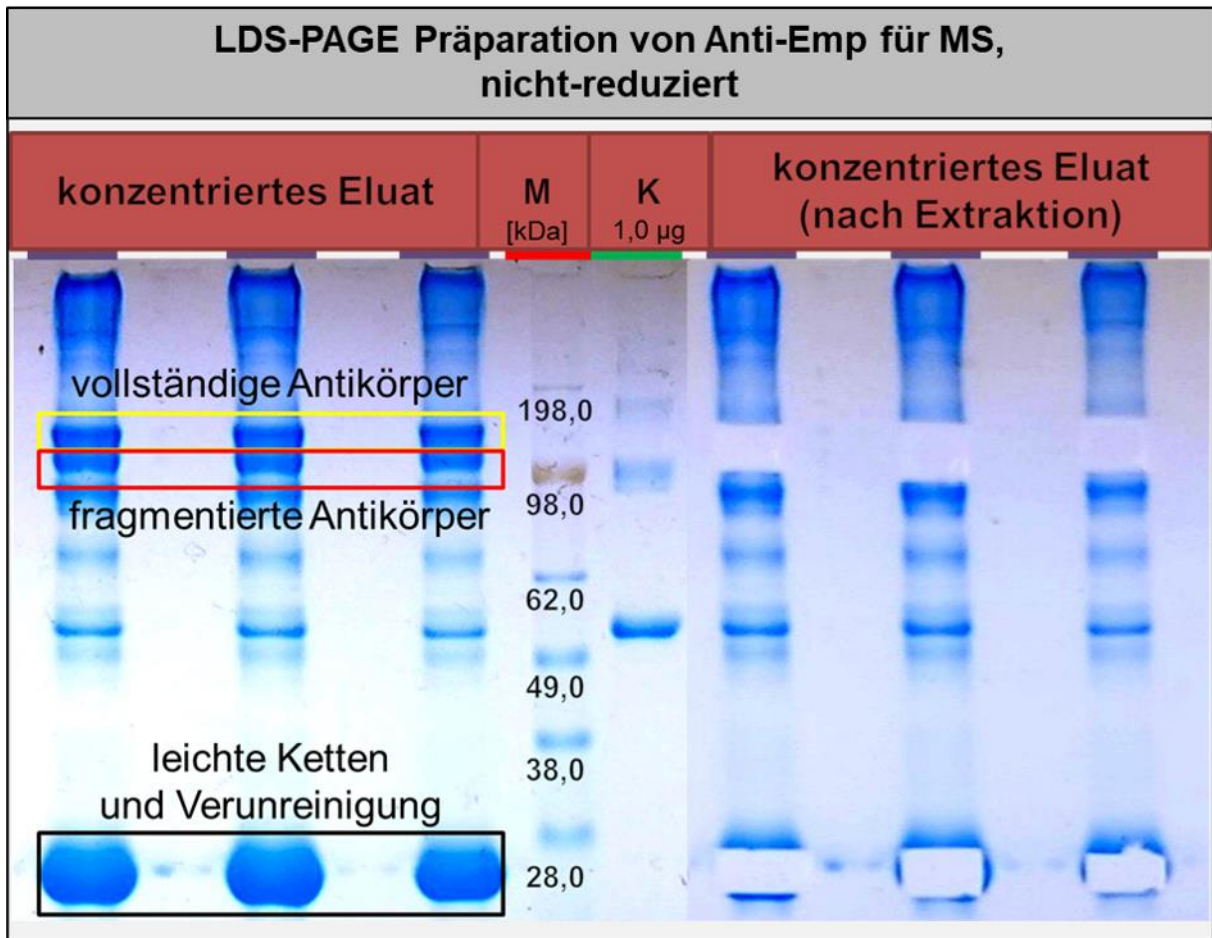


Anlage 1: Alle Proben für die Primärfärbung sind in einem Verhältnis von 1:500 verdünnt. Die beiden Sekundärantikörper werden mit einem Verdünnungsfaktor von 1:5000 aufgetragen. Färbungen gegen **IgG** sind links und gegen **IgA** rechts abgebildet. Die Substitutionsanalysen sind in Falschfarben dargestellt und Helligkeit sowie Kontrast sind optimiert.

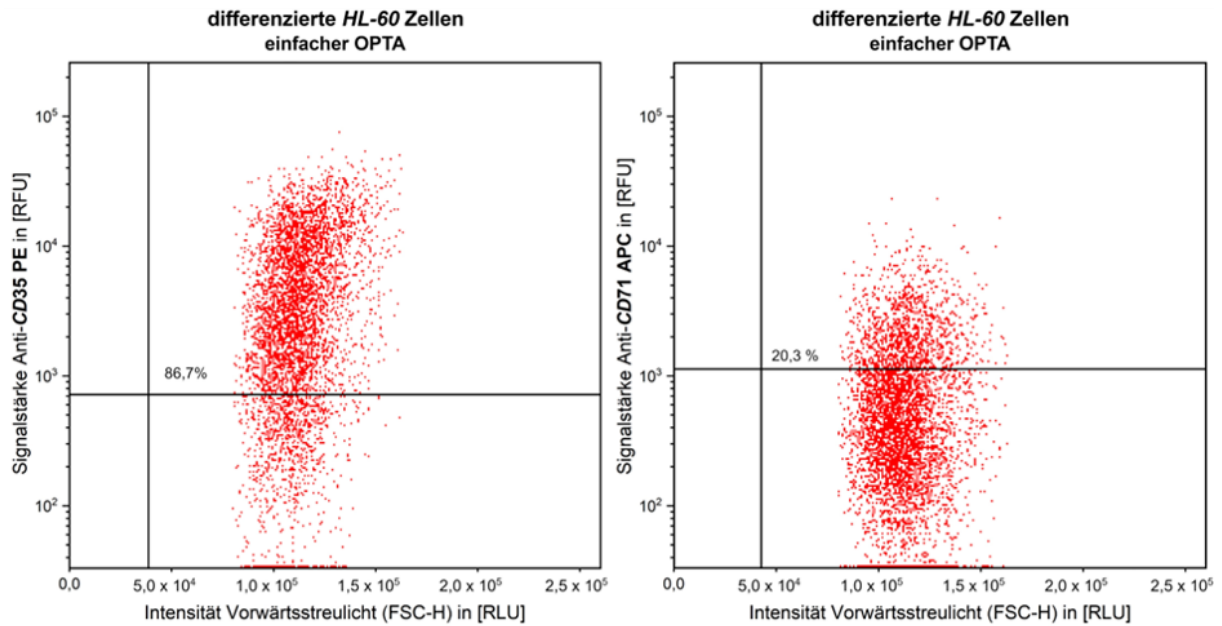
Substitutionsanalysen Affinitätschromatographie Anti-Emp FS4,
 Anti-IgG Fc *DyLight*[®] 680 und Anti-IgA *DyLight*[®] 800,
 16er-Konfiguration



