

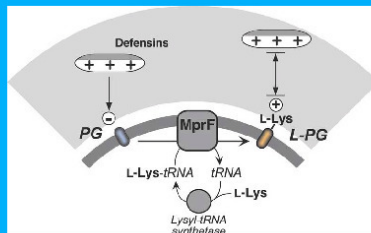


Petra Staubitz (Autor)

Charakterisierung des neuartigen Virulenzfaktors MprF und seiner Rolle bei der Defensinresistenz von *Staphylococcus aureus*

Petra Staubitz

Charakterisierung des neuartigen
Virulenzfaktors MprF und seiner Rolle bei
der Defensinresistenz von *Staphylococcus aureus*



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2802>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

EINLEITUNG

1.1 Staphylokokken

Staphylokokken wurden 1881 erstmalig von Ogston als Entzündungen und Eiter verursachende Mikrokokken definiert (Lyell, 1989). Aufgrund ihres niedrigen GC-Gehaltes (30-39%) unterscheidet man heute Staphylokokken von den morphologisch ähnlichen Mikrokokken mit einem GC-Gehalt von 63-73%. Staphylokokken sind grampositive, fakultativ anaerobe Bakterien, die einzeln, paarweise, in Tetraden oder traubenähnlichen (staphylé = Traube) Zellaggregaten wachsen. Sie sind unbeweglich, nicht sporenbildend, besitzen Teichonsäuren und haben ein einheitliches Zellwandpeptidoglycan. Viele *Staphylococcus aureus* Stämme haben charakteristischer Weise eine Pentaglycininterpeptidbrücke und Mikrokapseln (Lowy, 1998). Über 30 Arten und Unterarten sind bekannt, die zwar ubiquitär in der Natur vorkommen, konstante Populationen aber nur auf der Haut und Schleimhäuten von Säugetieren und Vögeln sowie in tierischen Produkten wie Fleisch und Milcherzeugnissen ausbilden. Charakteristisch für Staphylokokken ist die extrem hohe Kochsalzresistenz; viele Arten können bei Natriumchloridkonzentrationen von über 1,7 M noch wachsen. Die für die Humanmedizin wichtigsten Arten sind *S. aureus*, einem der wichtigsten allgemeinen und nosokomialen Pathogene, *S. epidermidis*, ein Opportunist der menschlichen Hautflora, der wegen seiner Fähigkeit einen Biofilm auszubilden, fremdkörperassoziierte Infektionen verursacht, und *S. saprophyticus*, der für 10-20% der akuten Harnwegsinfektionen bei jungen Frauen verantwortlich ist (Kayser et al., 2004).

1.1.1 Staphylococcus aureus als klinisch wichtiges Pathogen

Staphylococcus aureus ist 0,5-1,5 µm im Durchmesser und einer der prominentesten Vertreter der Gattung *Staphylococcus*. Der Arname „Aureus“ rührt von der häufig (gold)gelben Pigmentierung her. *S. aureus* gehört zu den Koagulase-positiven Staphylokokken. Man findet ihn auf der menschlichen Haut, aber hauptsächlich auf

