

Wechselwirkung mit und Aufnahme von  
*Staphylococcus aureus* Extracellular Adherence Protein (Eap)  
in Endothelzellen der Nabelschnur

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Susanne Janzen  
aus Coesfeld  
Gießen 2012

Aus dem Institut für Biochemie des Fachbereichs Medizin,  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
Direktor: Prof. Dr. Klaus T. Preissner

Gutachter: Prof. Dr. Klaus T. Preissner

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Hans-Rudolf Tinneberg

Tag der Disputation: 16.07.2012

## **Erklärung**

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>8</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>11</b>
1.1 <b>Aufbau eines Bakteriums .....</b>	<b>11</b>
1.2 <b><i>Staphylococcus aureus</i>.....</b>	<b>12</b>
1.3 <b>Virulenzfaktoren.....</b>	<b>13</b>
1.3.1 Enzyme und Toxine .....	13
1.3.2 Oberflächenproteine für die Adhäsion .....	14
1.4 <b>Extracellular adhesion/adhesive protein (Eap) .....</b>	<b>16</b>
1.4.1 Proteinstruktur.....	16
1.4.2 Biofilm.....	17
1.4.3 Interaktion mit Extrazellulärer Matrix (ECM), Plasmaproteinen und <i>S. aureus</i> .....	18
1.4.4 Interaktion mit eukaryotischen Zellen.....	18
1.5 <b>Fragestellung der Arbeit .....</b>	<b>24</b>
<b>2 METHODIK .....</b>	<b>26</b>
2.1 <b>Zellkultur.....</b>	<b>26</b>
2.1.1 Isolierung von humanen makrovaskulären Endothelzellen aus der Nabelschnur .....	26
2.1.2 Kultivierung der HUVEC .....	27
2.1.3 Zellzahlbestimmung.....	27
2.2 <b>Inkubation mit Eap.....</b>	<b>28</b>
2.2.1 Eap .....	28
2.2.2 Verschiedene Eap-Konzentrationen.....	29
2.2.3 Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen .....	29
2.2.4 Heparin im Inkubationsmedium oder Waschpuffer .....	29
2.2.5 Einfluss von Heparinase III.....	30
2.2.6 Eap in der Extrazellulären Matrix (ECM).....	30
2.2.7 Zeitverlauf.....	30
2.3 <b>Immunhistochemie.....</b>	<b>30</b>
2.3.1 Zellen für die Immunhistochemie .....	30
2.3.2 Fixierung.....	31

2.3.3	Herstellung von Gewebeschnitten der Nabelschnur.....	32
2.3.4	Immunfluoreszenzfärbung .....	32
2.3.5	Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen .....	35
<b>2.4</b>	<b>Zelluläre Permeabilität.....</b>	<b>37</b>
2.4.1	Permeabilitätsassay .....	37
2.4.2	Darstellung von PECAM-1 .....	38
<b>2.5</b>	<b>HUVEC-Bindungsassay .....</b>	<b>38</b>
2.5.1	Bindung des biotinylierten Eap an HUVEC.....	39
2.5.2	Entwicklung und Auswertung.....	39
<b>2.6</b>	<b>Auswertung und Statistik .....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALIEN .....</b>	<b>41</b>
3.1	Chemikalien.....	41
3.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	43
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>45</b>
4.1	Die Bindung von Eap an HUVEC wird durch Heparin und bei 4 °C reduziert.....	47
4.2	Die Aufnahme von Eap in Endothelzellen erfolgt konzentrationsabhängig. ....	49
4.3	ICAM-1 und PECAM-1 werden nach Eap-Inkubation weniger exprimiert. ....	51
4.4	Eap wird zeitabhängig stärker internalisiert, ICAM-1 und PECAM-1 werden weniger exprimiert im Zeitverlauf.....	53
4.5	Die intrazelluläre Aufnahme von Eap in HUVEC ist bei niedrigen Temperaturen und unter Einfluss von Heparin reduziert.....	56
4.6	Die Aufnahme von Eap in die Nabelschnur war bei 4 °C und gleichzeitiger Inkubation mit Heparin reduziert .....	59
4.7	ICAM-1 und PECAM-1 waren nicht so stark reduziert nach Inkubation bei 4 °C und gleichzeitiger Inkubation von Eap und Heparin. ....	61
4.8	Heparansulfate haben nur begrenzten Einfluss auf die Aufnahme von Eap.....	63
4.9	PECAM-1-Expression von HUVEC nach Eap-Inkubation nur leicht verändert. ....	65

4.10	Permeabilitätsassays zeigen nur Tendenzen.....	67
4.11	Eap ist ebenfalls in der ECM lokalisiert. ....	68
4.12	Eap ist vor allem im Zytoplasma der Zelle lokalisiert und zeigt eine perinukleäre Verdichtung.....	70
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>72</b>
5.1	Bindungsassays.....	74
5.2	Aufnahme von Eap in Endothelzellen.....	75
5.2.1	Aufnahme von Eap in Endothelzellen bei verschiedenen Temperaturen.....	78
5.3	Heparin reduziert die Aufnahme von Eap auf ein Minimum.....	79
5.4	Heparansulfate haben einen geringen Einfluss auf die Aufnahme von Eap.....	81
5.5	Die Rolle der Extrazellulären Matrix.....	83
5.6	Intrazelluläre Lokalisation von Eap.....	85
5.7	ICAM-1 und PECAM-1 als Interaktionspartner für Eap.....	86
5.8	Permeabilitätssteigerung durch Eap gering.....	87
5.9	Schlussfolgerung.....	88
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>92</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>105</b>
9.1	Ergebnisse ELISA-Bindungsassay.....	105
9.2	Immunfluoreszenzbilder.....	106
9.3	Abbildungsverzeichnis.....	128
9.4	Tabellenverzeichnis.....	130

<b>9.5 Lebenslauf.....</b>	<b>131</b>
<b>9.6 Danksagung.....</b>	<b>132</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AhpC	Alkhydroxyd-Reduktase von <i>S. aureus</i>
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AS	Aminosäure
AT	Antithrombin
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	Bovine Serum Albumin
CatA	Catalase von <i>S. aureus</i>
CCR	Chemokine receptor
CD	Cluster of Differentiation
Clf	Clumping factor
Cna	Collagen binding adhesin
Coa	Coagulase
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Eap	Extracellular adherence protein
ECBM	Endothelial Cell Basal Medium
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
ECM	Extracellular Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Efb	Extracellular binding protein
EGF	Epidermal-Growth-Factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Emp	ECM binding protein
<i>F. heparinum</i>	<i>Flavobacterium heparinum</i>
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FGF	Fibroblast-Growth-Factor
FBG	Fibrinogen
FCS	Fetal Calf Serum

Fc $\alpha$ RI	Fc-Rezeptor für IgA
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FN	Fibronektin
FnBP	Fibronectin binding protein
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GAG	Glykosaminoglykan
HABA	4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid
HBS	Hepes Buffered Saline
HBSS	Hanks Buffered Saline Solution
HOPE	Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect
HS	Heparansulfat
HRP	Horseradish-Peroxidase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
I.E.	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IsaA	Immunodominant staphylococcal antigen A
LDL	Low Density Lipoprotein
LFA-1	Lymphozytenfunktionsassoziiertes Antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid
Mac-1	Macrophage-1 antigen
Map	MHC class II analogous protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRSA	Methicillin resistenter <i>S. aureus</i>
MSCRAMM	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
NMH	Niedermolekulares Heparin
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell

PBS	Phosphate Buffered Saline
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PG	Proteoglykan
PSGL	P-selectin glycoprotein ligand
rER	Raues endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Sas protein	<i>S. aureus</i> surface protein
SERAM	Secretable expanded repertoire adhesive molecules
Spa	<i>S. aureus</i> Protein A
SSL	Staphylococcal superantigen-like proteins
T	Thrombin
TBS	Tris Buffered Saline
TGF	Transforming-Groth-Factor
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like-receptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
UFH	Unfraktioniertes Heparin
UPW	Ultra Pure Water
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VE-Cadherin	Vascular endothelial-Cadherin
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLA-4	Very Late Antigen-4
VRSA	Vancomycin resistenter <i>S. aureus</i>
vWF	Von Willebrand-Faktor
VN	Vitronektin

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau eines Bakteriums

Bakterien können morphologisch der Form nach in Stäbchen, Kokken und schraubenförmige Bakterien eingeteilt werden. Außerdem unterscheidet man eine Lagerung in Ketten, in Haufen oder in Diploform. Im Gegensatz zu Eukaryonten besitzen Prokaryonten keinen echten Zellkern sondern lediglich ein Kernäquivalent, das Träger der Erbinformation ist, und ein ringförmig geschlossenes, doppelsträngiges Fadenmolekül aus DNA, das Bakterienchromosom, darstellt. Oft finden sich im Zytoplasma noch weitere ringförmige DNA, die Plasmide, die bei der Fortpflanzung weitergegeben werden oder auch auf ein anderes Bakterium übertragen werden können.

Ein weiterer Unterschied zu Eukaryonten besteht in der Bakterien-Zellwand, die durch bestimmte Zellwandbausteine, die Mureine, aufgebaut ist. Die Zellwand besteht aus N-Acetylglukosamin und Acetylmuraminsäure, die abwechselnd miteinander verknüpft sind und Peptidoglykane bilden. Die Einteilung in Gram-positiv und Gram-negativ anfärbbare Bakterien ist durch diesen unterschiedlichen Zellwandaufbau bedingt. So besteht die Zellwand Gram-positiver Bakterien aus einer 20-80 nm dicken Schicht mit ca. 40 Mureinschichten (56). Teichon-, Lipoteichon- und Teichuronsäuren sind kovalent an das Mureingerüst gebunden (148). Bei *S. aureus* kommt zusätzlich noch das Protein A (siehe Kapitel 1.3.2) in der Zellwand vor (148). Die Zellwand Gram-negativer Bakterien ist dünner, auf die Zytoplasma-Membran folgt nur eine dünne Mureinschicht, darauf folgt eine weitere Membran, die ähnlich aufgebaut ist wie die Zytoplasma-Membran (56). Des Weiteren sind die Lipopolysaccharide (LPS) charakteristisch für Gram-negative Bakterien. Sie befinden sich in der äußeren Membran und sind für die Antigenität und vor allem der Toxizität der Bakterien verantwortlich.

Verschiedene Bakterienarten sind in der Lage, eine Kapsel auszubilden, in der sie in Zeiten mangelnder Energiezufuhr überdauern können. So ist auch die Mehrzahl der *S. aureus*-Stämme in der Lage eine Kapsel zu bilden, die vor Phagozytose schützt und so die Persistenz im Blutkreislauf des Wirtes gewährleistet.

1982 wurden die Kapselsaccharide mittels Antikörpern typisiert und somit verschiedene Serotypen der Kapselsaccharide unterschieden (79). Obwohl elf Typen von Polysacchariden beschrieben wurden, sind die Serotypen 5 und 8 diejenigen, die in den für die Infektionen verantwortlichen *S. aureus* dominieren (3, 59). Die beiden Typen 5 und 8 besitzen ähnliche sich wiederholende Untereinheiten, die aus N-Acetyl-Mannosaminuronsäure,

N-Acetyl-L-Fucosamin und N-Acetyl-D-Fucosamin bestehen (31, 32) und haben eine antiphagozytotische Aktivität (78, 141). Daneben wurde das Antigen 336 identifiziert (128). Es wird von *S. aureus*-Stämmen produziert, die keine Kapsel besitzen, aber dafür eben das 336-Polysaccharid (336PS) auf der Zelloberfläche exprimieren. Das 336PS hat Ähnlichkeit mit der in der Zellwand vorkommenden Teichonsäure (98, 109).

## 1.2 *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* gehört zur Familie der Micrococcaceae und Gattung der Staphylokokken. Es ist ein kugelförmiges, Gram-positives Bakterium, das in Haufen gelagert ist. *S. aureus* bildet keine Sporen, ist nicht beweglich und fakultativ anaerob (56). Etwa jeder dritte Mensch ist zeitweise besiedelt mit *S. aureus*, was in der Regel unbemerkt bleibt. Er besiedelt den Nasenvorhof, wo er dann auch durch einen Abstrich nachgewiesen werden kann, sowie die Haut, die Perianalgegend, den Dickdarm oder die oberen Atemwege (108). Solange das Immunsystem nicht geschwächt ist, kommt es meist nicht zu einer Infektion. Die Lipoteichonsäure spielt eine wesentliche Rolle in der Erkennung von *S. aureus* durch das menschliche Immunsystem, da sie, neben anderen Komponenten der Zellwand, vom Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2) erkannt wird. Dies führt zur Immunantwort, indem die Abwehrzellen zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie beispielweise Interleukin-1 (IL-1) oder Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), angeregt werden (27). Wird das Gleichgewicht im Immunsystem allerdings gestört, kann es zu einer Infektion kommen. Dies ist z.B. häufig bei Patienten mit Diabetes Typ 1 (146) oder mit AIDS (153) der Fall.

*S. aureus* kann sowohl ambulant als auch nosokomial erworbene Infektionen hervorrufen. Oft tritt er im Krankenhaus als Methicillin resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) auf, aber auch die Häufigkeit von Vancomycin resistenten *Staphylococcus aureus* (VRSA) nimmt zu (9, 58). So findet man einerseits oberflächliche Infektionen wie Abszesse, Furunkel, Karbunkel, Wundinfektionen und andererseits auch invasive Infektionen wie Endokarditis, Osteomyelitis oder Sepsis hervorgerufen durch Besiedelung von Kathetern (96). Auch Lebensmittelvergiftungen durch Exotoxine des *S. aureus* sind möglich.

Neben der Ausbreitung über Hautkontakt und auf aerobem Weg, ist einer der Hauptpathogenitätsfaktoren die Biofilmbildung auf Polymeroberflächen und eukaryotischen Geweben. Für diese Biofilmbildung scheint neben der Neutralen Phosphatase auch Eap eine Rolle zu spielen (siehe Kapitel 1.4.2) (74, 144). So kann *S. aureus* zum Beispiel mittels besiedelter medizinischer Instrumente eine Eintrittsstelle in den Menschen finden. Außerdem

kann es auch durch seine Toleranz gegen Trockenheit lange Zeit auf unbelebten Flächen überleben (12).

### **1.3 Virulenzfaktoren**

Verschiedene Virulenzfaktoren ermöglichen es *S. aureus* an eukaryotische Membranen zu adhären, eukaryotische Zellen zu lysieren und Opsonophagozytose zu widerstehen. Aufgrund der multifaktoriellen Natur der *S. aureus*-Infektionen und der funktionellen Redundanz der Adhäsine und Exoproteine ist es sehr schwer einzuordnen, welche Rolle genau die bakteriellen Faktoren spielen.

#### **1.3.1 Enzyme und Toxine**

*S. aureus* produziert Gewebe-spaltende Enzyme, wie Proteasen, Hyaluronidasen, Lipasen und Nucleasen (26). So sichert z.B. die „Catalase“ (CatA) das Überleben und die Persistenz von *S. aureus*. Zusammen mit der Alkylhydroxyid-Reduktase (AhpC) sind sie für die Kolonisation der Bakterien, besonders in der Nase, wichtig (20).

Die von *S. aureus* produzierte Staphylokinase stellt eine Abwehr gegen Defensine dar. Defensine befinden sich in den Granula der Neutrophilen Granulozyten und zerstören die Erregermembran. Sie sind aus hydrophilen und kationischen Aminosäuren aufgebaut, die mit der negativen Ladung von Bakterienmembranen und, nach deren Durchdringen, mit der bakteriellen DNA bzw. RNA interagieren. Die Staphylokinase bildet mit den Defensinen Komplexe, und neutralisiert so deren Wirkung. Ferner spielt Staphylokinase eine Rolle bei der Blutkoagulation, da sie in der Lage ist, Komplementfaktoren zu spalten und Plasminogen zu aktivieren (72).

Daneben sezerniert *S. aureus* Enzyme wie die „Enolase“ (Eno). Eno ist ein glykolytisches Enzym, das auch Laminin binden kann (10). Des Weiteren produziert es verschiedene Proteasen wie die Metalloproteinase Aureolysin. Aureolysin spaltet Plasma Proteinase-Inhibitoren wie den  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor (122), aktiviert Prothrombin (151) und scheint einen inhibitorischen Effekt gegenüber der Immunglobulin (Ig)-Produktion von Lymphozyten zu besitzen (124).

Die von *S. aureus* produzierten Enterotoxine spielen bei Lebensmittelvergiftungen eine große Rolle, da sie durch Erhitzen nicht zerstört werden und zum Toxic shock-Syndrom führen können. Diese Toxine fungieren als Superantigene, indem sie eine Dysregulation des Immunsystems bewirken: Dabei wird eine Brücke zwischen „Major Histocompatibility Complex“ (MHC) II-Molekülen und T-Zell-Rezeptor hergestellt und diese Verbindung so

negativ beeinflusst. Es kommt zu einer unkontrollierten T-Zell-Proliferation unabhängig von der antigenen Spezifität und damit zu einer unkontrollierten Immunantwort. Des Weiteren führen diese Enterotoxine zu einer Herunterregulation der Chemokinrezeptoren CCR 1, CCR 2 und CCR 5 der Monozyten (143).

Daneben gibt es die Toxine, die strukturelle Ähnlichkeit mit Superantigenen haben, aber nicht deren Wirkung besitzen, die sog. „Staphylococcal superantigen-like proteins“ (SSL). So verhindert z.B. SSL-5 das Rollen der Neutrophilen Granulozyten durch Blocken des „P-selectin glycoprotein ligand-1“ (PSGL-1), und greift so in die frühe Phase der Neutrophilen-Rekrutierung ein (7). SSL-7 hingegen blockiert das Komplementsystem, indem es C5 bindet. Außerdem bindet es noch an die lösliche Form des IgA, und verhindert eine Interaktion zwischen IgA und dem auf der Zelloberfläche befindlichen Rezeptor Fc $\alpha$ RI (CD89) (86).

Außerdem besitzt *S. aureus* noch weitere Toxine, wie das  $\alpha$ -Toxin (30) oder Hämolyse (135). Das  $\alpha$ -Toxin, das auch als  $\alpha$ -Hämolyse bezeichnet wird, wird als hydrophiles Monomer sekretiert und bildet große Poren, Heptamere, in den Zytoplasma-Membranen der eukaryotischen Zielzellen. Die Zelle wird dann durch osmotische Vorgänge zerstört (44, 149). Daneben sekretiert *S. aureus* weitere Hämolyse wie das  $\beta$ -Hämolyse, das jedoch nicht in allen Isolaten vorkommt.  $\beta$ -Hämolyse ist eine Sphingomyelinase, die proliferierende Lymphozyten abtöten kann (61).

### **1.3.2 Oberflächenproteine für die Adhäsion**

Neben der Fähigkeit, mit sich selbst zu assoziieren, kann *S. aureus* auch an eukaryotische Zellen, die extrazelluläre Matrix, oder auch an Materialoberflächen adhären. Selbst-Assoziation und Adhäsion werden durch verschiedene Oberflächenproteine vermittelt, deren Funktionen sich teilweise überschneiden. Diese Oberflächenproteine lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Zellwand-verankerte und nicht-Zellwand-verankerte, also sekretorische Proteine. Die Zellwand-verankerten Proteine werden auch als „microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“ (MSCRAMMs) bezeichnet (15, 29). Sie sind in der Zellwand der Bakterien über ein LPXTG-Motiv verankert und binden an Komponenten der extrazellulären Matrix, wie z.B. Fibronectin (FN) und Fibrinogen (FBG). Zu dieser Gruppe zählt man z.B. das „Fibronectin-binding protein A und B“, das „Collagen-binding adhesin“, „*S. aureus* surface protein“ und „Clumping factor A und B“ (siehe Tabelle 1.1.).

Zu dieser Gruppe zählt auch das Protein A, das in der Zellwand verankert ist und an den Fc-Teil von Antikörpern bindet. So schützt *S. aureus* sich vor Phagozytose, da der Fc-Teil

derjenige Teil des Immunglobulins ist, der von den Makrophagen durch Fc-Rezeptoren erkannt wird (11).

Tabelle 1.1: Adhäsionsproteine von *S. aureus*

<b>Zellwandverankerte Proteine mit LPXTG-Motif (MSCRAMMs)</b>			
		<b>Bindungspartner</b>	<b>Ref.</b>
Fibronectin binding protein A und B	FnBPA und FNBPB	FN, FBG	(57)
Collagen binding adhesin	Cna	Kollagen Typ I und IV	(118)
<i>S. aureus</i> surface protein	Sas protein	ECM	(126)
Clumping factor A und B	Clf A und Clf B	FBG	(18, 110)
<i>S. aureus</i> Protein A	Spa	Fc-Teil der Immunglobuline, vWF, TNF $\alpha$ -Rezeptor 1	(11, 42, 54, 107)
<b>Sekretierte Adhäsionsproteine (SERAMs)</b>			
		<b>Bindungspartner</b>	<b>Ref.</b>
Coagulase	Coa	Aktivierung von Prothrombin	(116, 129)
Extracellular fibrinogen binding protein	Efb	FBG und Komplement-Faktoren C3b und C3d	(51, 87, 88, 131)
ECM binding protein	Emp	Interaktion mit ECM	(63)
Sbi	-	IgG	(155)

Außerdem bindet Protein A an den TNF- $\alpha$  Rezeptor 1 und aktiviert dessen Spaltung, so dass durch TNF- $\alpha$  ausgelöste proinflammatorische Signale ausbleiben (41, 43).

Die zweite Gruppe der Adhäsine sind Proteine, die strukturell nicht miteinander verwandt sind und kein LPXTG-Motiv besitzen. Sie werden auch als „secretable expanded repertoire adhesive molecules“ (SERAMs) bezeichnet (15, 29). An der Zelloberfläche sind sie über unbestimmte, bisher nicht bekannte Bindemechanismen verankert (15).

Hierzu zählen die „Coagulase“ (Coa), das Efb, das „Extracellular Matrix binding protein“ (Emp), Sbi und das „Extracellular adherence protein“ (Eap) (Tabelle 1.1). Die Coa aktiviert Prothrombin, so dass FBG in Fibrin umgewandelt wird (115, 129). Efb hingegen bindet direkt an FBG und ebenso an die Komplementfaktoren C3b und C3d. Durch Bindung an C3d wird die Konformationsänderung von C3 zu C3b behindert. C3b ist unter anderem wichtig für die Opsonierung der Bakterien, so dass durch die Bindung des Efb an C3d die Phagozytose verhindert wird. C3b wird durch direkte Bindung inaktiviert (51, 87, 88). Emp besitzt ein weites Spektrum an Bindungspartnern, z.B. FBG, FN, Kollagen und Vitronektin (VN) (63). Sbi stellt neben Protein A ein weiteres Protein dar, das an IgG binden kann (155). Eap wird im Folgenden näher erläutert.

## **1.4 Extracellular adhesion/adhesive protein (Eap)**

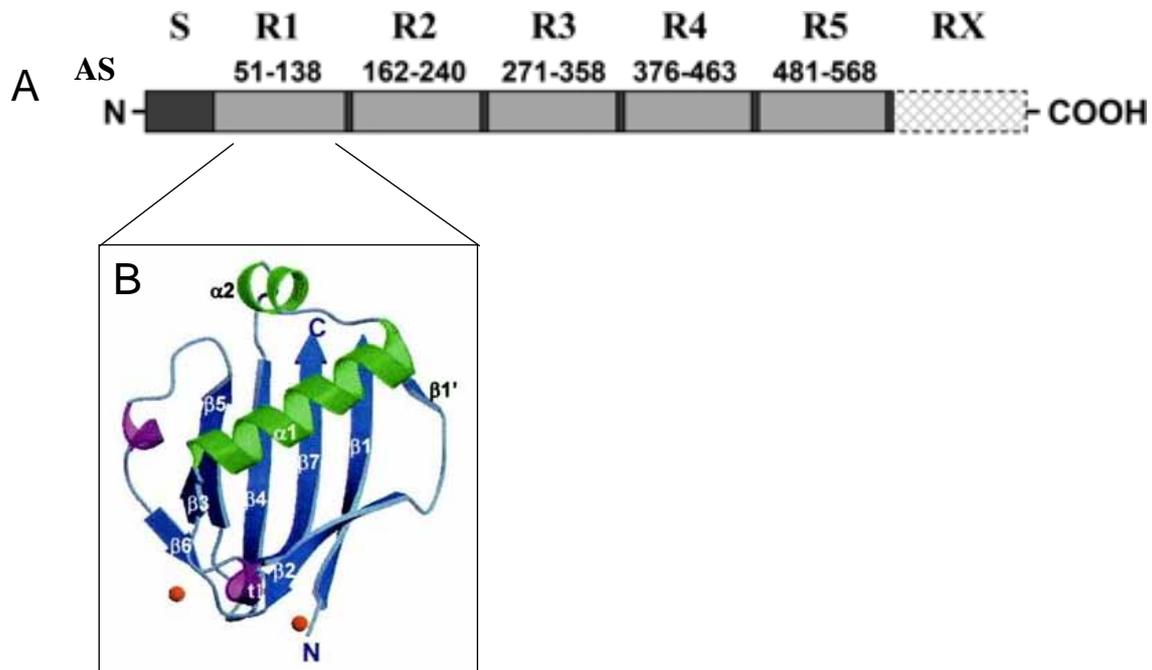
Eap gehört zur Gruppe der sekretierten Adhäsionsproteine von *S. aureus*. In einer klinischen Studie konnte es in allen *S. aureus*-Stämmen nachgewiesen werden, während in anderen Staphylokokken-Isolaten, wie *S. caprae* oder *S. capitis* das Eap-Gen nicht identifiziert wurde (65).

### **1.4.1 Proteinstruktur**

Eap wurde erstmals in den 1990er Jahren isoliert. Unabhängig voneinander fanden unterschiedliche Arbeitsgruppen Proteine von unterschiedlicher Größe, z.B. ein 72 kDa Protein, das Jonsson und Kollegen „MHC class II analogous protein“ (Map) nannten, da eine bestimmte Subdomäne hohe Ähnlichkeit mit der N-terminalen  $\beta$ -Kette vieler MHC II-Moleküle besitzt (75). Ein 50 kDa Protein, das von Bodén & Flock und McGavin und Kollegen fast zeitgleich identifiziert wurde (8, 104), wurde 1999 von Palma und Kollegen charakterisiert und „Extracellular adherence protein“ (Eap) genannt (114).

Hussain und Kollegen zeigten 2001, dass Map und Eap Analoge eines Proteins sind (62). Eap verschiedener Stämme von *S. aureus* besteht aus drei bis sechs Domänen und ist ein

basisches Protein mit Affinität zu Polyanionen wie Heparin. Jede einzelne Domäne besteht aus einer vierfachen  $\alpha$ -Helix, die diagonal über einer fünffachen  $\beta$ -Helix liegt (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1:** Die Struktur von Eap. (A) zeigt die schematische Darstellung des modularen Aufbaus von Eap aus einzelnen Eap-Domänen (B). Eap enthält ein Signalpeptid (S) aus 30 Aminosäuren (AS) und nachfolgenden Domänen (R1 bis Rx), deren Anzahl variabel ist, je nach Stamm (65). (B) zeigt die Struktur einer isolierten Eap-Domäne. Sie besteht aus einer vierfachen  $\alpha$ -Helix (grün), die diagonal zwischen einer fünffachen  $\beta$ -Faltblatt-Struktur (blau) liegt. Violett dargestellt ist die  $3_{10}$ -Helix (38). Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden mit EapN (Stamm Newman, 5 Domänen) durchgeführt.

Vergleiche dieser Domänen mit bekannten Strukturen zeigten eine Ähnlichkeit zu bakteriellen Superantigenen (38). Allerdings kamen Haggar und Kollegen später zu einem Ergebnis, dass Eap wohl nicht als ein Superantigen fungiert. Sie zeigten, dass die T-Zell-Aktivierung durch Eap abhängig ist vom MHC II-Molekül sowie vom „Intercellular Adhesion Molecule 1“ (ICAM-1). Außerdem entspricht die Kinetik der T-Zell-Proliferation mehr dem Profil eines konventionellen Antigens als dem eines Superantigens (48).

#### 1.4.2 Biofilm

*S. aureus* ist in der Lage, einen Biofilm zu bilden und sich so vor der Wirtsabwehr zu schützen und Antibiotikaresistenzen zu entwickeln (2, 90). Viele der Infektionen, die durch *S. aureus* hervorgerufen werden, stehen im Zusammenhang mit der Bildung von Biofilmen. Besonders solche Infektionen, die mit implantierten und künstlichen Prothesen verbunden

sind, gehen häufig mit einer Biofilm-Bildung einher (50). Oft werden diese Infektionen auch chronisch, neigen zu Rezidiven oder erfordern sogar die Entfernung der Prothesen.

Eap ist – neben anderen *S. aureus*-Proteinen – ebenfalls an der Bildung von Biofilmen beteiligt, mit besonders hoher Transkription unter Eisenmangel-Bedingungen (74) und verstärkter Biofilmbildung bei Präsenz von humanem Serum im Medium (144).

### **1.4.3 Interaktion mit Extrazellulärer Matrix (ECM), Plasmaproteinen und *S. aureus***

Eap ist neben der der Coa und dem Efb eines der Proteine, das FBG bindet. Außerdem wurden mindestens sieben Plasmaproteine als Bindungspartner für Eap identifiziert, darunter FN und Prothrombin. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung von Eap an FBG dieses nicht mehr als Ligand für das Leukozytenintegrin „Macrophage-1 antigen“ (Mac-1) zur Verfügung steht. *In vivo* konnte dann nachgewiesen werden, dass die Neutrophilen-Rekrutierung durch Eap reduziert wurde (16).

Neben den Plasmaproteinen zeigt Eap eine Bindung an Komponenten der ECM. Unterschiede bestehen hinsichtlich der Bindung an die verschiedenen Kollagen-Typen. So kommt trotz der bevorzugten Bindung an tripel-helikane Regionen der Kollagene, in der monomolekularen Form zwar eine Bindung an Kollagen I, nicht jedoch an Kollagen II, vor. In der Suprastruktur, den Mikrofibrillen, zeigte Eap allerdings eine Bindung sowohl an Kollagen VI oder an Kollagen IV-assoziierte Basalmembranen (53). Eap bindet ebenfalls an die Oberfläche von *S. aureus*, und erreicht damit eine Agglutination von *S. aureus* (114). Als Ligand für Eap auf der Oberfläche von *S. aureus* dient wahrscheinlich die Neutrale Phosphatase (28).

Durch diese Eigenschaften der Adhärenz spielt Eap eine wichtige Rolle für die Kolonisierung von *S. aureus*, ebenso wie es ins Immunsystem des Menschen eingreift, indem es die Immunabwehr herabsetzt und die Wundheilung verzögert (siehe Kapitel 1.4.4.4 und 1.4.4.5).

### **1.4.4 Interaktion mit eukaryotischen Zellen**

#### **1.4.4.1 Adhärenz**

Wie oben erwähnt besteht Eap aus mehreren Domänen. Es konnte gezeigt werden, dass Eap nur in seiner kompletten Konstitution für die Agglutination und Adhärenz von *S. aureus* verantwortlich ist und die einzelnen Domänen für sich alleine nicht in der Lage sind, diese zu vermitteln (66).

Eap spielt eine Rolle bei der Adhärenz von *S. aureus* an eukaryotische Zellen. Durch Anti-Eap Antikörper konnte ein Rückgang der Adhärenz an Fibroblasten vom *S. aureus* Stamm Newman beobachtet (49, 64, 85). Als potenzielle Bindungsstelle für Eap kommt dabei ICAM-1 in Frage (16).

#### 1.4.4.2 Invasion

Genau wie für die Adhäsion ist auch für die zelluläre Invasion nur Eap in seiner vollen Länge verantwortlich (66). Jedoch wird die Rolle von Eap bei der Internalisierung von *S. aureus* kontrovers diskutiert: Hagggar und Kollegen konnten zeigen, dass *S. aureus* vom Stamm Newman wesentlich stärker in die Fibroblasten eindringen konnte, als eine Eap-negative Mutante (AH12). Exogenes Eap steigerte die Internalisierung von *S. aureus*, während die Vorbehandlung mit Anti-Eap-Antikörpern die Internalisierung verringerte (49).

Der von Hagggar und Kollegen 2003 beschriebene *S. aureus*-Stamm AH12 ist jedoch ein Newman-Derivat und exprimiert eine Kurzform von Eap Newman, die aus dem Sekretionssignalpeptid und einem Teil der Domäne 1 (siehe Abb. 1.1) besteht. Das bedeutet, dass der von Hagggar und Kollegen verwendete Stamm gar nicht Eap-negativ war, sondern lediglich Eap nicht in seiner vollen Länge exprimierte.

Außerdem fanden Kreikemeyer *et al.* (2002) in anderen Experimenten, dass sowohl die Eap-negativen wie die Wildtyp-Stämme in gleichem Maße internalisiert werden. Da in dieser Studie jedoch mit dem *S. aureus*-Stamm Phillips und auch anderen humanen Epithelzellen (HEp-2) gearbeitet wurde, sind Vergleiche hier nur mit Einschränkung möglich (85).

Die verschiedenen *S. aureus*-Stämme unterscheiden sich hinsichtlich der Expression von Eap und anderen Virulenzfaktoren und auch die verwendeten Zelllinien zeigen jeweils physiologische Unterschiede. Daher ist es meist nur unter Vorbehalt möglich, die Ergebnisse zu vergleichen.

#### 1.4.4.3 ICAM-1 interagiert mit Eap

ICAM-1 gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und zeichnet sich durch Immunglobulin-ähnliche extrazelluläre Domänen aus. Es kommt vor allem auf Lymphozyten, dendritischen Zellen und aktivierten Endothelzellen vor (71). Konstitutiv wird ICAM-1 unter physiologischen Bedingungen kaum exprimiert. Im Entzündungsgeschehen wird es jedoch nach Stimulierung, z.B. durch proinflammatorische Proteine wie TNF- $\alpha$  oder IL-1, verstärkt

gebildet, um die ICAM-1-vermittelte Rekrutierung der Leukozyten an den Ort der Entzündung zu ermöglichen (17, 127).

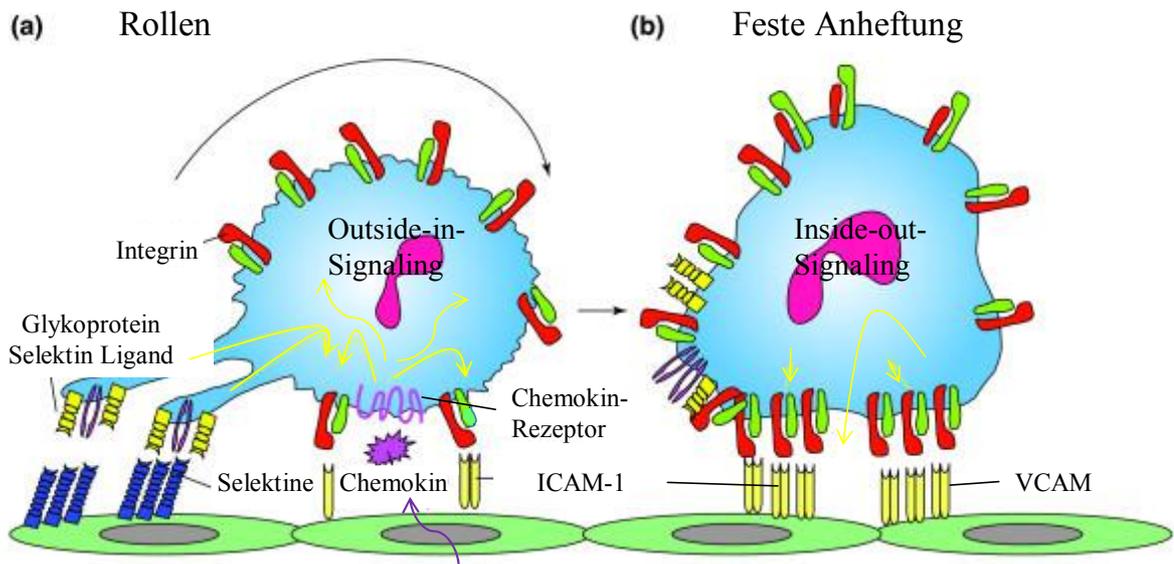
ICAM-1 spielt eine wichtige Rolle bei immunologischen Vorgängen, insbesondere bei der Leukozytenmigration aus Blutgefäßen ins entzündete Gewebe (Abb. 1.2). Dazu sind mehrere Schritte notwendig.

Zunächst kommt es zu einer Verlangsamung der Leukozytenbewegung („Rollen“) durch schwache Wechselwirkungen der L-Selektine auf der Leukozytenoberfläche und den E- und P-Selektinen auf den Endothelzellen mit Oligosaccharid-Liganden (Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Antigene) jeweils auf beiden Zelltypen. Chemokine sowie Komplementfaktor C5a oder Leukotrien B<sub>4</sub> wandern aus dem subendothelialen Bindegewebe ein, binden auf der apikalen Seite der Endothelzellen an Heparansulfate und werden so den Leukozyten präsentiert.

Dadurch kommt es zur Aktivierung von  $\beta_2$ -Integrinen der Leukozyten, wie dem Lymphozytenfunktionsassoziierten Antigen (LFA-1) oder Mac-1, und der Expression von  $\alpha_4\beta_1$ -Integrinen, wie dem Very Late Antigen-4 (VLA-4), auf der Leukozytenoberfläche. Dies geschieht über ein „Inside-out Signaling“. Das bedeutet, dass durch die Bindung der Chemokine an ihre G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sowie die Wechselwirkung der Selektine die inaktiven Integrine der Leukozyten durch intrazelluläre Signalkaskaden eine Konformationsänderung erfahren. Dadurch werden sie aktiviert und erhalten eine hohe Bindungsaffinität für die endothelialen Liganden ICAM-1 und „Vascular Cell Adhesion Molecule“ (VCAM).

Durch diese Bindung an Zelladhäsionsmoleküle des Endothels wie ICAM-1 und VCAM kommt es zu einer festen Anheftung der Leukozyten an die Gefäßwand. Die Adhäsionsmoleküle richten die Leukozyten aus, damit sie parazellulär durch die Endothelzellschicht ins entzündete Gewebe auswandern (Diapedese) und ihre Phagozytose-Funktion erfüllen können (55, 71, 139).

Eap interagiert mit ICAM-1 und stört so die Diapedese von Leukozyten. So zeigten Chavakis und Kollegen 2002, dass durch diese Interaktion eine feste Anheftung von Neutrophilen an die Endothelzellen blockiert wird und keine Transmigration mehr stattfinden kann. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch *in vivo*-Versuche im Peritonitis-Mausmodell, wo die Zahl der rekrutierten Neutrophilen erheblich niedriger war als in den Kontrollmäusen. Ebenso konnte die Arbeitsgruppe Preissner zeigen, dass bei Bindungsversuchen von Eap an immobilisiertes ICAM-1 die Bindung durch Heparin wieder aufgehoben werden konnte (16).



**Abb. 1.2:** Rollen und feste Anheftung eines Neutrophilen. Es kommt zunächst zum „Rollen“ (a) des Leukozyten durch Wechselwirkung der Selektine (blau) der Endothelzellen mit Selektin-Liganden (Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Antigen) des Leukozyten (gelb). Durch diese Bindung und zusätzliche Chemokine (violett) wird das „Inside-out Signaling“ (gelbe Pfeile) ausgelöst, das die inaktiven Integrine aktiviert (rot) und affin für deren Rezeptoren auf den Endothelzellen (gelb) macht. Diese Bindung führt dann zur festen Anheftung (b) und zur Transmigration der Leukozyten (139).

#### 1.4.4.4 Eap als anti-inflammatorischer und zugleich pro-inflammatorischer Faktor

Anti-inflammatorisch wirkt Eap, da es die Transmigration von Neutrophilen verhindert (16). Das dürfte auch der Grund dafür sein, dass in einigen Studien gezeigt werden konnte, dass Eap die Wundheilung verzögert (4). Denn die Wundheilung mit Wiederherstellung der Gewebeintegrität setzt eine Einwanderung von inflammatorischen Zellen ins Gewebe voraus. Das ist besonders in den ersten Phasen der Wundheilung wichtig. Nach Vasokonstriktion und Aktivierung der Blutgerinnungskaskade wandern Monozyten und Neutrophile ins Wundgebiet ein. Sie setzen hydrolytische Enzyme frei und Monozyten phagozytieren Zelltrümmer. Daran kann sich dann die Proliferations- und Reparationsphase anschließen (136).

Außerdem hat Eap einen inhibitorischen Effekt auf die Neovaskularisierung in der proliferativen Phase der Wundheilung, Eap wirkt somit anti-angiogen (133). Das konnte *in vivo* in Matrigel-Experimenten gezeigt werden (4). Zudem wird der anti-inflammatorische

Effekt dadurch ergänzt, dass Eap die Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-4 in peripheren mononukleären Blutzellen ("peripheral blood mononuclear cells", PBMC) induziert (68). IL-4 interagiert anti-inflammatorisch, da es Entzündungsreaktionen kontrolliert und verhindert, dass es zu einer zu starken Reaktion des Immunsystems kommt. Zudem stimuliert es die B-Zell-Aktivierung und die IgE-Produktion (60).

Jedoch gibt es auch einen pro-inflammatorischen Effekt von Eap. Eap aktiviert CD14<sup>+</sup> Zellen, wie PBMC, zur Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$ . IL-6 induziert die Bildung von Akute-Phase-Proteinen in der Leber und TNF- $\alpha$  ermöglicht unter anderem über eine Steigerung der ICAM-1-Expression die Diapedese von Neutrophilen im Entzündungsgeschehen (130). Im Gegensatz zur oben erwähnten Adhärenz sind zur Proliferation der PBMC sowohl die Eap-Domänen für sich alleine, als auch Eap in seiner vollen Länge in der Lage (66).

#### *1.4.4.5 Eap als immunomodulatorisches Protein*

Eap wird als Faktor in der Regulation von Immunantworten diskutiert. So induziert es z.B. die Synthese von IgM und IgG in PBMC (69). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Eap mit MHC II-Komplexen, lag die Vermutung nahe, dass Eap die T-Zellen über einen Superantigen-ähnlichen Mechanismus aktiviert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Eap nicht als Superantigen fungiert (siehe Kapitel 1.4.1) (48, 69).

Ein anderer Aspekt ist die Verschiebung der T-Helferzellantwort durch Eap in eine humorale anstatt zelluläre Abwehr. T-Helferzellen sind neben zytotoxischen T-Zellen und Natürlichen Killerzellen eine Untergruppe der T-Lymphozyten. Die T-Helferzellen werden noch einmal eingeteilt in Th1- und Th2-Populationen, je nachdem welche Zytokine sie sezernieren und welche Aufgabe sie demzufolge erfüllen (106).

Th1-Zellen schütten typischerweise Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-2 und TNF- $\alpha$  aus, wodurch Makrophagen aktiviert werden. Die Th1-Population reguliert die zelluläre Komponente der Immunantwort, die Th2-Zellen hingegen sind wichtig für den humoralen Teil, indem sie z.B. B-Zellen zur IgG Ausschüttung anregen. Seit mehreren Jahren ist noch eine dritte Sorte von T-Helferzellen, die Th17-Population, identifiziert. Sie produzieren IL-17 und IL-21 (84).

Eap ist in der Lage die T-Zellantwort zu verschieben z.B. durch verstärkte Sekretion von IL-4, und zwar auf die Seite der Th2-Population. Dies führt zu einer herabgesetzten Aktivität der Phagozyten, so dass *S. aureus* nicht komplett eliminiert werden kann, da die

Zell-vermittelte Th1-Immunantwort eine größere Rolle bei der Bekämpfung von Bakterien spielt als die humorale Th2-Immunantwort (46, 89).

Aufgrund seiner teilweise strukturellen Ähnlichkeit zu MHC II-Komplexen wurde vermutet, dass Eap die Interaktion von T-Zellen zu MHC-Molekülen blockt, indem es selbst an den T-Zell-Rezeptor bindet und eine Bindung der MHC-Moleküle verhindert. Andererseits bestand die Hypothese, dass Eap ebenfalls aufgrund der Homologie bestimmter Strukturen zu Superantigenen eine Quervernetzung von MHC-Molekülen und T-Zell-Rezeptor hervorrufen kann. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Eap weder die MHC-T-Zell-Rezeptor-Interaktion inhibiert noch als Superantigen fungiert (siehe 1.4.1). Es gibt lediglich eine unspezifische Quervernetzungs-Aktivität von Eap, für die mindestens zwei der sechs Domänen verantwortlich sind (102). Das bedeutet, dass Eap nur unwesentlich an der Interaktion von MHC-Molekülen und T-Zell-Rezeptor beteiligt ist.

## 1.5 Fragestellung der Arbeit

Wie in Kapitel 1.4.3 erwähnt, können Eap verschiedenste Funktionen zugewiesen werden: Neben der Adhärenz der *S. aureus*-Bakterien untereinander, was zur typischen traubenförmigen Anordnung von *S. aureus* führt, dient es auch der Adhäsion des Bakteriums an eukaryotische Zellen. Es beeinflusst das Immunsystem bzw. die Immunantwort des Menschen, indem es die Neutrophilen-Rekrutierung blockiert sowie als Folge dessen auch die Wundheilung verzögert. Außerdem besitzt Eap anti-inflammatorisches und anti-angiogenes Potenzial. Durch diese Mechanismen werden dem Bakterium gute Voraussetzungen geschaffen, dem menschlichen Immunsystem weitestgehend zu entkommen.

Neben verschiedenen Plasmaproteinen wie FBG, FN und VN wurde bisher ICAM-1 als ein wichtiger Bindungspartner für Eap identifiziert. Jedoch stellte sich die Frage, ob Eap auch an andere eukaryotische Zellrezeptoren als ICAM-1 binden kann und was nach Bindung an/in den eukaryotischen Zellen passiert. So sollte die vorliegende Arbeit unter anderem klären, ob Eap durch Bindung lediglich an der Oberfläche der Zellen verbleibt oder aktiv in das Zytoplasma der Endothelzellen aufgenommen wird. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob Eap über die Endothelzellen hinaus in die ECM, bzw. das Nabelschnurgewebe aufgenommen wird. Außerdem wurde die Lokalisation von Eap nach Aufnahme in die Zelle bezüglich der Verteilung im Zytoplasma und eventueller Lokalisation im Nucleus analysiert.

Daher wurde in dieser Arbeit die Aufnahme von Eap in makrovasculäre Endothelzellen *in vitro* und *ex vivo* die Interaktionen von Eap mit der Gefäßwand in der Nabelschnur untersucht. Dabei sollten folgende Fragen geklärt werden:

- i) Unter welchen Bedingungen wird Eap von Endothelzellen in das Zytoplasma aufgenommen?
- ii) Kann Heparin eine Aufnahme von Eap verhindern?
- iii) Welchen Einfluss auf die Aufnahme haben Heparansulfate auf der Zelloberfläche?
- iv) Gibt es noch andere Bindungspartner für Eap?
- v) Erhöht Eap die Permeabilität des Endothels und erleichtert so den Durchtritt toxischer Substanzen?
- vi) Wo genau innerhalb der Zelle ist Eap nach der Aufnahme lokalisiert?
- vii) Befindet Eap sich nach der Aufnahme auch in der ECM bzw. über das Endothel hinausgehend auch im subendothelialen Nabelschnurgewebe?

Es wurde untersucht, i) wie sich die Aufnahme von Eap bei verschiedenen Konzentrationen unterscheidet und ob niedrige Temperaturen von 4 °C eine Aufnahme reduzieren können. Ebenso wurde untersucht, ii) ob Heparin einen Einfluss auf die Internalisation von Eap hat, denn in früheren Arbeiten konnte u.a. gezeigt werden, dass Heparin Eap aus seiner Bindung mit ICAM-1 verdrängen kann. Es wurde der Frage nachgegangen, ob es einen Unterschied gibt, wenn Eap gleichzeitig mit Heparin inkubiert wurde oder wenn nach der Eap-Inkubation die Zellen bzw. die Nabelschnurvene mit Heparinhaltigem Puffer gewaschen wurden. Außerdem wurde analysiert, iii) welche Rolle Heparansulfate auf den Zelloberflächen bei der Aufnahme von Eap spielen, da diese häufig die Endozytose von Stoffen vermitteln.

Bereits bekannt war, dass Eap an ICAM-1 bindet, daher sollte überprüft werden, iv) ob es nicht noch andere Bindungspartner auf der Oberfläche der eukaryotischen Zellen gibt, wie beispielsweise „Receptor for Advanced Glycation Endproducts“ (RAGE) und „Platelet endothelial cell adhesion molecule 1“ (PECAM-1). In diesem Zusammenhang sollte auch erarbeitet werden, v) inwiefern sich durch eine eventuelle Änderung der PECAM-1-Expression die Permeabilität eines Endothelzell Monolayers ändert und so *S. aureus* Vorteile verschafft, indem der Durchtritt z.B. toxischer Substanzen erleichtert wird. Als letzte Frage wurde vi) der Lokalisation von Eap innerhalb der Zelle nachgegangen.