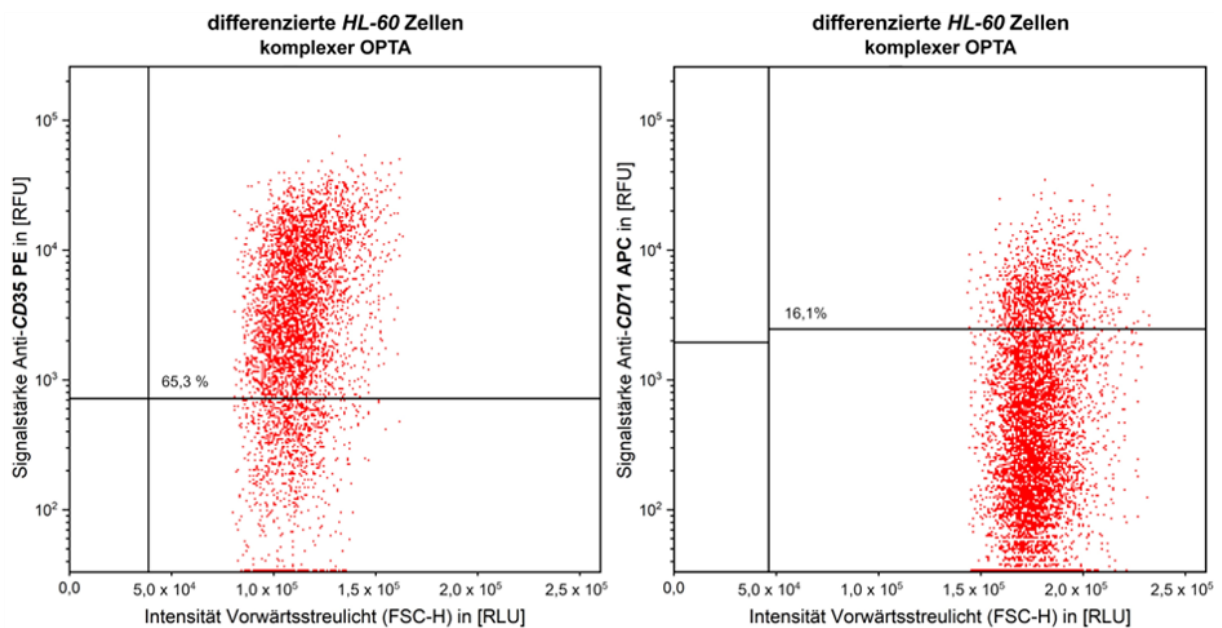
Anlage 2: Alle Proben für die Primärfärbung sind in einem Verhältnis von 1:500 verdünnt. Die beiden Sekundärantikörper werden mit einem Verdünnungsfaktor von 1:5000 aufgetragen. Färbungen gegen **IgG** sind links und gegen **IgA** rechts abgebildet. Die Substitutionsanalysen sind in Falschfarben dargestellt und Helligkeit sowie Kontrast sind optimiert.



Anlage 3: Nicht-reduzierende LDS-PAGE von konzentriertem Eluat aus einer Affinitätschromatographie von FS2 nach einer *Coomassie*[®]-Brillant-Blau-Färbung. Alle Proben werden in einem Volumen von 2,0 µL aufgetragen. Zusätzlich zu den Proben werden 1,0 µg **BSA** und ein Marker für Proteingrößen als Kontrollen verwendet. Links ist das Gel vor und rechts nach der Extraktion von Gelfragmenten abgebildet. Helligkeit und Kontrast der Abbildung sind optimiert.

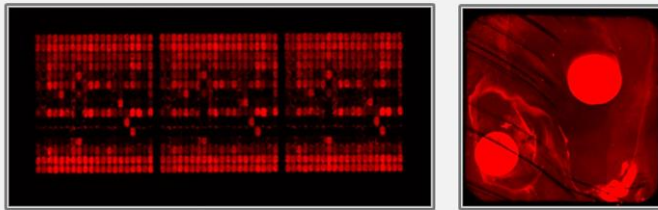


Anlage 4: Ergebnisse der *FACS* nach *Gating* zur Bestimmung des Anteils von *HL-60* Zellen, welche an ihrer Oberfläche **CD35** oder **CD71** präsentieren. Durch die Daten kann die Bereitschaft der Phagozytose aus einem Gemisch von differenzierten *HL-60* Zellen vor dem einfachen OPTA bestimmt werden.



Anlage 5: Ergebnisse der *FACS* nach *Gating* zur Bestimmung des Anteils von *HL-60* Zellen, welche an ihrer Oberfläche **CD35** oder **CD71** präsentieren. Durch die Daten kann die Bereitschaft der Phagozytose aus einem Gemisch von differenzierten *HL-60* Zellen vor dem komplexen OPTA bestimmt werden.

scFvs Substitutionsanalysen und
Peptidarrays, Anti-IgG Fc *DyLight*[®] 680



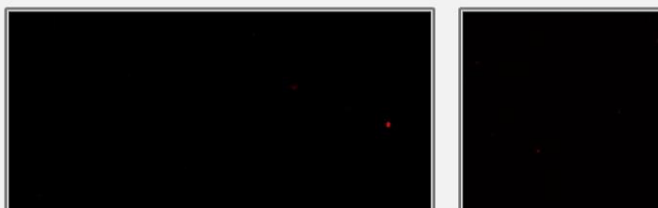
Serum FS2 (1:500)