nasalen Epithelien, wobei 60% der Menschen zeitweilige, 20% der Bevölkerung ständige Träger sind (Peacock et al., 2001). Der Trägerstatus stellt einen hohen Risikofaktor dar, denn obwohl *S. aureus* zur normalen Hautflora gerechnet wird, ist seine Tendenz, Infektionen zu verursachen, sehr hoch. So kann er sich nicht nur auf Wirtszellen, sondern auch in deren Innerem vermehren (Shompole et al., 2003). Wie schon erwähnt ist *S. aureus* einer der wichtigsten allgemeinen und nosokomialen Pathogene der Humanmedizin, der wie fast kein anderes Pathogen viele verschiedene Infektionskrankheiten hervorrufen kann, die von weniger gefährlichen Hautkrankheiten wie Furunkeln und Karbunkeln über chronische Krankheiten wie Osteomyelitis bis zu lebensbedrohlichen Krankheiten wie Scaled Skin Syndrom, Lungenentzündung, akute Endokarditis, Myokarditis, Nahrungsmittelvergiftungen, Sepsis und Toxic Shock Syndrome reichen können. Grund dafür ist ein reichhaltiges Arsenal an Resistenzmechanismen und Virulenzfaktoren, die die klinische Symptomatik von Infekten durch diesen Erreger bestimmen. Neben der Anpassung an die ökologische Nische Haut / Nase (hohe Osmotoleranz, Resistenz gegen Trockenheit und Säuremantel der Haut) zählen dazu unter anderem extrazelluläre Enzyme (z.B. Koagulase, Lipase), extrazelluläre Toxine (z. B. α -, β -, γ - und δ -Toxin, Enterotoxine, TSST), verschiedene antiphagozytische Komponenten (z.B. Protein A, Kapsel) und Adhäsine auf der Zellwand (z.B. Clumping Factor, Fibronectin-Bindeprotein, Kollagen-Bindeprotein). Hinzu kommen Defensinresistenz (Resistenz gegen antimikrobielle Peptide) und verschiedene Antibiotikaresistenzen (z.B. β -Lactamase, Multiple Drug Transporter), die meist auf mobilen genetischen Elementen oder Plasmiden lokalisiert sind (Lowy, 1998; Crossly K.B. et al., 1997).

Seit den 1980er Jahren treten in Krankenhäusern vermehrt Methicillin-resistente Stämme (MRSA; gleichzusetzen mit multi-resistenten Stämmen) auf und 1997 wurden die ersten Stämme mit einer Resistenz gegen das Notfallantibiotikum Vancomycin entdeckt (VRSA-Stämme). Kürzlich ist der von Medizinern und Forschern gefürchtete Fall eingetreten, dass die plasmidkodierte Vancomycinresistenzgene von Enterokokken in *S. aureus* gefunden wurden. Diese Stämme sind auch gegen sehr hohe Vancomycindosen resistent (Weigel et al., 2003).

Wichtige Varianten einiger *S. aureus* Stämme sind die sogenannten Small Colony Variants, die sich durch kleine Zellen, langsames Wachstum und einen Defekt in der

Elektronentransportkette auszeichnen. Sie sind sehr virulent und werden nur mit bestimmten Krankheiten in Verbindung gebracht (Roggenkamp et al., 2004).

Ein neues, ernsthaftes Problem, das mit der modernen Medizin Einzug gehalten hat (Schierholz et al., 2001), ist die Besiedelung von Fremdkörpern wie verschiedene Arten von Kathetern, Endoprothesen und Shuntventilen durch *S. epidermidis* und *S. aureus*. Staphylokokken besiedeln Plastikmaterialien mit Hilfe ihrer Adhäsine die an die von Fibrinogen oder Fibronektin bedeckten Fremdkörper binden. Es bildet sich ein Biofilm, der ein Streuherd sein kann und schwer zu therapieren ist.

Die zunehmende Resistenzentwicklung bei Krankenhausstämmen gegen alle verfügbaren Antibiotika, die Fähigkeit zur Biofilmbildung auf in der Medizin verwendeten Plastikmaterialien und die steigende Zahl immunsupprimierter Patienten (AIDS, Menschen nach Operationen, Chemotherapiepatienten, usw.) machen eine Behandlung von *S. aureus* immer schwerer. Es müssen also neue Möglichkeiten für Präventivmaßnahmen sowie neue Therapien gegen Staphylokokkeninfektionen gefunden werden.

In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu verstehen, warum *S. aureus* den Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems, der ersten Verteidigungslinie des Körpers, so erfolgreich widerstehen kann.

1.2 Defensinresistenz von *Staphylococcus aureus*

Bakterielle Pathogene wie *S. aureus* besitzen eine Reihe von Virulenzfaktoren, die ihnen die Kolonisierung der nährstoffreichen Gewebe von Eukaryoten ermöglichen. Dazu zählen Adhäsine der Bakterienoberfläche, mit denen sie an bestimmte Wirtszellen adhären können, sekretierte Exoproteine inklusive gewebeschädigender Toxine sowie Defensinresistenzmechanismen (Lowy, 1998). Letztere ermöglichen es ihnen, eine der Barrieren der ersten Verteidigung des Wirtes zu überwinden. Außerdem wird angenommen, dass die Defensinresistenz bei der Entwicklung persistierender und chronischer Infektionen eine wichtige Rolle spielt (Liese et al., 1996; Goldman et al., 1997).

