

**Autophagie und *Staphylococcus aureus*
Pathogen-Wirtszell-Interaktion**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat

im Fachbereich Biologie

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Sonja Ariane Leggio

aus Köln

Köln 2008

**Berichtersteller/ Berichterstellerin: Prof. Dr. Martin Krönke
Prof. Dr. Jens Brüning**

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 23.04.2008

*Dedicata alla mia famiglia
e a tutti coloro che hanno
creduto in me.*

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	I
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	1
1.2 KLINISCHE RELEVANZ VON <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	1
1.3 VIRULENZFAKTOREN VON <i>S. AUREUS</i>	3
1.3.1 <i>Das agr-Zwei-Komponentensystem</i>	4
1.4 <i>S. AUREUS</i> ALS INTRAZELLULÄRES PATHOGEN	6
1.5 AUTOPHAGIE	7
1.5.1 <i>Autophagie und Bakterien</i>	8
1.5.2 <i>S. aureus Zytotoxizität und Autophagie</i>	11
1.5.3 <i>Ein Überblick der Autophagie in S. cerevisiae</i>	12
1.5.4 <i>Autophagie in Säugern</i>	13
1.6 DER AUTOPHAGIE INITIATIONSKOMPLEX ATG1-ATG13 IN <i>S. CEREVISIAE</i>	16
1.6.1 <i>Die Serin/Threonin Kinase ATG1</i>	19
1.7 ZIELSETZUNG.....	21
2 MATERIAL UND METHODEN.....	22
2.1 MATERIALIEN	22
2.1.1 <i>Kits</i>	22
2.1.2 <i>Medien, Lösungen und Puffer</i>	23
2.1.3 <i>Antikörper</i>	25
2.1.4 <i>Eukaryotische Zellen</i>	25
2.1.5 <i>Bakterienstämme</i>	25
2.1.6 <i>Molekularbiologische Substanzen</i>	26
2.1.7 <i>Oligonukleotide</i>	27
2.1.8 <i>Verbrauchsmaterialien und Geräte</i>	28
2.1.9 <i>Software und Datenbanken</i>	29
2.2 ZELLBIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE METHODEN	30
2.2.1 <i>Kultivierung der Bakterien</i>	30
2.2.2 <i>Kultivierung der eukaryotischen Zellen</i>	30
2.2.3 <i>Transkriptionelle Inhibition durch siRNA</i>	31
2.2.4 <i>In vitro Infektion</i>	32
2.2.5 <i>Induktion und Inhibition von Autophagie in transient transfizierten HeLa Zellen</i>	33
2.2.6 <i>Fluoreszenzmikroskopie</i>	33
2.2.7 <i>Gewinnung eukaryotischer, nukleifreier Totalzellextrakte und Proteinbestimmung</i>	34
2.2.8 <i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	34
2.2.9 <i>Western Blot und Immunodetektion</i>	35
2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHEN METHODEN	35
2.3.1 <i>RNA Isolation aus HeLa-Zellen</i>	35

2.3.2	Reverse Transkription der RNA in cDNA.....	36
2.3.3	Quantitative RT-PCR (Real-time-PCR)	36
2.3.4	Northern Blot Analyse.....	38
2.3.5	Microarray-Analyse.....	39
3	ERGEBNISSE.....	41
3.1	<i>S. AUREUS</i> INDUZIERT <i>AGR</i> -ABHÄNGIGEN WIRTSZELLTOD.....	41
3.2	TRANSKRIPTIONSANALYSE VON HELa-ZELLEN NACH INFEKTION MIT WILDTYP <i>AGR</i> ODER <i>AGR</i> -DEFIZIENTEN <i>S. AUREUS</i>	43
3.3	IDENTIFIKATION UND CHARAKTERISIERUNG VON ULK1, ULK2 UND ULK3	49
3.3.1	Expressionsanalyse der <i>ULK1</i> , <i>ULK2</i> und <i>ULK3</i> Transkripte in humanen Geweben.....	51
3.3.2	Quantifizierung der <i>ULK1</i> , <i>ULK2</i> und <i>ULK3</i> Gene in HeLa-Zellen.....	54
3.3.3	Hemmung der Expression von <i>ULK1</i> und <i>ULK2</i> durch RNA-Interferenz.....	55
3.4	HEMMUNG DER EXPRESSION VON ULK1 BZW. ULK1 UND ULK2 DURCH siRNA-INTERFERENZ FÜHRT ZUR INHIBITION VON AUTOPHAGIE IN HELa-ZELLEN.....	56
3.5	ULK1 UND ULK2 SIND FÜR DIE AUFNAHME VON <i>S. AUREUS</i> IN AUTOPHAGOSOMEN NOTWENDIG	60
3.6	<i>S. AUREUS</i> INDUZIERTER ZELLTOD VERLÄUFT ULK1 UND ULK2 ABHÄNGIG	62
4	DISKUSSION	64
4.1	TRANSKRIPTIONSPROFIL VON HELa-ZELLEN NACH INFEKTION MIT <i>S. AUREUS</i>	65
4.2	MENSCHLICHE ZELLEN HABEN DREI ZUM ATG1 DER HEFE HOMOLOGE GENE: ULK1, ULK2 UND ULK3	67
4.3	BETEILIGUNG VON ULK1 UND/ODER ULK2 AN DER AUTOPHAGIE	69
4.4	ULK1 UND ULK2 SIND ENTSCHEIDEND AM ZYTOTOXISCHEN EFFEKT VON INTRAZELLULÄREN <i>S. AUREUS</i> BETEILIGT.....	70
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	73
6	SUMMARY.....	74
7	REFERENZEN.....	75
8	ANHANG.....	83

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
Abb.	Abbildung
<i>agr</i>	<i>accessory gene regulator</i>
<i>agr</i> ^{-/-}	<i>accessory gene regulator</i> defizient
AIP	<i>Auto Inducing Peptide</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATG/AUT	Autophagiegen
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Collection</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Albumin aus Rinderserum
C-Domäne	Carboxy-Domäne
cDNA	Komplementäre DNA
CMA	Chaperon vermittelte Autophagie
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
Clf	<i>Clumping factor</i>
CnA	<i>Collagen Adhesin</i>
CP	<i>Crossing point</i>
cRNA	Komplementäre RNA
Cvt	<i>cytosol to vacuol targeting</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
EAP/MAP	<i>Extracellular matrix protein/MHC class II-analogous protein</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Efb	<i>Extracellular binding protein</i>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>

Abkürzung	Erklärung
FC	<i>Fold change</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FnBP	<i>Fibronectin Binding Protein</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
HeLa	Epithelialzelllinie aus Zervixcarcinom
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon-gamma
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasen
LAMP	<i>Lysosome-Associated Membrane Protein</i>
LB	Luria Bertani
LC3	<i>microtubule-associated protein light-chain3</i>
LTA	<i>Lipo Teichoic Acid</i>
MEF	Mausembryofibroblasten
MEM	<i>Modified Eagle's Medium</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
MRSA	Methicillin-resistente <i>S. aureus</i> Stämme
MSCRAMM	<i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
MTN	<i>Multiple Tissue Northern</i>
neg.	Negativ
OD	Optische Dichte
PAS	präautophagosomale Struktur
PBS	Phosphatpuffer
PE	Phosphatidylethanolamin

Abkürzung	Erklärung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PGN	Peptidoglykan
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphatidylinositol-3-phosphatkinase
PVL	Panton-Valentin-Leukocidin
qRT-PCR	<i>Quantitative real time PCR</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	<i>Real time PCR</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SDS	Natriumdodecansulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SpA	<i>Staphylococcal protein A</i>
SSC	Sodiumcitrat-Sodiumchlorid
TAE	Tris-Acetat -EDTA
TCS	<i>Two Component System</i>
TE	Tris-EDTA
TOR	<i>target of rapamycin</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFSS	<i>Type IV Secretion System</i>
TBST	Tweenhaltige Tris-gepufferte Salzlösung
TNE	Tris-Natrium -EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSST	<i>Toxic Shock Syndrome Toxin</i>
TTSS	<i>Type III Secretion System</i>
TSS	<i>Toxic Shock Syndrome</i>
ULK	unc-51-like Kinase

Abkürzung	Erklärung
UV	Ultraviolet
Vps	<i>vacuole protein sorting</i>
WA	Wortmannin
wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylokokken sind gram-positive, 0,8-1,2 µm große Kokken mit charakteristischer traubenförmiger Anordnung aus der Familie der *Staphylococcaceae*, die unbeweglich sind und keine Sporen bilden. Staphylokokken können unter verschiedenen Umweltbedingungen wachsen, am besten bei Temperaturen zwischen 30°C und 37°C. Mit seltenen Ausnahmen sind Staphylokokken fakultativ anaerob. Durch ihre hohe pH-Toleranz und ihre relative Resistenz gegen Austrocknung, UV-Strahlen und verschiedene Desinfektionsmittel können sie längere Zeit in der Umwelt überdauern. Staphylokokken sind beim Menschen und bei Säugetieren als Kommensalen der Haut und der Schleimhäute des Oropharynx weit verbreitet, sind aber potenziell pathogen.

Für *Staphylococcus aureus* ist der Mensch das Hauptreservoir. *S. aureus* kolonisiert weltweit 20-70% der Bevölkerung vorübergehend und etwa ein Drittel der Menschen dauerhaft ohne in diesen Trägern symptomatisch zu werden (Laupland et al., 2003).

1.2 Klinische Relevanz von *Staphylococcus aureus*

Die stetig ansteigende Zahl immunsupprimierter Patienten, der zunehmende Einsatz von Kathetern, Implantaten oder anderen Polymeroberflächen in der Medizintechnik und die Resistenzentwicklung gegen Antibiotika durch Mutation oder durch Erwerb von Resistenzgenen führte in den letzten zehn Jahren zu einer stetig steigenden klinischen Relevanz von *S. aureus* (Laupland et al., 2003; Livermore, 2000). *S. aureus* verursacht weltweit nosokomiale Infektionskrankheiten, aber auch als Erreger von außerhalb des Hospitalmilieus erworbenen Infektionskrankheiten (*community-acquired*) gewinnt *S. aureus* zunehmend an Bedeutung (Naimi et al., 2003). Die durch *S. aureus* verursachten Infektionen sind mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität behaftet und lassen sich in lokalisierte oder generalisierte pyrogene Infektionen und Toxin-vermittelte Erkrankungen einteilen (Lowy, 1998).

S. aureus verursacht in erster Linie Haut- und Weichteilinfektionen, wie Furunkel, Karbunkel, Pyodermie, Sinusitis oder Otitis media, aber auch tiefer gehende Infektionen, wie eitrige Parotitis, Mastitis puerperalis, und die primäre oder sekundäre Osteomyelitis. Des Weiteren kann eine Infektion mit *S. aureus* zu Atemwegsinfektionen bis hin zur Pneumonie, sowie durch eine Keimausschwemmung in die Blutbahn zu systemischen Erkrankungen, wie Endokarditis und Sepsis, führen.

Zu den Toxin-vermittelten Erkrankungen gehören die Lebensmittelintoxikation, welche durch die Staphylokokken-Enterotoxine A-O verursacht werden, sowie die staphylogene toxische epidermische Nekrolyse (Synonym: *staphylococcal scalded skin syndrome*), die durch die exfoliativen Toxine A und B verursacht wird. Eine lebensbedrohliche Erkrankung, die zum Multiorganversagen führen kann, stellt das Toxische Schocksyndrom (TSS, *toxic shock syndrom*) dar. TSS beruht auf der Superantigenwirkung des „Toxic-Shock-Syndrom“-Toxins-1 (TSST-1) und kann in seltenen Fällen auch von den Enterotoxinen B und C verursacht werden (Emori and Gaynes, 1993; Kass and Parsonnet, 1987; Köhler et al., 2001; Lowy, 1998). Ein weiteres Toxin-vermitteltes Krankheitsbild von *S. aureus* beruht auf dem Panton-Valentine-Leukozidin (PVL), welches in enger Assoziation mit dem Auftreten von Abszessen, Furunkeln, sowie einer eher seltenen, nekrotisierenden Pneumonie steht. Die Übertragung des PVL-Gens durch Bakteriophagen in einen Methicillin-resistenten *S. aureus* führte zur Entstehung eines Stammes, der sowohl ausgeprägt virulent als hochgradig resistent gegen Antibiotika ist (Prevost et al., 1995).

Der steigende Selektionsdruck durch unkritische Verabreichung von Breitbandantibiotika und durch ungenügende Hygienemaßnahmen führte zu einer steigenden Prävalenz von multiresistenten *S. aureus* Stämmen weltweit. Die Periode von der Einführung einer Antibiotikaklasse bis zum erstmaligen Nachweis einer resistenten *S. aureus*-Mutante dauert in der Regel weniger als vier Jahre – Ausnahme: Vancomycin 20 Jahre - und zeigt wie anpassungsfähig *S. aureus* ist.

Das erste gegen Staphylokokken eingesetzte β -Laktamase-stabile Antibiotikum war 1959 das Methicillin. Bereits ein Jahr später wurde der erste Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) Stamm nachgewiesen. Im Jahr 1976 waren nahezu alle *S. aureus* Stämme resistent gegen alle verfügbaren Penicilline, sowie gegen das Aminoglykosid Gentamycin. Seit 1997 sind erstmalig Stämme mit reduzierter Sensitivität gegenüber Glykopeptid-Antibiotika beobachtet worden, so dass heute

MRSA für „multiresistente *S. aureus*“ steht (Acar et al., 1970; Hiramatsu et al., 1997; Jevons, 1961; Shanson et al., 1976; Weigel et al., 2003).

1.3 Virulenzfaktoren von *S. aureus*

Zur Anpassung an den jeweiligen Wirt, bzw. das jeweilige Milieu verfügen pathogene Bakterienspezies über regulatorische Elemente, die es ihnen erlauben, in Reaktion auf die Umweltparameter ihre eigene Genexpression spezifisch zu verändern. Die Modulierbarkeit der Synthese fast aller untersuchten Virulenz- und Adhärenzfaktoren von *S. aureus* durch verschiedene Umweltparameter, z.B pH-Wert und Osmolarität, ist umfangreich untersucht worden. Andererseits sind Bedeutung und Abfolge der differentiellen Genexpression während der Kolonisation und der Infektion noch weitgehend unverstanden.

Die Spezies *S. aureus* umfasst Stämme, die unterschiedliche Virulenzfaktoren exprimieren und deshalb zu sehr unterschiedlichen Infektionskrankheiten führen können (Bayles et al., 1998; Crossley and Archer, 1997). Die Virulenzfaktoren von *S. aureus* befinden sich in der Zellwand oder werden in die Umgebung sezerniert. An der Oberfläche von *S. aureus* befinden sich Adhäsine, welche die Bindung an die extrazelluläre Matrix des Wirtes ermöglichen. Dadurch besitzt *S. aureus* die Fähigkeit, Materialien und Gewebe zu kolonisieren und damit eine solide Basis für die Invasion des Wirtes zu etablieren. Die Adhäsine gehören zu der heterogenen Familie der *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMM) (Mazmanian et al., 1999). Zu den MSCRAMM zählen Virulenzfaktoren wie *staphylococcal protein A* (SpA), *fibronectin-binding proteins* (FnBPs), *collagen adhesin* (CnA), sowie *clumping factors A/B* (ClfA und ClfB) (Foster and Hook, 1998). Eine weitere Gruppe von Virulenzfaktoren bilden die nicht-kovalent gebundenen Oberflächenproteine. Diese sind durch ionische Wechselwirkungen mit der bakteriellen Zellwand assoziiert. Hierzu gehören die Enzyme Enolase und Autolysin, sowie das multifunktionale *extracellular adherence protein/MHC class II-analogous protein* (Eap/MAP) Protein. Diese binden an verschiedene extrazelluläre Matrixproteine, wie Fibrinogen, Fibronektin und Vitronektin und sind ebenfalls an der

Adhäsion und Internalisierung von *S. aureus* in Wirtszellen beteiligt (Carneiro et al., 2004; Heilmann et al., 2005; Palma et al., 1999).

Zu den von *S. aureus* sezernierten Virulenzfaktoren gehören die porenbildenden Toxine (α -Toxin) und Leukozidine (γ -Hämolyisin, Panton-Valentin-Leukozidin und Leukozidine E-D). Sie verursachen durch Porenbildung in der eukaryotischen Plasmamembran den Tod der Wirtszelle. Um einer Opsonisierung zu entgehen, inaktiviert *S. aureus* mit den immuno-modulierenden Faktoren Staphylokinase und *extracellular binding protein* (Efb) den Komplementfaktor CD3b. Des Weiteren sezerniert *S. aureus* Proteine, die von der Wirtszelle eingesetzte antimikrobielle Peptide wie Lactoferrin und Aureolysin neutralisieren (Foster, 2005).

S. aureus nutzt somit sowohl als Einzelgen kodierte Virulenzfaktoren, z. B. Toxine, Koagulase und Protein A, als auch komplexe multifaktorielle Virulenzmechanismen, wie Adhäsion, Schleimproduktion oder Zytotoxizität (Day et al., 2001).

1.3.1 Das *agr*-Zwei-Komponentensystem

Eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion von Bakterien übernehmen die so genannten Zweikomponentensysteme (TCS, *two component system*). Bei *S. aureus* sind 16 TCSs bekannt, von denen vier (*agr*, *sae*, *srr* und *arl*) die Expression von Virulenzfaktoren beeinflussen (Giraud et al., 1997; Recsei et al., 1986; Yarwood et al., 2001).

Das *agr*-System ist ein „*quorum sensing*“-System, das beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase der Bakterien, ab einem Schwellenwert der Bakteriendichte von ca. $10^8 - 10^9$ Bakterien/ml aktiviert wird (Lyon et al., 2000). Sobald der intrazelluläre Effektor des *agr*-Systems RNAIII transkribiert wird, inhibiert *agr* die Produktion von Zellwand-assoziierten Bindeproteinen, wie zum Beispiel Protein A (SpA), während die Expression einiger sezernierter Proteine, wie z. B. α -Hämolyisin (hla) und anderer Proteasen aktiviert wird (Novick, 2003; Novick et al., 1993; Wolz et al., 2000).

Der *agr*-Lokus besteht aus zwei divergenten Transkriptionseinheiten, RNAII und RNAIII, die ausgehend von den Promotoren P2 und P3 transkribiert werden (Abb.1). RNAII kodiert vier Proteine: AgrA (I), AgrC (II), AgrD (III) und AgrB (IV). Das zyklische Oktapeptid „*auto-inducing-peptide*“ (AIP) entsteht durch die Modifizierung des

Vorläufers AgrD durch AgrB (Novick et al., 1995). Nach seiner Synthese und Sekretion akkumuliert AIP extrazellulär und bindet spezifisch an einen Transmembranrezeptor, die Sensorkinase AgrC. Diese Bindung führt zur Phosphorylierung von AgrC an einem Histidinrest. Dieser Phosphatrest wird anschließend auf den „response-regulator“ AgrA übertragen und dadurch aktiviert (Novick, 2003). Daraufhin bindet das aktivierte intrazelluläre Effektormolekül (AgrA) an die Interpromotorregion im *agr*-Lokus und führt zur Transkription von RNAII und RNAIII des *agr*-Systems (Koenig et al., 2004).

Durch Untersuchungen *in vitro* konnte gezeigt werden, dass *agr*-defiziente Stämme von *S. aureus* besser in die Wirtszelle eindringen als der Wildtyp.

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* sind *agr*-Mutanten weniger virulent als ihr isogener Wildtyp (Abdelnour et al., 1993; Cheung et al., 1994; Gillaspay et al., 1995); (Haslinger-Löffler et al., 2005; Wesson et al., 1998). In welcher Weise das *agr*-System die Zytotoxizität von *S. aureus* moduliert, ist bisher jedoch nicht bekannt.

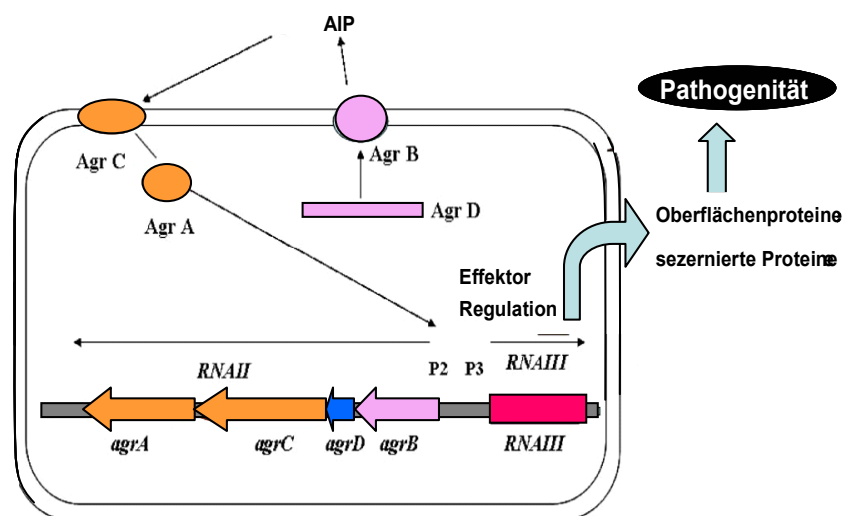


Abb.1 Das *agr*-System von *Staphylococcus aureus*

Schematische Darstellung des Quorum Sensing-Systems *agr* von *Staphylococcus aureus*. Erklärung im Text (nach Iwatsuki et al, 2006)

1.4 *S. aureus* als intrazelluläres Pathogen

Die von *S. aureus* verursachten Krankheiten sind häufig schwer zu behandeln. Die Beobachtung, dass Patienten nach einer Antibiotika-Therapie häufig einen Rückfall erleiden, ließ vermuten, dass *S. aureus* Strategien entwickelt hat, um intrazellulär zu persistieren (Garzoni et al., 2007; Kauffman et al., 1993; Powers et al., 1990).

S. aureus wurde bis Ende der Neunziger Jahre als typisch extrazelluläres Pathogen klassifiziert (Finlay and Cossart, 1997; Lowy, 2000). Vielfache Untersuchungen zeigten jedoch, dass *S. aureus* in nicht-professionelle Phagozyten, wie z. B. Epithelzellen (Almeida et al., 1996; Kahl et al., 2000), Endothelzellen (Ogawa et al., 1985), Fibroblasten (Sinha et al., 1999), Keratinozyten (Nuzzo et al., 2000) und Osteoblasten (Bayles et al., 1998) eindringen kann. Der Internalisierungsmechanismus von *S. aureus* basiert auf einer Brückenbildung zwischen den bakteriellen Fibronektin-bindenden Proteinen A und B (FnBPA; FnBPB) mit Fibronektin der Wirtszelle am Integrinrezeptor $\alpha 5\beta 1$ (Dziewanowska et al., 2000; Massey et al., 2001; Sinha et al., 1999).

Die intrazelluläre Lokalisation kann für das Bakterium von Vorteil sein, weil es dort den Abwehrmechanismen des Wirts entkommt und vor der Wirkung extrazellulärer Antibiotika geschützt ist (Bayles et al., 1998; Hamill et al., 1986; Menzies and Kourteva, 1998). Die intrazelluläre Lokalisation wurde außer für Labor-Stämme auch für klinische Isolate nachgewiesen (Krut et al., 2003; Sinha et al., 1999). Nach der Internalisierung variiert das intrazelluläre Verhalten von *S. aureus* je nach Bakterienstamm und Wirtszelle: Persistenz, schnelles Ausbrechen aus zellulären Vesikeln oder die Fähigkeit sich innerhalb der Vesikel zu vermehren wurden beobachtet (Bantel et al., 2001; Bayles et al., 1998; Kahl et al., 2000; Wesson et al., 1998). Intrazelluläre *S. aureus* können zum Tod der Wirtszelle führen. Untersuchungen zum intrazellulären Verhalten von *S. aureus* und dadurch verursachten Wirtszelltod führen zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen, so dass der Mechanismus des Zelltodes kontrovers diskutiert wird: So können mit *S. aureus* infizierte Wirtszellen durch nekrotischen oder apoptotischen Zelltod sterben. Eine Reihe von Faktoren scheinen an dem durch *S. aureus* verursachten Zelltod beteiligt zu sein, jedoch ist ihre jeweilige Rolle bisher noch nicht eindeutig definiert (Essmann et al., 2003; Garzoni et al., 2007; Haslinger-Löffler et al., 2005;

Haslinger-Löffler et al., 2006; Menzies and Kourteva, 1998; Sinha and Herrmann, 2005).

Neue Daten zeigen, dass Wildtyp *agr S. aureus* Stämme die Fähigkeit besitzen, aus Endophagosomen in den autophagosomalen Weg überzutreten. *S. aureus* nutzt die Autophagosomen als intrazelluläre Replikationsnische. Mit *S. aureus* beladene Autophagosomen reifen nicht weiter zu Autolysosomen. *S. aureus* repliziert in den Autophagosomen, bricht aber später aus diesen ins Zytoplasma aus und induziert dann den Wirtszelltod (Schnaith et al., 2007).

1.5 Autophagie

Ashford und Porter beobachteten 1962 in humanen Leberzellen das Phänomen der „Selbst-Verdauung“: Zytoplasmatische Anteile werden von einem atypischen Lysosom umhüllt und abgebaut. (Ashford and Porter, 1962; Levine and Klionsky, 2004).

In eukaryotischen Zellen sind zwei Abbauewege für Proteine bekannt. Im Ubiquitin-Proteasom-Weg werden kurzlebige Proteine degradiert, während der Abbau von langlebigen Proteinen und ganzen Organellen durch Autophagie erfolgt. Autophagie ist eine zelluläre Reaktion auf unterschiedliche Stress-Situationen, wie u. a. Nährstoffmangel oder oxidativen Stress. (Codogno et al., 1997; Mortimore and Poso, 1986). Dabei werden drei Varianten der Autophagie unterschieden: Mikroautophagie, Makroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA). Die Letzte führt zum Verdau von den durch das Pentapeptid „KFERQ“ gekennzeichneten zytosolischen Proteinen. Bei der Mikroautophagie werden kleine Bestandteile des Zytoplasmas (Peroxisomen und sogar Teile des Nukleus) direkt über Invagination von lysosomalen Membranen umschlossen und durch lysosomale Hydrolasen degradiert. Anschließend werden die Abbauprodukte ins Zytoplasma abgegeben. Bei der Makroautophagie (meist einfach Autophagie abgekürzt) werden zytosolische Bestandteile, wie langlebige Proteine oder Organellen durch Autophagosomen umschlossen, vom Zytosol abgesondert, lysosomal verdaut und recycelt (Dunn, 1994).

Die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase zählt zur Hauptaufgabe der Autophagie und ist daher konstitutiv auf basalem Niveau in allen Zelltypen mit lysosomalen Kompartimenten vorzufinden. Autophagie spielt in physiologischen Prozessen, wie Zelldifferenzierung, Gewebeumbildungen und Zelltod (programmierter Zelltod Typ II) eine Rolle. Weiterhin wird ihr eine Rolle bei Krebs, an der Alterung, neurodegenerativen Krankheiten wie z.B. Alzheimer oder Parkinson und Kardiomyopathien zugeschrieben. Im Immunsystem ist Autophagie an der Antigenpräsentation, Elimination intrazellulärer Krankheitserreger oder toxischen Metaboliten beteiligt (Klionsky, 2004; Levine and Klionsky, 2004; Meijer and Codogno, 2004; Ogier-Denis and Codogno, 2003; Yorimitsu and Klionsky, 2005).

1.5.1 Autophagie und Bakterien

In Säugern spielt Autophagie eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunabwehr gegen intrazelluläre Pathogene, wie Bakterien und Viren (Kirkegaard et al., 2004). Um der Zellabwehr zu entgehen haben einige Bakterien verschiedene Strategien entwickelt, durch welche sie dem endophagosomalen Weg entgehen und ins Zytoplasma übertreten können. Normalerweise werden diese Bakterien von Autophagosomen umhüllt und anschließend in den Autolysosomen inaktiviert und abgebaut (Abb. 2). Ein Beispiel dafür ist *Streptococcus pyogenes*, welcher die Membran des Phagosoms, in dem es eingeschlossen ist, durch Streptolysin A zerstört und ins Zytoplasma gelangt. Dort wird er in Autophagosomen aufgenommen und degradiert (Nakagawa et al., 2004). Ähnlich erfolgt die Eliminierung von *Mycobacterium tuberculosis* in murinen wie auch in humanen Makrophagen. Durch Inhibierung der Phagosomenreifung kann das Bakterium die Zerstörung durch lysosomale Proteasen entgehen. Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion von Autophagie durch Zugabe von Rapamycin oder IFN- γ zur Kolokalisation der mit Mykobakterien beladenen Vesikel und dem Autophagosomenmarker LC3 führt. Im Autophagolysosom werden die Mykobakterien schließlich abgebaut (Gutierrez et al., 2004).

Im Gegensatz zu den oben genannten Bakterien gibt es jedoch intrazelluläre Pathogene, die der autophagischen Wirtszellabwehr entweichen können. Dazu

gehören u. a. *Shigella flexneri*, *Lysteria monozytogenes* und *Rickettsia conorii*. *Shigella flexneri* besitzt an der Oberfläche dem Faktor VirG, an den das autophagosomale Protein ATG5 bindet und so mit autophagosomalen Membranen assoziiert. Durch das (*type III secretion system*) TTSS sezerniert *S. flexneri* gleichzeitig mit dem Faktor VirG das Effektorprotein IcsB, das eine stärkere Affinität zu VirG hat und somit die Bindung zwischen ATG5 und VirG inhibiert (Ogawa et al., 2005). *L. monozytogenes* kann aus den Phagosomen ins Zytoplasma ausbrechen und durch die bakteriellen Phospholipasen, Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C und Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C, das Autophagosom zerstören. Durch Chloramphenicol metabolisch inaktive *L. monozytogenes* hingegen werden in Autophagosomen eliminiert (Py et al., 2007; Rich et al., 2003).