## **2 Methodik**

### **2.1 Zellkultur**

Die Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Bank durchgeführt (Holten Lamin Air, Thermo Scientific). Die Endothelzellen wurden in einem Begasungsbrutschrank (Sanyo Incubator MCO-17AIC) bei 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 97% und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% inkubiert und kultiviert. Die Isolierung von Primärzellen, deren Weiterkultivierung sowie die *ex vivo*-Experimente mit Nabelschnüren wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle Materialien und Geräte wurden vor ihrem Einsatz gereinigt, desinfiziert, sterilisiert oder autoklaviert.

#### ***2.1.1 Isolierung von humanen makrovaskulären Endothelzellen aus der Nabelschnur***

Die Nabelschnüre wurden von Patientinnen der Frauenklinik des Universitätsklinikums Gießen zur Verfügung gestellt. Alle Spenderinnen haben dazu ihr Einverständnis gegeben. Der Ethikantrag zur Verwendung von Nabelschnurmaterial zu wissenschaftlichen Zwecken wurde von der Gießener Ethik-Kommission am 29.10.2009 genehmigt (Aktenzeichen 132/09).

Die humanen Endothelzellen der Umbilikalvene aus der Nabelschnur („human umbilical cord vein cells“, HUVEC) wurden nach dem von Jaffe et al. (1973) etablierten Protokoll isoliert (67). Die Nabelschnur wurde nach der Entbindung bei 4 °C gelagert und war zum Zeitpunkt der Isolation nicht älter als 24 Stunden. Gepufferte Salzlösung nach Hank („Hanks buffered saline solution“, HBSS) und Kollagenase wurden vor ihrer Verwendung auf 37 °C erwärmt. Zunächst wurde die Nabelschnur äußerlich gesäubert und danach die Vene mit HBSS durchspült, um Verunreinigungen und Blutgerinnsel zu entfernen. Ein Ende der Vene wurde mit einer Arterienklemme verschlossen und anschließend Kollagenase injiziert. Nach 20 min Inkubation bei 37 °C wurden die abgelösten Endothelzellen mit HBSS in ein 50 ml-Röhrchen gespült, in dem Fetal Calf Serum (FCS) vorgelegt war. Sie wurden anschließend bei 1000 rpm (Heraeus Labofuge 400R) fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit Endothel-Zellmedium resuspendiert. Die so gewonnenen Endothelzellen wurden mit 20% FCS im Medium in eine kollagenbeschichtete Zellkulturschale ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie mit Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen und mit frischem Endothel-Zellmedium

(ohne zusätzliches FCS) inkubiert. Bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 85-90% wurden die Zellen für Experimente verwendet oder gesplittet.

### **2.1.2 Kultivierung der HUVEC**

Die Endothelzellen wurden auf Kollagen-beschichtete Zellkulturschalen ausgesät (58 cm<sup>2</sup>; Art.-Nr. 633971, Greiner). Sie wurden in „Endothelial Cell Basal Medium“ (ECBM) (Art.-Nr. C-22210, Promocell) kultiviert, dem Supplements (Art.-Nr. C-39210, Promocell) beigelegt waren (FCS 0,02 ml/ml, „Endothelial Cell Growth Supplement“ (ECGS, bovine hypothalamic extract) 0,004 ml/ml, „Basic Fibroblast Growth Factor“ (bFGF) 1 ng/ml, Heparin 90 µg/ml, Hydrocortison 1 µg/ml). Außerdem wurden sie mit Penicillin und Streptomycin (Art.-Nr. 15070063, Invitrogen) versetzt, um Bakterienwachstum zu vermeiden.

War ein Konfluenzgrad von 85-90% erreicht, wurden die Zellen gesplittet, falls sie nicht für Experimente verwendet wurden. Zum Splitten wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurde Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Lösung (TrypLE, Art.-Nr. A1217702, Invitrogen) dazu gegeben und für zwei bis drei Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Kontrolle unter dem Mikroskop wurden die Schalen abgeklopft. Die Ablösungsreaktion wurde mit Vollmedium abgestoppt und die Zellen in ein 50 ml-Röhrchen überführt, um bei 1000 rpm (Heraeus Labofuge 400R) fünf Minuten zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit frischem HUVEC-Medium resuspendiert. Sie wurden wiederum in Kollagen-beschichtete Zellkulturschalen ausgesät. Je nachdem, wie oft die Zellen gesplittet wurden, wurden sie mit der entsprechenden Passage versehen.

### **2.1.3 Zellzahlbestimmung**

Eine Zellzahlbestimmung musste vor dem Aussäen für die Experimente vorgenommen werden. Dazu wurde ein Cell Analyser System (CASY Cell Counter System Model DT. Schaerfe-System. Reutlingen) verwendet.

Es wurden jeweils 20 µl der trypsinierten, in Medium aufgenommenen Zellen zu 10 ml isotonischer Lösung (CASY Ton, Art.-Nr. 2501037, Omni Life Science, Bremen) gegeben. Der Counter führt drei Messvorgänge durch, indem er jeweils die Zellzahl in einem bestimmten Volumen der Lösung misst. Das Ergebnis der Messung wird als Größenverteilung am Computer dargestellt.

## 2.2 Inkubation mit Eap

### 2.2.1 Eap

Für die Eap-Isolation wurden zunächst *S. aureus* vom Stamm Newman in einer Übernachtskultur angesetzt. Die Bakterienkultur wurde zentrifugiert und die Bakterien mit Lithium-Chlorid lysiert. Durch weitere Zentrifugation erhielt man den Eap enthaltenden bakteriellen Überstand. Der vorgereinigte Rohextrakt wurde uns freundlicherweise aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums des Saarlandes aus Homburg zur Verfügung gestellt.

In Gießen fand die endgültige Aufreinigung durch „Fast Protein Liquid Chromatography“ (FPLC) statt. Zunächst wurde ein Kationenaustausch durch die Mono S<sup>TM</sup> (GE Healthcare Life Sciences) und anschließend eine Gelfiltration mit der Superdex 200 HR (GE Healthcare Life Sciences) durchgeführt. Durch Ultrazentrifugation mit Amicon Ultra-Filtern (Millipore) wurde die Eap-Lösung aufkonzentriert und das für die Experimente verwendete Eap in Hepes Buffered Saline (HBS) gelöst.

Für die Bindungsassays (siehe Kapitel 2.5) wurde Eap biotinyliert. Biotin ist ein Vitamin, das eine hohe Affinität zu Avidin und Streptavidin besitzt. Da es mit 244 Da relativ klein ist, kann es an viele Proteine konjugiert werden, ohne dass sich deren biologische Aktivität ändert. Biotin wird über eine Amid-Bindung an Lysinreste des Proteins gebunden (5). Zur Biotinylierung von Eap wurde das EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation Kit von Pierce, Thermo Fisher Scientific, Bonn, verwendet.

Damit eine adäquate Bindung des Biotins an Eap ermöglicht wird, muss Biotin im 20-fachen Überschuss dazugegeben werden. Zu 500 µl Eap mit der Konzentration 2,97 mg/ml Eap wurde 46,01 µl einer 10 mM Sulfo-NHS-Biotin Lösung in Ultra Pure Water (UPW) gegeben. Diese Werte konnten laut der Gebrauchsanleitung des Biotinylierungs-Kits ermittelt werden. Wichtig ist, dass Eap nicht in einem Puffer gelöst ist, der primäre Amine enthält, z.B. Tris Buffered Saline (TBS), da diese die Bindungsreaktion behindern können. In diesem Fall war Eap in HBS gelöst. Der Ansatz wurde zwei Stunden auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das überschüssige, nicht gebundene Biotin durch Dialyse mittels einer Zeba Desalt Spin column entfernt. Dazu wurde der Biotinylierungsansatz bei 1000 g zentrifugiert und mit PBS gewaschen.

Um den Erfolg der Biotinylierung zu testen, wurde der „4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid“ (HABA) Assay angewendet. Das biotinylierte Eap wurde zu einer Verbindung aus HABA und Avidin gegeben. Da Avidin eine höhere Affinität zu Biotin als zu

HABA hat, wird dieses aus der Verbindung verdrängt. Über die Absorption bei 500 nm im ELISA-Reader konnte man die Anzahl der gebundenen Biotin-Moleküle an ein Eap-Molekül bestimmen. Zusätzlich wurde die Biotinylierung mittels Western Blot kontrolliert.

Für die *in vitro*-Experimente wurden konfluente HUVEC verwendet. Zu Beginn wurden die Zellen mit ECBM + 0,1% Bovines Serum Albumin (BSA) gewaschen und danach mit Eap in unterschiedlichen Konzentrationen und unter verschiedenen Bedingungen stimuliert.

### **2.2.2 Verschiedene Eap-Konzentrationen**

Bei Experimenten mit HUVEC-Monolayern wurde 1, 5, 10 oder 20 µg/ml Eap in ECBM + 0,1% BSA auf die Zellen gegeben und drei Stunden bei 37 °C inkubiert.

Die Nabelschnüre wurden nach der Entbindung bei 4 °C gelagert und zeitnah (eine bis drei Stunden) weiterverarbeitet. Äußerlich wurden sie mit PBS gesäubert und die *V. umbilicalis* über eine Kanüle mit HBSS (Promocell) durchspült. Danach wurde unter verschiedenen Bedingungen mit Eap inkubiert. Dafür wurde 2 cm hinter der Knopfkanüle die Nabelschnur mit einem Kabelbinder abgeklemmt und 1, 5, 10 oder 20 µg/ml Eap in PBS über die Knopfkanüle in die *V. umbilicalis* injiziert. Nach der Injektion wurde die Nabelschnur kurz vor der Knopfkanüle ebenfalls mit einem Kabelbinder verschlossen, die Knopfkanüle entfernt und das entsprechende Stück von der Nabelschnur abgeschnitten. Die Nabelschnur wurde drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Nabelschnurstücke.

### **2.2.3 Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen**

Die Zellen wurden gewaschen, Eap in den entsprechenden Konzentrationen in ECBM + 0,1% BSA auf die Zellen gegeben und drei Stunden entweder bei 4 °C, bei Raumtemperatur (RT) oder bei 37 °C inkubiert. Die Behandlung der Nabelschnur erfolgte analog, d.h. die Nabelschnursegmente wurden nach Injektion von 20 µg/ml Eap bei 4 °C, RT bzw. 37 °C inkubiert.

### **2.2.4 Heparin im Inkubationsmedium bzw. Waschpuffer**

Für eine gleichzeitige Inkubation von Eap und unfraktioniertem Heparin (Heparin-Natrium, ratiopharm), wurden in ECBM + 0,1% BSA neben Eap auch 10 µg/ml Heparin gelöst, das entspricht etwas mehr als 0,1 I.E./ml Heparin. Als weitere Bedingung erfolgte eine alleinige Inkubation mit Eap und anschließendes Waschen mit 10 µg/ml Heparin im Waschpuffer PBS.

Ebenso wurde mit der *V. umbilicalis* der Nabelschnur verfahren. 20 µg/ml Eap wurden zusammen mit 10 µg/ml Heparin drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Außerdem wurde nach Inkubation von 20 µg/ml Eap mit 10 µg/ml Heparin in PBS gewaschen.

### ***2.2.5 Einfluss von Heparinase III***

Vor der Eap-Stimulation, wurden die Zellen mit Heparinase III vorbehandelt. Heparinase III spaltet ausschließlich das auf der Zelloberfläche vorhandene Heparansulfat und kein unfraktioniertes Heparin bzw. niedermolekulares Heparin. Die HUVEC wurden mit 1 U/ml Heparinase III in PBS eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde einmal mit 10% Glycin in PBS sowie einmal mit PBS gewaschen, um sicher zu gehen, dass alle Heparansulfate entfernt wurden. Dann wurde Eap in ECBM + 0,1% BSA für drei Stunden bei 37 °C auf die Zellen gegeben werden. Für die *ex vivo*-Experimente erfolgte ebenfalls vor der Inkubation mit Eap eine Vorinkubation mit 1 U/ml Heparinase III in PBS bei 37 °C. Anschließend wurde die Nabelschnur mit 10% Glycin in PBS, und danach mit HBSS durchspült. Nach Injektion von 20 µg/ml Eap in PBS wurde drei Stunden bei 37 °C inkubiert.

### ***2.2.6 Eap in der Extrazellulären Matrix***

Die HUVEC wurden drei Stunden mit 1, 5, 10 und 20 µg/ml Eap in ECBM + 0,1% BSA bei 37 °C inkubiert, mit PBS gewaschen und die Zellen entfernt. Dazu wurden die Zellen für 10 min mit 1% Triton X-100 in PBS bei RT permeabilisiert, anschließend die Lösung abgenommen und die Zellen abgelöst, indem für fünf Minuten mit 20 mM NH<sub>3</sub> in Aqua dest. inkubiert wurde (45). Die Lösung wurde abgenommen. Die ECM wurde mit ECBM + 0,1% BSA gewaschen, fixiert und angefärbt (Kapitel 2.3).

### ***2.2.7 Zeitverlauf***

In die *V. umbilicalis* wurden 20 µg/ml Eap in PBS injiziert und Proben genommen nach 15 min, 30 min, einer Stunde, zwei Stunden, drei Stunden, vier Stunden und fünf Stunden.

## **2.3 Immunhistochemie**

### ***2.3.1 Zellen für die Immunhistochemie***

Für die Experimente wurden HUVEC von Passage null (frisch isoliert) bis drei verwendet. Die Zellen wurden gewaschen und trypsiniert. Sie wurden in frischem HUVEC-Medium

resuspendiert. Für die immunhistochemischen Experimente wurden 50.000 Zellen pro Kollagen-beschichtete Objektträger mit Zellkulturkammern (Chamber slides) ausgesät. Am nächsten Tag wurde überprüft, ob die Zellen konfluent waren.

### **2.3.2 Fixierung**

#### *2.3.2.1 Fixierung der HUVEC*

Nach der Stimulation bzw. Inkubation mit Eap (siehe Kapitel 2.2) wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem Methanol/Aceton-Gemisch (1:1) bei Raumtemperatur 15 min fixiert. Bei der Methanol-Aceton-Fixierung werden die Zellen, im Gegensatz zu einer Fixierung mit Paraformaldehyd, permeabilisiert, so dass Strukturen im Zellinneren analysiert werden können (25).

#### *2.3.2.2 Fixierung der Nabelschnur*

Die Fixierung der Nabelschnurpräparate erfolgte mit dem "Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect" (HOPE<sup>®</sup>) (DCS Diagnostics, Hamburg). HOPE<sup>®</sup> ist eine relativ neue Methode der Fixierung, bei der die native Struktur von Makromolekülen weitgehend erhalten bleibt. Eine Quervernetzung der Molekülstrukturen im Gewebe bleibt aus, da kein Alkohol oder Aldehyde, wie z.B. Formalin, verwendet werden. Es können Antikörper eingesetzt werden, die bisher nur als „kryogängig“ charakterisiert waren, und die deshalb vorher nur eingeschränkt oder mit Vorbehandlung eingesetzt werden konnten (40, 112).

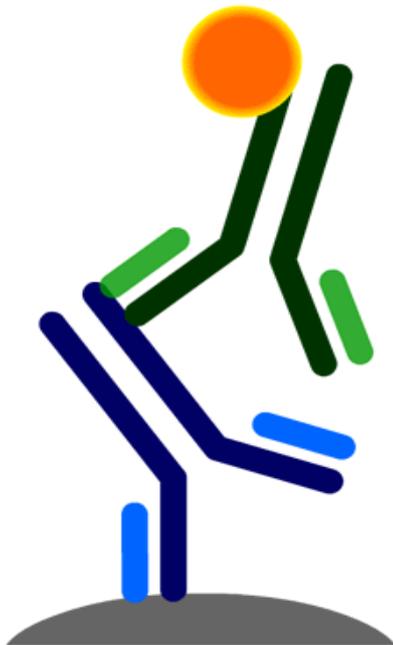
Als Gewebeprobe wurde ein ca. 8 mm breites Stück der Nabelschnur entnommen, und zwar ein unbehandeltes Stück als Kontrolle und jeweils ein Stück aus der Mitte der mit Eap inkubierten Nabelschnurabschnitte. Sie wurden mit PBS, bzw. mit PBS und Heparin (siehe Kapitel 2.3), gewaschen. Zur Fixierung wurden die Proben in eiskalte HOPE<sup>®</sup> I - Lösung gegeben und 18 bis 42 Stunden über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Die Gewebeprobe wurden zur Dehydratisierung zwei Stunden in HOPE<sup>®</sup> II/Aceton - Lösung (1:1000) und danach dreimal zwei Stunden in reines Aceton gegeben. Anschließend wurden sie zur Einbettung über Nacht in flüssiges Paraffin bei 54 °C gegeben und am nächsten Tag eingebettet in spezielle Präparateträger für das Mikrotom. Die eingebetteten Gewebeprobe wurden bis zum Schneiden bei 4 °C gelagert.

### **2.3.3 Herstellung von Gewebeschnitten der Nabelschnur**

Aus den in Paraffin fixierten Gewebestücken wurden mit dem Mikrotom 4 µm dicke Schnitte hergestellt. Diese wurden zum Strecken in ein Wasserbad mit 37 °C überführt und danach auf Adhäsivobjektträger (Super Frost Plus, Langenbrinck) aufgezogen. Gelagert wurden sie bei 4 °C. Freundlicherweise durfte das Mikrotom in der Frauenklinik der Universität Gießen benutzt werden.

### **2.3.4 Immunfluoreszenzfärbung**

Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte nach der indirekten Methode. Hierfür wird zunächst der spezifische Primärantikörper auf die Zellen aufgebracht. Anschließend folgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der sich gegen den Primärantikörper richtet. Der Sekundärantikörper ist mit einem Fluorochrom konjugiert und die Färbung lässt sich so im Fluoreszenzmikroskop nachweisen (Abb. 2.1).



**Abb. 2.1:** Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz  
Der Sekundärantikörper (grün) bindet an den spezifischen Primärantikörper (blau). Der Sekundärantikörper ist mit einem Fluorochrom (gelb) konjugiert.

#### **2.3.4.1 Immunfluoreszenzfärbung der Zellen**

Die Zellen wurden nach der Eap-Inkubation mit Tris Buffered Saline (TBS) gewaschen und eine Stunde bei Raumtemperatur mit 3% BSA/TBS-Tween (TBS-T) geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurden sie mit PBS gewaschen. Der Primärantikörper wurde in entsprechender Verdünnung (Tab. 2.1) in 1% BSA/TBS-T angesetzt und entweder bei 4 °C über Nacht oder eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

An Stelle des Primärantikörpers wurden bei jedem Färbevorgang auch Zellen mit einem Kontrollantikörper inkubiert, um später auszuschließen, dass die Färbungen durch unspezifische Bindungen hervorgerufen werden. Nach der Inkubation des Primär- bzw. des Kontrollantikörpers wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Darauf folgte die Detektion mit dem Sekundärantikörper. Dieser wurde speziesspezifisch zum Primärantikörper in 1% BSA/TBS-T eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert. Je nachdem welches Fluorochrom, entweder Alexa Fluor® 488 oder Alexa Fluor® 555, man verwendete, leuchtete das Signal im Mikroskop später rot (Anregung bei 553 nm; Emission bei 568 nm) oder grün (Anregung bei 493 nm, Emission bei 520 nm).

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete Antikörper zur Färbung der HUVEC

			<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Primärantikörper</b>				
	Eap F3H04	Monoclonal, mouse	1:300	Inhibitex
	PECAM-1	Monoclonal, mouse	1:100	DAKO
<b>Sekundärantikörper</b>				
	Alexa Fluor® 488	Donkey, anti-mouse	1:400	Invitrogen
	Alexa Fluor® 555	Donkey, anti-mouse	1:400	Invitrogen

Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde nochmals mit PBS gewaschen. Dies geschah im Dunkeln, um ein Ausbleichen der Fluoreszenz der Sekundärantikörper zu vermeiden. Dann wurde vorsichtig die Kammer mit der Dichtung vom Objektträger entfernt werden und die überschüssige Feuchtigkeit abgesaugt. Als letzter Schritt konnten nun die Zellen mit Vectashield inklusive 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Färbung eingedeckt werden. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der die DNA markiert, indem er sich in AT-reiche Regionen der DNA setzt (140) und sich somit zur Kernfärbung eignet. Nach 30 min wurden die Deckgläser auf den Objektträgern mit Nagellack abgedichtet. Bei Verwendung der IBIDI-Slides für die Konfokalmikroskopie folgte nach der Färbung mit dem Sekundärantikörper noch eine Kernfärbung mittels Hoechst-Farbstoff. Anschließend wurde mit ProLong Gold eingedeckt. Die Präparate wurden bei 4 °C und dunkel gelagert.

#### 2.3.4.2 Immunfluoreszenzfärbung der Nabelschnur

Zur Entparaffinierung wurden die Objektträger mit den Schnitten in eine Küvette mit 60 °C warmem Isopropanol gestellt und anschließend mit frischem 60 °C warmem Isopropanol gründlich gespült. Danach wurden sie durch 70%-iges külschrankkaltes Aceton rehydratisiert und zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Zum Ausgleich des pH-Wertes und des Salzgehaltes wurde anschließend mit PBS gewaschen.

Nach dem Waschen wurden die Objektträger einzeln entnommen, seitlich auf Zellstoff ausgeklopft und die Rückseite mit Zellstoff getrocknet. Das Gewebe wurde mit einem Fettstift, dem PAP pen, zweimal umrandet, um ein Abfließen der Antikörper-Lösungen zu verhindern. Danach wurden die Objektträger in eine mit feuchten Papiertüchern ausgelegte Immunhistoküvette gelegt, so dass eine feuchte Kammer entstand. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurden die Schnitte mit Blockpuffer (PBS + 0,1% Triton + 10% Donkey-Serum) inkubiert. Nach dem Blocken wurde der Primärantikörper in jeweils entsprechender Verdünnung im Antikörper-Puffer (PBS + 0,1% Triton + 1% Donkey-Serum) aufgetragen (Tab. 2.2) und entweder bei 4 °C über Nacht oder eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 2.2: In der Arbeit verwendete Antikörper zur Färbung der Nabelschnur

			<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Primärantikörper</b>				
Eap F3H04	Monoclonal, mouse	1:300	Inhibitex	
PECAM-1	Monoclonal, mouse	1:100	DAKO	
ICAM-1	Monoclonal, mouse	1:50	Santa Cruz	
<b>Sekundärantikörper</b>				
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Donkey, anti-mouse	1:400	Invitrogen	
Alexa Fluor <sup>®</sup> 555	Donkey, anti-mouse	1:400	Invitrogen	

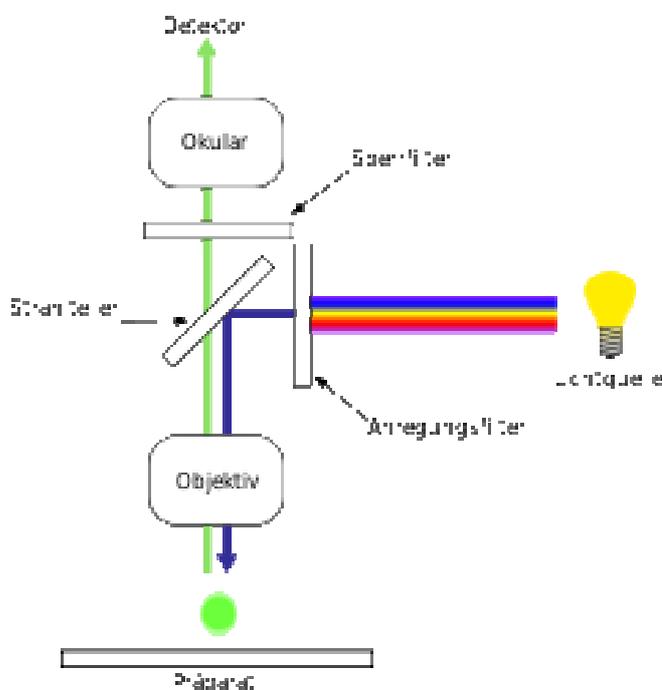
Bei jedem Färbeschritt wurden auch hier wieder Präparate mit Kontrollantikörpern inkubiert, um unspezifische Färbungen auszuschließen. Außerdem wurden die Nabelschnurspräparate zusätzlich als Positivkontrolle gegen den von Willebrand-Faktor (vWF) gefärbt.

Danach wurden die Schnitte mit PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper (siehe Tab. 2.2) wurde in entsprechender Verdünnung in PBS auf das Gewebe aufgetragen und eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde wiederum mit PBS gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte mittels Hoechst-Farbstoff. Sie wurde in TBS mit pH-Wert 7,6 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde mit PBS gewaschen und das Gewebe mit ProLong Gold luftblasenfrei abgedeckt und mit Nagellack abgedichtet. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei 4 °C.

### 2.3.5 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen

#### 2.3.5.1 Fluoreszenzmikroskop

Durch die Fluoreszenzmikroskopie können biologische Proben detailliert abgebildet werden und man erhält räumliche Informationen über die Probe. Das Konzept der Fluoreszenzmikroskopie besteht darin, dass die Fluorochrome anzuregen durch Licht einer bestimmten Wellenlänge und danach das Anregungslicht vom entstehenden Fluoreszenzlicht optisch zu trennen. Das Fluoreszenzlicht ist durch die Stokesverschiebung meist langwelliger (83) und kann auf einem Detektor abgebildet werden (Abb. 2.2).



**Abb. 2.2:** Prinzip eines Fluoreszenzmikroskopes

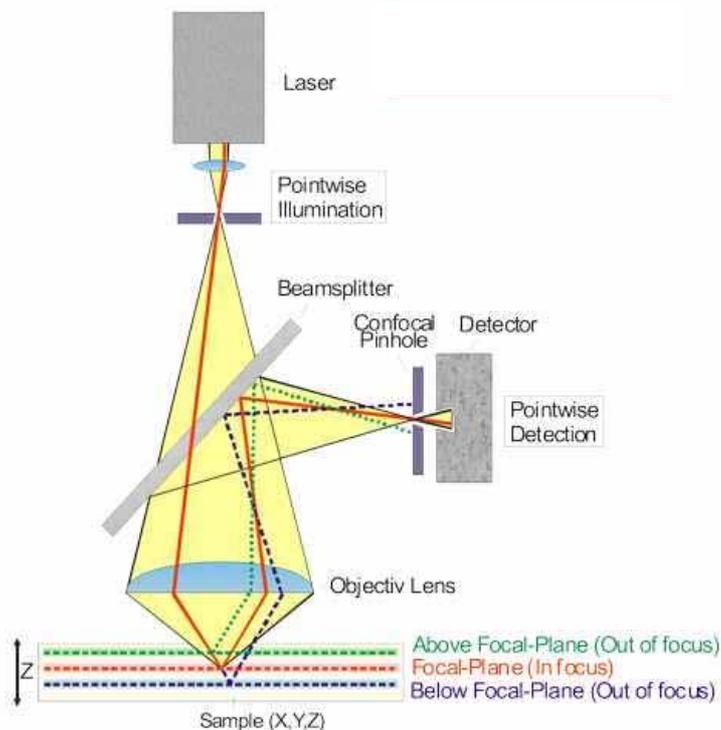
Die Lichtquelle wird durch einen Filter in ein Anregungslicht bestimmter Wellenlänge zerlegt. Dieses wird über den Strahlteiler durch das Objektiv auf das Präparat gelenkt und regt die Fluorochrome an, deren entstehendes Fluoreszenzlicht wird dann über das Okular wahrgenommen (Detektion).

Die Auswertung der Färbungen, *ex vivo* sowie *in vitro*, erfolgte zunächst am Fluoreszenzmikroskop Leica DMR mit der Software Metamorph. So konnte ein Überblick

über die Ergebnisse erlangt werden, und anschließend die Präparate ggf. noch am Konfokalmikroskop betrachtet werden.

### 2.3.5.2 Konfokales Lasermikroskop

Die konfokale Mikroskopie beruht auf dem von Marvin Minsky entwickelten und 1961 patentierten „zweifach fokussierendem Objekt-Raster-Mikroskop“. Bei einem konfokalen Mikroskop (Abb. 2.3) wird nur ein Fleck erleuchtet und nicht, wie bei der normalen Auflichtmikroskopie, das gesamte Präparat gleichmäßig (94). So wird die Entstehung von Streulicht verringert. Da allerdings auch Licht von den Bereichen ober- und unterhalb der Zielebene gestreut wird, gibt es eine auf die Zielebene abgestimmte Lochblende (*pinhole*) (119), die das von der Zielebene reflektierte Licht auf den Detektor leitet. Somit werden die Strahlen der Bereiche ober- und unterhalb der Zielebene eliminiert und ein scharfes Bild einer bestimmten Zielebene erzeugt. Durch Abtasten des Präparates im Rasterverfahren entsteht das Bild einer kompletten Schnittebene (94).



**Abb. 2.3:** Prinzip eines Konfokalmikroskopes

Durch einen Laser wird nur ein bestimmter Punkt auf einer bestimmten Ebene (Focal Plane (rot)) erleuchtet. Die Fluoreszenz, die von dieser Ebene ausgeht, wird über die Lochblende (Confocal Pinhole) auf den Detektor geleitet und wird abgebildet. Dagegen gelangt die Fluoreszenz, die von den Ebenen über und unter der Zielebene liegen (grün und blau) nicht durch die Lochblende, und wird absorbiert.

Ein konfokales Lasermikroskop (NIKON Eclipse TE2000-E) mit der C1plus/C1si Control software EZ-C1 (Version 3.80) (NIKON) wurde zur Auswertung der *in vitro*-Präparate verwendet. Die Zelle wurde in mehreren Ebenen untersucht. Bestimmte Zielebenen

wurden schärfer abgebildet als mit dem Fluoreszenzmikroskop. Das Konfokalmikroskop wurde zur Analyse der Lokalisation von Eap innerhalb der Zelle bei den *in vitro*-Experimenten benutzt.

#### *2.3.5.3 Quantifizierung*

Um die optischen Ergebnisse statistisch zu erfassen, wurden die Färbungen mit der Software Metamorph quantifiziert. Die untersuchten Immunfluoreszenzbilder sind außer im Ergebnisteil auch im Anhang aufgeführt. Da die *ex vivo*-Bilder Querschnittsaufnahmen darstellen, wurden zur Quantifizierung der Nabelschnurabbildungen Bilder mit annähernd gleicher Länge des darauf abgebildeten Endothels verglichen. Die *in vitro*-Bilder zeigen einen Endothelzell Monolayer, daher wurden Ausschnitte gleicher Größe des Zytoplasmas der HUVEC quantifiziert. Der Bereich des Farbenspektrums war bei jeder Messung identisch. Anschließend wurden die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen ermittelt (siehe Kapitel 2.6).

## **2.4 Zelluläre Permeabilität**

Um den Einfluss von Eap auf die Integrität eines HUVEC-Monolayers zu untersuchen, wurde ein Permeabilitätsassay durchgeführt und die Expression von PECAM-1 nach Eap-Inkubation untersucht.

### **2.4.1 Permeabilitätsassay**

#### *2.4.1.1 Stimulation*

Kollagen-benetzte Membranfilter (Millipore) mit einer Porengröße von 0,4 µm wurden in eine 24-well Platte gesetzt. Sechs Tage vor dem Experiment wurden 70.000 Zellen pro Filter ausgesät. Es wurden HUVEC der ersten und zweiten Passage verwendet. Es erfolgte jeden Tag ein Mediumwechsel. Für den Leerwert wurden auf einen Filter keine Zellen ausgesät. Am Tag des Experiments wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. 1, 5, 10 und 20 µg/ml Eap in PBS wurden ins untere Well und in den Filter pipettiert. Dann wurde drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC)-konjugiertes Dextran der Größe 10 kDa in den Filter gegeben.

### 2.4.1.2 Auswertung

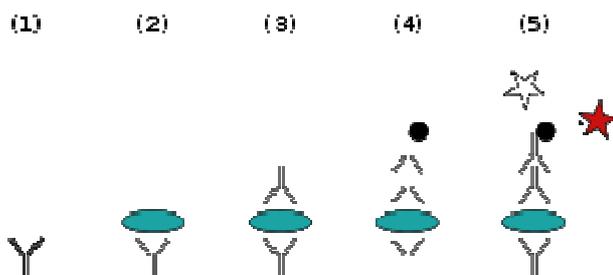
Nach 120 min wurde Medium aus dem unteren Well entnommen und in eine 96-Well Platte übertragen. Anschließend wurde die Fluoreszenz gemessen mit dem Fluoreszenz Mikroplatten Reader FLx800 (Bio Tek Instruments). Die Anregung geschah bei einer Wellenlänge von 485 nm, und die Emission betrug 528 nm. Für die Auswertung wurde die KC4™ Data Analysis Software (BioTek) benutzt.

### 2.4.2 Darstellung von PECAM-1

Die Darstellung von PECAM-1 erfolgte per Immunfluoreszenzfärbung (Kapitel 2.3). Ein konfluenter HUVEC Monolayer wurde drei Stunden mit 1, 5, 10 und 20 µg/ml Eap inkubiert und anschließend PECAM-1 mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Als Positivkontrolle für Adhäsionsverluste diente Thrombin. Denn Thrombin erhöht die Permeabilität von Endothelzellen und führt zu Adhäsionsverlusten (35, 36). Für die Behandlung mit Thrombin wurden die Zellen eine Stunde bei 37 °C mit 3 U/ml Thrombin in PBS inkubiert.

## 2.5 HUVEC-Bindungsassay

Um die Bindung von Eap an HUVEC zu untersuchen und zu quantifizieren, wurde ein Bindungsassay mittels Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Abb. 2.4) durchgeführt. Auf einer Mikrotiterplatte wird ein HUVEC Monolayer kultiviert, und dazu das Substrat, in diesem Fall biotinyliertes Eap, gegeben. Danach wird ein Detektionsantikörper, hier Streptavidin, das Horseradish-Peroxidase (HRP)-gekoppelt ist, hinzugegeben. Das Streptavidin bindet an das Biotin des Eaps. Durch Tetramethylbenzidin (TMB) und anschließende Zugabe von Schwefelsäure wird ein Farbumschlag erzeugt, der proportional zum gebundenen Eap ist.



**Abb. 2.4:** Prinzip eines Sandwich-ELISA

An die Zellen bindet biotinyliertes Eap (3). Streptavidin, das HRP-gekoppelt ist, bindet an das Biotin des Eap (4) und durch Zugabe von TMB und Schwefelsäure kommt es zu einem Farbumschlag (5).

### **2.5.1 Bindung des biotinylierten Eap an HUVEC**

Die HUVEC wurden ein Tag vor dem Experiment auf eine 96-Well Platte mit 15.000 Zellen pro Well ausgesät. Für die Experimente wurden konfluente HUVEC verwendet. Am Tag des Experiments wurden die Zellen mit ECBM + 0,1% BSA gewaschen. Danach wurde biotinyliertes Eap (siehe Kapitel 2.2.1) unter verschiedenen Bedingungen zu den Zellen gegeben. Die Bedingungen wurden jeweils in Triplikaten durchgeführt:

- Eap in verschiedenen Konzentrationen (0,01 bis 0,5 µg/ml)
- Eap zusammen mit 10 µg/ml Heparin
- Zeitverlauf: Inkubation mit 0,05 µg/ml Eap und 0,1 µg/ml Eap von 15 min bis 5 Stunden
- Inkubation bei 4 °C und 37 °C
- Vor der der Inkubation mit Eap erfolgte eine Vorinkubation mit 10 µg/ml Heparin

Die Vorinkubation wurde eine Stunde bei 37 °C in ECBM + 0,1% BSA durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug (außer bei den Zeitverläufen) drei Stunden. Anschließend wurde mit ECBM gewaschen. Anschließend wurde der Detektionsantikörper Streptavidin in PBS dazugegeben und 45 min inkubiert und mit PBS gewaschen. Danach konnte entwickelt und ausgewertet werden.

### **2.5.2 Entwicklung und Auswertung**

TMB-Lösung und Peroxid-Lösung wurden kurz vor der Verwendung im Verhältnis 1:1 gemischt und in die Wells pipettiert. Die blaue Farbentwicklung wurde nach ca. fünf Minuten gestoppt, indem 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hinzugefügt wurden. Es gab einen Farbumschlag in eine gelbe Färbung, deren Absorption bei 450 nm gemessen werden konnte. Die Messung erfolgte im Anschluss an die Entwicklung. Benutzt wurde der Absorptions Reader für Mikroplatten ELx808 (BioTek Instruments) und die KC4™ Data Analysis Software (BioTek).

## **2.6 Auswertung und Statistik**

Für die Quantifizierung der Immunfluoreszenz-Experimente wurden die im Anhang (Kapitel 9.2) aufgeführten Bilder herangezogen. Die *ex vivo*- und *in vitro*-Experimente wurden mit jeder Bedingung mindestens dreimal wiederholt. Die Ergebnisse waren reproduzierbar.

Obwohl die Methode einige Unsicherheitsfaktoren enthält (siehe Einleitung Kapitel 4), erlauben die entsprechenden Fallzahlen eine Interpretation der Ergebnisse.

Die Bindungsassays wurden vier- bzw. fünfmal wiederholt, wobei jede Bedingung in dem einzelnen Experiment in Triplikaten durchgeführt wurde.

Die angegebenen Standardabweichungen (s) für die Werte der Quantifizierung sowie der Bindungsassays wurden mit folgender Formel berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$$

Dabei entsprach  $\bar{x}$  dem Mittelwert der Quantifizierungs- bzw. Absorptionen und  $n$  der Anzahl der quantifizierten Bilder bzw. der Absorptionen.

### 3 Materialien

#### 3.1 Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 donkey anti-mouse IgG	Invitrogen (Molecular Probes), Karlsruhe
Alexa Fluor <sup>®</sup> 555 donkey anti-mouse IgG	Invitrogen (Molecular Probes), Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
anti-Eap-Antikörper (Monoklonal,Maus)	Inhibitex, R& D Facility, Alpharetta, Georgia, USA
anti-ICAM-1-Antikörper (Monoklonal,Maus)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-PECAM-1-Antikörper (Monoklonal,Maus)	DAKO Cytomation, Hamburg
Bovine Serum Albumin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Collagen Typ I	BD Biosciences, Heidelberg
Collagenase	Worthington, Lakewood, USA
Endothelial Cell Basal Medium + Supplement Pack (Fetal Calf Serum 5%, Epidermal Groth Factor, Basic Fibroblast Growth Factor, Heparin, Hydrocortisone)	Promocell, Heidelberg
Ethanol	Roth, Karlsruhe
EZ-Link-Sulfo-NHS-Biotinylation Kit	Pierce, Thermo Fisher Scientific, Bonn
Fetal bovine serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Hanks` Buffered Saline (HBSS)	Promocell, Heidelberg
Heparin	Ratiopharm, Ulm
Heparinase III	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Hoechst-Färbung	Invitrogen (Molecular Probes), Karlsruhe

HOPE <sup>®</sup> I + II Lösungen	DCS Diagnostics, Hamburg
Human umbilical vein endothelial cells	Selbst isoliert
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mounting medium, Vectashield	Vector Laboratories, Peterborough, UK
Mouse control IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Paraffin	DCS Diagnostics, Hamburg
Penicillin	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe
Prolong	Invitrogen (Molecular Probes), Karlsruhe
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe
Streptavidin, HRP-gekoppelt	DAKO Cytomation, Hamburg
Streptomycin	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe
Thrombin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
TMB Substrate Kit	Pierce, Fisher Thermo Scientific, Bonn
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton-X 100	Roth, Karlsruhe
TrypLE™	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Ultra Pure Water	Biochrom, Berlin

### 3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

8-well-chamber slides	NUNC, Rochester, USA (für Fluoreszenzmikroskopie) Ibidi, München, (für Konfokalmikroskopie)
Bechergläser	Schott, Mainz
C1plus/C1si Control software EZ-C1	NIKON, Düsseldorf
CASY Cell Counter System Model DT	Schaerfe System, Reutlingen
Combitips plus(1.0, 2.5, 5.0 und 10 ml)	Eppendorf, Hamburg
Drei-Wege-Hahn	Braun, Melsungen
Einbettkassetten	MAGV GmbH, Rabenau-Londorf
Eindeckgläser 18 x 18 mm	Menzel, Braunschweig
Eindeckgläser 24 x 60 mm	Roth, Karlsruhe
Einmal-Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Eppendorf Tubes (0.5, 1.0 und 2.0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop Leica DMR	Leica Microsystems, Wetzlar
FLx800™ Fluorescence Microplate Reader	Bio Tek Instruments, Bad Friedrichshall
Heraeus Instruments Labofuge 400 R	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Inkubator Sanyo MCO-17AIC	Sanyo Laborgeräte, München
Kabelbinder	Cimco, Remscheid
Kanülen	Terumo, Eschborn
KC4™ Data Analysis Software	Bio Tek Instruments, Bad Friedrichshall
Konfokalmikroskop Eclipse TE2000-E	NIKON, Düsseldorf
Methamorph software 7.0	Molecular Devices, Ismaning
Mikroskop Wilowert 30	Hund, Wetzlar
Mikrotom Leica RM	Leica Microsystems, Wetzlar

Nagellack	Rival de Loop, Berlin
PAP Pen (Fettstift)	Beckman Coulter, Krefeld
Pipettenspitzen (2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson, Limburg
Polypropylen-Röhrchen 15 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Spritzen Luer lock (2 ml, 25 ml, 50 ml)	Omnifix Braun, Melsungen
Steril-Bänke Holten Lamin Air	Thermo Fisher Scientific, Bonn
SuperFrost <sup>®</sup> -Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen
Zellkulturschalen	Greiner bio-one, Frickenhausen

## 4 Ergebnisse

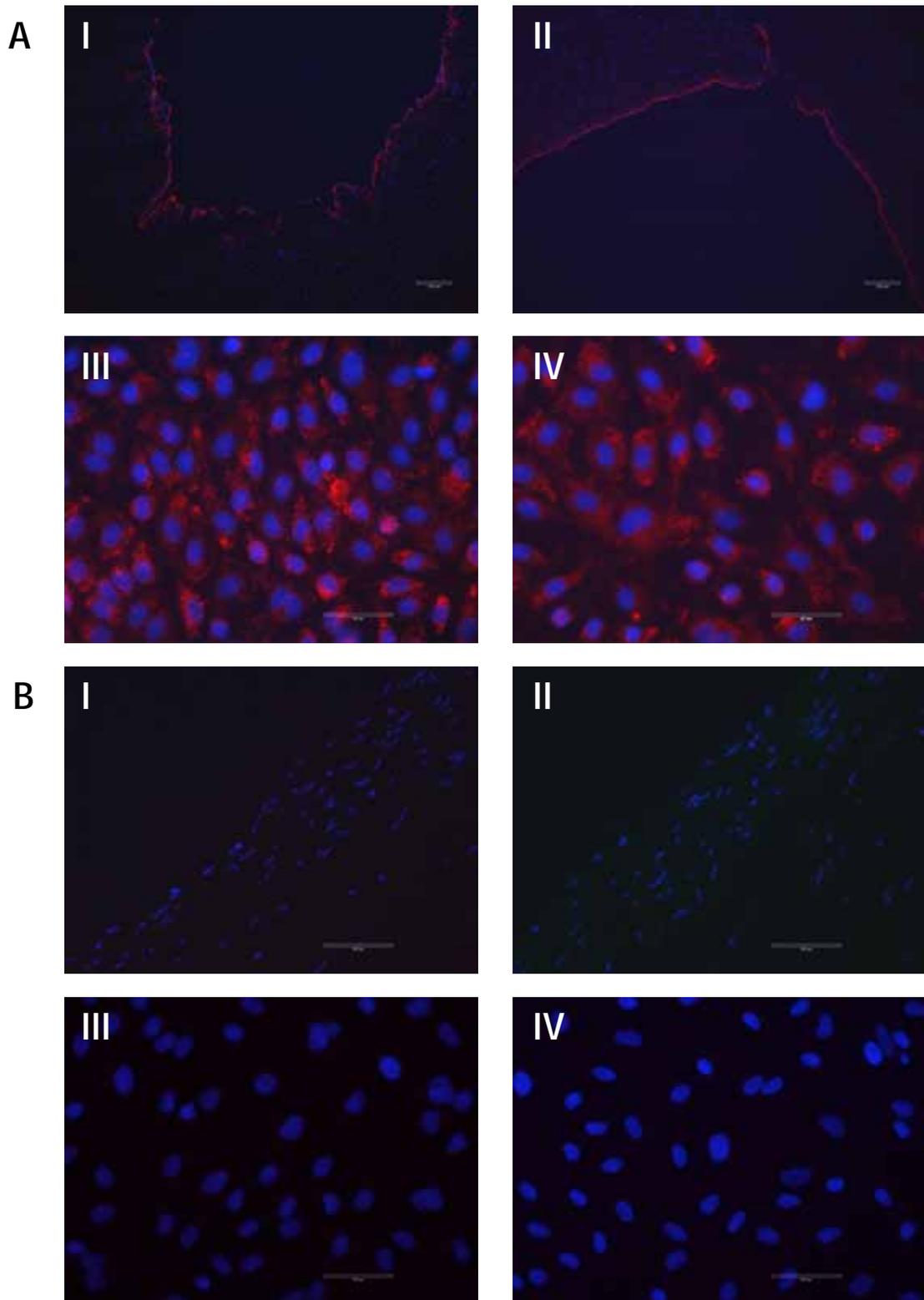
Zunächst wurde die Bindung von Eap an makrovaskuläre Endothelzellen (HUVEC) untersucht. Dafür wurden Bindungsassays mit biotinyliertem Eap an HUVEC durchgeführt, die im ELISA-Verfahren ausgewertet wurden.

Neben der Bindung von Eap sollte auch die Aufnahme von Eap in Endothelzellen im Hinblick auf verschiedene Aspekte untersucht werden. Untersucht wurde, inwiefern sich die Aufnahme von Eap bei unterschiedlichen Inkubationszeiten, bei verschiedenen Temperaturen, dem Einfluss von Heparin, nach Entfernung von Heparansulfaten auf der Zelloberfläche ändert und welche Rolle die ECM spielt.

Dies wurde *ex vivo*, durch Experimente mit Gefäßendothel der *V. umbilicalis* von Nabelschnüren, sowie auch *in vitro* mit isolierten HUVEC durchgeführt. Eap wurde durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Nach der Inkubation mit Eap wurde ein gegen Eap gerichteter Antikörper auf die Zellen bzw. die Nabelschnurschnitte gegeben und dieser Primärantikörper wurde wiederum von einem Sekundärantikörper gebunden, der mit einem Fluorochrom gekoppelt war. Daher war eine Färbung gleichzusetzen mit einer Bindung und Aufnahme von Eap. Um die Ergebnisse zusätzlich graphisch darzustellen, wurden die mikroskopischen Aufnahmen der Färbungen mit der Software Metamorph quantifiziert.

Als Positivkontrolle der *ex vivo*-Experimente wurde bei jedem Färbeschritt zusätzlich gegen den vWF gefärbt, um sicher zu gehen, dass es sich um Endothel handelt und dieses nicht bei der Durchführung der Experimente beschädigt oder abgelöst wurde. Denn der vWF wird neben Thrombozyten vor allem von Endothelzellen gebildet. Die Färbung gegen den vWF fiel in allen Experimentreihen positiv aus, unabhängig von einer Eap-Inkubation und bestätigt damit, dass das Endothel zum Zeitpunkt der Experimente intakt war. Um unspezifische Färbungen auszuschließen, wurde bei ebenfalls bei jedem Färbeschritt zusätzlich ein Kontrollantikörper aufgetragen, der die Negativkontrolle darstellte. In Abb. 4.1 sind exemplarisch eine vWF-Färbung sowie Negativkontrollen der *V. umbilicalis* bzw. von HUVEC dargestellt.

Außerdem wurde untersucht, ob Eap einen Einfluss auf die Permeabilität von HUVEC hat. Dies wurde durch Permeabilitätsassays, in denen der Durchfluss durch HUVEC-Monolayer nach Eap-Inkubation bestimmt wurde, sowie durch die Darstellung von PECAM-1 und Änderung der Verteilung von PECAM-1 nach Eap-Inkubation durch Immunfluoreszenz untersucht.