1.2.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem

Das humane bzw. Vertebraten- Immunsystem wird traditionell in zwei Teile aufgeteilt, die angeborene oder natürliche Immunität und die adaptive oder erworbene Immunität. Beide Teile setzen sich aus humoralen und zellulären Bestandteilen zusammen. So gehören zum angeborenen Immunsystem Bestandteile, die direkt antimikrobiell wirken wie kationische antimikrobielle Peptide (KAMPs), bakteriolytische Enzyme, wie Lysozym, Gruppe II Phospholipase A₂ (PLA₂) und Elastase, sowie Lactoferrin und das Komplementsystem. Zum angeborenen Immunsystem gehören auch Phagozyten wie Natürliche Killerzellen, das Monozyten-Makrophagen-System und Granulozyten (Burmester G.-R and Pezzutto A., 2004).

Neutrophile Granulozyten besitzen zwei Arten von Verteidigungsmechanismen, Sauerstoff-abhängige („oxidative burst“) und Sauerstoff-unabhängige, wozu beispielsweise die KAMPs gehören. Da *S. aureus* nahezu resistent gegen KAMPs ist, ist der „oxidative burst“ gegen ihn der wichtigste Inaktivierungsmechanismus (Kristian et al., 2003). CGD-Patienten (Chronic granulomatous disease), die einen genetisch bedingten Defekt im „oxidativ burst“ aufweisen, sind extrem anfällig gegenüber *S. aureus* Infektionen (Liese et al., 1996).

Während das angeborene Immunsystem sofort reagiert, nachdem es Pathogene erkannt hat, braucht das adaptive Immunsystem 3-5 Tage, bis eine effektive Immunreaktion erfolgt. Das liegt daran, dass dieser Teil des Immunsystems hauptsächlich auf T- und B-Zellen basiert. Diese Zellsysteme können hoch spezifisch auf ihr jeweiliges Antigen reagieren und klonal expandieren, so dass eine sehr effektive Antwort sowie eine Gedächtnisreaktion möglich sind (Burmester G.-R and Pezzutto A., 2004). Das bedeutet, dass neben einem zeitlichen Unterschied auch noch einer in den Rezeptoren besteht. Die des angeborenen Immunsystems erkennen konservierte Muster essentieller bakterieller Moleküle wie z.B. LPS und Murein. Diese Rezeptoren werden vererbt. Die Rezeptoren des adaptiven Immunsystems erkennen theoretisch jede fremde Struktur spezifisch, was daran liegt, dass die Gene für diese Rezeptoren zwar vererbt, jeder Rezeptor aber in jedem Individuum neu durch Rekombination entsteht (Medzhitov and Janeway, Jr., 2000).

Bei einer Infektion erkennt das angeborene Immunsystem also zunächst bestimmte, bakterienspezifische Muster und setzt seine humoralen Komponenten, z.B. die KAMPs und seine Phagozyten ein, um den Wirtsorganismus zu schützen. Es reagiert

also zunächst unabhängig vom adaptiven Immunsystem. Die Zellen des angeborenen Immunsystems produzieren aber auch Cytokine, darunter auch Chemokine. Je nach Cytokinmilieu wird so eine bestimmte Immunantwort moduliert. Bei diesem Schritt wird auch das adaptive Immunsystem zugeschaltet, indem z.B. T-Zellen zur Infektionsstelle gelockt (chemischer Gradient an inflammatorischen Mediatoren) werden (Banyer et al., 2000; Oppenheim et al., 2003).

Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass KAMPs und Chemokine überlappende Wirkungen haben. Bei vielen Chemokinen wurde eine antimikrobielle Wirkung nachgewiesen (Yang et al., 2003). Defensine und Cathelicidine wirken chemokinartig für unreife dendritische Zellen und Monocyten, rekrutieren T-Zellen (Yang et al., 2002) und regen Mastzellen zur Histaminfreisetzung an (Niyonsaba et al., 2001). Thrombocidine sind Spaltprodukte bestimmter Chemokine. KAMPs und Chemokine weisen also eine strukturelle Ähnlichkeit und eine funktionelle Überlappung auf (Durr and Peschel, 2002; Banyer et al., 2000). Allerdings ist noch unklar, ob KAMPs und Chemokine evolutiv miteinander verwandt sind (Yang et al., 2002; Yang et al., 2002).