LES20_A7



LES20_C1



LES20_C9



LES20_D8

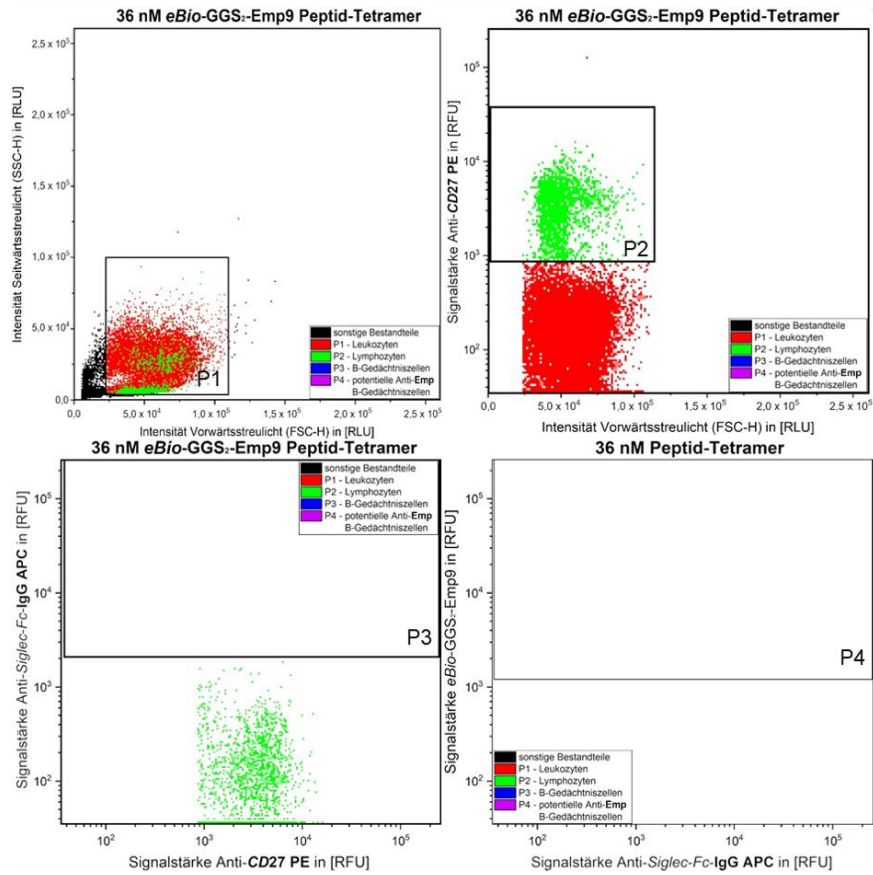


LES7_C5

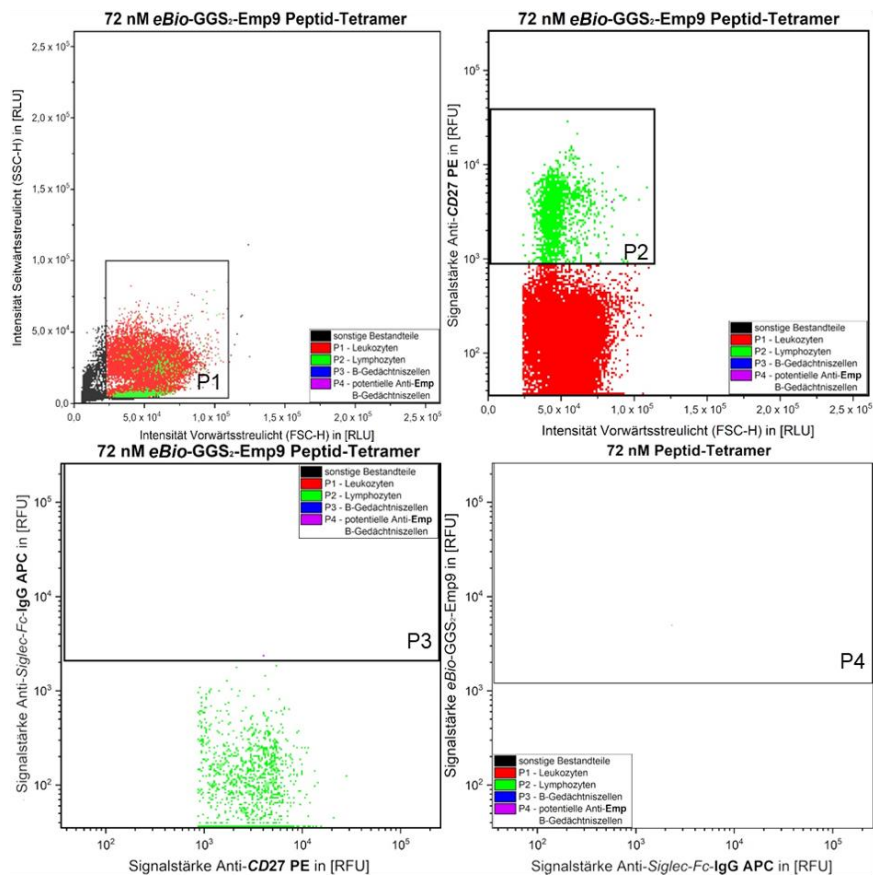


LES7_C8

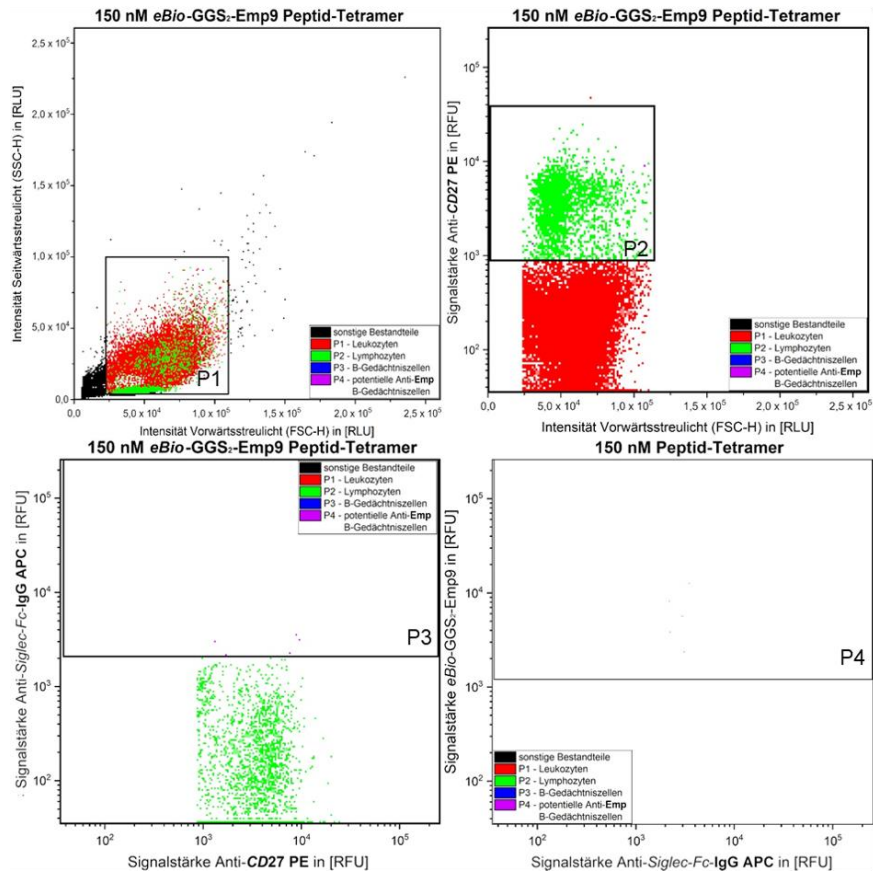
Anlage 6: Zur Primärfärbung der Substitutionsanalysen und Peptidarrays wird das Blutserum einer Testperson im Verhältnis von 1:200 und scFvs in einer Konzentration von 10,0 µg/mL verwendet. Sekundärfärbungen mit Anti-IgG Fc *DyLight*[®] 680 werden in einem Verhältnis von 1:5000 durchgeführt. Links = markierte Substitutionsanalysen in Fünfer- oder 16er-Konfiguration; Rechts = markierte Peptidarrays. Die Helligkeit und der Kontrast sind zur besseren Sichtbarkeit um das 16-fache verbessert.