Andere intrazelluläre Bakterien, wie *Coxiella burnetii*, *Legionella pneumophila*, *Porphyromonas gingivalis* und *Brucella abortus* nutzen das Autophagosom zum Überleben und zur Replikation in der Wirtszelle. Diese Bakterien besitzen Typ IV Sekretionssysteme, durch welche sie in der Lage sind, zelluläre Prozesse zu unterlaufen und so ihr intrazelluläres Kompartiment zu modifizieren. *C. burnetii* lebt und repliziert in sauren, hydrolasereichen Kompartimenten, die über den Autophagieweg gebildet werden. Ebenfalls zeigt *L. pneumophila* die Fähigkeit in sauren Autophagosomen zu überleben, die positiv für LAMP-1 und Cathepsin D sind. Demgegenüber fusionieren mit *P. gingivalis* und *B. abortus* beladene phagoendosomale Vesikel mit späten Autophagosomen. Die entstehenden Vesikel sind negativ für LAMP-1 und v-ATPase und werden von den Bakterien zur Vermehrung genutzt (Dorn et al., 2001; Dorn et al., 2002; Gutierrez et al., 2005; Ogawa and Sasakawa, 2006; Pizarro-Cerda et al., 1998; Sturgill-Koszycki and Swanson, 2000).

Die angewandten Strategien der o. g. Bakterien sind erst kürzlich auch bei *S. aureus* beobachtet worden. Obwohl Gram-positive Bakterien keine vergleichbaren Sekretionssysteme wie Gram-negative Bakterien haben, kann *S. aureus* dennoch wirtszelleigene Kompartimente modifizieren und Autophagosomen zur intrazellulären Replikation nutzen (Schnaith et al., 2007).

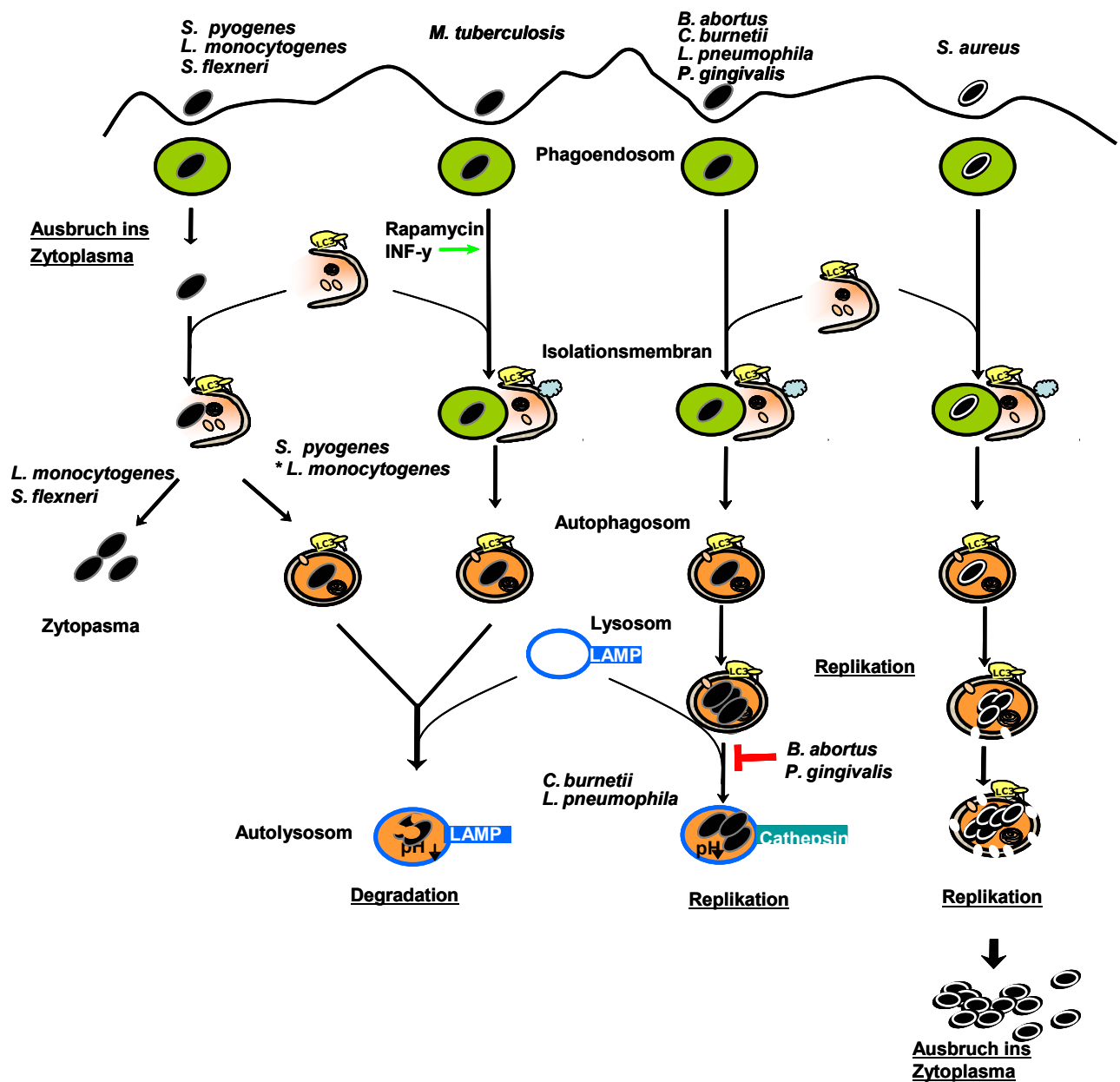


Abb.2 Autophagie und Bakterien: Verhaltensmuster von Bakterien im autophagosomalen Weg.

**L. monocytogenes* durch Chloramphenicol metabolisch inaktiviert. (Modifiziert nach: Schnaith, Autophagie und Wirtszellapoptose-Überlebensstrategien von *S. aureus*, Dissertation 2007)

1.5.2 *S. aureus* Zytotoxizität und Autophagie

Verschiedene Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* haben gezeigt, dass eine Infektion mit *S. aureus* abhängig vom Zelltyp und *S. aureus* Stamm unterschiedlich verlaufen kann.

Während einige intrazelluläre Stämme von *S. aureus* nach der Invasion den Wirtszelltod induzieren, persistieren andere in den Zellen ohne diese zu töten bis die Bakterien schließlich über den phagoendosomal Weg eliminiert werden. Aufgrund der unterschiedlichen Verhaltensmuster wird *S. aureus* in zwei Kategorien eingeteilt: Die zytotoxischen und die nicht-zytotoxischen *S. aureus* Stämme (Krut et al., 2003).

Neue Untersuchungen zeigen, dass für diese Dichotomie das *agr*-System verantwortlich ist. Es ist aber noch unklar, welche vom *agr*-System regulierten Virulenzfaktoren für die Induktion des Wirtszelltodes durch *S. aureus* verantwortlich sind. Mikroskopische Untersuchungen der intrazellulären Lokalisation von *S. aureus* zeigten, dass wt *S. aureus* Stämme mit Autophagosomen interagieren und anschließend den Wirtszelltod induzieren. Der zytotoxische *S. aureus* gelangt in der Wirtszelle in den endophagosomalen Weg und geht von Rab7-positiven Phagoendosomen in Autophagosomen über. *S. aureus* blockiert die Reifung der Autophagosomen zu Autolysosomen und die damit verbundene phago-lysosomale Fusion. Demzufolge bleibt die Akkumulation des spät endosomal/lysosomalen Markers, LAMP-2 und die Senkung des pH-Werts in *S. aureus* beladene Autophagosomen aus. *S. aureus* nutzt das Autophagosom als Replikationsnische. Nach der Replikation gelangt *S. aureus* ins Zytoplasma und induziert den Tod der Wirtszelle. *Agr*-defiziente *S. aureus* werden hingegen bereits in Phagolysosomen inaktiviert und abgebaut (Schnaith et al., 2007).

Die Methode der Microarray-Analyse eröffnet die Möglichkeit den funktionellen Zusammenhang zwischen *agr*, Autophagie und Wirtszelltod zu charakterisieren, in dem die Reaktionen der Wirtszelle auf Transkriptionsebene untersucht werden.

1.5.3 Ein Überblick der Autophagie in *S. cerevisiae*

In den letzten fünfzehn Jahren wurde der molekulare Mechanismus der Autophagie und die dazugehörigen „*AuTophagy-related*“ (ATG) Gene umfangreich in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht (Takeshige et al., 1992; Tsukada and Ohsumi, 1993).

Autophagie besteht aus mehreren Schritten und wird durch verschiedene Stimuli, wie z.B. Aminosäuremangel (*Starvation*), Stress oder durch Rapamycin pharmakologisch induziert (Abb.3).

In der Hefe wird die Induktion der Autophagie über den von *target of rapamycin* (TOR) regulierten ATG1-ATG13-Kinase-Komplex kontrolliert. Darüber hinaus sind weitere ATG Proteine, wie ATG 11, 17, 20, 24, 29 und 31 an der Induktion beteiligt. Nach der Induktion erfolgt die Autophagosomenbildung durch eine aufeinander abgestimmte Interaktion der ATG Proteine an der präautophagosomalen Struktur (PAS). Die PAS, dessen Ursprung noch unklar ist, wird als Plattform für die Autophagosomenbildung beschrieben. Sie besteht aus einer Vesikel bildenden Struktur und den ATG Proteinen. An der Vesikelbildung (Nukleation) sind die Proteine ATG6, ATG14, Vps15 und Vps34, sowie die Intramembranproteine ATG9, ATG23 und ATG27 beteiligt. Durch Elongation der präautophagosomalen Struktur entsteht die Isolationsmembran. Dieser Schritt beruht auf der Interaktion von ATG1, ATG2, ATG11, ATG13 und ATG18. An der Isolationsmembran sind ATG 11 und 19 für die Rekrutierung und Umschließung von Zytosol und anderen Bestandteile zuständig, während für die Elongation der Membran zwei koordinierte Konjugationssysteme (ATG5-12-16 und ATG8-PE), sowie ATG7, ATG10 und ATG11 verantwortlich sind. Das fertige Autophagosom fusioniert schließlich mit dem Lysosomen zum Autolysosom. Im Autolysosom wird die autophagosomale Membran durch das ATG15-Protein abgebaut. Das ATG22 ist am Recycling der einzelnen Bestandteilen ins Zytoplasma beteiligt (Epple et al., 2001; Huang and Klionsky, 2007; Legakis et al., 2007; Yang et al., 2006).

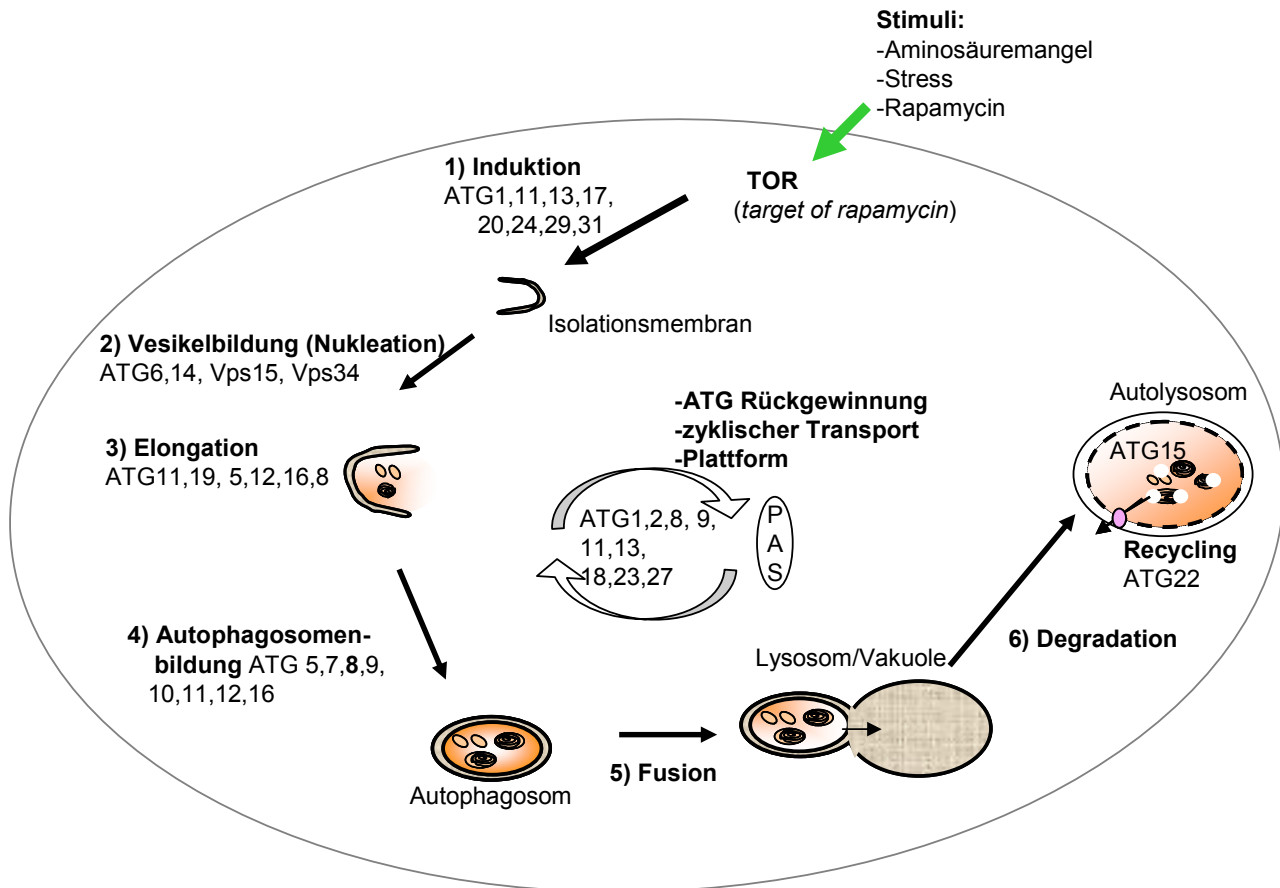


Abb.3 Schematischer Überblick über die Autophagie in *Saccharomyces cerevisiae*.

Die Autophagie in *Saccharomyces cerevisiae* kann wie andere subzelluläre Transportprozesse in die Schritte: Induktion (1), Vesikelbildung (2), Elongation der Isolationsmembran (3), Autophagosombildung (4), Fusion von Autophagosom und Lysosom (5) und Degradation des Inhaltes im Autolysosom (6), unterteilt werden. Die Aktivierung der Autophagie erfolgt durch Stimuli, wie Aminosäuremangel, Stress oder durch den Autophagie-Induktor Rapamycin (grüner Pfeil). PAS, präphagosomale Struktur; ATG, Autophagiegene.

Weitere Erklärungen im Text (Modifiziert nach Ju Huang and Klionsky, 2007).

1.5.4 Autophagie in Säugern

Autophagie ist ein evolutionär hochkonservierter Prozess, der in Eukaryoten, wie Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*), Schleimpilzen (*Dictyostelium discoideum*), Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*), Nematoden (*Caenorhabditis elegans*), Fliegen (*Drosophila melanogaster*) und Säugern (z. B. *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Homo sapiens*) erhalten ist (Levine and Klionsky, 2004; Meijer and Codogno, 2004; Pattingre et al., 2005). Zu den meisten oben beschriebenen ATG Genen der Hefe

gibt es Homologe in den höheren Eukaryoten. Aufgrund dieser Homologie konnte die Aufklärung des molekularen Mechanismus der Autophagie in Säugertieren teilweise von der Hefe abgeleitet werden (Mizushima et al., 2002).

Die Inhibition von mTOR durch Dephosphorylierung führt zur Aktivierung der Autophagie-Signalkaskade. Die Aktivierung von Autophagie erfolgt wie bei der Hefe durch die verschiedenen Stimuli, wie Aminosäuremangel, Stress oder pharmakologisch durch Rapamycin.

Die Serin/Threonin-Kinase *mammalian target of rapamycin* (mTOR) reguliert negativ Autophagie. mTOR ist nicht nur das Schlüsselenzym für den Ablauf von Autophagie, da es auch in mehreren anderen physiologischen Prozessen, wie Transkription, Translation und Organisation des Zytoskeletons beteiligt ist. Die Regulierung von mTOR kann über verschiedene Signaltransduktionswege erfolgen. Der Insulin-Akt-Weg ist eines der Signalnetzwerke, die an der Regulierung von mTOR beteiligt sind. Am Insulinrezeptor stimulieren Insulin oder Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren die Signalkaskade, die zur Aktivierung vom *insulin receptor substrate 1* (IRS1) und der Phosphatidylinositol-3-phosphatkinase (PI3K) führt. Darauf hin folgt die Rekrutierung von Akt zur Plasmamembran mit anschließender Dephosphorylierung von mTOR durch Akt (Corradetti and Guan, 2006) (Abb.4).

Die Autophagosomenbildung scheint auf so genannten präautophagosomalen Strukturen (PAS) zu basieren, deren Ursprung nicht bekannt ist. Die Klasse III Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K/Hefe Vps34) und dessen Bindungspartner Beclin-1/Hefe ATG6 sind anfänglich als Komplex an der Rekrutierung von Proteinen am PAS, die für die Biogenese der Autophagosomen benötigt werden, beteiligt (Mizushima et al., 2002). Daher kann Autophagie durch die PI3K-Inhibitoren 3-Methyladenin oder Wortmannin unterdrückt werden.

Weiter ist über die Initiation von Autophagie nach der Inaktivierung von mTOR und bis zur Bildung der so genannten Isolationsmembran in Säugern auf molekularer Ebene wenig bekannt.

Demgegenüber ist die Elongation der Isolationsmembran gut beschrieben. Sie läuft wie bei der Hefe über zwei kovalent gebundene, koordinierte Konjugationssysteme den ATG5-ATG12 Komplex und den LC3-PE Komplex ab.

Die Bildung des ATG5-ATG12 Komplexes erfolgt durch ein E2-Ubiquitin-Konjugationsenzym/Hefe ATG10 und ein E1-Ubiquitin-Aktivierungsemzym/Hefe ATG7. Der ATG12-ATG5 Komplex wird schließlich durch die Bindung von

ATG16L vervollständigt. Nach der Elongation der Isolationsmembran dissoziiert der ATG5-ATG12 x ATG16L-Komplex vom fertigen Autophagosom.

Die Bildung des ATG12-ATG5-Konjugats ist Voraussetzung für die Membranrekrutierung von (*microtubule-associated protein light-chain 3*) LC3/Hefe ATG8. Bei der Konjugation von LC3 an Phosphatidylethanolamin (PE) wird zytosolisches LC3 am C-terminalen Glycin durch die Endopeptidase ATG4 proteolytisch gespalten (LC3I), über das E2-Ubiquitin-Konjugationsenzym/Hefe ATG3 und das E1-Ubiquitin-Aktivierungsemzym/Hefe ATG7 an PE gebunden und schließlich an die Isolationsmembran gebunden (LC3II) (Kabeya et al., 2000; Yorimitsu and Klionsky, 2005). Das gebundene LC3-PE (LC3 II) befindet sich auf der inneren und äußeren Membran des Autophagosoms und bleibt an der Membran von der Bildung bis zur autophagolysosomalen Zerstörung des Autophagsoms gebunden (Mizushima, 2004; Mizushima et al., 2002). Das Autophagosom fusioniert mit Vesikeln des Endozytoseweges. Das entstandene intermediäre Autophagosom fusioniert anschließend weiter mit Lysosomen zum Autolysosom. In Autolysosomen wird die innere autophagosomale Membran degradiert und der Inhalt verdaut. Es entsteht ein Autolysosom mit einfacher Membran. Dieses ist mit bekannten lysosomalen Markern, wie LAMP1/2 oder Cathepsin dekoriert (Yorimitsu and Klionsky, 2005).

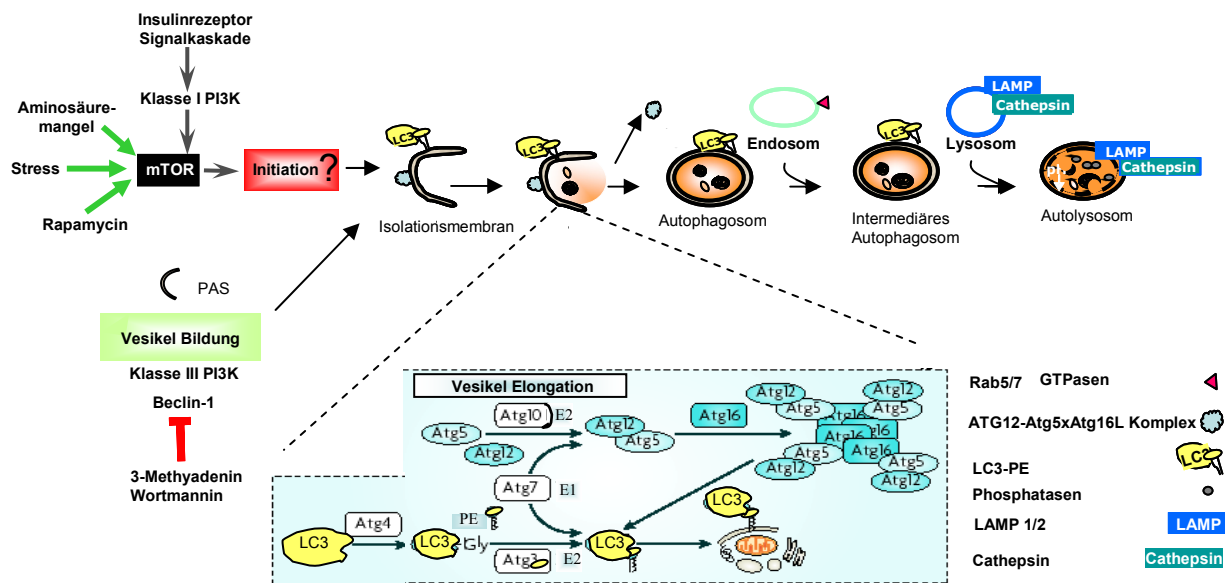


Abb. 4 Der Autophagieweg in Säuetieren

Aminosäuremangel und Rapamycin führen zur Aktivierung von Autophagie. Induktion, Entstehung und Reifung der Autophagosomen. Autophagie-Initiation (grün), Autophagie-Inhibition (rot). Weitere Erklärungen im Text (Modifiziert nach Kirkegaard et al, 2004 und Maiuri et al, 2007).

1.6 Der Autophagie Initiationskomplex ATG1-ATG13 in *S. cerevisiae*

In *S. cerevisiae* existieren verschiedene Vesikeltransportwege über welche die Zelle zytoplasmatisches Material abbauen kann. Der *cytosol to vacuol targeting* (Cvt-) und der autophagosomale Weg. Der Cvt-Weg hat einen ähnlichen Mechanismus und teilt wichtige Komponenten mit der Autophagie, findet aber im Gegensatz zur Autophagie unter Wachstumsbedingungen statt.

Obwohl sich die Autophagosomen von den Cvt-Vesikeln in Größe, Inhalt und in den meisten Komponenten die an der Vesikelbildung beteiligt sind unterscheiden, ist der Verlauf beider Wege sehr ähnlich. Darüber hinaus überlappen einige molekulare Komponenten des Autophagieweges mit denen des Cvt-Weges (Baba et al., 1997; Klionsky and Ohsumi, 1999; Scott et al., 1997).

So wird die Initiation beider Wege durch die Serin/Threonin Proteinkinase ATG1 und das Phosphoprotein ATG13 gesteuert (Kamada et al., 2000; Matsuura et al., 1997) (Abb.5). Neben den ATG1 und ATG13 Proteinen sind an der Initiation des Cvt-Weges Vac8, ATG20 und ATG24 beteiligt, während die Autophagie-Induktion über die Interaktion von ATG1, ATG13 und ATG17 erfolgt (Cheong et al., 2005; Kabeya et al., 2005; Scott et al., 2000). Die Inhibition von ATG1 führt zur Hemmung beider Wege (Harding et al., 1995; Kamada et al., 2000; Matsuura et al., 1997; Straub et al., 1997).

Der Autophagieprozess wird negativ durch die Phosphatidylinositolkinase-verwandte Serin/Threonin Kinase TOR kontrolliert. Unter nährstoffreichen Bedingungen ist die aktivierte TOR-Kinase an der Regulation unterschiedlicher Wachstumssignalwege beteiligt. Außerdem hyperphosphoryliert TOR unter aminosäurereichen Bedingungen ATG13. Durch die Hyperphosphorylierung von ATG13 wird die Interaktion von ATG13 mit ATG1 gehemmt (Kamada et al., 2000), so dass ATG13 und ATG1 zwei getrennte Komplexe bilden, die wiederum den Cvt-Weg steuern und Autophagie hemmen.

Demgegenüber führt die Inhibierung von TOR zur partiellen Dephosphorylierung von ATG13 und zur Autophosphorylierung von ATG1. Durch die Bindung von ATG17 am dephosphorylierten ATG13 wird der sich bildende ATG1-ATG13-Komplex stabilisiert, welches Autophagie induziert (Funakoshi et al., 1997; Kabeya et al., 2005; Kamada et al., 2000; Matsuura et al., 1997). Eine weitere wichtige Rolle spielt der ATG1-ATG13 Komplex in der Kontrolle der zellulären Lokalisierung, Anordnung, Rückgewinnung und zyklischen Transports von verschiedenen ATG Proteinen, wie ATG2, ATG8, ATG9, ATG11, ATG18, ATG23 und ATG27. Beispielsweise ist der Komplex für die Lokalisation von ATG11 an der PAS zuständig (Legakis et al., 2007; Reggiori et al., 2004; Shintani et al., 2001; Suzuki and Ohsumi, 2007; Yorimitsu and Klionsky, 2005).

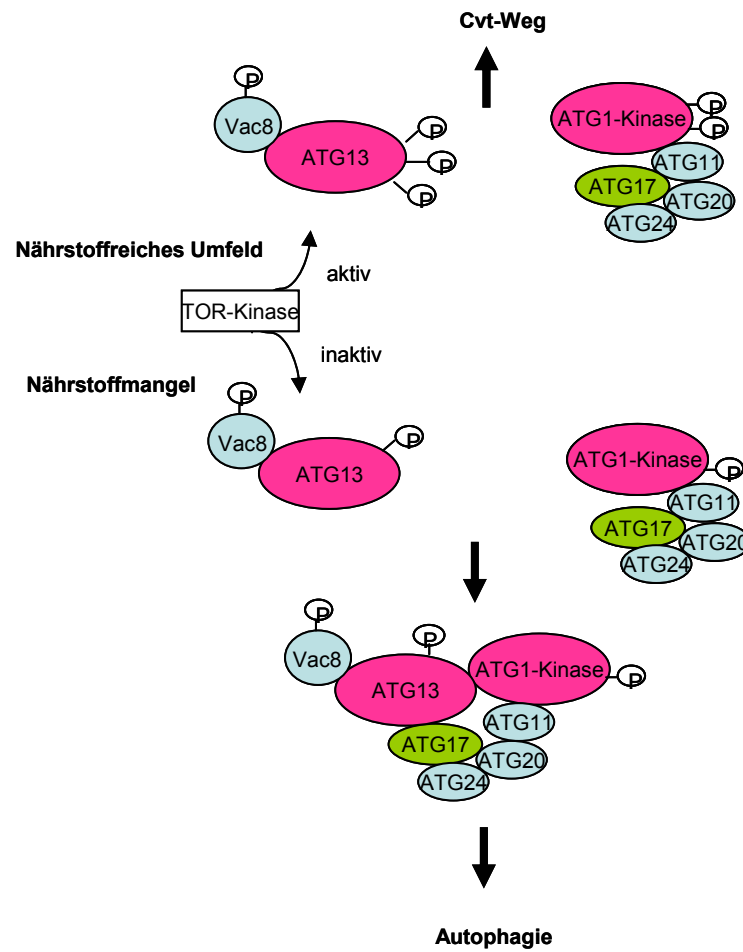


Abb. 5 Schematische Darstellung des ATG1-ATG13 Initiationskomplexes

Komponenten benötigt für die Autophagie in grün, für den *Cytoplasm-to-Vacuole Transport* (Cvt)-Weg in blau oder für beide Wege in pink, dargestellt. Unter Nährstoffmangel wird TOR inaktiviert und durch die Bildung des ATG1-ATG13-Initiationskomplex Autophagie induziert. Im nährstoffreichen Umfeld ist TOR aktiv, ATG13 wird nicht dephosphoriliert und der Cvt-Weg wird konstitutiv durchgeführt. Weitere Erklärungen im Text (Modifiziert nach Yorimitsu et al, 2005 und Khalfan et al, 2007).

1.6.1 Die Serin/Threonin Kinase ATG1

Der Serin/Threonin Kinase ATG1 wurde eine Schlüsselrolle in der Initiation von Autophagie zugeschrieben (Meijer and Codogno, 2004; Neufeld, 2007; Yorimitsu and Klionsky, 2007; Yorimitsu et al., 2006). ATG1, auch als AUT3 oder CVT10 benannt, ist die erst entdeckte Proteinkomponente des Autophagieweges (Matsuura et al., 1997). ATG1 ist im Zytosol lokalisiert und kodiert für ein Protein von 897 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 102 kDa. Das Protein besteht aus drei Domänen; der Amino-terminalen Region, der Serin-reichen Region und der Carboxy-terminalen Region. Die Amino-terminale Region weist eine hohe Sequenzhomologie mit Amino-terminalen Domänen anderer Serin/Threonin Kinasen auf. Dagegen wurde bislang der Carboxy-terminalen Region keine Funktion zugeordnet. Es wurde auch keine sequenzielle Homologie mit anderen Proteinen in Datendank-Analysen gefunden. Die Serin-reiche Region (Aminosäure 495-526) könnte als Region für die Phosphorylierung oder Autophosphorylierung dienen (Matsuura et al., 1997; Straub et al., 1997; Thumm and Gotz, 1997).

Bei *S. cerevisiae* wird durch Aminosäurenmangel die Kinaseaktivität von ATG1 induziert, welche essentiell für den Ablauf der Autophagie ist (Kabeya et al., 2005; Kamada et al., 2000). *S. cerevisiae* ATG1-Nullmutanten überleben im nährstoffreichen Medium, während sie im Minimalmedium sterben. Weiterhin wurde in diesen Mutanten die Hemmung des Autophagieweges beobachtet (Straub et al., 1997).

ATG1 Homologe und ihre Schlüsselrolle in der Autophagie wurden ebenfalls in Modellorganismen, wie *Caenorhabditis elegans* (*unc-51*), *Dictyostelium discoideum* (*DdAtg1*) und *Drosophila melanogaster* (*CG10967*) nachgewiesen (Melendez et al., 2003; Otto et al., 2004; Scott et al., 2004).