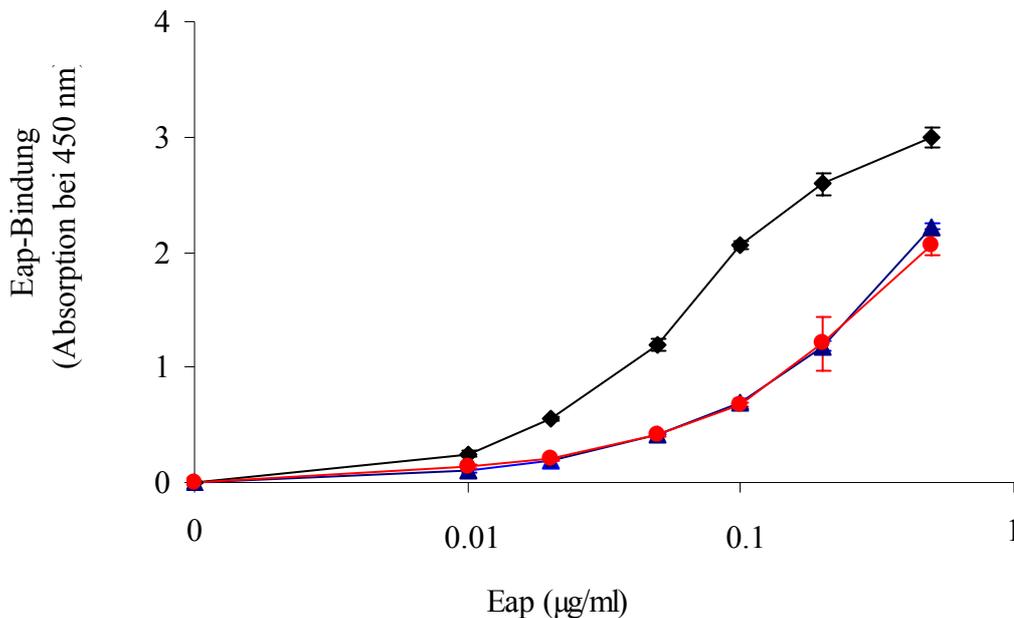


**Abb. 4.1:** Positiv- und Negativkontrolle der *V. umbilicalis* bzw. HUVEC. Das Endothel der *V. umbilicalis* wurde unbehandelt (A I) und nach Eap-Inkubation (A II) als Positivkontrolle gegen den vWF gefärbt. Dementsprechend wurde auch die Positivkontrolle der unbehandelten (A III) bzw. mit Eap behandelten (A IV) HUVEC durchgeführt. Die Negativkontrolle der unbehandelten (B I) und mit Eap inkubierten Nabelschnurvene (B II) erfolgte durch Kontrollantikörper, genauso wie die Negativkontrolle der unbehandelten (B III) und mit Eap (B IV) behandelten HUVEC.

#### 4.1 Die Bindung von Eap an HUVEC wird durch Heparin und bei 4 °C reduziert.

Zunächst wurde die Bindung von Eap an HUVEC durch Bindungsassays untersucht. Um die Menge des gebundenen Eaps an HUVEC unter verschiedenen Bedingungen zu bestimmen, wurden Bindungsassays an HUVEC Monolayern in 96-Well-Platten durchgeführt. Eap wurde zuvor biotinyliert (siehe Kapitel 2.2.1). So konnte nach der Eap-Inkubation mittels Streptavidin und TMB ein Farbumschlag erzeugt werden, dessen Absorption gemessen wurde und proportional zum gebundenen Eap war.

Je höher die Konzentration von Eap während der Inkubation war, desto höher war auch die Menge des an HUVEC gebundenen Eaps. Besonders ab einer Konzentration von 0,02 µg/ml Eap zeigt die Kurve einen starken Anstieg (Abb. 4.2 ♦).

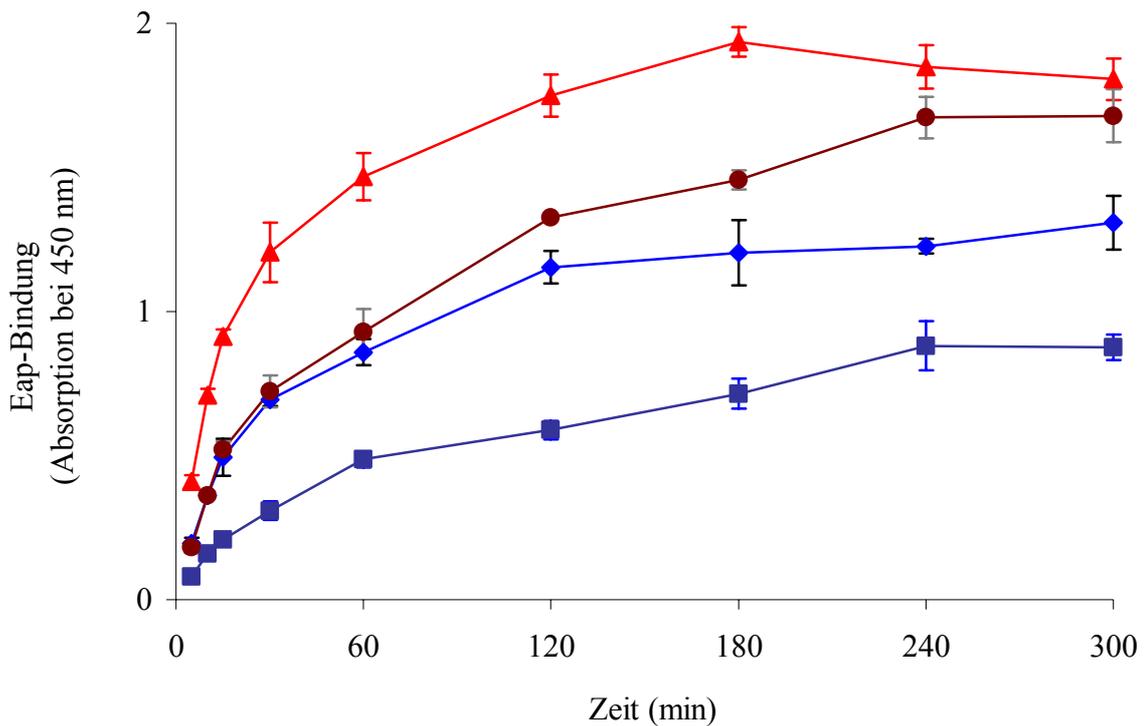


**Abb. 4.2:** HUVEC-Eap-Bindungsassay (n=4) mit verschiedenen Konzentrationen und unter dem Einfluss von Heparin. Die HUVEC wurden drei Stunden mit 0,01 bis 0,5 µg/ml biotinyliertem Eap, bzw. Eap gleichzeitig mit 10 µg/ml Heparin inkubiert. Außerdem wurden HUVEC vor der Eap-Inkubation eine Stunde vorinkubiert mit 10 µg/ml Heparin. Die Bindung des biotinylierten Eaps an die Zellen wurde durch Absorption bei 450 nm im ELISA Reader gemessen. Die schwarze Linie (♦) stellt die alleinige Eap-Inkubation dar, während die blaue Linie (▲) die Inkubation von Eap zusammen mit Heparin zeigt. Die rote Linie (●) gibt die Werte nach Vorinkubation mit Heparin und anschließender Eap-Inkubation wieder. Abgebildet sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen.

Bei gleichzeitiger Inkubation von Eap und Heparin ist die Menge an gebundenem Eap reduziert. Diese Reduktion ist ebenfalls abhängig von der Menge des verwendeten Eaps (Abb. 4.2 ▲).

Eine verringerte Eap-Bindung zeigte sich auch nach Vorinkubation mit Heparin. Der Kurvenverlauf (Abb. 4.2 ●) ähnelte dem der Kurve der gleichzeitigen Inkubation mit Eap und Heparin.

Im Zeitverlauf der Eap-Inkubation (Abb. 4.3) zeigte sich sowohl bei Inkubation mit 0,05 µg/ml als auch bei 0,1 µg/ml Eap eine zunächst zeitabhängige Steigerung der Menge an gebundenem Eap, die sich nach 180 min jedoch nicht mehr stark ändert. Außerdem stellt sich auch hier wieder die von der Eap-Konzentration abhängig höhere Bindung bei Inkubation mit 0,1 µg/ml Eap als bei 0,05 µg/ml dar.



**Abb. 4.3:** HUVEC-Eap-Bindungsassay (n=3) im Zeitverlauf und bei verschiedenen Temperaturen. HUVEC wurden von 15 min bis 5 Stunden mit 0,05 bzw. 0,1 µg/ml biotinyliertem Eap inkubiert. Dies geschah jeweils bei 37 °C und bei 4 °C. Die Bindung des biotinylierten Eaps an die Zellen wurde mittels Absorption bei 450 nm im ELISA Reader gemessen. Die hellrote Linie (▲) zeigt die Inkubation von 0,1 µg/ml Eap bei 37 °C und die dunkelrote Linie (●) die Inkubation bei 4 °C. Die hellblaue Linie (◆) stellt die Inkubation von 0,05 µg/ml Eap bei 37 °C dar und die dunkelblaue Linie (■) bei 4 °C. Abgebildet sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen.

Auch im Hinblick auf die Inkubationstemperaturen war ein Unterschied zu erkennen (Abb. 4.3). Sowohl nach einer Inkubation von 0,05 µg/ml Eap als auch nach Inkubation mit 0,1 µg/ml Eap gab es jeweils eine erkennbar größere Bindungsrate nach Inkubation bei 37 °C als nach Inkubation bei 4 °C.

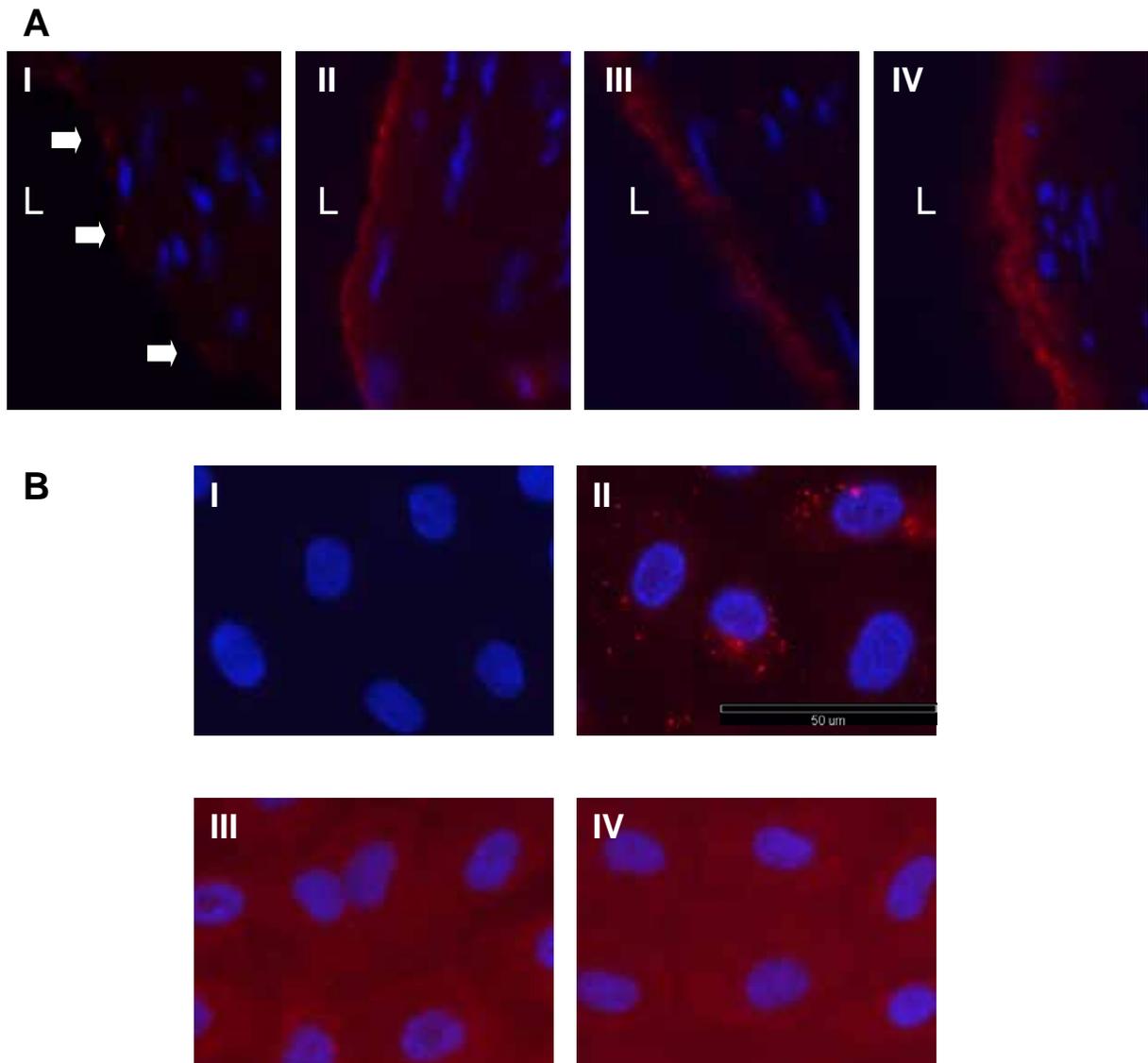
## **4.2 Die Aufnahme von Eap in Endothelzellen erfolgt konzentrationsabhängig.**

Um zu prüfen, welche Konzentrationen für die Aufnahme von Eap eine Rolle spielen oder ob es evtl. eine Sättigung gibt, wurden verschiedene Konzentrationen (1, 5, 10 und 20 µg/ml Eap) eingesetzt. Die Aufnahme von Eap in Endothelzellen wurde durch Immunfluoreszenzfärbung mittels anti-Eap-Antikörper dargestellt (siehe Kapitel 2.2: Immunhistochemie).

Untersucht wurde die Aufnahme *ex vivo* (Abb. 4.4A), also die Aufnahme von Eap in die Endothelzellen der *V. umbilicalis* der Nabelschnur, sowie *in vitro* (Abb. 4.4B), d.h. die Aufnahme in einen Monolayer von HUVEC. Die Intensität der Färbung wurde quantifiziert mit dem Programm Metamorph.

Die Unterschiede in der Intensität der Färbung sind *ex vivo* ausgeprägter als *in vitro*. Bei Inkubation mit 1 µg/ml Eap (Abb. 4.4A I) sind lediglich einzelne punktuelle Färbungen (Pfeile in Abb. 4.4A I) zu erkennen, während bei 5 µg/ml (Abb. 4.4A II) ein dünner, aber durchgehender Saum auf den Endothelzellen zu erkennen ist. Wurde die Nabelschnur mit 10 bzw. 20 µg/ml Eap (Abb. 4.4A III und IV) inkubiert, so war die Färbung nicht auf die Endothel-Zellschicht beschränkt, sondern Eap war auch im Nabelschnurgewebe über das Endothel hinaus nachweisbar. Dies war bei Inkubation mit 20 µg/ml Eap ausgeprägter als bei Inkubation mit 10 µg/ml Eap.

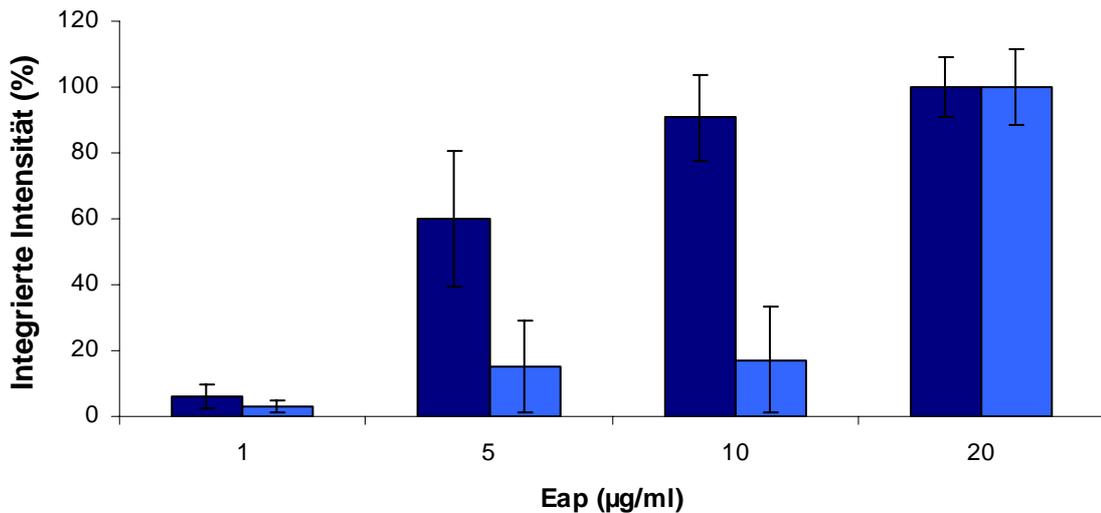
*In vitro* ist der Unterschied zwischen der Konzentration von 1 µg/ml Eap (Abb. 4.4B II) und 5 µg/ml Eap (Abb. 4.4B III) deutlich zu sehen. Die Kontrolle (Abb. 4.4B I) zeigt, dass der Antikörper Eap-spezifisch ist, da die Kontrolle ungefärbt bleibt. Bei Inkubation mit 1 µg/ml Eap sind in die Zellen nicht homogen gefärbt, wie bei 5, 10 und 20 µg/ml, sondern man sieht einzelne intrazelluläre punktuelle Färbungen. Bei Inkubation von 5 und 10 µg/ml Eap (Abb. 4.4B III und IV) ist die Färbung ähnlich homogen. Der Unterschied zeigt sich aber in der Intensität der Färbung, wie die Quantifizierung (Abb. 4.5) zeigt.



**Abb. 4.4:** Aufnahme von Eap in Endothelzellen. Die *V. umbilicalis* und makrovaskuläre Endothelzellen (HUVEC) wurden nach dreistündiger Eap-Inkubation immunhistochemisch gegen Eap gefärbt. (A) Inkubation der Nabelschnur mit (I) 1 µg/ml Eap, (II) 5 µg/ml Eap, (III) 10 µg/ml Eap und (IV) 20 µg/ml Eap. (B) Inkubation der HUVEC (I) ohne Eap (II) 1 µg/ml Eap, (III) 5 µg/ml Eap und (IV) 10 µg/ml Eap. L = Lumen der Nabelschnur  
(Weitere Bilder dazu siehe Anhang Kapitel 9.2.1.1 und 9.2.2.1)

Entspricht die Aufnahme von Eap bei Inkubation von 20 µg/ml Eap 100%, so waren es *in vitro* bei Inkubation von 5 µg/ml Eap noch bei 60% und nach Inkubation mit 10 µg/ml Eap noch 90%, die aufgenommen wurden.

Stärker war der Unterschied *ex vivo*, da die Aufnahme von Eap nach Inkubation von 5 µg/ml Eap nur knapp 20% dessen betrug, was nach Inkubation mit 20 µg/ml Eap aufgenommen wurde.



**Abb. 4.5:** Quantifizierung der Aufnahme von Eap in Endothelzellen. Die Nabelschnurvene bzw. die HUVEC wurden drei Stunden mit 1, 5, 10 und 20 µg/ml Eap inkubiert und immunhistochemisch angefärbt. Die Färbung wurde anschließend quantifiziert. Die hellblauen Säulen geben die Werte der Nabelschnur-Experimente und die dunkelblauen Säulen die der *in vitro*-Experimente mit HUVEC wieder. Dargestellt sind die Mittelwerte der Quantifizierung mit den Standardabweichungen.

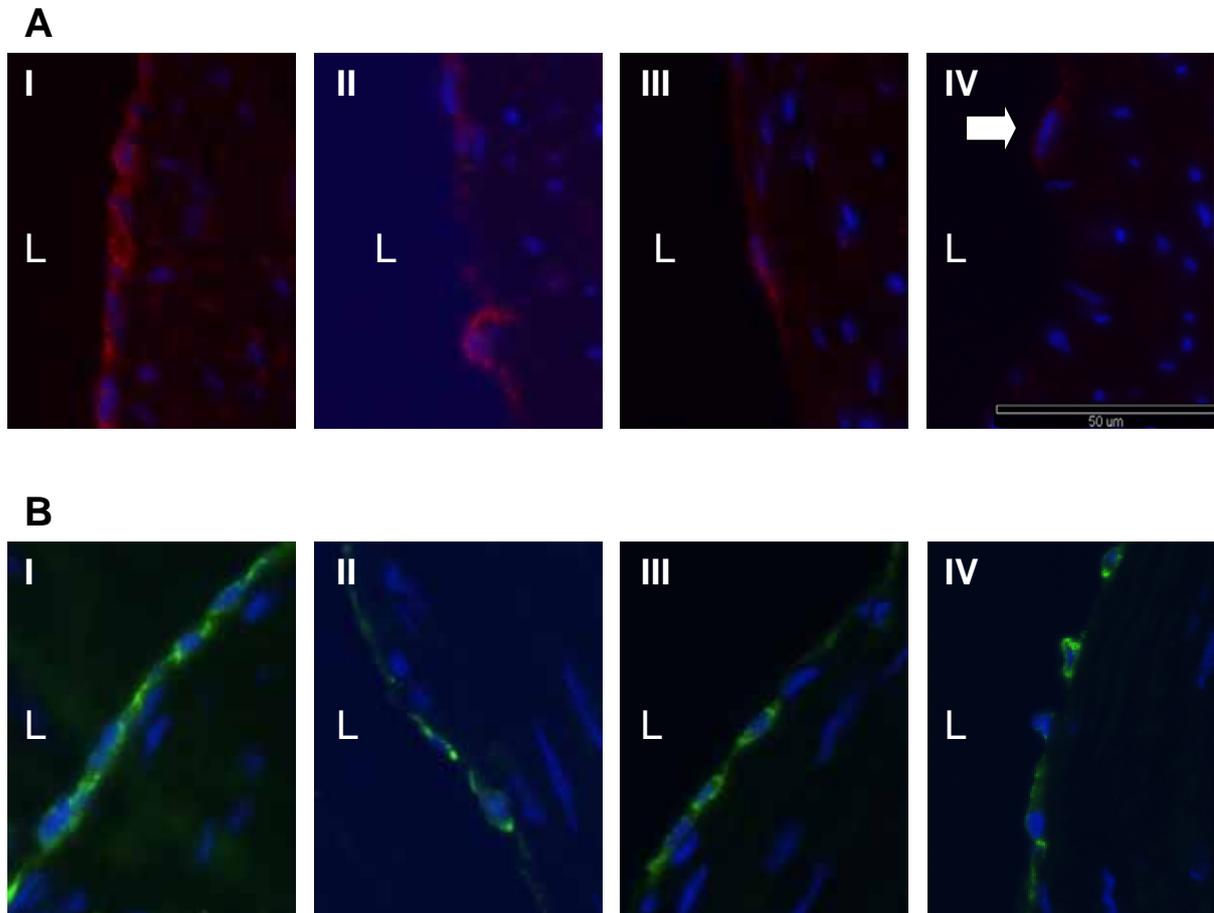
### 4.3 ICAM-1 und PECAM-1 werden nach Eap-Inkubation weniger exprimiert.

ICAM-1 konnte als Bindungsstelle für Eap identifiziert werden. Daher sollte geprüft werden, ob es nach Eap-Inkubation zu einer reduzierten Darstellung von ICAM-1 kommt, da durch eine Blockade von Eap die anti-ICAM-1-Antikörper nicht mehr binden können aufgrund einer Konkurrenz zwischen der Eap-Interaktion und der Antikörper-Bindung ans Endothel.

Um zu untersuchen, inwiefern sich die Expression von ICAM-1 sowie PECAM-1 nach Eap-Inkubation ändert, wurden sie nach Eap-Inkubation durch Immunfluoreszenzfärbung mittels anti-ICAM-1-Antikörper und anti-PECAM-1-Antikörper dargestellt. Quantifiziert wurde die Färbung durch das Programm Metamorph.

In der Kontrolle ohne Eap-Behandlung (Abb. 4.6A I) war ICAM-1 durchgehend am Endothel der *V. umbilicalis* erkennbar. Abhängig von der Eap-Konzentration während der Inkubation konnte ICAM-1 (Abb. 4.6A) reduziert dargestellt werden. So zeigte sich bei der Quantifizierung (Abb. 4.7), dass nach Inkubation mit 20 µg/ml Eap (Abb. 4.6A IV) nur noch 5% des ICAM-1 angefärbt werden konnte, was bei der Kontrolle (Abb. 4.6A I) zu sehen war.

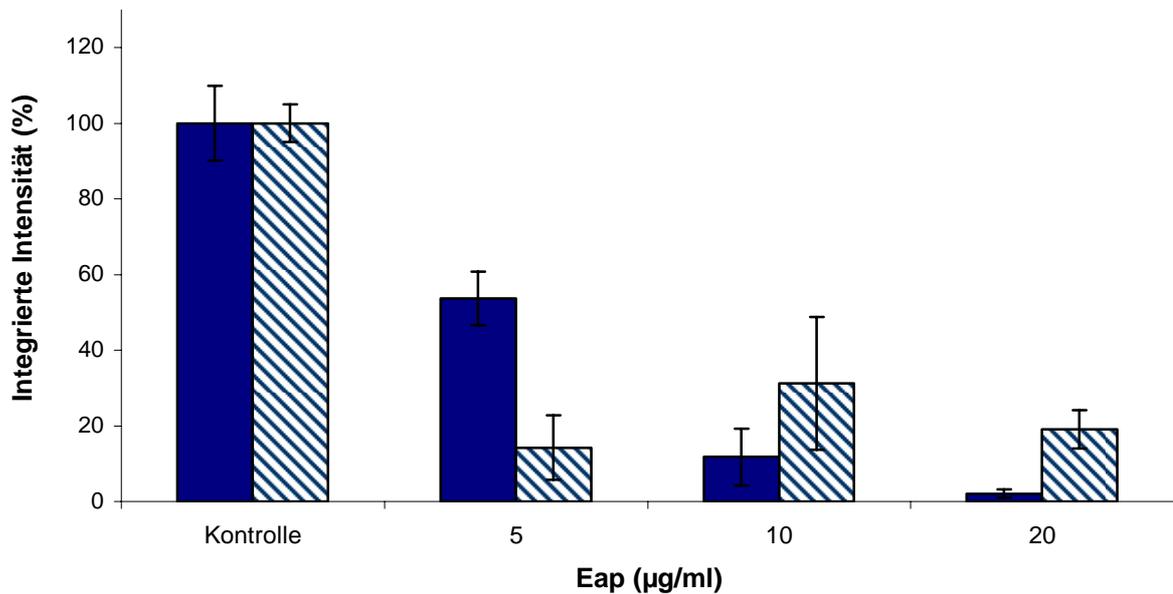
ICAM-1 war nicht mehr durchgängig verteilt, sondern lediglich noch vereinzelt (Pfeil in Abb. 4.6A IV).



**Abb. 4.6:** ICAM-1 und PECAM-1 nach Eap-Inkubation. ICAM-1 und PECAM-1 wurden nach dreistündiger Inkubation der Nabelschnurvene mit 5, 10 und 20 µg/ml Eap durch Immunfluoreszenz dargestellt. (A) Die Nabelschnur wurde gegen ICAM-1 gefärbt. (I) zeigt die Kontrolle ohne Eap-Inkubation und nach Inkubation mit (II) 5 µg/ml Eap, (III) 10 µg/ml Eap und (IV) 20 µg/ml Eap (B) Die Nabelschnur wurde gegen PECAM-1 gefärbt. Abgebildet ist die (I) Kontrolle ohne Eap-Inkubation, bzw. die Nabelschnurvene nach Inkubation mit (II) 5 µg/ml Eap, (III) 10 µg/ml Eap und (IV) 20 µg/ml Eap. L = Lumen der Nabelschnur (Weitere Bilder dazu siehe Anhang Kapitel 9.2.1.2 und 9.2.1.3)

Auch PECAM-1 war in der Kontrolle ohne Eap-Behandlung (Abb. 4.6B I) ebenfalls durchgehend am Endothel der *V. umbilicalis* exprimiert. Nach Eap-Inkubation (Abb. 4.6B) war PECAM-1 ebenfalls weniger stark ausgeprägt, allerdings zeigte sich keine Abhängigkeit von der Eap-Konzentration. Am wenigsten, und ebenfalls nicht mehr durchgängig darstellbar wie bei der Kontrolle, war es nach einer Inkubation mit 5 µg/ml Eap (Abb. 4.6B II).

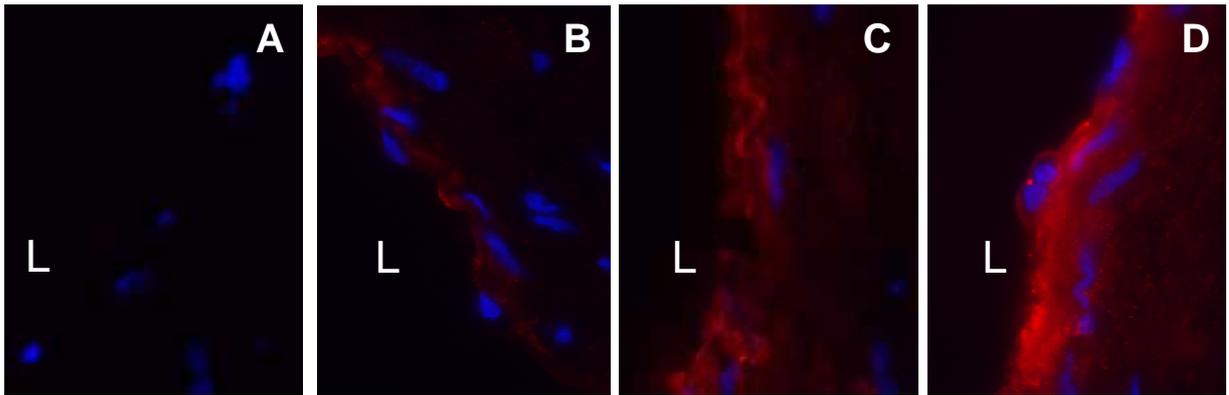
Allerdings waren bei der Quantifizierung von PECAM-1 (Abb. 4.7) die Standardabweichungen hoch und die Ergebnisse weniger eindeutig als bei ICAM-1.



**Abb. 4.7:** Quantifizierung der ICAM-1 und PECAM-1-Färbungen. Nach dreistündiger Inkubation der Nabelschnurvene mit 5, 10 und 20 µg/ml Eap wurden die Präparate gegen ICAM-1 und PECAM-1 immunfluoreszent gefärbt. Die Färbungen wurden im Anschluss quantifiziert. Die gefüllten Säulen stehen für die Werte der ICAM-1-Quantifizierung und die gestrichelten für die der PECAM-1-Quantifizierung. Abgebildet sind die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen.

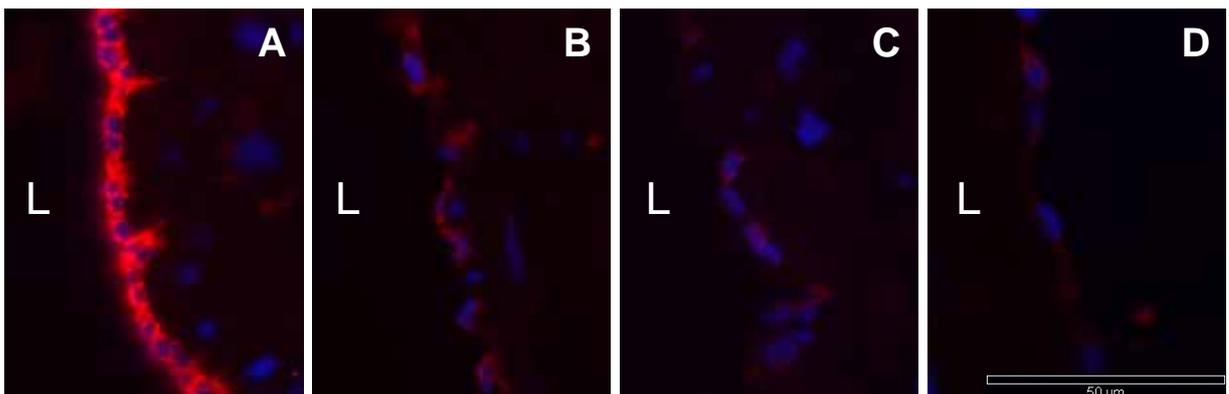
#### **4.4 Eap wird zeitabhängig stärker internalisiert, ICAM-1 und PECAM-1 werden weniger exprimiert im Zeitverlauf.**

Um zu sehen, ob Eap einen zeitabhängigen Aufnahmemechanismus zeigt, wurde die *V. umbilicalis* der Nabelschnursegmente 15, 30 min, eine, zwei, drei, vier und fünf Stunden mit 20 µg/ml Eap inkubiert. Anschließend wurde die Aufnahme von Eap (Abb. 4.8) durch Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Ebenfalls durch Immunfluoreszenzfärbung wurde die Verteilung von ICAM-1 (Abb. 4.9) und PECAM-1 (Abb. 4.10) beurteilt. Es sollte untersucht werden, ob es durch eine zeitabhängige Aufnahme von Eap auch eine dementsprechende Reduzierung der anti-ICAM-1 bzw. anti-PECAM-1-Antikörperbindung gab. Die Färbungen wurden mit Metamorph quantifiziert (Abb. 4.11).



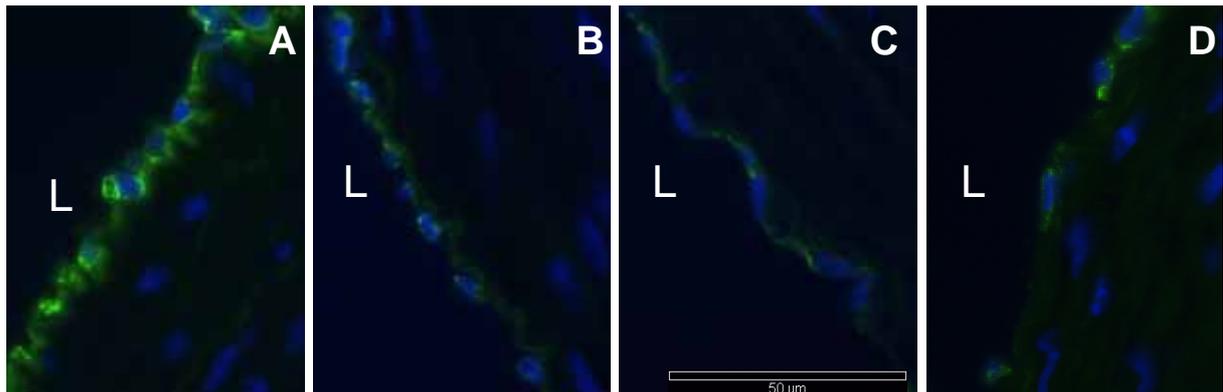
**Abb. 4.8:** Zeitverlauf der Aufnahme von Eap in die *V. umbilicalis*. Die Nabelschnurvene wurde mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Eap im Zeitverlauf von 15 min bis 5 Stunden inkubiert und Eap später durch Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. (A) zeigt die Kontrolle ohne Eap-Inkubation und (B) die Nabelschnur 15 min, (C) zwei Stunden und (D) fünf Stunden nach der Eap-Zugabe. L = Lumen der Nabelschnur  
(Weitere Bilder dazu siehe Anhang Kapitel 9.2.1.7)

Nach einer Inkubation mit Eap von 15 min (Abb. 4.8B) ist Eap lediglich punktuell nachzuweisen, während Eap nach einer Inkubation von zwei Stunden (Abb. 4.8C) einen deutlichen, durchgehenden Saum mit Ausbreitung ins Nabelschnurgewebe zeigt. Nach einer Inkubation von fünf (Abb. 4.8D) Stunden ist Eap deutlich über das Endothel hinaus im Nabelschnurgewebe lokalisiert.



**Abb. 4.9:** Expression von ICAM-1 in der Nabelschnurvene im Zeitverlauf der Eap-Inkubation. Die Nabelschnur wurde unterschiedlich lang von 15 min bis zu fünf Stunden mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Eap inkubiert und anschließend gegen ICAM-1 gefärbt. Eine (A) Kontrolle blieb unbehandelt, (B) zeigt die Nabelschnur nach 15 min, (C) nach zwei Stunden und (D) nach fünf Stunden Eap-Inkubation. L = Lumen der Nabelschnur  
(Weitere Bilder dazu siehe Anhang Kapitel 9.2.1.8)

Die Färbung von ICAM-1 zeigt den gegensinnigen Verlauf. Abhängig von der Inkubationszeit von Eap war ICAM-1 weniger stark ausgeprägt. Die Kontrolle ohne Eap-Inkubation (Abb. 4.9A) zeigt eine durchgängige Expression des Endothels von ICAM-1. Nach fünf Stunden Eap-Inkubation zeigte ICAM-1 nur noch eine geringe Antikörperbindung, mit entsprechend geringer Immunfluoreszenzfärbung (Abb. 4.9D).

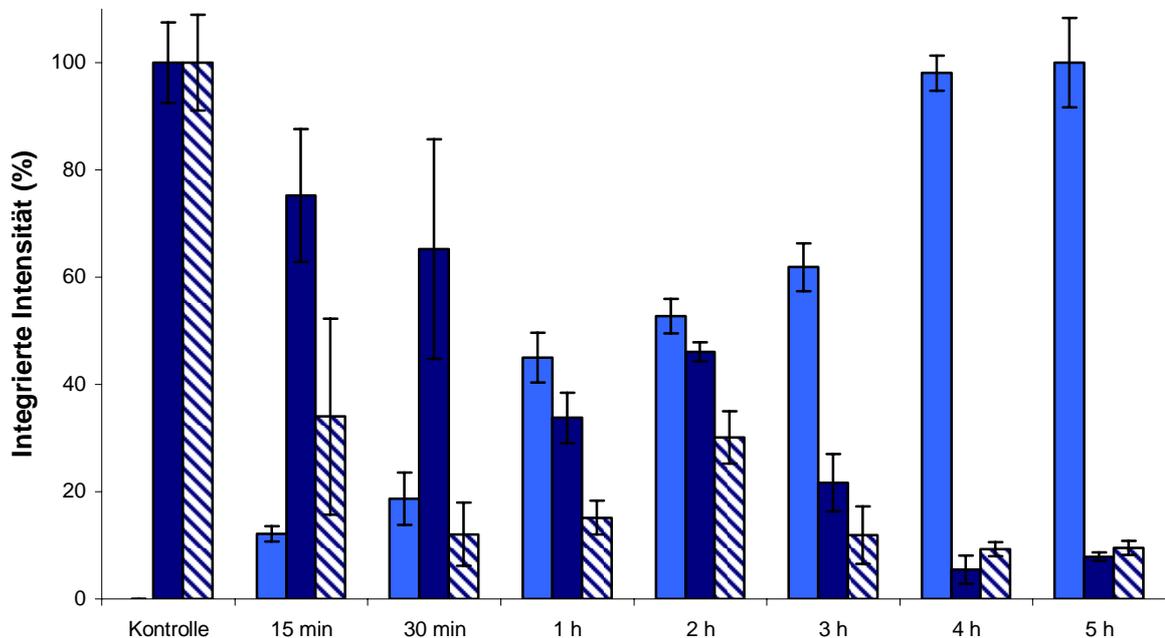


**Abb. 4.10:** Expression von PECAM-1 in der Nabelschnurvene im Zeitverlauf der Eap-Inkubation. Die Nabelschnur wurde unterschiedlich lange von 15 min bis zu fünf Stunden mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Eap inkubiert und danach gegen PECAM-1 gefärbt. Eine (A) Kontrolle blieb unbehandelt, (B) zeigt die Nabelschnur nach 15 min, (C) nach zwei Stunden und (D) nach fünf Stunden Eap-Inkubation. L = Lumen der Nabelschnur (Weitere Bilder dazu siehe Anhang Kapitel 9.2.1.9)

In der Kontrolle ohne Eap-Inkubation (Abb. 4.10A) war PECAM-1 durchgängig vom Endothel der *V. umbilicalis* exprimiert. Nach Eap-Inkubation konnte PECAM-1 hier ebenfalls reduziert dargestellt werden, jedoch nicht so klar abhängig von der Zeit der Eap-Inkubation wie bei ICAM-1. PECAM-1 war nicht mehr kontinuierlich durchgängig von den Endothelzellen exprimiert wie in der Kontrolle (Abb. 4.10A), sondern unterbrochen und vereinzelt darstellbar.

Die von der Inkubationszeit abhängige stärkere Aufnahme von Eap zeigt auch die Quantifizierung (Abb. 4.11), wonach allerdings nach vier Stunden schon annähernd das Maximum erreicht ist. Der Quantifizierung kann man ebenso entnehmen, dass ICAM-1 umso weniger dargestellt werden konnte, desto länger die Inkubationszeit von Eap war. Zum Beispiel betrug Menge und Intensität der ICAM-1-Färbung nach fünf Stunden Eap-Inkubation nur noch ca. 10% der Kontroll-Färbung ohne Eap-Inkubation. PECAM-1 war ebenfalls reduziert. So zeigte PECAM-1 nach vier oder fünf Stunden Eap-Inkubation

ebenfalls nur noch ca. 10% des Kontrollwertes ohne Eap-Inkubation. PECAM-1 zeigte beim 15 min-Wert hohe Standardabweichungen, ICAM-1 beim 30 min-Wert.



**Abb. 4.11:** Quantifizierung der Eap-, ICAM-1- und PECAM-1-Färbung im Zeitverlauf nach Eap-Inkubation. Die *V. umbilicalis* wurde unterschiedlich lange mit 20 µg/ml Eap von 15 min bis fünf Stunden inkubiert. Die hellblauen Säulen stellen die Werte der Quantifizierung der Eap-Färbung dar, die dunkelblauen Säulen die der ICAM-1-Färbung und die gestreiften Säulen geben die Werte der PECAM-1-Quantifizierung wider. Angegeben sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen.

#### **4.5 Die intrazelluläre Aufnahme von Eap in HUVEC ist bei niedrigen Temperaturen und unter Einfluss von Heparin reduziert.**

Da bei niedrigen Temperaturen die Aktivität von Zellen fast zum Erliegen kommt und somit u.a. auch kaum noch Stoffe in die Zelle aufgenommen werden, sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in der Aufnahme von Eap bei niedrigen Temperaturen gab.

Im Falle eines aktiven Aufnahmemechanismus von Eap sollte die Aufnahme von Eap bei niedriger Inkubationstemperatur reduziert sein. Dazu wurden HUVEC drei Stunden mit Eap bei 4 °C, bei Raumtemperatur und bei 37 °C inkubiert.

In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Heparin eine Bindung von Eap an ECM-Proteine blockieren kann und in Vorversuchen konnte eine Bindung von Heparin an Eap bestätigt werden (Ergebnisse siehe Anhang Kapitel 9.1).

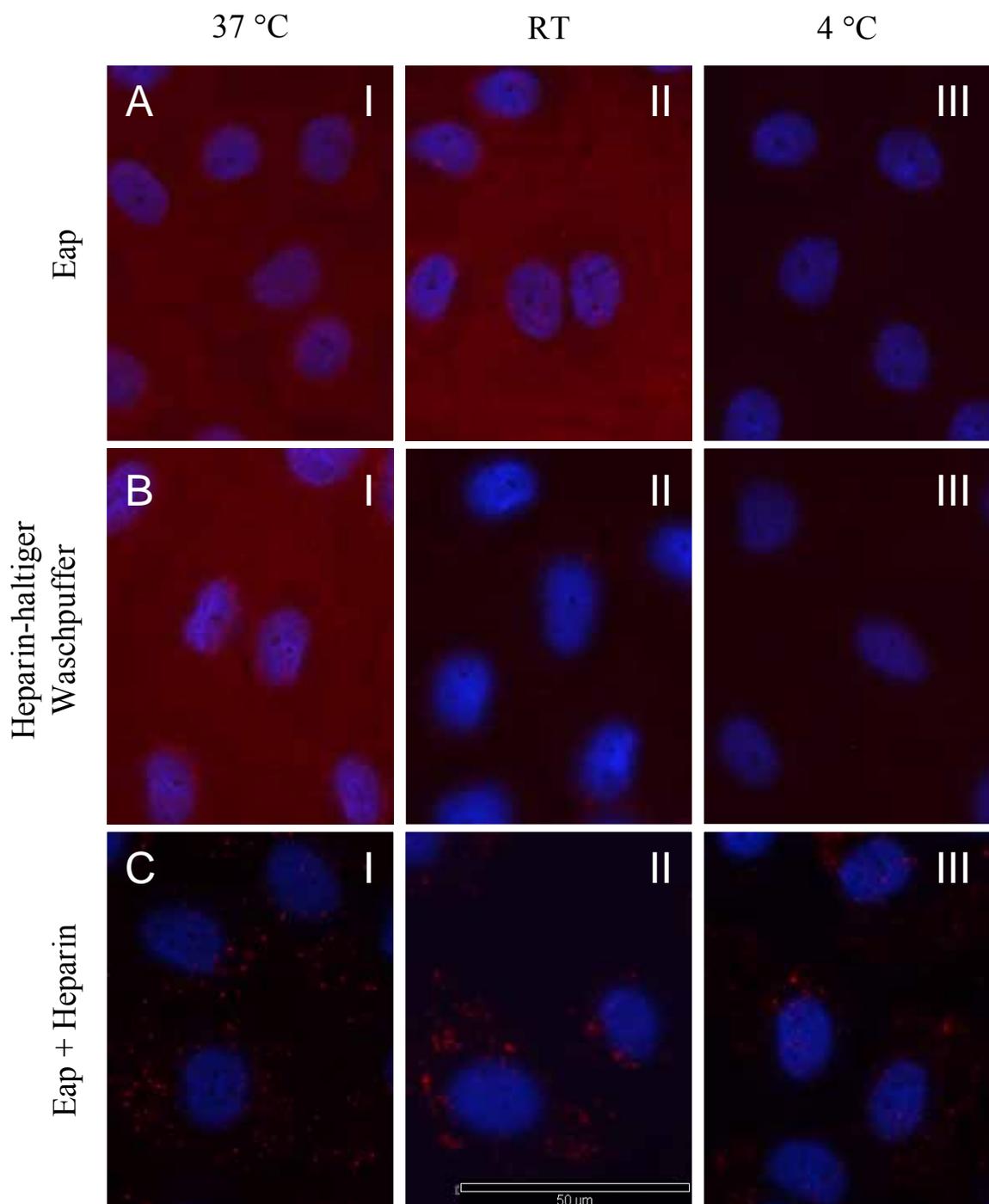
Es sollte in dem Zusammenhang untersucht werden, ob Heparin ebenfalls die Aufnahme von Eap in Endothelzellen verhindert, denn durch die Bindung von Eap und Heparin könnte Eap möglicherweise nicht mehr in die Endothelzellen aufgenommen werden.

Dafür wurden in einem Experiment HUVEC mit Eap zusammen mit Heparin inkubiert, und in einem weiteren Versuchsansatz nach der Inkubation mit Eap die HUVEC bzw. Nabelschnurvene mit Heparin-haltigem Puffer gewaschen. Die Aufnahme von Eap wurde durch Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Die Intensität der Färbung wurde mit Metamorph quantifiziert.

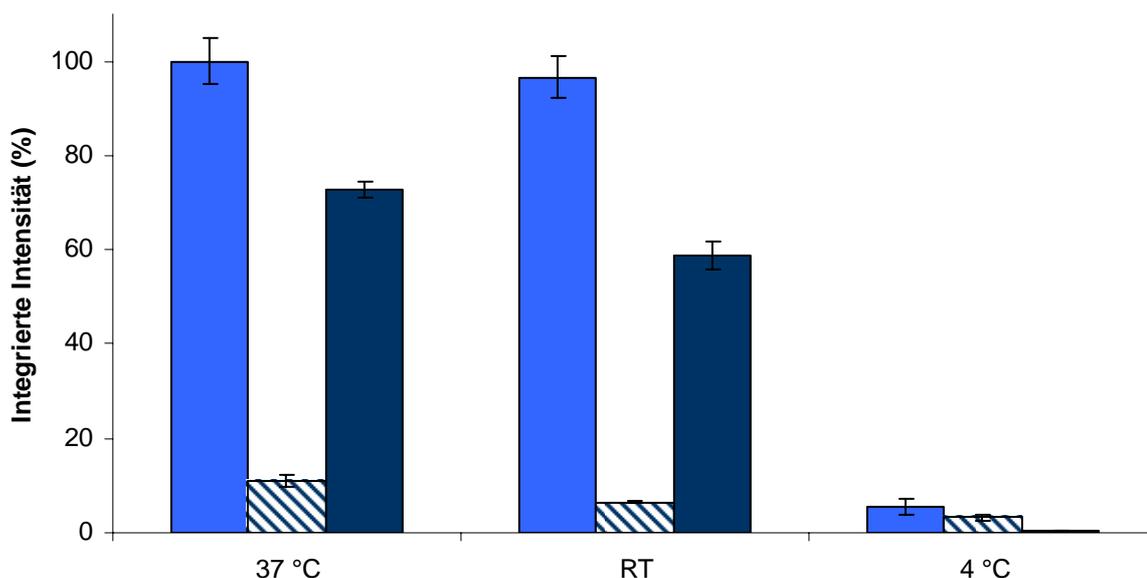
Bei alleiniger Inkubation von Eap war die Aufnahme bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C (Abb. 4.12A I) stärker als bei 4 °C (Abb. 4.12A III). Im Falle einer Eap-Inkubation bei 4 °C wurden der Quantifizierung (Abb. 4.13) nach lediglich noch 3% des Eap aufgenommen, was bei 37 °C in die HUVEC aufgenommen wurde. Der Unterschied zwischen 37 °C und RT (Abb. 4.12A II) war allerdings gering.