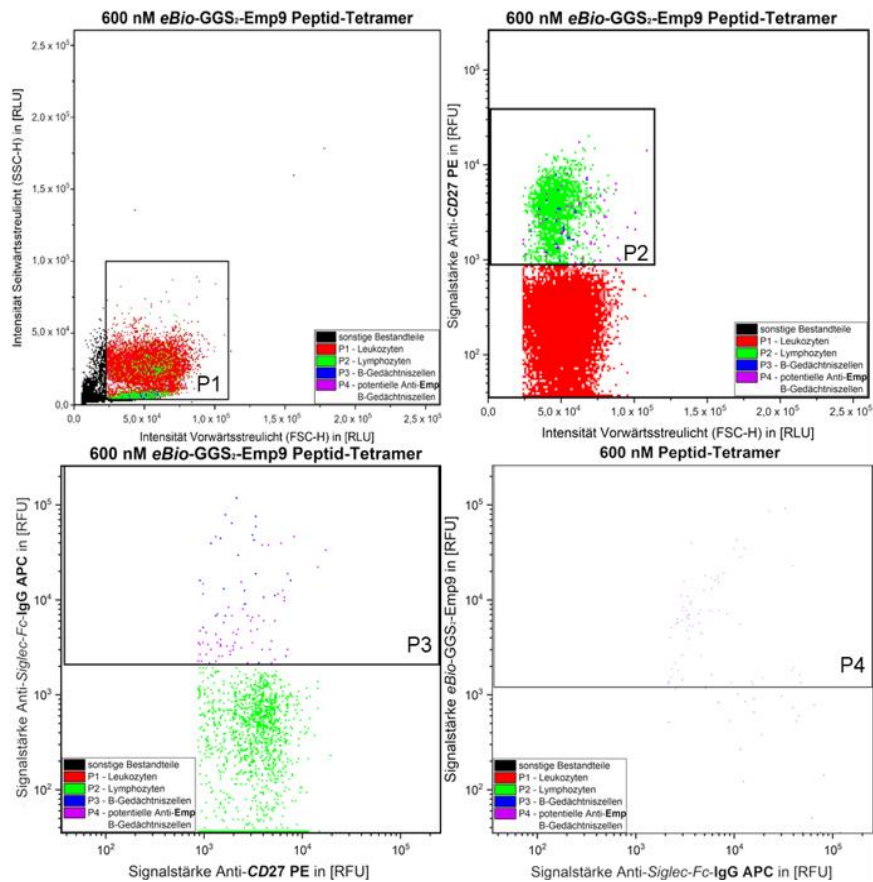
Anlage 7: Ergebnisse der FACS nach Gating. (36 nM eBio-GGS₂-Emp9).



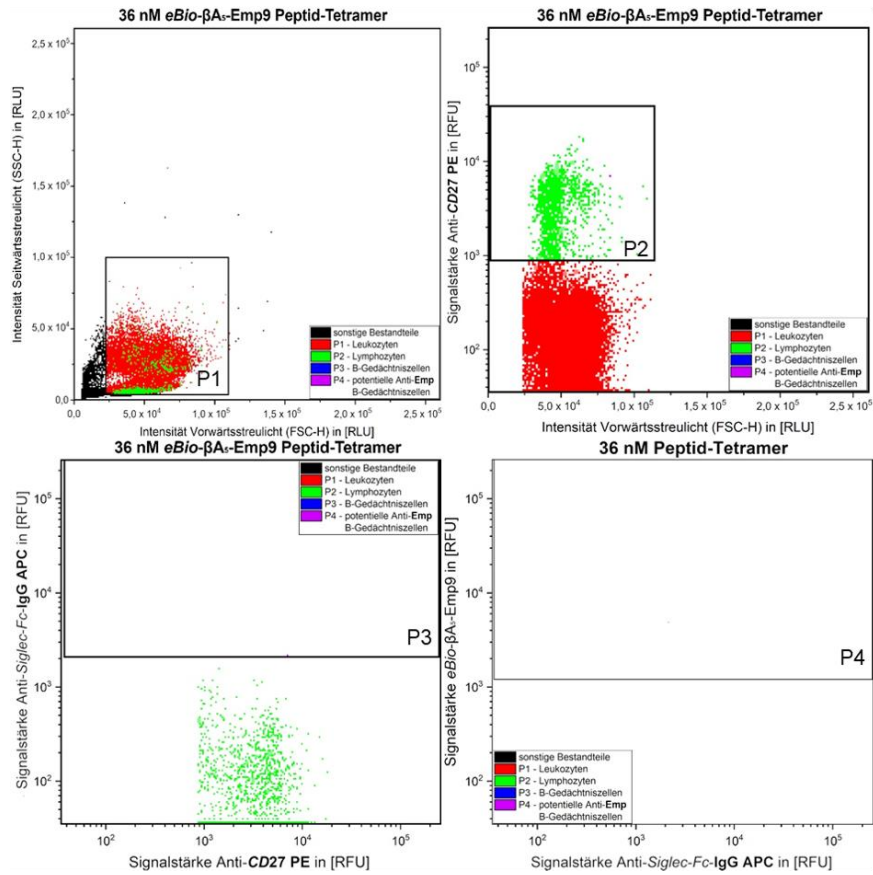
Anlage 8: Ergebnisse der FACS nach Gating (72 nM eBio-GGS₂-Emp9).



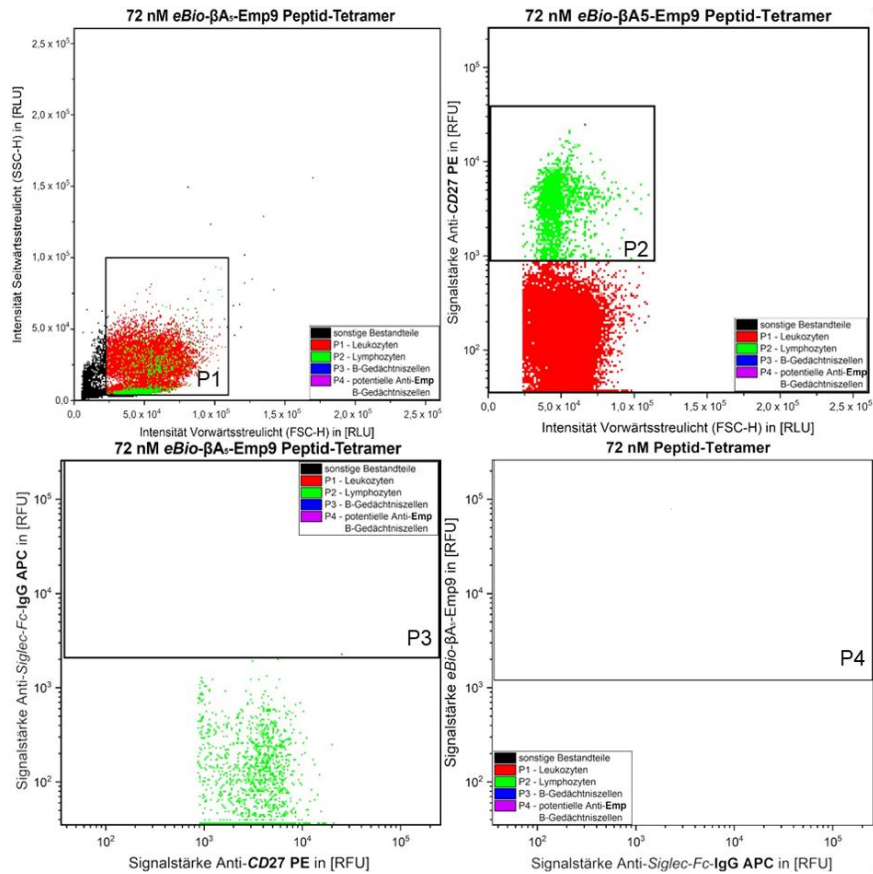
Anlage 9: Ergebnisse der FACS nach Gating (150 nM eBio-GGS₂-Emp9).