Andere Komponenten des Initiationskomplexes, wie das ATG17 bzw. ATG13 oder ihre Homologe konnten bislang in Säugern nicht nachgewiesen werden. Das ATG17 wurde bisher nur in Pilzen, während ATG13 in Pilzen und Pflanzen identifiziert werden konnte (Meijer et al., 2007; Seay et al., 2006).

Trotz der zahlreichen Publikationen zu Struktur und Funktionsweise von ATG1 zeigt sich letztlich immer noch ein begrenztes Wissen über den eigentlichen Induktionsmechanismus von Autophagie, vor allem in Säugetieren. Bislang wurden zwei ATG1 Homologe in Säugetieren, „UNC-51-like kinase“ 1 (ULK1) und „UNC-51-

like kinase“ 2 (ULK2) identifiziert (Kuroyanagi et al., 1998; Yan et al., 1998; Yan et al., 1999). Beide ULK Proteine zeigen eine hohe Sequenzhomologie in der Kinase Domäne zu ATG1 von *S. cerevisiae*.

Welche Funktionen ULK1 und ULK2 im Autophagieweg ausführen, ob sie jeweils eine individuelle oder eine redundante Funktion ausüben, ist noch nicht geklärt. Darüber hinaus ist eine funktionelle Rolle der ULK Proteine im Bezug auf die Zytotoxizität von wt *agr S. aureus* ebenfalls ungeklärt, jedoch von großem Interesse.

1.7 Zielsetzung

Infektionsstudien von *S. aureus* zeigen, dass einige intrazelluläre Wildtyp *S. aureus* Stämme mit intaktem *agr*-System nach der Invasion nicht-professioneller Phagozyten den Wirtszelltod induzieren, während *agr*-defiziente *S. aureus* Stämme, ohne die Wirtszellvitalität zu beeinflussen, in den Zellen persistieren bis sie schließlich über den phagoendosomal Weg eliminiert werden. Neue Untersuchungen zeigen, dass zytotoxische wt *agr* *S. aureus* nach Invasion in den autophagosomalen Weg gelangen, die Autophagosomen zur intrazellulären Replikation nutzen und den Wirtszelltod induzieren.

In dieser Arbeit sollte das Transkriptionsprofil nicht-professioneller Phagozyten nach Infektion mit zytotoxischem wt *agr* *S. aureus* durch Microarray-Analyse ermittelt werden, um Gene zu identifizieren, die eine Funktion an dem von *S. aureus* induzierten Autophagie-abhängigen Wirtszelltod haben.

Eine mögliche Rolle der Kandidaten an der Autophagie-Initiation sollte durch siRNA Interferenz-Untersuchungen bestätigt werden.

In diesem Zusammenhang sollte schließlich die Funktion der Kandidaten auf die intrazelluläre *S. aureus*-Zytotoxizität geklärt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Chemikalien wurden falls nicht gesondert erwähnt, in p. a. Qualität von Merck, Sigma oder Roth bezogen. Enzyme wurden von Fermentas mit den vom Hersteller mitgelieferten Puffern verwendet. Es wurde generell mit sterilen Medien und Materialien gearbeitet. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert (Porendurchmesser 0.2 μm), hitzestabile Lösungen wurden autoklaviert (121 °C, 1 atü, 20 min). Alle Lösungen wurden mit deionisiertem, zweifach destilliertem Wasser aus der EASYpure[®] UV/UF Reinstwasseranlage (Werner Reinstwassersysteme, Leverkusen) angesetzt. Die Hersteller hier nicht aufgeführter Materialien sind jeweils im Text aufgeführt.

2.1.1 Kits

Bezeichnung	Hersteller
ECL Detection Reagent Kit	Amersham Pharmacia
SYBR-Green I	Roche
BCA Protein Assay	Pierce
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RNase free DNase Set	Qiagen
Superscript III cDNA Synthese Kit	Invitrogen

2.1.2 Medien, Lösungen und Puffer

2.1.2.1 Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller/Zusammensetzung
Dulbecco´s MEM (1x)	Biochrom
Trypsin-Lsg. (10x)	Biochrom
FCS (Fötales Kälberserum)	Biochrom
Penicillin-Streptomycin	Biochrom
Blasticidin	Invitrogen
PBS-Puffer	Biochrom
Trypanblau	Biochrom

2.1.2.2 Bakterienkultur

Bezeichnung	Hersteller/Zusammensetzung
LB (Luria-Bertani)-Medium	10 g/l Trypton (Dibco) 5 g/l Hefeextrakt (Gifco) 5 g/l NaCl
Blutagarplatten	Oxoid
Mueller-Hinton-Platten	Oxoid

2.1.2.3 SDS-PAGE

Bezeichnung	Hersteller/Zusammensetzung
Laemmli-Puffer	0,06 M Tris-HCl, pH 6,8 2 % SDS 25 % Glycerol 0,2 % Bromphenolblau 10 % 2-Mercaptoethanol
TT-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA

10x Tris/Tricine/SDS	Bio-Rad
Rainbow Marker	Amersham Pharmacia
Page Ruler	Fermentas
Acrylamid 4K Lösung (40%) Mix 37,5:1	Applichem
10% APS-Lsg. (Ammoniumpersulfat)	AppliChem

2.1.2.4 Zellysate und Western Blot

Bezeichnung	Zusammensetzung
TNE-Puffer (ohne NaCl)	100 mM TRIS, pH 7,2 10 mM EDTA 1 % NP-40 Protease Complete Cocktail
Transfer-Puffer	25 mM Tris-HCL 192 mM Glycin 20 % Methanol
TBST-Puffer (10x)	1,5 M NaCl 0,5 M Tris 0,5 % Tween 20, pH 7,5
Blocking-Puffer	5 % Magermilch 2 % BSA in 1 x TBST

2.1.2.5 Mikroskopie

Bezeichnung	Hersteller/Zusammensetzung
ProLonge Gold Antifade	Invitrogen
PFA	3 % Paraformaldehyd in PBS unter Rühren erwärmen 1-3 Tropfen 1 M NaOH
Wasch-Puffer	0,1 % Saponin in PBS
Block-Puffer	0,1 % Saponin 5 % BSA in PBS

2.1.3 Antikörper

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
Kaninchen Anti-Human LC3B polyklonal	Western Blot 1:250	Sigma
Schaf Anti-Kaninchen IgG-HRP	Western Blot 1:5000	Sigma
Ziege Anti-Maus IgG-Alexa Fluor 568 gekoppelt	Immunofluoreszenz 1:1000	Molecular Probes
Maus Anti- <i>S. aureus</i> Protein A monoklonal	Immunofluoreszenz 1 :1000	Sigma

2.1.4 Eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Herkunft
HeLa (ATCC CCI-2)	ATCC (American Type Culture Collection), Manassas, USA
HeLa-EGFP-LC3	Dr. Annabelle Schnaith Institut für med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene Köln, Deutschland

2.1.5 Bakterienstämme

Bezeichnung	Herkunft
ATCC 29213	DMSZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), Braunschweig, Deutschland
NCTC 8325 (NRS77)	NARSA (the network on antimicrobial resistance in <i>Staphylococcus aureus</i>)
NRS 151	NARSA
RN4220 (NRS144)	NARSA

2.1.6 Molekularbiologische Substanzen

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
TE-Puffer	10 mM Tris-Cl, pH 8 1 mM Na ₂ EDTA*2 H ₂ O, pH 8
STE-Puffer	0,1 mM NaCl 10 mM Tris/HCL (pH 7,4) 1 mM Na ₂ EDTA*2 H ₂ O, pH 8 auf 1 l mit H ₂ O auffüllen
50 x TAE-Puffer	40 mM TRIS, pH 7,2 20 mM Essigsäure 2 mM Na ₂ EDTA*2 H ₂ O, pH 8 auf 1 l mit H ₂ O auffüllen
Ethidiumbromid Stammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in H ₂ O
Proben-Puffer (10x)	200mM Tris-Acetat, pH 8 50% (v/v) Glycerin 5 mM EDTA 0,1% Bromphanolblau 0,1% Xylen-Zyanol 0,1% Orange G
2 x SSC	0,3 M NaCl 0,03 M NaCitrat, pH 7
Ready-Load TM 1 Kb Plus (DNA Ladder)	Invitrogen
Agarose	BMA
TRIZOL	Invitrogen
SephadeX-Säulen G-50	Amersham
ReadyPrime II labeling System	Amersham
Multiple Tissue Northern Blot	Clontech
Lipofectamine 2000	Invitrogen
dT Oligos	Invitrogen
Ready to go beads	Amersham
[α 32P] dCTP	Amersham

2.1.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden in Rahmen dieser Arbeit entwickelt und von der Firma Sigma Genosys synthetisiert. Die Oligonukleotide wurden in TE-Puffer mit einer Konzentration von 100 pmol/μl angesetzt und bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wurden die Oligonukleotide in Wasser im Verhältnis 1:20 verdünnt (5pmol/μl).

Gen	Bezeichnung des Oligonukleotids	Nukleotidsequenz (5' → 3')
ACTIN	ACTf	GACGAGGCCAGAGCAAGAG
	ACTr	ATCTCCTTCTGCATCCTGTC
	ACTf_rt	AGACCTGTACGCCAACACAG
	ACTr_rt	AGGAGGAGCAATGATCTTG
ULK1	ULK1f_rt	GCCTCACTGACCTGCTCCTTAA
	ULK1r_rt	GAGGGTGCATCTCCATGG
	ULK1f_Sonde	AAATCCCCACCCGTGCCTGT
	ULK1r_Sonde	GTGTTTGGAACTGGGTGGGT
ULK2	ULK2f_rt	CTCACCTTCCCCTTTGGTT
	ULK2r_rt	GCAGTCTAGCACCCGATAAGAG
	ULK2f_Sonde	AGTGCTGCTGTGGGCATCCT
	ULK2r_Sonde	TAAGAGGCAATGGGCACATT
ULK3	ULK3f_rt	TTCCAATCAGGCCCTGCTGA
	ULK3r_rt	TGCCAGCAACAGCAGTAGCT
	ULK3f_Sonde	TGTGAAGAAAGACCAGGAGG
	ULK3r_Sonde	AGCGAGATTCCCTCATCTTG

2.1.8 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Nitrozellulose Membran Protran 0,2mm	Schleicher&Schuell
Hyperfilm ECL	GE Healthcare
Criterion Fertiggassette	Biorad
Criterion Blotter BR 8,7x13 cm	Biorad
Criterion Cell 8,7x13 cm	Biorad
ELISA Reader MRX TC	Dynex Technology
Power Supply EPS-3501 XL	Amersham Pharnacia
Roller Cat RM5	Zipperer
Scanner Umax	Amersham Pharnacia
Schüttler Comfort	Eppendorf
Spektrophotometer	Thermo
Schüttler WT 12	Biometra
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus
Entwicklungsautomat	AGFA
EDDY-Jet	IUL Instruments Königswinter, Deutschland
Phospho Imager	BioRad
Umkehrmikroskop Olympus IX81 mit F-View II Trigger Camera	Olympus/Soft Imaging System
LightCycler®480	Roche
TriCatb2200-Counter	Perkin Elmer

2.1.9 Software und Datenbanken

Software

Cell ^P Software	Soft Imaging System
LightCycler480 Software Version 1.2	Roche
(Phospho Imager) Quantity one	BioRad
analySISD Software	Soft Imaging System

Datenbanken

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	National Center for Biotechnology Information
http://www.expasy.org/	The ExPASy (Expert Protein Analysis System) <u>proteomics</u> server
http://source.stanford.edu	SOURCE is structured as a set of relationships between two entities: GeneReports and CloneReports

2.2 Zellbiologische und biochemische Methoden

2.2.1 Kultivierung der Bakterien

Zur Kultivierung von *S. aureus* Stämmen wurde der zu untersuchende Stamm aus einem bei -40°C gelagertem Glycerolstock mit Hilfe einer sterilen Impföse auf einer Blutagarplatte ausgestrichen. Nach mindestens 12 h Inkubation bei 37°C wurde eine Kolonie der Blutagarplatte in 5 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C und 200U/min inkubiert (Vorkultur). Mit dieser Vorkultur wurde der Hauptansatz (50 ml LB-Medium) angeimpft und auf eine Start- OD_{600} (optische Dichte) von 0,05 eingestellt. Die Inkubation der Kultur erfolgte bei 37°C und 200U/min im Brutschrank. Geerntet wurden die Bakterien bei einer $\text{OD}_{600} = 0,3$. Die so erhaltene Bakteriensuspension wurde 10 min bei 4000 rpm, 4°C zentrifugiert und das Bakterienpellet anschließend in 1 ml DMEM / 10% FCS resuspendiert. Für die Infektion wurde eine Bakteriensuspension mit einer Dichte von 1×10^8 CFU/ml photometrisch eingestellt. Je nach Versuchsansatz wurde die Bakteriensuspension in den entsprechenden Mengen eingesetzt.

2.2.2 Kultivierung der eukaryotischen Zellen

HeLa-Zellen (humane Zervixadenokarzinom-Zelllinie) und EGFP-LC3, stabil exprimierende HeLa-Zellen, wurden in Dulbecco's MEM (DMEM) nach Zugabe von 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin G und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin kultiviert. Den rekombinanten HeLa-EGFP-LC3-Zellen wurden zusätzlich 10 $\mu\text{g/ml}$ Blastocidin zugegeben. Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen im Inkubator bei 37°C und 5% Kohlendioxid gehalten und alle drei Tage subkultiviert. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen in FCS mit 10% v/v Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

2.2.3 Transkriptionelle Inhibition durch siRNA

Um ULK1 und ULK2 funktionell untersuchen zu können, wurden für die transiente Transfektion die folgenden sechs siRNAs von der Firma Ambion bezogen.

Gegen die mRNA von ULK1 konnten wir eine bereits experimentell validierte siRNA (siRNA1) verwenden, während für das Gen-Silencing von ULK2 fünf vorgenerierten, aber nicht-validierte siRNAs (siRNA1-6) eingesetzt wurden.

	<i>sense</i> Sequenz (5'→3')	<i>antisense</i> Sequenz (5'→3')
siRNA1	CCCAAGCACUUUAUGCAUAtt	UAUGCAUAAAGUGCUUGGGtg
siRNA2	GGGACUCUCAGUGAAGACAtt	UGUCUUCACUGAGAGUCCct
siRNA3	GGUUUAUUGAUGAAAUCAAtt	UUGAUUUCAUCAAUAAACct
siRNA4	CCAAAAGAUAGAAUGGACTt	GUCCAUUCUAUCUUUUUGGtt
siRNA5	GGACACUCGUGAAGUGGUAtt	UACCACUUCACGAGUGUCct
siRNA6	CGGAAUAUCUCUCACCUGGtt	CCAGGUGAGAGAUAUUCCGtt

Als Kontrolle wurde eine negative (neg.) (*non targeting*) siRNA (Katalog Nr. 4635) benutzt.

Zur Transfektion der HeLa-Zellen bzw. EGFP-LC3-HeLa-Zellen mit siRNA wurde je Untersuchungsansatz eine bestimmte Zellmenge in 6-Well- (200.000 Zellen/Well) oder 24-Well-Platten (30.000 Zellen/Well) ausgesäht. Die Zellen wurden nach 18 Stunden mit 1,67 ml frischem, antibiotikahaltigem Zellkulturmedium versehen.

Für einen 333 µl-Ansatz wurde die entsprechende Menge siRNA (Endkonzentration 4, 30, 100 nM) in Optimem-Medium verdünnt und mit 6 µl vom Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 gemischt. Nach 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz tropfenweise auf den Zellen verteilt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit frischem Zellkulturmedium versehen. Achtundvierzig Stunden später erfolgte die Weiterverarbeitung der transfizierten Zellen für die *S. aureus* Infektion (Kap. 2.2.4.1), Zelllyse (Kap. 2.2.7), RNA-Präparation (Kap. 2.3.1) oder Mikroskopie (Kap. 2.2.6). Die Transfektionseffizienz wurde durch quantitative RT-PCR (Kap. 2.3.3) überprüft.

2.2.4 *In vitro* Infektion

2.2.4.1 *In vitro* Infektion von eukaryotischen Zellen mit *S. aureus*

Für die *in vitro* Infektion wurden 300.000 HeLa-Zellen/ml in 6-Well-Platten ausgesät. Die transient transfizierten Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion (Kap. 2.2.3) für die Infektion eingesetzt. Die Zellen wurden mit der in Kap. 2.2.1 gewonnenen Bakteriensuspension mit definierter Bakterienmenge MOI200 (*Multiplicity of Infection*; Infektionsrate) infiziert. Die infizierten Zellen wurden anschließend für eine Stunde (t=0) in einem CO₂-Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Extrazelluläre Bakterien wurden nach einstündiger Inkubation durch eine 15-minütige Inkubation mit 100 µg/ml Lysostaphin bei 37°C lysiert. Nach der Lysostaphin-Behandlung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in antibiotikahaltigem Medium für die zu untersuchenden Zeitpunkte (1h, 3h, 5h, 7h) im CO₂-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Wirtszellvitalität wurde durch Trypanblaufärbung lichtmikroskopisch (Bonifacio, 2000) nach einer, drei, fünf, sieben und 24 Stunden nach Infektion bestimmt. Durch CFU-Analyse wurde die intrazelluläre Bakterienmenge ermittelt. Die Lyse der Zellen für die Microarray-Analyse erfolgte nach eine, drei, fünf und sieben Stunden in Trizol.

2.2.4.2 CFU-Analyse (*Colony Forming Unit*)

Zur Bestimmung der intrazellulären Bakterienmenge wurden die infizierten Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 0,05%igen Triton-X100 lysiert und in drei verschiedenen Verdünnungen auf Mueller-Hinton-Platten mit dem EDDY-Jet spiralförmig ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C. Die Auszählung der gewachsenen Bakterienkolonien und die CFU-Analyse wurden entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.5 Induktion und Inhibition von Autophagie in transient transfizierten HeLa Zellen

Die Induktion von Autophagie in unbehandelten und transient transfizierten HeLa-Zellen erfolgte durch die Zugabe von Rapamycin (80 µg/ml) für eine oder zwei Stunden. Zur Inhibition von Autophagie wurden die Zellen für zwei Stunden mit Wortmannin (100 nM) behandelt.

2.2.6 Fluoreszenzmikroskopie

Für das *S. aureus*-LC3-Kolokalisationsexperiment erfolgte die Infektion mit der in Kapitel 2.2.1 gewonnenen Bakteriensuspension (MOI20) 48 Stunden nach Transfektion der EGFP-LC3-HeLa-Zellen. Um die extrazellulären Bakterien zu eliminieren wurde eine Stunde nach Infektion eine 15-minütige Lysostaphin-Behandlung (100µg/ml) durchgeführt. Nach indizierten Infektionszeiten (1-5 Stunden) wurden die infizierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 30 min mit 3% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Vor der Färbung mit Antikörpern wurden die Zellen mit saponinhaltigem Wasch-Puffer 15 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Danach wurden die Zellen 10 min bei Raumtemperatur mit Block-Puffer inkubiert. Die Färbung der Bakterien mit dem spezifischen 1. Antikörper Maus Anti-*S. aureus* Protein A 1:1000 in Blocking-Puffer erfolgte 30 min in einer feuchten abgedunkelten Kammer. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen mit Block-Puffer entfernt. Es folgte die Inkubation mit dem 2. fluoreszenzmarkierten Antikörper (1:1000) für 30 min und das anschließende Waschen. Das Präparat wurde an der Luft ca. 3 min angetrocknet.

Alle aufgearbeiteten Proben wurden mit ProLong Gold Antifade Reagent auf einem Objektträger eingebettet. Zur Fluoreszenzmikroskopie wurde das Umkehrmikroskop Olympus IX81 verwendet, welches mit einer F-View II Trigger Kamara ausgestattet ist. Die Aufnahmen wurden mittels Cell^P Software analysiert.

Für die Quantifizierung der Autophagosomen in unbehandelten und transient transfizierten EGFP-LC3-HeLa-Zellen wurden pro Experiment 100 Zellen mikroskopisch ausgewertet.

2.2.7 Gewinnung eukaryotischer, nukleifreier Totalzellextrakte und Proteinbestimmung

Zur Herstellung von Totalzellextrakte wurden behandelte HeLa-Zellen mit Trypsin von der Platte abgelöst und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen (300 x g, 10 min, 4 °C). Die Lyse der Zellen erfolgte in 100 µl eiskaltem TNE-Puffer durch 20-maligen auf- und abpipettieren. Die Zellyse wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und das resultierende Zellysat bei 4°C und 14000 rpm 20 min zentrifugiert. Der Überstand stellte den erworbenen eukaryotischen, zytosolischen Zellextrakt dar und wurde durch Western Blot und Immunodetektion analysiert. Zur Proteingehaltsbestimmung wurde der BCA Protein Assay von Pierce verwendet. Als Eichlösung wurde BSA in gleichem Probelösungsmittel vermessen.

2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurde das Criterion System von Bio-Rad verwendet und 10%ige Polyacrylamidgele eingesetzt. Gegossen wurde in eine Bio-Rad Criterion Fertiggassette 13,3 x 8,7cm. Für ein Gel besteht das Trenngel aus 10 ml Bisacrylamid/Acrylamid-Mix, 13,2 ml TT-Puffer, 11,2 ml 50 % Glycerol, 5,6 ml Wasser, 40 µl TEMED und 80 µl APS. Nach kurzem Durchmischen der Komponenten wurde die Lösung in eine Kassette gegossen. Nachdem das Trenngel polymerisiert war wurde die Oberfläche mit Isopropanol geglättet. Darauf wurde das Sammelgel bestehend aus 1 ml Bisacrylamid/Acrylamid-Mix, 4,48 ml TT-Puffer, 6,52 ml Wasser, 10 µl TEMED und 100 µl APS gegossen und sofort der Kamm zur entsprechenden Formung der Taschen eingeführt.

Die Proben mit jeweils eine Proteinmenge von 30 µg wurden mit einer 50%igen Glycerol-Lösung und der berechneten Menge fünffachem Lämmli-Proben-Puffer versetzt und bei 95°C für 5 min denaturiert. Anschliessend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und bei 100V konstant in einer Criterion Elektrophoresezelle in Tris/Tricine/SDS- Laufpuffer aufgetrennt.

2.2.9 Western Blot und Immunodetektion

Als Western Blot wird der elektrophoretische Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran (Nitrozellulosemembran) bezeichnet.

Nach der Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE wurden die Proteine durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Es wurde im Tank-Blot-Verfahren, in Transfer-Puffer, mit dem Criterion-Blotter-System für 90 min bei 250 mA geblottet.

Nach dem Transfer wurden zunächst die freien Bindungsstellen auf der Membran mit Blocking-Puffer über Nacht bei 4°C abgesättigt. Die übertragenen Proteine wurden durch spezifische Antikörper detektiert (Immunodetektion).

Die Membran wurde mit dem 1. spezifischen Antikörper (LC3 1:250 in Blocking-Puffer) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen in TBST-Puffer entfernt. Es erfolgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper der an Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert ist (1:5000 in Blocking-Puffer). Es wurde erneut mit TBST-Puffer gewaschen. Zur Visualisierung wurden die Membranen mit ECL-Reagenz nach Angaben des Herstellers versetzt und mit einem Hyperfilm ECL in der Entwicklermaschine entwickelt.

2.3 Molekularbiologischen Methoden

2.3.1 RNA Isolation aus HeLa-Zellen

Für die Isolierung der RNA wurden HeLa-Zellen mit 1 ml TRIZOL® lysiert und nach Angaben des Herstellers verarbeitet.

Die genomische DNA wurde mit RNase-freier DNase zweimal für 15 min bei Raumtemperatur verdaut. Im Anschluss wurde die RNA mit dem RNeasy Mini Kit nach Angaben des Herstellers isoliert. Der totalRNA-Gehalt wurde photometrisch ($\lambda=260\text{nm}$) bestimmt und die Reinheit der RNA wurde über das Verhältnis $A_{260}/A_{280\text{nm}}$ ermittelt. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.3.2 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Die cDNA-Synthese wurde jeweils mit 4 µg RNA im doppelten Ansatz durchgeführt: ein Ansatz mit reverse Transkriptase (+RT) und einer ohne (-RT). Die reverse Transkription erfolgte unter Verwendung von dT Oligos und dem Superscript III Kit der Firma Invitrogen den Angaben des Herstellers entsprechend.

Zur Kontrolle der cDNA-Synthese wurde eine PCR mit Actin-Oligonukleotide durchgeführt: Für die Kontroll-PCR wurden *Ready to go beads* mit jeweils 1 µl der Actin Oligonukleotide ACTf und ACTr, 1 µl cDNA und 22 µl Wasser und einem gängigen PCR-Programm (Annealing Temperatur 55 °C; 25 Zyklen) amplifiziert. Anschließend wurde 1 µl des PCR-Ansatzes gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.3.3 Quantitative RT-PCR (Real-time-PCR)

Die mRNA-Expression der ULK Gene in behandelten und unbehandelten HeLa-Zellen wurde durch qRT-PCR quantifiziert. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression der Zielgene mit der eines nicht regulierten Haushaltsgen („*Housekeeping gene*“) normalisiert. In dieser Arbeit wurde zur Normalisierung der Zielgen-Amplifikate das Haushaltsgen β-Actin verwendet.

Bei der qRT-PCR wurde für die Messung ein fluoreszierender Farbstoff (SYBR green I) eingesetzt, der vorzugsweise an neu synthetisierter, doppelsträngiger DNA bindet und daraufhin Fluoreszenz emittiert, dessen Intensität sich proportional zur DNA-Konzentration verhält. Die Quantifizierung des entstehenden Amplifikats erfolgte nach jedem Zyklus über ein Fluoreszenzsignal-übermittelndes System. Für die qRT-PCR wurden die in Kapitel 2.1.6 aufgelisteten Oligonukleotide verwendet. Die Spezifität der PCR-Produkte wurde durch Bestimmung der Schmelztemperatur der jeweiligen ULK Gene bzw. des β-Actin Gens im Anschluss an der Amplifikation überprüft.

Für die Ermittlung der PCR-Effizienz der untersuchten Gene wurde aus unbehandelten HeLa-Zellen cDNA eine Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen aufgearbeitet. Die PCR-Effizienz wird aus der Steigung der eingesetzten Menge an cDNA berechnet, die in einer logarithmischen Funktion gegen die Zyklenzahl (CP „*Crossing point*“) dargestellt wird. Unten sind die spezifische

Schmelztemperatur, sowie die PCR-Effizienz der jeweiligen untersuchten Gene aufgelistet.

Gen	Schmelztemperatur	PCR-Effizienz
ULK1	89-90	2,1
ULK2	86-87	2,4
ULK3	90,5-92	1,8
β-ACTIN	88-88,5	2

Für jeden Lauf wurde ein Mastermix angesetzt (10 µl Mastermix, 2x; 1 µl „forward“ 10 µM, 1 µl „reverse“ Oligonukleotide 10 µM, 6 µl Wasser). Zu diesen 18 µl wurden jeweils 2 µl (400 ng) cDNA-Matrize pipettiert, bzw. bei der Negativ-Kontrolle 2 µl Wasser. Bei allen Läufen wurden für jede Probe Triplikate eingesetzt. Die qRT-PCR erfolgte mit folgendem Programm an dem „LightCycler®480“ System von Roche;

Programm	Zyklen	Analyse
Pre-Inkubation	1	-
Amplifikation	45	Quantifizierung
Schmelzkurve	1	Schmelzkurve
Kühlen	1	-

Temperatur Targets

	Erfassungsart (Acquisition Mode)	Zeit	Ramp Rate (°C/s)	Akquisition (per °C)
Pre-Inkubation				
95 °C	-	10 min	4.4	-
Amplifikation				
95°C	-	10 sec	4.4	-
60 °C	-	10 sec	2.2	-
72 °C	Single	7 sec	4.4	-
Schmelzkurve				
95 °C	-	5 sec	4.4	-
65 °C	-	1 min	2.2	-
97 °C	fortlaufend	-	-	5
Kühlen				
40 °C	-	10 sec	1.5	-

Für die Auswertung der jeweiligen Messungen wurde die E-Methode (PAPAER) verwendet. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der LightCycler480®-Software ausgewertet (Version 1.2; Roche).

2.3.4 Northern Blot Analyse

Die Northern Blot Analyse erfolgte durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA Sonden. Für die Untersuchung der Gewebeexpression der ULK-Gene wurde der kommerziell erhältliche MTN-Blot („Multiple Tissue Northern“-Blot, Clontech) eingesetzt. Die verwendete Nylon-Membran enthält pro Bande circa 1 µg polyA⁺ RNA von 12 unterschiedliche humanen Geweben (Herz, Gehirn, Plazenta, Thymus, Lunge, Leber, Skelletmuskel, Niere, Milz, Blutzellen, Dünn- und Dickdarm) und war für die Hybridisierung bereits gebrauchsfertig.

Die Herstellung der Hybridisierungssonden erfolgte mit den in Kapitel 2.1.7 aufgelisteten Oligonukleotide. Von jeder Hybridisierungssonde wurden 30 ng in 45 µl TE-Puffer aufgenommen, 3 min bei 95°C denaturiert und direkt auf Eis gestellt. Die Markierung der Sonden erfolgte mit dem „ReadyprimeTM II DNA Labeling System“ und 5 µl Phospho [α32P] dCTP (50µci), für 10 min bei 37°C. Danach wurden die Sonden in 50µl STE-Puffer aufgenommen und auf Sephadex-Säulen 200 nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Jede markierte Sonde wurde danach ein weiteres Mal denaturiert (10 min, 95°C) und auf Eis gestellt. Am β-Counter erfolgte die Messung der eingebauten Radioaktivität.

Parallel wurde der MTN-Blot in 10 ml vorgewärmten Hybridisierungspuffer 30 min bei 68°C prähybridisiert. Anschließend wurde die prähybridisierte Membran eine Stunde bei 68°C mit der denaturierten, radioaktiv markierten Sonde inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde der Blot zweimal für 5 min in 2xSSC/0,1%SDS und anschließend weitere zweimal für 30 min in 0,1xSSC/0,1%SDS bei 68°C gewaschen.

2.3.5 Microarray-Analyse

Für die Microarray-Analyse wurden HeLa-Zellen wie in Kapitel 2.2.4.1 mit dem zytotoxischen wt *agr* *S. aureus* Stamm NCTC8325 und mit dem *agr*^{-/-} *S. aureus* Stamm NRS151 infiziert (MOI200). Als Kontrolle dienten nicht infizierte HeLa-Zellen. Eine, drei, fünf und sieben Stunden nach Infektion wurden die drei Ansätze (nicht-infizierte Kontrolle, mit wt *S. aureus* infizierte Zellen und *agr*^{-/-} *S. aureus* infizierten Zellen) geerntet in Trizol lysiert und wie im Kapitel 2.3.1 die RNA präpariert.