Wurde nach der Inkubation von Eap der Monolayer mit Heparin-haltigem Puffer gewaschen (Abb. 4.12B), war die Intensität der Färbung, also die Aufnahme von Eap, nicht so hoch wie nach alleiniger Inkubation ohne Heparin-Waschschritt. Bei 37 °C konnte durch Waschen mit Heparin-haltigem Puffer eine Reduktion der Eap-Aufnahme um 25% erzielt werden, bei Raumtemperatur sogar noch etwas mehr. Wurden 20 µg/ml Eap drei Stunden zusammen mit Heparin inkubiert (Abb. 4.12C), wurde, unabhängig von der Temperatur, fast gar kein Eap aufgenommen. Die Färbung ähnelte der Färbung nach Inkubation mit 1 µg/ml Eap, es war keine homogene Färbung des Zytoplasmas, sondern Agglomerate innerhalb der Zelle.

Bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C wurde lediglich 12% der Eap-Menge aufgenommen, die bei alleiniger Inkubation ohne Heparin aufgenommen wurde. Bei einer Inkubation unter Raumtemperatur sogar noch weniger. Bei 4 °C wurde in allen Fällen, ob alleinige Inkubation von Eap oder zusammen mit Heparin, nie mehr als 5% des Eaps aufgenommen, was bei 37 °C aufgenommen wurde.



**Abb. 4.12:** Aufnahme von Eap in HUVEC bei verschiedenen Temperaturen und zusammen mit Heparin. Die HUVEC wurden drei Stunden mit 20 µg/ml bei 4 °C, RT und 37 °C inkubiert. Außerdem wurden HUVEC mit 20 µg/ml Eap gleichzeitig mit 10 µg/ml Heparin inkubiert, sowie nach alleiniger Inkubation von Eap die HUVEC anschließend mit Heparin-haltigem Puffer gewaschen. (A) zeigt die alleinige Inkubation von Eap Inkubation ohne Heparin (I) bei 37 °C, (II) bei RT und (III) bei 4 °C (B) Nach Eap-Inkubation wurde der Monolayer mit Heparin-haltigem Puffer gewaschen (I) bei 37 °C, (II) bei RT und (III) bei 4 °C (C) Eap und Heparin wurden zusammen gleichzeitig inkubiert (I) bei 37 °C, (II) bei RT und (III) bei 4 °C (Weitere Bilder siehe Anhang Kapitel 9.2.2.2)

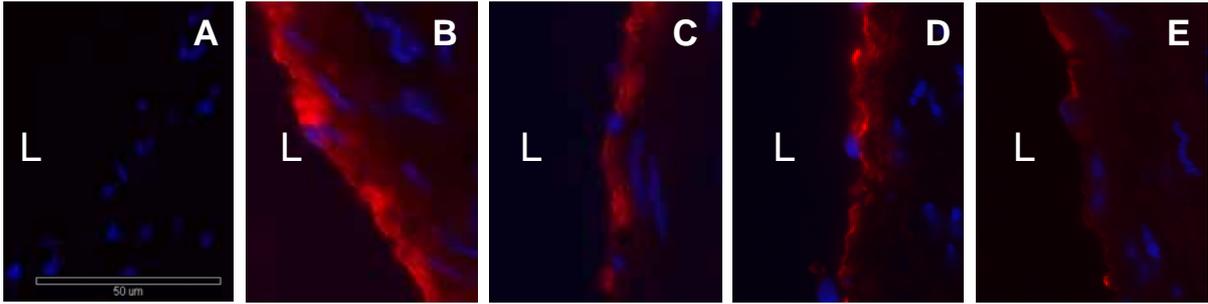


**Abb. 4.13:** Quantifizierung der Eap-Färbung nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen und unter dem Einfluss von Heparin. HUVEC wurden drei Stunden mit 20 µg/ml Eap oder gleichzeitig mit 20 µg/ml Eap und 10 µg/ml Heparin inkubiert. Außerdem wurden nach Inkubation nur mit 20 µg/ml Eap die HUVEC mit 10 µg/ml Heparin-haltigem Waschpuffer gewaschen. Die hellblauen Säulen zeigen die Werte der Quantifizierung für Eap-Inkubation ohne Heparin, die gestreiften Säulen bilden die Werte für eine gleichzeitige Inkubation von Eap und Heparin ab und die dunkelblauen Säulen stehen für die Quantifizierungswerte für Eap-Inkubation und anschließendem Waschen mit Heparin-haltigem Waschpuffer. Dargestellt sind Mittelwerte der Quantifizierung und deren Standardabweichungen.

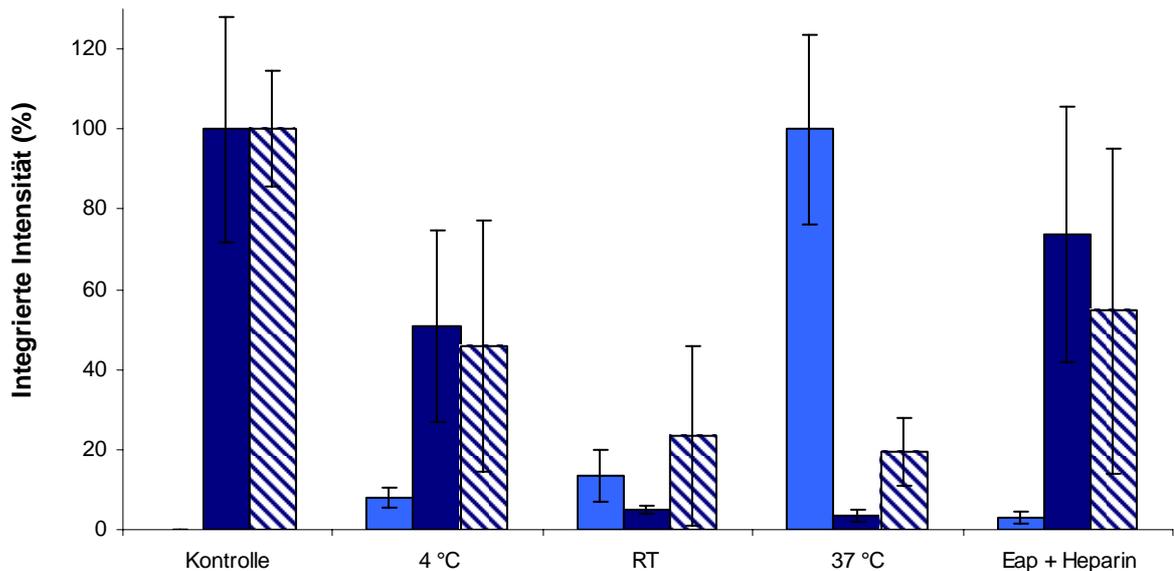
#### **4.6 Die Aufnahme von Eap in die Nabelschnur war bei 4 °C und gleichzeitiger Inkubation mit Heparin reduziert.**

Der Sachverhalt, wie er in Kapitel 4.5 *in vitro* untersucht wurde, sollte auch *ex vivo* am Endothel der *V. umbilicalis* der Nabelschnur überprüft werden. Es wurde wiederum geklärt werden, inwiefern Temperatur und Heparin einen Einfluss auf die Aufnahme von Eap haben. Es erfolgte eine dreistündige Eap-Inkubation der Nabelschnursegmente mit 20 µg/ml Eap bei 4 °C, bei Raumtemperatur und bei 37 °C.

Außerdem wurde die Nabelschnurvene ebenfalls mit 20 µg/ml Eap zusammen mit 10 µg/ml Heparin inkubiert. Die Aufnahme von Eap ins Endothel der Nabelschnurvene (Abb. 4.14) wurde durch Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Anschließend wurden die Färbungen quantifiziert (Abb. 4.15).



**Abb. 4.14:** Aufnahme von Eap ins Endothel der *V. umbilicalis* bei verschiedenen Inkubationstemperaturen und unter dem Einfluss von Heparin. Die Nabelschnur wurde mit 20 µg/ml Eap für drei Stunden bei 37 °C, RT und 4 °C inkubiert, bzw. bei 37 °C mit 20 µg/ml Eap und 10 µg/ml Heparin inkubiert. Später erfolgte die Darstellung von Eap über Immunfluoreszenzfärbung. (A) zeigt eine unbehandelte Kontrolle der Nabelschnur. Die Nabelschnur wurde mit Eap bei (B) 37 °C, (C) RT und (D) 4 °C inkubiert. Außerdem erfolgte eine gleichzeitige Inkubation von (E) Eap und Heparin. L = Lumen der Nabelschnur  
(Weitere Bilder dazu siehe Anhang Kapitel 9.2.1.4)



**Abb. 4.15:** Quantifizierung der Eap-, ICAM-1- und PECAM-1-Färbungen nach Eap-Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen und unter dem Einfluss von Heparin. Die Nabelschnurvene wurde nach dreistündiger Inkubation mit 20 µg/ml Eap bei 4 °C, RT und 37 °C sowie einer gleichzeitigen Inkubation von 20 µg/ml Eap und 10 µg/ml Heparin gegen Eap angefärbt und quantifiziert. Die hellblauen Säulen spiegeln die Werte für die Eap-Färbung wider, die dunkelblauen die der ICAM-1-Färbung und die gestreiften Säulen zeigen die PECAM-1-Quantifizierung. Es sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen angegeben.

Der Unterschied in der Aufnahme von Eap war hier deutlicher zwischen einer Inkubationstemperatur von 37 °C (Abb. 4.14B) und Raumtemperatur (Abb. 4.14C) als zwischen Raumtemperatur und 4 °C (Abb. 4.14D), so wie dies *in vitro* der Fall war. Zu erkennen war, dass auch hier bei 4 °C deutlich weniger Eap aufgenommen wurde als bei 37 °C.

Die Quantifizierung (Abb. 4.15) zeigt, dass nach Inkubation bei 4 °C nur 9% dessen aufgenommen wurden, was bei 37 °C aufgenommen wurde. Bei Inkubation zusammen mit Heparin (Abb. 4.14E) wurden auch *ex vivo*, genau wie *in vitro*, nur geringe Mengen an Eap, der Quantifizierung nach lediglich 3%, aufgenommen.

#### **4.7 ICAM-1 und PECAM-1 waren nicht so stark reduziert nach Inkubation bei 4 °C und gleichzeitiger Inkubation von Eap und Heparin.**

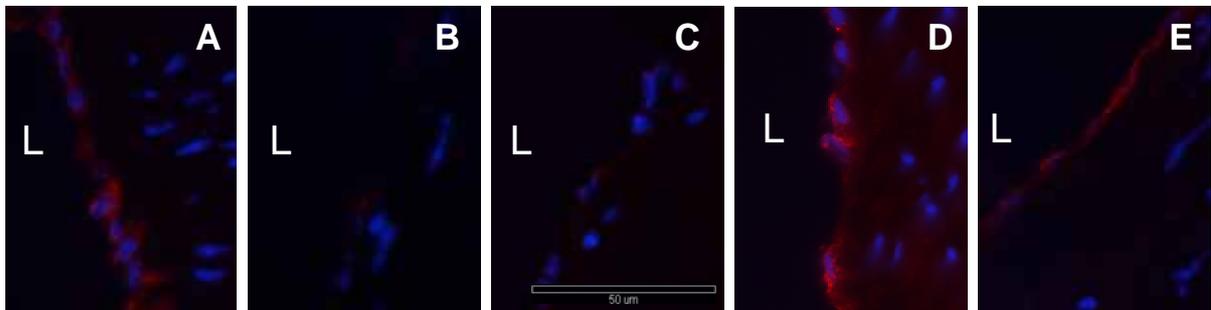
Da ein Unterschied in der Aufnahme von Eap bei verschiedenen Inkubationstemperaturen und bei Inkubation zusammen mit Heparin gezeigt werden konnte, wurde auch die ICAM-1 und PECAM-1-Expression untersucht. Da bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C und bei gleichzeitiger Inkubation von Eap mit Heparin nur wenig Eap gezeigt und aufgenommen wurde, sollte geklärt werden, ob auch ICAM-1 und PECAM-1 dadurch wieder stärker dargestellt werden konnten.

Dazu wurde die *V. umbilicalis* drei Stunden mit Eap bei 4 °C, bei Raumtemperatur und bei 37 °C inkubiert. Außerdem erfolgte eine Inkubation von Eap zusammen mit Heparin. ICAM-1 (Abb. 4.16) und PECAM-1 (Abb. 4.17) wurden durch Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Anschließend wurden die Färbungen quantifiziert (Abb. 4.15).

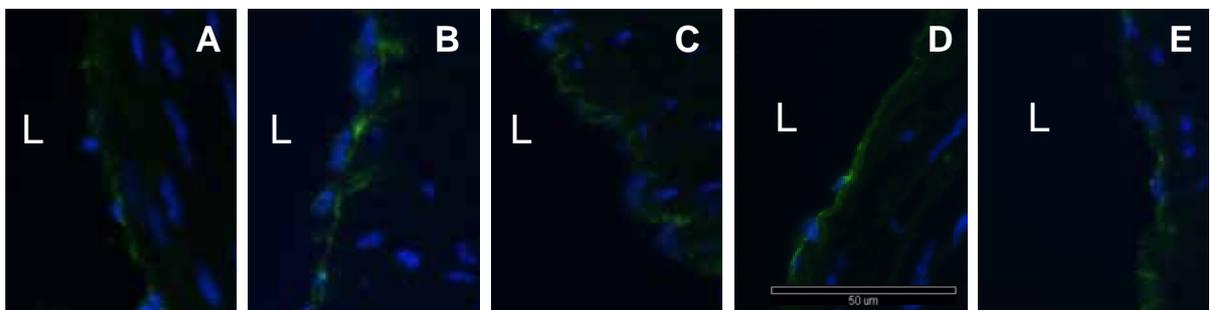
ICAM-1 konnte, wie in den Experimenten zuvor, bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C (Abb. 4.16B) weniger dargestellt werden als in der unbehandelten Kontrolle ohne Eap-Inkubation (Abb. 4.16A). Dort stellte ICAM-1 sich durchgängig am Endothel der *V. umbilicalis* dar. Nach einer Inkubation bei 4 °C (Abb. 4.16D) allerdings war ICAM-1 wieder stärker verteilt, jedoch nicht in dem Maße wie in der Kontrolle. Ebenfalls wieder stärker verteilt war ICAM-1 bei gleichzeitiger Inkubation von Eap mit Heparin (Abb. 4.16E).

ICAM-1 zeigte in der Quantifizierung (Abb. 4.18) hohe Standardabweichungen, tendenziell entsprach der Anteil von ICAM-1 nach einer Eap-Inkubation bei 4 °C der Hälfte des ICAM-1, was in der Kontrolle zu sehen war.

Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur und 37 °C war noch knapp 10% des ICAM-1, was in der Kontrolle darstellbar war, nachzuweisen. Bei gleichzeitiger Inkubation von Eap und Heparin war der ICAM-1-Anteil mit 75% nicht so stark reduziert.



**Abb. 4.16:** ICAM-1-Expression der Nabelschnurvene bei verschiedenen Inkubationstemperaturen von Eap und unter dem Einfluss von Heparin. Die *V. umbilicalis* wurde mit 20 µg/ml Eap für drei Stunden bei 37 °C, RT und 4 °C inkubiert, bzw. bei 37 °C mit 20 µg/ml Eap und 10 µg/ml Heparin inkubiert. Später erfolgte die Darstellung von ICAM-1 über Immunfluoreszenzfärbung. (A) zeigt eine unbehandelte Kontrolle der Nabelschnur. Die Nabelschnurvene wurde mit Eap bei (B) 37 °C, (C) RT und (D) 4 °C inkubiert. Außerdem erfolgte eine gleichzeitige Inkubation von (E) Eap und Heparin. L = Lumen der Nabelschnur (Weitere Bilder dazu siehe Anhang Kapitel 9.2.1.5)



**Abb. 4.17:** PECAM-1-Expression der *V. umbilicalis* bei verschiedenen Inkubationstemperaturen von Eap und unter dem Einfluss von Heparin. Die Nabelschnurvene wurde mit 20 µg/ml Eap für drei Stunden bei 37 °C, RT und 4 °C inkubiert. Außerdem erfolgte eine Inkubation bei 37 °C von 20 µg/ml Eap zusammen mit 10 µg/ml Heparin. (A) zeigt eine unbehandelte Kontrolle der Nabelschnur. Die Nabelschnurvene wurde mit Eap bei (B) 37 °C, (C) RT und (D) 4 °C inkubiert. Außerdem erfolgte eine gleichzeitige Inkubation von (E) Eap und Heparin. L = Lumen der Nabelschnur (Weitere Bilder dazu siehe Anhang Kapitel 9.2.1.6)

Bei der Darstellung von PECAM-1 verhielt es sich ähnlich, es wurde jedoch nicht so stark reduziert nachgewiesen wie ICAM-1. Die Tendenz war allerdings gleich, die Reduzierung der

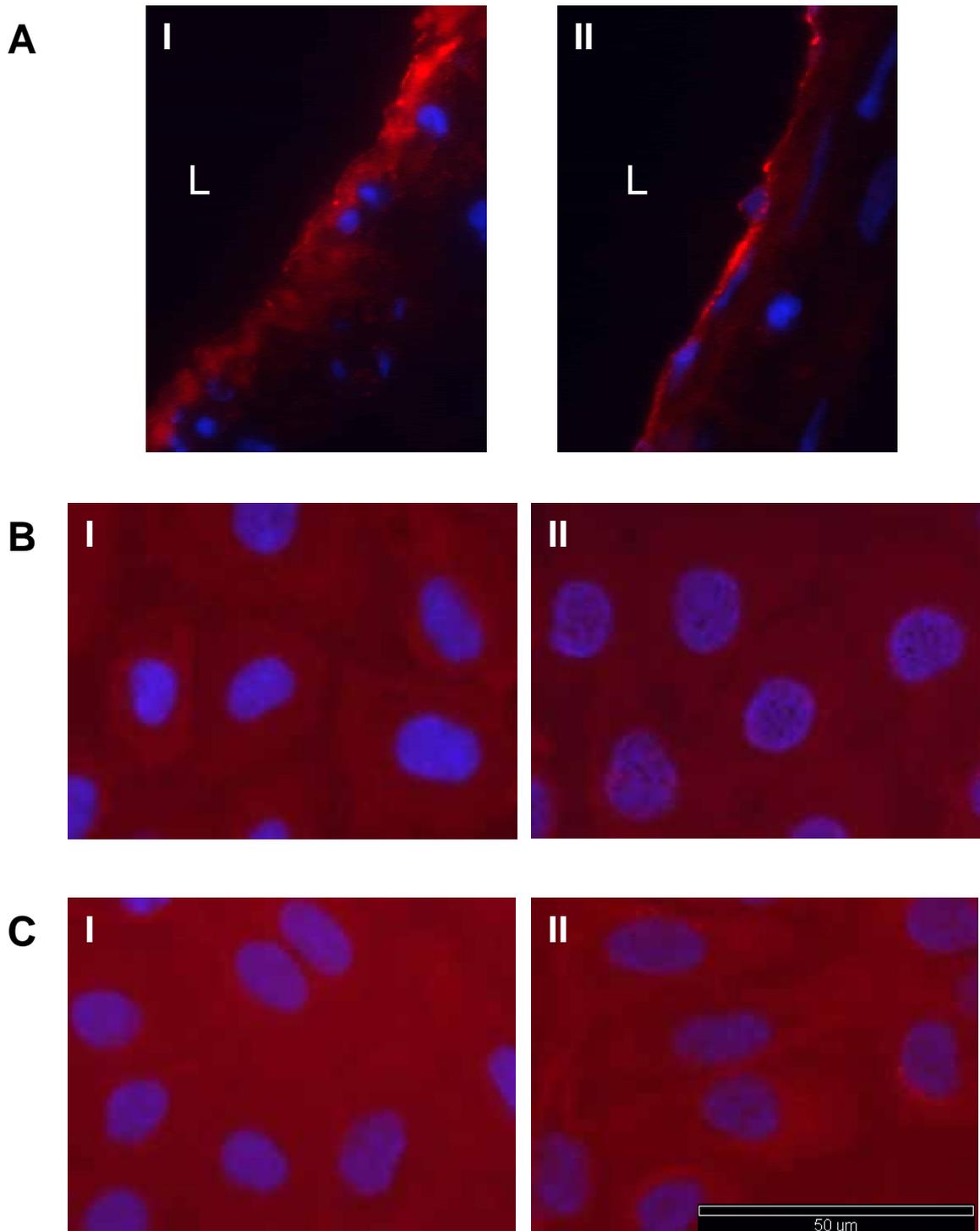
Verteilung von PECAM-1 war bei Inkubation mit Eap bei 37 °C (Abb. 4.17B) größer als nach einer Inkubation bei 4 °C (Abb. 4.17D) oder gleichzeitiger Inkubation von Eap mit Heparin (Abb. 4.17E).

#### **4.8 Heparansulfate haben nur begrenzten Einfluss auf die Aufnahme von Eap.**

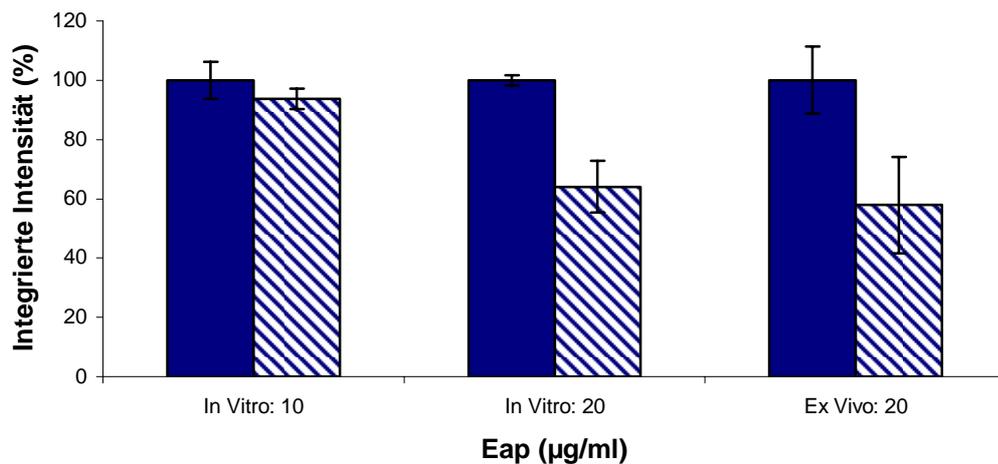
Da eine stark reduzierte Aufnahme von Eap durch Heparin gezeigt werden konnte, sollte untersucht werden, ob Heparansulfate auf den Zelloberflächen ebenfalls einen Einfluss auf Bindung und Aufnahme von Eap haben. Daher wurden die Heparansulfate auf den Zellen durch Heparinase III entfernt. Falls diese eine wichtige Rolle im Bindungs- und Aufnahmemechanismus spielen, sollte auch hier eine reduzierte Resorption von Eap in die Zellen die Folge sein.

Dies wurde *in vitro* an HUVEC sowie *ex vivo* am Endothel der Nabelschnurvene untersucht. Die *V. umbilicalis* bzw. der HUVEC Monolayer wurde vor der dreistündigen Inkubation von 20 bzw. 10 µg/ml Eap eine Stunde mit 1 U/ml Heparinase III vorbehandelt wurde. Danach wurde die Bindung bzw. Aufnahme von Eap durch Immunfluoreszenz dargestellt und die Färbungen quantifiziert.

*In vitro* war der Unterschied in der Aufnahme bzw. Bindung bei Inkubation von 10 µg/ml Eap (Abb. 4.18B) nicht so deutlich, allerdings war die Aufnahme nach Inkubation von 20 µg/ml Eap (Abb. 4.18C) und Vorbehandlung mit Heparinase III um 35% reduziert, wie die Quantifizierung (Abb. 4.19) zeigt. *Ex vivo* (Abb. 4.18A) betrug die Reduktion in der Aufnahme von Eap nach Entfernung der Heparansulfate auf den Endothelzellen 40%.



**Abb. 4.18:** Aufnahme von Eap in HUVEC bzw. in die *V. umbilicalis* nach Entfernung der Heparansulfate. Vor der dreistündigen Inkubation mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Eap wurden die Heparansulfate auf der Zelloberfläche durch Heparinase III entfernt. Die Nabelschnur (A) wurde (I) ohne Vorbehandlung durch Heparinase und (II) nach Vorbehandlung mit Heparinase mit Eap inkubiert. Die HUVEC wurden mit (B) 10  $\mu\text{g/ml}$  Eap (I) ohne Vorbehandlung durch Heparinase und (II) nach Vorbehandlung mit Heparinase inkubiert. Außerdem wurden HUVEC mit (C) mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Eap (I) ohne Vorbehandlung durch Heparinase und (II) nach Vorbehandlung durch Heparinase inkubiert. L = Lumen der Nabelschnur  
(Weitere Bilder siehe Anhang Kapitel 9.2.1.1 und 9.2.2.1)

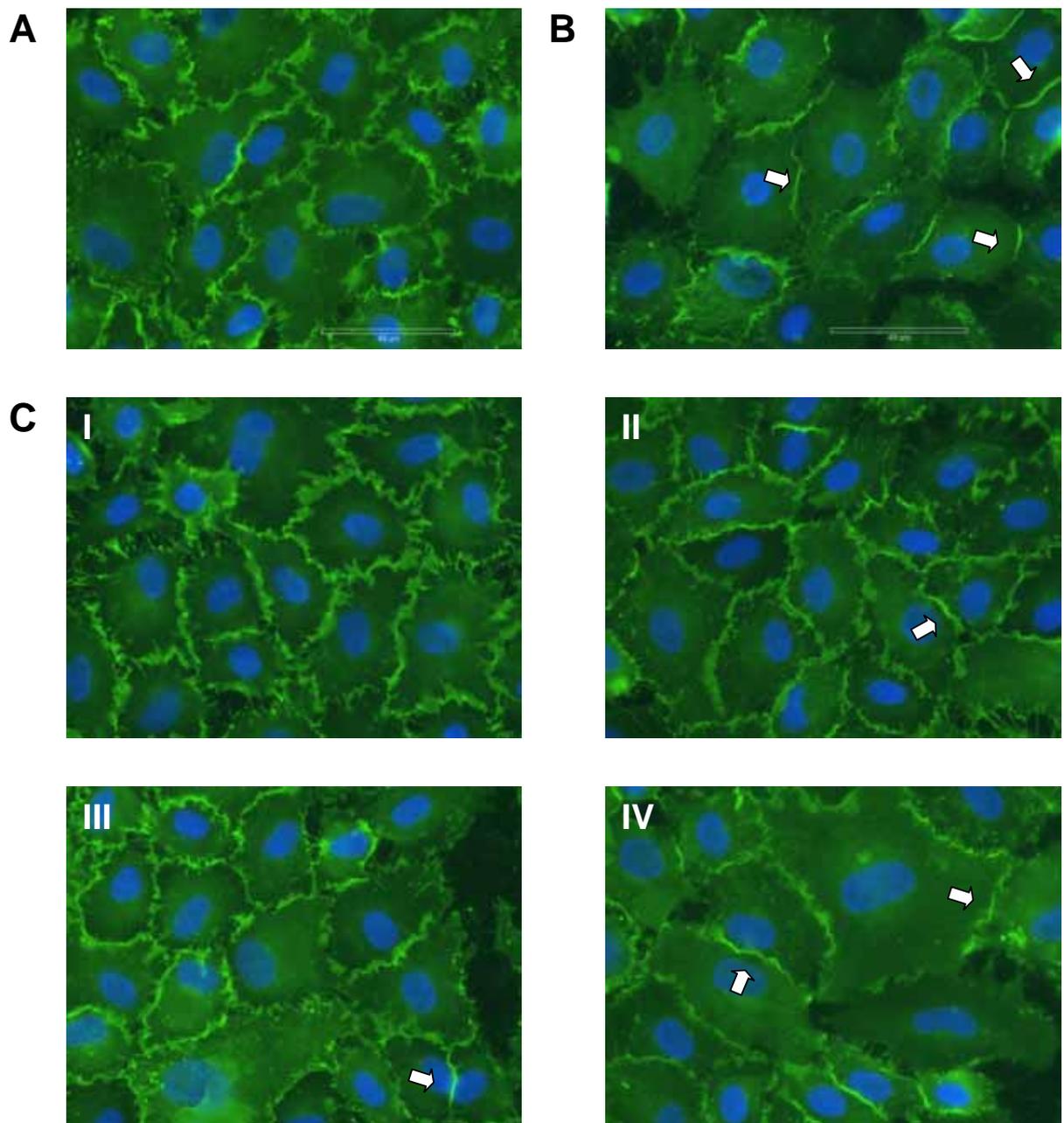


**Abb. 4.19:** Quantifizierung der Eap-Färbung nach Entfernung der Heparansulfate. Die Heparansulfate auf der Zelloberfläche wurden durch Heparinase III entfernt und danach erfolgte eine Inkubation mit 20 µg/ml Eap. Die gefüllten Säulen zeigen die Werte der Eap-Quantifizierung ohne, dass Heparansulfate entfernt wurden und die gestreiften stellen die Werte für die Eap-Färbung nach Entfernung der Heparansulfate dar. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

#### **4.9 PECAM-1-Expression von HUVEC nach Eap-Inkubation nur leicht verändert.**

Da die *ex vivo*-Experimente zeigten, dass PECAM-1 nach Eap-Inkubation weniger darstellbar war, wurde dies auch *in vitro* an HUVEC untersucht. Da dies auch im Hinblick auf mögliche Adhäsionsverluste mit Permeabilitätserhöhung der HUVEC geschehen sollte, wurde als Positivkontrolle ein HUVEC-Monolayer mit 3 U/ml Thrombin (Abb. 4.20B) behandelt. Thrombin führt nachweislich zu einer Permeabilitätserhöhung von HUVEC. Die Verteilung von PECAM-1 der HUVEC wurde nach dreistündiger Inkubation mit 1 (Abb. 4.20C I), 5 (Abb. 4.20C II), 10 (Abb. 4.20C III) und 20 µg/ml Eap (Abb. 4.20C IV) durch Immunfluoreszenzfärbung dargestellt.

Eine Veränderung in der Verteilung von PECAM-1 war nach Inkubation mit 5, 10 und 20 µg/ml Eap zu erkennen, jedoch weit nicht so ausgeprägt wie nach einer Behandlung mit Thrombin (Abb. 4.20B). In dem Fall war zu sehen, dass PECAM-1 an den Zellgrenzen weniger stark ausgeprägt war. Es fehlte die breite Darstellung von PECAM-1 wie z.B. in der Kontrolle ohne Eap- oder Thrombin-Behandlung (Abb. 4.20A), sondern PECAM-1 zeigt an den Zellgrenzen schmalere und linienförmigere Konturen (Pfeile in Abb. 4.20B).



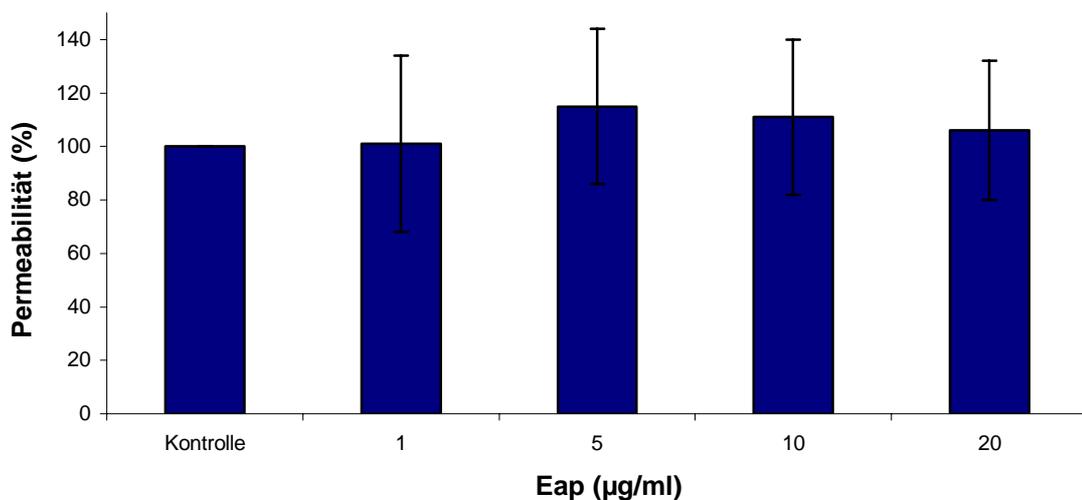
**Abb. 4.20:** Expression von PECAM-1 von HUVEC nach Eap-Inkubation. HUVEC wurden nach dreistündiger Inkubation mit 20 µg/ml Eap gegen PECAM-1 gefärbt. Als Positivkontrolle für eine Permeabilitätszunahme wurden HUVEC eine Stunde mit 3 U/ml Thrombin behandelt. (A) zeigt eine Kontrolle ohne Behandlung mit Eap oder Thrombin (B) Die HUVEC wurden mit Thrombin behandelt. (C) Es erfolgte eine Inkubation mit (I) 1 µg/ml Eap, (II) 5 µg/ml Eap, (III) 10 µg/ml Eap und (IV) 20 µg/ml Eap. Die Pfeile stellen Veränderungen der PECAM-1-Expression dar.

Nach Inkubation mit 1 µg/ml Eap waren diese Veränderungen in der PECAM-1-Expression dagegen kaum bis gar nicht zu erkennen. Bei Inkubation mit 5, 10 und 20 µg/ml Eap konnten Veränderungen der Verteilung von PECAM-1 erkannt werden, wie sie auch nach Behandlung

mit Thrombin auftraten (Pfeile in Abb. 4.20C II, III und IV). Diese waren jedoch längst nicht so ausgeprägt wie bei Behandlung der HUVEC mit Thrombin.

#### 4.10 Permeabilitätsassays zeigen nur Tendenzen.

In den vorhergehenden Experimenten konnte einer Veränderung der PECAM-1-Verteilung gezeigt werden. Um zu untersuchen, ob die Veränderungen der PECAM-1-Expression auch einen Einfluss auf die Permeabilität der HUVEC haben, wurden Permeabilitätsassays durchgeführt. Nach dreistündiger Inkubation der HUVEC, die auf 0,4  $\mu\text{m}$ -großen Filtern ausgesät waren, mit 1, 5, 10 und 20  $\mu\text{g/ml}$  Eap wurde 10 kDa-großes FITC-konjugiertes Dextran hinzugefügt und nach zwei Stunden mittels ELISA Reader der Durchfluss des FITC-Dextrans durch den Monolayer gemessen.

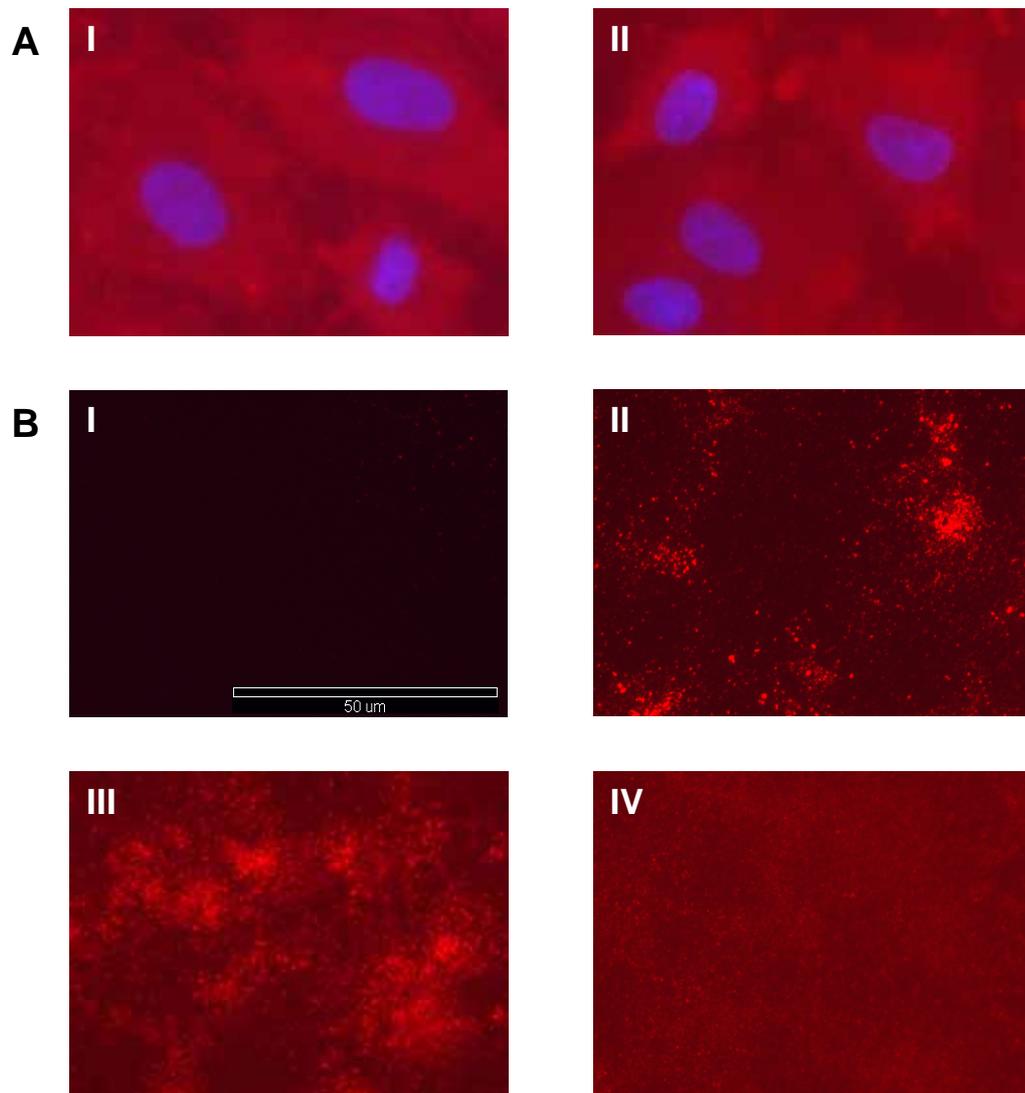


**Abb. 4.21:** Permeabilitätsassay (n=5). Nach dreistündiger Inkubation von HUVEC mit Eap wurde FITC-konjugiertes Dextran hinzugegeben. Die Permeabilität wurde zwei Stunden nach Zugabe des FITC-Dextrans durch Messung des Durchflusses bestimmt. Es sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen dargestellt.

Die Unterschiede in der Permeabilität der HUVEC nach Eap-Inkubation waren nicht groß. Tendenziell war nach Inkubation der HUVEC mit 5  $\mu\text{g/ml}$  Eap eine höhere Permeabilität festzustellen. Allerdings bestand die Permeabilitätserhöhung in einer höheren Durchflussrate von lediglich 18% und die Versuchsreihe zeigte insgesamt hohe Standardabweichungen.

#### 4.11 Eap ist ebenfalls in der ECM lokalisiert.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Eap an Strukturen der ECM binden kann. Um darzustellen, ob Eap sich demnach auch in der ECM und nicht nur innerhalb der Zelle befindet, wurden HUVEC-Monolayer mit 1, 5, 10 und 20  $\mu\text{g/ml}$  Eap inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Triton-Lösung permeabilisiert und danach mit Ammoniak-Lösung abgelöst und entfernt. So blieb nur die ECM übrig, in die die Zellen eingebettet sind. An der ECM gebundenes Eap wurde dann mittels Immunfluoreszenzfärbung dargestellt.



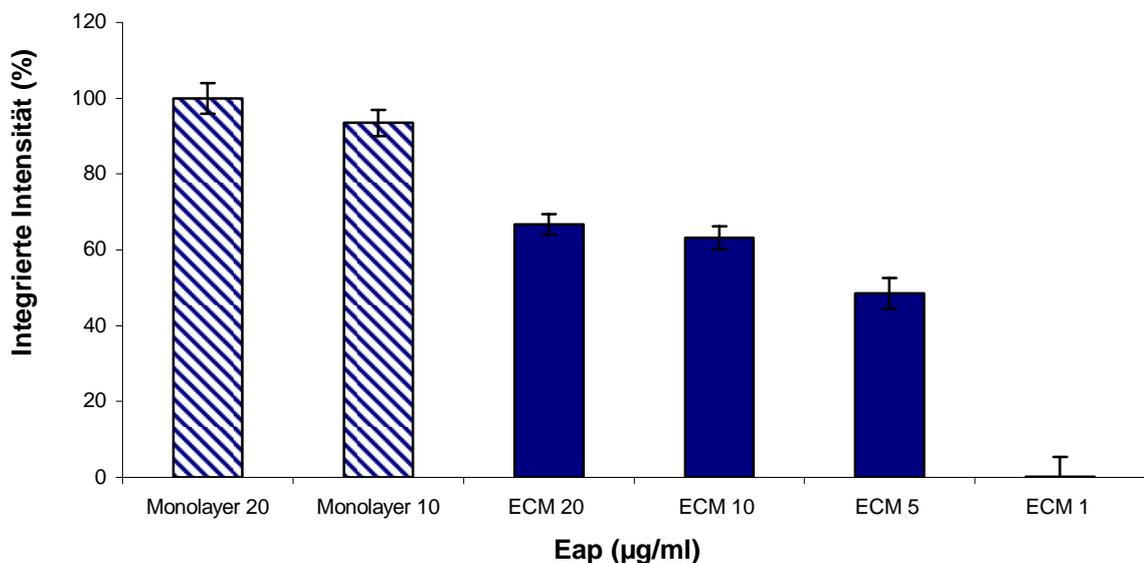
**Abb. 4.22:** Lokalisation von Eap in der ECM von HUVEC. Nach dreistündiger Inkubation der HUVEC mit 1, 5, 10 und 20  $\mu\text{g/ml}$  Eap wurden die Zellen entfernt. Die verbliebene ECM wurde gegen Eap durch Immunfluoreszenz angefärbt. (A) Es erfolgte eine Inkubation ohne Entfernung der Zellen. Die HUVEC wurden mit (I) 10  $\mu\text{g/ml}$  und (II) 20  $\mu\text{g/ml}$  Eap inkubiert. (B) Nach der Inkubation mit (I) 1  $\mu\text{g/ml}$ , (II) 5  $\mu\text{g/ml}$ , (III) 10  $\mu\text{g/ml}$  und (IV) 20  $\mu\text{g/ml}$  Eap wurden die Zellen entfernt.

(Weitere Bilder siehe Anhang Kapitel 9.2.2.3)

Abb. 4.22A zeigt die Färbung eines nicht konfluenten Monolayers, wo man deutlich erkennen kann, dass das Zellzytoplasma homogen gefärbt ist, und die Zell-Zwischenräume weniger intensiv gefärbt sind. Dieser Sachverhalt spiegelt sich in der Färbung der ECM wider.

Die ECM zeigte eine Aufnahme bzw. Bindung von Eap, jedoch nicht so stark, wie dies innerhalb der Zellen der Fall war. Nach Inkubation von 1  $\mu\text{g/ml}$  Eap war annähernd gar kein Eap in der ECM nachzuweisen (Abb. 4.22B I). Ansonsten war die Lokalisation von Eap in der ECM, wie auch in den vorhergegangenen Experimenten abhängig von der Eap-Konzentration. Nach Inkubation von 20  $\mu\text{g/ml}$  Eap war eine stärkere Aufnahme von Eap in die ECM zu sehen, als nach Inkubation von 5  $\mu\text{g/ml}$  Eap, wie die Quantifizierung (Abb. 4.23) ebenfalls bestätigt.

Allerdings erreicht die Aufnahme bzw. Bindung von Eap an die ECM nicht die Intensität der Aufnahme in die Zellen. Im Fall der Inkubation mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Eap (Abb. 4.22B IV) sind es extrazellulär 35% weniger Eap.

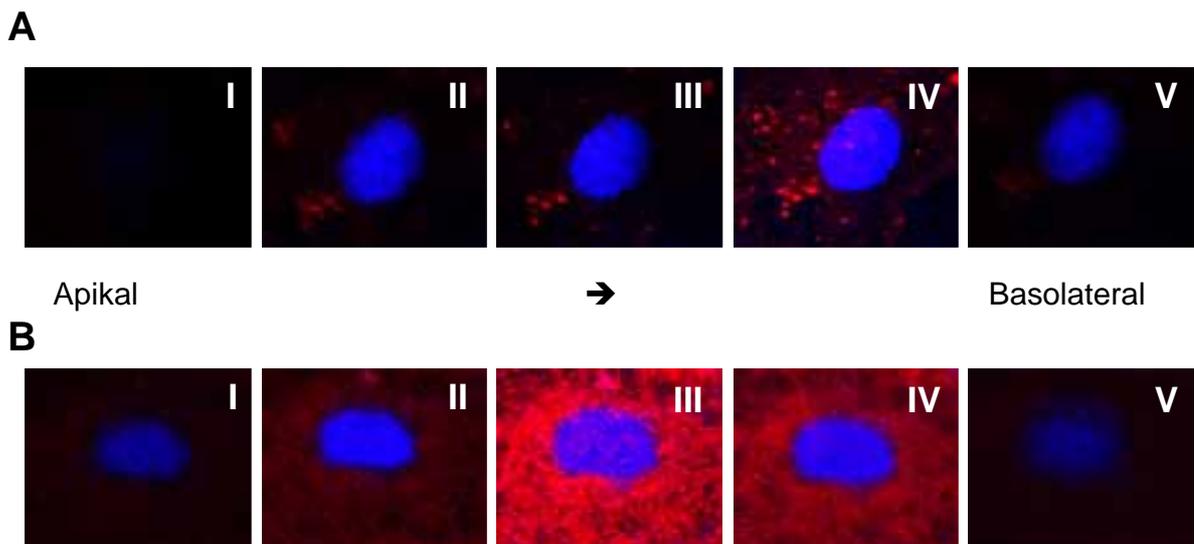


**Abb. 4.23:** Quantifizierung der Eap-Färbung der ECM. Nach Inkubation mit 1, 5, 10 und 20  $\mu\text{g/ml}$  Eap eines Monolayers wurden die Zellen entfernt und die ECM gegen Eap angefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen.

#### 4.12 Eap ist vor allem im Zytoplasma der Zelle lokalisiert und zeigt eine perinukleäre Verdichtung.

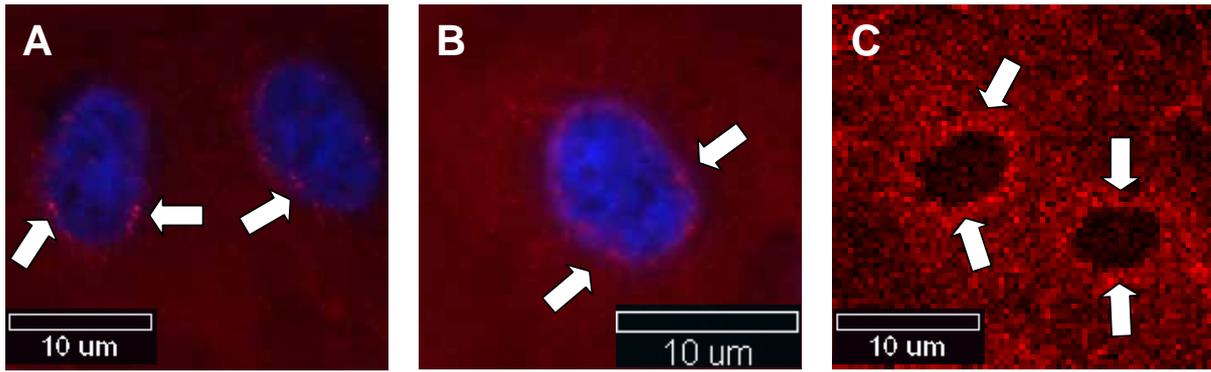
Um ein genaueres Bild über die Lokalisation von Eap innerhalb der Zelle zu bekommen, wurden HUVEC-Monolayer mit 1 bzw. 20 µg/ml Eap drei Stunden inkubiert und Eap mittels Immunfluoreszenz dargestellt. Die Aufnahmen wurden mit einem Konfokalmikroskop gemacht. Die Zelle wurde in den einzelnen Zellebenen durchmustert und die Eap-Lokalisierung bestimmt.

Bei der Inkubation mit 1 µg/ml Eap (Abb. 4.24A) erkennt man Agglomerate von Eap im Zytoplasma, die sich von der Schichtung her in der Zellmitte (Abb. 4.24A III und IV) befinden. Deutlicher wird dies bei der Inkubation von 20 µg/ml Eap (Abb. 4.24B). Dort ist die Lokalisation von Eap ebenfalls in der Mitte der durchmusterten Ebenen am größten (Abb. 4.24B III). Somit zeigte sich nach dreistündiger Inkubation, dass Eap innerhalb der Zelle lokalisiert ist, und nicht lediglich apikal an die Endothelzelle gebunden war.



**Abb. 4.24:** Konfokalaufnahmen von HUVEC nach Eap-Inkubation. Die HUVEC wurden drei Stunden mit 1 bzw. 20 µg/ml Eap inkubiert und im Anschluss immunfluoreszent gefärbt. (A) zeigt die Inkubation mit 1 µg/ml Eap und (B) die Inkubation mit 20 µg/ml Eap. (I) bis (V) stellen die Schichten innerhalb der Zelle von (I) apikal bis (V) basolateral dar.