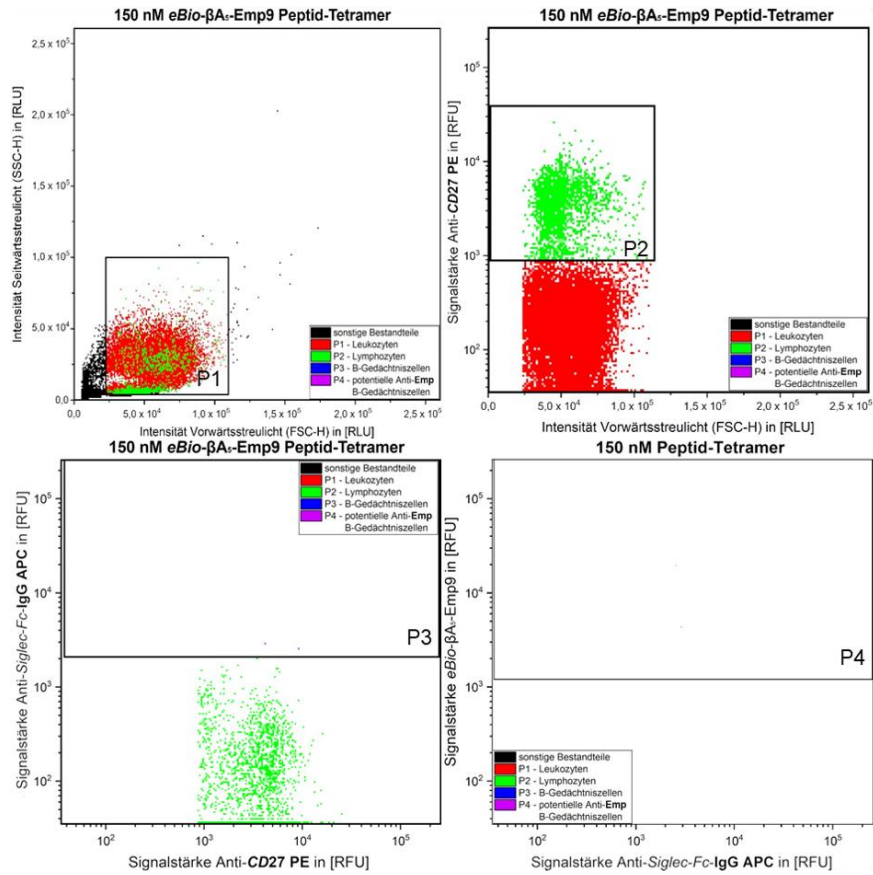
Anlage 10: Ergebnisse der FACS nach Gating (600 nM eBio-GGS₂-Emp9).



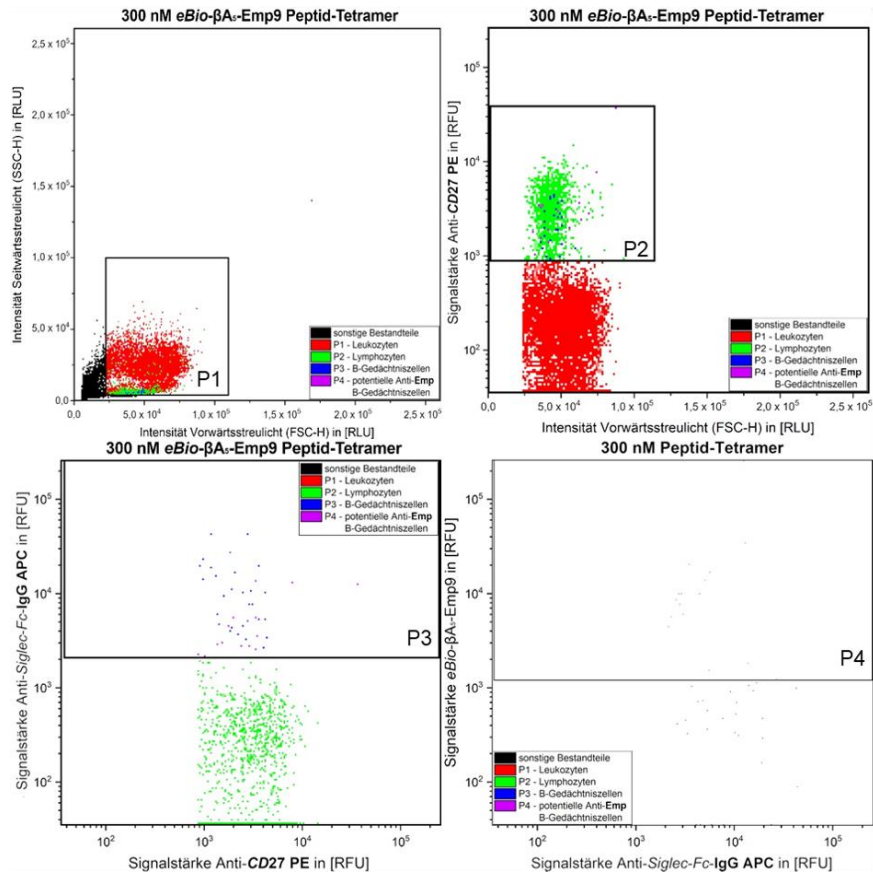
Anlage 11: Ergebnisse der FACS nach Gating (36 nM eBio-βA₅-Emp9).