Die cDNA- und cRNA-Synthese für die Microarray-Analyse wurde mit dem Illumina®TotalPrep RNA Amplification Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers vom Institut für Molekulare Tumorbologie und Tumorummunologie am Universitätsklinikum Köln (Prof. Joachim Schultze, Dr. Svenja Debey-Pascher) durchgeführt. Im ersten Schritt der cDNA-Synthese wurden jeweils 100 ng Gesamt-RNA eingesetzt, bei dem die RNA in einer Reverse-Transkriptase Reaktion unter Verwendung eines T7 Oligo (dT)-Primers in Einzelstrang-cDNA umgeschrieben wurde. Im zweiten Schritt wurde die Einzelstrang-cDNA in eine Doppelstrang-cDNA konvertiert. Nach einer Säulenaufreinigung wurde die cDNA in einer *in-vitro* Transkription als Matrize für die Synthese biotinylierter cRNA eingesetzt.

Das Hybridisieren, Waschen und Scannen der Microarrays erfolgte nach dem „Hybridize“ and „Wash“ 6-sample Beadchip-Protokoll des Illumina BeadStation 500X System Manuals (Illumina, USA). Alle Schritte wurden vom Institut für Molekulare Tumorbologie und Tumorummunologie am Universitätsklinikum Köln (Prof. Joachim Schultze) durchgeführt.

Für die Hybridisierung auf humane WG-6 V1 Beadchips (Illumina, USA) wurden 1.5 µg biotinylierte cRNA eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte unter Rotation für 16 h bei 55°C. Nach dem Waschen und Trocknen wurden die Arrays mit einem Beadarray Reader 500X (Illumina, USA) gescannt und die Rohdaten wurden mittels Beadstudio-Software extrahiert.

Die Daten-Analyse wurde vom Institut für Molekulare Tumorbologie und Tumorummunologie am Universitätsklinikum Köln (Prof. Joachim Schultze) durchgeführt.

Die Rohdaten der Microarrays wurden in R (Bioconductor-Projekt) eingelesen und normalisiert (Quantil-Normalisierung). Die Quantil-normalisierten Daten wurden anschließend mit dem Programm dCHIP 1.3 analysiert. Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene wurden folgende Filterkriterien verwendet:

- Fold Change > 1.5,
- Differenz zwischen den Mittelwerten der Signalintensitäten der Vergleichsgruppen >100,
- p-Wert des T-Tests < 0.05.

Array-Information: Auf dem human WG-6 V1-Array sind 47297 Transkripte repräsentiert (19730 Refseq-Sequenzen, 21199 zusätzliche XM-Sequenzen, Rest: bisher nicht-annotierte Transkripte).

3 Ergebnisse

3.1 *S. aureus* induziert *agr*-abhängigen Wirtszelltod

Diese Arbeit diente zur Aufklärung der Zytotoxizität von invasiven *S. aureus* in nicht-professionellen Phagozyten.

Als Wirtszellen wurden HeLa-Zellen ausgewählt, die typische nicht-professionelle Phagozyten sind. Als zytotoxische *S. aureus* Stämme wurden die Wildtyp-Stämme (wt) ATCC29213 und NCTC8325 mit einem voll funktionsfähigen „*accessory gene regulator*“ (*agr*)-System benutzt. Das *agr*-System reguliert die Expression wichtiger Virulenzfaktoren von *S. aureus*. Als nicht-zytotoxische *S. aureus* Stämme wurden zwei zum Stamm NCTC8325 isogene Stämme gewählt: die *agr*-Deletionsmutante (*agr*^{-/-}) NRS151 und die partielle *agr*-Mutante RN4220.

Als Standardprotokoll wurden HeLa-Zellen mit zytotoxischen oder nicht-zytotoxischen *S. aureus* in einem Verhältnis von 200 Bakterien pro Wirtszelle („*multiplicity of infection*“ (MOI)) infiziert. Um den zeitlichen Verlauf des zytotoxischen Effekts von *S. aureus* auf HeLa-Zellen zu bestimmen, wurde die Vitalität der infizierten HeLa-Zellen mit dem Trypanblauausschlußverfahren nach einer, drei, fünf, sieben und 24 Stunden bestimmt. Vierundzwanzig Stunden nach Infektion mit dem zytotoxischen Stamm ATCC29213 lebten nur noch circa 20% der infizierten HeLa-Zellen und etwa 50% der mit dem ebenfalls zytotoxischen *S. aureus* NCTC8325 infizierten Zellen, während etwa 80-85% der mit den *agr*-Mutanten RN4220 oder NRS151 infizierten HeLa-Zellen noch vital waren. Ebenfalls waren etwa 90% der nicht infizierten Zellen nach 24 Stunden noch vital (Abb. 6). Ein deutlicher zytotoxischer Effekt zeigte sich schon sieben Stunden nach Infektion mit dem wt *agr* Stamm ATCC29213 mit nur noch 65% vitalen Zellen, während sich zu diesem Zeitpunkt die Vitalität der mit dem wt *agr* Stamm NCTC8325 oder mit den *agr*-Mutanten RN4220 oder NRS151 infizierten HeLa-Zellen nicht von der Vitalität der nicht infizierten Kontrolle unterschied. Verschiedene Stämme von *S. aureus* mit einem funktionsfähigen *agr*-System unterscheiden sich somit deutlich in der Kinetik und Effektivität des in HeLa-Zellen induzierten zytotoxischen Effektes.

Der beobachtete zytotoxische Effekt von *S. aureus* innerhalb weniger Stunden in HeLa-Zellen diente zur Feststellung der zu untersuchenden optimalen Zeitpunkte für Microarray-Analysen. Das Transkriptionsprofil von HeLa-Zellen in Reaktion auf die Infektion mit *S. aureus* wurde dementsprechend zu den Zeitpunkten eine, drei, fünf und sieben Stunden nach Infektion durch Microarray-Analysen untersucht. Trotz der höheren Zytotoxizität von ATCC29213 wurde für die Microarray-Analysen der wt *S. aureus* Stamm NCTC8325 benutzt, da er sich ideal mit seinem isogenen *agr*^{-/-} *S. aureus* Stamm NRS151 vergleichen ließ.

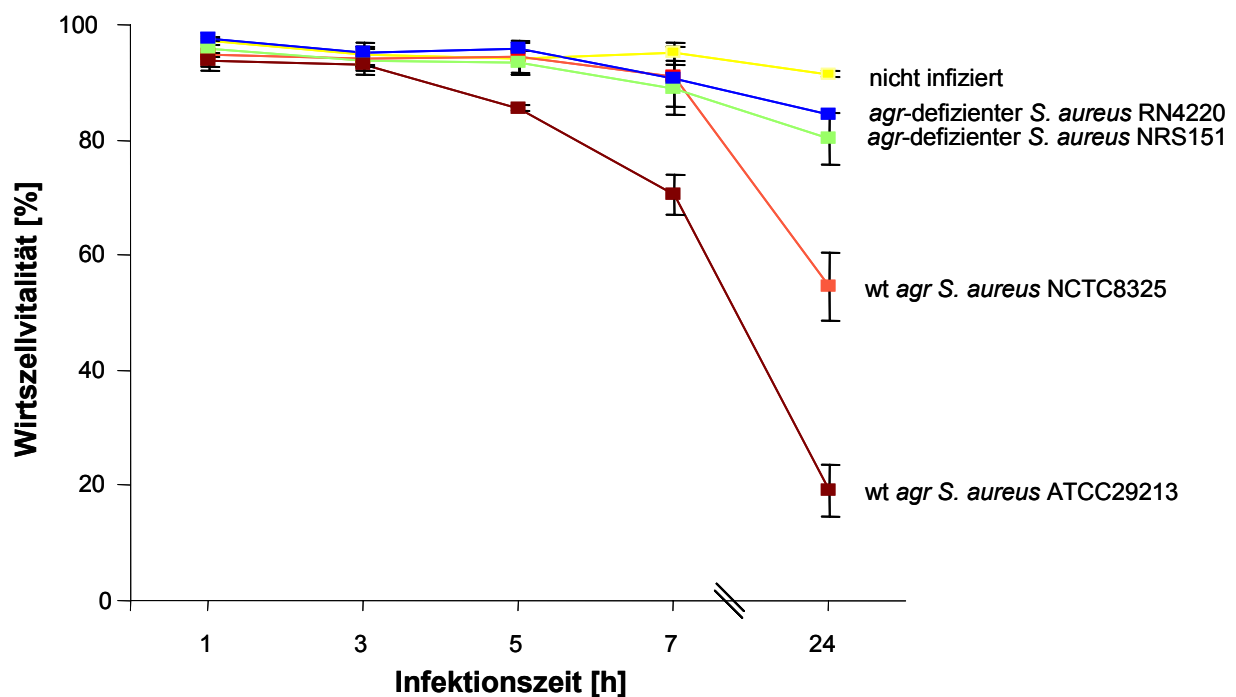


Abb. 6 Kinetik der Vitalität von HeLa-Zellen nach Infektion mit ausgewählten zytotoxischen versus nicht-zytotoxischen Stämmen von *S. aureus*.

HeLa-Zellen wurden mit den wt *agr S. aureus* Stämmen ATCC29312 und NCTC8325 oder mit dem zu NCTC8325 isogenen, *agr*-defizienten *S. aureus* Stämmen RN4220 und NRS151 mit einer MOI200 infiziert. Nach ein, drei, fünf, sieben und 24 h wurde die Vitalität der HeLa-Zellen mit dem Trypanblauausschlußverfahren bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten.

3.2 Transkriptionsanalyse von HeLa-Zellen nach Infektion mit Wildtyp *agr* oder *agr*-defizienten *S. aureus*

Um die Reaktion von HeLa-Zellen nach Invasion von wt *agr* oder *agr*-defizienten *S. aureus* Stämmen zu charakterisieren, wurde die Genexpression von HeLa-Zellen im Verlauf der *S. aureus* Infektion untersucht. Für die Microarray-Analyse wurden HeLa-Zellen entweder mit dem wt *agr* NCTC8325 *S. aureus* Stamm oder mit dem *agr*^{-/-} isogenen Stamm NRS151 gemäß dem oben beschriebenen Standardprotokoll infiziert. Nicht infizierte HeLa-Zellen wurden als Kontrolle eingesetzt. Für jeden Zeitpunkt wurden Triplikate angesetzt. Zu den Zeitpunkten eine, drei, fünf und sieben Stunden nach Infektion wurde die RNA aus den Zellen extrahiert und anschliessend dazu verwendet, um das Transkriptionsprofil von HeLa-Zellen mit der Illumina-Microarray-Technologie in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Joachim L. Schultze, Molekulare Tumorbologie und Tumor-Immunologie an der Klinik I für Innere Medizin der Universität zu Köln, zu erfassen. Die Arbeitsgruppe schrieb die RNA in cRNA um und führte die Hybridisierung und die anschließende bioinformatische Analyse der Daten durch. Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene wurden als Filterkriterien eine mindestens um das 1,5-fache veränderte Expression (Fold Change > 1,5) und eine statistische Signifikanz im t-Test mit $p < 0,05$ verwendet. Eine Stunde nach Infektion gemäß dem Standardprotokoll waren in den nicht infizierten Kontrollen, sowie in mit wt *S. aureus* oder *agr*^{-/-} *S. aureus* infizierten HeLa-Zellen, vergleichbar geringere Änderungen des Transkriptionsprofils nachweisbar. Aufgrund dieser niedrigen Transkriptionsänderung eine Stunde nach Infektion wurde dieser Zeitpunkt als Referenzprofil definiert.

In Zellen, die gemäß dem Standardprotokoll behandelt, aber nicht infiziert wurden, konnten nach drei Stunden keine und nach fünf und sieben Stunden jeweils weniger als 10 differentiell exprimierte Gene nachgewiesen werden (Abb. 7A). Dieses zeigt, dass die Behandlung der Zellen, bestehend u. a. aus mehreren Zentrifugationsschritten und Inkubation mit Lysostaphin, keinen wesentlichen Einfluss auf die Genexpression von HeLa-Zellen hatte. Im Gegensatz zu nicht infizierten Kontrollen konnten in HeLa-Zellen, die mit dem *agr*^{-/-} *S. aureus* infiziert waren, bereits drei Stunden nach Infektion 67 differentiell exprimierte Gene detektiert werden und im weiteren Verlauf stieg die Anzahl der differentiell exprimierten Gene auf 158 nach sieben Stunden.

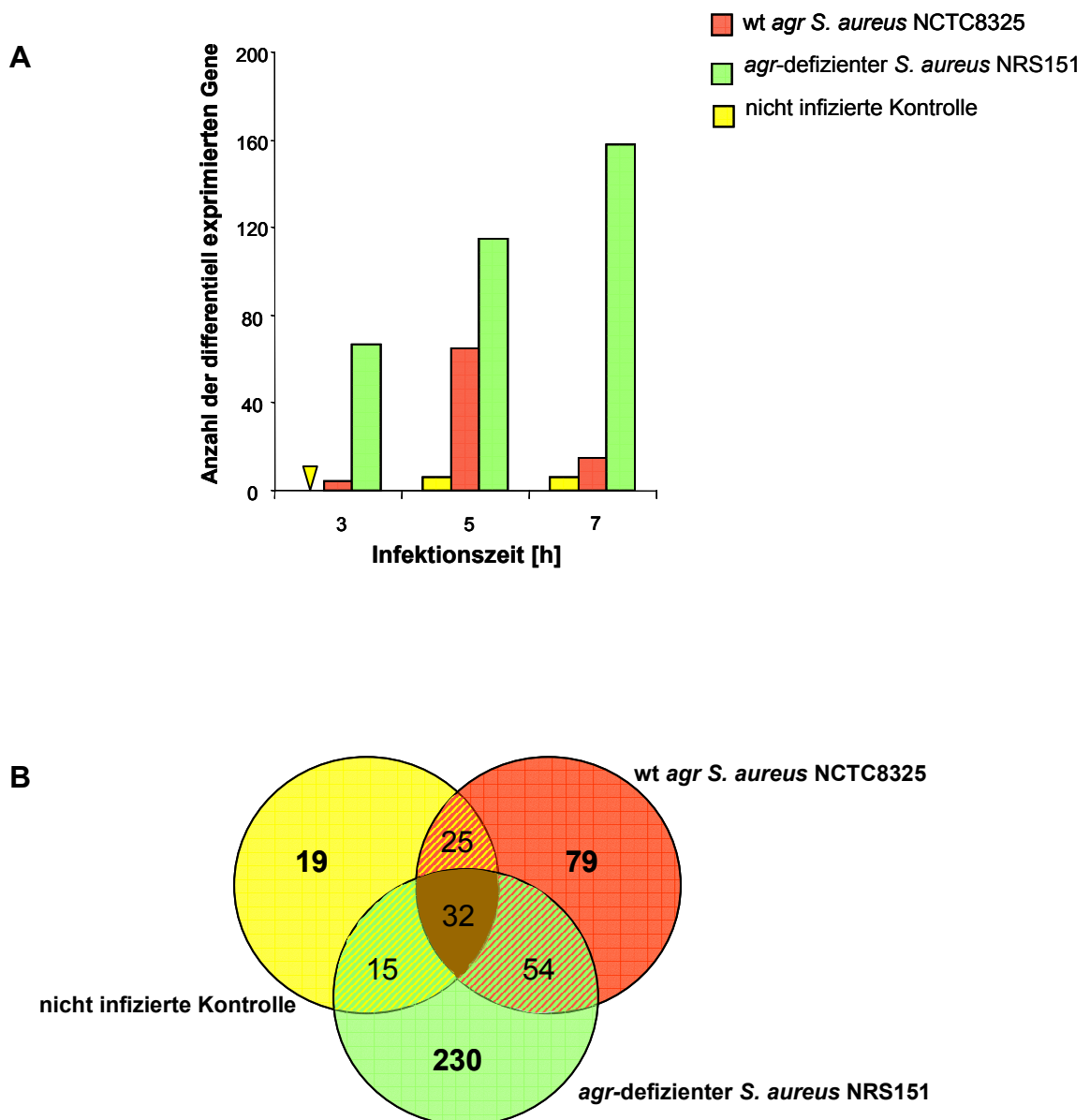


Abb. 7 Änderung der Genexpression in HeLa-Zellen nach Infektion mit den *S. aureus* Stämmen NCTC8325 und NRS151.

HeLa-Zellen wurden mit einer MOI 200 mit wt *agr* NCTC8325 oder mit dem zu NCTC8325 isogenen *agr*-defizienten *S. aureus* Stamm NRS151 infiziert. Zur Identifizierung differentiell exprimierten Gene wurden ein Fold-Change >1,5 und ein p-Wert <0,05 festgelegt. (A) Anzahl der differentiell exprimierten Gene aus den Transkriptionsprofile drei, fünf und sieben Stunden nach Infektion, nach Vergleich mit dem Referenzprofil zum Zeitpunkt eine Stunde nach Infektion. Zusammenfassende Darstellung der Gesamtanzahl differentiell exprimierter Gene.

▽ Keine signifikant veränderte exprimierten Gene nachgewiesen. (B) Zusammenfassung der zu allen drei Untersuchungszeitpunkten differentiell exprimierten Gene.

Es muss bei dieser zusammenfassenden Darstellung der Gesamtanzahl differentiell exprimierter Gene darauf hingewiesen werden, dass die z. B. zu dem Zeitpunkt drei Stunden nach Infektion exprimierten Gene nicht zwangsläufig unter den Genen sein müssen, die auch zu den späten Zeitpunkten differentiell exprimiert sind. Deshalb können über den gesamten Beobachtungszeitraum von sieben Stunden nach Infektion deutlich mehr Gene verändert sein als zu jedem einzelnen Zeitpunkt angegeben (siehe auch Abb. 7B).

Drei Stunden nach Infektion mit dem wt *S. aureus* wurden in HeLa-Zellen nur vier, nach fünfstündiger Infektion allerdings schon 65 differentiell exprimierte Gene detektiert. Überraschenderweise war sieben Stunden nach Infektion die Anzahl der differentiell exprimierten Gene wieder massiv zurückgegangen auf nur noch 15 Gene.

Die Infektion mit dem wt *S. aureus* ruft somit in HeLa-Zellen verglichen mit dem *agr*^{-/-} *S. aureus* hinsichtlich der Anzahl der Gene und dem zeitlichen Verlauf eine deutlich unterschiedliche Transkriptionsantwort hervor.

In Abb. 7 B ist zusammengefasst für die drei Untersuchungszeitpunkte die Anzahl der differentiell regulierten Gene in nicht infizierten, mit dem wt *S. aureus* und mit dem *agr*^{-/-} *S. aureus* infizierten HeLa-Zellen dargestellt. Es ist auffällig, dass *agr*^{-/-} *S. aureus* in HeLa-Zellen die Transkription von insgesamt 331 Genen verändert, von denen 230 spezifisch für diese Infektion sind. In Tabelle 1 (siehe Anhang) sind die 230 während der Infektion mit dem *agr*^{-/-} *S. aureus* spezifisch differentiell exprimierte Gene aufgelistet. Die Art und Vielzahl der nach Infektion mit dem *agr*^{-/-} *S. aureus* exprimierten Gene deutet auf eine Aktivierung von globalen Signalkaskaden als Wirtszellantwort hin. Induziert wurden u. a. Gene der NFκB- (z.B. NFκB1; NFκBIE; TNIP1, MAP3K8) und TGF-β- (z.B. SMAD3) Signaltransduktionswege und einige proinflammatorische Mediatoren (z. B. IL11, IL6 und IL8). Weitere detektierte Gene sind Transkriptionsfaktoren (u. a. HLX1; SOX13) oder an der Apoptose beteiligte Gene.

Die Infektion der HeLa-Zellen mit dem wt *S. aureus* führt dagegen zur Transkriptionsänderung von insgesamt nur 190 Genen und davon sind nur 79 spezifisch für diese Infektion. Die Abbildung 7 B zeigt auch die Anzahl der differentiell exprimierten Gene, die unter jeweils zwei oder allen drei Bedingungen induziert werden. Die 79 in mit wt *S. aureus* infizierten HeLa-Zellen differentiell exprimierten Gene sind in Tabelle 2 mit ihren in der Literatur bzw. in Datenbanken beschriebenen

Charakteristika und Funktionen aufgelistet. Ausgehend von dieser Liste sollten anschließend Untersuchungen des molekularen Mechanismus der Wirtszellzytotoxizität von *S. aureus* durchgeführt werden. Die Gene können sieben funktionellen Gruppen zugeordnet werden (Abb.8). Hauptsächlich erfuhren eine Transkriptionsänderung Gene die für Strukturproteine (CTNNA1; YWHAG) und Enzyme (eine Aldo-Keto-Reduktase (AKR1C4); eine NADH-Dehydrogenase (NDUFA5); eine Ligase und zwei Serin/Threonin-Kinasen (CSNK1A1; ULK1)) kodieren, detektiert. Darüber hinaus wurden Gene der Transkriptionsmaschinerie, wie CCNH, SSB und HIF1- α , sowie Gene für Vesikeltransport, -sortierung und -regulierung (CLTC; SEC63) und Gene des apoptotischen Signalwegs (CROP; TXNL1) nachgewiesen.

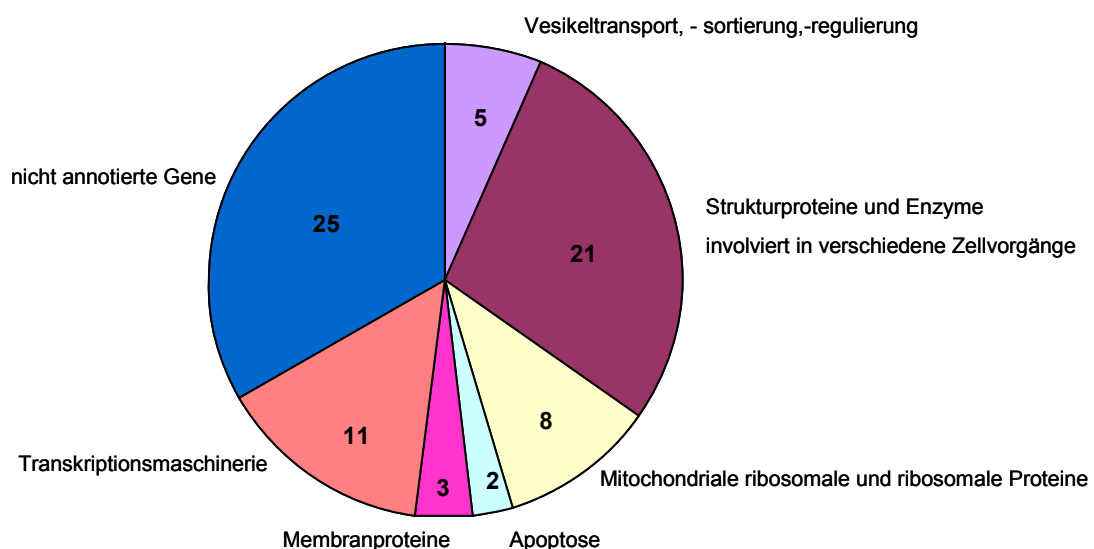


Abb. 8 Einteilung der differentiell exprimierten Gene in HeLa-Zellen nach Infektion mit dem wt *S. aureus* Stamm NCTC8325 in funktionelle Gruppen.

Die Einteilung in Gruppen erfolgte nach Recherchen in der Literatur und Datenbanken gemäß den dort beschriebenen Funktionen der Gene.

Tab. 2 Liste der statistisch, signifikant exprimierten Gene in Hela-Zellen infiziert mit dem wt *agr S. aureus* Stamm NCTC8325

Genname	Symbol	FC 3h	FC 5h	FC 7h	Beschreibung
Strukturproteine und Enzyme involviert in verschiedenen Zellvorgänge					
<i>unc-51-like kinase 1 (C. elegans)</i>	ULK1	1,57	1,41	1,25	Serine-Threonin-Kinase; Nervenzellen; Autophagy
casein kinase 1, alpha 1	CSNK1A1	1,45	1,64	1,27	Serine-Threonin-Kinase; Wnt Patway
aldo-keto reductase family 1, member C4 (chlordecone reductase)	AKR1C4	1,18	1,55	1,17	Aldo-Keto Reduktase; Katalysiert Aldehyden zur Ketonen
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 5, 13kDa	NDUFA5	1,12	1,59	1,29	gehört in die mitochondriale Atmungskette/ NADH Dehydrogenase
ankyrin repeat and IBR domain containing 1	ANKIB1	-1,19	-1,63	-1,35	handelt vermutlich als 3 Ubiquitin-Protein Ligase
frizzled homolog 6 (Drosophila)	FZD6	1,14	1,51	1,24	vermutlich in Transduktion und intrazelluläre Übermittlung von Polaritätsinformationen involviert/ beteiligt an die Gewebemorphogenese und/oder Gewebedifferenzierung/Rezeptor für Wnt Proteine
UDP-N-acteylglucosamine pyrophosphorylase 1	UAP1	1,43	1,72	1,49	Transferase Aktivität/am Metabolismus beteiligt
CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	CD24	1,16	1,59	1,27	Moduliert die B-Zellen Aktivierung
catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa	CTNNA1	1,49	2,25	1,7	Zelladhäsion/Zelldifferenzierung
interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)	G1P2	1,07	1,5	2,06	zeigt antiviralen Aktivität bei einer viralen Infektion/Zell-Zell Interaktion
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide	YWHAG	1,26	1,53	1,23	Adapterprotein, welche an verschiedenen Signalwegen beteiligt ist
myotrophin	MTPN	1,34	1,53	1,16	hängt Integralproteine an Zytoskelletelemente
glutaredoxin 2	GLRX2	1,23	1,52	1,26	in Redoxreaktionen der Zelle beteiligt
sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted,(semaphorin) 3C (semaphorin) 3C	SEMA3C	1,27	1,83	1,3	in verschiedene zelluläre Überlebensmechanismen beteiligt
growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	GADD45A	-1,07	-1,14	-1,59	interagiert mit einigen cdk (<i>cell division protein kinase</i>) Komplexe
actin, alpha, cardiac muscle	ACTC	1,15	-1,21	-1,55	vermittelt zur "chemorepulsant"/ Aktivierung von Semaphorin
SAC1 suppressor of actin mutations 1-like (yeast)	SACM1L	1,23	1,51	1,25	keine INFO
TatD DNase domain containing 1	TATDN1	1,16	1,51	1,18	keine INFO
discoidin, CUB and LCCL domain containing 2	DCBLD2	1,31	1,37	1,54	keine INFO
NA	SAS10	1,27	1,51	1,18	UTP3, small subunit (SSU) processome component, homolog (S. cerevisiae)
Vesikeltransport; -sortierung und -regulierung					
kinesin family member 20A	KIF20A	-1,25	-1,54	-1,36	Reguliert vermutlich den retrograden Transport von rab6
clathrin, heavy polypeptide (Hc)	CLTC	1,29	1,74	1,35	intrazellulärer Proteintransport; Verkehr von Rezeptoren Endozytose von Makromolekülen
AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1 (yeast)	AHSA1	-1,25	-1,57	-1,46	beeinflusst vermutlich den Verkehr zwischen ER und Golgi
pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 1(cytohesin 1)	PSCD1	1,54	1,34	-1,04	Regulierung der Proteinsortierung und Membranverkehr
SEC63-like (S. cerevisiae)	SEC63	1,27	1,62	1,34	Proteinsortierung; -Transport; - Faltung/ in rauen ER lokalisiert Komplex mit Sec61-Sec62-Sec63
Mitochondriale ribosomale und ribosomale Proteine					
NA	LOC130678	1,06	1,52	1,08	ähnlich zur 60S ribosomalen Protein P1
NA	LOC389848	1,24	1,53	1,2	ähnlich zur 40S ribosomalen Protein SA (p40)
NA	LOC158345	1,37	2,26	1,44	ribosomales protein L4
ribosomal protein L7	RPL7	1,34	1,65	1,22	ribosomales protein
ribosomal protein L9	RPL9	1,32	1,87	1,27	ribosomales protein
mitochondrial ribosomal protein L47	MRPL47	-1	1,56	1,17	ribosomales protein
lactamase, beta	LACTB	1,26	1,51	1,4	mitochondriale ribosomale 39S ribosomal protein L56I
NA	LOC127545	1,13	1,7	1,26	ribosomales protein L18a

Genname	Symbol	FC 3h	FC 5h	FC 7h	Beschreibung
Apoptose-Signalweg					
thioredoxin-like 1	TXNL1	1,26	1,69	1,34	Apoptose; Signaltransduktion
NA_cisplatin resistance-associated overexpressed protein	CROP	1,24	1,66	1,25	Apoptose; RNA Splicing; Stress Antwort
Membranproteine					
transmembrane protein 14B	TMEM14B	1,1	1,56	1,28	Transmembranprotein
immediate early response 3 interacting protein 1	IER3IP1	1,27	1,6	1,17	hypothetisches Transmembranprotein
V-set and immunoglobulin domain containing 1	VSIG1	1,29	1,62	1,32	"liegt vor dem ATG4 Gen (gleiche Richtung)"/Glukoprotein
Genname	Symbol	FC 3h	FC 5h	FC 7h	Beschreibubg
Transkriptionsmaschinerie					
Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)	SSB	1,14	1,52	1,21	Transkription der ma polymerase iii
NA_DNA directed RNA polymerase II polypeptide J-relevaed gene	POLR2J2	-1,02	1,55	1,27	Transkription/kodiert für die "subunit" der RNA Polymerase II (synthetisiert die mRNA in Eukaryoten)
zinc finger CCCH-type, antiviral 1	ZC3HAV1	1,03	1,31	1,53	vermutlich in der Transkription involviert
zinc finger and BTB domain containing 2	ZBTB2	1,17	1,55	1,27	vermutlich in der Transkription involviert
high-mobility group box 1	HMGB1	1,25	1,51	1,22	an der Abwicklung der DNA beteiligt
NA_Cisplatin resistance-associated overexpressed protein	CROP	1,24	1,66	1,25	vermutlich an der Bildung der Spliceosomen beteiligt
cyclin H	CCNH	1,37	1,59	1,28	Interagiert mit CDK7 und führt zur Transkription
histone acetyltransferase 1	HAT1	1,21	1,52	1,2	an Replikation der Nukleosomen beteiligt
splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract	SFPQ	1,35	1,6	1,3	Bindet DNA/RNA; am nuklearen mRNA Splicing via Spliceosome beteiligt
breast carcinoma amplified sequence 2	BCAS2	1,24	1,54	1,31	RNA Splicing
hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	HIF1A	1,6	2,02	1,52	Transkriptionsfaktor; bei Sauerstoffmangel (Hypoxia)
nicht annotierte Gene n= 25					

3.3 Identifikation und Charakterisierung von ULK1, ULK2 und ULK3

Vorherige Untersuchungen der Zytotoxizität der wt *S. aureus* Stämme zeigten, dass wt *S. aureus* autophagosomale Vesikel der Wirtszelle benötigt, um intrazellulär zu überleben und den Tod der Wirtszelle zu induzieren (Schnaith et al., 2007).