Bezüglich der homogenen Verteilung von Eap im Zytoplasma fällt bei höherer Vergrößerung (Abb. 4.25) auf, dass es eine perinukleäre Verdichtung (Pfeile in Abb. 4.25) gibt. Dies kann man besonders gut sehen, wenn man auf die DAPI-Färbung verzichtet (Abb. 4.25C).

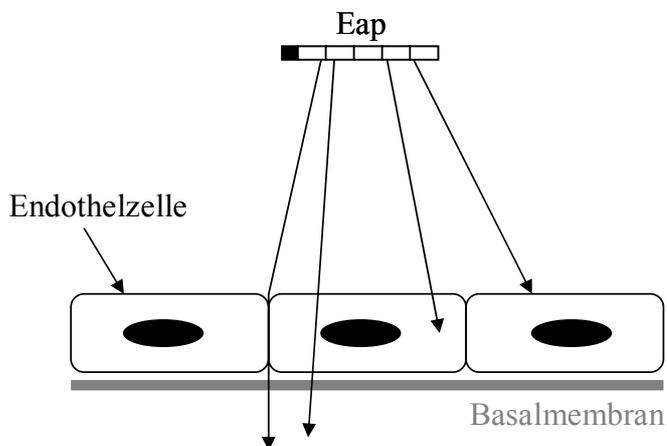


**Abb. 4.25:** Perinukleäre Verdichtung der Eap-Färbung. HUVEC wurden drei Stunden mit 10 µg/ml Eap inkubiert und Eap durch Immunfluoreszenz dargestellt. (A) und (B) stellen Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HUVEC dar und (C) zeigt eine Konfokalmikroskopische Aufnahme. Die Pfeile deuten auf perinukleäre Verdichtungen von Eap.

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Wechselwirkung mit und die Aufnahme von Eap in Endothelzellen der Nabelschnur untersucht. Es ist wichtig, einen Einblick in diese Mechanismen zu bekommen, da Eap als Virulenzfaktor von *S. aureus* verantwortlich ist für dessen Kolonisierung, Adhärenz und Invasion. Zudem greift Eap in die Immunabwehr des Menschen ein, was *S. aureus* weitere Vorteile verschafft. Zu verstehen, unter welchen Umständen Eap aufgenommen wird und unter welchen Umständen auch nicht, ist wichtig zur Prävention von *S. aureus*-Infektionen, die gerade im medizinischen Bereich, auch im Hinblick auf MRSA, an Häufigkeit zunehmen.

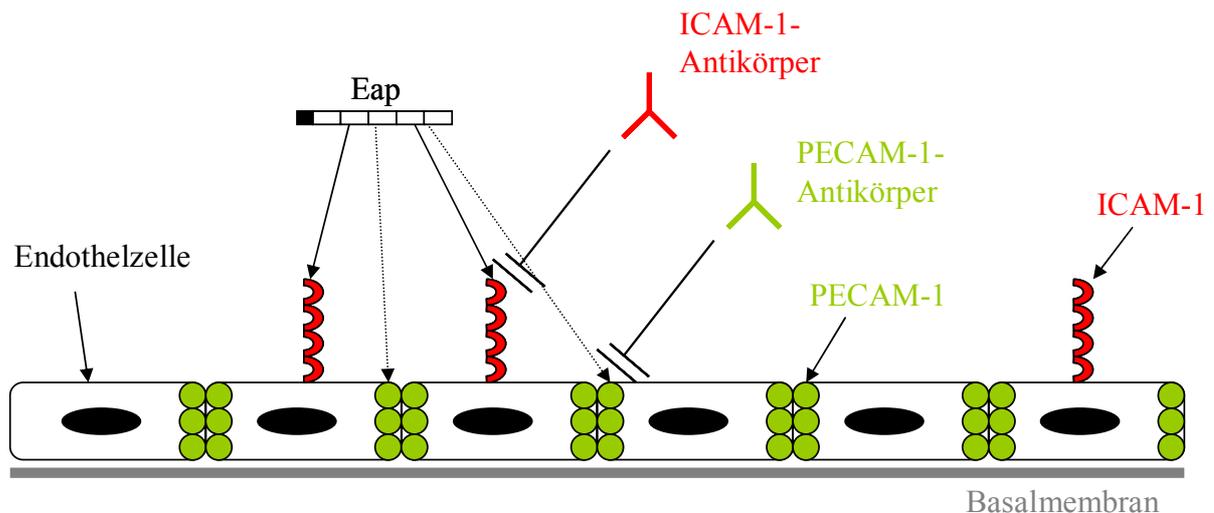
Grundsätzlich gibt es verschiedene Möglichkeiten der Wechselwirkungen von Eap mit dem Endothel der *V. umbilicalis* (Abb. 5.1) bzw. der HUVEC. Entweder bindet Eap lediglich an der Oberfläche der Endothelzellen und verbleibt dort, oder Eap wird in die Endothelzelle aufgenommen. Zudem kann Eap aus der Endothelzelle weiter ins Gewebe bzw. die ECM vordringen oder parazellulär ins Gewebe gelangen.



**Abb. 5.1:** Mögliche Wechselwirkungen von Eap mit dem Endothel. Entweder verbleibt Eap an der Zelloberfläche oder es erreicht das Zellinnere. Außerdem könnte es von der Zelle aus oder parazellulär ins Gewebe gelangen.

Die vorliegenden Ergebnisse konnten zeigen, dass Eap nicht nur im Sinne einer Bindung auf der Zelloberfläche verbleibt, sondern von Endothelzellen aufgenommen wurde. Außerdem beschränkte sich die Lokalisation von Eap nicht nur auf die Endothelzellschicht, sondern Eap konnte darüber hinaus auch im Nabelschnurgewebe bzw. der ECM nachgewiesen werden.

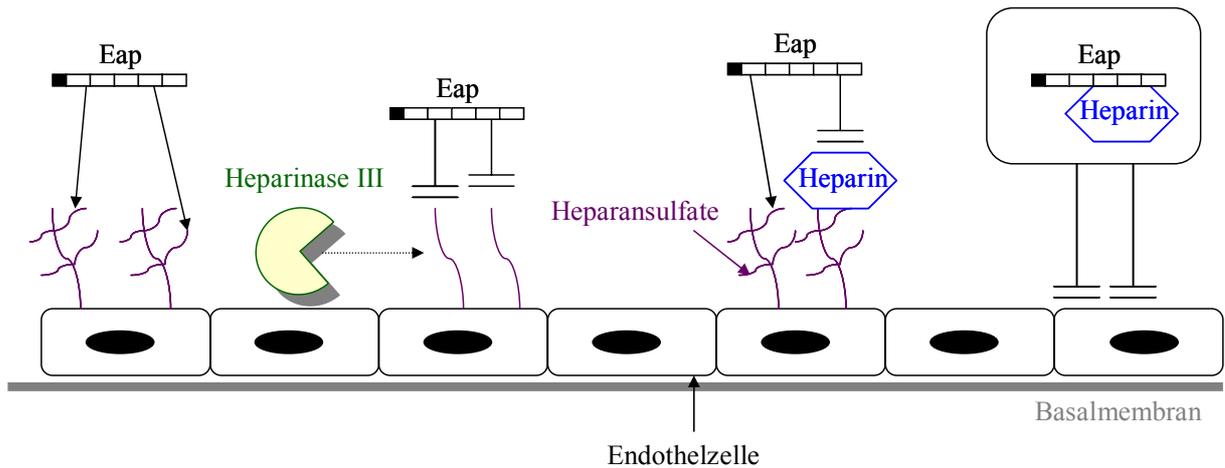
Bisher konnte gezeigt werden, dass ICAM-1 der Endothelzellen als Rezeptor für Eap fungiert. In dieser Arbeit konnte zudem PECAM-1 als möglicher weiterer, allerdings weniger affiner Partner für Eap identifiziert werden (siehe Kapitel 5.6). Durch eine Interaktion von Eap mit diesen Bindungspartnern konnten die ICAM-1- bzw. PECAM-1-Antikörper nicht mehr binden und daher nicht immunfluoreszent angefärbt werden (Abb. 5.2).



**Abb. 5.2:** Bindungspartner von Eap am Endothel. ICAM-1 und PECAM-1 kommen als Bindungspartner für Eap in Frage. Durch deren Blockierung können die ICAM-1- und PECAM-1-Antikörper nicht mehr binden und werden nicht immunfluoreszent angefärbt.

Außerdem konnte auch ein kompetitiver Einfluss von Heparin und eine Bindungsbeteiligung von Heparansulfaten auf den Endothelzelloberflächen gezeigt werden (siehe Kapitel 5.2 und 5.3). Heparin verhinderte die Aufnahme von Eap annähernd vollständig, während eine Entfernung der Heparansulfate als mögliche Bindungspartner für Eap eine weniger starke Reduzierung der Eap-Aufnahme zeigte (Abb. 5.3).

Um die Aufnahme von Eap darzustellen, wurde in den *in vitro*- und *ex vivo*-Experimenten die Methode der Immunfluoreszenz angewandt. Zur graphischen Darstellung wurden die Färbungen quantifiziert. Die Resultate sind jedoch, gerade für die *ex vivo*-Experimente, als Anhaltspunkte zu sehen, da man stets nur kleine Ausschnitte einer ganzen Nabelschnurvene bewerten kann und schwer zu beurteilen ist, ob das Endothel nach längerer Inkubationszeit noch physiologische Eigenschaften aufweist.



**Abb. 5.3:** Einfluss von Heparin und Heparansulfate auf die Bindung und Aufnahme von Eap. Eap bindet möglicherweise über Heparansulfate an die Endothelzelle und kann demnach nicht mehr binden, wenn diese durch Heparinase III entfernt werden. Außerdem verhindert Heparin eine Bindung und Aufnahme, entweder durch Konkurrenz von Eap und Heparin um die Heparansulfate oder durch Komplexbildung von Eap und Heparin, der dann nicht mehr aufgenommen werden kann.

## 5.1 Bindungsassays

Um die direkte Interaktion von Eap und Endothelzellen zu bestimmen, wurden Bindungsassays durchgeführt. Dafür wurde Eap biotinyliert und unter verschiedenen Bedingungen zu einem HUVEC Monolayer gegeben. Im ELISA-Verfahren (siehe Kapitel 2.5) konnte diese Bindung quantifiziert werden.

Wie schon in den Experimenten mit der *V. umbilicalis* und den HUVEC stellte sich auch hier eine von der Inkubationskonzentration abhängige Bindung von Eap an HUVEC dar. Neben der Abhängigkeit der Bindung von der Eap-Konzentration war sie auch abhängig von der Inkubationszeit. Bis 120 min nach Eap-Zugabe gibt es einen deutlichen Anstieg der Bindung von Eap an HUVEC, wogegen nach 120 min keine deutlichen Steigerungen der Bindung mehr erkennbar sind und sich fast ein Plateau einstellt (Abb. 4.24). Bei den Zeitverläufen der Experimente mit der Nabelschnur war nach 240 min keine große Veränderung mehr festzustellen. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Aufnahme bzw. Bindung von Eap limitiert ist, bzw. eine Sättigung erreicht.

Außerdem war deutlich zu sehen, dass es durch gleichzeitige Inkubation mit Heparin zu einer reduzierten Bindung von Eap kommt. Analog zu den *ex vivo*- und *in vitro*-Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass es bei 4 °C zu einer geringeren Eap-Bindung kommt als bei 37 °C.

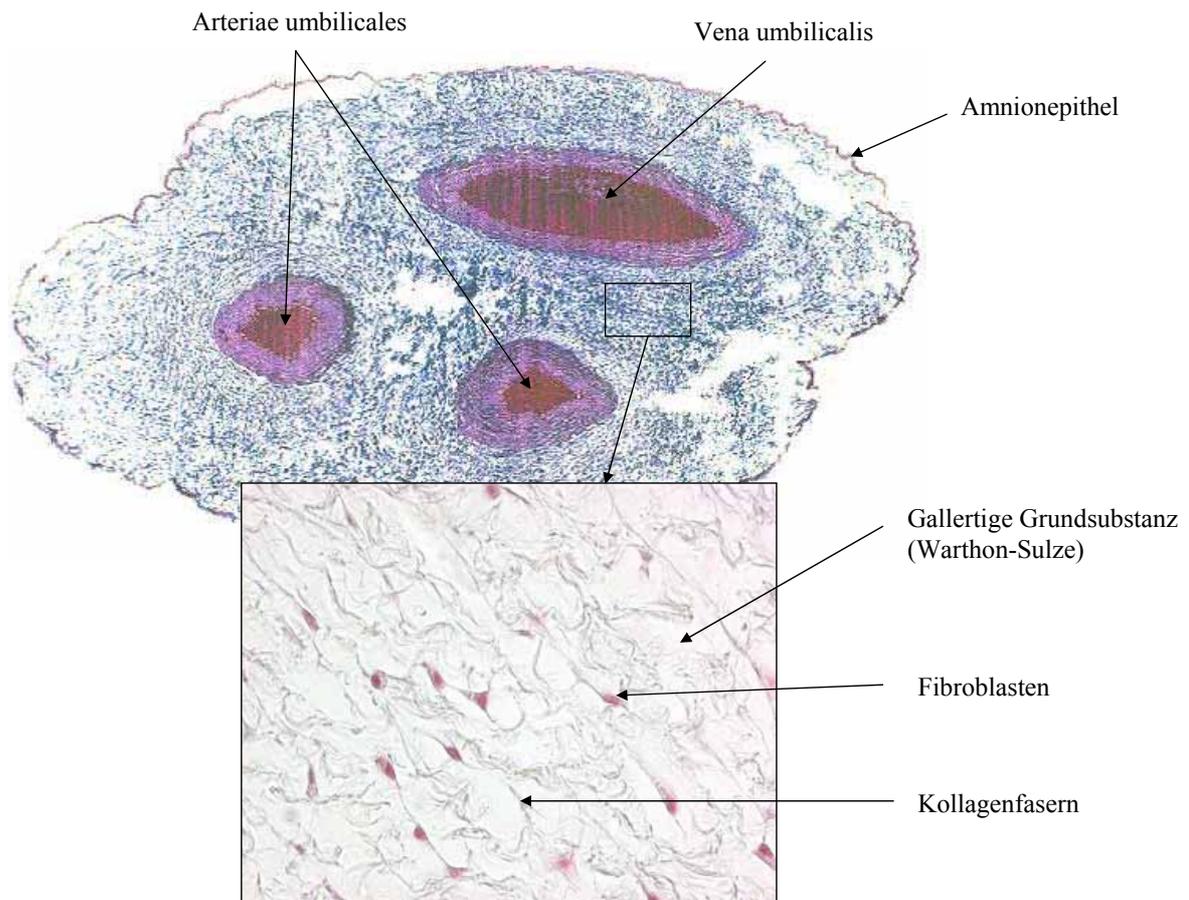
Schlussfolgernd spiegeln die Ergebnisse der Bindungsassays die Resultate der *ex vivo*- und *in vitro*-Experimente in den Punkten konzentrationsabhängige sowie zeitabhängige Bindung und reduzierte Bindung bei 4 °C und unter dem Einfluss von Heparin wider. In dieser Versuchsreihe wurde zusätzlich untersucht, wie sich eine Vorinkubation mit Heparin auswirkt. Das Ergebnis zeigte, dass die Vorkinkubation, im gleichen Maße wie die gleichzeitige Inkubation von Eap und Heparin, die Bindung von Eap an HUVEC reduziert. Dies deutet auf die Möglichkeit hin, dass Heparin an die gleichen „Rezeptoren“ der Zelle oder der ECM bindet, an die auch Eap bindet, um anschließend in die Zelle aufgenommen zu werden. Durch die Vorinkubation werden diese Stellen vom Heparin besetzt und stehen Eap nicht mehr für eine Bindung zur Verfügung.

Zur Methode der Bindungsassays muss man bemerken, dass Eap für die Bindungsassays biotinyliert werden musste, was sich dann evtl. anders verhalten könnte als nicht-biotinyliertes Eap. Es wurde jedoch generell beschrieben, dass eine Biotinylierung keinen Einfluss auf die Eigenschaften des Proteins hat (24).

Eine andere Methode, um ebenfalls eine Bindung zu quantifizieren und zu bestimmen stellt die Durchflusszytometrie, bei der die Fluoreszenz gebundener Moleküle durch „Fluorescence Activating Cell Sorting“ (FACS) gemessen wird, aber auch dafür müssen diese markiert werden, nämlich mit Fluoreszenzmarkern (113). Versuche mit Eap in der Durchflusszytometrie in Zukunft stellen eine gute Ergänzung zu den bisherigen Ergebnissen dar.

## **5.2 Aufnahme von Eap in Endothelzellen**

Die Nabelschnur zeigt im Querschnitt zwei Arterien, die *Aa. umbilicales* mit dicker muskelreicher Media, sowie eine muskelärmere Vene mit dünner Media, die *V. umbilicalis*. Häufig kann man noch den Rest des obliterierten Dottergangs (Allantois) sehen. Als Grundgewebe dient eine gallertige Grundsubstanz (Warthon-Sulze), die für die prallelastische Konsistenz der Nabelschnur verantwortlich ist und Abknickungen vermeidet. Überzogen wird die Nabelschnur vom Amnionepithel (147) (Abb. 5.4). Die *ex vivo*-Bilder bilden Querschnitte einer Nabelschnur ab, man kann hierdurch beurteilen, wie weit die Aufnahme von Eap vom Endothel der *V. umbilicalis* ausgehend ins Nabelschnurgewebe reicht. Generell war zu sehen, dass sich die Färbung nicht nur auf die Endothelzellen der *V. umbilicalis* beschränkt, sondern Eap nach drei Stunden auch deutlich im Nabelschnurgewebe nachzuweisen war, besonders deutlich war dies nach Inkubation mit 10 und 20 µg/ml Eap.



**Abb. 5.4:** Histologisches Präparat eines Nabelschnurquerschnittes (Azan-Färbung). Zu erkennen sind die zwei *Aa. umbilicales* sowie die *V. umbilicalis*. Dazwischen befindet sich die gallertige Grundsubstanz (Wharthon-Sulze), die nur wenige Kollagenfasern sowie Fibroblasten enthält. ("HistoNet 2000" [http://www.histonet2000.de/praeparat.php?pzid=003\\_016](http://www.histonet2000.de/praeparat.php?pzid=003_016))

Das Nabelschnurgewebe ist dem embryonalen Bindegewebe sehr ähnlich: Es besteht aus verzweigten fortsatzreichen Fibroblasten, die in reichlich amorpher Grundsubstanz mit vielen Proteoglykanen eingebettet sind und in der wenig Kollagenfasern zu finden sind (76) (Abb. 5.4).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Eap nicht nur in den Endothelzellen verbleibt, sondern darüber hinaus auch ins Gewebe, also die gallertige Grundsubstanz, aufgenommen wird. Das zeigte auch der Zeitverlauf einer Eap-Inkubation über fünf Stunden, da Eap abhängig von der Inkubationszeit tiefer ins Nabelschnurgewebe aufgenommen wurde. Nach vier Stunden war jedoch keine starke Änderung mehr zu sehen.

Die beobachtete Aufnahme war umso stärker, je höher die Eap-Konzentration war. Bei 1 µg/ml Eap war die Aufnahme, wie auch nach einer Inkubation bei 4 °C oder bei gleichzeitiger Inkubation von Eap mit Heparin, sehr niedrig. Dagegen waren bei 5 µg/ml Eap

deutlichere Ergebnisse in Bezug auf die Aufnahme zu sehen, da Eap durch die Immunfluoreszenz klar erkennbar war und auch Veränderungen in der Aufnahme prägnanter zu sehen waren. Im Bereich dieser Konzentration führten schon 2002 Chavakis und Kollegen (16) ihre Experimente durch, zwar nicht im Bezug auf Bindung und Aufnahme von Eap in Zellen, sondern einer Bindung von Eap an ECM-Proteine. Noch deutlicher wird dies allerdings bei Inkubation mit 10 und 20 µg/ml Eap.

Bisher wurde die Internalisation von Eap alleine in Endothelzellen nicht untersucht, jedoch konnte in vielen Arbeiten nachgewiesen werden, dass Eap für die Internalisation von *S. aureus* verantwortlich ist (49, 64).

Im Vergleich dazu wurde bei den *in vitro*-Experimenten lediglich ein HUVEC Monolayer mit Eap inkubiert. Hier ist der Unterschied in der Eap-Aufnahme zwischen 1 µg/ml Eap und 5 µg/ml Eap größer, ab 5 µg/ml Eap ist das Zytoplasma der HUVEC homogen gefärbt. Man kann davon ausgehen, dass Eap sich komplett im Zytoplasma verteilt hatte, wohingegen sich bei Inkubation mit 1 µg/ml Eap punktuelle Färbungen zeigten, die auf Aggregate von Eap hinweisen. Eine Färbung des Kerns (siehe Abb. 4.24) konnte in keinem Fall beobachtet werden. Einen anderen Raum, so wie in der Nabelschnur das angrenzende Gewebe, gab es bei der Inkubation des Monolayers nicht, wohin Eap sich in die Tiefe hätte ausbreiten könnte, daher sind die Unterschiede ab 5 µg/ml bzw. 10 µg/ml Eap nicht mehr so groß.

Bisher gibt es keine Arbeiten, in denen zur Darstellung von Eap die Methode der Immunfluoreszenz eingesetzt wurde. Es gibt jedoch viele Arbeiten, die andere Proteine von *S. aureus* immunfluoreszent markieren. So wurden unter anderem das „Immunodominant staphylococcal antigen A“ (IsaA) (95) oder das α-Toxin (93) über die Immunfluoreszenz abgebildet. Lorenz *et al.* z.B. entwickelten Antikörper gegen IsaA mit dem Ziel der Prävention von *S. aureus*-Infektionen durch Blockierung dieses Virulenzfaktors. In der Arbeit wurden diese Antikörper dann mit Erfolg für die indirekte Immunfluoreszenz zur Darstellung von *S. aureus* verwendet. Liang *et al.* untersuchten die Aufnahme des Alpha-Toxins in Endothelzellen der Lunge und setzten dafür unter anderem die Methode der Immunfluoreszenz ein.

Als methodische Alternative zur Immunfluoreszenz kommen Quantum dots in Frage. Quantum dots sind kleine (<10 nm) anorganische Fluorophore, die mit anderen Molekülen konjugiert werden können und über ihre Emission sichtbar gemacht werden können (13, 14). Weiterführende Untersuchungen der Wechselwirkungen von Eap und dem Endothel mit dieser Methode würden eine gute Ergänzung zu den bisherigen Ergebnissen darstellen.

### **5.2.1 Aufnahme von Eap in Endothelzellen bei verschiedenen Temperaturen**

Die Aufnahme von Eap divergiert bei verschiedenen Temperaturen. Während bei 4 °C so gut wie keine Aufnahme von Eap in das Zytoplasma beobachtet werden konnte, war die Aufnahme bei Raumtemperatur (etwa 22-24 °C) deutlich höher. Bei 37 °C konnte – im Vergleich zu den bei Raumtemperatur durchgeführten Versuchen – nur eine stärkere Aufnahme festgestellt werden, die jedoch nur geringfügig größer war als die Aufnahme bei Raumtemperatur. Dies lässt den Schluss zu, dass es sich, wie erwartet, bei der Aufnahme von Eap um einen aktiven Prozess handelt. Die verschiedenen Formen des aktiven Transports werden unter dem Begriff Endozytose subsummiert. Dabei gilt 4 °C als eine Temperatur, bei der die intrazelluläre Energiegewinnung zum Erliegen kommt und so die Endozytose als aktiven Prozess nicht mehr erlaubt.

Offen ist in diesem Zusammenhang noch, welche Art der Endozytose für Eap in Frage kommt. Endozytose bedeutet die Aufnahme von Material durch Absenkung und Einschnürung der Zellmembran und anschließender Vesikelbildung. Man unterscheidet (a) die Phagozytose, das bedeutet die Aufnahme fester Substanzen, die größer als 0,5 µm sind, z.B. Zelltrümmer und Bakterien.

Daneben gibt es (b) die Rezeptor-vermittelte Endozytose. Diese bezeichnet die Aufnahme von Proteinen, Lipoproteinen und Makromolekülen. Sie wurde z.B. für den „Epidermal growth factor“ (EGF) beschrieben (33, 99) und gilt auch für Aufnahme von „Low Density Lipoprotein“ (LDL). Bei dieser Art der Endozytose sind spezifische Proteine (Clathrin) an der Invagination der Plasmamembran beteiligt, die einen Clathrin-Mantel (coated pit) um die aufgenommenen Partikel bilden. Kurz nach der Abschnürung des Vesikels zerfällt dieser und das Clathrin steht der Zelle wieder zur Verfügung.

Bei (c) der Caveolae-vermittelten Endozytose befinden sich in der Plasmamembran glatte, Ω-förmige Grübchen (Caveolae), die reich an Cholesterin und Sphingolipiden sind und Rezeptoren besitzen können. Stabilisiert werden sie durch Caveolin, das die Caveolae von der zytosolischen Seite her bedeckt. Einige Viren und Bakterientoxine werden z.B. über diesen Weg aufgenommen.

Über (d) die Clathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytose ist bisher wenig bekannt, sie konnte z.B. für den IL-2 Rezeptor gezeigt werden (97).

Die Phagozytose kommt als Aufnahmeweg für Eap nicht in Frage, da kontinuierliches Endothel, im Gegensatz zum diskontinuierlichem Leberendothel, zur Phagozytose nicht

befähigt sind und spezielle Makrophagen der Aufnahme von Bakterien u.ä. dienen mit dem Hintergrund diese zu vernichten.

Vielmehr kommt die Clathrin-vermittelte Endozytose in Frage, da diese bei Stoffen, die an Zellrezeptoren binden, deren Aufnahme vermittelt. Da Eap an den Zellrezeptor ICAM-1 bindet, ist dieser Weg ebenfalls für die Aufnahme von Eap vorstellbar. Verschiedene Bakterientoxine werden jedoch über den Caveolae-vermittelten Weg in die Zelle aufgenommen und für Eap muss auch dieser Weg in Erwägung gezogen werden. Das intrazelluläre Schicksal der aufgenommenen Stoffe hängt jedoch gar nicht vom Aufnahmeweg auf (73).

Aus den Experimenten kann man die Schlussfolgerung ziehen, dass es sich um einen aktiven Aufnahmemechanismus von Eap in die Endothelzellen handelt, der wahrscheinlich über Clathrin- oder Caveolae-vermittelte Endozytose funktioniert. Dennoch gibt es Aspekte, die weiterführende Versuche verlangen. Es bleibt zu klären, über welchen der beiden Wege genau Eap in die Zelle aufgenommen wird und welchen anschließenden Weg innerhalb der Zelle Eap zurücklegt (siehe auch Kapitel 5.6: Intrazelluläre Lokalisation von Eap).

### **5.3 Heparin reduziert die Aufnahme von Eap auf ein Minimum.**

Durch Inkubation von Eap zusammen mit Heparin konnte eine Aufnahme von Eap bis auf ein Minimum reduziert werden. Das kann zum Einen darauf beruhen, dass Eap einen Komplex mit Heparin bildet, der nicht mehr in die Endothelzellen aufgenommen werden kann, oder dass Heparin mögliche Bindungsstellen am Eap-Molekül blockiert. Daneben ist es auch möglich, dass das lösliche Heparin mit Heparansulfaten auf der Zelloberfläche als Bindungspartner von Eap (siehe Kapitel 5.4: Heparansulfate haben nur begrenzten Einfluss auf die Aufnahme von Eap) kompetitiert.

Heparin hat ähnliche Effekte wie Eap; beide blockieren im inflammatorischen Geschehen eine Adhäsion von Leukozyten an die Endothelzellen über die Mac-1-ICAM-1-Bindung. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Heparin mit Mac-1 von Leukozyten interagiert und dadurch eine Bindung der Leukozyten ans Endothel verhindert. Eap interagiert mit ICAM-1 der Endothelzellen, nicht aber mit dem Leukozyten, und verhindert eine Diapedese der Neutrophilen (120).

Darüber hinaus führt Heparin zu einer verminderten Expression von ICAM-1, sowohl in Endothelzellen (105) als auch am Mesothel (1). So könnte ein wichtiger Bindungspartner für Eap wegfallen oder zumindest reduziert werden, was ebenfalls zu einer reduzierteren

Bindung und Aufnahme von Eap führen würde. Allerdings geschieht dies auf langfristige Sicht, und ist daher unwahrscheinlich.

Ein nachträgliches Waschen nach Eap-Inkubation konnte allerdings keine wesentliche Reduktion in der Internalisierung von Eap zeigen. Heparin hat demnach nicht die Fähigkeit gebundenes oder aufgenommenes Eap wieder zu entfernen, sondern entfaltet seine Wirkung bei gleichzeitiger Inkubation mit Eap.

Die Interaktion von Bakterien, aber auch Viren, mit Heparin und Glykosaminoglykanen wurde schon früh untersucht (150). Während aktuell über eine Heparin-*Staphylococcus*-Bindung von Mattsby-Baltzer und Kollegen (2011) Daten vorgelegt wurden (103), gibt diese Arbeit Hinweise auf eine direkte Interaktion von Eap mit Heparin.

Es ist wichtig, Einblick in die Interaktion von Eap mit Heparin zu bekommen, da Heparin ein körpereigener Stoff ist, und somit auch im Falle von *S. aureus*-Infektionen eine Rolle spielen kann. Heparin wird von den Mastzellen, z.B. bei einer Gewebsverletzung, ausgeschüttet und bestimmt das Gleichgewicht zwischen Blutgerinnung und Antikoagulation. Es wirkt hemmend auf die Blutkoagulation, indem es im Blut zirkulierendes Antithrombin (AT) bindet und dessen Aktivität um das 1000-fache erhöht.

Therapeutisch kann exogen zugeführtes Heparin zur Thrombose-Prophylaxe oder als Antikoagulanzen bei der Hämodialyse eingesetzt werden. AT inaktiviert Faktor Xa und Thrombin (T) und wirkt so anti-koagulierend. Heparin kommt in der unfraktionierten Form (UFH) oder in der fraktionierten Form, dem niedermolekularen Heparin (NMH), vor. Je nach Indikation wird entweder UFH (z.B. zur peri- oder postoperativen Thromboseprophylaxe) oder NMH (z.B. zur Therapie einer Venenthrombose) eingesetzt (123). In den hier beschriebenen Experimenten wurde Heparin-Natrium (UFH) verwendet.

Der genaue Mechanismus, wie Heparin die Bindung von Eap an die Endothelzellen verhindert und somit auch die Aufnahme blockiert, bleibt Teil noch folgender Untersuchungen. Da Heparin einen Einfluss hat, wenn es gleichzeitig mit Eap inkubiert wird, liegt die Vermutung nahe, dass es zu einer Bindung von Eap und Heparin kommt, so dass anschließend keine Aufnahme von Eap mehr erfolgen kann.

## 5.4 Heparansulfate haben einen geringen Einfluss auf die Aufnahme von Eap.

Da ein Einfluss von Heparin auf die Aufnahme von Eap gezeigt werden konnte, sollte untersucht werden, welche Rolle die Glykocalix auf den Zelloberflächen bezüglich Bindung und Aufnahme von Eap spielen.

Heparansulfate (HS) sind metabolisch dynamische Zellbestandteile, die einem schnellen Auf- und Abbaumechanismus unterliegen, d.h. sie können synthetisiert und dann entweder sekretiert oder in Zellmembran eingebaut werden. In der Membran integriert können HS wieder in die Zelle aufgenommen werden oder auch durch Heparinasen degradiert werden (52). Die zellbiologischen Funktionen der HS-Proteoglykane (HS-PG) beruhen auf spezifischen Interaktionen ihrer Glykosaminoglykan (GAG)-Seitenketten mit basischen Proteinen, wie z.B. Eap. Daneben besitzen HS anti-koagulatorische Fähigkeiten, genau wie Heparin, die Inhibierung des Thrombins und anderer Gerinnungsproteasen durch AT ortsständig zu katalysieren (siehe Kapitel 5.2) (52).

Um für die Experimente die HS auf den Zelloberflächen zu entfernen, wurde Heparinase III eingesetzt. Sie spaltet selektiv die HS (39). Heparinasen sind Enzyme, die spezifisch für Heparin sind und physiologisch von bestimmten Mikroorganismen wie dem *Flavobacterium heparinum* synthetisiert werden. Sie werden entweder direkt aus *F. heparinum*-Kulturen gewonnen oder können rekombinant durch Expression in *E. coli* gewonnen werden (39).

Die Aufnahme von Eap war nach Entfernung der HS reduziert. In den *ex vivo*-Experimenten (Endothel der *V. umbilicalis*) war der Unterschied in der Aufnahme nach Entfernung der HS größer als bei den *in vitro*-Experimenten mit HUVEC. So konnte *ex vivo* eine Reduktion der Aufnahme um maximal 40% gezeigt werden. Dies lässt vermuten, dass HS einen Interaktionspartner für Eap darstellen, der jedoch nicht als alleiniger Bindungspartner für die Internalisation verantwortlich sein kann. Es muss auch noch eine Bindung an andere "Rezeptoren" stattfinden, die für die Aufnahme verantwortlich sind.

In diesem Zusammenhang gibt es große Ähnlichkeiten zwischen den Interaktionen von Eap mit Endothelzellen und dem ternären Komplex aus T, AT und VN, der in der Arbeitsgruppe Preissner entdeckt wurde (21-23). Durch Bindung von VN an T-AT erhält der ursprünglich binäre Komplex bestimmte Heparin-bindende Eigenschaften, was die Bindung an HS der Endothelzellen ermöglicht und zur Aufnahme des T-AT und dessen Entfernung aus dem Blutkreislauf führt. 1992 konnten de Boer *et al.* zeigen, dass für die Bindung des ternären

Komplexes an HUVEC die Heparin-bindende Domäne des VN verantwortlich ist, wobei die Ergebnisse stark denen mit Eap ähneln. Exogenes Heparin blockierte nahezu komplett die Bindung von VN-T-AT an HUVEC, während eine Entfernung der HS-PG eine Reduzierung der Bindung um 50% erzielte. 1995 konnte die Arbeitsgruppe auch die Aufnahme des ternären Komplexes in die subendotheliale ECM nachweisen, ähnlich, wie es hier für Eap gezeigt wurde. De Boer *et al.* gingen jedoch davon aus, dass die Aufnahme nicht alleinige Folge der Bindung sei, sondern weitere „Rezeptoren“ im Sinne einer Rezeptor-vermittelten Endozytose in den Aufnahmemechanismus involviert sind (siehe Kapitel 5.2.1) (21–23). Um zu prüfen, ob der Mechanismus der Bindung und Aufnahme des ternären Komplexes der gleiche ist, der der Bindung und Aufnahme von Eap zugrunde liegt, wären Experimente, die eine Konkurrenz von Eap und VN-T-AT untersuchen, sinnvoll.

Andererseits kann man aber auch nicht ausschließen, dass durch die Heparinase III möglicherweise nicht alle HS entfernt werden konnten und Eap somit vor allem durch eine Bindung an HS aufgenommen werden konnte, bzw. dass die Eap-Konzentrationen so hoch waren, dass Eap letztendlich aufgenommen wurde.

Frühere Arbeiten hatten sich bisher nicht mit der Rolle der HS in Bezug auf Eap beschäftigt, allerdings wurden *S. aureus*-Stämme hinsichtlich ihrer Bindung an ECM und die Rolle der dort lokalisierten HS untersucht. Man kam auch hier zu dem Ergebnis, dass durch Vorbehandlung mit Heparinase III eine Reduzierung in der Bindung von *S. aureus* stattfand (144).

Es ist wichtig, die Rolle der HS in Bezug auf die Eap-Bindung und Aufnahme zu kennen, da HS von fast allen Zelltypen in Form von zusammengesetzten HS-PG synthetisiert werden und auf Zelloberflächen, in Basalmembranen und in der ECM vorkommen. Außerdem fungieren sie als Korezeptor für die Zytokin-Rezeptor-Wechselwirkung, z.B. von „Vascular endothelial growth factor“ (VEGF) oder „Basic fibroblast growth factor“ (bFGF) (34, 47, 81, 125). So könnte Eap durch Bindung an HS-PG möglicherweise auch eine Verdrängung der HS-PG-Zytokin-Wechselwirkung hervorrufen. Möglicherweise lässt sich durch diese Interaktion der anti-proliferative Effekt von Eap in Bezug auf die Endothelzell-Proliferation erklären, der in den Arbeitsgruppen Preissner-Herrmann beobachtet wurde (133). Wenn Eap durch seine Bindung die HS-PG blockiert, fällt deren Rolle als Korezeptor für VEGF und bFGF aus, so dass die Konkurrenz zwischen Eap und diesen Zytokinen deren proliferative Wirkung blockiert.

Neben der Funktion der HS-PG als Korezeptor für Zytokine dienen sie ebenfalls den Chemokinen als zelluläre Bindungskomponenten und spielen eine Rolle in der

Transmigration von Neutrophilen. Die Wechselwirkung zwischen dem Neutrophilen und den Chemokinen steht am Anfang der Leukozytenmigration und ist eine Voraussetzung für die feste Anheftung und Bindung an ICAM-1 (siehe Kapitel 1.4.4.3). Durch eine Bindung von Eap an die HS-PG würden die polyanionischen Bindungsstellen für Chemokine maskiert. Das bedeutet, dass eine lokal geprägte („juxtacrine“) Aktivierung der Leukozyten ausbleibt, es zu keiner festen Anheftung und damit auch zu keiner Diapedese der Leukozyten ins subendotheliale Gewebe kommen kann. Neben der Tatsache, dass Eap die feste Anheftung des Leukozyten durch Blockade von ICAM-1 verhindert, würde die Konkurrenz zwischen Eap und Chemokinen erklären, dass die Neutrophilen-Rekrutierung *in vivo* durch Eap reduziert werden kann (16). Zusammen genommen erklärt dies die starke anti-inflammatorische Aktivität von Eap (4, 16).

## 5.5 Die Rolle der Extrazellulären Matrix

Es konnte bisher gezeigt werden, dass Eap an Strukturen der ECM bindet. Jedoch wurde mit immobilisierten und einzelnen Komponenten gearbeitet, und nicht mit intakter ECM als Ganzes. Es wurde eine Bindung von Eap an immobilisiertes VN, FBG und FN nachgewiesen (16).

Um zu untersuchen, ob daher auch die ECM eine Rolle bezüglich der Lokalisation von Eap spielt, wurden die Zellen eines HUVEC Monolayers nach Inkubation mit Eap entfernt, so dass nur die ECM zurückblieb.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich Eap nach der Inkubation von HUVEC nicht nur in den Endothelzellen, sondern auch in der ECM befand. Je höher die Konzentration von Eap war, desto mehr Eap befand sich anschließend auch in der ECM.

Die ECM besitzt eine Vielzahl von Komponenten, vor allem Kollagenfasern und PG/GAG, die als potentielle Bindungspartner für Eap in Frage kommen. Zu den Glykosaminoglykanen zählen die Heparan-, Chondroitin- und Keratansulfate und die Hyaluronsäure. Durch Kollagen und Elastin wird der ECM die Struktur verliehen. Laminin findet man in der Basalmembran. FN ist assoziiert mit Kollagen, und spielt v.a. bei der Adhäsion und Migration von Zellen eine wichtige Rolle (91).

Eine adhäsive Zelle bindet über ECM-Rezeptoren in der Plasmamembran an die ECM. Die am weitesten verbreiteten Rezeptoren zählen zu den Integrinen, die intrazellulär Anschluss ans Zytoskelett der Zelle haben und neben der mechanischen Verankerung auch der Signaltransduktion dienen. Verschiedene Adhäsionsproteine vermitteln die Adhäsion

zwischen der Zelle und der ECM, z.B. Fibronectin. Fibronectin bindet über Integrine an die Zelle und besitzt bezüglich der ECM Affinität zu Kollagenfibrillen, Fibrin und Proteoglykanen (97). VN ist ein multifunktionales Glykoprotein und kommt im Blutplasma sowie in der ECM vor. Es ist an der Oberfläche elastischer Fasern assoziiert und hat sehr potente Zelladhäsionsfähigkeiten. Die Rezeptoren für VN auf der Zelloberfläche stellen wiederum Integrine dar. (55).

Der Bindungspartner von Eap bezüglich der ECM könnten Proteine sein, die ebenfalls von Heparin bzw. HS gebunden werden, da bei gleichzeitiger Inkubation mit Heparin wenig Eap, wiederum durch Konkurrenz zwischen Heparin und Eap um HS-PG während der initialen Zellbindung, aufgenommen wurde. An anderer Stelle wurde gezeigt, dass Heparin an FN bindet, bzw. dass FN neben Bindungsdomänen für Kollagen auch eine Domäne für die Bindung an Heparin besitzt (37, 80, 82). Dass Eap ebenfalls an FN bindet, wurde bereits demonstriert (16). Einen weiteren Bindungspartner, sowohl von Eap als auch von Heparin, stellt VN dar. Es enthält ebenfalls Heparin-bindende Domänen, deren Struktur ähnlich der Heparin-bindenden Domäne des FN ist (138). Außerdem können sowohl Eap als auch Heparin an FBG binden (111).

Da in Gegenwart von Heparin kaum Eap aufgenommen wurde, wird es sich um eine Konkurrenz zwischen Heparin und den genannten HS-PG-Bindungsstellen um Eap handeln, da ein anschließendes Waschen mit Heparin nach Bindung von Eap kaum einen Effekt zeigte: die Bindung blieb bestehen und Heparin konnte Eap nicht mehr von der Bindung lösen. Bei gleichzeitiger Inkubation von Heparin und Eap können diese Komplexe (siehe Kapitel 5.3) nicht mehr an FBG, VN oder FN binden. In Bindungsassays konnte eine direkte Wechselwirkung von Heparin an immobilisiertes Eap gezeigt werden (siehe Anhang Kapitel 9.1).

Neben der direkten Bindung von Eap an die ECM, kann der Grund für die Lokalisation von Eap in der ECM der Durchtritt des Proteins durch die Endothelzelle in die ECM sein. Denn schon die *ex vivo*-Experimente zeigten, dass die Aufnahme von Eap sich nicht auf das Endothel der *V. umbilicalis* beschränkte, sondern sich darüber hinaus ins Nabelschnurgewebe ausbreitete. In dem Zusammenhang kann man Vergleiche zu Arbeiten von de Boer *et al.* anführen (siehe Kapitel 5.4). Sie fanden heraus, dass der ternäre Komplex zunächst intrazellulär aufgenommen wurde, und von dort aus basolateral weiter in die subendotheliale Matrix gelangte (23).

Festzuhalten bleibt, dass Eap genauso intrazellulär wie auch in der ECM lokalisiert ist. Ungeklärt bleibt, ob dies durch eine direkte Bindung von Eap an diese Strukturen mittels

parazellulärem Transport und unter Umgehung der transzellulären Passage geschieht. Dies sollte in weiteren Experimenten untersucht werden.

## **5.6 Intrazelluläre Lokalisation von Eap**

Da gezeigt werden konnte, dass Eap nicht nur an der Zelloberfläche bindet, sondern in einem aktiven Prozess aufgenommen wird, stellte sich die Frage nach der Lokalisation von Eap innerhalb der Zelle.

Es zeigt sich in den Konfokal-Aufnahmen beim Durchmustern der einzelnen Zellschichten, dass Eap sich nach dreistündiger Inkubation nicht auf der Zelloberfläche befindet, sondern innerhalb der Zelle nach basolateral lokalisiert ist. Ab einer Inkubationskonzentration von 5 µg/ml Eap zeigte sich eine homogene Verteilung von Eap im Zytoplasma. Je höher die Konzentration von Eap war, desto mehr Eap ließ sich auch im Zytoplasma der HUVEC nachweisen. Anders sah es bei Inkubation mit 1 µg/ml Eap aus, da sich wenige Eap-Aggregate punktuell im Zytoplasma befanden. Genau dasselbe Bild zeigte sich auch bei gleichzeitiger Inkubation von höheren Konzentrationen Eap mit Heparin.

Neben der scheinbar homogenen Verteilung im Zytoplasma war um den Kern herum meist eine verstärkte und verdichtete Immunfluoreszenz-Färbung zu erkennen. Das wird ganz besonders gut deutlich, wenn man eine Aufnahme ohne die DAPI-Färbung, also die Kernfärbung, betrachtet. Man kann daher vermuten, dass es zu einer perinukleären Verdichtung oder Anlagerung von Eap an die Kernmembran kommt. Die Fläche des Kerns ist dagegen immer komplett frei von Eap. Zumindest nach dreistündiger Inkubation ist kein Eap in den Kern eingedrungen.

Die Verteilung von Eap innerhalb der Zelle spricht gegen einen parazellulären Weg von Eap in die ECM (siehe Kapitel 5.5), da es eine gleichmäßige Verteilung im Zytoplasma mit einer perinukleären Verdichtung gibt. Würde Eap parazellulär ins Gewebe gelangen, würde man eine verstärkte Lokalisation von Eap an den Zellgrenzen erwarten.

Bestimmte Zellorganellen sind aufgrund deren Funktion perinukleär lokalisiert, z.B. der Golgi Apparat und das raue endoplasmatische Retikulum (rER), denn der Kern und das ER besitzen eine gemeinsame doppelte Membran (142). Man könnte daher annehmen, dass Eap sich genau in diesen Organellen besonders anreichert, z.B. im Golgi-Apparat nach Aufnahme per Endozytose weiterverteilt bzw. prozessiert wird. Außerdem steht gerade der perinukleäre Raum in ständiger Verbindung mit dem Kerninneren, so dass nach längerer Inkubationszeit möglicherweise Eap auch in den Kern gelangen könnte.

Sobke *et al.* fanden 2006 heraus, dass Eap Wachstums- und Differenzierungsprozesse von Endothelzellen durch Blockade des Ras-Raf-Signalweges behindert. Allerdings stellte sich die Frage, ob dies durch ein intrazelluläres Eingreifen von Eap oder lediglich durch Bindung an die Zelloberfläche geschieht (133). Nach den Ergebnissen dieser Arbeit wäre eine intrazelluläre Interaktion von Eap denkbar. Das sind Fragen, die es in Zukunft noch zu untersuchen gilt. Denn auch in früheren Arbeiten wurde eine genaue Lokalisation von Eap innerhalb der Zelle bisher nicht bestimmt. Eine Möglichkeit wäre, nach Eap-Inkubation von Zellen, eine Zellfraktionierung (134) vorzunehmen, um zu sehen, in welchem Zellkompartiment Eap lokalisiert ist. Dies ist besonders interessant im Hinblick auf den Mechanismus, wie und wo Eap in den Alltag der Zelle eingreift.

## **5.7 ICAM-1 und PECAM-1 als Interaktionspartner für Eap**

Da in früheren Arbeiten ICAM-1 als Interaktionspartner von Eap postuliert wurde (16), wurde untersucht, wie sich die ICAM-1-Verteilung des Endothels nach Inkubation der *V. umbilicalis* mit Eap verhält.

Hier konnte gezeigt und durch Quantifizierung bestätigt werden, dass die Darstellung von ICAM-1 nach Inkubation mit Eap reduziert war. Je höher die Eap-Konzentration und je länger die Inkubationszeit war, umso deutlicher war die Reduktion der ICAM-1-Färbung.

Bei PECAM-1 waren die Ergebnisse weniger eindeutig. Nach einer Eap-Inkubation konnte PECAM-1 nicht so deutlich dargestellt werden wie in der Kontrolle ohne Eap-Behandlung. Jedoch gab es keine Konzentrations- oder Zeitabhängigkeit der Reduzierung, wie dies bei ICAM-1 zu sehen war. Auffällig war, dass sowohl PECAM-1 als auch ICAM-1 nach relativ kurzer Einwirkzeit von Eap, in den 15 und 30 min-Werten hohe Standardabweichungen zeigten, was sich jedoch in den späteren Werten längerer Inkubationszeit legte.

Die Frage besteht, ob die anti-ICAM-1-Antikörper nicht mehr binden konnten, weil ICAM-1 von Eap blockiert wurde oder weil tatsächlich eine Herunterregulation von ICAM-1, also eine verminderte Expression, von Seiten der Endothelzelle, ausgeht. Wahrscheinlicher ist die erste Annahme, denn in viele Arbeiten wurde gezeigt, dass Eap direkt an ICAM-1 bindet (16). Außerdem kommt es generell wesentlich häufiger zu einer Hochregulation als zu einer Absenkung von ICAM-1, z.B. in jedem inflammatorischen Geschehen durch TNF- $\alpha$ , IL-1 oder INF- $\gamma$  (17). Nur wenige, zudem nicht-physiologische, Stoffe führen zu einer

Herunterregulation, z.B. Pirfenidon, ein antifibrotisches Medikament (77), oder Viren, wie das Kaposi Sarkom-assoziierte Herpes-Virus (101).

