

**Autophagie und Wirtszellapoptose –  
Überlebensstrategien von *Staphylococcus aureus***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. nat. med.

der Medizinischen Fakultät

und

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Annabelle Schnaith**

aus Kirchheim/Teck

Köln 2007

Berichterstatter/Berichterstatterin: **Prof. Dr. Karin Schnetz**

**Prof. Dr. Angelika Noegel**

Tag der letzten mündlichen Prüfung: **28.März.2007**

*Für meine Eltern*



*In Erinnerung an Marie Curie (1867-1934)*

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
3-MA	3-Methyladenin
Abb.	Abbildung
actA	<i>actin-nucleating protein A</i>
<i>agr</i>	<i>accessory gene regulator</i>
AIP	<i>Auto Inducing Peptide</i>
APAF-1	<i>Apoptotic Protease Activating Faktor-1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>The American Type Culture Collection</i>
ATG	Autophagiegen
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
BSA	Albumin aus Rinderserum
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
Cif	<i>Clumping factor</i>
CnA	<i>Collagen Adhesin</i>
DABCO	Diazabicyclo-(2,2,2)-octan
DAMP	N-(3-[2,4-dinitrophenyl]-amino)propyl-N(3 aminopropylmethylamin)-dihydrochlorid
DD	<i>Death Domain</i>
DISC	<i>Death Inducing Signaling Complex</i>
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>dot/icm</i>	<i>defective in organelle trafficking/intracellular multiplication</i>
EAP/MAP	<i>Extracellular matrix protein/MHC class II-analogous protein</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA1	<i>Early Endosome Antigen 1</i>
Efb	<i>Extracellular binding protein</i>

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGTA	Ethylendioxybis(ethylenitrilo)-tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EM	Elektronenmikroskopie
Emp	<i>Extracellular matrix protein binding protein</i>
ETA	<i>Exofoliativ Toxin A</i>
ETD	<i>Exofoliativ Toxin D</i>
FADD	<i>Fas-Associated Protein with Death Domain</i>
Fas	<i>apoptosis stimulating fragment</i>
Fc	<i>Functional chain</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FE	Frühes Endosom
FnBP	<i>Fibronectin Binding Protein</i>
GAS	Gruppe A <i>Streptococcus</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HeLa	Epithelialzelllinie aus Zervixcarcinoms
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IpaB	<i>Invasion plasmid antigen B</i>
IRS1	<i>Insulin Receptor Substrate 1</i>
KO	Knockout
LAMP	<i>Lysosome-Associated Membrane Protein</i>
LB	Luria Bertani
LC3	<i>microtubule-associated protein light-chain3</i>
LTA	<i>Lipo Teichoic Acid</i>
Lys	Lysosom
M6PR	Mannose-6-phosphat-Rezeptor
MCF7	Humane Brustkrebszelllinie
MDC	Monodansylcadaverin
MEF	Mausembryofibroblasten

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
MEM	<i>Modified Eagle's Medium</i>
MKSA	Zelllinie eines Mausnierensarkoms
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>
OD	Optische Dichte
PBP2	<i>Penicillin Binding Protein 2</i>
PBS	Phosphatpuffer
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphatidylinositol-3-phosphatkinase
PVL	Panton-Valentin-Leukocidin
Rab	<i>Ras-related protein</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCCmec	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>
SDS	Natriumdodecansulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SE	Spätes Endosom
SpA	<i>Staphylococcal protein A</i>
SSSS	<i>Staphylococcal Scaled Skin Syndrome</i>
TCS	<i>Two Component System</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TfR	Transferrin Rezeptor
TFSS	<i>Type IV Secretion System</i>

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	<i>Toxic Shock Syndrome</i>
TSST	<i>Toxic Shock Syndrome Toxin</i>
TTSS	<i>Type III Secretion System</i>
WA	Wortmannin
wt	Wildtyp
WTA	<i>Wall Teichoic Acid</i>
XIAP	<i>X-Inhibitor of Apoptosis</i>