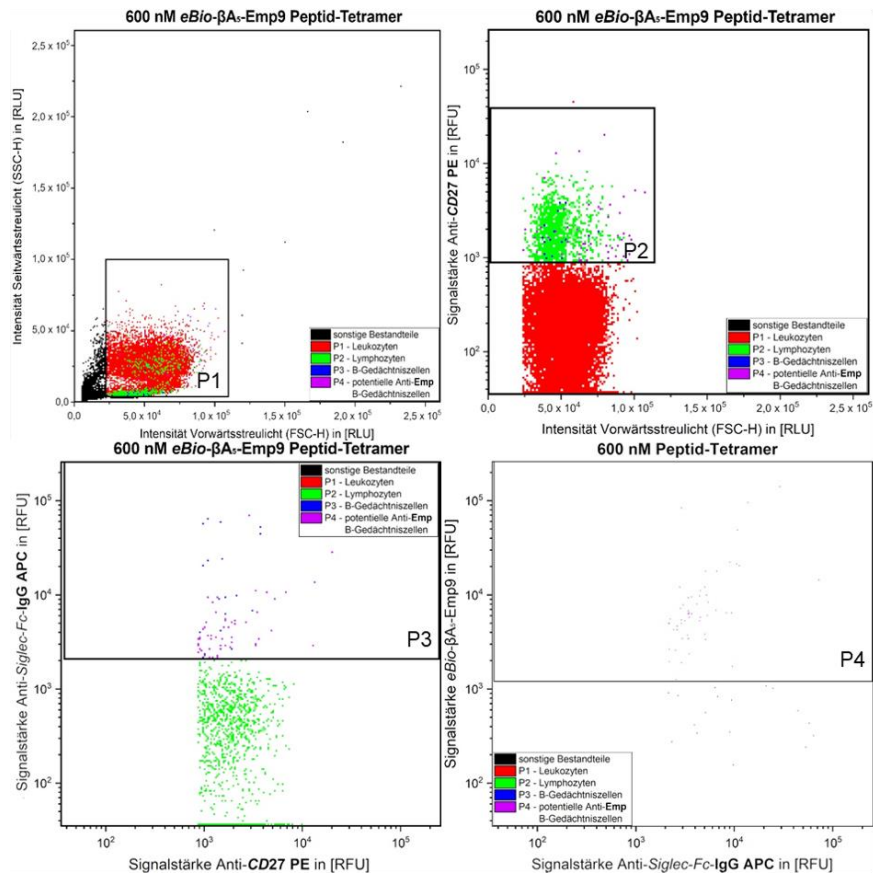
Anlage 12: Ergebnisse der FACS nach Gating (72 nM eBio-βA₅-Emp9).



Anlage 13: Ergebnisse der FACS nach Gating (150 nM eBio-βA₅-Emp9).

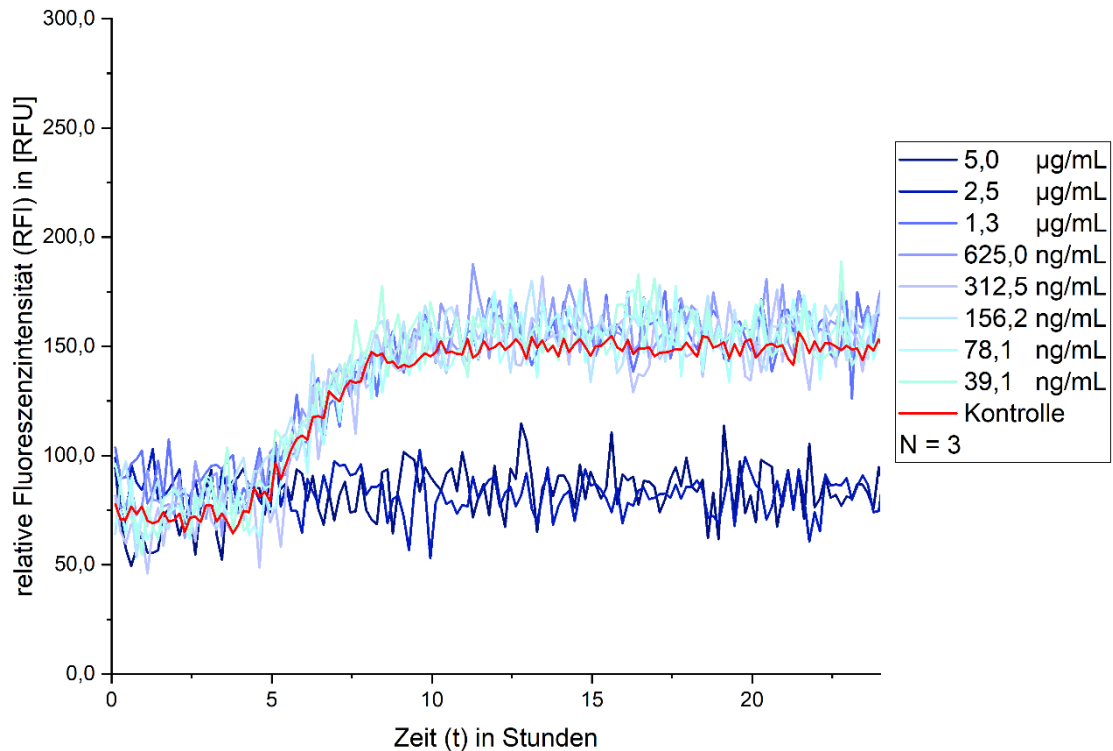


Anlage 14: Ergebnisse der FACS nach Gating (300 nM eBio-βA₅-Emp9).



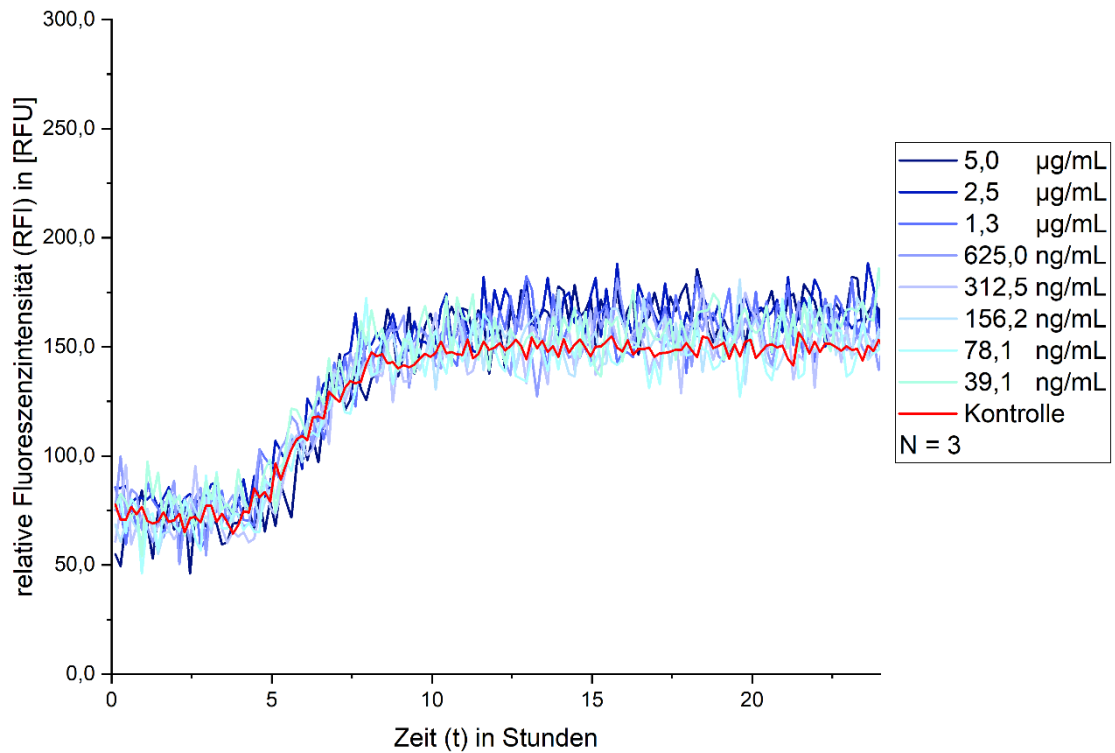
Anlage 15: Ergebnisse der FACS nach Gating (600 nM eBio-β₅-Emp9).