Zwischen den Inkubationszeiten vier und fünf Stunden gab es hinsichtlich der Aufnahme von Eap keine großen Unterschiede mehr. Dies könnte auf einen maximalen Effekt nach vierstündiger Inkubation hinweisen. Um dies zu untersuchen sollten weitere Versuchsreihen mit Inkubationen von Eap bis 24 Stunden oder mehr durchgeführt werden. Allerdings stellt sich die Frage, inwieweit die Zellen dann noch vital sind, da die Inkubation von Eap in einem Medium frei von Zusätzen durchgeführt werden muss, um Interaktionen mit Eap zu vermeiden.

Die Wechselwirkung von Eap mit PECAM-1 wurde bisher nur wenig untersucht. Daher könnte PECAM-1 ein weniger affiner Bindungspartner von Eap sein. 1997 hat eine niederländische Gruppe die Expression von Oberflächenmolekülen wie ICAM-1 und PECAM-1 untersucht, allerdings nach Infektion mit *S. aureus*, nicht Eap. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass sich 23 Stunden nach der Aufnahme von *S. aureus* zu einer erhöhten Expression von ICAM-1 und einer unveränderten Expression von PECAM-1 kam. Eine erhöhte ICAM-1-Expression führte demnach auch zu einer erhöhten Adhäsivität von Monozyten und Granulozyten (6). Dies wurde nach Infektion mit *S. aureus* beobachtet. Eap für sich alleine hat ja die gegenteilige Eigenschaft, nämlich ICAM-1 zu binden und somit zu blockieren, um die Diapedese von Neutrophilen zu verhindern.

## **5.8 Permeabilitätssteigerung durch Eap gering**

In den *ex vivo*-Experimenten konnte eine Reduzierung der PECAM-1-Verteilung gezeigt werden. Oft zeigten die Ergebnisse jedoch hohe Standardabweichungen, außerdem war die Reduzierung von PECAM-1 nicht abhängig von der Eap-Konzentration oder der Inkubationsdauer, wie es z.B. bei ICAM-1 der Fall war. Daher wurde die PECAM-1-Verteilung ebenfalls *in vitro* untersucht, vor allem im Hinblick auf Permeabilitätsverluste. Da gezeigt wurde, dass Thrombin die Permeabilität eines HUVEC-Monolayers erhöht (100), wurden HUVEC als Positivkontrolle für Adhäsionsverluste mit Thrombin behandelt. In einigen Arbeiten konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Expression von PECAM-1 und erhöhter Zellpermeabilität hergestellt werden (152, 154).

Allerdings konnte keine deutliche Veränderung in der PECAM-1-Verteilung nach Inkubation mit Eap dargestellt werden, eine Behandlung mit Thrombin zeigte definitiv stärkere Unterschiede in der Expression von PECAM-1. Somit kann man resumieren, dass

Eap kaum einen Einfluss auf die Permeabilität zu haben scheint. Andererseits kann man weiterführend für die Ermittlung einer Permeabilitätserhöhung die Expression von VE-Cadherin untersuchen (19). Dies würde sich als weitere Methode in der Zukunft anbieten.

Ebenfalls im Hinblick auf die Permeabilität wurde ein Permeabilitätsassay durchgeführt. Dieses wird häufig verwendet, um die Durchlässigkeit eines Monolayers zu testen und kann mit verschiedenen Substanzen zur Messung angewendet werden, wie z.B. Evans blue (117) oder eben Rhodamin- oder FITC-gekoppeltes Dextran, wie hier verwendet (70, 132). Wie schon bei der Untersuchung der Expression von PECAM-1 waren auch hier die Ergebnisse wenig eindeutig. Es war lediglich eine Tendenz dahingehend zu erkennen, dass es evtl. eine leichte Permeabilitätserhöhung gibt, die allerdings wenig relevant sein dürfte. Daher bleibt festzuhalten, dass Eap die Permeabilität wenig beeinflusst.

In früheren Arbeiten wurde bisher wiederum nur die Beziehung zwischen *S. aureus* und Permeabilität, noch nicht zwischen Eap und Permeabilität untersucht. Dort wurde gezeigt, dass es bei Infektion mit *S. aureus* zu einer Permeabilitätssteigerung kommt, und zwar durch das *S. aureus*  $\alpha$ -Toxin (121, 137).

## **5.9 Schlussfolgerung**

Zusammenfassend läßt sich festhalten, dass die in dieser Arbeit erhobenen Befunde darauf hinweisen, dass Eap über einen aktiven Mechanismus in die Endothelzelle aufgenommen wird und darüber hinaus auch in die subendotheliale Matrix gelangt. Innerhalb der Zelle konnte eine Verteilung von Eap im Zytoplasma gezeigt werden, mit einer perinukleären Verdichtung, jedoch keiner Lokalisation im Kern selbst.

Für die Bindung von Eap an die Endothelzelle scheinen HS-PG eine wichtige Rolle zu spielen, die über eine Heparin-bindende Sequenz von Eap interagieren, da exogenes Heparin eine Bindung und Aufnahme von Eap inhibieren konnte. So kommt es zu einer Konkurrenz zwischen Heparin und HS-PG um die Bindungsstellen am Eap. Eine Konkurrenz von Eap mit z.B. Zytokinen wie VEGF und bFGF sowie Chemokinen um diese polyanionischen Bindungsstellen erklärt auch die anti-inflammatorische und anti-proliferative Wirkung des bakteriellen Proteins.

Die vormals gemachte Beobachtung, dass ICAM-1 als Bindungspartner auf den Endothelzellen für Eap fungiert, konnte in den Experimenten unterstützt werden. Zudem kommt PECAM-1 als möglicher weiterer, aber weniger affiner, „Rezeptor“ in Frage. Im

Zusammenhang mit einer möglichen Interaktion von Eap mit PECAM-1 konnte gezeigt werden, dass Eap jedoch keinen Einfluss auf die Permeabilität des Endothels hat.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können zu weiteren Forschungsansätzen führen, denn das molekulare Verständnis der Wechselwirkungen und der Aufnahme von Eap als Virulenzfaktor von *S. aureus* bietet die Möglichkeit neuer Therapieansätze gegen *S. aureus*-Infektionen.

## 6 Zusammenfassung

*Staphylococcus aureus* ist ein ubiquitär vorkommendes Bakterium, dessen Infektionen oft mit schweren endovaskulären Krankheiten assoziiert sind. Die Ursache dafür sind verschiedene Virulenzfaktoren, u.a. das hier bearbeitete Extracellular Adherence Protein (Eap).

Eap erfüllt verschiedene Aufgaben: So führt es zu einer Adhärenz der *S. aureus*-Bakterien untereinander sowie auch der Adhäsion des Bakteriums an eukaryotische Zellen. Außerdem greift es in das Abwehrsystem des Menschen ein, um der humanen Immunantwort zu entgehen. Zudem besitzt es anti-inflammatorisches und anti-angiogenes Potenzial. Verschiedene Plasmaproteine wie Fibrinogen, Fibronectin und Vitronectin und auch ICAM-1 wurden als Bindungspartner für Eap identifiziert.

Ob Eap auch an andere Rezeptoren als ICAM-1 binden kann und was nach Bindung an den eukaryotischen Zellen passiert und ob Eap an der Oberfläche der Zellen verbleibt oder in die Endothelzellen und darüber hinaus aufgenommen wird, war Gegenstand dieser Arbeit.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden *ex vivo*-Experimente mit Gefäßen von Nabelschnüren, sowie *in vitro*-Experimente mit makrovaskulären Endothelzellen (HUVEC) durchgeführt. Zellen und die *V. umbilicalis* der Nabelschnur wurden unter verschiedenen Bedingungen mit Eap inkubiert und anschließend Immunfluoreszenzbilder mikroskopisch ausgewertet. Durch Permeabilitätsassays wurde der Einfluss von Eap auf die Permeabilität von HUVEC untersucht. Um die Bindung von Eap an eukaryotische Zellen zu bestimmen, wurden Bindungsassays mit biotinyliertem Eap an HUVEC über das ELISA-Prinzip durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von Eap in das Zytoplasma von Endothelzellen abhängig von der Eap-Konzentration und der Inkubationszeit ist und nicht nur auf die Endothelzellen beschränkt bleibt, sondern auch in der ECM nachgewiesen wurde. Die Aufnahme von Eap war bei 4 °C und bei gleichzeitiger Inkubation von Eap mit Heparin stark reduziert. Heparansulfate auf den Zelloberflächen hatten einen begrenzten Einfluss auf die Internalisierung von Eap.

ICAM-1 war nach Eap-Inkubation in der *V. umbilicalis* reduziert darstellbar, was die Annahme von ICAM-1 als Bindungspartner von Eap unterstützt. Ebenfalls reduziert, jedoch meist nicht so stark wie ICAM-1 und auch nicht konzentrationsabhängig von Eap oder der Inkubationszeit, war PECAM-1. Dies läßt PECAM-1 als weiteren, aber weniger affinen, „Rezeptor“ für Eap vermuten.

Die Permeabilität eines HUVEC-Monolayers wurde jedoch durch Eap nur gering beeinflusst. Eap zeigte eine homogene Verteilung im Zytoplasma ab einer Konzentration von 5 µg/ml Eap und zudem eine perinukleäre Agglomeration. Der Kern blieb allerdings frei von Eap, was darauf hinweist, dass Eap zunächst nicht in den Kern wandert, sich aber dort anlagert.

## 7 Summary

*Staphylococcus aureus* is a prevalent bacterium; its infections are often associated with severe endovascular diseases because it expresses a variety of virulence factors, including the Extracellular Adherence Protein (Eap).

Eap leads not only to the adherence of *S. aureus* bacteria to each other but also mediates adhesion of the bacteria to eukaryotic cells. It also influences the immune system of its host and has anti-inflammatory and anti-angiogenic potential. Various plasma proteins such as fibrinogen, fibronectin, vitronectin and receptors like ICAM-1 were previously identified as binding partners for Eap.

This raises the question whether Eap can bind to receptors other than ICAM-1 and what happens after binding to the eukaryotic cells, whether Eap remains on the surface of cells or is internalized to the endothelial cells and beyond.

These questions were examined in *ex vivo*-experiments with veins of umbilical cords, as well as in *in vitro*-experiments with macrovascular endothelial cells (HUVEC). HUVEC and *V. umbilicalis* were incubated with Eap under different conditions and immunofluorescence images were evaluated microscopically. In addition, permeability assays were done to examine the permeability of HUVEC monolayers after incubation with Eap. To investigate the binding of Eap, binding assays of biotinylated Eap to HUVEC were carried out by the ELISA principle.

In this work it could be shown that the inclusion of Eap in the cytoplasm of endothelial cells is dependent on the concentration of Eap and time of incubation. The localisation Eap was not limited on the endothelial cells, because Eap could also be detected in the extracellular matrix. The inclusion of Eap was significantly reduced at 4 °C and in the case of simultaneous incubation of Eap with heparin. Heparan sulfates on the cell surface had a limited effect on the internalization of Eap.

ICAM-1 was reduced in the *V. umbilicalis* after incubation of the umbilical cord with Eap. That supports the assumption of ICAM-1 as a binding partner of Eap. PECAM-1 was also reduced, but usually not as strong as ICAM-1, and neither concentration dependent of Eap or of time of incubation. This suggests PECAM-1 as another, but rather nonspecific, ligand for Eap.

The permeability of HUVEC monolayers was affected only slightly by Eap, there was only a tendency towards an increasing permeability.

In regard to the localization of Eap inside the cell, at a concentration of 5 µg/ml Eap a homogeneous distribution in the cytoplasm could be shown. Although also a perinuclear agglomeration was visible, the core, however, remained free of Eap, suggesting that Eap does not initially moves into the nucleus, but adsorbs at the nucleus.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Alkhamesi NA, Ziprin P, Pfistermuller K, Peck DH, Darzi AW. ICAM-1 mediated peritoneal carcinomatosis, a target for therapeutic intervention. *Clin Exp Metastasis* 2005; 22:449–59.
2. Anderson GG, O'Toole GA. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 322:85–105.
3. Arbeit RD, Karakawa WW, Vann WF, Robbins JB. Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1984; 2:85–91.
4. Athanasopoulos AN, Economopoulou M, Orlova VV, Sobke A, Schneider D, Weber H et al. The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. *Blood* 2006; 107: 2720–7.
5. Bayer EA, Wilchek M. Protein biotinylation. *Methods Enzymol* 1990; 184:138–60.
6. Beekhuizen H, van dGJ, Olsson B, van BIJ, van FR. Infection of human vascular endothelial cells with *Staphylococcus aureus* induces hyperadhesiveness for human monocytes and granulocytes. *J Immunol* 1997; 158:774–82.
7. Bestebroer J, Poppelier MJ, Ulfman LH, Lenting PJ, Denis CV, van KKP et al. Staphylococcal superantigen-like 5 binds PSGL-1 and inhibits P-selectin-mediated neutrophil rolling. *Blood* 2007; 109:2936–43
8. Boden MK, Flock JI. Evidence for three different fibrinogen-binding proteins with unique properties from *Staphylococcus aureus* strain Newman. *Microb Pathog* 1992; 12:289–98.
9. Carleton HA, Diep BA, Charlebois ED, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. Community-adapted methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): population dynamics of an expanding community reservoir of MRSA. *J Infect Dis* 2004; 190 1730–8
10. Carneiro CR, Postol E, Nomizo R, Reis LF, Brentani RR. Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect* 2004; 6:604–8
11. Cedergren L, Andersson R, Jansson B, Uhlen M, Nilsson B. Mutational analysis of the interaction between staphylococcal protein A and human IgG1. *Protein Eng* 1993; 6: 441–8.

12. Chaibenjawong P, Foster SJ. Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus*. Arch Microbiol 2011; 193:125–35
13. Chan WC, Maxwell DJ, Gao X, Bailey RE, Han M, Nie S. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. Curr Opin Biotechnol 2002; 13:40–6.
14. Chan WC, Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. Science 1998; 281(5385):2016–8.
15. Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, Herrmann M. *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. Thromb Haemost 2005; 94:278–85.
16. Chavakis T, Hussain M, Kanse SM, Peters G, Bretzel RG, Flock J et al. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. Nat. Med. 2002; 8:687–93.
17. Chin JE, Winterrowd GE, Krzesicki RF, Sanders ME. Role of cytokines in inflammatory synovitis. The coordinate regulation of intercellular adhesion molecule 1 and HLA class I and class II antigens in rheumatoid synovial fibroblasts. Arthritis Rheum 1990; 33:1776–86.
18. Clarke SR, Foster SJ. Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. Adv Microb Physiol 2006; 51:187–224.
19. Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M et al. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96:9815–20.
20. Cosgrove K, Coutts G, Jonsson IM, Tarkowski A, Kokai-Kun JF, Mond JJ 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; 189:1025–35.
21. de BHC, de GPG, Bouma BN, Preissner KT. Ternary vitronectin-thrombin-antithrombin III complexes in human plasma. Detection and mode of association. J Biol Chem 1993; 268:1279–83.
22. de BHC, Preissner KT, Bouma BN, de GPG. Binding of vitronectin-thrombin-antithrombin III complex to human endothelial cells is mediated by the heparin binding site of vitronectin. J Biol Chem 1992; 267:2264–8.

23. de BHC, Preissner KT, Bouma BN, de GPG. Internalization of vitronectin-thrombin-antithrombin complex by endothelial cells leads to deposition of the complex into the subendothelial matrix. *J Biol Chem* 1995; 270:30733–40.
24. Diamandis EP, Christopoulos TK. The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin Chem* 1991; 37:625–36.
25. DiDonato D, Brasaemle DL. Fixation methods for the study of lipid droplets by immunofluorescence microscopy. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 773–80.
26. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:16-34
27. Fedtke I, Gotz F, Peschel A. Bacterial evasion of innate host defenses--the *Staphylococcus aureus* lesson. *Int J Med Microbiol* 2004; 294:189–94.
28. Flock M, Flock JI. Rebinding of extracellular adherence protein Eap to *Staphylococcus aureus* can occur through a surface-bound neutral phosphatase. *J. Bacteriol.* 2001; 183:3999–4003.
29. Foster TJ, Hook M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 1998; 6:484–8.
30. Fournier B, Philpott DJ. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:521–40.
31. Fournier JM, Hannon K, Moreau M, Karakawa WW, Vann WF. Isolation of type 5 capsular polysaccharide from *Staphylococcus aureus*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1987; 138:561–7.
32. Fournier JM, Vann WF, Karakawa WW. Purification and characterization of *Staphylococcus aureus* type 8 capsular polysaccharide. *Infect Immun* 1984; 45:87–93.
33. Gaborik Z, Hunyady L. Intracellular trafficking of hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15:286–93.
34. Gaetzner S, Deckers MM, Stahl S, Lowik C, Olsen BR, Felbor U. Endostatin's heparan sulfate-binding site is essential for inhibition of angiogenesis and enhances in situ binding to capillary-like structures in bone explants. *Matrix Biol* 2005; 23:557–61.
35. Garcia JG, Pavalko FM, Patterson CE. Vascular endothelial cell activation and permeability responses to thrombin. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995; 6:609–26.
36. Garcia JG, Verin AD, Schaphorst KL. Regulation of thrombin-mediated endothelial cell contraction and permeability. *Semin Thromb Hemost* 1996; 22:309–15.
37. Garcia-Pardo A, Rostagno A, Frangione B. Primary structure of human plasma fibronectin. Characterization of a 38 kDa domain containing the C-terminal heparin-

- binding site (Hep III site) and a region of molecular heterogeneity. *Biochem J* 1987; 241:923–8.
38. Geisbrecht BV, Hamaoka BY, Perman B, Zemla A, Leahy DJ. The crystal structures of EAP domains from *Staphylococcus aureus* reveal an unexpected homology to bacterial superantigens. *J Biol Chem* 2005; 280:17243–50.
  39. Godavarti R, Davis M, Venkataraman G, Cooney C, Langer R, Sasisekharan R. Heparinase III from *Flavobacterium heparinum*: cloning and recombinant expression in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 225:751–8.
  40. Goldmann T, Dromann D, Marzouki M, Schimmel U, Debel K, Branscheid D et al. Tissue microarrays from HOPE-fixed specimens allow for enhanced high throughput molecular analyses in paraffin-embedded material. *Pathol Res Pract* 2005; 201:599–602.
  41. Gomez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A et al. *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat Med* 2004; 10: 842–8.
  42. Gomez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A et al. *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat Med* 2004; 10:842–8.
  43. Gomez MI, Seaghdha MO, Prince AS. *Staphylococcus aureus* protein A activates TACE through EGFR-dependent signaling. *EMBO J* 2007; 26:701–9.
  44. Gouaux JE, Braha O, Hobaugh MR, Song L, Cheley S, Shustak C et al. Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:12828–31.
  45. Grulich-Henn J, Ritter J, Mesewinkel S, Heinrich U, Bettendorf M, Preissner KT. Transport of insulin-like growth factor-I across endothelial cell monolayers and its binding to the subendothelial matrix. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2002; 110:67–73.
  46. Guillen C, McInnes IB, Vaughan DM, Kommajosyula S, Van BPH, Leung BP et al. Enhanced Th1 response to *Staphylococcus aureus* infection in human lactoferrin-transgenic mice. *J Immunol* 2002; 168:3950–7.
  47. Gupta K, Gupta P, Wild R, Ramakrishnan S, Hebbel RP. Binding and displacement of vascular endothelial growth factor (VEGF) by thrombospondin: effect on human microvascular endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Angiogenesis* 1999; 3:147–58.
  48. Hagggar A, Flock J, Norrby-Teglund A. Extracellular adherence protein (Eap) from *Staphylococcus aureus* does not function as a superantigen. *Clin. Microbiol. Infect.* 2009.

49. Hagggar A, Hussain M, Lönnies H, Herrmann M, Norrby-Teglund A, Flock J. Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 2003; 71:2310–7.
50. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 2009; 11:1034–43.
51. Hammel M, Sfyroera G, Ricklin D, Magotti P, Lambris JD, Geisbrecht BV. A structural basis for complement inhibition by *Staphylococcus aureus*. *Nat Immunol* 2007; 8:430–7.
52. Hänsel R, Sticher O, Steinegger E. *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. 9., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010. (Springer-Lehrbuch).
53. Hansen U, Hussain M, Villone D, Herrmann M, Robenek H, Peters G et al. The anchorless adhesin Eap (extracellular adherence protein) from *Staphylococcus aureus* selectively recognizes extracellular matrix aggregates but binds promiscuously to monomeric matrix macromolecules. *Matrix Biol* 2006; 25:252–60.
54. Hartleib J, Kohler N, Dickinson RB, Chhatwal GS, Sixma JJ, Hartford OM et al. Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood* 2000; 96:2149–56.
55. Heine H. *Lehrbuch der biologischen Medizin: Grundregulation und extrazelluläre Matrix*; 28 Tabellen. 3., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Hippokrates-Verl.; 2007.
56. Heizmann WR, Heizmann-Döller-Kropp-Bleich. *Kurzlehrbuch medizinische Mikrobiologie und Immunologie: Zur Vorbereitung auf das 1. Staatsexamen* ; mit 61 Tabellen. 2., überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 1999.
57. Heying R, van dGJ, Que YA, Moreillon P, Beekhuizen H. Fibronectin-binding proteins and clumping factor A in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis: FnBPA is sufficient to activate human endothelial cells. *Thromb Haemost* 2007; 97:617–26.
58. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* 2001; 1:147–55.
59. Hochkeppel HK, Braun DG, Vischer W, Imm A, Sutter S, Staeubli U et al. Serotyping and electron microscopy studies of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with monoclonal antibodies to capsular polysaccharide types 5 and 8. *J Clin Microbiol* 1987; 25:526–30.
60. Holter W, Majdic O, Kalthoff FS, Knapp W. Regulation of interleukin-4 production in human mononuclear cells. *Eur J Immunol* 1992; 22:2765–7.

61. Huseby M, Shi K, Brown CK, Digre J, Mengistu F, Seo KS et al. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2007; 189:8719–26.
62. Hussain M, Becker K, von EC, Peters G, Herrmann M. Analogs of Eap protein are conserved and prevalent in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8:1271–6.
63. Hussain M, Becker K, von EC, Schrenzel J, Peters G, Herrmann M. 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; 183:6778–86.
64. Hussain M, Haggar A, Heilmann C, Peters G, Flock JI, Herrmann M. Insertional inactivation of Eap in *Staphylococcus aureus* strain Newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts. *Infect Immun* 2002; 70:2933–40.
65. Hussain M, von EC, Sinha B, Joost I, Herrmann M, Peters G et al. eap Gene as novel target for specific identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2008; 46:470–6.
66. Hussain M, Haggar A, Peters G, Chhatwal GS, Herrmann M, Flock J et al. More than one tandem repeat domain of the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus* is required for aggregation, adherence, and host cell invasion but not for leukocyte activation. *Infect. Immun.* 2008; 76:5615–23.
67. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973; 52:2745–56.
68. Jahreis A, Beckheinrich P, Hausteiner UF. Effects of two novel cationic staphylococcal proteins (NP-tase and p70) and enterotoxin B on IgE synthesis and interleukin-4 and interferon-gamma production in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2000; 142:680–7.
69. Jahreis A, Yousif Y, Rump JA, Drager R, Vogt A, Peter HH et al. Two novel cationic staphylococcal proteins induce IL-2 secretion, proliferation and immunoglobulin synthesis in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of both healthy controls and patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol* 1995; 100:406–11.
70. Jalimarada SS, Shivanna M, Kini V, Mehta D, Srinivas SP. Microtubule disassembly breaks down the barrier integrity of corneal endothelium. *Exp Eye Res* 2009; 89:333–43.

71. Janeway C, Beginnen K, Rajewsky K. Immunologie. 5. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.; 2002. (Spektrum-Lehrbuch).
72. Jin T, Bokarewa M, Foster T, Mitchell J, Higgins J, Tarkowski A. *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol* 2004; 172:1169–76.
73. Johannes L, Lamaze C. Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic* 2002; 3:443–51.
74. Johnson M, Cockayne A, Morrissey JA. Iron-regulated biofilm formation in *Staphylococcus aureus* Newman requires ica and the secreted protein Emp. *Infect Immun* 2008; 76:1756–65.
75. Jonsson K, McDevitt D, McGavin MH, Patti JM, Hook M. *Staphylococcus aureus* expresses a major histocompatibility complex class II analog. *J Biol Chem* 1995; 270:21457–60.
76. Junqueira LCU, Carneiro J. Histologie. 6., neu übersetzte, überarbeitete und aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2005. (Springer-Lehrbuch).
77. Kaneko M, Inoue H, Nakazawa R, Azuma N, Suzuki M, Yamauchi S et al. Pirfenidone induces intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) down-regulation on cultured human synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 1998; 113:72–6.
78. Karakawa WW, Sutton A, Schneerson R, Karpas A, Vann WF. Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1988; 56:1090–5.
79. Karakawa WW, Vann WF. Capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *Semin Infect Dis* 1982; 4:285–93.
80. Karp G, Beginnen K. Molekulare Zellbiologie [S. 317]. 1., dt. Auflage. Berlin: Springer; 2005. (Springer-Lehrbuch).
81. Karumanchi SA, Jha V, Ramchandran R, Karihaloo A, Tsiokas L, Chan B et al. Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors. *Mol Cell* 2001; 7:811–22.
82. Kishore R, Samuel M, Khan MY, Hand J, Frenz DA, Newman SA. Interaction of the NH<sub>2</sub>-terminal domain of fibronectin with heparin. Role of the omega-loops of the type I modules. *J Biol Chem* 1997; 272:17078–85.
83. Kogure T, Kawano H, Abe Y, Miyawaki A. Fluorescence imaging using a fluorescent protein with a large Stokes shift. *Methods* 2008; 45:223–6.

84. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:485–517.
85. Kreikemeyer B, McDevitt D, Podbielski A. The role of the map protein in *Staphylococcus aureus* matrix protein and eukaryotic cell adherence. *Int J Med Microbiol* 2002; 292:283–95.
86. Langley R, Wines B, Willoughby N, Basu I, Proft T, Fraser JD. 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; 174:2926–33.
87. Lee LY, Hook M, Haviland D, Wetsel RA, Yonter EO, Syribeys P et al. Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. *J Infect Dis* 2004; 190:571–9.
88. Lee LY, Liang X, Hook M, Brown EL. Identification and characterization of the C3 binding domain of the *Staphylococcus aureus* extracellular fibrinogen-binding protein (Efb). *J Biol Chem* 2004; 279:50710–6.
89. Lee LY, Miyamoto YJ, McIntyre BW, Hook M, McCrea KW, McDevitt D et al. The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. *J Clin Invest* 2002; 110:1461–71.
90. Leid JG, Shirtliff ME, Costerton JW, Stoodley P. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun* 2002; 70(11):6339–45.
91. Lewin B. The extracellular matrix and cell adhesion, in *Cells*. Sudbury, Mass.: Jones and Bartlett Publ.; 2007.
92. Ley K. Plugging the leaks. *Nat Med* 2001; 7:1105–6.
93. Liang X, Yan M, Ji Y. The H35A mutated alpha-toxin interferes with cytotoxicity of staphylococcal alpha-toxin. *Infect Immun* 2009; 77:977–83.
94. Lichtmann JW. *Konfokale Mikroskopie*; 1994. (Spektrum der Wissenschaft).
95. Lorenz U, Lorenz B, Schmitter T, Streker K, Erck C, Wehland J et al. Functional antibodies targeting IsaA of *Staphylococcus aureus* augment host immune response and open new perspectives for antibacterial therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:165–73.
96. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 1998; 339:520–32.
97. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen. 2., komplett überarb. Aufl.* Stuttgart: Thieme; 2006.
98. Ma J, Cocchiaro J, Lee JC. Evaluation of serotypes of *Staphylococcus aureus* strains used in the production of a bovine mastitis bacterin. *J Dairy Sci* 2004; 87:178–82.

99. Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* 2006; 10:839–50.
100. Malik AB, Fenton J2. Thrombin-mediated increase in vascular endothelial permeability. *Semin Thromb Hemost* 1992; 18::193–9.
101. Manes TD, Hoer S, Muller WA, Lehner PJ, Pober JS. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K3 and K5 proteins block distinct steps in transendothelial migration of effector memory CD4+ T cells by targeting different endothelial proteins. *J Immunol* 2010; 184:5186–92.
102. Massey RC, Scriba TJ, Brown EL, Phillips RE, Sewell AK. Use of peptide-major histocompatibility complex tetramer technology to study interactions between *Staphylococcus aureus* proteins and human cells. *Infect Immun* 2007; 75:5711–5.
103. Mattsby-Baltzer I, Bergstrom T, McCrea K, Ward R, Adolfsson ML, Larm O. Affinity Apheresis for Treatment of Bacteremia Caused by *Staphylococcus aureus* and/or Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA). *J Microbiol Biotechnol* 2011; 21:659–64.
104. McGavin MH, Krajewska-Pietrasik D, Ryden C, Hook M. Identification of a *Staphylococcus aureus* extracellular matrix-binding protein with broad specificity. *Infect Immun* 1993; 61:2479–85.
105. Miller SJ, Hoggat AM, Faulk WP. Heparin regulates ICAM-1 expression in human endothelial cells: an example of non-cytokine-mediated endothelial activation. *Thromb Haemost* 1998; 80:481–7.
106. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136:2348–57.
107. Nguyen T, Ghebrehiwet B, Peerschke EI. *Staphylococcus aureus* protein A recognizes platelet gC1qR/p33: a novel mechanism for staphylococcal interactions with platelets. *Infect Immun* 2000; 68:2061–8.
108. Noble WC, Valkenburg HA, Wolters CH. Carriage of *Staphylococcus aureus* in random samples of a normal population. *J Hyg (Lond)* 1967; 65:567–73.
109. O'Brien CN, Guidry AJ, Fattom A, Shepherd S, Douglass LW, Westhoff DC. Production of antibodies to *Staphylococcus aureus* serotypes 5, 8, and 336 using poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *J Dairy Sci* 2000; 83:1758–66.
110. O'Brien LM, Walsh EJ, Massey RC, Peacock SJ, Foster TJ. *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. *Cell Microbiol* 2002; 4:759–70.

111. Odrliin TM, Shainoff JR, Lawrence SO, Simpson-Haidaris PJ. Thrombin cleavage enhances exposure of a heparin binding domain in the N-terminus of the fibrin beta chain. *Blood* 1996; 88:2050–61.
112. Olert J, Wiedorn KH, Goldmann T, Kuhl H, Mehraein Y, Scherthan H et al. HOPE fixation: a novel fixing method and paraffin-embedding technique for human soft tissues. *Pathol Res Pract* 2001; 197:823–6.
113. Pala P, Hussell T, Openshaw PJ. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods* 2000; 243:107–24.
114. Palma M, Hagggar A, Flock JI. Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J Bacteriol* 1999; 181:2840–5.
115. Panizzi P, Friedrich R, Fuentes-Prior P, Richter K, Bock PE, Bode W. Fibrinogen substrate recognition by staphylocoagulase.(pro)thrombin complexes. *J Biol Chem* 2006; 281:1179–87.
116. Panizzi P, Friedrich R, Fuentes-Prior P, Richter K, Bock PE, Bode W. Fibrinogen substrate recognition by staphylocoagulase.(pro)thrombin complexes. *J Biol Chem* 2006; 281:1179–87.
117. Patterson CE, Rhoades RA, Garcia JG. Evans blue dye as a marker of albumin clearance in cultured endothelial monolayer and isolated lung. *J Appl Physiol* 1992; 72:865–73.
118. Patti JM, Bremell T, Krajewska-Pietrasik D, Abdelnour A, Tarkowski A, Ryden C et al. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infect Immun* 1994; 62:152–61.
119. Pawley JB. *Handbook of biological confocal microscopy*. 3. ed. New York, NY: Springer; 2006.
120. Peter K, Schwarz M, Conradt C, Nordt T, Moser M, Kubler W et al. Heparin inhibits ligand binding to the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *Circulation* 1999; 100:1533–9.
121. Phillips JR, Tripp TJ, Regelmann WE, Schlievert PM, Wangensteen OD. Staphylococcal alpha-toxin causes increased tracheal epithelial permeability. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41:1146–52.
122. Potempa J, Watorek W, Travis J. The inactivation of human plasma alpha 1-proteinase inhibitor by proteinases from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 1986; 261:14330–4.
123. Pötzsch B, Madlener K. *Hämostaseologie*. 2., vollständig aktualisierte und erweiterte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010.

124. Prokesova L, Porwit-Bohr Z, Baran K, Potempa J, Pospisil M, John C. Effect of metalloproteinase from *Staphylococcus aureus* on in vitro stimulation of human lymphocytes. *Immunol Lett* 1991; 27:225–30.
125. Rehn M, Veikkola T, Kukk-Valdre E, Nakamura H, Ilmonen M, Lombardo C et al. Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:1024–9.
126. Roche FM, Meehan M, Foster TJ. The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. *Microbiology* 2003; 149(Pt 10):2759–67.
127. Roebuck KA, Finnegan A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol* 1999; 66:876–88.
128. Roghmann M, Taylor KL, Gupte A, Zhan M, Johnson JA, Cross A et al. Epidemiology of capsular and surface polysaccharide in *Staphylococcus aureus* infections complicated by bacteraemia. *J Hosp Infect* 2005; 59:27–32.
129. Sawai T, Tomono K, Yanagihara K, Yamamoto Y, Kaku M, Hirakata Y et al. Role of coagulase in a murine model of hematogenous pulmonary infection induced by intravenous injection of *Staphylococcus aureus* enmeshed in agar beads. *Infect Immun* 1997; 65:466–71.
130. Scriba TJ, Sierro S, Brown EL, Phillips RE, Sewell AK, Massey RC. The *Staphylococcus aureus* Eap protein activates expression of proinflammatory cytokines. *Infect Immun* 2008; 76:2164–8.
131. Shannon O, Uekotter A, Flock JI. Extracellular fibrinogen binding protein, Efb, from *Staphylococcus aureus* as an antiplatelet agent in vivo. *Thromb Haemost* 2005; 93:927–31.
132. Shivanna M, Jalimarada SS, Srinivas SP. Lovastatin inhibits the thrombin-induced loss of barrier integrity in bovine corneal endothelium. *J Ocul Pharmacol Ther* 2010; 26:1–10.
133. Sobke AC, Selimovic D, Orlova V, Hassan M, Chavakis T, Athanasopoulos AN et al. The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* abrogates angiogenic responses of endothelial cells by blocking Ras activation. *FASEB J* 2006; 20:2621–3.
134. Soboll S, Elbers R, Heldt HW. Metabolite measurements in mitochondria and in the extramitochondrial compartment by fractionation of freeze-stopped liver tissue in nonaqueous media. *Methods Enzymol* 1979; 56:201–6.

135. Somerville GA, Cockayne A, Durr M, Peschel A, Otto M, Musser JM. Synthesis and deformylation of *Staphylococcus aureus* delta-toxin are linked to tricarboxylic acid cycle activity. *J Bacteriol* 2003; 185:6686–94.
136. Souza-Offtermatt G. Intensivkurs Chirurgie: Mit 306 Tabellen. 1. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer; 2004. (Klinik).
137. Suriyaphol G, Sarikaputi M, Suriyaphol P. Differential responses of cells from human skin keratinocyte and bovine mammary epithelium to attack by pore-forming *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2009; 32:491–502.
138. Suzuki S, Pierschbacher MD, Hayman EG, Nguyen K, Ohgren Y, Ruoslahti E. Domain structure of vitronectin. Alignment of active sites. *J Biol Chem* 1984; 259:15307–14.
139. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol* 2007; 8:215.
140. Tanious FA, Veal JM, Buczak H, Ratmeyer LS, Wilson WD. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 1992; 31:3103–12.
141. Thakker M, Park JS, Carey V, Lee JC. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect Immun* 1998; 66:5183–9.
142. Thews G, Mutschler E, Vaupel P, Thews-Mutschler-Vaupel. Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen: 135 Tabellen. 5., völlig neu bearb. und erw. Aufl. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.; 1999.
143. Thomas D, Chou S, Dauwalder O, Lina G. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Chem Immunol Allergy* 2007; 93:24–41.
144. Thompson KM, Abraham N, Jefferson KK. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein contributes to biofilm formation in the presence of serum. *FEMS Microbiol Lett* 2010; 305:143–7.
145. Tristan A, Benito Y, Montserret R, Boisset S, Dusserre E, Penin F et al. The signal peptide of *Staphylococcus aureus* panton valentine leukocidin LukS component mediates increased adhesion to heparan sulfates. *PLoS One* 2009; 4:e5042.
146. Tuazon CU, Perez A, Kishaba T, Sheagren JN. *Staphylococcus aureus* among insulin-injecting diabetic patients. An increased carrier rate. *JAMA* 1975; 231:1272.
147. Ulfing N. Kurzlehrbuch Embryologie: 9 Tabellen. 2., überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2009.

148. Umeda A, Ueki Y, Amako K. Structure of the *Staphylococcus aureus* cell wall determined by the freeze-substitution method. *J Bacteriol* 1987; 169:2482–7.
149. Valeva A, Palmer M, Bhakdi S. Staphylococcal alpha-toxin: formation of the heptameric pore is partially cooperative and proceeds through multiple intermediate stages. *Biochemistry* 1997; 36:13298–304.
150. Wadstrom T, Ljungh A. Glycosaminoglycan-binding microbial proteins in tissue adhesion and invasion: key events in microbial pathogenicity. *J Med Microbiol* 1999; 48:223–33.
151. Wegrzynowicz Z, Heczko PB, Drapeau GR, Jeljaszewicz J, Pulverer G. Prothrombin activation by a metalloprotease from *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1980; 12:138–9.
152. Wei H, Fang L, Song J, Chatterjee S. Statin-inhibited endothelial permeability could be associated with its effect on PECAM-1 in endothelial cells. *FEBS Lett* 2005; 579:1272–8.
153. Weinke T, Schiller R, Fehrenbach FJ, Pohle HD. Association between *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization and septicemia in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11:985–9.
154. Yun PL, Decarlo AA, Chapple CC, Hunter N. Functional implication of the hydrolysis of platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31) by gingipains of *Porphyromonas gingivalis* for the pathology of periodontal disease. *Infect Immun* 2005; 73:1386–98.
155. Zhang L, Jacobsson K, Vasi J, Lindberg M, Frykberg L. A second IgG-binding protein in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 1998; 144 (Pt 4):985–91.

## 9 Anhang

### 9.1 Ergebnisse ELISA-Bindungsassay

Biotinyliertes Heparin (0,0001 bis 50 I.E.) wurde zu immobilisiertem Eap gegeben und die Bindungsrate über das ELISA-Prinzip (siehe Kapitel 2.5) bestimmt.

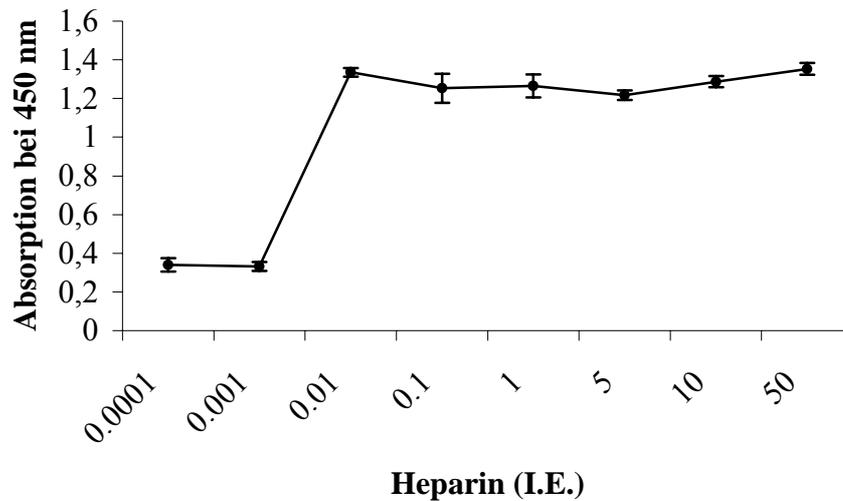


Abb. 9.1: ELISA-Bindungsassay von Heparin an immobilisiertes Eap.

## **9.2 Immunfluoreszenzbilder**

Die folgenden Bilder wurden zur Auswertung der Experimente herangezogen (siehe dazu auch Kapitel 2.6).

## 9.2.1 *Ex Vivo*-Experimente

### 9.2.1.1 Inkubation der *V. umbilicalis* mit 1, 5, 10 und 20 $\mu\text{g/ml}$ Eap bzw. mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Eap nach Entfernung der HS (anti-Eap-Färbung)

Kontrolle (ohne Eap)

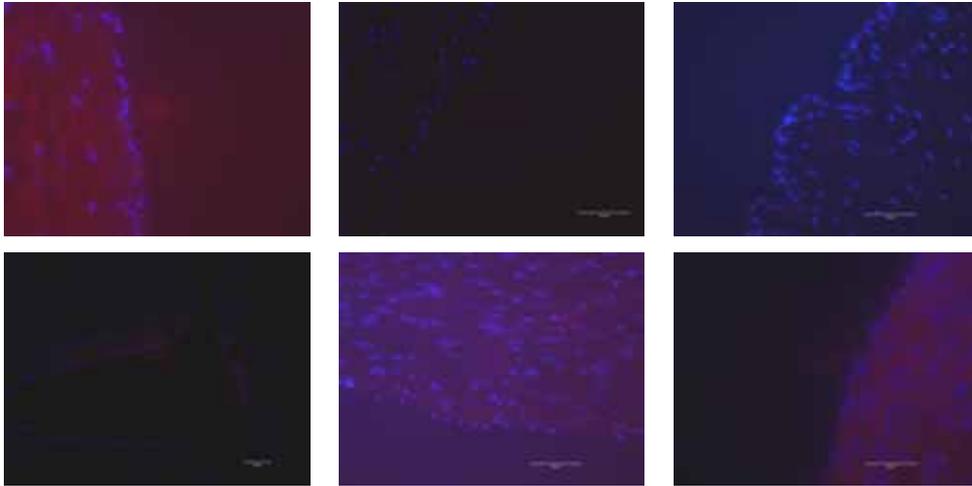


Abb. 4.4 A I: Inkubation mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Eap

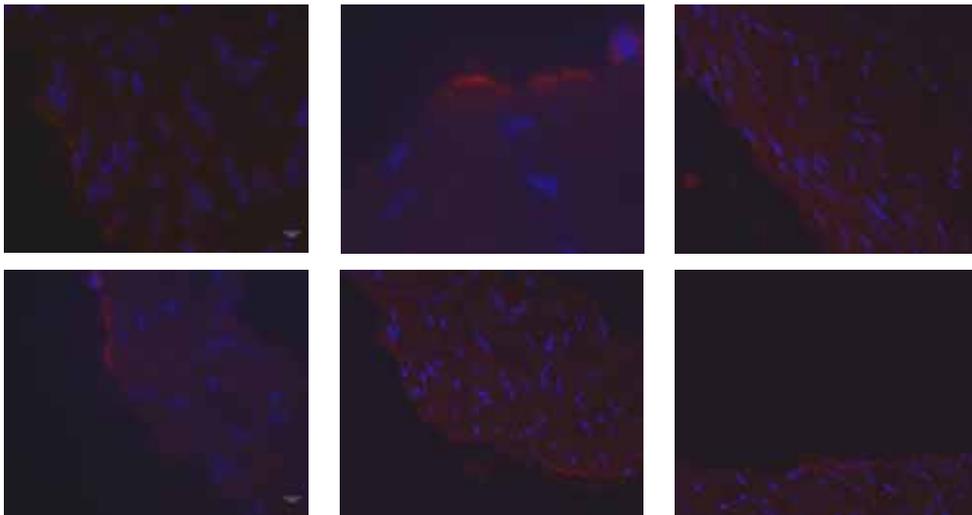


Abb. 4.4 A II: Inkubation mit 5  $\mu\text{g/ml}$  Eap

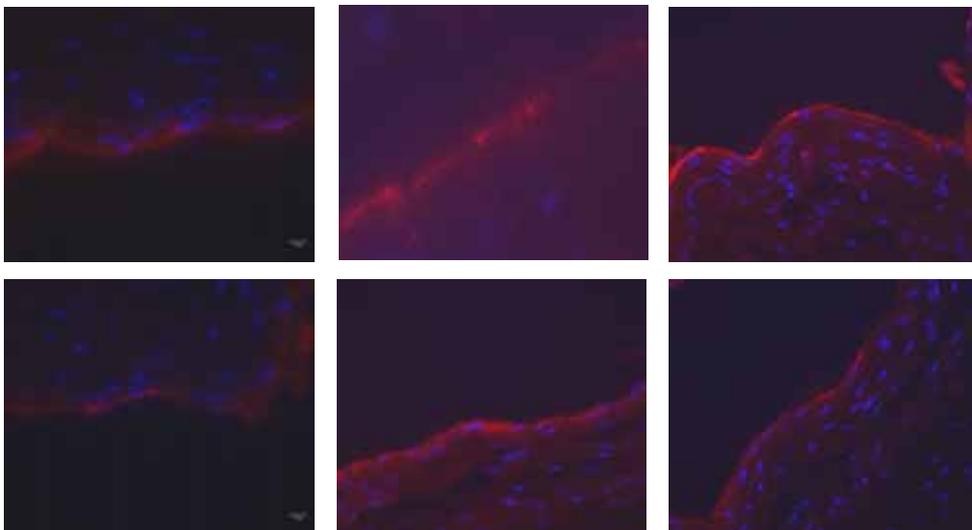


Abb. 4.4 A III: Inkubation mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Eap

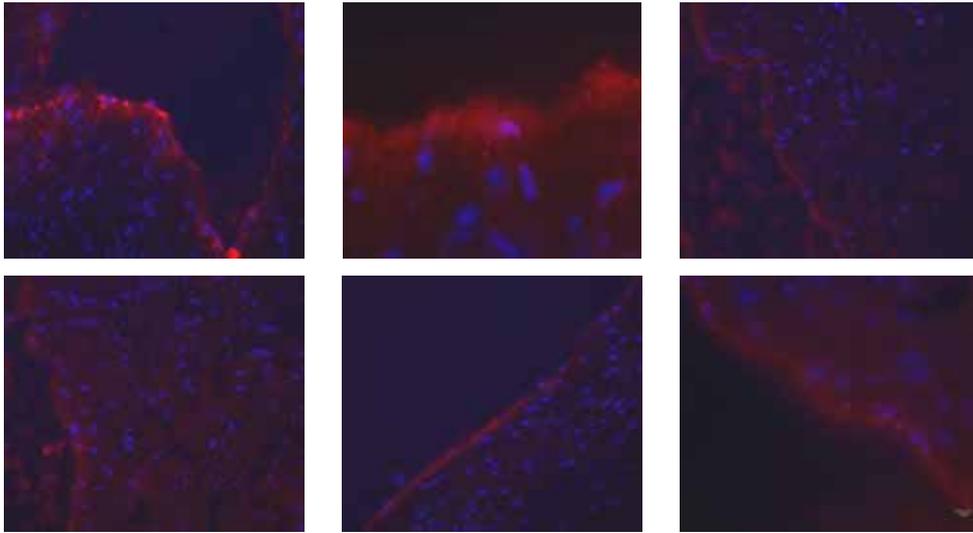


Abb. 4.4 A IV: Inkubation mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Eap

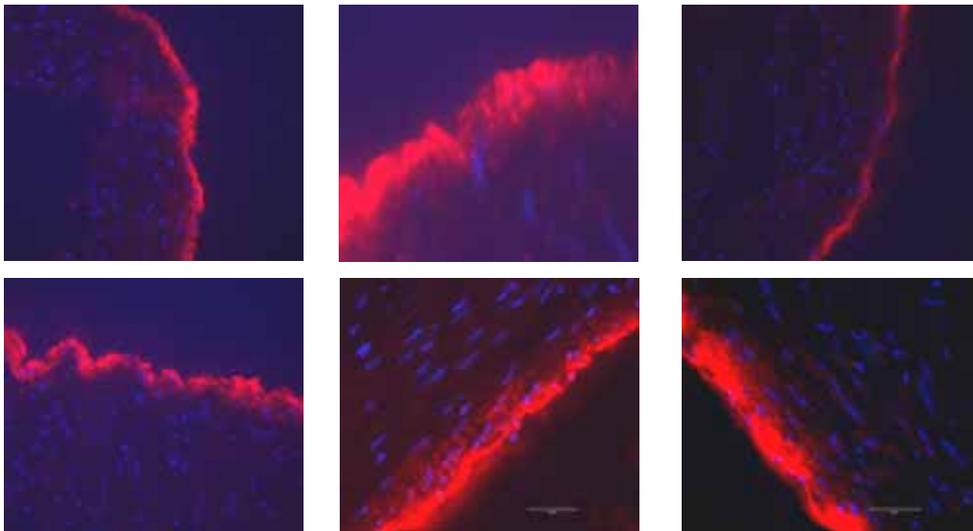
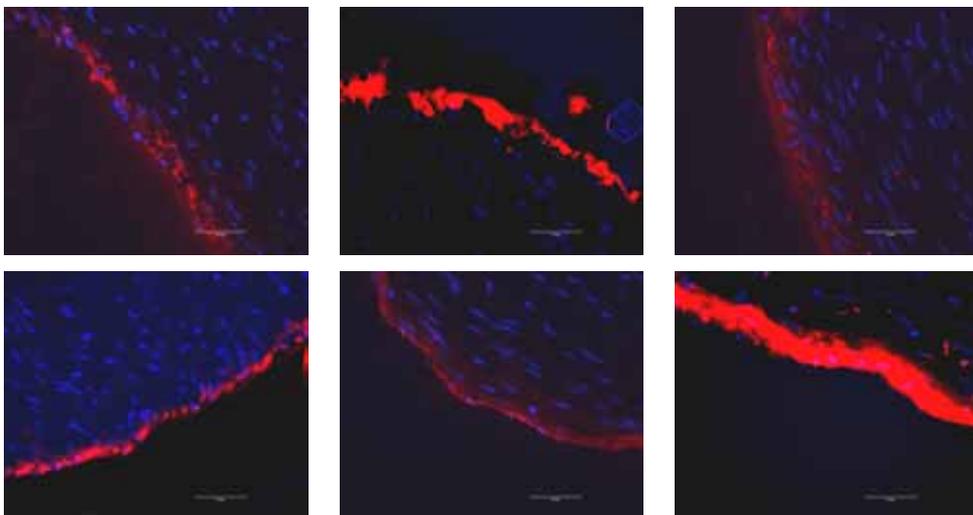