---

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	1
1.2	<i>S. aureus</i> Pathogenität und Antibiotikaresistenz .....	1
1.3	<i>S. aureus</i> Virulenzfaktoren und Regulation durch <i>agr</i> .....	4
1.4	<i>S. aureus</i> als intrazelluläres Pathogen .....	7
1.5	Modulation der Phagozytose von intrazellulären Bakterien .....	8
1.6	Autophagie .....	11
1.7	Autophagie und Bakterien .....	14
1.8	Programmierter Zelltod: Apoptose und Autophagie.....	16
1.9	<i>S. aureus</i> induziert Wirtszelltod .....	20
1.10	Zielsetzung.....	22
2	Material und Methoden.....	23
2.1	Materialien.....	23
2.2	Methoden .....	32
3	Ergebnisse .....	41
3.1	Die <i>S. aureus</i> Zytotoxizität ist abhängig von <i>agr</i> .....	41
3.2	<i>S. aureus</i> kolokalisiert mit Autophagosomen .....	42
3.3	Induktion von Autophagie steigert die Replikationsrate von <i>S. aureus</i> .....	48
3.4	Rapamycin-induzierte Autophagie stellt die Replikationsfähigkeit von <i>agr</i> -defizienten <i>S. aureus</i> her .....	50
3.5	Autophagie-induzierende <i>S. aureus</i> verhindern die phago-lysosomale Fusion .....	54
3.6	<i>S. aureus</i> tritt aus den Autophagosomen in das Zytoplasma über .....	58
3.7	<i>S. aureus</i> tötet Wirtszellen mit einem von Caspasen unabhängigen Mechanismus .....	60
3.8	<i>S. aureus</i> induziert Autophagie-Zelltod .....	64
4	Diskussion.....	69
4.1	Das <i>S. aureus</i> Autophagosom ist einzigartig.....	69
4.2	<i>S. aureus</i> induziert ATG5 abhängigen Wirtszelltod .....	76
4.3	Der <i>agr</i> -Lokus reguliert die Induktion von Autophagie und Zytotoxizität von <i>S. aureus</i> .....	79
5	Zusammenfassung .....	81

6	Summary .....	82
7	Literatur .....	83
8	Lebenslauf.....	90
9	Erklärung .....	91
10	Danksagung.....	92

# 1 Einleitung

## 1.1 *Staphylococcus aureus*

Die Gram-positiven Staphylokokken gehören zu der Familie der Micrococcaceae. Staphylokokken sind nicht bewegliche, nicht sporenbildende Gram-positive, katalasepositive Kokken. Ihre Größe beträgt im Durchmesser 0,5-1,5 µm und sie ordnen sich zumeist zu einem Haufen bzw. einer Traube (griechisch: Staphylos) an. Staphylokokken können unter verschiedenen Umweltbedingungen wachsen, am besten jedoch bei Temperaturen zwischen 30°C und 37°C. Eine erhöhte pH-Toleranz und Resistenz gegen Austrocknung machen sie vergleichsweise unempfindlich. Mit seltenen Ausnahmen sind Staphylokokken fakultativ anaerob. Sie sind allgemein als Kommensale der Haut sowie der Schleimhäute des Oropharynx beim Menschen und bei Tieren weit verbreitet und als Krankheitserreger bedingt pathogen.

Die größte klinisch-bakteriologische Bedeutung kommt der Spezies *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) zu. Aufgrund der Fähigkeit zur Bildung von Plasmakoagulase, sowie anderer spezieller Proteine, wie Clumpingfaktor oder Protein A, lässt sich *S. aureus* von den anderen (koagulasenegativen) Staphylokokken unterscheiden (Kloos and Schleifer, 1975; Köhler et al., 2001).

## 1.2 *S. aureus* Pathogenität und Antibiotikaresistenz

*S. aureus* ist weltweit einer der häufigsten Erreger innerhalb und außerhalb des Krankenhauses erworbener, ernstzunehmender Infektionskrankheiten. Die durch *S. aureus* verursachten Infektionen lassen sich in lokalisierte oder generalisierte pyrogene Infektionen und toxinvermittelte Erkrankungen einteilen (Lowy, 1998).