1.2.2 Defensine

1.2.2.1 Einteilung und Vorkommen der Defensine und anderer KAMPs

KAMPs sind im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet und gehören zu den evolutiv ältesten Verteidigungsfaktoren der Immunabwehr, was auf ihre bedeutende Rolle schließen lässt. Trotz ihrer langen Geschichte gehören sie immer noch zu den natürlichen „Breitbandantibiotika“ gegen Bakterien, Pilze und Viren. Einige KAMPs werden von Bakterien produziert (gehören zu den Bakteriocinen) und sollen konkurrierende Mikroorganismen in ihrem Wachstum hemmen (Peschel, 2002).

Die Diversität der KAMPs in Aminosäuresequenz und Struktur ist bei den über 500 beschriebenen Verbindungen sehr groß, was eine Einteilung sehr schwierig macht. Das Gemeinsame an ihrer Struktur ist, dass alle, wenn sie aktiv sind, hydrophobe und kationische Aminosäuren in separaten Sektionen (meist in einer Schleife)

organisieren (amphiphiles Design) (Balla et al., 2004; Powers and Hancock, 2003; Zasloff, 2002). Manche, wie das lineare, α -helikale Magainin, bilden diese Struktur erst aus, wenn sie in die Membran eindringen (Mills and Holland, 2004). Defensine stabilisieren diese Struktur mit intramolekularen Disulfidbrücken und das tryptophanreiche Indolicidin organisiert seine hydrophoben und hydrophilen Seitenketten erst in Membrenumgebung in hydrophobe und hydrophile Bereiche. Mit diesen amphiphilen Eigenschaften können KAMPs mit den negativ geladenen Kopfgruppen sowie den hydrophoben Anteilen der bakteriellen Membran, ihrem Hauptangriffsziel, perfekt interagieren (Zasloff, 2002).

KAMPs zielen auf einen überraschenden, aber klaren, grundlegenden Unterschied im Design der Membranen von mehrzelligen Organismen und Bakterien. Bakterienmembranen sind so organisiert, dass die der Außenwelt zugewandten Seite hauptsächlich aus negativ geladenen Phospholipidkopfgruppen besteht. Im Gegensatz dazu besteht die äußere Seite der Membranen bei Tieren und Pflanzen aus Phospholipiden, die keine Nettoladung tragen. Phospholipide mit negativen Kopfgruppen (Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylinositol (PI)) befinden sich auf der cytoplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran. Die Anwesenheit von Cholesterin verringert generell die Aktivität der KAMPs, entweder durch Stabilisierung der Lipiddoppelschicht oder durch Interaktion mit dem Peptid (Zasloff, 2002). Auch die Ionenstärke spielt eine Rolle (Oppenheim et al., 2003). Viele KAMPs werden bei hohen Ionenstärken inaktiv, da sie die initiale Interaktion mit der Zielmembran schwächt (Ganz, 2001).

Humane KAMPs werden in drei Gruppen eingeteilt (Peschel, 2002) (Fig. 1):

- (1) **Defensine:** Sie haben eine rigide β -Faltblattstruktur, die durch drei Disulfidbrücken stabilisiert wird. Je nach Aminosäuremuster und Anordnung der Disulfidbrücken unterscheidet man α -Defensine (HNPs; in neutrophilen Granulozyten; Cryptidine (HD5-6) in Paneth Cells) (Ganz and Weiss, 1997; Cunliffe, 2003) und β -Defensine (hauptsächlich Körperoberflächen wie Epithelien der Nase, des Respirationstraktes, des Gastrointestinaltraktes und des Genitourinaltraktes) (Peschel and Collins, 2001; Nizet et al., 2001)
- (2) **Cathelicidine:** Unter Säugetieren weit verbreitet; beim Menschen kommt nur das LL-37 vor (Nizet and Gallo, 2003) (α -helikal; in neutrophilen Granulozyten und Epithelien).