Abb. 4.18 A: Entfernung der HS auf den Endothel-Zelloberflächen durch Heparinase III und anschließende Inkubation mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Eap



**9.2.1.2 Inkubation der *V. umbilicalis* mit 5, 10 und 20 µg/ml Eap (anti-ICAM-1-Färbung)**

Abb. 4.6 A I: Kontrolle (ohne Eap-Inkubation)

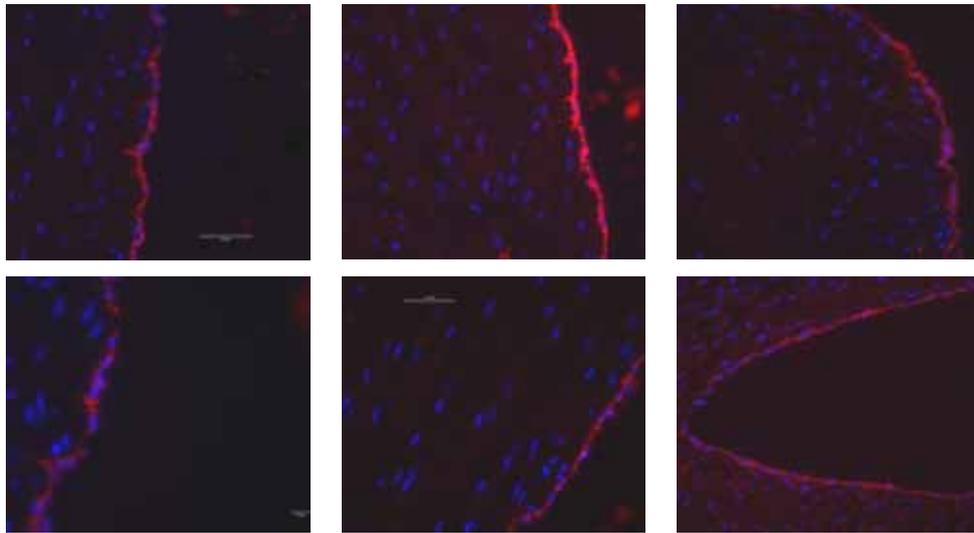


Abb. 4.6 A II: Inkubation mit 5 µg/ml Eap

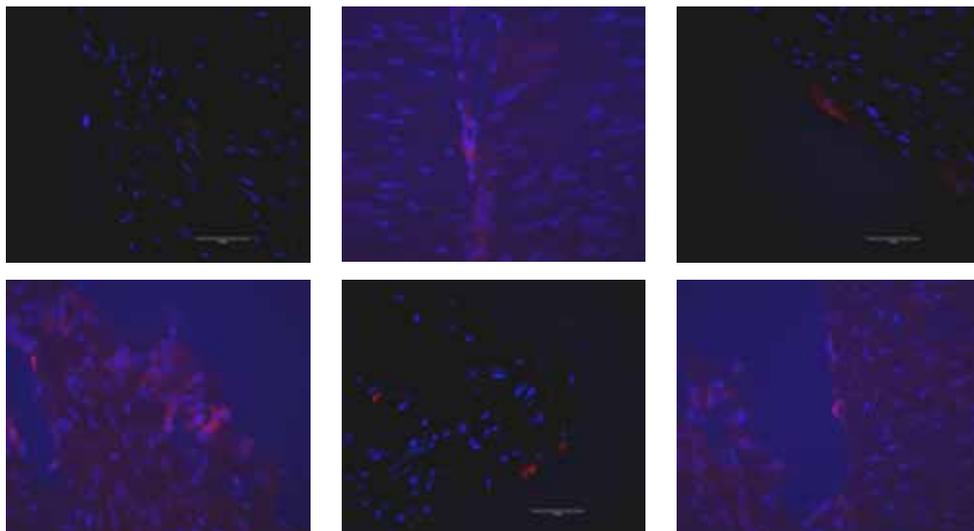


Abb. 4.6 A III: Inkubation mit 10 µg/ml Eap

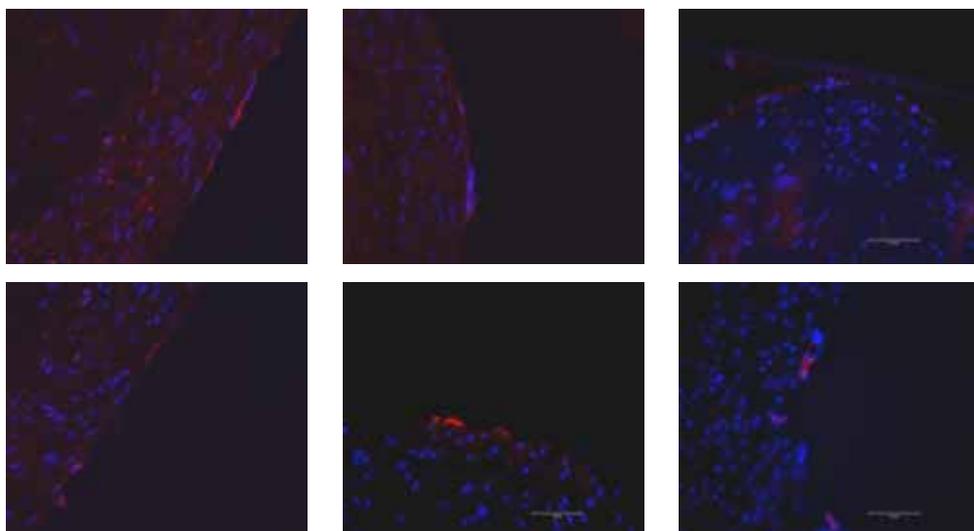
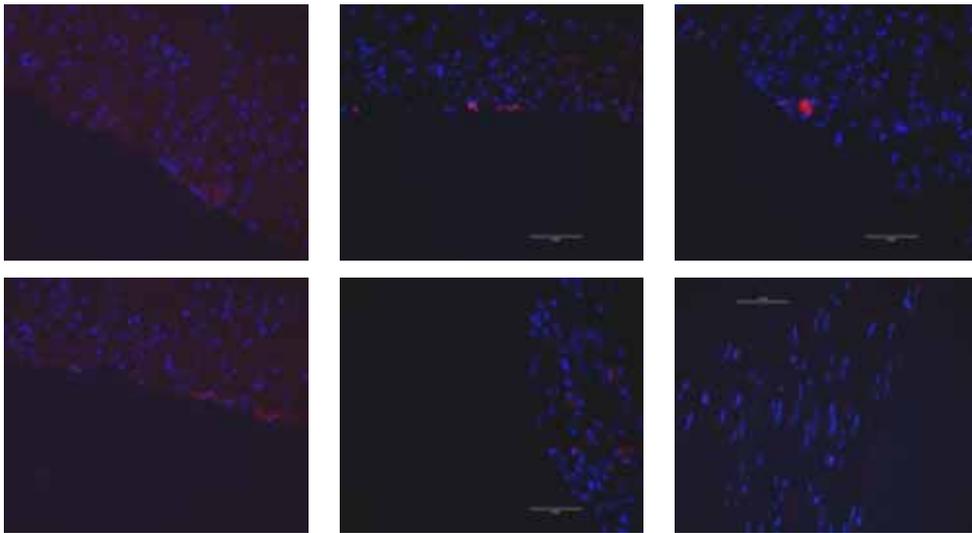


Abb. 4.6 A IV: Inkubation mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Eap



**9.2.1.3 Inkubation der *V. umbilicalis* mit 5, 10 und 20  $\mu\text{g/ml}$  Eap (anti-ICAM-1-Färbung)**

Abb. 4.6 B I: Kontrolle (ohne Eap-Inkubation)

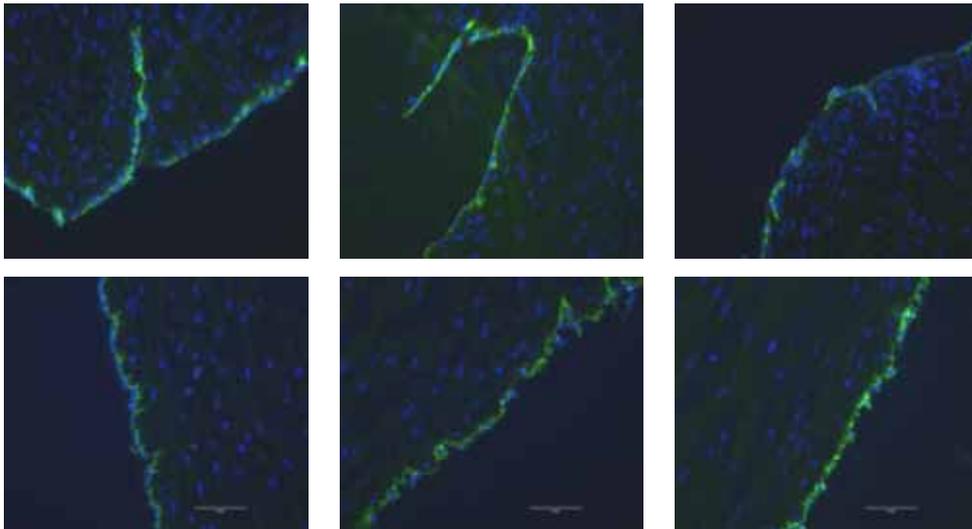


Abb. 4.6 B II: Inkubation mit 5  $\mu\text{g/ml}$  Eap

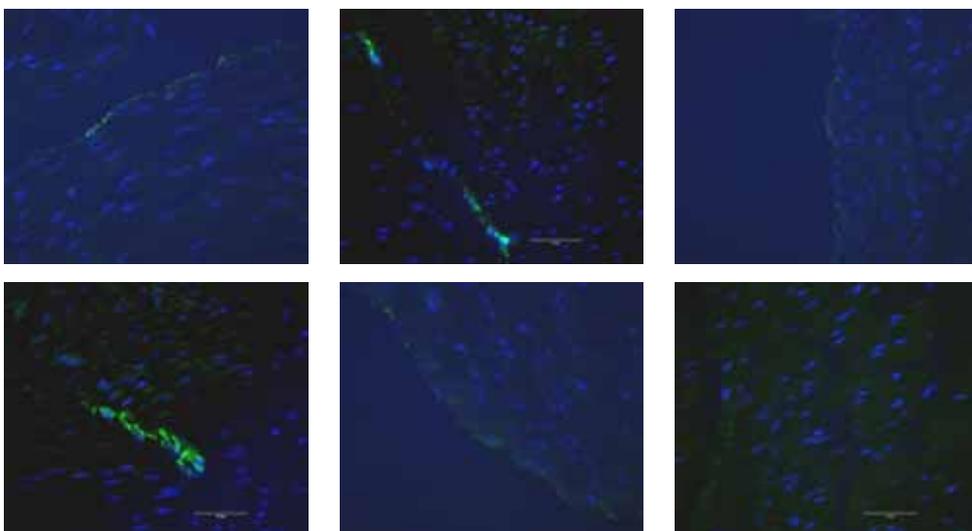


Abb. 4.6 B III: Inkubation mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Eap

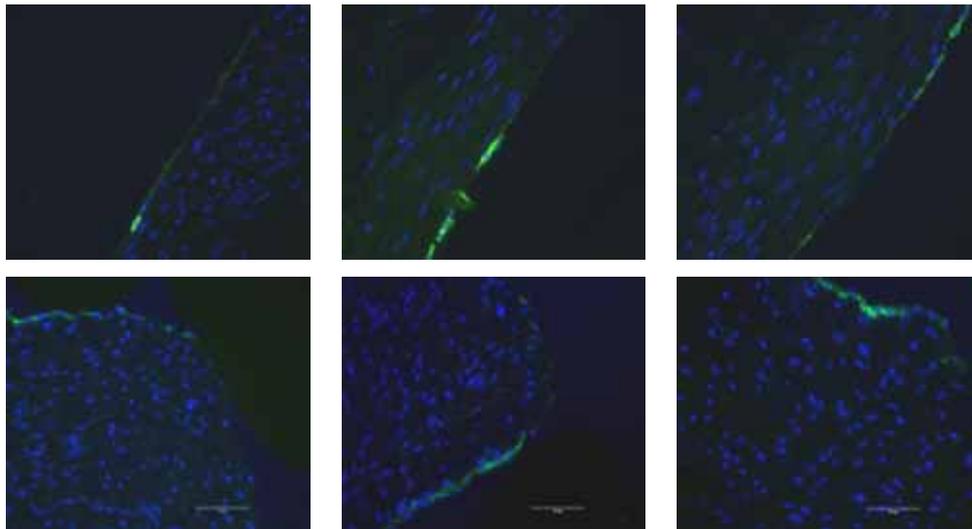
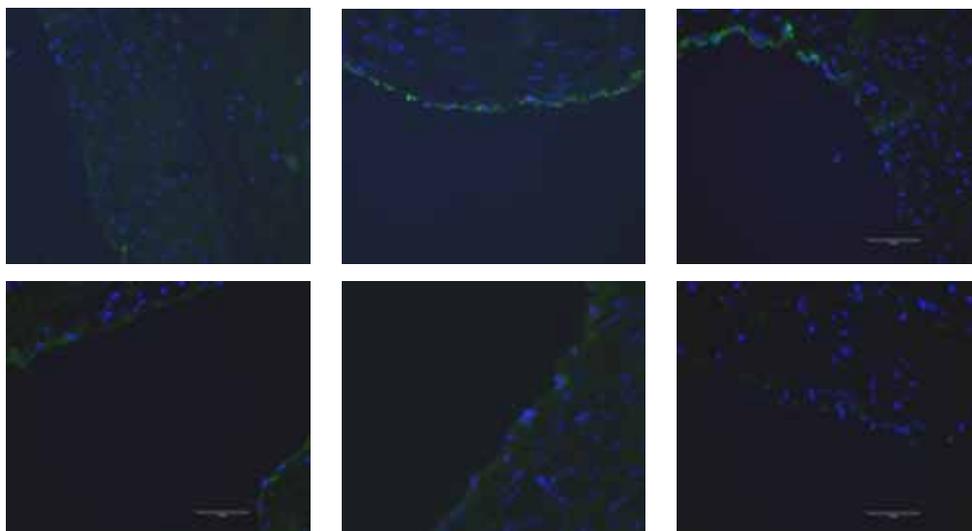


Abb. 4.6 B IV: Inkubation mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Eap



**9.2.1.4 Inkubation der *V. umbilicalis* mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Eap bei unters. Temperaturen und zusammen mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Heparin (anti-Eap-Färbung)**

Abb. 4.14 B: Inkubation bei 37  $^{\circ}\text{C}$

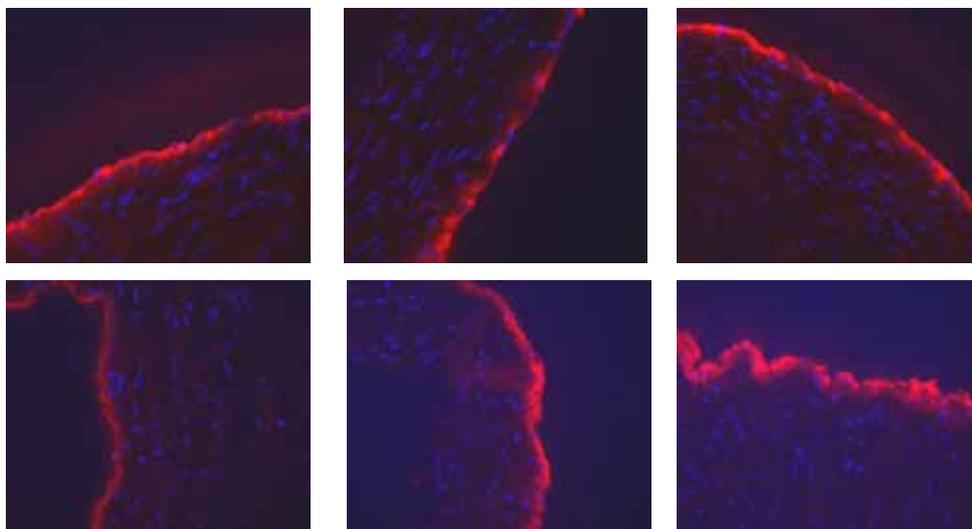


Abb. 4.14 C: Inkubation bei Raumtemperatur

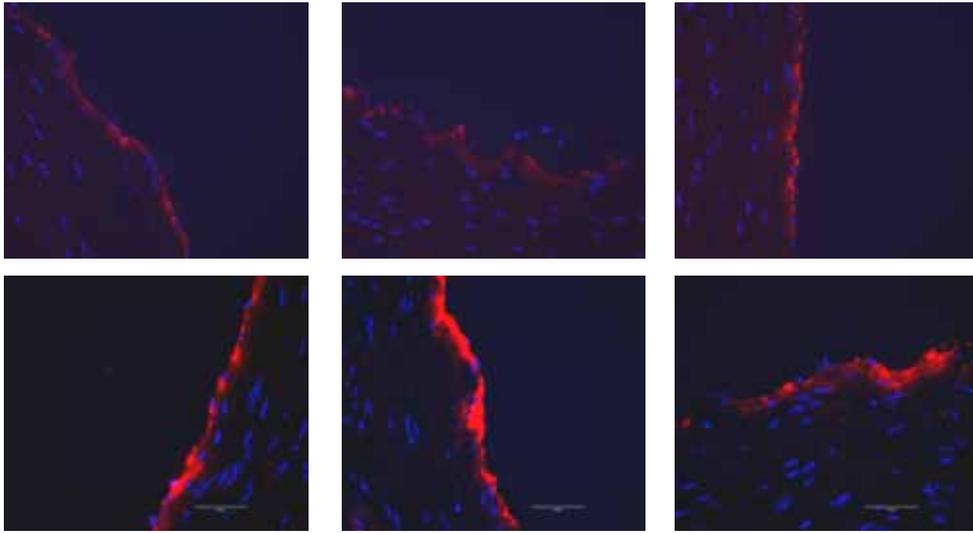


Abb. 4.14 D: Inkubation bei 4 °C

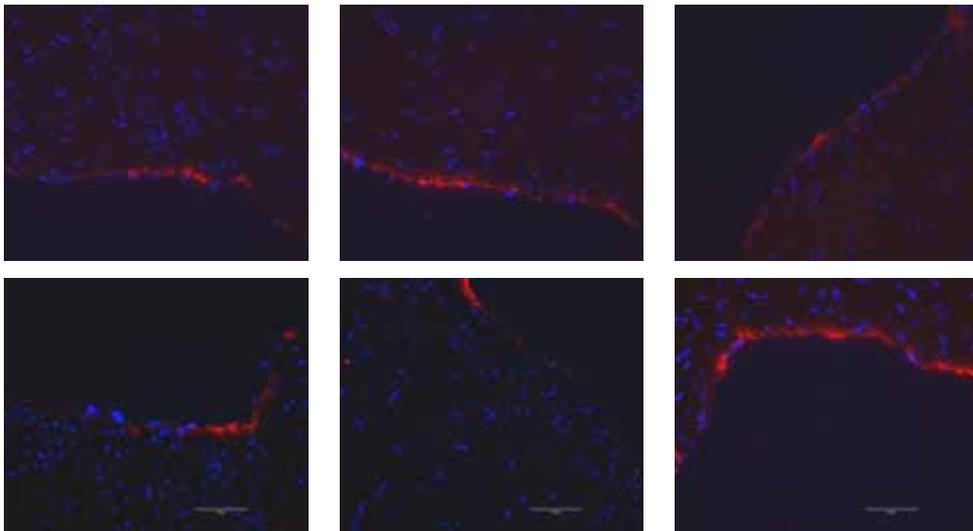
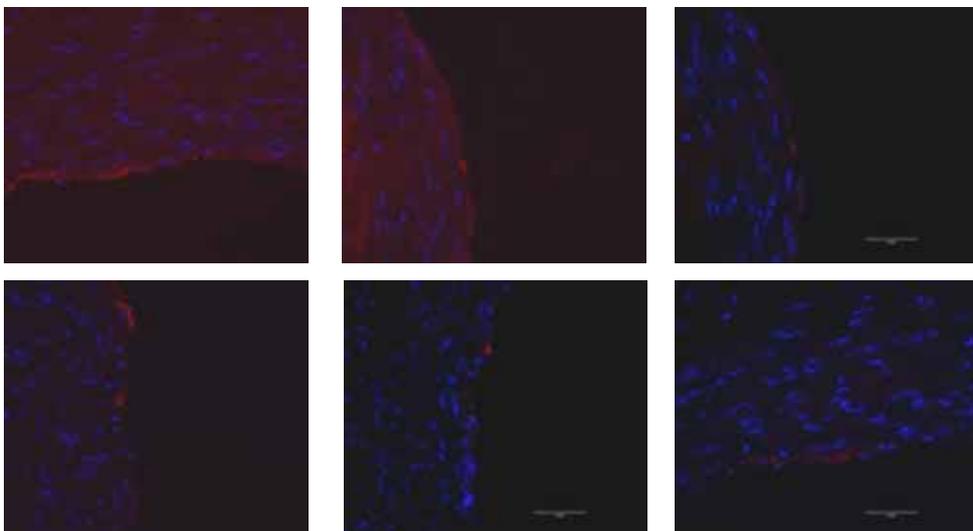


Abb. 4.14 E: Inkubation zusammen mit Heparin



**9.2.1.5 Inkubation der *V. umbilicalis* mit 20 µg/ml Eap bei unters.**

**Temperaturen und zusammen mit 10 µg/ml Heparin (anti-ICAM-1-Färbung)**

Abb. 4.16 B: Inkubation bei 37 °C

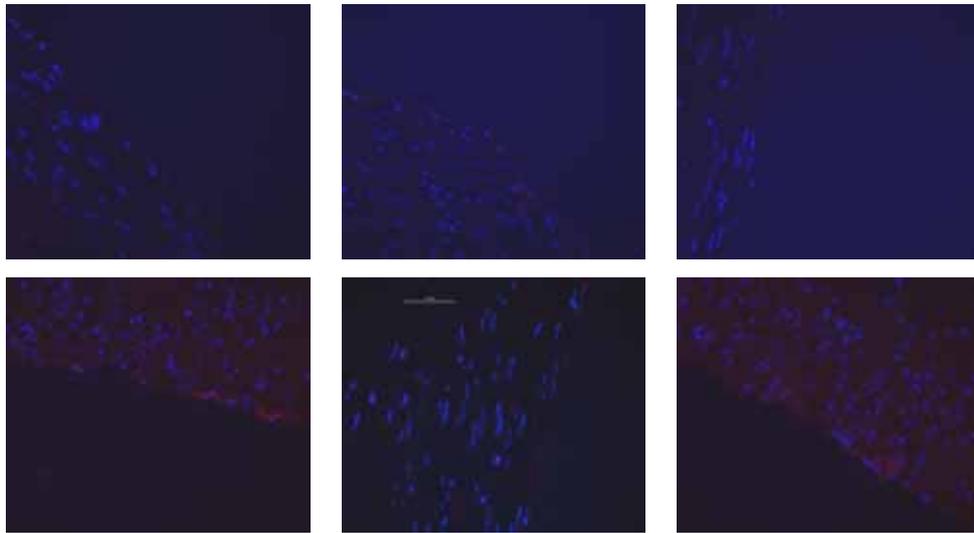


Abb. 4.16 C: Inkubation bei Raumtemperatur

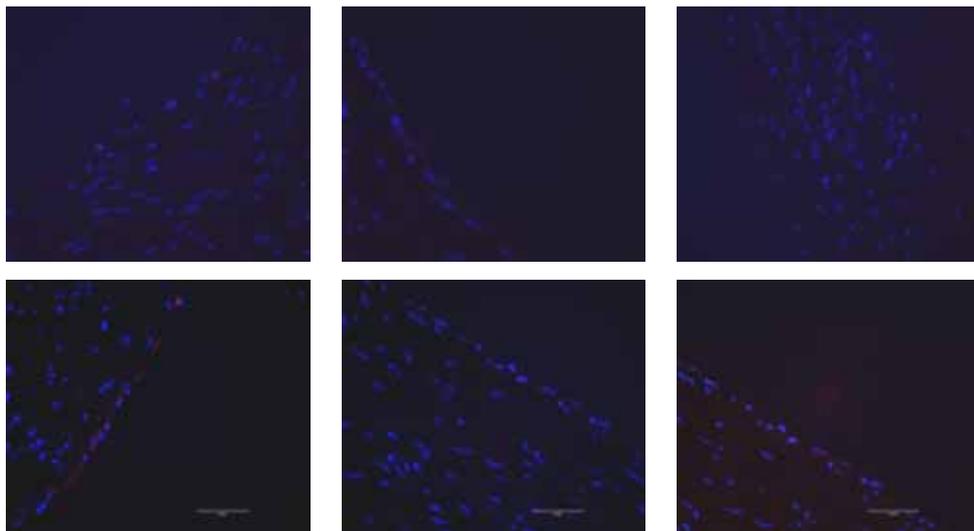


Abb. 4.16 D: Inkubation bei 4 °C

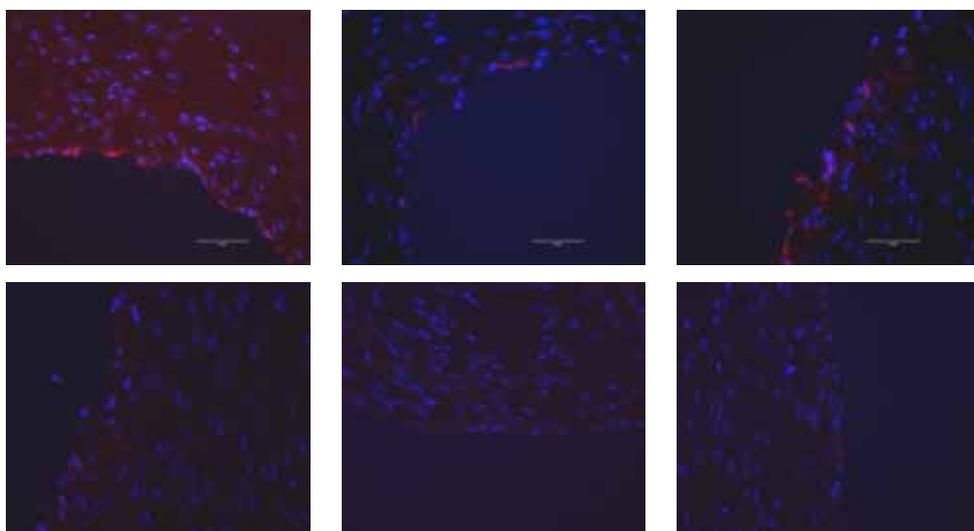
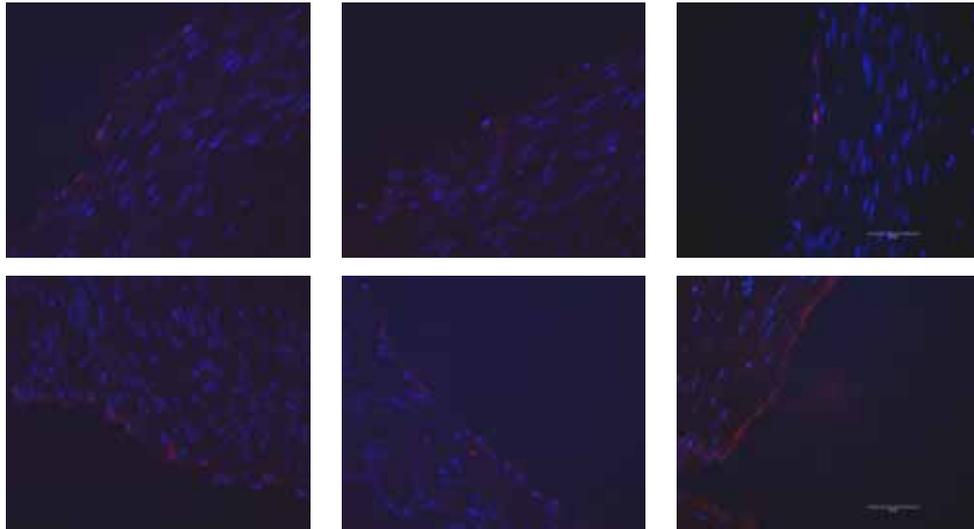


Abb. 4.16 E: Inkubation zusammen mit Heparin



**9.2.1.6 Inkubation der *V. umbilicalis* mit 20 µg/ml Eap bei unters. Temperaturen und zusammen mit 10 µg/ml Heparin (anti-PECAM-1-Färbung)**

Abb. 4.17 B: Inkubation bei 37 °C

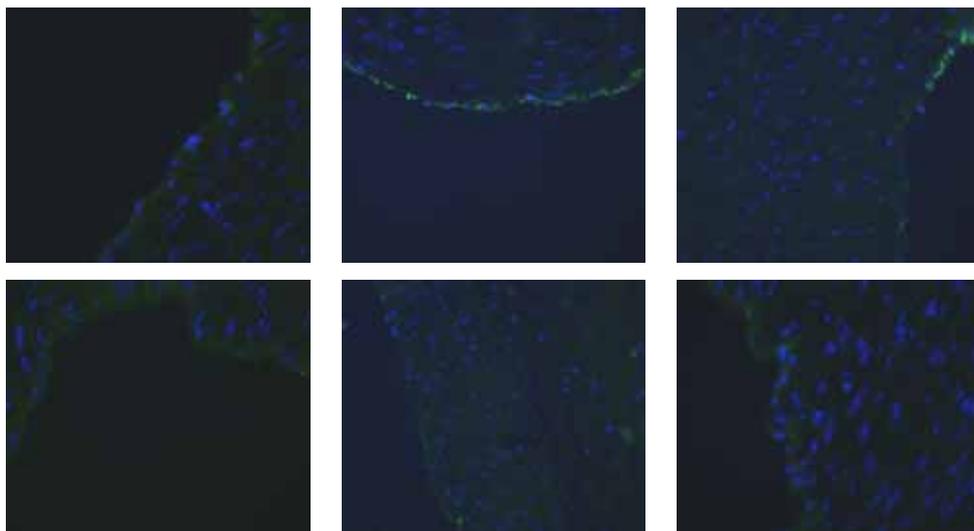


Abb. 4.17 C: Inkubation bei Raumtemperatur

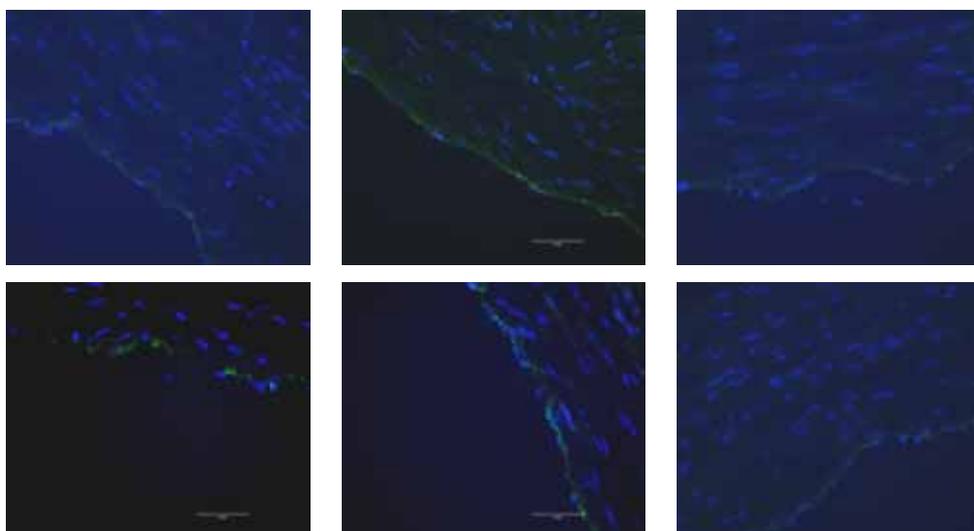


Abb. 4.17 D: Inkubation bei 4 °C

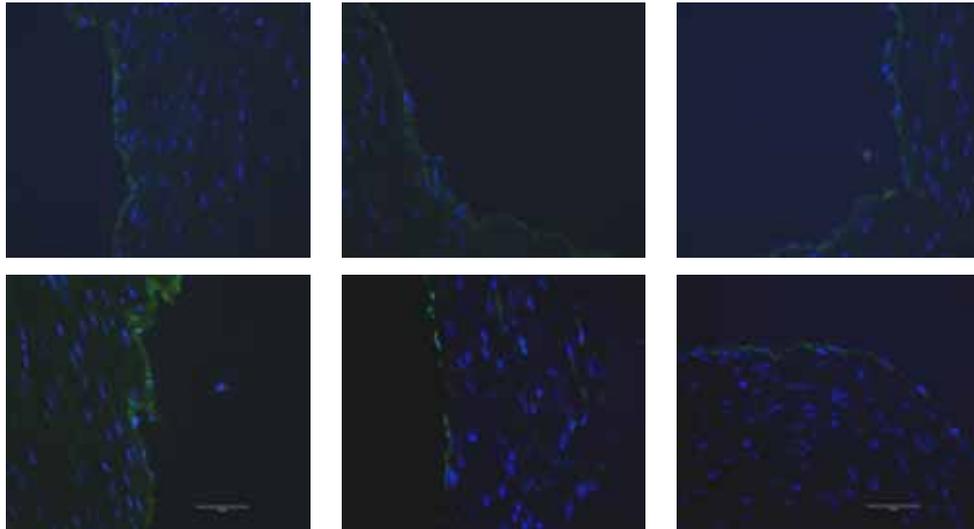
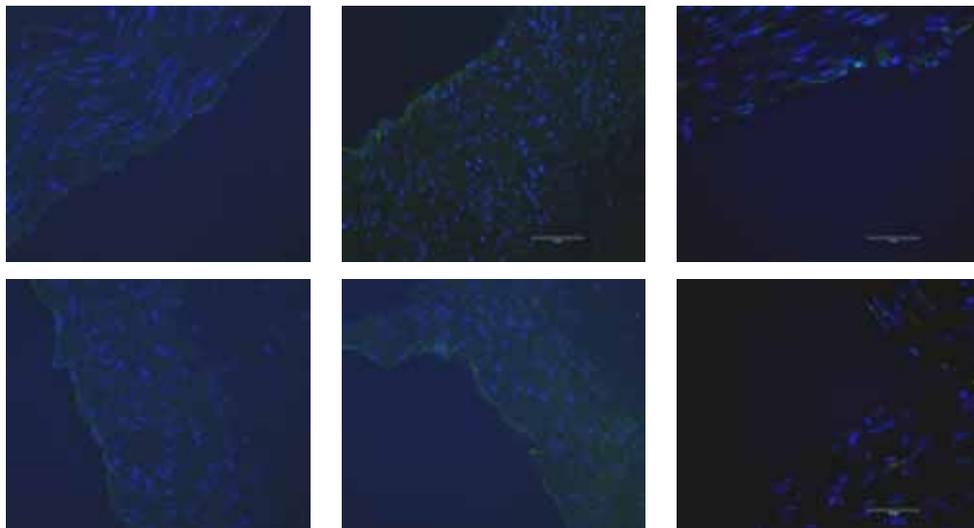
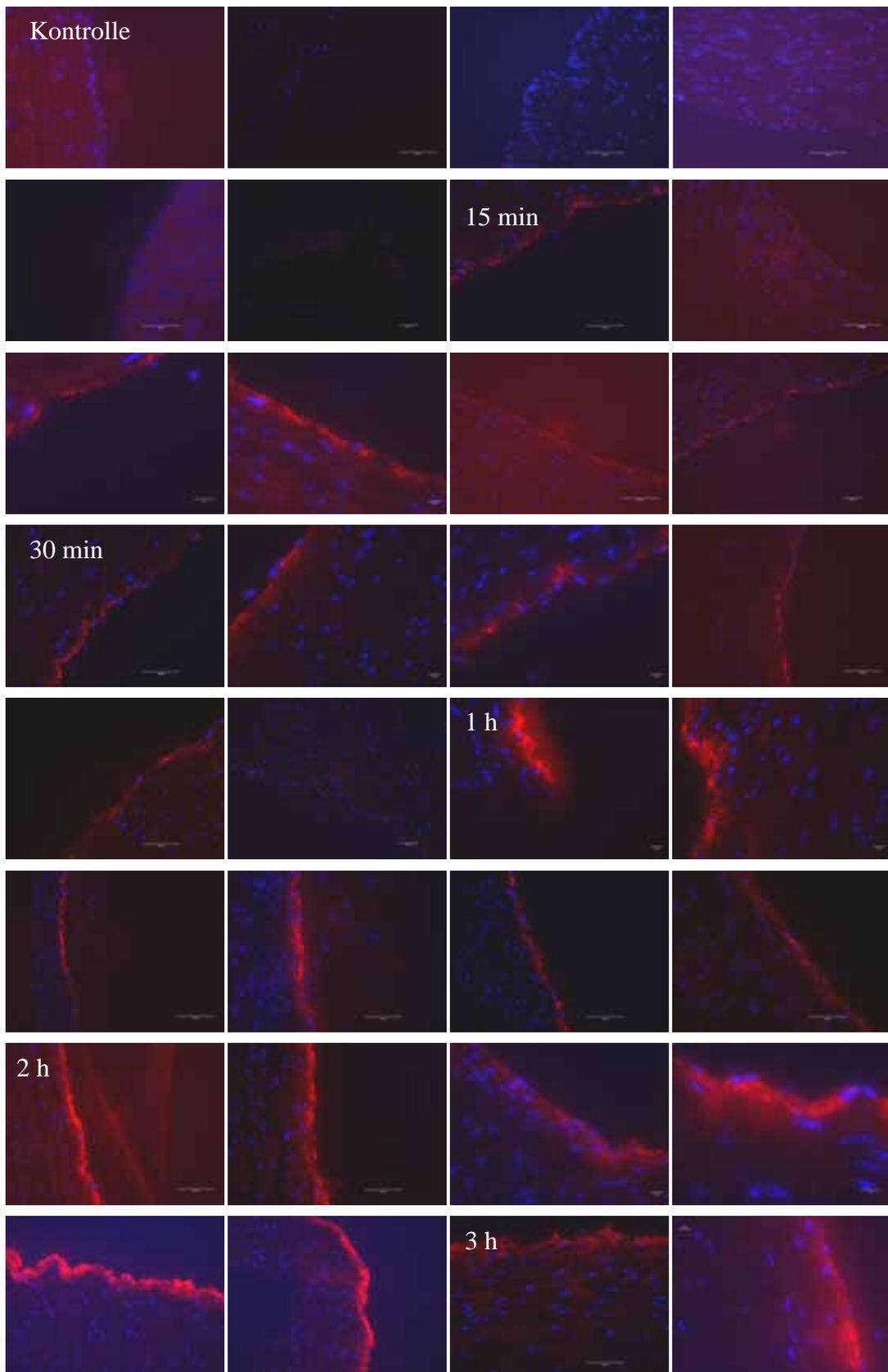
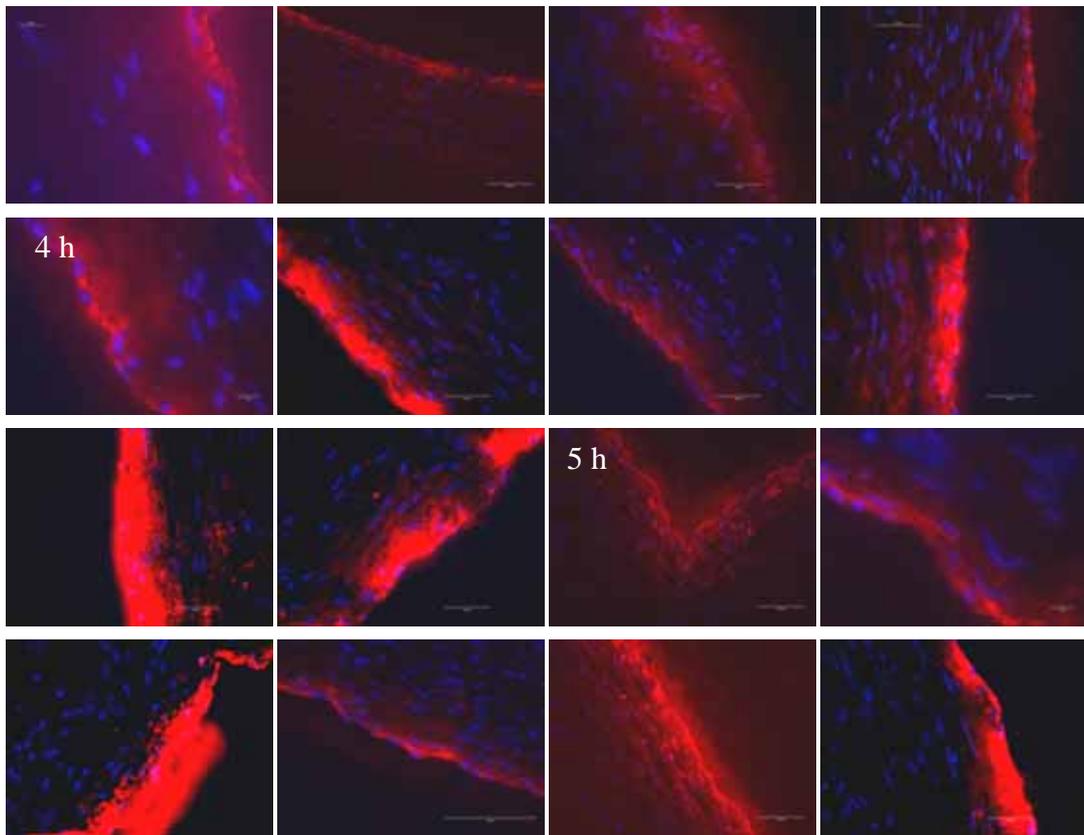


Abb. 4.17 E: Inkubation zusammen mit Heparin

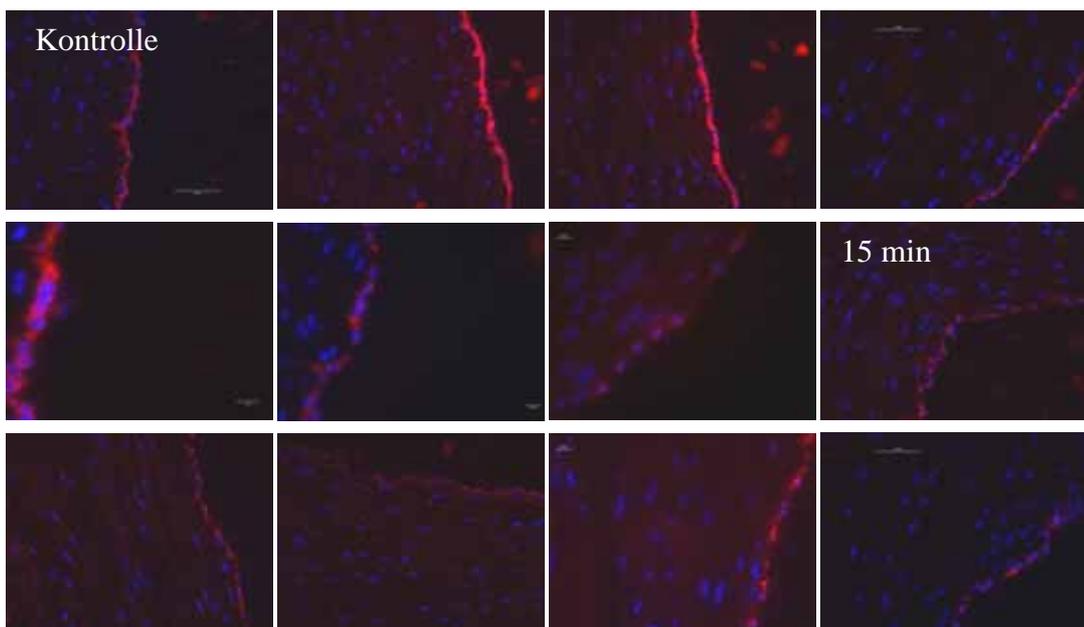


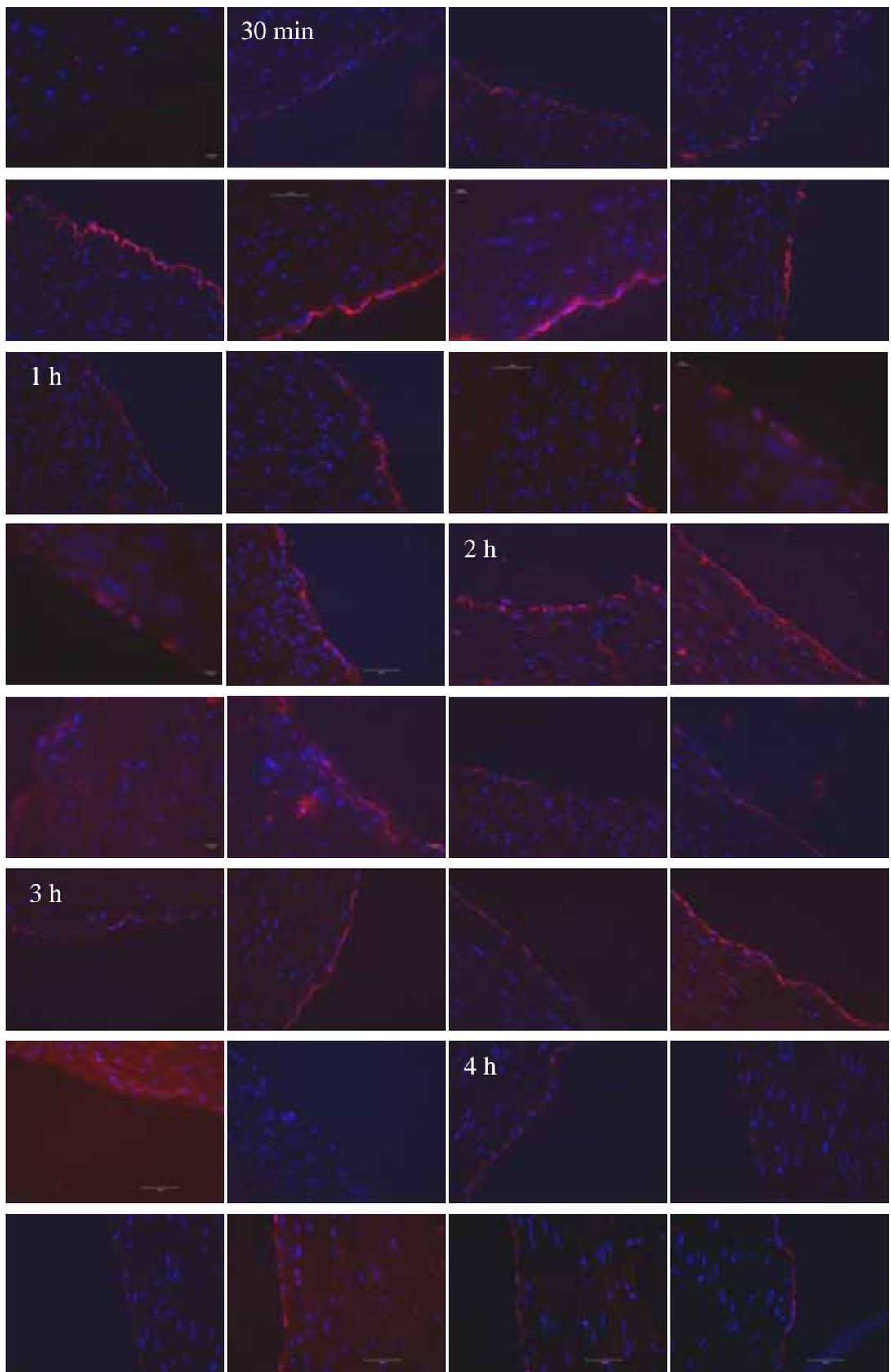
**9.2.1.7 Abb. 4.8: Inkubation der *V. umbilicalis* mit 20 µg/ml Eap von 15 min bis zu 5 Stunden (anti-Eap-Färbung)**