Invasive *S. aureus*-Erkrankungen können als lokale (oberflächliche), tiefgehende und systemische Infektionen auftreten. Zu den lokalisierten invasiven Prozessen gehören Furunkel (wenn zusammenfließend: Karbunkel), Pyodermie, Wundinfektionen,

Sinusitis und Otitis media. Tiefer gehende Infektionen sind die eitrige Parotitis, Mastitis puerperalis, sowie die primäre und sekundäre (postoperative oder posttraumatische) Osteomyelitis. Die *S. aureus*-Pneumonie tritt meist im Anschluss an eine Influenza-A-Infektion oder als nosokomiale Pneumonie bei beatmeten Patienten auf. Abszesse können sowohl in Weichteilen als auch in Organen auftreten, Empyeme in Körperhöhlen. Alle Prozesse können eine Keimausschwemmung in die Blutbahn nach sich ziehen und damit zur Sepsis (Letalität bei antibiotikaempfindlichen Stämmen noch immer bis zu 50%) und Endokarditis führen.

Wie auch von den koagulase-negativen Staphylokokken bekannt, vermag *S. aureus* sehr gut an Kunststoff- und Metalloberflächen zu haften und dort so genannte Biofilme zu bilden. Daraus ergeben sich Infektionen bei Kathetern und Shunts, sowie auch bei Gelenkersatz und Stabilisierungsmaßnahmen in der Traumatologie und Orthopädie.

Zu den toxinvermittelten Erkrankungen gehören unter anderem die Lebensmittelintoxikationen. Sie werden durch *S. aureus* Enterotoxine A-O verursacht. Nach Aufnahme des kontaminierten Lebensmittels treten abrupt Übelkeit, Erbrechen, krampfartige Bauchschmerzen und Durchfall auf. In den meisten Fällen ist die Erkrankung selbstlimitierend und endet nach 8–24 Stunden. Das *Toxic Shock Syndrom* (TSS) ist eine lebensbedrohliche Erkrankung und beruht auf der Superantigenwirkung des Toxic-Shock-Syndrom-Toxins (TSST-1) und wird auch in seltenen Fällen von den Enterotoxinen B und C verursacht. Fieber (über 39°C), diffuses makulöses Exanthem und Hypotonie sind klinische Symptome. TSS kann zu Multiorganversagen führen (Kass and Parsonnet, 1987).

Durch von *S. aureus* Stämmen gebildete exfoliative Toxine (ETA, ETB) wird die staphylogene toxische epidermische Nekrolyse (TEN; Synonym: *staphylococcal scalded skin syndrome*, SSSS) verursacht. Die Erkrankung führt im Anfangsstadium zu einem generalisierten Erythem mit Fieber, welches im epidermolytischen Stadium zu großflächiger Epidermolyse mit Blasenbildung und späterer Ablösung der Epidermisanteile führen kann (Emori and Gaynes, 1993; Köhler et al., 2001; Lowy, 1998).

Die Behandlung von *S. aureus* Infektionen erfolgt durch antibakterielle Wirkstoffe. Der Selektionsdruck durch antibiotische Behandlung ruft bei *S. aureus* vergleichsweise schnell eine Resistenzentwicklung durch Mutation oder durch