Unter den Genen, die bereits drei Stunden nach Infektion mit wt *S. aureus* signifikant hochreguliert sind, ist das Gen ULK1 (unc-51-like Kinase) („fold change“ 1,57, p-Wert < 0,05). Humanes ULK1 ist ein Homolog von ATG1 aus *S. cerevisiae*. ATG1 ist in der Hefe von entscheidender Bedeutung bei der Initiation von Autophagie (Matsuura et al., 1997).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob ULK1 an der Induktion von Autophagie in humanen Zellen beteiligt ist und welche Rolle es für den Verlauf der Infektion von HeLa-Zellen mit dem zytotoxischen *agr* wt *S. aureus* spielt.

Es wurde mittels BLAST-Analyse zusätzlich zu den zwei bislang bekannten „unc-51-like Kinase“ 1 (NM_003565) und „unc-51-like Kinase“ 2 (NM_014683) ein Gen für ein weiteres potenzielles Homolog von ATG1 nachgewiesen, die „unc-51-like Kinase“ 3 (NM_015518).

ATG1 ist eine Serin/Threonin-Kinase, die aus einer Amino-terminalen-Kinase-Domäne, einer zentralen Prolin-Serin-Domäne und einer Carboxy-terminalen-Domäne besteht (Straub et al., 1997). Zu dem hoch konservierten N-terminalen katalytischen Zentrum (Aminosäuren 9-279) der Serin/Threonin-Kinase-Familie besitzen die entsprechende Aminosäuresequenzen von ULK1, ULK2 und ULK3 jeweils eine Sequenzhomologie von 38%, 37% und 39% (Abb. 9A). Die Gene für ULK1, ULK2 und ULK3 sind auf den Chromosom 12, 17 bzw. 15 lokalisiert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Die in ULK1 und ULK2 jeweils vorhandene Prolin-Serin-reiche Domäne hat eine geringe Homologie, und die C-Domäne hat gar keine Homologie zur der von ATG1 aus *S. cerevisiae*. Im Unterschied zu ULK1 und ULK2 besteht ULK3 nur aus der Serin/Threonin Kinase Domäne (Abb. 9B).

B

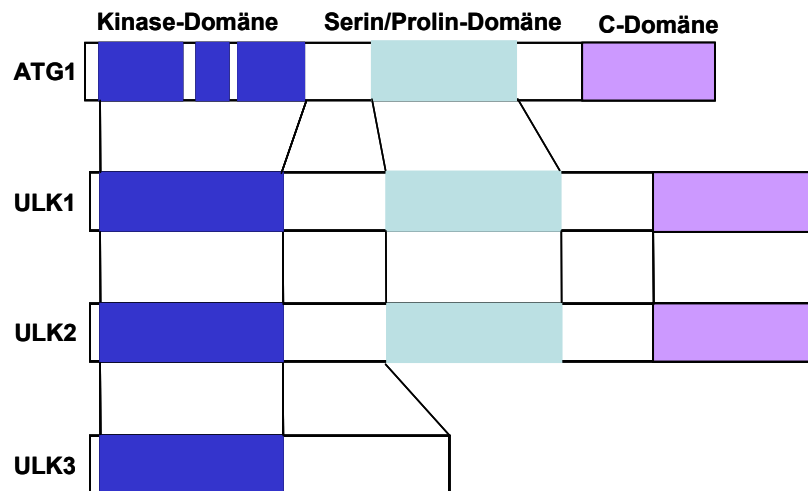


Abb. 9 Vergleich der Domänen der humanen ULK Proteine mit dem ATG1 in *S. cerevisiae*.

Vergleich der Proteinsequenzen der humanen ULK Proteine mit ATG1 von *S. cerevisiae* durch das ClustalW Programm. (A) Zwischen ATG1 und den Sequenzen der drei ULK Proteine konservierte Aminosäuren sind schwarz markiert. Die dunkle graue Markierung zeigt eine > 50% Homologie und die hell graue Markierung eine 50%ige Übereinstimmung in der Homologie zwischen den Proteinsequenzen. Kinase-Domäne (blauer Kasten), Serin-Prolin Domäne (hell blau Kasten), C-Domäne (lila Kasten). (B) Schematische Darstellung der Domänen Struktur von ATG1 der Hefe und den humanen Proteine ULK1 ULK2 und ULK3. Die ORFs sind in Rechtecken dargestellt.

3.3.1 Expressionsanalyse der ULK1, ULK2 und ULK3 Transkripte in humanen Geweben

Die vorausgegangenen Befunde führten zu der Frage nach der Expression der ULK Transkripte in verschiedenen humanen Geweben. Darüber hinaus sollte das Vorkommen verschiedener Spleißvarianten untersucht werden. Sowohl die Gewebespezifität der mRNA-Transkripte von ULK1, ULK2 und ULK3, als auch deren Größe in adulten humanen Geweben wurde mit dem „Human Multiple Tissue“ Northern Blot der Firma Clontech evaluiert.

Nach Hybridisierung mit der ULK1-Sonde wurde ein sehr starkes Signal für eine mRNA mit der Größe von ca. 6.0 kb in Herz und Plazenta nachgewiesen (Abb. 10A). Deutlich geringere Signalstärken waren für dieses Transkript in Gehirn, Skelett-Muskulatur, Niere und Leber nachweisbar. In Thymus, Milz, Dünndarm, Lunge, und

Blutzellen war die Expression sehr gering und im Dickdarm konnte nur ein sehr schwaches Signal detektiert werden.

Vom Transkript der ULK2 mRNA wurden zwei Spleißformen detektiert. Diese waren etwa 4.0 kb und 5.8 kb groß (Abb. 10B). Die detektierten Bandengrößen stimmten mit den in der Datenbank vorausgesagten Größen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/AceView>) überein. Dominant war vor allem die 4.0 kb Bande der mRNA im Herz. Daneben zeigte die 5.8 kb Bande eine hohe Expression im Gehirn und ein schwächeres Signal im Herz. In den anderen untersuchten Geweben waren die Signale der jeweiligen ULK2-Spleißformen deutlich schwächer, und im Dickdarm und Thymus waren die beiden ULK2-Spleißformen nicht nachweisbar.

Die zwei Spleißformen unterscheiden sich lediglich hinsichtlich der 3' UTR (*untranslated region*), die bei der Spleißform mit der Größe von 4,0 kB fehlt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/AceView>). Für die weiteren Untersuchungen wurden Oligonukleotide und siRNA Sequenzen gewählt, welche nicht im 3'UTR binden.

Für ULK3 wurden zwei Signale mit einer Transkriptionsgröße von etwa 3.2 kb und 2.8 kb detektiert (Abb. 10C). Die höchste Signalintensität zeigte die ULK3 mRNA in Gehirn, Herz, Milz, Niere, Leber und Dünndarm, während ein schwächeres Signal im Dickdarm, Skelett-Muskulatur, Plazenta und Blutzellen nachweisbar war. Nicht detektiert wurde ULK3 mRNA in Thymus und Lunge. Die identifizierten Bandengrößen korrelierten mit den aus der Datenbank vorausgesagten Größen (AceView). Im Unterschied zu ULK2 kodiert von den beiden ULK3 Spleißvarianten nur das 2.8 kb mRNA Transkript für das ganze, funktionsfähige ULK3 Protein. Das 3.2 kb mRNA Transkript enthält ein Stoppcodon in der Kinase-Domäne, welches zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation führt.

Die Gewebeverteilung der drei ULK mRNA Transkripte zeigte, dass ULK1 mit unterschiedlicher Stärke in allen untersuchten Geweben exprimiert wird. ULK2 mRNA Transkripte konnten hingegen in allen Geweben außer im Dickdarm und Thymus detektiert werden. Die mRNA ULK3 Transkripte konnten weder in Thymus, noch in Lunge nachgewiesen werden.

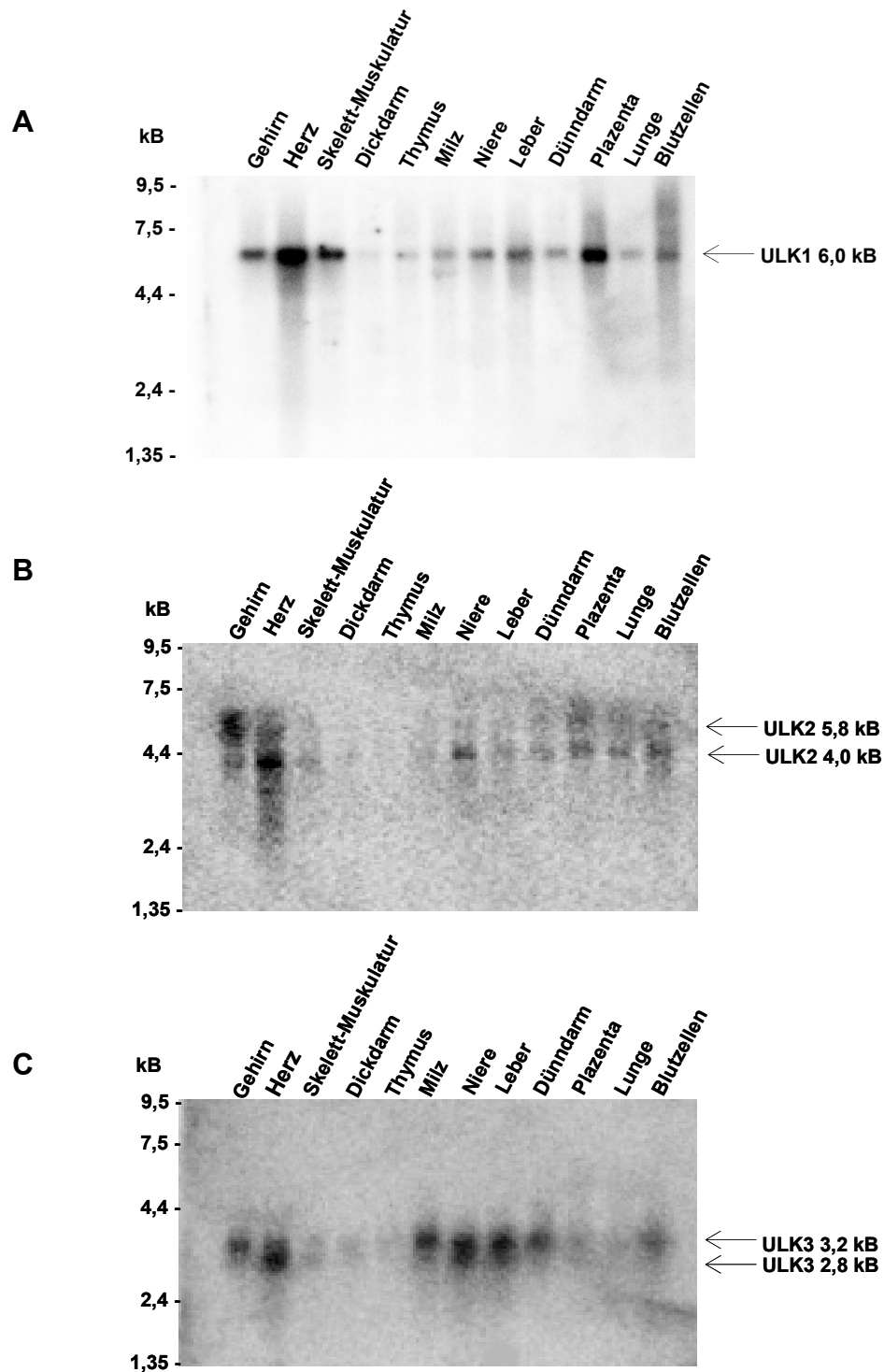


Abb. 10 Nachweis der ULK1-, ULK2- und ULK3-Transkripte in humanen Gewebe durch Northern Blot Analyse.

Die Detektion der ULK mRNA Transkripte erfolgte durch Northern Blot Analyse. Jede Bande enthielt 2 µg polyA⁺ RNA aus 12 verschiedenen menschlichen Geweben. **(A)** Die Hybridisierung erfolgte mit der für ULK1 spezifischen DNA-Sonde. **(B)** Die Hybridisierung erfolgte mit der für ULK2 spezifischen DNA-Sonde. **(C)** Die Hybridisierung erfolgte mit der für ULK3 spezifischen DNA-Sonde. Die ungefähre Größe der Banden wurde durch lineare Regression berechnet.

3.3.2 Quantifizierung der ULK1, ULK2 und ULK3 Gene in HeLa-Zellen

Die Quantifizierung der drei ULK mRNAs in HeLa-Zellen erfolgte durch quantitative RT-PCR. Die RNA wurde aus HeLa-Zellen präpariert und in cDNA revers transkribiert. Die Quantifizierung der Expression von ULK1-3 in HeLa-Zellen wurde in Relation zur Expression des Haushaltsgens β -Aktin bestimmt. Die qRT-PCR zeigte, dass ULK1 höher exprimiert wird als ULK2 und ULK3. Das Expressionsniveau von ULK2 wies nur etwa 22% und das von ULK3 nur 10% von ULK1 auf (Abb. 11). Die Expression von ULK3 in HeLa-Zellen war so gering, so dass ULK3 in die weiteren Untersuchungen nicht einbezogen wurde.

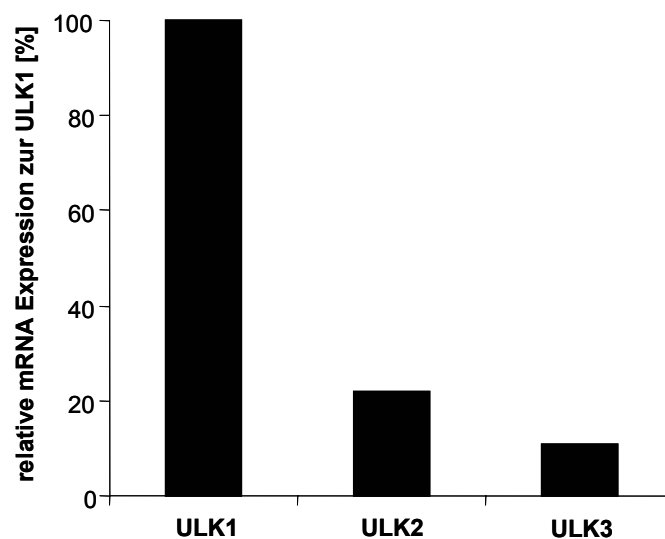


Abb.11 Relative Quantifizierung der ULK1, ULK2 und ULK3 Expression in HeLa-Zellen.

Aus nicht behandelten HeLa-Zellen wurde die RNA präpariert und in cDNA revers transkribiert. Für die Quantifizierung der ULK 1-3 Transkripte wurde bei der RT-PCR der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green verwendet. Die Expression der ULK-Transkripte wurde auf die Expression des Haushaltsgens β -Actin normalisiert.

3.3.3 Hemmung der Expression von ULK1 und ULK2 durch RNA-Interferenz

Um ULK1 und ULK2 funktionell zu untersuchen, sollte die Expression dieser Proteine inhibiert werden. Hierzu wurden sechs verschiedene siRNAs ausgewählt. Die Effektivität der siRNAs wurde nach transienter Transfektion von HeLa-Zellen und anschließende qRT-PCR-Analyse ermittelt. Für die effiziente Inhibition der mRNA Expression erwies sich die Konzentration von 30 nM siRNA als optimal. Während die 4 nM siRNA Konzentration eine geringe Gen-Knockdown-Effizienz zeigte, konnte die Effektivität von 30 nM nicht mit der 100 nM siRNA Konzentration weiter gesteigert werden.

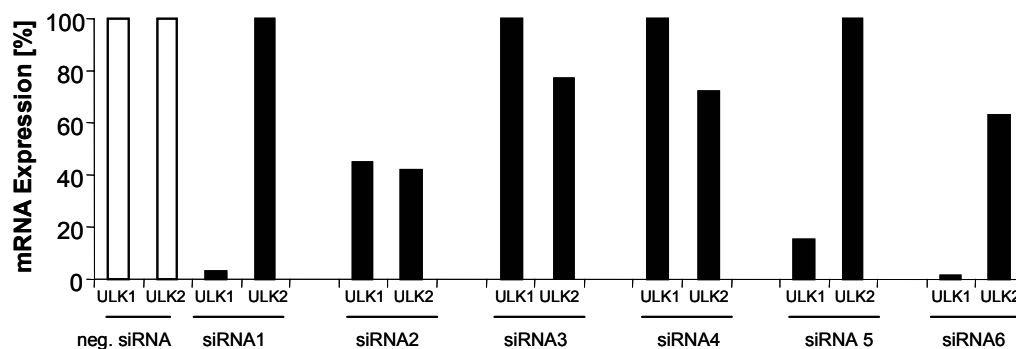


Abb. 12 Bestimmung der Spezifität und Effektivität verschiedener siRNAs zur Hemmung der Expression von ULK1 und ULK2 durch qRT-PCR.

HeLa-Zellen wurden mit sechs verschiedenen siRNAs (30nM) mit Lipofectamin transient transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert, die RNA präpariert und in cDNA revers transkribiert. Durch qRT-PCR wurde die Spezifität und Effektivität der siRNAs 1-6 ermittelt. Die Expression der ULK-Transkripte wurde auf die Expression des Haushaltsgens β -Actin normalisiert.

Die Transfektion mit der ULK1 siRNA1 zeigte eine 95%ige Effizienz gegen ULK1 und keinen Effekt gegen ULK2 (Abb. 12). Die restlichen siRNAs (2, 3, 4, 5, 6) hatten keine spezifische Knockdown-Effizienz gegen ULK2. Parallel konnten ULK1 und ULK2 durch die siRNA2 herunterreguliert werden. Für die weiteren Untersuchungen wurden mit der siRNA1 gegen ULK1 und um gleichzeitig ULK1 und ULK2 herunterzuregulieren wurde die siRNA2, in weiterem als „ULK1/2“ bezeichnet, verwendet.

3.4 Hemmung der Expression von ULK1 bzw. ULK1 und ULK2 durch siRNA-Interferenz führt zur Inhibition von Autophagie in HeLa-Zellen

Das Protein ATG1 gehört in der Hefe zu den Regulatoren der Autophagie-Induktion. Während in der Hefe die Mechanismen der Autophagie schon weitgehend charakterisiert wurden, sind die entsprechenden Abläufe in Säugerzellen noch weitgehend unklar. Um eine Beteiligung der Proteine ULK1 und ULK2 an der Autophagie in humanen Zellen zu untersuchen, wurde die Autophagosomenbildung in Abhängigkeit von der Expression dieser beiden ULK Proteine analysiert.

Ein spezifischer Marker für Autophagosomen ist *microtubule-associated protein light-chain 3* (LC3), das zum ATG8 der Hefe homolog ist. In der Zelle wird das zytoplasmatische LC3 direkt nach der Synthese am C-terminalen Glycin proteolytisch gespalten (LC3 I). Bei Induktion der Autophagie bindet LC3 I an Phosphatidylethanolamin (PE), welches Bestandteil der Isolationsmembran ist und als LC3-PE bezeichnet wird (Kabeya et al., 2000; Yorimitsu and Klionsky, 2005). Die Ratio LC3II/LC3I ist ein Maß für die Ausprägung von Autophagie und kann durch Western Blot Analyse untersucht werden.

Abbildung 13 zeigt das Verhältnis von LC3 II zu LC3 I in unbehandelten HeLa-Zellen und nach Induktion der Autophagie mit Rapamycin. Die Zellen wurden 48 Stunden vorher mit Kontroll-siRNA (neg. siRNA), spezifischer ULK1 siRNA1 oder mit ULK1/2 siRNA2 transfiziert. In mit neg. siRNA, siRNA1 oder siRNA2 transfizierten HeLa-Zellen, die nicht mit Rapamycin behandelt wurden, war die Ratio LC3II/LC3I sehr ähnlich. Die Behandlung mit dem Autophagie-Induktor Rapamycin dagegen führte in den mit neg. siRNA transfizierten Zellen zu Konversion von LC3I in LC3II.

Die Behandlung mit Rapamycin der mit siRNA1 oder siRNA2 transfizierten Zellen führte dagegen zu viel geringerer Konversion von LC3I in LC3II. Dieser Befund deutet darauf hin, dass ULK1 und eventuell ULK2 an der Autophagie beteiligt sind (Abb.13).

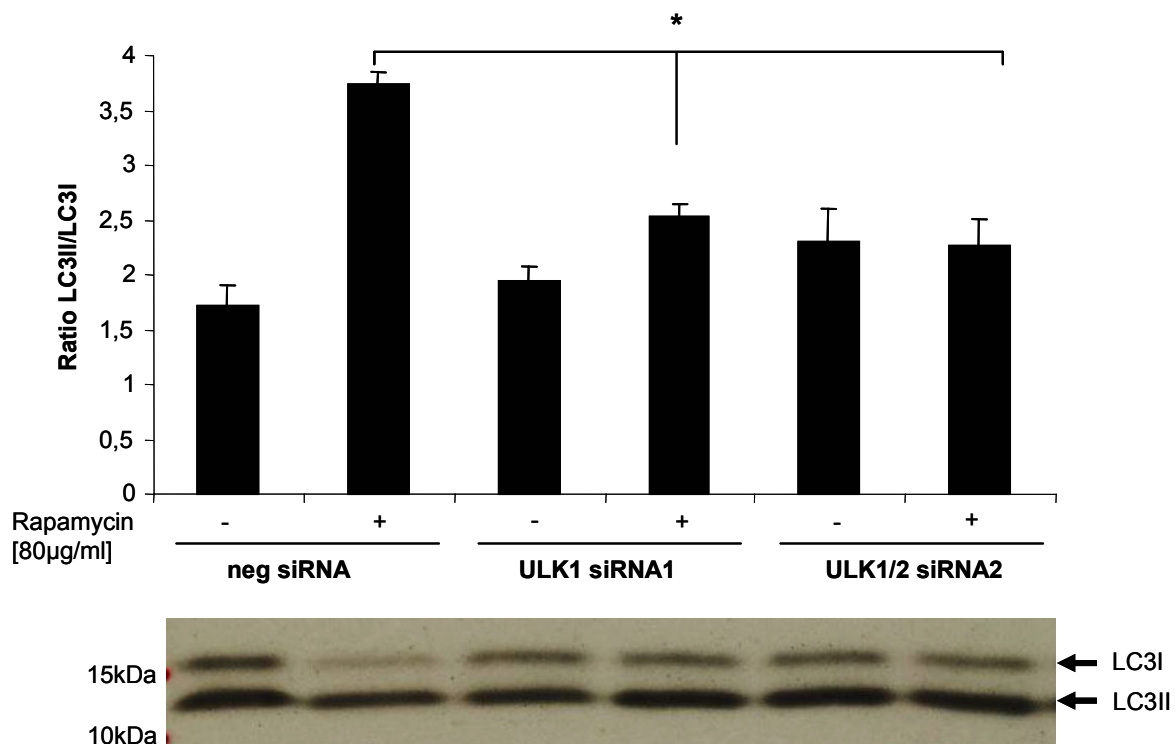


Abb. 13 Bestimmung der Ratio LC3II/LC3I in HeLa-Zellen nach Hemmung der Expression von ULK1 und ULK1/2 durch siRNA-Interferenz.

HeLa-Zellen wurden mit der neg., ULK1 und ULK1/2 siRNA (30nM) transfiziert. Nach 48 h Transfektion wurde mit Rapamycin (1h) Autophagie induziert. Durch Western Blot Analyse wurde die Konversion LC3I in LC3 II detektiert. * p-Wert < 0,05.

Um die Beteiligung von ULK1 und ULK2 an der Bildung von Autophagosomen zu verifizieren, wurden stabil EGFP-LC3 exprimierende HeLa-Zellen 48 Stunden nach Transfektion mit neg. siRNA, siRNA1 oder siRNA2 fluoreszenzmikroskopisch hinsichtlich der Bildung von LC3-positiven Autophagosomen untersucht. Eine exemplarische Aufnahme ist in Abbildung 14 A für den Zeitpunkt 2 h gezeigt.

Eine Quantifizierung der Autophagosomen in den transfizierten Zellen zeigte, dass unbehandelte, mit neg. siRNA transfizierte EGFP-LC3 exprimierende HeLa-Zellen eine geringe Anzahl von Autophagosomen haben, was der basalen konstitutiven Autophagie in diesen Zellen entspricht (Abb.14B). Die Transfektion von Zellen mit der ULK1/2 siRNA2 führte tendenziell zu einer Verringerung der basalen Autophagie in unbehandelten Zellen, während die alleinige Hemmung von ULK1 (siRNA1) die

basale Autophagie nicht signifikant beeinflusste. Nach zweistündiger Rapamycin-Behandlung war ein signifikanter Unterschied der Anzahl von Autophagosomen in den mit neg. siRNA transfizierten Kontrollzellen im Vergleich zu den mit ULK1 oder ULK1/2 siRNA transfizierten Zellen nachweisbar.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ULK1 und ULK2 an der Bildung von Autophagosomen in HeLa-Zellen beteiligt zu sein scheinen. Die stärkere Hemmung der Bildung von Autophagosomen in mit ULK1/2 siRNA2 behandelten Zellen, lässt auf eine Beteiligung sowohl von ULK1 als auch von ULK2 an der Bildung von Autophagosomen in humanen Zellen schließen.

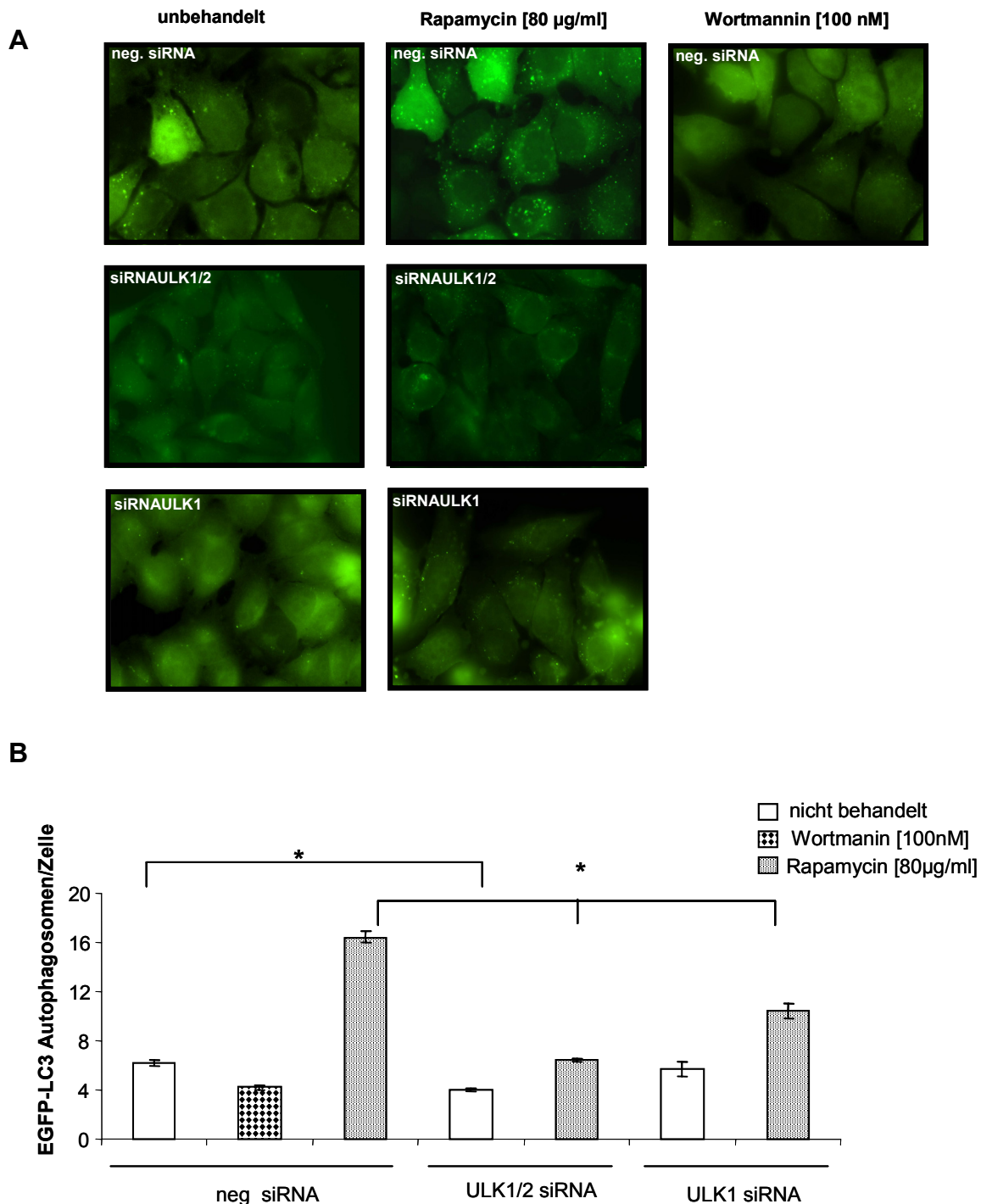


Abb. 14 Knockdown von ULK1 und ULK1/2 führt zur Hemmung von Autophagie.