Test der Stressantwort von RGB-S Reporter auf Amp mTagBFP2 - Bac8c



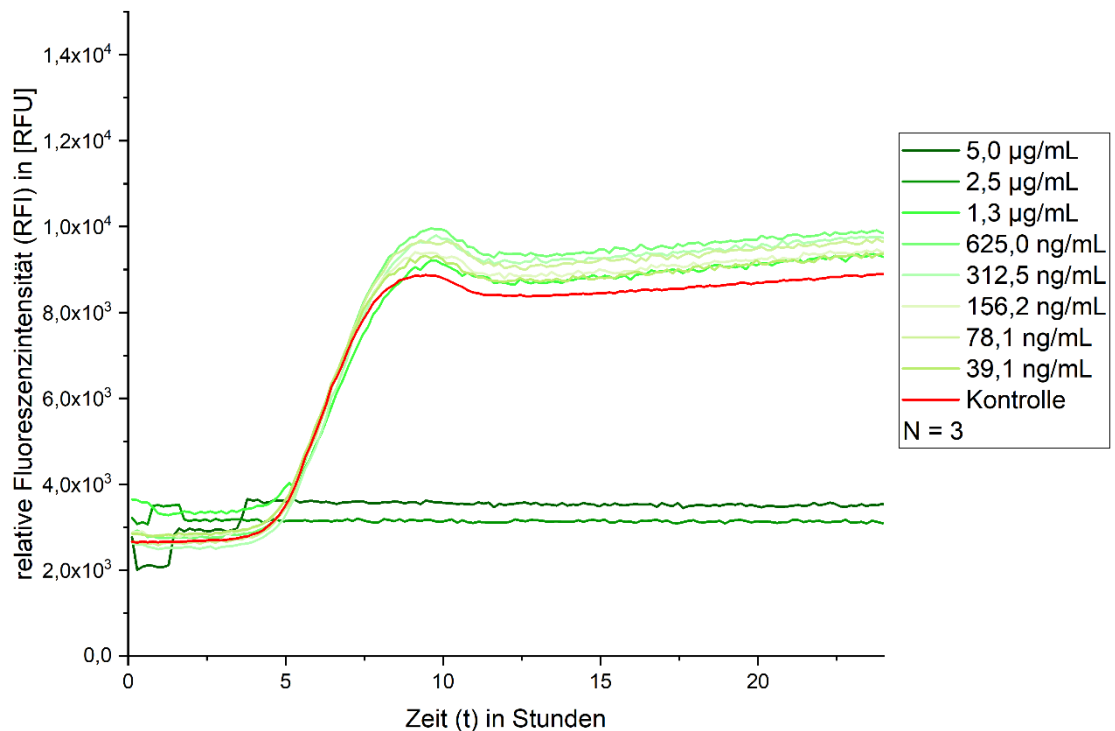
Anlage 16: Zunahme der Fluoreszenzintensität von mTagBFP2 im Verlauf von einem Tag, bei der Exposition des RGB-S Reporters mit Bac8c.

**Test der Stressantwort von *RGB-S* Reporter auf AmP
mTagBFP2 - Pac-525**



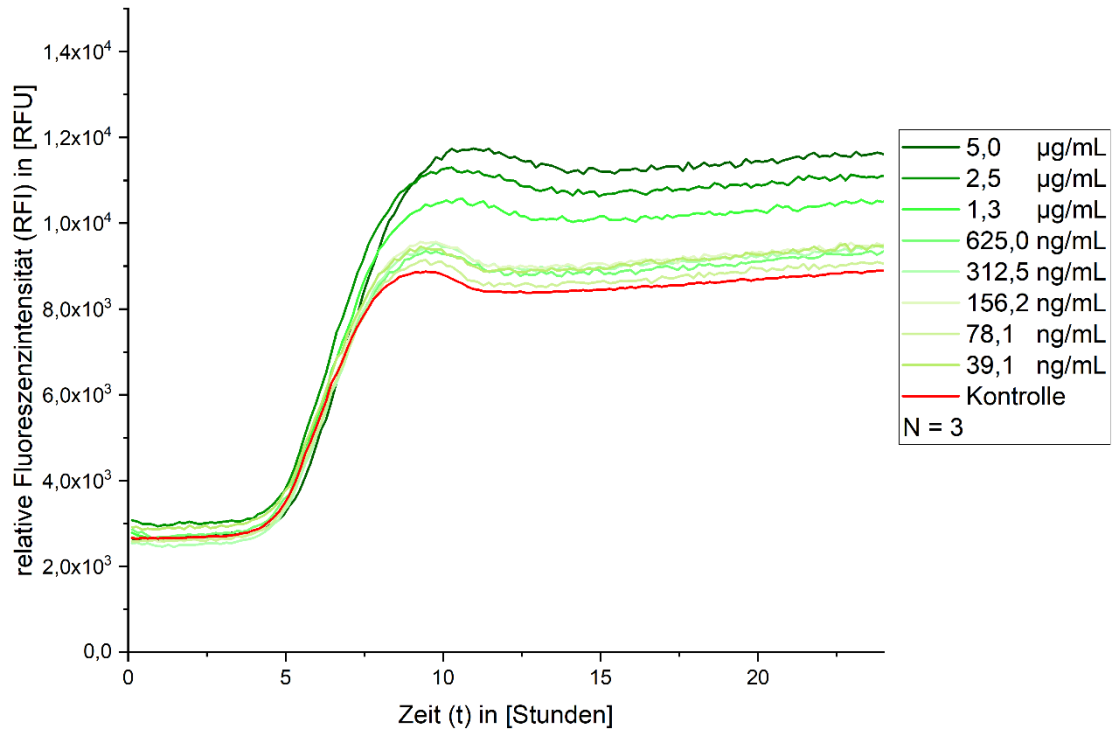
Anlage 17: Zunahme der Fluoreszenzintensität von **mTagBFP2** im Verlauf von einem Tag, bei der Exposition des *RGB-S* Reporters mit Pac-525.