Erwerb von Resistenzgenen hervor (Livermore, 2000). Zunehmend treten diese Antibiotikaresistenzen bei *S. aureus* auf, wodurch die Behandlung von Infektionen durch diesen Keim erschwert wird (Chambers, 2001). Besonders im Krankenhausbereich stellen Methicillin-resistente *S. aureus* Stämme (MRSA) bei nosokomialen Infektionen ein Problem dar. Resistente oder multiresistente Keime gewinnen an Bedeutung, vor allem weil es zunehmend mehr prädisponierte Risikopatienten (Frühgeborene, Intensivpatienten, immunsupprimierte Patienten) gibt, die einer Antibiotikatherapie bedürfen (Petti and Fowler, 2002; Platt, 2001). Resistenz gegen Methicillin tritt zumeist als Mehrfachresistenz auf und ist auf ein zusätzliches Penicillin-Bindeprotein (PBP2a) zurückzuführen. Dieses wird durch das Strukturgen *mecA* kodiert, welches innerhalb des integrierten DNA-Elements *SCCmec* (*staphylococcal cassette chromosome mec*) liegt (Ito et al., 2001). Die Antibiotika-Behandlung bei *S. aureus* Infektionen ist schwierig geworden, da  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Methicillin, Oxacillin) schon lange nicht mehr wirksam sind. Nosokomiale MRSA sind resistent gegenüber den meisten Antibiotikaklassen, wie Makroliden, Aminoglykosiden, Fluoroquinolonen, Tetrazyklinen und Linkosamiden. Seit einigen Jahren nehmen Infektionen mit Methicillin-resistenten Stämmen bei Personen, die nicht hospitalisiert sind oder waren, zu. Diese Stämme werden als *community acquired* MRSA (CA-MRSA) bezeichnet (Naimi, 2003; Witte, 2004). Im Unterschied zu nosokomialen MRSA verursachen CA-MRSA Infektionen bei Personen ohne prädispositionierte Risikofaktoren. In diesem Zusammenhang wird ihnen auch erhöhte Virulenz nachgesagt. Obwohl noch nicht nachgewiesen, wird diese erhöhte Virulenz auf das Vorkommen von PVL (Panton-Valentin-Leukocidin) zurückgeführt. PVL ist ein porenbildendes Toxin, welches dem Erreger zur Abtötung von Granulozyten und Makrophagen dient. Diese Stämme können zu einer schnell voranschreitenden, lebensbedrohlichen Hautinfektion, der nekrotisierenden Fasciitis, führen. Wenn das über Bakteriophagen übertragene PVL-Gen mit Methicillin-Resistenz in *S. aureus* gepaart ist, verbindet sich ausgeprägte Virulenz mit hochgradiger Antibiotikaresistenz.

Zurzeit überwiegen in den USA und Kanada die zwei *S. aureus* CA-MRSA Klone MW2 und USA300. Sie verursachen über zwei Drittel aller rezidivierenden Haut- und Weichteilinfektionen (Diep et al., 2006; King et al., 2006).

Im Vergleich zu nosokomialen MRSA sind CA-MRSA teilweise noch empfindlich gegenüber manchen Antibiotika (z.B Clindamycin). Im Krankenhaus wird als Mittel

der „letzten Wahl“ das Glykopeptid-Antibiotikum Vancomycin eingesetzt. Allerdings sind auch hier seit 1997 schon Stämme mit reduzierter Sensitivität beobachtet worden (Hiramatsu et al., 1997; Weigel et al., 2003). Die ausgeprägte Morbidität, die hohe Rezidivneigung und die ernstzunehmende Resistenzentwicklung erfordern die Findung neuer „Targets“ zur Entwicklung neuartiger antibakterieller Wirkstoffe.