EGFP-LC3 stabil exprimierende HeLa-Zellen wurden für 48 h mit 30nM siRNA (neg., ULK1/2 und ULK1) transient transfiziert. Nach 48 h wurde in den transfizierten EGFP-LC3 exprimierende HeLa-Zellen Autophagie durch Zugabe von Rapamycin (2h) induziert oder mit Wortmannin (2h) inhibiert. (A) Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von EGFP-LC3-positiven Autophagosomen zu dem Zeitpunkt 2 Stunden (B) Quantitative Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Pro Experiment wurden 100 Zellen auf LC3-positive Autophagosomen gezählt. Diese Daten repräsentieren die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. * p-Wert < 0,01

3.5 ULK1 und ULK2 sind für die Aufnahme von *S. aureus* in Autophagosomen notwendig

Vorausgehende Untersuchungen in unserem Institut zeigten, dass *S. aureus* Autophagosomen zur intrazellulären Replikation nutzt und in der Folge den Tod der Wirtszelle induziert (Schnaith et al., 2007).

Um die Beteiligung der Proteine ULK1 und ULK2 an der Aufnahme von *S. aureus* in Autophagosomen zu untersuchen, wurde die subzelluläre Lokalisation von *S. aureus* während der Infektion von EGFP-LC3 exprimierenden HeLa-Zellen verfolgt. 48 Stunden nach Transfektion mit neg. siRNA, siRNA1 oder siRNA2 wurden die Zellen mit dem wt *agr S. aureus* Stamm ATCC29213 mit einer MOI20 infiziert und anschließend in einem Zeitraum von fünf Stunden beobachtet.

In Abbildung 15 A sind exemplarisch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von infizierten Zellen drei Stunden nach Infektion gezeigt. In den mit neg. siRNA transfizierten Kontrollzellen ist deutlich die Kolokalisation von *S. aureus* mit LC3-positiven Kompartimenten zu sehen. In den mit ULK1/2 siRNA transfizierten Zellen ist hingegen eine sehr geringe Anzahl an LC3-positiven Kompartimenten und geringfügige Kolokalisation (<10%) von LC3-positiven Kompartimenten mit *S. aureus* zu beobachten. In den mit ULK1 siRNA behandelten Zellen wurde eine ähnlich geringe Kolokalisation beobachtet (<20%) (Abb.15A).

Der zeitliche Verlauf der Kolokalisation von *S. aureus* mit LC3-positiven Kompartimenten zeigt, dass drei Stunden nach Infektion in den mit neg. siRNA transfizierten Zellen circa 95 % der *S. aureus* mit den LC3-positiven Kompartimenten kolokalisiert waren. Fünf Stunden nach Infektion konnte in diesen Zellen eine Kolokalisation von *S. aureus* mit LC3-positiven Kompartimenten nicht mehr nachgewiesen werden. In den mit ULK1 oder ULK1/2 siRNA transfizierten Zellen blieb dagegen eine Steigerung der Kolokalisation von *S. aureus* mit LC3-positiven Kompartimenten aus (Abb. 15B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass ULK1 und ULK2 eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme von *S. aureus* in Autophagosomen haben.

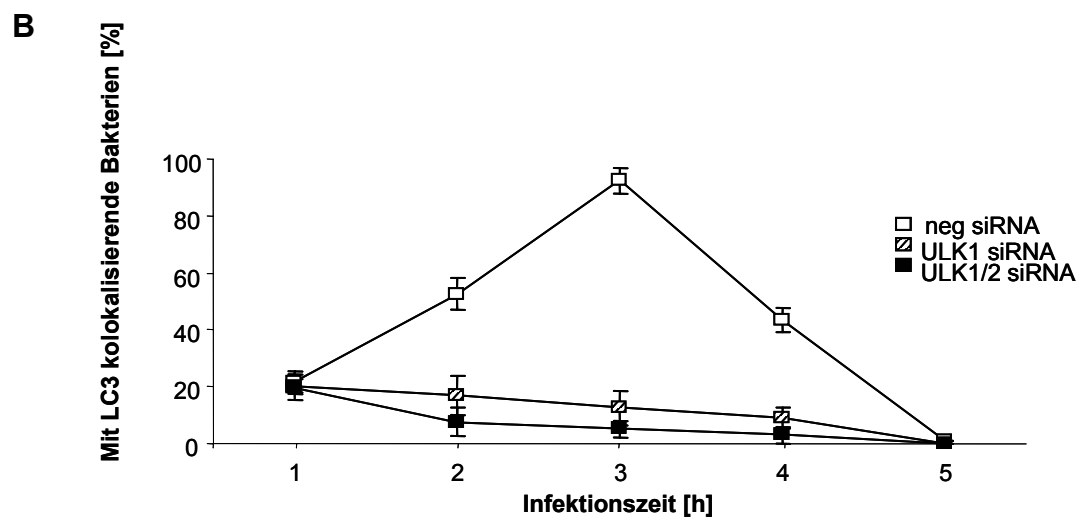
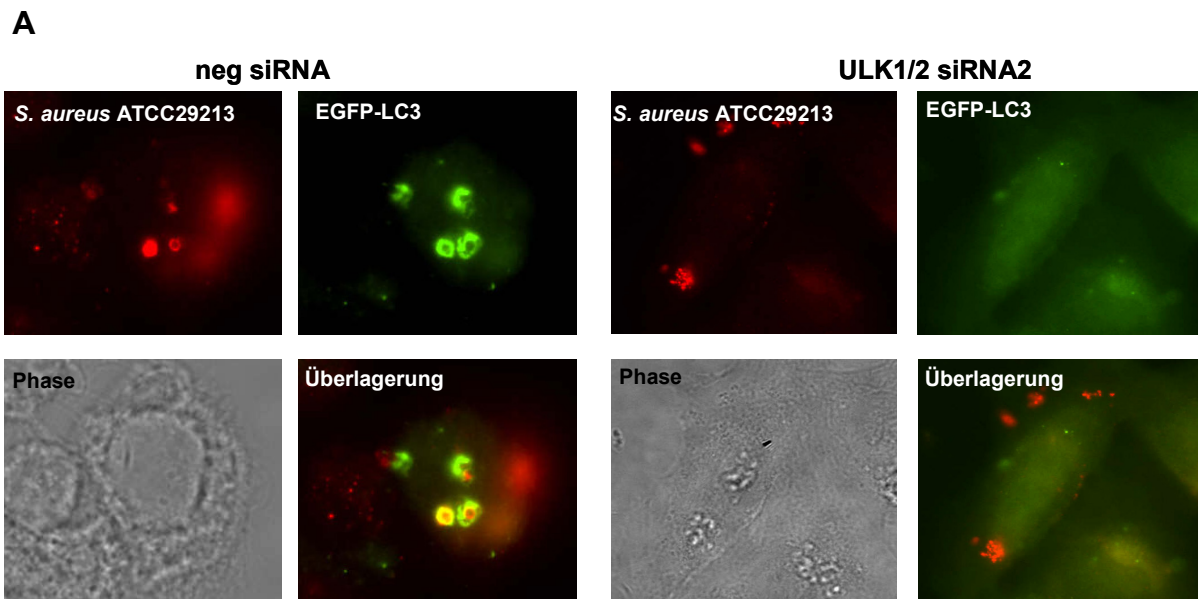


Abb. 15 Knockdown von ULK1 und ULK1/2 verhindert die von *S. aureus* mit EGFP-LC3 Kolokalisation.

EGFP-LC3 HeLa-Zellen wurden mit 30 nM siRNA (neg., ULK1/2 und ULK1) transient transfiziert und 48 h nach Transfektion mit dem wt *agr* *S. aureus* Stamm ATCC29213 mit einer MOI 20 infiziert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert und die Bakterien anschließend mit Protein A spezifischem Antikörper, gefolgt von einem Alexa 568-markierten Sekundärantikörper gefärbt. **(A)** Exemplarische Aufnahmen von mit neg. und ULK1/2 siRNA transfizierten EGFP-LC3 HeLa-Zellen drei Stunden nach Infektion. **(B)** Kinetik der Kolokalisation von *S. aureus* mit EGFP-LC3 in EGFP-LC3 exprimierenden HeLa-Zellen transfiziert mit den angegebene siRNAs und infiziert mit wt *S. aureus* ATCC29213. Pro Zeitpunkt wurden 100 Zellen in jedem Experiment auf fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

3.6 *S. aureus* induzierter Zelltod verläuft ULK1 und ULK2 abhängig

Die Aufnahme von *S. aureus* in Autophagosomen ist für das intrazelluläre Überleben notwendig und Voraussetzung für die *S. aureus*-Zytotoxizität (Schnaith et al., 2007). Die Bedeutung der ULK-Proteine für das intrazelluläre Überleben von *S. aureus* und die Wirtszell-Zytotoxizität wurde durch Quantifizierung der intrazellulären Bakterienlast und der Vitalität infizierter HeLa-Zellen nach Hemmung der ULK-Expression durch siRNA untersucht.

HeLa-Zellen wurden transfiziert mit neg., ULK1 oder ULK1/2 siRNA und 48 Stunden nach Transfektion mit dem wt *agr S. aureus* ATCC29213 mit einer MOI 200 infiziert. Die intrazelluläre Bakterienlast und die Vitalität der Wirtszellen wurden 24 Stunden nach Infektion bestimmt.

Der Knockdown von ULK1 oder ULK1/2 führte zu einer deutlich reduzierten Menge intrazellulärer Bakterien im Vergleich zu den nicht transfizierten oder mit neg. siRNA transfizierten Zellen (Abb. 16A). Dieses Ergebnis bestätigt unsere Vorbefunde, wonach wt *S. aureus* Autophagosomen für die intrazelluläre Replikation als Replikationsnische benötigt.

Die Bestimmung der Vitalität 24 Stunden nach Infektion der mit ULK1 oder ULK1/2 siRNA transfizierten Zellen zeigt, dass ein deutlich höherer Anteil der mit ULK1 siRNA1 oder ULK1/2 siRNA2 transfizierten Zellen im Vergleich zu den mit neg. siRNA behandelten HeLa-Zellen noch vital ist (Abb. 16B).

Insgesamt zeigen diese Befunde deutlich die notwendige Rolle von ULK1 und/oder ULK2 für das intrazelluläre Überleben von *S. aureus* und der *S. aureus*-Wirtszell-Zytotoxizität.

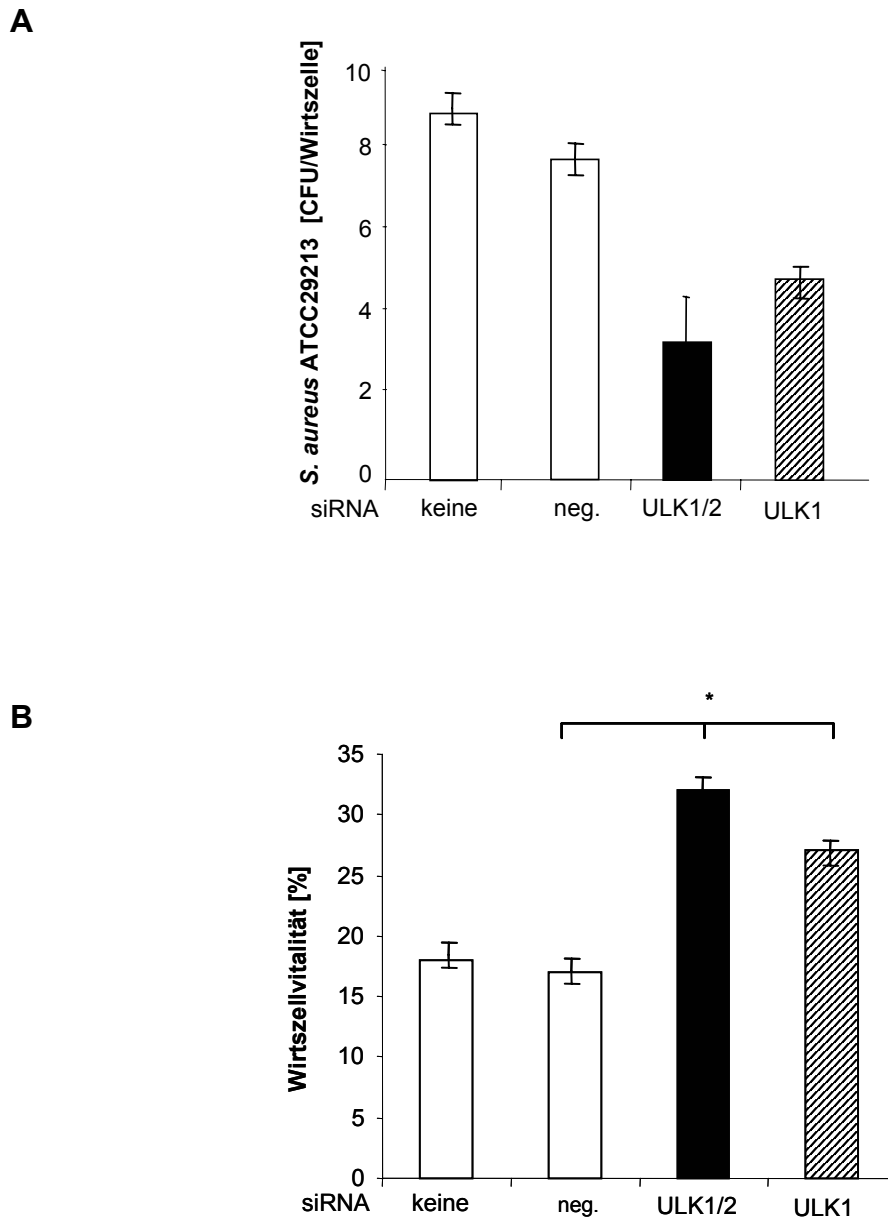


Abb. 16 Bakterienlast und Wirtszellvitalität nach Infektion von HeLa-Zellen mit *S. aureus* in Abhängigkeit von der Inhibition von ULK1 und ULK1/2.

HeLa-Zellen wurden mit 30 nM der neg., ULK1/2 und ULK1 siRNA transient transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen mit dem wt *agr S. aureus* Stamm ATCC29213 gemäß dem Standardprotokoll mit einer MOI200 infiziert. **(A)** Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Lysate in Verdünnungsstufen auf Mueller-Hilton-Platten ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde die Bakterienmenge mittels CFU-Analyse ermittelt und die Bakterienlast pro Zelle berechnet. **(B)** Die Wirtszellvitalität wurde 24 h nach Infektion mit dem Trypanblauausschlußverfahren bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. *p-Wert < 0,05

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit zielt auf die Aufklärung des zytotoxischen Mechanismus von intrazellulären *S. aureus*, die Autophagie-vermittelt Wirtszelltod induzieren. Hierzu wurde mit Microarray-Analysen das Transkriptionsprofil nicht-professioneller Phagozyten nach Infektion mit *S. aureus* über die Zeit erhoben. Als Wirtszellen wurden HeLa-Zellen benutzt. Um die spezifische Reaktion von HeLa-Zellen auf Infektion mit zytotoxischen wt *agr* *S. aureus* zu charakterisieren, wurden parallel auch mit isogenen, nicht-zytotoxischen *agr*^{-/-} *S. aureus* infizierte HeLa-Zellen untersucht. Bereits drei Stunden nach Infektion mit wt *agr* *S. aureus* ist die Transkription von ULK1, dem humanen Homolog des ATG1 aus *S. cerevisiae* signifikant erhöht. ATG1 ist in *S. cerevisiae* notwendig für die Initiation der Autophagie.

Mit BLAST-Analyse wurde neben den zwei bislang bekannten humanen Homologen von ATG1, ULK1 und ULK2 ein zusätzliches Homolog, das ULK3 identifiziert. In Northern Blot Analysen wurde gezeigt, dass in den meisten humanen Geweben die Transkripte ULK1-3 gemeinsam, jedoch unterschiedlich stark exprimiert werden.

Im Folgenden wurde untersucht, welche Rolle ULK1 oder parallel ULK1/2 im Verlauf der Infektion mit *S. aureus* in HeLa-Zellen spielt. Nach Hemmung der Expression von ULK1 oder parallel ULK1/2 durch RNA-Interferenz wurde in nicht infizierten HeLa-Zellen eine reduzierte Bildung von Autophagosomen beobachtet. Nach Infektion mit *S. aureus* wurde in HeLa-Zellen, deren Expression von ULK1 oder parallel ULK1/2 herunterreguliert war, eine deutlich reduzierte Bakterienlast bei gleichzeitig erhöhter Vitalität der Wirtszellen beobachtet. ULK1 und eventuell ULK2 sind wesentlich für die Aufnahme von *S. aureus* in Autophagosomen, für die intrazelluläre Replikation dieser Bakterien und letztlich für den zytotoxischen Effekt von *S. aureus* auf die Wirtszelle.

4.1 Transkriptionsprofil von HeLa-Zellen nach Infektion mit *S. aureus*

Um die Reaktion von HeLa-Zellen auf die Infektion mit *S. aureus* zu charakterisieren, wurden HeLa-Zellen mit dem zytotoxischen wt *agr* *S. aureus* Stamm NCTC8325, oder mit dem hierzu isogenen nicht-zytotoxischen *agr*^{-/-} *S. aureus*, Stamm NRS151, infiziert.

In der Vergangenheit wurde die Interaktion von *S. aureus* und Wirtszellen untersucht, in dem verschiedene Zelltypen mit Bestandteilen von *S. aureus* inkubiert wurden, z. B. mit Lipoteichonsäure (LTA), Peptidoglykan (PGN), Protein A, oder Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1. Ferner wurden Wirtszellen mit lebenden, Hitze- oder metabolisch-inaktivierten *S. aureus* co-inkubiert. Die Reaktionen der Wirtszellen wurden meistens mit RT-PCR oder Northern Blot Analysen nachgewiesen. Deshalb ist der Nachteil dieser Studien, dass mit ihnen nur ein begrenzter und vorher definierter Teil der zellulären Reaktionen gemessen werden konnte (Lin et al., 2001; Yao et al., 1995).

Für die Untersuchung komplexer zellbiologischer Prozesse, wie den Interaktionen zwischen Wirtszellen und Pathogenen liefern Microarray-Analysen hingegen weit umfassendere Daten. Es wurden bereits einigen Microarray-Analysen zu Untersuchung der Reaktionen von Monozyten, Makrophagen, Epithelzellen oder Endothelzellen auf die Infektion mit *S. aureus* oder auf einzelne Virulenzfaktoren dieses Bakteriums durchgeführt. So haben Feezor et al. berichtet, dass Leukozyten aus Vollblut nach Co-Inkubation mit Hitze-inaktivierten *S. aureus* vor allem proinflammatorische Mediatoren der IL1-Superfamilie, wie IL1 β und IL18 exprimieren (Feezor et al., 2003). Die Inkubation von humanen Monozyten mit PGN oder metabolisch-inaktivierten *S. aureus* führte ebenfalls zu einer Hochregulierung proinflammatorischer Mediatoren, wie den Chemokinen IL8 und MIP-1 α (Wang et al., 2000). Matussek und Kollegen beobachteten in Endothelzellen nach Infektion mit *S. aureus* die Transkriptionsänderung von SMAD3 und der *heat shock* Proteine 90 kDa und 70 kDa, sowie von den proinflammatorischen Mediatoren IL6 und IL8 (Matussek et al., 2005). Auch in Epithelzellen wurde nach Infektion mit *S. aureus* Chemokin IL8 und die Zytokine IL6, IL1 α und IL1 β nachgewiesen (Matussek et al., 2005; Peterson et al., 2005).

Obwohl für die o. g. Untersuchungen verschiedene Zelltypen, Infektionszeiten und Stämme von *S. aureus* eingesetzt wurden, ist immer wieder die Expression proinflammatorischer Mediatoren in den Wirtszellen beobachtet worden.

In der hier vorgelegten Arbeit durchgeführte Microarray-Analyse zeigte mit 230 Genen eine größere Anzahl von differentiell exprimierten Genen in Wirtszellen nach Infektion mit *agr*^{-/-} *S. aureus* als nach Infektion mit wt *agr* *S. aureus* (79 Gene). Nach Infektion mit dem *agr*^{-/-} *S. aureus* Stamm NRS151 wurden in HeLa-Zellen vor allem eine pleiotrope Signalkaskaden aktiviert. So wurde u. a. die Transkription der Gene der NFκB- (z.B. NFκB1; NFκBIE; TNIP1) und TGF-β- (z.B. SMAD3) Signaltransduktionswege induziert. Ebenfalls wurden die proinflammatorischen Mediatoren IL8, IL11 und IL6, sowie weitere Transkriptionsfaktoren, wie u. a. HLX1, SOX13 und SMAD3, sowie das *heat shock* 70 kDa Protein detektiert.

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass die nicht-zytotoxischen *S. aureus* Stämme Abwehrmechanismen aktivieren, die das Eindringen der Bakterien in die Wirtszelle signalisieren und vermutlich zur Eliminierung der intrazellulären Bakterien führen.

Verglichen mit *agr*^{-/-} *S. aureus* ruft die Infektion mit wt *agr* *S. aureus* in HeLa-Zellen hinsichtlich der Anzahl der Gene und dem zeitlichen Verlauf eine deutlich andere transkriptionelle Antwort hervor. Die in den mit wt *agr* *S. aureus* infizierten HeLa-Zellen differentiell exprimierten 79 Gene können sieben funktionellen Gruppen zugeordnet werden. Es handelt sich um Gene, die für Strukturproteine (z. B. CTNNA1, YWHAG), Enzyme (z. B. AKR1C4, CSNK1A1, ULK1), die Transkriptionsmaschinerie (z. B. CCNH, SSB, HIF1-α), Vesikeltransport, -sortierung und -regulierung (z. B. CLTC, SEC63) und für Gene des apoptotischen Signalwegs (CROP und TXNL1) kodieren. Im Gegensatz zu den mit *agr*^{-/-} *S. aureus* infizierten HeLa-Zellen wurde jedoch keine Transkription von proinflammatorischen Mediatoren beobachtet.

Bereits Yao und Kollegen hatten in Endothelzellen gezeigt, dass nicht alle *S. aureus* Stämme die Transkription proinflammatorischer Mediatoren der Wirtszelle aktivieren (Yao et al., 1995). Diese Daten wurden von der Gruppe von Moreilhon durch Microarray-Analysen bestätigt (Moreilhon et al., 2005). Für ihre Untersuchungen verwendeten beide Gruppen den *S. aureus* Stamm 8325-4, der von dem in dieser Arbeit verwendeten *S. aureus* NCTC8325 abstammt.

Das transkriptionelle Reaktionsmuster von HeLa-Zellen nach Infektion mit dem *agr*^{-/-} *S. aureus*, lässt vermuten, dass wt *agr S. aureus* von HeLa-Zellen nicht als „gefährlicher Eindringling“ erkannt wird. Es ist unklar, ob der wt *agr S. aureus* sich durch veränderte Oberflächen „maskiert“ oder durch sezernierte Virulenzfaktoren mit der Erkennung durch *Pattern-recognition receptors* beziehungsweise mit den folgenden Signalkaskaden interferiert.

Auffällig in den in dieser Arbeit erlangten Daten ist, dass der Transkriptionsfaktor HIF-1 α als einziges Gen zu allen Zeitpunkten nach Infektion mit dem wt *agr S. aureus* Stamm in HeLa-Zellen hochreguliert ist. Moreilhon und Kollegen haben bereits die Transkription von Genen beschrieben, welche durch HIF-1 α reguliert werden. Während diese Gruppe vermutete, dass HIF-1 α eine umfassende regulatorische Rolle in der Wirtszelle während der *S. aureus* Infektion spielen könnte (Moreilhon et al., 2005), deuten neuere Untersuchungen auf eine Beteiligung von HIF-1 α an der Apoptose durch Aktivierung von Caspase 8 und an der Autophagie (Bohensky et al., 2007).

In der hier durchgeführten Microarray–Analyse ergab sich bereits drei Stunden nach Infektion von HeLa-Zellen mit wt *agr S. aureus* eine signifikante Transkriptionsänderung des Gens der unc-51-like Kinase 1 (ULK1). Humanes ULK1 ist homolog zu ATG1 von *S. cerevisiae*, welches an der Initiation der Autophagie beteiligt ist (Kuroyanagi et al., 1998; Matsuura et al., 1997). ULK1 wurde bis jetzt in keiner Transkriptionsanalyse von Wirtszellen während einer Infektion mit *S. aureus* identifiziert. Aufgrund der möglichen Rolle von ULK1 an der Initiation der Autophagie und der in unserem Institut kürzlich nachgewiesenen Abhängigkeit der Zytotoxizität von *S. aureus* von der Autophagie, wurde ULK1 in dieser Arbeit eingehender untersucht.

4.2 Menschliche Zellen haben drei zum ATG1 der Hefe homologe Gene: ULK1, ULK2 und ULK3

Zu ATG1 von *S. cerevisiae* homolog ist das UNC-51 von *C. elegans*, sowie ULK1 von *Homo sapiens* (Kuroyanagi et al., 1998). In der Maus wurden bislang zwei zu UNC-51 von *C. elegans* Homologe Proteine identifiziert, ULK1 und ULK2 (Yan et al., 1998; Yan et al., 1999).

In dieser Arbeit wurde mittels BLAST-Analyse zusätzlich zu ULK1 und ULK2, als den zwei bislang in Säugetieren bekannten homologen von ATG1 aus *S. cerevisiae* ein weiteres Homolog identifiziert, die „unc-51-like Kinase“ 3 (ULK3). Die vorhergesagten Aminosäuresequenzen der humanen ULK1, ULK2 und ULK3 Proteine haben jeweils eine Homologie von 38%, 37% und 39% zu der Kinase-Domäne von ATG1 der Hefe.

Die Serin/Threonin-Kinase ATG1 besteht aus einer Amino-terminalen Kinase-Domäne, einer zentralen Prolin-Serin-Domäne und einer Carboxy-terminalen-Domäne (Straub et al., 1997). Während ULK1 und ULK2 ebenfalls diese drei Domänen besitzen, besteht ULK3 nur aus der Serin/Threonin-Kinase-Domäne. Die Prolin-Serin-Domänen von ULK1 und ULK2 haben nur eine geringe Homologie zu ATG1 aus *S. cerevisiae* und die Carboxy-terminalen-Domänen von ULK1 und ULK2 haben keine Homologie zur der von ATG1.

In *S. cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Dictyostelium discoideum* und *Caenorhabditis elegans* wurden bislang nur je ein Homolog zu ATG1 detektiert. Die in der Maus vorkommenden Homologe ULK1 und ULK2 weisen untereinander eine höhere Homologie auf als zu UNC-51 aus *C. elegans*, so dass eine Verdopplung, und mit ULK3, eine Verdreifachung von ATG1 der Hefe in *Homo sapiens* vermutet werden kann (Kuroyanagi et al., 1998).

Während der Evolution von Einzellern zu höheren Eukaryoten kommt es durchaus häufig zur Entstehung mehrere Homologe eines Gens, die sogar unterschiedliche Funktionen in den höheren Eukaryoten übernehmen (Paraloge). Ein Beispiel sind die drei zum ATG8 der Hefe homologen Proteine LC3, GABARAP und GATE-16 des Menschen, von denen nur das LC3 an der Autophagie beteiligt ist, während für GATE-16 und GABARAP bislang keine Funktionen in der Autophagie gezeigt wurden. Sie sind aber an Vesikeltransport und Membranfusionsprozessen in anderen Zusammenhängen beteiligt (Mizushima et al., 2002).

Für die mRNA von ULK1 in humanen Geweben haben Kuroyanagi et al., (1998) eine ähnliche ubiquitäre Verteilung gezeigt wie sie in dieser Arbeit nachgewiesen wurde.

Auch ULK2 und ULK3 sind weit verbreitet, wobei ULK2 nicht im Dickdarm und Thymus, und ULK3 nicht in Thymus und Lunge detektiert werden konnten. In der Maus sind die Transkripte von ULK1 und ULK2 ebenfalls ubiquitär exprimiert (Yan et al., 1998; Yan et al., 1999).

In dieser Arbeit wurde in HeLa-Zellen mit qRT-PCR massiv unterschiedliche Expressionsniveaus der drei ULK mRNAs nachgewiesen. Die mRNA von ULK2 machte nur etwa 20% der von ULK1 aus und ULK3 machte weniger als 10% von ULK1 aus. Wegen dieser geringen Expression und durch die fehlende Carboxy-Domäne deutlich andere Struktur wurde ULK3 in dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert.

4.3 Beteiligung von ULK1 und/oder ULK2 an der Autophagie

ATG1 in *S. cerevisiae* und seine Homologe in *Drosophila melanogaster*, *Dictyostelium discoideum* und *Caenorhabditis elegans* sind in Autophagie-abhängige Wachstums- und Entwicklungsprozesse eingebunden (Melendez et al., 2003; Otto et al., 2004; Scott et al., 2004). So können ATG1 Deletionsmutanten von *Drosophila* im späten Puppenstadium bei Aminosäurenmangel keine Autophagie aktivieren und sterben in Folge dessen. Außerdem zeigten ATG1 Deletionsmutierte adulte Fliegen ein Defekt an der Induktion von Autophagie (Lee et al., 2007; Scott et al., 2007).

Die Deletion von UNC-51 in *C. elegans* führt zu einem Defekt in der Bildung von Autophagosomen, mit folgender Schädigung in der axonalen Elongation und Reduktion der Körpergröße. Überdies wurde gezeigt, dass der so genannte Dauerzustand von *C. elegans* mit der Zunahme von Autophagie assoziiert ist (Aladzcity et al., 2007; Melendez et al., 2003).

Die exakte Funktion der Homologe von ATG1 bei der Initiation von Autophagie ist allerdings auf molekularer Ebene weder in *Drosophila melanogaster*, *Dictyostelium discoideum*, *Caenorhabditis elegans* oder in Säugetieren geklärt. In der Hefe wird Autophagie durch die Komplexbildung von ATG1 und ATG13 initiiert. Durch Inhibierung von TOR wird ATG13 dephosphoryliert und kann dann an ATG1 binden. Dieser Komplex wird durch ATG17 stabilisiert und ist für die Initiation der Bildung der Autophagosomen notwendig (Kabeya et al., 2005).

Die mutmaßliche Beteiligung von ULK1 an der Autophagie in Säugerzellen wurde erstmals von Young et al. (2006) aus Beobachtungen in HEK293-Zellen geschlossen. Diese Autoren zeigten, dass die subzelluläre Verteilung von ULK1 zwischen dem Trans-Golgi-Netzwerk und LC3-positiven Kompartimenten abhängig

von ULK1 ist (Young et al., 2006). Chan et al., (2007) zeigten, dass durch den Knockdown von ULK1 in HEK293-Zellen oder HeLa-Zellen, die Bildung von Autophagosomen blockiert wird (Chan et al., 2007).