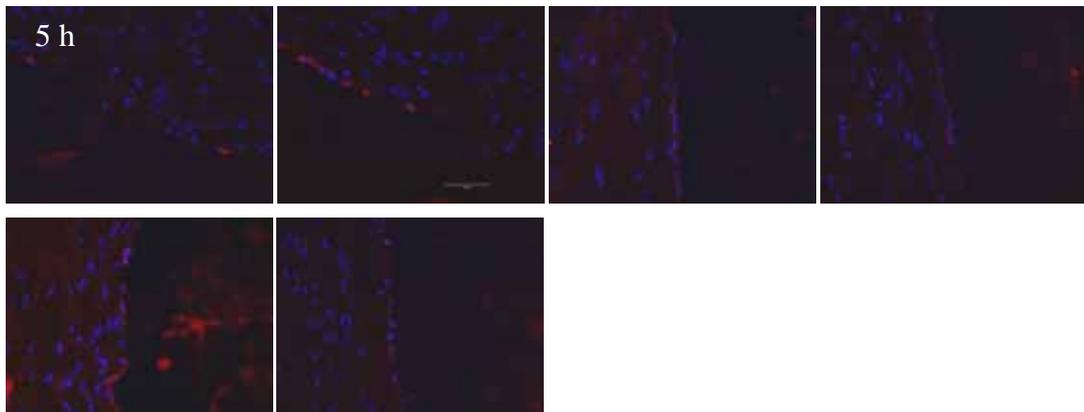




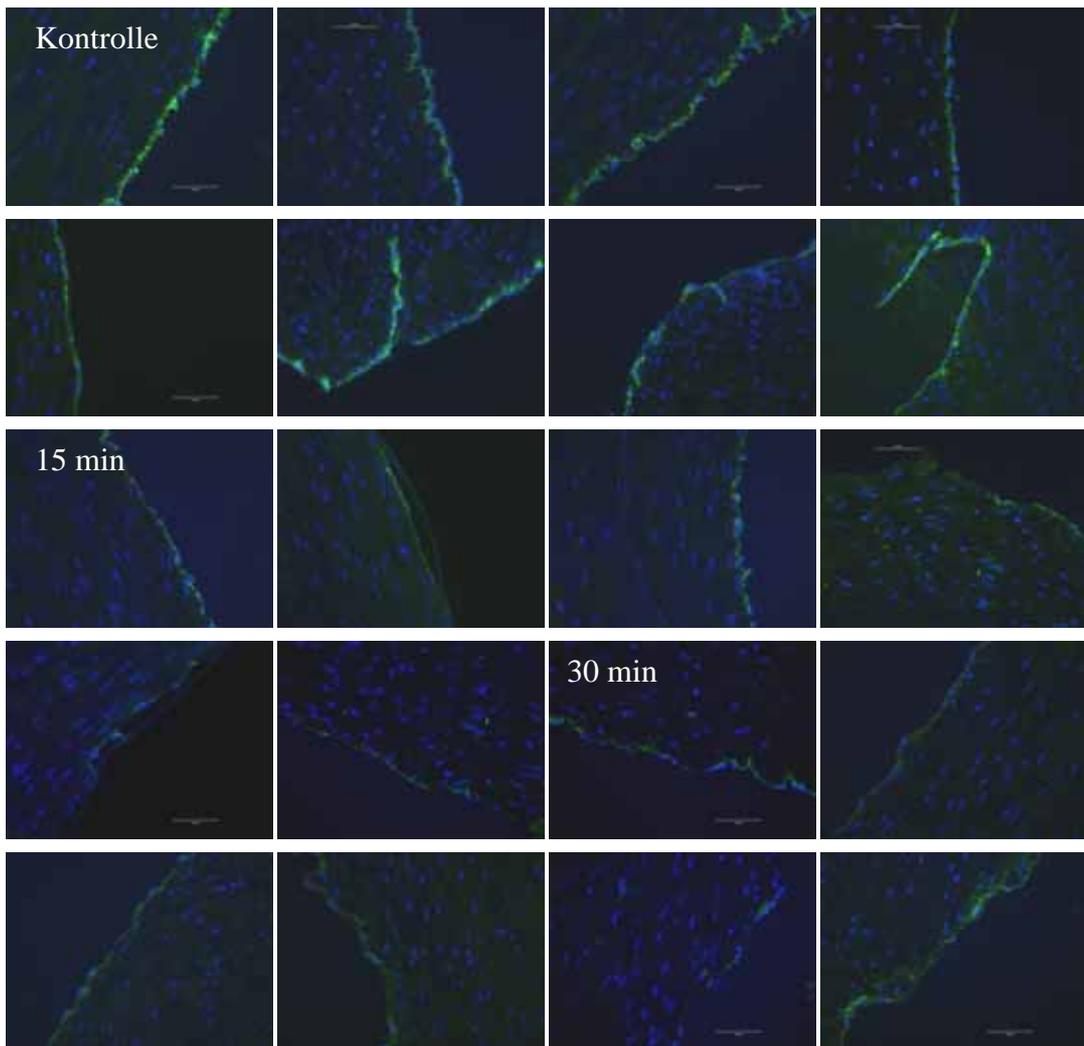
**9.2.1.8 Abb. 4.9: Inkubation einer Nabelschnur mit 20 µg/ml Eap von 15 min bis zu 5 Stunden (anti-ICAM-1-Färbung)**

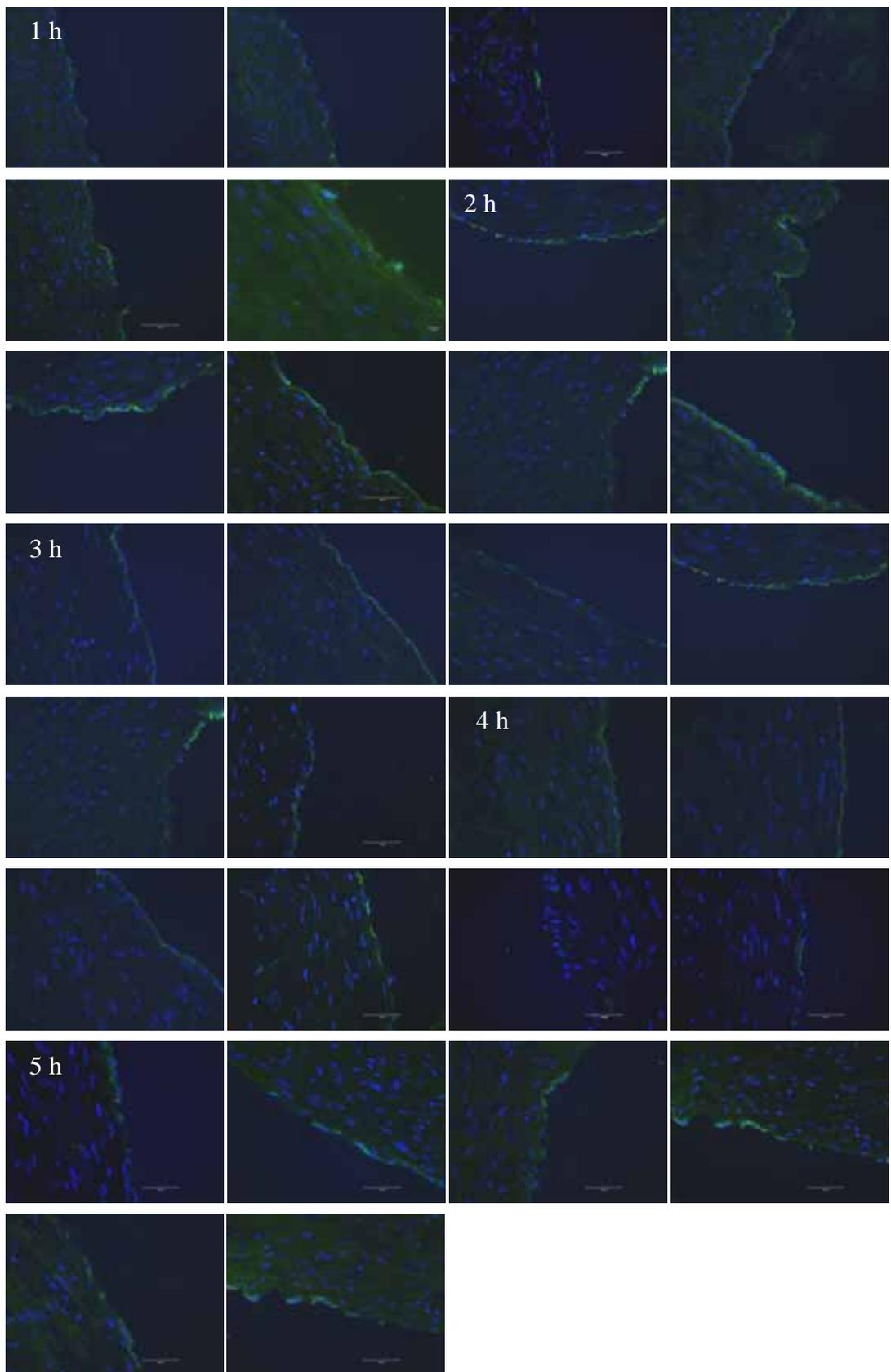






**9.2.1.9 Abb. 4.10: Inkubation einer Nabelschnur mit 20 µg/ml Eap von 15 min bis zu 5 Stunden (anti-PECAM-1-Färbung)**





## 9.2.2 *In Vitro*-Experimente

### 9.2.2.1 Inkubation von HUVEC mit 1, 5, 10 und 20 $\mu\text{g/ml}$ Eap bzw. mit Eap nach Entfernung der HS auf den Endothelzellen (anti-Eap-Färbung)

Abb. 4.4 B I: Kontrolle (ohne Eap)

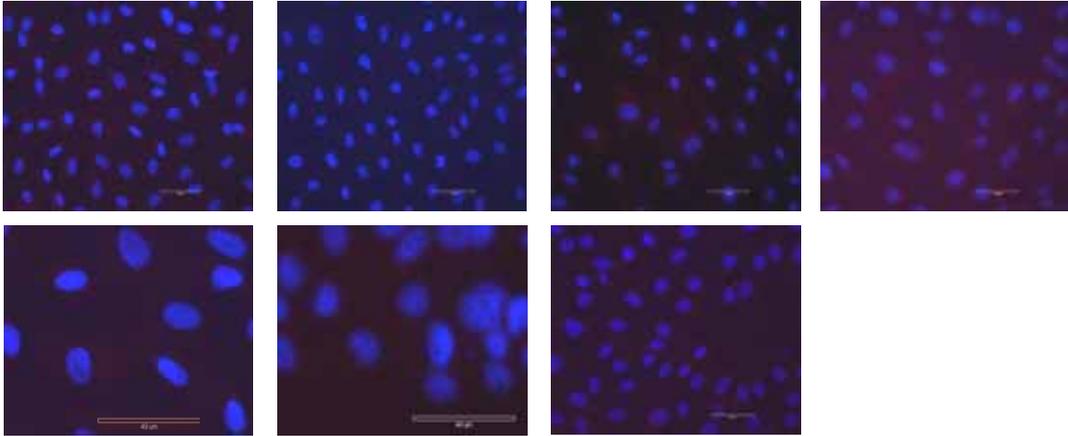


Abb. 4.4 B II: Inkubation mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Eap

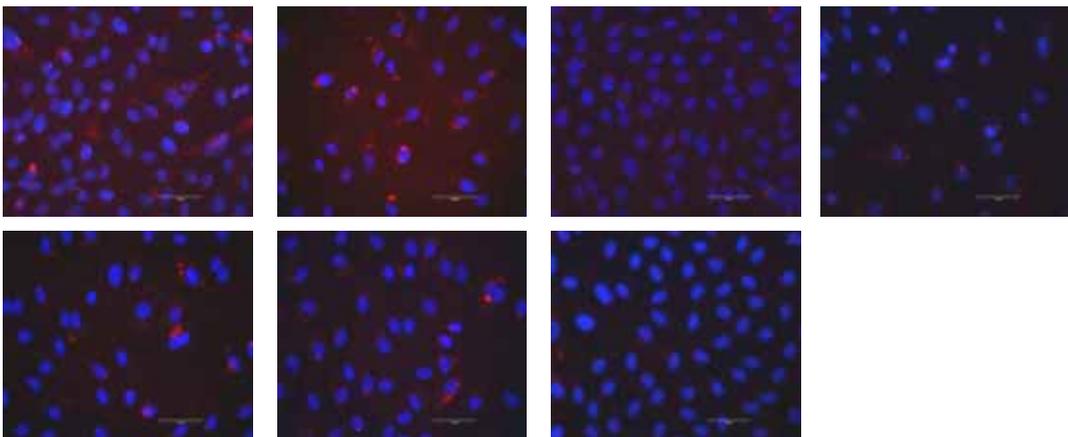


Abb. 4.4 B III: Inkubation mit 5  $\mu\text{g/ml}$  Eap

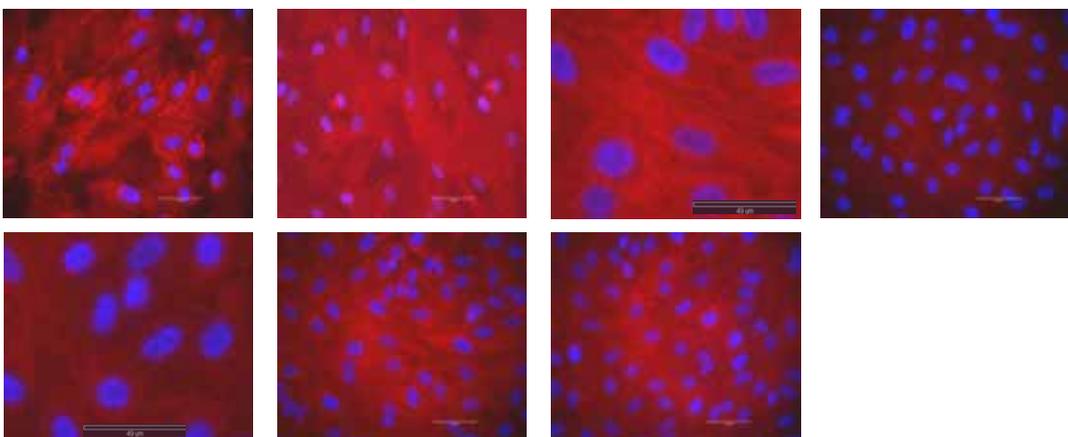


Abb. 4.4 B IV + Abb. 4.18 B I: Inkubation mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Eap

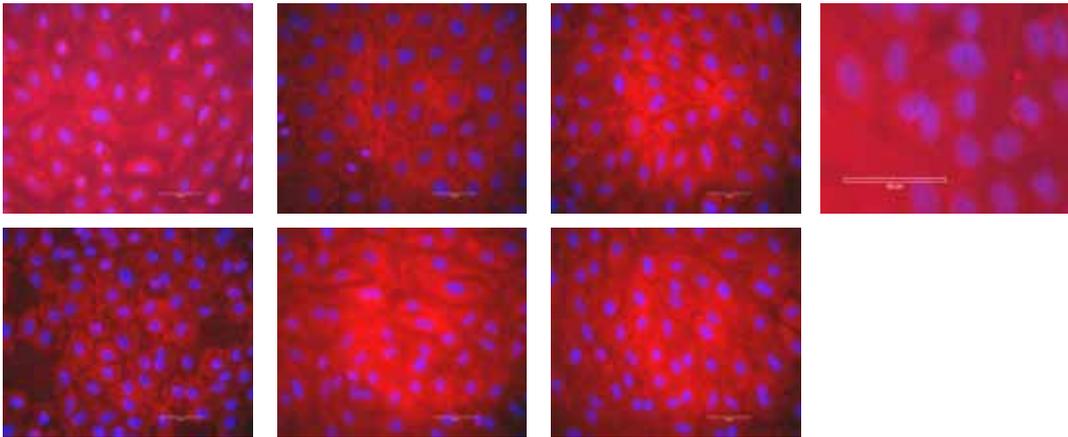


Abb. 4.18 C I : Inkubation mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Eap

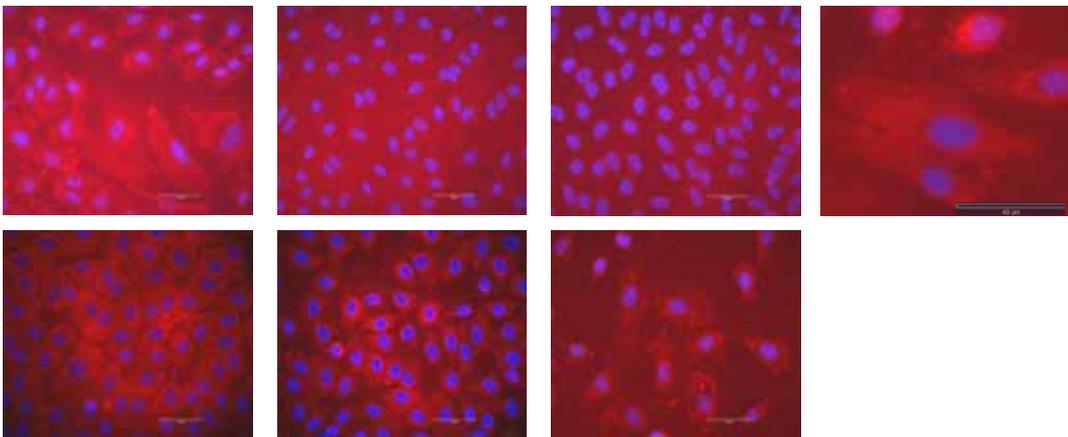


Abb. 4.18 C II: Entfernung der HS auf den Zelloberflächen der HUVEC  
mit Heparinase III, anschließende Inkubation mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Eap

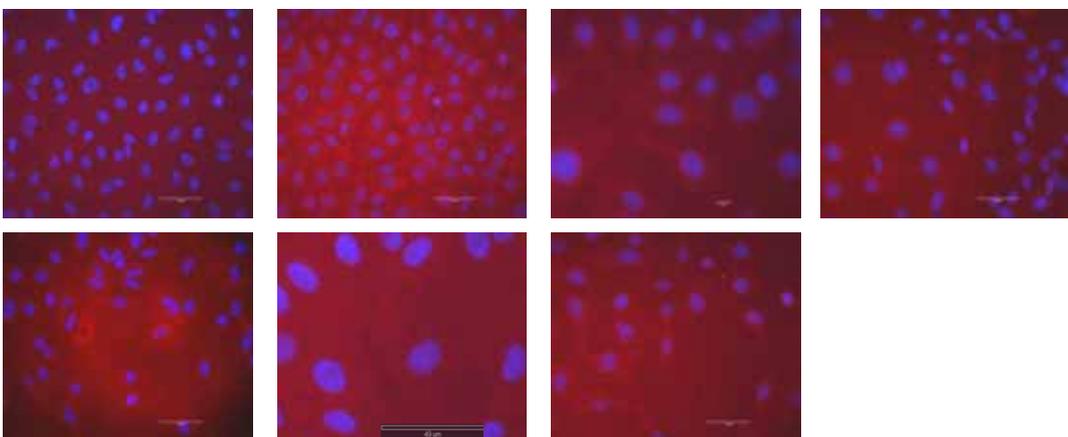
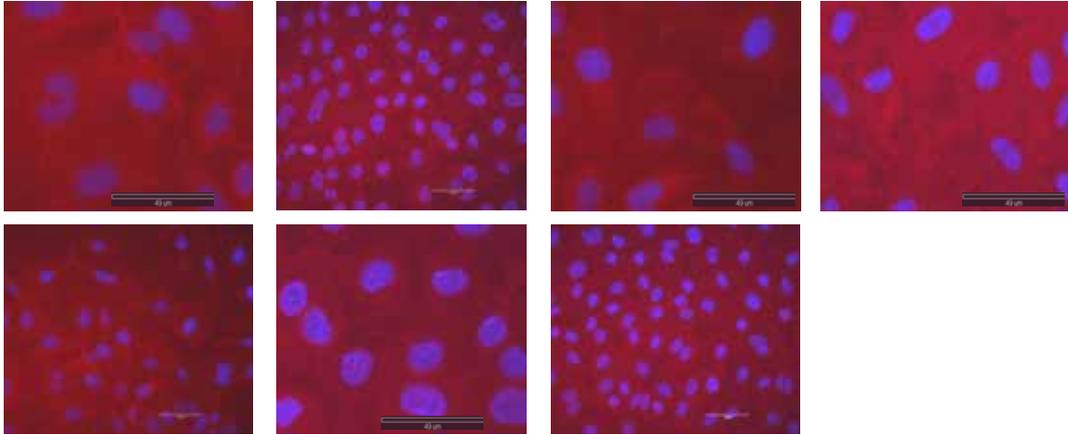


Abb. 4.18 B II: Entfernung der HS auf den Zelloberflächen der HUVEC mit Heparinase III, anschließende Inkubation mit 10 µg/ml Eap



**9.2.2.2 Inkubation von HUVEC mit 10 µg/ml Eap bei 4 °C, Raumtemperatur, 37 °C und unter dem Einfluss von Heparin**

Abb. 4.12 A I: Inkubation bei 37 °C

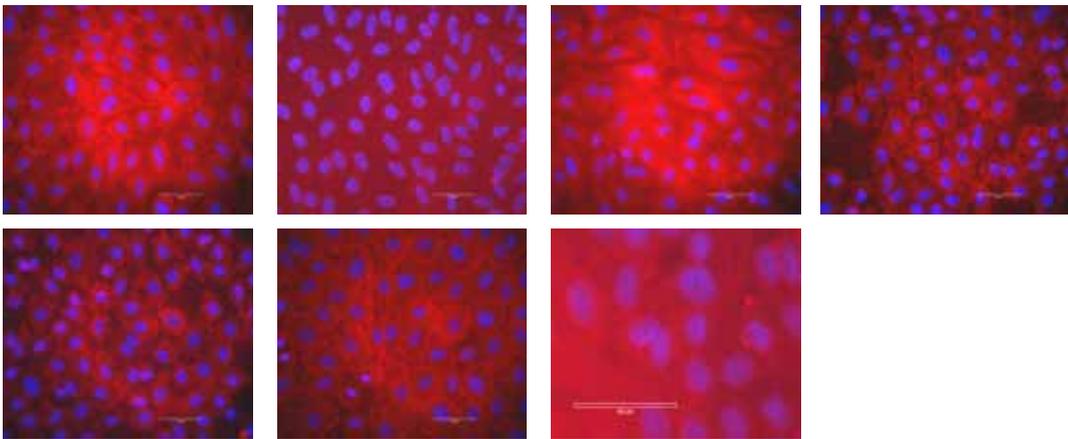


Abb. 4.12 B I: Inkubation bei 37 °C, Heparin-haltiger Waschlösung

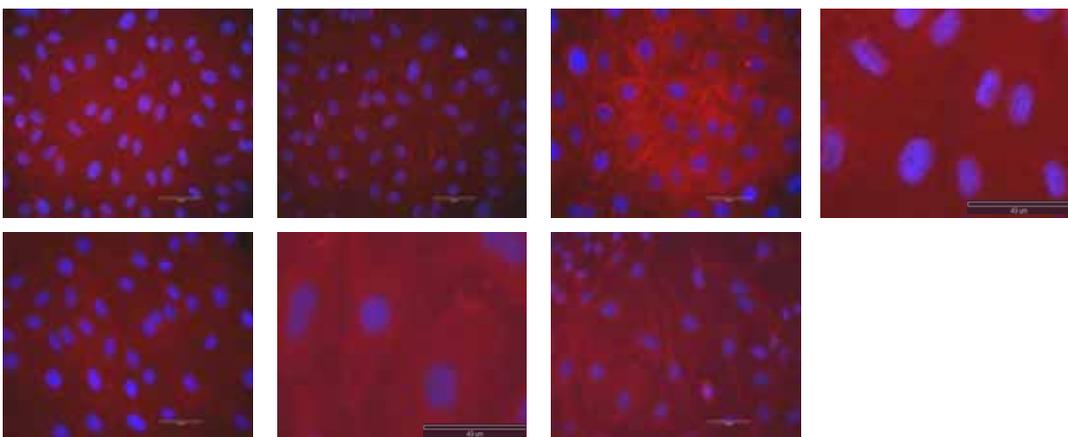


Abb. 4.12 C I: Inkubation bei 37 °C zusammen mit Heparin

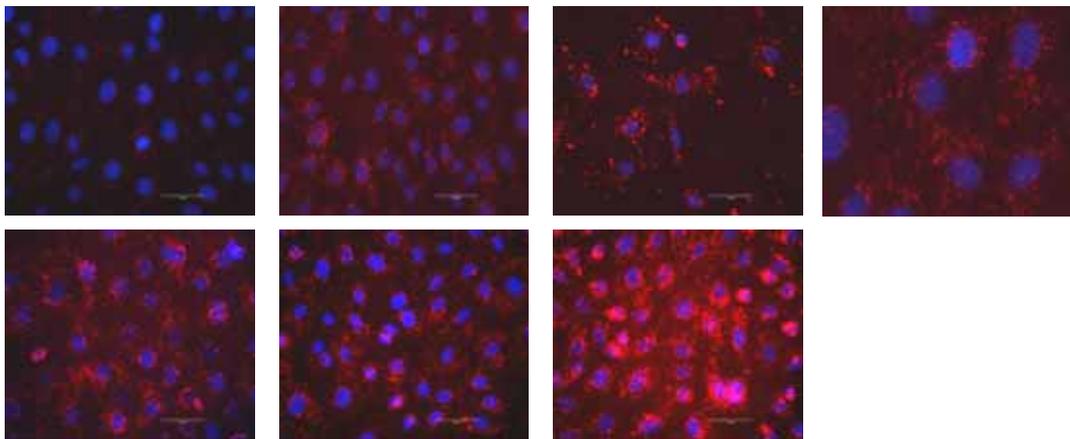


Abb. 4.12 A II: Inkubation bei Raumtemperatur

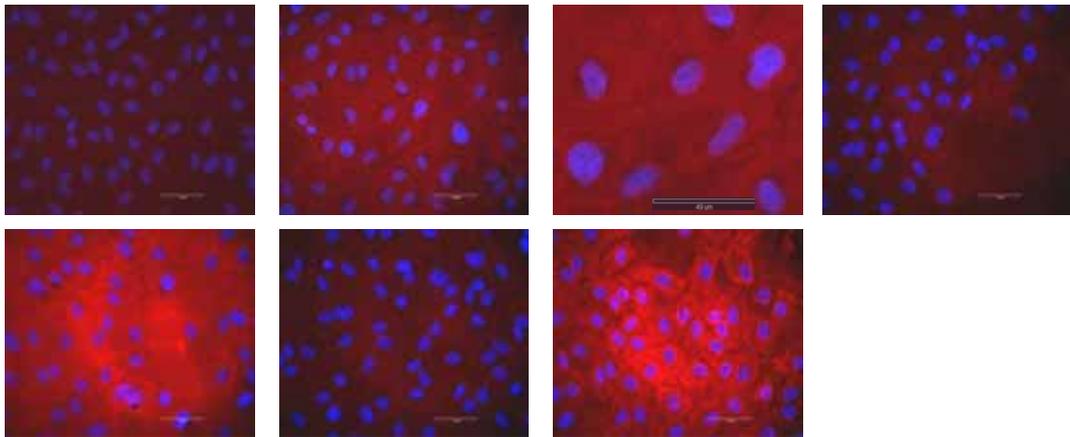


Abb. 4.12 B II: Inkubation bei Raumtemperatur, Heparin-haltiger Waschlösung

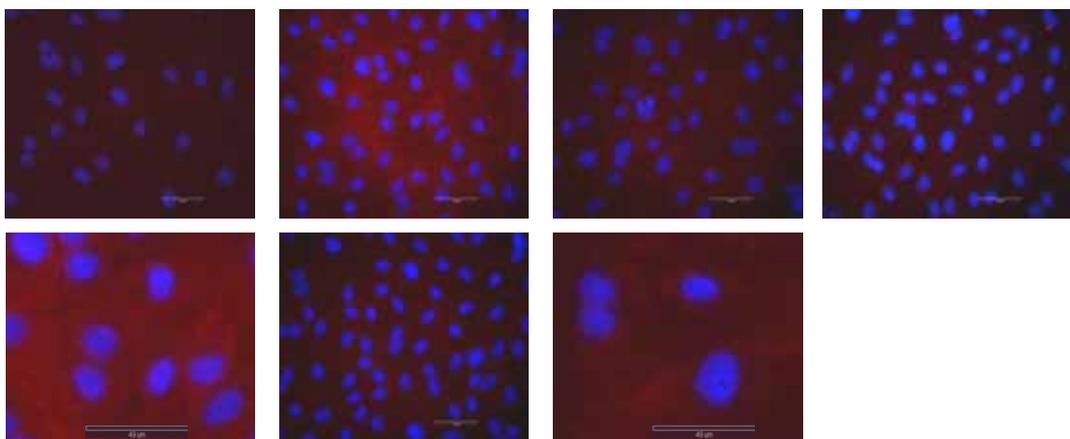


Abb. 4.12 C II: Inkubation bei Raumtemperatur zusammen mit Heparin

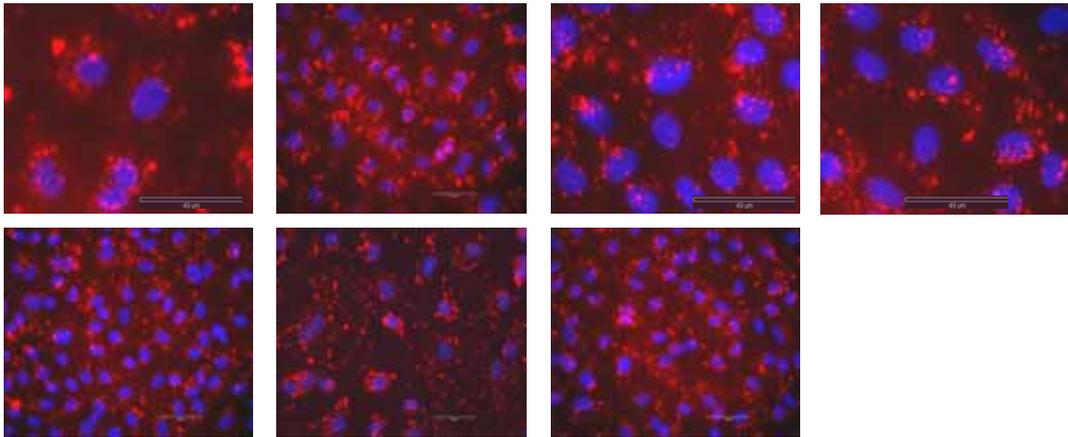


Abb. 4.12 A III: Inkubation bei 4 °C

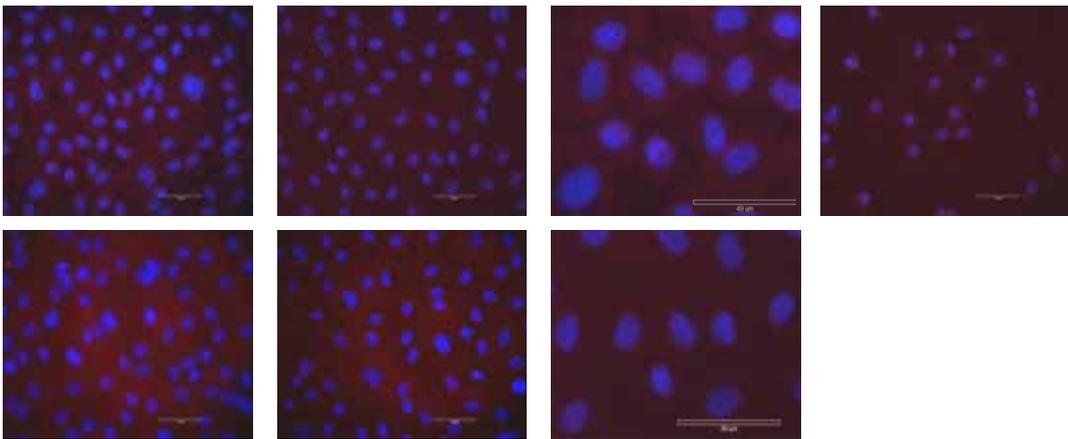


Abb. 4.12 B III: Inkubation bei 4 °C, Heparin-haltiger Waschluffer

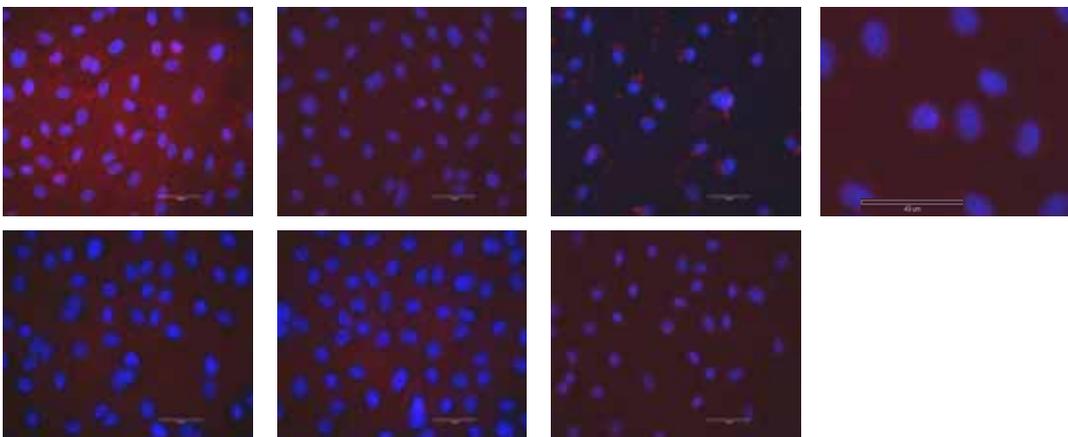
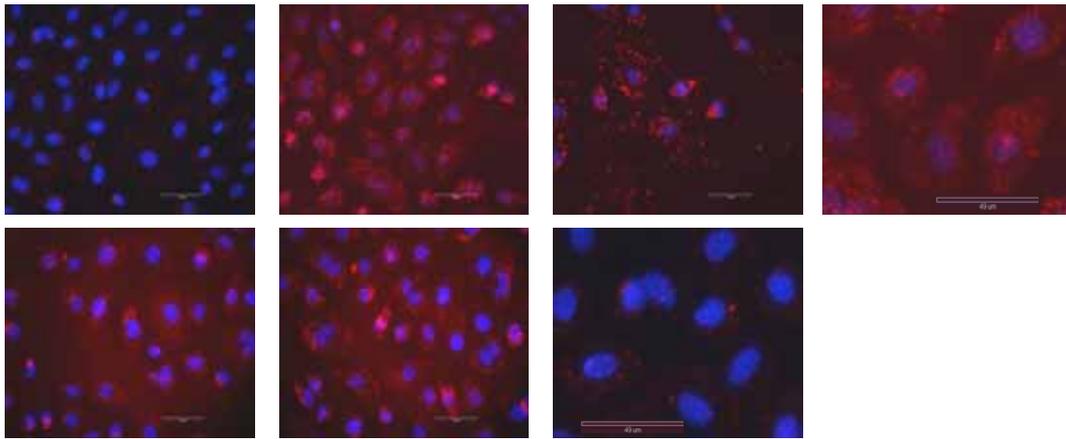


Abb. 4.12 C III: Inkubation bei 4 °C zusammen mit Heparin



**9.2.2.3 Inkubation von HUVEC mit 1, 5, 10 bzw. 20 μg/ml Eap  
und anschließender Entfernung der Zellen**

Abb. 4.22 B I: Inkubation mit 1 μg/ml Eap

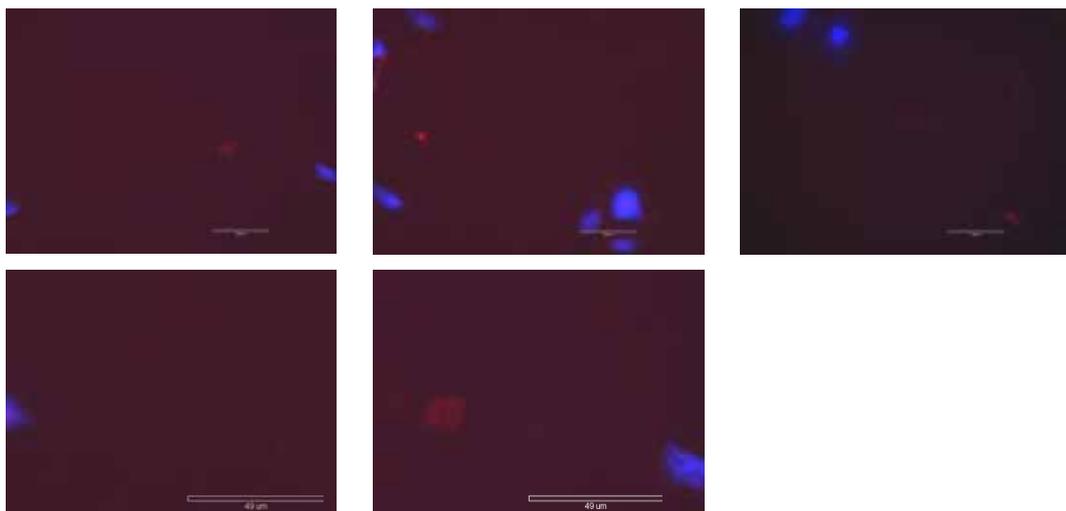


Abb. 4.22 B II: Inkubation mit 5 μg/ml Eap

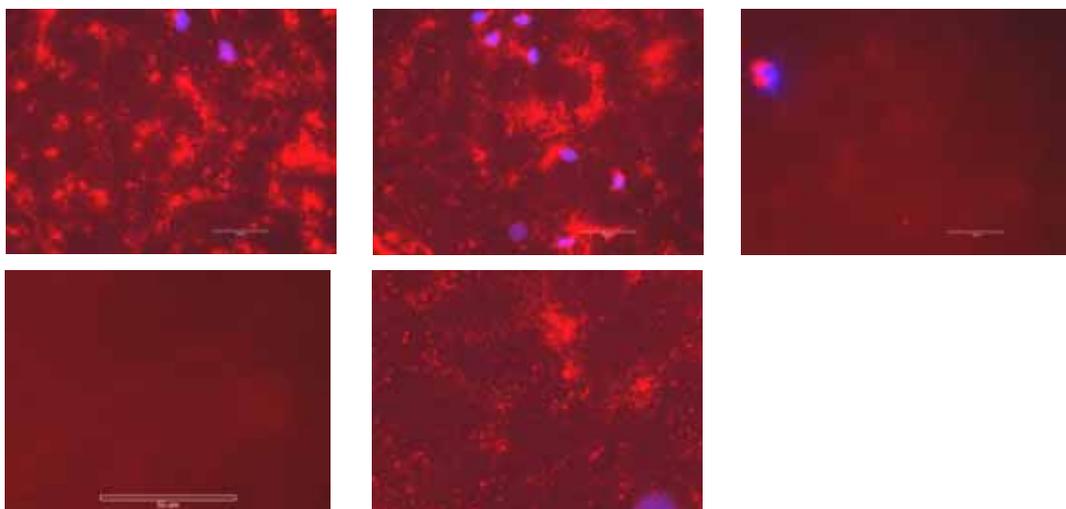


Abb. 4.22 B III: Inkubation mit 10 µg/ml Eap

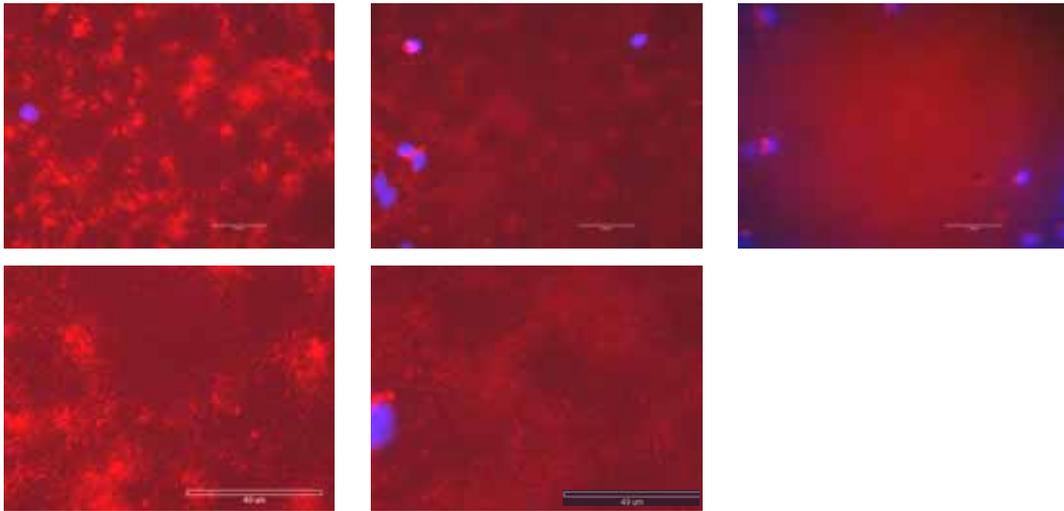
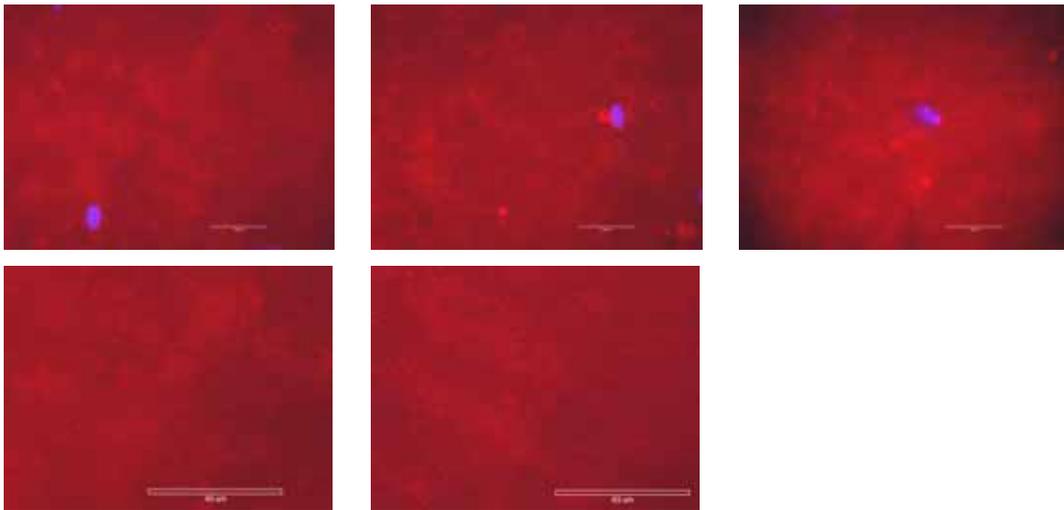


Abb. 4.22 B IV: Inkubation mit 20 µg/ml Eap



### 9.3 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.1:</b> Die Struktur von Eap.	17
<b>Abb. 1.2:</b> Rollen und feste Anheftung eines Neutrophilen.	21
<b>Abb. 2.1:</b> Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz	32
<b>Abb. 2.2:</b> Prinzip eines Fluoreszenzmikroskopes	35
<b>Abb. 2.3:</b> Prinzip eines Konfokalmikroskopes	36
<b>Abb. 2.4:</b> Prinzip eines Sandwich-ELISA	38
<b>Abb. 4.1:</b> Positiv- und Negativkontrolle der <i>V. umbilicalis</i> bzw. HUVEC.	46
<b>Abb. 4.2:</b> HUVEC-Eap-Bindungsassay (n=4) mit verschiedenen Konzentrationen und unter dem Einfluss von Heparin.	47
<b>Abb. 4.3:</b> HUVEC-Eap-Bindungsassay (n=3) im Zeitverlauf und bei verschiedenen Temperaturen.	48
<b>Abb. 4.4:</b> Aufnahme von Eap in Endothelzellen.	50
<b>Abb. 4.5:</b> Quantifizierung der Aufnahme von Eap in Endothelzellen.	51
<b>Abb. 4.6:</b> ICAM-1 und PECAM-1 nach Eap-Inkubation.	52
<b>Abb. 4.7:</b> Quantifizierung der ICAM-1 und PECAM-1-Färbungen.	53
<b>Abb. 4.8:</b> Zeitverlauf der Aufnahme von Eap in die <i>V. umbilicalis</i> .	54
<b>Abb. 4.9:</b> Expression von ICAM-1 in der Nabelschnurvene im Zeitverlauf der Eap-Inkubation.	54
<b>Abb. 4.10:</b> Expression von PECAM-1 in der Nabelschnurvene im Zeitverlauf der Eap-Inkubation.	55
<b>Abb. 4.11:</b> Quantifizierung der Eap-, ICAM-1- und PECAM-1-Färbung im Zeitverlauf nach Eap-Inkubation.	56
<b>Abb. 4.12:</b> Aufnahme von Eap in HUVEC bei verschiedenen Temperaturen und zusammen mit Heparin.	58
<b>Abb. 4.13:</b> Quantifizierung der Eap-Färbung nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen und unter dem Einfluss von Heparin.	59

<b>Abb. 4.14:</b> Aufnahme von Eap ins Endothel der <i>V. umbilicalis</i> bei verschiedenen Inkubationstemperaturen und unter dem Einfluss von Heparin.	60
<b>Abb. 4.15:</b> Quantifizierung der Eap-, ICAM-1- und PECAM-1-Färbungen nach Eap-Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen und unter dem Einfluss von Heparin.	60
<b>Abb. 4.16:</b> ICAM-1-Expression der Nabelschnurvene bei verschiedenen Inkubationstemperaturen von Eap und unter dem Einfluss von Heparin.	62
<b>Abb. 4.17:</b> PECAM-1-Expression der <i>V. umbilicalis</i> bei verschiedenen Inkubationstemperaturen von Eap und unter dem Einfluss von Heparin.	62
<b>Abb. 4.18:</b> Aufnahme von Eap in HUVEC bzw. in die <i>V. umbilicalis</i> nach Entfernung der Heparansulfate.	64
<b>Abb. 4.19:</b> Quantifizierung der Eap-Färbung nach Entfernung der Heparansulfate.	65
<b>Abb. 4.20:</b> Expression von PECAM-1 von HUVEC nach Eap-Inkubation.	66
<b>Abb. 4.21:</b> Permeabilitätsassay	67
<b>Abb. 4.22:</b> Lokalisation von Eap in der ECM von HUVEC.	68
<b>Abb. 4.23:</b> Quantifizierung der Eap-Färbung der ECM.	69
<b>Abb. 4.24:</b> Konfokalaufnahmen von HUVEC nach Eap-Inkubation.	70
<b>Abb. 4.25:</b> Perinukleäre Verdichtung der Eap-Färbung.	71
<b>Abb. 5.1:</b> Mögliche Wechselwirkungen von Eap mit dem Endothel.	72
<b>Abb. 5.2:</b> Bindungspartner von Eap am Endothel.	73
<b>Abb. 5.3:</b> Einfluss von Heparin und HS auf die Bindung und Aufnahme von Eap.	74
<b>Abb. 5.4:</b> Histologisches Präparat eines Nabelschnurquerschnittes (Azan-Färbung).	76
<b>Abb. 9.1:</b> ELISA-Bindungsassay von Heparin an immobilisiertes Eap.	105

## 9.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Adhäsionsproteine von <i>S. aureus</i>	15
Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete Antikörper zur Färbung der HUVEC	33
Tabelle 2.2: In der Arbeit verwendete Antikörper zur Färbung der Nabelschnur	34

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**

## 9.6 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die mich auf unterschiedliche Weise unterstützt und damit zu dieser Dissertation beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Klaus Preissner danke ich für die freundliche Überlassung des interessanten Themas und die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien. Vielen Dank für die Mühe, meine Manuskripte zu korrigieren und für viele Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Ein großer Dank gilt meiner Betreuerin, Frau Dr. Christiane Jünemann, für die Unterstützung, Fachkompetenz und Geduld mit der sie mich durch mein Projekt begleitet hat. Insbesondere bin ich ihr dankbar, dass sie sich durch meine Texte kämpfte und mir mit vielen konstruktiven Ratschlägen jederzeit zur Seite stand.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Uwe Schubert, der mir ebenfalls jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Ganz besonders bedanke ich mich für seine Unterstützung in der Zellkultur und bei den Bindungsassays.

Für die Einführung und die Hilfe bei den immunhistochemischen Experimenten und der Mikroskopie möchte ich mich bei Frau Dr. Karin Hersemeyer und Frau Bärbel Fühler bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich meiner lieben Familie, besonders meinen Eltern, danken, die stets ein offenes Ohr für mich hatten in guten, aber auch in schlechten Zeiten, mich immer unterstützten und somit ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Außerdem danke ich natürlich meinem Freund, der mich jederzeit ermuntert und motiviert hat und mir in jeder Sekunde zur Seite stand.