**Test der Stressantwort von *RGB-S* Reporter auf AmP
GFPmut3b - Bac8c**



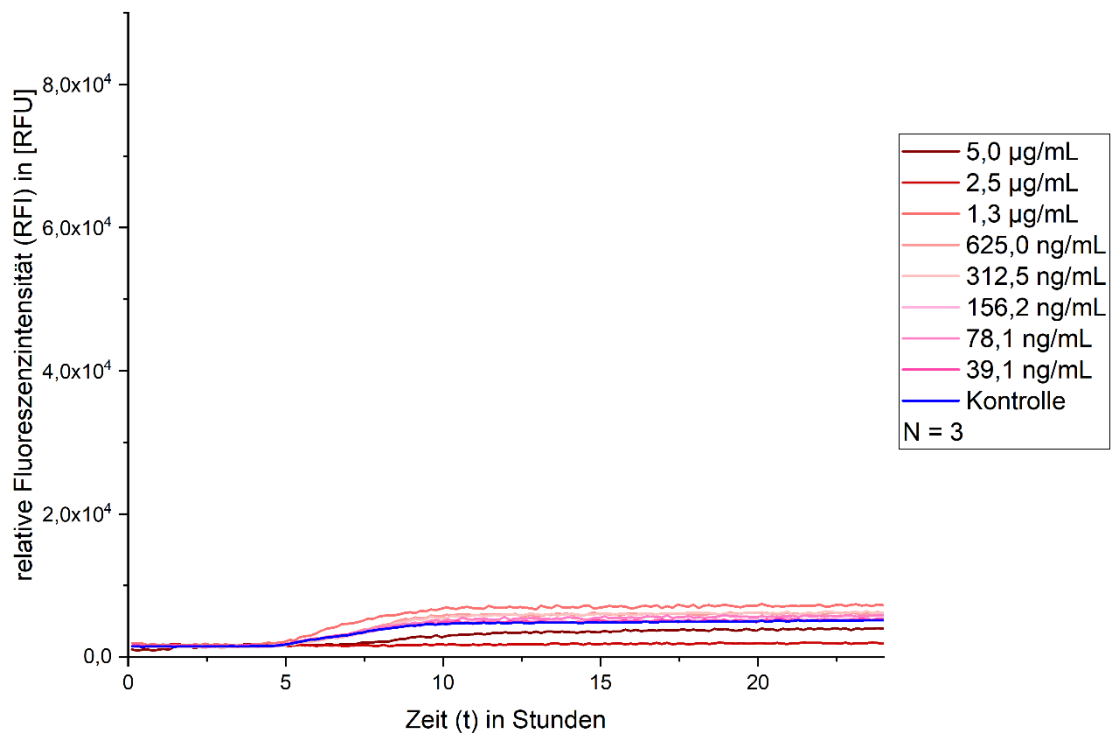
Anlage 18: Zunahme der Fluoreszenzintensität von **GFPmut3b** im Verlauf von einem Tag, bei der Exposition des *RGB-S* Reporters mit Bac8c.

**Test der Stressantwort von *RGB-S* Reporter auf Amp
GFPmut3b - Pac-525**



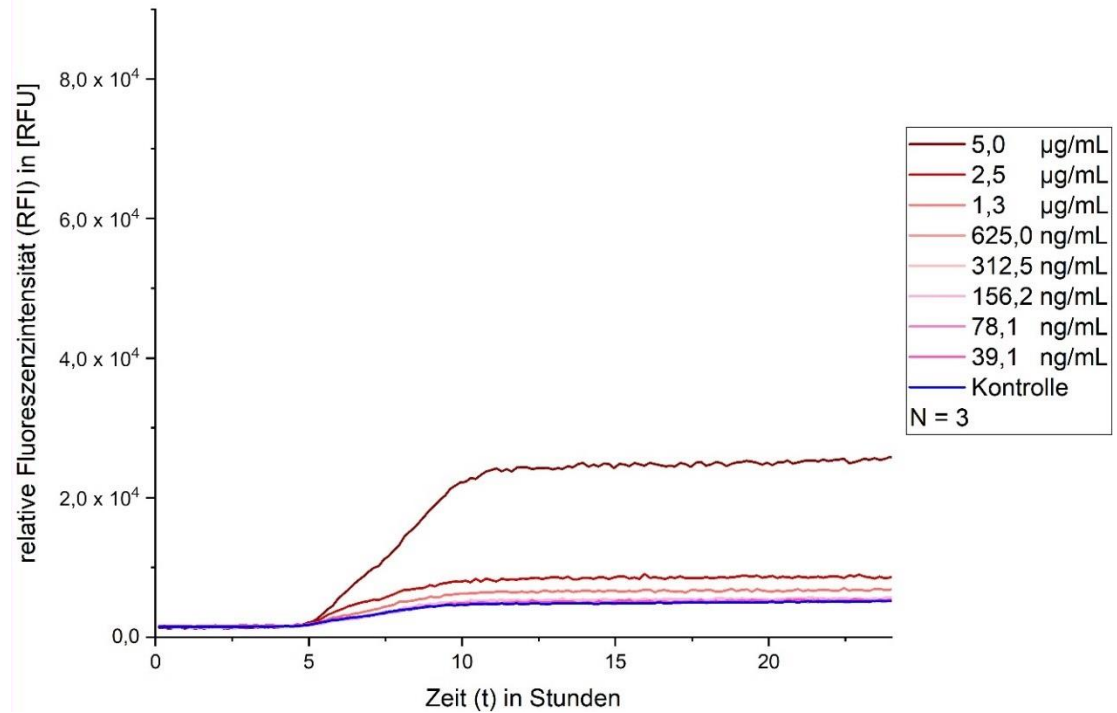
Anlage 19: Zunahme der Fluoreszenzintensität von **GFPmut3b** im Verlauf von einem Tag, bei der Exposition des *RGB-S* Reporters mit Pac-525.

**Test der Stressantwort von *RGB-S* Reporter auf Amp
mRFP1 - Bac8c**



Anlage 20: Zunahme der Fluoreszenzintensität von **mRFP1** im Verlauf von einem Tag, bei der Exposition des *RGB-S* Reporters mit Bac8c.

**Test der Stressantwort von *RGB-S*-Reporter auf Amp
mRFP1 - Pac-525**



Anlage 21: Zunahme der Fluoreszenzintensität von **mRFP1** im Verlauf von einem Tag, bei der Exposition des *RGB-S* Reporters mit Pac-525.