In dieser Arbeit wurde die Funktion von ULK1 nach Hemmung der Expression durch RNA-Interferenz untersucht. Die „siRNA1“ reduzierte die Expression von ULK1 um 95%. Nach Behandlung mit siRNA1 wurde eine deutlich reduzierte Konversion von LC3I zu dem an PE gebundenen LC3 II beobachtet. Bestätigt wurden diese Befunde durch die stark reduzierte Bildung von LC3-positiven Autophagosomen.

Zur Funktion von ULK2 gibt es weit weniger Vordaten als zu der von ULK1. Die Überexpression von ULK2 führt in Säugerzellen zum apoptotischen Zelltod. Ob dieses auch über eine Initiation der Autophagie erfolgt, ist nicht geklärt (Yang et al., 2007).

In dieser Arbeit wurden verschiedene siRNAs eingesetzt, die spezifisch zum Abbau der mRNA von ULK2 führen sollten. Den stärksten, aber keineswegs spezifischen Effekt hatte die „siRNA2“. Sie reduziert die Expression von ULK2 aber auch von ULK1 zu je ca. 45%. Mit siRNA2 behandelte HeLa-Zellen konvertierten nach Behandlung mit Rapamycin das LC3 I wesentlich geringer in LC3 II und bildeten kaum noch Autophagosomen. Auffällig ist, dass in den mit siRNA2 behandelten Zellen sogar die basale Autophagie reduziert ist, was an der verringerten Anzahl von Autophagosomen ohne Induktion durch Rapamycin beobachtbar ist.

Angesichts des nur einerseits mäßigen Effektes der siRNA2 auf die Expression der mRNA von ULK1 und ULK2 und andererseits einer sehr starken Hemmung der Konversion von LC3 und einer verringerten basalen Menge an Autophagosomen kann vermutet werden, dass ULK1 und ULK2 einen synergistischen Effekt haben. Eine derartige Hypothese muss in zukünftigen Untersuchungen verfolgt werden.

4.4 ULK1 und ULK2 sind entscheidend am zytotoxischen Effekt von intrazellulären *S. aureus* beteiligt

In einer vorhergehenden Arbeit aus diesem Institut wurde gezeigt, dass zytotoxische wt *agr S. aureus* über den phagoendosomal Weg in Autophagosomen gelangen. *S. aureus* nutzt die Autophagosomen als intrazelluläre Replikationsnische bevor die

Bakterien aus dieser ausbrechen und den Wirtszelltod induzieren (Schnaith et al., 2007). Dabei wurde bereits gezeigt, dass der von *S. aureus* induzierte Wirtszelltod abhängig von ATG5 ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob auch ULK1 und ULK2 an der Autophagie von *S. aureus* und an dem ausgeübten zytotoxischen Effekt beteiligt sind.

Eine Stunde nach Infektion waren in den mit siRNA1, siRNA2 und neg. siRNA behandelten EGFP-LC3 HeLa-Zellen etwa 20% der wt *agr S. aureus* mit LC3 kolokalisiert. In den mit siRNA1 und siRNA2 behandelten EGFP-LC3 HeLa-Zellen blieb eine Steigerung der Kolokalisation aus. Im Gegensatz dazu waren in mit neg. siRNA behandelten Kontrollzellen drei Stunden nach Infektion 95% der *S. aureus* mit LC3 kolokalisiert. Diese Ergebnisse bestätigen die Daten von Schnaith et al. (2007), die für einen anderen wt *agr S. aureus* Stamm auch eine über 90%-ige Kolokalisation von *S. aureus* mit LC3 zeigten.

Nach Behandlung mit siRNA1, die die Expression von ULK1 hemmt, war in EGFP-LC3 HeLa-Zellen die Kolokalisation von *S. aureus* mit LC3 ebenfalls massiv reduziert. In Folge dessen kommt es zu einer deutlich höheren Wirtszellvitalität von ca. 28% der infizierten HeLa-Zellen im Vergleich zu den ca. 18% der Kontrollzellen. Die gleichzeitige Hemmung der Expression von ULK1 und ULK2 mit siRNA2 steigerte die Überlebensrate sogar noch mehr. Parallel dazu war in HeLa-Zellen behandelt mit siRNA1 oder siRNA2 die intrazelluläre Bakterienlast 24 Stunden nach Infektion auf ca. 50% der in den Kontrollzellen nachweisbaren Bakterienmenge verringert.

Autophagosomen sind bereits als Replikationsnische einiger anderen Bakterienarten identifiziert worden. *Porphyromonas gingivalis* und *Brucella abortus* induzieren die Fusion ihrer phagoendosomalen Kompartimente mit späten Autophagosomen (Dorn et al., 2001; Pizarro-Cerda et al., 1998) und *Burkholderia cenocepacia* benutzt Autophagosomen als intermediäres Vesikel, um in das endoplasmatische Retikulum zu gelangen und sich dort zu vermehren (Sajjan et al., 2006).

Für die in dieser Arbeit untersuchten *S. aureus* müssen noch die durch das *agr*-System regulierten Virulenzfaktoren identifiziert werden, mit denen der Erreger die Bildung von Autophagosomen induziert oder diese modifiziert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu dem Schluss, dass die ATG1 Homologen ULK1 und ULK2 bei der Autophagie in humanen Zellen eine wichtige Rolle spielen und gemeinsam an der Autophagosomenbildung beteiligt sind. Außerdem sind ULK1 und ULK2 Voraussetzung für die intrazelluläre Replikation in Autophagosomen und essentiell für den zytotoxischen Effekt von wt *agr S. aureus* in HeLa-Zellen.

5 Zusammenfassung

S. aureus ist in der Lage verschiedene nicht-professioneller Phagozyten zu infiltrieren und zu töten. Diese zytotoxischen *S. aureus* Isolate besitzen die Fähigkeit *agr*-vermittelt den Autophagieweg zu unterlaufen, um in Autophagosomen zu replizieren und schließlich Wirtszelltod zu induzieren.

In dieser Arbeit wurde das Transkriptionsprofil von HeLa-Zellen nach Infektion mit zytotoxischen wt *agr* *S. aureus* versus nicht-zytotoxischen *agr*^{-/-} *S. aureus* verglichen. Auf nicht-zytotoxische *S. aureus* reagieren HeLa-Zellen mit der differentiellen Expression von 230 Genen innerhalb der ersten sieben Stunden nach Infektion, während die Reaktion auf den zytotoxischen wt *agr* *S. aureus* mit nur 79 Genen sehr viel begrenzter ist.

Unter den bereits drei Stunden nach Infektion von HeLa-Zellen mit wt *agr* *S. aureus* signifikant gesteigert exprimierten Genen ist die unc-51-like Kinase (ULK1). ULK1 ist homolog zu der Serin/Threonin Kinase ATG1, die in der Hefe an der Initiation der Autophagie beteiligt ist.

Mit BLAST-Analyse wurde neben den zwei bislang bekannten humanen Homologen von ATG1, ULK1 und ULK2 ein zusätzliches Homolog, das ULK3 identifiziert. In Northern Blot Analysen wurde gezeigt, dass in den meisten humanen Geweben die Transkripte ULK1-3 gemeinsam, jedoch unterschiedlich stark exprimiert werden.

Durch Hemmung der Expression von ULK1 oder parallel von ULK1/2 mit siRNA-Interferenz wurde die Funktion dieser ULK Proteine für die allgemeine Autophagie, für die Autophagie von *S. aureus* sowie für den zytotoxischen Effekt von *S. aureus* untersucht.

Die reduzierte Expression von ULK1 oder ULK1/2 führt generell zu verringerter Bildung von Autophagosomen und ebenso zu deutlicher Reduktion der Kolo-kalisation von *S. aureus* mit LC3-positiven Autophagosomen.

Zudem ist nach Hemmung der Expression von ULK1 oder ULK1/2 in mit *S. aureus* infizierten HeLa-Zellen die intrazelluläre Bakterienlast reduziert und ein signifikanter erhöhter Anteil der Wirtszellen bleibt vital.

Diese Daten deuten auf eine wichtige Rolle von ULK1 und eventuell ULK2 bei der Entstehung von Autophagosomen als intrazelluläre Replikationsnische von *S. aureus* hin. Die Bildung dieser Nische ist Voraussetzung für den vollen zytotoxischen Effekt von *S. aureus*.

6 Summary

S. aureus is able to invade and induce host cell death in various types of non-professional phagocytes. These cytotoxic *S. aureus* isolates subvert autophagy *agr*-dependent. They use the autophagosomes for intracellular replication and eventually induce host cell death.

To this end, the transcription profile of HeLa cells infected with cytotoxic wt *agr* *S. aureus* was compared with that of cells infected with noncytotoxic *agr*^{-/-} *S. aureus*. HeLa cells infected with noncytotoxic *S. aureus* differentially expressed 230 genes within seven hours after infection, while the response to cytotoxic wt *agr* *S. aureus* was with 79 differentially expressed genes much less pronounced. Among the transcripts upregulated already 3 h after infection with wt *agr* *S. aureus* was unc-51-like kinase 1 (ULK1). ULK1 is a homologue of the serine/threonine protein kinase ATG1 of yeast, which is involved in the initiation of autophagy.

Besides the two known homologues of ATG1 we identified by BLAST analysis an additional homologue, the unc-51 like kinase 3 (ULK3). Northern blot analysis revealed, that the ULK1-3 transcripts are expressed together in the most human tissues, but in different expression levels.

By down-regulation of the expression of ULK1 or parallel ULK1/2 via siRNA interference, the function of these ULK proteins was assessed in autophagy in general, in autophagy of *S. aureus* and in the cytotoxic effect mediated by *S. aureus*. Reduced expression of ULK1 or ULK1/2 inhibited generation of autophagosomes in general, and specifically the co-localization of *S. aureus* with LC3-positive autophagosomes. Importantly, inhibition of ULK1 or ULK1/2 resulted in HeLa cells in a reduced bacterial load and reduced cytotoxicity.

These results suggest, that ULK1 and possibly ULK2 are important for the generation of autophagosomes as the niche for intracellular replication of *S. aureus*. Inhibition of autophagy leads to a diminished survival of intracellular *S. aureus* and a reduced cytotoxic effect of this bacterium.

7 Referenzen

- Abdelnour, A., Arvidson, S., Bremell, T., Ryden, C. and Tarkowski, A. (1993) The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infect Immun*, **61**, 3879-3885.
- Acar, J.F., Courvalin, P. and Chabbert, Y.A. (1970) Methicillin-resistant staphylococemia: bacteriological failure of treatment with cephalosporins. *Antimicrobial Agents Chemother*, **10**, 280-285.
- Aladzcity, I., Toth, M.L., Sigmond, T., Szabo, E., Bicsak, B., Barna, J., Regos, A., Orosz, L., Kovacs, A.L. and Vellai, T. (2007) Autophagy genes *unc-51* and *bec-1* are required for normal cell size in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **177**, 655-660.
- Almeida, R.A., Matthews, K.R., Cifrian, E., Guidry, A.J. and Oliver, S.P. (1996) *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci*, **79**, 1021-1026.
- Ashford, T.P. and Porter, K.R. (1962) Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol*, **12**, 198-202.
- Baba, M., Osumi, M., Scott, S.V., Klionsky, D.J. and Ohsumi, Y. (1997) Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J Cell Biol*, **139**, 1687-1695.
- Bantel, H., Sinha, B., Domschke, W., Peters, G., Schulze-Osthoff, K. and Janicke, R.U. (2001) α -Toxin is a mediator of *Staphylococcus aureus*-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling. *J Cell Biol*, **155**, 637-648.
- Bayles, K.W., Wesson, C.A., Liou, L.E., Fox, L.K., Bohach, G.A. and Trumble, W.R. (1998) Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun*, **66**, 336-342.
- Bohensky, J., Shapiro, I.M., Leshinsky, S., Terkhorn, S.P., Adams, C.S. and Srinivas, V. (2007) HIF-1 regulation of chondrocyte apoptosis: induction of the autophagic pathway. *Autophagy*, **3**, 207-214.
- Bonifacio, J.S.e. (2000) *Current protocols in cell biology*.
- Carneiro, C.R., Postol, E., Nomizo, R., Reis, L.F. and Brentani, R.R. (2004) Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect*, **6**, 604-608.
- Chan, E.Y., Kir, S. and Tooze, S.A. (2007) siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem*, **282**, 25464-25474.
- Cheong, H., Yorimitsu, T., Reggiori, F., Legakis, J.E., Wang, C.W. and Klionsky, D.J. (2005) Atg17 regulates the magnitude of the autophagic response. *Mol Biol Cell*, **16**, 3438-3453.
- Cheung, A.L., Eberhardt, K.J., Chung, E., Yeaman, M.R., Sullam, P.M., Ramos, M. and Bayer, A.S. (1994) Diminished virulence of a *sar*-/*agr*- mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. *J Clin Invest*, **94**, 1815-1822.
- Codogno, P., Ogier-Denis, E. and Houri, J.J. (1997) Signal transduction pathways in macroautophagy. *Cell Signal*, **9**, 125-130.
- Corradetti, M.N. and Guan, K.L. (2006) Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene*, **25**, 6347-6360.

- Crossley, K.B. and Archer, G.L. (1997) *The staphylococci in human disease*, Churchill Livingstone Inc. New York.
- Day, N.P., Moore, C.E., Enright, M.C., Berendt, A.R., Smith, J.M., Murphy, M.F., Peacock, S.J., Spratt, B.G. and Feil, E.J. (2001) A link between virulence and ecological abundance in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Science*, **292**, 114-116.
- Dorn, B.R., Dunn, W.A., Jr. and Progulske-Fox, A. (2001) *Porphyromonas gingivalis* traffics to autophagosomes in human coronary artery endothelial cells. *Infect Immun*, **69**, 5698-5708.
- Dorn, B.R., Dunn, W.A., Jr. and Progulske-Fox, A. (2002) Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cell Microbiol*, **4**, 1-10.
- Dunn, W.A., Jr. (1994) Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol*, **4**, 139-143.
- Dziewanowska, K., Carson, A.R., Patti, J.M., Deobald, C.F., Bayles, K.W. and Bohach, G.A. (2000) Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: role in internalization by epithelial cells. *Infect Immun*, **68**, 6321-6328.
- Emori, T.G. and Gaynes, R.P. (1993) An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev*, **6**, 428-442.
- Epple, U.D., Suriapranata, I., Eskelinen, E.L. and Thumm, M. (2001) Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole. *J Bacteriol*, **183**, 5942-5955.
- Essmann, F., Bantel, H., Totzke, G., Engels, I.H., Sinha, B., Schulze-Osthoff, K. and Janicke, R.U. (2003) *Staphylococcus aureus* alpha-toxin-induced cell death: predominant necrosis despite apoptotic caspase activation. *Cell Death Differ*, **10**, 1260-1272.
- Feezor, R.J., Oberholzer, C., Baker, H.V., Novick, D., Rubinstein, M., Moldawer, L.L., Pribble, J., Souza, S., Dinarello, C.A., Ertel, W. and Oberholzer, A. (2003) Molecular characterization of the acute inflammatory response to infections with gram-negative versus gram-positive bacteria. *Infect Immun*, **71**, 5803-5813.
- Finlay, B.B. and Cossart, P. (1997) Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science*, **276**, 718-725.
- Foster, T.J. (2005) Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol*, **3**, 948-958.
- Foster, T.J. and Hook, M. (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*, **6**, 484-488.
- Funakoshi, T., Matsuura, A., Noda, T. and Ohsumi, Y. (1997) Analyses of APG13 gene involved in autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **192**, 207-213.
- Garzoni, C., Francois, P., Huyghe, A., Couzinet, S., Tapparel, C., Charbonnier, Y., Renzoni, A., Lucchini, S., Lew, D.P., Vaudaux, P., Kelley, W.L. and Schrenzel, J. (2007) A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells. *BMC Genomics*, **8**, 171.
- Gillaspy, A.F., Hickmon, S.G., Skinner, R.A., Thomas, J.R., Nelson, C.L. and Smeltzer, M.S. (1995) Role of the accessory gene regulator (*agr*) in pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Infect Immun*, **63**, 3373-3380.
- Giraud, A.T., Cheung, A.L. and Nagel, R. (1997) The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Arch Microbiol*, **168**, 53-58.
- Gutierrez, M.G., Master, S.S., Singh, S.B., Taylor, G.A., Colombo, M.I. and Deretic, V. (2004) Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and

- Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell*, **119**, 753-766.
- Gutierrez, M.G., Vazquez, C.L., Munafo, D.B., Zoppino, F.C., Beron, W., Rabinovitch, M. and Colombo, M.I. (2005) Autophagy induction favours the generation and maturation of the Coxiella-replicative vacuoles. *Cell Microbiol*, **7**, 981-993.
- Hamill, R.J., Vann, J.M. and Proctor, R.A. (1986) Phagocytosis of Staphylococcus aureus by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect Immun*, **54**, 833-836.
- Harding, T.M., Morano, K.A., Scott, S.V. and Klionsky, D.J. (1995) Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Cell Biol*, **131**, 591-602.
- Haslinger-Loffler, B., Kahl, B.C., Grundmeier, M., Strangfeld, K., Wagner, B., Fischer, U., Cheung, A.L., Peters, G., Schulze-Osthoff, K. and Sinha, B. (2005) Multiple virulence factors are required for Staphylococcus aureus-induced apoptosis in endothelial cells. *Cell Microbiol*, **7**, 1087-1097.
- Haslinger-Loffler, B., Wagner, B., Bruck, M., Strangfeld, K., Grundmeier, M., Fischer, U., Volker, W., Peters, G., Schulze-Osthoff, K. and Sinha, B. (2006) Staphylococcus aureus induces caspase-independent cell death in human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int*, **70**, 1089-1098.
- Heilmann, C., Hartleib, J., Hussain, M.S. and Peters, G. (2005) The multifunctional Staphylococcus aureus autolysin aaa mediates adherence to immobilized fibrinogen and fibronectin. *Infect Immun*, **73**, 4793-4802.
- Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T. and Tenover, F.C. (1997) Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother*, **40**, 135-136.
- Huang, J. and Klionsky, D.J. (2007) Autophagy and human disease. *Cell Cycle*, **6**, 1837-1849.
- Jevons, M. (1961) 'Celebenin' resistant staphylococci. *British Medical Journal*, **1**, 124-125.
- Kabeya, Y., Kamada, Y., Baba, M., Takikawa, H., Sasaki, M. and Ohsumi, Y. (2005) Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy. *Mol Biol Cell*, **16**, 2544-2553.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J*, **19**, 5720-5728.
- Kahl, B.C., Goulian, M., van Wamel, W., Herrmann, M., Simon, S.M., Kaplan, G., Peters, G. and Cheung, A.L. (2000) Staphylococcus aureus RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line. *Infect Immun*, **68**, 5385-5392.
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M. and Ohsumi, Y. (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol*, **150**, 1507-1513.
- Kass, E.H. and Parsonnet, J. (1987) On the pathogenesis of toxic shock syndrome. *Rev Infect Dis*, **9 Suppl 5**, S482-489.
- Kauffman, C.A., Terpenning, M.S., He, X., Zarins, L.T., Ramsey, M.A., Jorgensen, K.A., Sottile, W.S. and Bradley, S.F. (1993) Attempts to eradicate methicillin-resistant Staphylococcus aureus from a long-term-care facility with the use of mupirocin ointment. *Am J Med*, **94**, 371-378.
- Kirkegaard, K., Taylor, M.P. and Jackson, W.T. (2004) Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat Rev Microbiol*, **2**, 301-314.

- Klionsky, D.J. (2004) Cell biology: regulated self-cannibalism. *Nature*, **431**, 31-32.
- Klionsky, D.J. and Ohsumi, Y. (1999) Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 1-32.
- Koenig, R.L., Ray, J.L., Maleki, S.J., Smeltzer, M.S. and Hurlburt, B.K. (2004) Staphylococcus aureus AgrA binding to the RNAIII-agr regulatory region. *J Bacteriol*, **186**, 7549-7555.
- Köhler, W., Eggers, H.J., Fleischer, B., Marre, R., Pfister, H. and Pulverer, G. (2001) *Medizinische Mikrobiologie*. 8. Auflage Urban und Fischer Verlag.
- Krut, O., Utermohlen, O., Schloschherr, X. and Krönke, M. (2003) Strain-specific association of cytotoxic activity and virulence of clinical Staphylococcus aureus isolates. *Infect Immun*, **71**, 2716-2723.
- Kuroyanagi, H., Yan, J., Seki, N., Yamanouchi, Y., Suzuki, Y., Takano, T., Muramatsu, M. and Shirasawa, T. (1998) Human ULK1, a novel serine/threonine kinase related to UNC-51 kinase of Caenorhabditis elegans: cDNA cloning, expression, and chromosomal assignment. *Genomics*, **51**, 76-85.
- Laupland, K.B., Church, D.L., Mucenski, M., Sutherland, L.R. and Davies, H.D. (2003) Population-based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive Staphylococcus aureus infections. *J Infect Dis*, **187**, 1452-1459.
- Lee, S.B., Kim, S., Lee, J., Park, J., Lee, G., Kim, Y., Kim, J.M. and Chung, J. (2007) ATG1, an autophagy regulator, inhibits cell growth by negatively regulating S6 kinase. *EMBO Rep*, **8**, 360-365.
- Legakis, J.E., Yen, W.L. and Klionsky, D.J. (2007) A cycling protein complex required for selective autophagy. *Autophagy*, **3**, 422-432.
- Levine, B. and Klionsky, D.J. (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, **6**, 463-477.
- Lin, C.H., Kuan, I.H., Lee, H.M., Lee, W.S., Sheu, J.R., Ho, Y.S., Wang, C.H. and Kuo, H.P. (2001) Induction of cyclooxygenase-2 protein by lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus in human pulmonary epithelial cells: involvement of a nuclear factor-kappa B-dependent pathway. *Br J Pharmacol*, **134**, 543-552.
- Livermore, D.M. (2000) Antibiotic resistance in staphylococci. *Int J Antimicrob Agents*, **16 Suppl 1**, S3-10.
- Lowy, F.D. (1998) Staphylococcus aureus infections. *N Engl J Med*, **339**, 520-532.
- Lowy, F.D. (2000) Is Staphylococcus aureus an intracellular pathogen? *Trends Microbiol*, **8**, 341-343.
- Lyon, G.J., Mayville, P., Muir, T.W. and Novick, R.P. (2000) Rational design of a global inhibitor of the virulence response in Staphylococcus aureus, based in part on localization of the site of inhibition to the receptor-histidine kinase, AgrC. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13330-13335.
- Massey, R.C., Kantzanou, M.N., Fowler, T., Day, N.P., Schofield, K., Wann, E.R., Berendt, A.R., Hook, M. and Peacock, S.J. (2001) Fibronectin-binding protein A of Staphylococcus aureus has multiple, substituting, binding regions that mediate adherence to fibronectin and invasion of endothelial cells. *Cell Microbiol*, **3**, 839-851.
- Matsuura, A., Tsukada, M., Wada, Y. and Ohsumi, Y. (1997) Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in Saccharomyces cerevisiae. *Gene*, **192**, 245-250.
- Matussek, A., Strindhall, J., Stark, L., Rohde, M., Geffers, R., Buer, J., Kihlstrom, E., Lindgren, P.E. and Lofgren, S. (2005) Infection of human endothelial cells with

- Staphylococcus aureus induces transcription of genes encoding an innate immunity response. *Scand J Immunol*, **61**, 536-544.
- Mazmanian, S.K., Liu, G., Ton-That, H. and Schneewind, O. (1999) Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science*, **285**, 760-763.
- Meijer, A.J. and Codogno, P. (2004) Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 2445-2462.
- Meijer, W.H., van der Klei, I.J., Veenhuis, M. and Kiel, J.A. (2007) ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes. *Autophagy*, **3**, 106-116.
- Melendez, A., Tallozy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E.L., Hall, D.H. and Levine, B. (2003) Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science*, **301**, 1387-1391.
- Menzies, B.E. and Kourteva, I. (1998) Internalization of Staphylococcus aureus by endothelial cells induces apoptosis. *Infect Immun*, **66**, 5994-5998.
- Mizushima, N. (2004) Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 2491-2502.
- Mizushima, N., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2002) Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct*, **27**, 421-429.
- Moreilhon, C., Gras, D., Hologne, C., Bajolet, O., Cottrez, F., Magnone, V., Merten, M., Groux, H., Puchelle, E. and Barbry, P. (2005) Live Staphylococcus aureus and bacterial soluble factors induce different transcriptional responses in human airway cells. *Physiol Genomics*, **20**, 244-255.
- Mortimore, G.E. and Poso, A.R. (1986) The lysosomal pathway of intracellular proteolysis in liver: regulation by amino acids. *Adv Enzyme Regul*, **25**, 257-276.
- Naimi, T.S., LeDell, K.H., Como-Sabetti, K., Borchardt, S.M., Boxrud, D.J., Etienne, J., Johnson, S.K., Vandenesch, F., Fridkin, S., O'Boyle, C., Danila, R.N. and Lynfield, R. (2003) Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. *Jama*, **290**, 2976-2984.
- Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., Hamada, S. and Yoshimori, T. (2004) Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science*, **306**, 1037-1040.
- Neufeld, T.P. (2007) Contribution of Atg1-dependent autophagy to TOR-mediated cell growth and survival. *Autophagy*, **3**, 477-479.
- Novick, R.P. (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol*, **48**, 1429-1449.
- Novick, R.P., Projan, S.J., Kornblum, J., Ross, H.F., Ji, G., Kreiswirth, B., Vandenesch, F. and Moghazeh, S. (1995) The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in Staphylococcus aureus. *Mol Gen Genet*, **248**, 446-458.
- Novick, R.P., Ross, H.F., Projan, S.J., Kornblum, J., Kreiswirth, B. and Moghazeh, S. (1993) Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *Embo J*, **12**, 3967-3975.
- Nuzzo, I., Sanges, M.R., Folgore, A. and Carratelli, C.R. (2000) Apoptosis of human keratinocytes after bacterial invasion. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **27**, 235-240.
- Ogawa, M. and Sasakawa, C. (2006) Bacterial evasion of the autophagic defense system. *Curr Opin Microbiol*, **9**, 62-68.

- Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N. and Sasakawa, C. (2005) Escape of intracellular Shigella from autophagy. *Science*, **307**, 727-731.
- Ogawa, S.K., Yurberg, E.R., Hatcher, V.B., Levitt, M.A. and Lowy, F.D. (1985) Bacterial adherence to human endothelial cells in vitro. *Infect Immun*, **50**, 218-224.
- Ogier-Denis, E. and Codogno, P. (2003) Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1603**, 113-128.
- Otto, G.P., Wu, M.Y., Kazgan, N., Anderson, O.R. and Kessin, R.H. (2004) Dictyostelium macroautophagy mutants vary in the severity of their developmental defects. *J Biol Chem*, **279**, 15621-15629.
- Palma, M., Haggar, A. and Flock, J.I. (1999) Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J Bacteriol*, **181**, 2840-2845.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D. and Levine, B. (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, **122**, 927-939.
- Peterson, M.L., Ault, K., Kremer, M.J., Klingelhutz, A.J., Davis, C.C., Squier, C.A. and Schlievert, P.M. (2005) The innate immune system is activated by stimulation of vaginal epithelial cells with *Staphylococcus aureus* and toxic shock syndrome toxin 1. *Infect Immun*, **73**, 2164-2174.
- Pizarro-Cerda, J., Meresse, S., Parton, R.G., van der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goni, I., Moreno, E. and Gorvel, J.P. (1998) *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun*, **66**, 5711-5724.
- Powers, K.A., Terpenning, M.S., Voice, R.A. and Kauffman, C.A. (1990) Prosthetic joint infections in the elderly. *Am J Med*, **88**, 9N-13N.
- Prevost, G., Couppie, P., Prevost, P., Gayet, S., Petiau, P., Cribier, B., Monteil, H. and Piemont, Y. (1995) Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *J Med Microbiol*, **42**, 237-245.
- Py, B.F., Lipinski, M.M. and Yuan, J. (2007) Autophagy limits *Listeria monocytogenes* intracellular growth in the early phase of primary infection. *Autophagy*, **3**, 117-125.
- Recsei, P., Kreiswirth, B., O'Reilly, M., Schlievert, P., Gruss, A. and Novick, R.P. (1986) Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. *Mol Gen Genet*, **202**, 58-61.
- Reggiori, F., Tucker, K.A., Stromhaug, P.E. and Klionsky, D.J. (2004) The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Dev Cell*, **6**, 79-90.
- Rich, K.A., Burkett, C. and Webster, P. (2003) Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy. *Cell Microbiol*, **5**, 455-468.
- Sajjan, U.S., Yang, J.H., Hershenson, M.B. and LiPuma, J.J. (2006) Intracellular trafficking and replication of *Burkholderia cenocepacia* in human cystic fibrosis airway epithelial cells. *Cell Microbiol*, **8**, 1456-1466.
- Schnaith, A., Kashkar, H., Leggio, S.A., Addicks, K., Kronke, M. and Krut, O. (2007) *Staphylococcus aureus* subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death. *J Biol Chem*, **282**, 2695-2706.
- Scott, R.C., Juhasz, G. and Neufeld, T.P. (2007) Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol*, **17**, 1-11.
- Scott, R.C., Schuldiner, O. and Neufeld, T.P. (2004) Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev Cell*, **7**, 167-178.