### 1.3 *S. aureus* Virulenzfaktoren und Regulation durch *agr*

Die *S. aureus*-Pathogenität beruht auf der Produktion eines großen Repertoires von Toxinen, Exoenzymen, Adhäsinen und immunomodulierenden Proteinen. Mit der Ausnahme von Erkrankungen, die durch spezifische Toxine (Superantigene), wie Enterotoxine, Exofoliativtoxine und das TSST-1, ausgelöst werden, ist kein Virulenzfaktor bekannt, der allen *S. aureus* Stämmen gemein ist. Die meisten *S. aureus* Stämme zeichnen sich durch eine hohe Diversität an Virulenzfaktoren aus (Crossley and Archer, 1997). Man unterscheidet bei *S. aureus* zwischen zellwandassoziierten und sezernierten Proteinen. Die Adhäsion von *S. aureus* an die Wirtszelle ist der erste notwendige Schritt zur Ausprägung einer Infektion. Die zellwandassoziierten Adhäsine sind kovalent an die Zellwand gebunden oder mit der Zellwand verankert. Zu der ersten Gruppe gehören WTA (*wall teichoic acid*) und LTA (*lipo teichoic acid*), die für die Adhäsion an Epithelialzellen essentiell sind (Lowy, 2000). Die zellwandverankerten Proteine, auch MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) genannt, zeigen strukturelle Verwandtschaft. Sie besitzen ein aus sechs Aminosäuren bestehendes Motiv (LPXTG), an denen eine Sortase die Proteine erkennt und sie in der Zellwand verankert (Mazmanian et al., 1999). Zu dieser Familie zählen die prominenten Virulenzfaktoren SpA (*staphylococcal protein A*), FnBPs (*fibronectin-binding proteins*), CnA (*collagen adhesin*), ClfA und ClfB (*clumping factors*) (Foster and Hook, 1998).

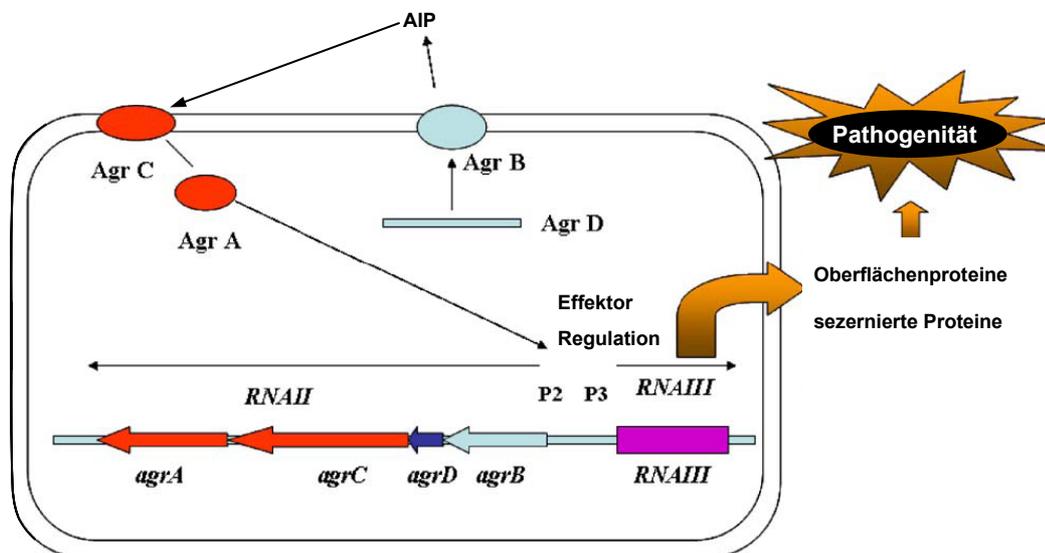
*S. aureus* besitzt auch eine Vielzahl sezernierter Virulenzfaktoren. Dazu gehören die porenbildenden Toxine ( $\alpha$ -Toxin) und Leukocidine ( $\gamma$ -Hämolysin, Panton-Valentin Leukocidin und Leukocidin E-D). Sie haben die Eigenschaft die Wirtzellmembranen zu zerstören. Immunomodulierende Faktoren, wie Staphylokinase und Efb

(*extracellular binding protein*), inaktivieren den Komplementfaktor CD3b, um einer Oponisierung zu entgehen. Proteine, wie EAP/MAP (*extracellular adherence protein/MHC classII-analogous protein*) und Emp (*extracellular matrix protein-binding protein*), vereinfachen die Bindung von *S. aureus* an die Wirtszelle, indem sie durch Konformationsänderungen die Matrixmoleküle modifizieren. Des Weiteren sezerniert *S. aureus* neutralisierende Proteine gegen von der Wirtszelle eingesetzte antimikrobielle Peptide wie Lactoferrin und Aureolysin (Foster, 2005). Es ist erneut festzuhalten, dass alle diese Faktoren nur zur Virulenz beitragen, kein einzelner aber allein die Virulenz von *S. aureus* mechanistisch erklären könnte.