- Scott, S.V., Baba, M., Ohsumi, Y. and Klionsky, D.J. (1997) Aminopeptidase I is targeted to the vacuole by a nonclassical vesicular mechanism. *J Cell Biol*, **138**, 37-44.
- Scott, S.V., Nice, D.C., 3rd, Nau, J.J., Weisman, L.S., Kamada, Y., Keizer-Gunnink, I., Funakoshi, T., Veenhuis, M., Ohsumi, Y. and Klionsky, D.J. (2000) Apg13p and Vac8p are part of a complex of phosphoproteins that are required for cytoplasm to vacuole targeting. *J Biol Chem*, **275**, 25840-25849.
- Seay, M., Patel, S. and Dinesh-Kumar, S.P. (2006) Autophagy and plant innate immunity. *Cell Microbiol*, **8**, 899-906.
- Shanson, D.C., Kensit, J.C. and Duke, R. (1976) Outbreak of hospital infection with a strain of *Staphylococcus aureus* resistant to gentamicin and methicillin. *Lancet*, **2**, 1347-1348.
- Shintani, T., Suzuki, K., Kamada, Y., Noda, T. and Ohsumi, Y. (2001) Apg2p functions in autophagosome formation on the perivacuolar structure. *J Biol Chem*, **276**, 30452-30460.
- Sinha, B., Francois, P.P., Nusse, O., Foti, M., Hartford, O.M., Vaudaux, P., Foster, T.J., Lew, D.P., Herrmann, M. and Krause, K.H. (1999) Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasins via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5 \beta 1$. *Cell Microbiol*, **1**, 101-117.
- Sinha, B. and Herrmann, M. (2005) Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by *Staphylococcus aureus*. *Thromb Haemost*, **94**, 266-277.
- Straub, M., Bredschneider, M. and Thumm, M. (1997) AUT3, a serine/threonine kinase gene, is essential for autophagocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **179**, 3875-3883.
- Sturgill-Koszycki, S. and Swanson, M.S. (2000) *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J Exp Med*, **192**, 1261-1272.
- Suzuki, K. and Ohsumi, Y. (2007) Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **581**, 2156-2161.
- Takehige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. and Ohsumi, Y. (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol*, **119**, 301-311.
- Thumm, G. and Gotz, F. (1997) Studies on prolystaphin processing and characterization of the lysostaphin immunity factor (Lif) of *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. *Mol Microbiol*, **23**, 1251-1265.
- Tsukada, M. and Ohsumi, Y. (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **333**, 169-174.
- Wang, Z.M., Liu, C. and Dziarski, R. (2000) Chemokines are the main proinflammatory mediators in human monocytes activated by *Staphylococcus aureus*, peptidoglycan, and endotoxin. *J Biol Chem*, **275**, 20260-20267.
- Weigel, L.M., Clewell, D.B., Gill, S.R., Clark, N.C., McDougal, L.K., Flannagan, S.E., Kolonay, J.F., Shetty, J., Killgore, G.E. and Tenover, F.C. (2003) Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*, **302**, 1569-1571.
- Wesson, C.A., Liou, L.E., Todd, K.M., Bohach, G.A., Trumble, W.R. and Bayles, K.W. (1998) *Staphylococcus aureus* Agr and Sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis. *Infect Immun*, **66**, 5238-5243.
- Wolz, C., Pohlmann-Dietze, P., Steinhuber, A., Chien, Y.T., Manna, A., van Wamel, W. and Cheung, A. (2000) Agr-independent regulation of fibronectin-binding protein(s) by the regulatory locus sar in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, **36**, 230-243.

- Yan, J., Kuroyanagi, H., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., Tokumitsu, H., Tomoda, T., Shirasawa, T. and Muramatsu, M. (1998) Identification of mouse ULK1, a novel protein kinase structurally related to *C. elegans* UNC-51. *Biochem Biophys Res Commun*, **246**, 222-227.
- Yan, J., Kuroyanagi, H., Tomemori, T., Okazaki, N., Asato, K., Matsuda, Y., Suzuki, Y., Ohshima, Y., Mitani, S., Masuho, Y., Shirasawa, T. and Muramatsu, M. (1999) Mouse ULK2, a novel member of the UNC-51-like protein kinases: unique features of functional domains. *Oncogene*, **18**, 5850-5859.
- Yang, M.H., Yoo, K.H., Yook, Y.J., Park, E.Y., Jeon, J.O., Choi, S.H., Park, S.Y., Woo, Y.M., Lee, M.J. and Park, J.H. (2007) The gene expression profiling in murine cortical cells undergoing programmed cell death (PCD) induced by serum deprivation. *J Biochem Mol Biol*, **40**, 277-285.
- Yang, Z., Huang, J., Geng, J., Nair, U. and Klionsky, D.J. (2006) Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Mol Biol Cell*, **17**, 5094-5104.
- Yao, L., Bengualid, V., Lowy, F.D., Gibbons, J.J., Hatcher, V.B. and Berman, J.W. (1995) Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression. *Infect Immun*, **63**, 1835-1839.
- Yarwood, J.M., McCormick, J.K. and Schlievert, P.M. (2001) Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **183**, 1113-1123.
- Yorimitsu, T. and Klionsky, D.J. (2005) Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*, **12 Suppl 2**, 1542-1552.
- Yorimitsu, T. and Klionsky, D.J. (2007) Endoplasmic reticulum stress: a new pathway to induce autophagy. *Autophagy*, **3**, 160-162.
- Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z. and Klionsky, D.J. (2006) Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem*, **281**, 30299-30304.
- Young, A.R., Chan, E.Y., Hu, X.W., Kochl, R., Crawshaw, S.G., High, S., Hailey, D.W., Lippincott-Schwartz, J. and Tooze, S.A. (2006) Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci*, **119**, 3888-3900.

8 Anhang

Statistisch signifikante, exprimierte Gene in HeLa-Zellen infiziert mit dem *agr^{-/-}* *S. aureus* Stamm NRS151

Gennamen nach der HGNC	Genbank ID	Symbol	FC 3h	p-Wert	FC 5h	p-Wert	FC 7h	p-Wert
interleukin 11	NM_000641	IL11	4,97	0,05	1,25	0,53	-1,67	0,16
interleukin 8	NM_000584	IL8	2,94	0,08	-2,7	0,03	-4,68	0,02
interleukin 6 (interferon, beta 2)	NM_000600	IL6	-1,37	0,43	-2,92	0,00	-2,73	0,01
DNA-damage-inducible transcript 3	NM_004083	DDIT3	1,68	0,01	1,44	0,00	1,52	0,04
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	NM_003998	NFKB1	1,97	0,03	1,73	0,06	1,19	0,16
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	NM_004556	NFKBIE	1,29	0,00	1,44	0,01	1,52	0,00
TNFAIP3 interacting protein 1	NM_006058	TNIP1	1,61	0,01	2,03	0,06	2,39	0,07
dual specificity phosphatase 5	NM_004419	DUSP5	1,54	0,35	-2,25	0,01	-2,79	0,00
sprouty-related, EVH1 domain containing 2	NM_181784	SPRED2	1,5	0,02	1,33	0,01	1,15	0,06
RAS, dexamethasone-induced 1	NM_016084	RASD1	1,58	0,04	1,16	0,14	1,04	0,78
myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	NM_021960	MCL1	2,04	0,04	-1,32	0,35	-1,53	0,19
myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	NM_021960	MCL1	1,75	0,19	-1,22	0,28	-1,51	0,05
baculoviral IAP repeat-containing 3	NM_001165	BIRC3	1,6	0,03	3,45	0,02	4,4	0,03
heat shock 70kDa protein 1A	NM_005345	HSPA1A	-1,55	0,02	-1,37	0,08	1,03	0,86
heat shock 70kDa protein 1B	NM_005346	HSPA1B	-1,74	0,00	-1,67	0,01	-1,12	0,37
oxidised low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	NM_002543	OLR1	1,6	0,08	2,09	0,04	2,24	0,03
pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	NM_007350	PHLDA1	1,57	0,05	-1,37	0,08	-1,63	0,02
syntaxin 11	NM_003764	STX11	1,97	0,00	1,57	0,13	1,19	0,30
syntaxin 3A	NM_004177	STX3A	1,63	0,00	1,23	0,12	1,07	0,34
rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 18	NM_015318	ARHGEF18	1,58	0,00	1,64	0,01	1,45	0,01
cathepsin L	NM_001912	CTSL	1,28	0,02	1,21	0,03	1,55	0,00
SMAD, mothers against DPP homolog 3 (Drosophila)	NM_005902	SMAD3	1,87	0,01	1,28	0,11	1,13	0,18
slit-like 2 (Drosophila)	NM_138440	SLITL2	1,55	0,00	1,79	0,00	1,64	0,00
Jumonji, AT rich interactive domain 2	NM_004973	JARID2	1,83	0,00	1,19	0,02	1,2	0,05
heparin-binding EGF-like growth factor	NM_001945	HBEGF	1,76	0,05	-1,55	0,06	-2,01	0,02
leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1	NM_015541	LRIG1	1,56	0,02	1,69	0,00	1,58	0,00
UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5	NM_032047	B3GNT5	1,55	0,03	1,07	0,23	1,04	0,66
amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	NM_001657	AREG	2,27	0,02	-1,02	0,94	-1,27	0,25
fibroblast growth factor 2 (basic)	NM_002006	FGF2	1,83	0,01	1,92	0,13	1,48	0,26
dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	NM_012242	DKK1	1,97	0,00	1,17	0,05	1,18	0,21
N-myc downstream regulated gene 1	NM_006096	NDRG1	1,65	0,17	1,79	0,14	2,13	0,02
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	NM_000389	CDKN1A	1,81	0,04	-1,17	0,55	-1,89	0,06
PHD finger protein 13	NM_153812	PHF13	1,83	0,00	1,23	0,11	1,11	0,35
SRY (sex determining region Y)-box 13	NM_005686	SOX13	1,77	0,01	1,31	0,06	1,04	0,39
NK3 transcription factor related, locus 1 (Drosophila)	NM_006167	NKX3-1	1,68	0,01	1,25	0,09	1,09	0,46
eukaryotic translation initiation factor 2C, 2	NM_012154	EIF2C2	1,68	0,04	1,4	0,05	1,22	0,30
Wilms tumor 1 associated protein	NM_004906	WTAP	1,66	0,03	1,36	0,31	1,22	0,47
H2.0-like homeo box 1 (Drosophila)	NM_021958	HLX1	1,5	0,05	-1,16	0,19	-1,22	0,11
G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A	NM_003979	GPRC5A	1,5	0,00	1,69	0,01	1,66	0,02
ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1	NM_003033	ST3GAL1	1,8	0,00	1,45	0,01	1,08	0,62
spermine oxidase	NM_019025	SMOX	1,59	0,00	1,55	0,12	1,41	0,07
glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2	NM_005110	GFPT2	1,53	0,01	1,49	0,00	1,37	0,01
homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	NM_001010989	HERPUD1	1,53	0,01	1,15	0,31	1,06	0,17

Gennamen nach der HGNC	Genbank ID	Symbol	FC 3h	p-Wert	FC 5h	p-Wert	FC 7h	
chromosome 8 open reading frame 4	NM_020130	C8orf4	1,77	0,00	1,5	0,10	1,04	0,19
chromosome 10 open reading frame 45	NM_031453	C10orf45	1,53	0,02	2,15	0,01	1,86	0,04
chromosome 2 open reading frame 26	NM_023016	C2orf26	1,52	0,02	-1,33	0,08	-1,68	0,01
chromosome 14 open reading frame 147	NM_138288	C14orf147	-1,07	0,16	-1,3	0,00	-1,64	0,00
chromosome 11 open reading frame 8	NM_001584	C11orf8	-1,28	0,03	-1,86	0,00	-1,54	0,02
chromosome 14 open reading frame 151	NM_032714	C14orf151	1,46	0,02	1,68	0,00	1,65	0,01
FERM domain containing 6	NM_152330	FRMD6	1,75	0,00	1,5	0,00	1,28	0,03
FERM domain containing 6	NM_152330	FRMD6	1,75	0,00	1,5	0,00	1,28	0,03
adhesion molecule with Ig-like domain 2	NM_181847	AMIGO2	1,69	0,01	1,48	0,03	1,12	0,41
kelch-like 21 (Drosophila)	NM_014851	KLHL21	1,54	0,01	1,29	0,03	1,16	0,01
phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	NM_021127	PMAIP1	1,79	0,03	1,13	0,60	-1,09	0,74
transmembrane protein 2	NM_013390	TMEM2	1,51	0,02	1,43	0,01	1,21	0,18
kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 2	NM_015483	KBTD2	1,49	0,01	-1,01	0,89	-1,1	0,10
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	NM_005463	HNRPDL	1,48	0,17	1,7	0,02	1,85	0,02
interleukin 4 receptor	NM_000418	IL4R	1,47	0,06	2,01	0,00	1,79	0,04
solute carrier family 25, member 37	NM_016612	SLC25A37	1,47	0,01	1,72	0,00	1,53	0,04
polymerase (DNA directed) sigma	NM_006999	POLS	1,47	0,06	1,51	0,01	1,32	0,00
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G (avian)	NM_002359	MAFG	1,47	0,01	1,55	0,01	1,16	0,17
synaptotagmin XII	NM_177963	SYT12	1,46	0,00	1,8	0,00	1,64	0,00
ras homolog gene family, member F (in filopodia)	NM_019034	RHOF	1,46	0,00	1,55	0,01	1,5	0,03
metallothionein 2A	NM_005953	MT2A	1,42	0,00	1,4	0,00	1,61	0,01
calcium binding protein 39	NM_016289	CAB39	1,42	0,02	1,56	0,01	1,21	0,06
bone morphogenetic protein 6	NM_001718	BMP6	1,4	0,02	1,91	0,06	2,17	0,04
peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)	NM_005729	PPIF	1,4	0,10	1,8	0,00	1,79	0,06
EF-hand domain family, member D2	NM_024329	EFHD2	1,4	0,04	1,62	0,04	1,76	0,04
TIMP metalloproteinase inhibitor 1	NM_003254	TIMP1	1,39	0,05	1,36	0,04	1,53	0,01
sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4B	NM_020210	SEMA4B	1,38	0,05	1,44	0,04	1,67	0,03
folliculin	NM_144606	FLCN	1,38	0,04	1,37	0,05	1,57	0,01
prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	NM_000963	PTGS2	1,38	0,46	-2,37	0,01	-2,76	0,02
cytoplasmic linker 2	NM_003388	CYLN2	1,37	0,08	1,39	0,01	1,5	0,00
PRP4 pre-mRNA processing factor 4 homolog B (yeast)	NM_003913	PRPF4B	1,35	0,29	1,81	0,01	1,75	0,02
5'-nucleotidase, ecto (CD73)	NM_002526	NT5E	1,35	0,01	1,45	0,00	1,61	0,04
mal, T-cell differentiation protein-like	NM_005434	MALL	1,34	0,00	1,45	0,03	1,53	0,01
runt-related transcription factor 3	NM_001031680	RUNX3	1,34	0,05	-1,15	0,21	-1,19	0,14
TSC22 domain family, member 1	NM_006022	TSC22D1	1,34	0,34	-1,45	0,07	-1,87	0,01
exostoses (multiple) 1	NM_000127	EXT1	1,33	0,07	1,56	0,01	1,42	0,01
S100 calcium binding protein A11 (calgizzarin)	NM_005620	S100A11	1,29	0,05	1,59	0,01	1,76	0,00
adenosine A2b receptor	NM_000676	ADORA2B	1,29	0,00	1,34	0,01	1,5	0,00
cathepsin L	NM_001912	CTSL	1,28	0,02	1,21	0,03	1,55	0,00
zinc finger protein 297B	NM_014007	ZNF297B	1,28	0,04	-1,31	0,07	-1,27	0,10
transforming growth factor beta 1 induced transcript 1	NM_015927	TGFB11	1,26	0,01	1,59	0,00	1,39	0,10
fibronectin type III domain containing 3B	NM_022763	FNDC3B	1,26	0,02	1,51	0,00	1,21	0,07
transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)	NM_003202	TCF7	1,25	0,08	1,41	0,03	1,74	0,00
WD repeat and SOCS box-containing 2	NM_018639	WSB2	1,25	0,02	1,5	0,03	1,66	0,00
NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 6	NM_014397	NEK6	1,25	0,12	1,72	0,01	1,64	0,00
FK506 binding protein 1A, 12kDa	NM_000801	FKBP1A	1,25	0,15	1,57	0,02	1,64	0,01
TSC22 domain family, member 1	NM_006022	TSC22D1	1,25	0,45	-1,4	0,12	-2	0,02

Gennamen nach der HGNC	Genbank ID	Symbol	FC 3h	p-Wert	FC 5h	p-Wert	FC 7h	p-Wert
collagen, type IV, alpha 1	NM_001845	COL4A1	1,24	0,09	1,46	0,01	1,51	0,00
ADAM metallopeptidase domain 19 (meltrin beta)	NM_023038	ADAM19	1,23	0,05	1,63	0,00	1,67	0,00
cysteinyl-tRNA synthetase	NM_001014437	CARS	1,23	0,15	1,53	0,01	1,64	0,00
tubulin, beta 2	NM_001069	TUBB2	1,23	0,04	1,42	0,03	1,57	0,02
mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3	NM_015133	MAPK8IP3	1,23	0,20	1,45	0,00	1,53	0,00
tripartite motif-containing 47	NM_033452	TRIM47	1,23	0,08	1,43	0,00	1,51	0,02
heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa) binding protein 1	NM_017870	HSPA5BP1	1,23	0,05	1,4	0,00	1,51	0,00
ets variant gene 4 (E1A enhancer binding protein, E1AF)	NM_001986	ETV4	1,22	0,01	1,68	0,00	1,79	0,01
Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 3	NM_014604	TAX1BP3	1,22	0,08	1,42	0,01	1,53	0,00
collagen, type IV, alpha 2	NM_001846	COL4A2	1,21	0,02	1,53	0,00	1,54	0,00
RAB guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	NM_014504	RABGEF1	1,21	0,04	1,53	0,00	1,4	0,00
neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9	NM_006403	NEDD9	1,21	0,20	-1,46	0,10	-1,55	0,07
24-dehydrocholesterol reductase	NM_014762	DHCR24	1,19	0,01	1,42	0,01	1,71	0,02
CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	NM_000610	CD44	1,19	0,01	1,47	0,01	1,51	0,05
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	NM_006291	TNFAIP2	1,18	0,09	1,63	0,00	1,64	0,00
p53 and DNA damage regulated 1	NM_030815	PDRG1	1,18	0,04	1,41	0,00	1,52	0,00
hyaluronan synthase 2	NM_005328	HAS2	1,18	0,13	-1,41	0,05	-1,28	0,12
secretory granule, neuroendocrine protein 1 (7B2 protein)	NM_003020	SGNE1	1,17	0,00	1,43	0,00	1,76	0,03
heme oxygenase (decycling) 1	NM_002133	HMOX1	1,17	0,26	-1,33	0,03	-1,26	0,04
ADP-ribosylation factor related protein 1	NM_003224	ARFRP1	1,16	0,12	1,53	0,03	1,83	0,00
DR1-associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha)	NM_006442	DRAP1	1,16	0,02	1,38	0,01	1,6	0,01
calreticulin	NM_004343	CALR	1,16	0,28	1,45	0,00	1,52	0,00
LIM and senescent cell antigen-like domains 2	NM_017980	LIMS2	1,15	0,18	1,4	0,02	1,58	0,00
LIM domain kinase 1	NM_002314	LIMK1	1,15	0,13	1,26	0,11	1,52	0,02
hexokinase 1	NM_000188	HK1	1,14	0,08	1,34	0,01	1,51	0,01
inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3	NM_002224	ITPR3	1,13	0,23	1,43	0,00	1,65	0,00
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25	NM_003790	TNFRSF25	1,13	0,28	1,57	0,02	1,64	0,03
tripartite motif-containing 39	NM_021253	TRIM39	1,13	0,47	1,59	0,02	1,63	0,02
lysyl oxidase-like 2	NM_002318	LOXL2	1,13	0,10	1,32	0,00	1,56	0,01
cyclin D3	NM_001760	CCND3	1,12	0,27	1,51	0,00	1,39	0,02
CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase 1	NM_021198	CTDSP1	1,12	0,26	1,55	0,00	1,37	0,01
nuclear receptor coactivator 7	NM_181782	NCOA7	1,12	0,68	-1,57	0,05	-1,77	0,04
transmembrane BAX inhibitor motif containing 1	NM_022152	TMBIM1	1,11	0,01	1,56	0,01	1,79	0,00
stratifin	NM_006142	SFN	1,11	0,33	1,49	0,01	1,58	0,03
adenosylmethionine decarboxylase 1	NM_001033059	AMD1	1,09	0,62	1,48	0,07	1,58	0,04
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	NM_005195	CEBPD	1,08	0,18	-1,47	0,00	-1,88	0,00
ring finger protein 149	NM_173647	RNF149	1,07	0,48	1,38	0,00	1,55	0,01
zinc finger protein 36, C3H type-like 2	NM_006887	ZFP36L2	1,07	0,56	-1,38	0,06	-1,64	0,02
solute carrier organic anion transporter family, member 1A2	NM_005075	SLCO1A2	1,06	0,57	1,52	0,01	1,51	0,00
yrdC domain containing (E.coli)	NM_024640	YRDC	1,06	0,48	-1,49	0,01	-1,71	0,00
N-acetyltransferase 9	NM_015654	NAT9	1,04	0,34	1,45	0,00	1,52	0,01
proline/serine-rich coiled-coil 1	NM_001005290	PSRC1	1,02	0,87	1,59	0,00	1,76	0,04
Ras-related GTP binding C	NM_022157	RRAGC	1,02	0,53	1,26	0,01	1,51	0,00
Kruppel-like factor 6	NM_001008490	KLF6	1,02	0,96	-2,07	0,01	-2,35	0,01
paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta	NM_013440	PILRB	1,01	0,85	1,33	0,00	1,57	0,01
CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily)	NM_004233	CD83	1,01	0,90	-1,3	0,04	-1,78	0,00
protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	NM_003463	PTP4A1	-1,01	0,94	-1,17	0,27	-1,52	0,04
surfeit 5		SURF5	-1,02	0,82	1,46	0,00	1,59	0,00

Gennamen nach der HGNC	Genbank ID	Symbol	FC 3h	p-Wert	FC 5h	p-Wert	FC 7h	p-Wert
ring finger protein 19	NM_015435	RNF19	-1,02	0,89	-1,49	0,03	-1,5	0,01
tribbles homolog 1 (Drosophila)	NM_025195	TRIB1	-1,02	0,89	-1,87	0,01	-2,09	0,00
brix domain containing 1	NM_032194	BXDC1	-1,03	0,83	1,36	0,04	1,52	0,01
ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide	NM_001001787	ATP1B1	-1,03	0,58	-1,21	0,00	-1,57	0,01
chromosome 5 open reading frame 13	NM_004772	C5orf13	-1,04	0,39	-1,19	0,01	-1,57	0,00
dual specificity phosphatase 1	NM_004417	DUSP1	-1,04	0,91	-2,27	0,04	-2,59	0,01
ephrin-B2	NM_004093	EFNB2	-1,05	0,78	-1,8	0,05	-2,19	0,03
protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), beta isoform	NM_004576	PPP2R2B	-1,06	0,50	-1,3	0,00	-1,58	0,01
RAB20, member RAS oncogene family	NM_017817	RAB20	-1,07	0,67	-1,62	0,00	-1,47	0,01
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	NM_006186	NR4A2	-1,07	0,89	-2,98	0,00	-2,96	0,00
phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent	NM_001003683	PDE1A	-1,09	0,39	-1,33	0,05	-1,67	0,02
chromosome 16 open reading frame 49	NM_020312	C16orf49	-1,12	0,29	-1,31	0,01	-1,52	0,00
RAD21 homolog (S. pombe)	NM_006265	RAD21	-1,12	0,36	-1,37	0,01	-1,58	0,00
nuclear pore complex interacting protein	NM_006985	NPIP	-1,13	0,27	1,37	0,01	1,48	0,01
ring finger protein 182	NM_152737	RNF182	-1,13	0,60	-1,49	0,07	-1,9	0,03
disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	NM_001343	DAB2	-1,14	0,15	-2,02	0,00	-2,72	0,01
glyoxalase domain containing 1	NM_032756	GLOXD1	-1,16	0,06	-1,5	0,01	-1,34	0,01
solute carrier organic anion transporter family, member 3A1	NM_013272	SLCO3A1	-1,16	0,03	-1,27	0,00	-1,64	0,01
opsin 3 (encephalopsin, panopsin)	NM_001030011	OPN3	-1,17	0,08	-1,42	0,00	-1,67	0,00
GATA binding protein 6	NM_005257	GATA6	-1,18	0,12	-1,51	0,02	-1,28	0,02
fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism)	NM_000142	FGFR3	-1,18	0,17	-1,58	0,02	-1,51	0,03
leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4	NM_018490	LGR4	-1,18	0,05	-1,7	0,00	-1,51	0,01
Kruppel-like factor 9	NM_001206	KLF9	-1,18	0,49	-2,14	0,01	-2,19	0,01
low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia)	NM_000527	LDLR	-1,19	0,44	-2,1	0,00	-1,31	0,06
Rho-related BTB domain containing 3	NM_014899	RHOBTB3	-1,21	0,14	-1,49	0,04	-1,79	0,03
Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3	NM_019555	ARHGEF3	-1,22	0,00	-1,65	0,01	-1,37	0,01
early growth response 2 (Krox-20 homolog, Drosophila)	NM_000399	EGR2	-1,22	0,39	-2,26	0,00	-1,92	0,00
v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	NM_002228	JUN	-1,23	0,18	-1,54	0,04	-1,53	0,06
cyclin L1	NM_020307	CCNL1	-1,23	0,38	-2,12	0,01	-2,06	0,02
synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)	NM_000345	SNCA	-1,24	0,10	-1,37	0,05	-1,5	0,02
UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 6	NM_006876	B3GNT6	-1,24	0,02	-1,43	0,00	-1,53	0,00
MOCO sulphurase C-terminal domain containing 1	NM_022746	MOSC1	-1,24	0,12	-1,38	0,05	-1,7	0,02
trophinin associated protein (tastin)	NM_005480	TROAP	-1,25	0,09	1,32	0,05	1,44	0,04
mannosidase, endo-alpha-like	NM_001031740	MANEAL	-1,25	0,14	-1,53	0,02	-1,43	0,03
immediate early response 2	NM_004907	IER2	-1,25	0,23	-1,94	0,00	-2,01	0,00
phosphodiesterase 8B	NM_001029851	PDE8B	-1,27	0,01	-1,94	0,00	-1,86	0,00
collagen, type VIII, alpha 1	NM_001850	COL8A1	-1,27	0,09	-1,57	0,04	-1,96	0,01
zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)	NM_003407	ZFP36	-1,28	0,43	-2,59	0,02	-2,54	0,01
LIM domain only 4	NM_006769	LMO4	-1,29	0,02	-1,37	0,01	-1,53	0,00
transmembrane protein 15	NM_014908	TMEM15	-1,31	0,00	-1,59	0,00	-1,18	0,06
inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2	NM_014214	IMPA2	-1,31	0,01	-1,53	0,01	-1,58	0,01
transducin (beta)-like 1X-linked receptor 1	NM_024665	TBL1XR1	-1,31	0,03	-1,54	0,01	-1,66	0,01
chromosome 6 open reading frame 69	NM_173562	C6orf69	-1,31	0,02	-1,64	0,01	-1,71	0,00
PHD finger protein 21A	NM_016621	PHF21A	-1,33	0,02	-1,57	0,01	-1,29	0,03
cell division cycle and apoptosis regulator 1	NM_018237	CCAR1	-1,34	0,05	-1,51	0,03	-1,4	0,04
Trf (TATA binding protein-related factor)-proximal homolog (Drosophila)	NM_004275	TRFP	-1,35	0,03	-1,5	0,01	-1,4	0,03
zinc finger protein 331	NM_018555	ZNF331	-1,35	0,02	-1,72	0,01	-1,54	0,01

Gennamen nach der HGNC	Genbank ID	Symbol	FC 3h	p-Wert	FC 5h	p-Wert	FC 7h	p-Wert
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	NM_002135	NR4A1	-1,38	0,08	-1,67	0,04	-1,96	0,02
myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)	NM_004529	MLLT3	-1,39	0,03	-1,75	0,01	-1,41	0,02
histone 1, H2ah		HIST1H2AH	-1,4	0,09	-2,12	0,02	-2,14	0,02
snail homolog 2 (Drosophila)	NM_003068	SNAI2	-1,41	0,18	-1,55	0,00	-1,4	0,00
nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1	NM_005654	NR2F1	-1,41	0,00	-1,89	0,00	-1,68	0,00
bobby sox homolog (Drosophila)	NM_020235	BBX	-1,46	0,04	-2,04	0,01	-2,26	0,01
hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	NM_012258	HEY1	-1,49	0,01	-1,83	0,00	-1,34	0,06
zinc finger protein 261	NM_005096	ZNF261	-1,49	0,02	-1,73	0,00	-1,67	0,00
Kruppel-like factor 10	NM_001032282	KLF10	-1,5	0,05	-2,1	0,02	-2,19	0,02
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	NM_005204	MAP3K8	-1,54	0,01	-1,7	0,01	-1,58	0,01
early growth response 1	NM_001964	EGR1	-1,85	0,35	-9,26	0,00	-7,12	0,00
transducer of ERBB2, 1	NM_005749	TOB1	-1,92	0,00	-1,72	0,01	-1,66	0,01
v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	NM_005252	FOS	-2,17	0,07	-3,86	0,01	-3,62	0,01
nicht annotierte Gene = 13	NM_014059	RGC32	-1,07	0,27	-1,37	0,13	-1,71	0,01

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Universität Köln unter der Leitung von Prof. Dr. Martin Krönke, Herrn Dr. Oleg Krut und Herrn Dr. Olaf Utermöhlen wissenschaftlich betreut. Die wissenschaftliche Betreuung der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Köln erfolgte durch Prof. Dr. Jens Brüning.

Für die wissenschaftliche Ideen und Diskussionen während der Promotionszeit möchte ich mich recht herzlich bei Prof. Dr. Martin Krönke, Herrn Dr. Oleg Krut, Herrn Dr. Olaf Utermöhlen und Frau Dr. Annabelle Schnaith bedanken. Ebenfalls danke ich Prof. Dr. Jens Brüning für die Übernahme der Betreuung der Dissertation und die Anfertigung des Gutachtens.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Joachim L. Schultze und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere bei Svenja Debey-Pascher für die produktive und freundliche Kooperation bedanken.

Ich danke allen Kollegen des Instituts für Med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene für die schöne Arbeitsatmosphäre. Im Besonderen möchte ich der Arbeitsgruppe Utermöhlen und der Arbeitsgruppe Krut für die tägliche Hilfsbereitschaft und für die fachliche und private Unterstützung danken.

Mein abschließender Dank gebührt meiner Familie und meinen Freunden für das entgegengebrachte Verständnis und die Unterstützung in jeder Lebenslage.

Darüber hinaus geht mein herzlicher Dank an alle, die zum Entstehen dieser Arbeit, wissenschaftlich oder unwissenschaftlich, auf die eine oder andere Weise, beigetragen haben.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Martin Krönke und Prof. Dr. Jens Brüning betreut worden.