Die Etablierung einer *S. aureus* Infektion setzt eine koordinierte Expression von Virulenzfaktoren der Bakterien voraus. Die Kommunikation zwischen Bakterien einer Population wird durch *Quorum Sensing*-Systeme vermittelt. Erreichen die Bakterien eine bestimmte Populationsdichte, aktivieren Autoinduktoren (AIP) posttranskriptionale Regulatoren (Kong et al., 2006; Yarwood and Schlievert, 2003). Die Regulation erfolgt bei vielen Bakterien über Zwei-Komponentensysteme (TCS, *two component system*). Sie bestehen aus einem Transmembran-Rezeptor (*sensor protein*) und einem zytoplasmatischen Effektorprotein (*response regulator*) (Hacker and Heesemann, 2000). Bei *S. aureus* weiß man, dass von 16 möglichen, vier TCSs (*agr, sae, srr und arl*) die Expression von Virulenzfaktoren regulieren (Giraud et al., 1997; Recsei et al., 1986; Yarwood et al., 2001). Hauptsächlich kontrolliert das Zwei-Komponentensystem *agr* zusammen mit dem Transkriptionsfaktor *sarA* die Produktion von Virulenzfaktoren (Morfeldt et al., 1988; Otto et al., 1999; Peng et al., 1988). *Agr* wird mit der Pathogenese von *S. aureus* in Verbindung gebracht. Funktionslose *S. aureus agr*-Mutanten sind in verschiedenen *in vivo* Infektionsmodellen weniger virulent als ihre Wildtypen (Abdelnour et al., 1993; Blevins et al., 2003; Gillaspay et al., 1995). Es wird angenommen, dass zu Beginn einer *S. aureus* Infektion, wenn die Bakteriendichte noch gering ist, vor allem bakterielle Adhäsine produziert werden. Ist das Wirtszellgewebe kolonisiert und eine bestimmte Populationsdichte erreicht, reguliert *agr* die Produktion der Zellwandproteine herunter und die der sezernierten Virulenzfaktoren herauf (Novick, 2003).

Der *agr*-Lokus (*accessory gene regulator*) wurde durch eine Transposoninsertion entdeckt, bei der die Expression verschiedener Virulenzfaktoren beeinflusst war (Recsei et al., 1986). Bei dieser Mutante werden zellwandassoziierte Proteine (z. B.

Protein A) überexprimiert, während die Synthese der sezernierten Proteine, wie z.B. das Hämolyysin und andere Proteasen stark herunterreguliert sind.



**Abb. 1 Schematische Darstellung des *agr*-Systems.**

*Staphylococcus aureus* reguliert die Expression der Virulenzfaktoren über das *Quorum Sensing*-System *agr*. Erklärung im Text (Iwatsuki et al., 2006).

Der *agr*-Lokus (Abb. 1) besteht aus zwei divergenten Transkriptionseinheiten, deren Transkription von den Promotoren P2 und P3 kontrolliert wird. Das P2 Transkript (RNAII) kodiert für das Zwei-Komponentensystem (AgrA, AgrC) und das zugehörige *auto-inducing-peptide* (AIP), welches aus dem AgrD Protein durch Prozessierung mittels AgrB gebildet wird (Novick et al., 1995). Das zyklische Oktapeptid (AIP) wird von der Zelle sezerniert und bindet auf der extrazellulären Seite spezifisch an den Transmembranrezeptor (AgrC). Die Bindung von AIP an den Transmembranrezeptor (Histidin-Proteinkinase) führt zur Aktivierung durch die Phosphorylierung an einem Histidinrest. Dieser Phosphatrest wird anschließend auf AgrA, den *response regulator* des *agr*-Systems, übertragen. Der aktivierte intrazelluläre Effektor bindet an die Interpromotorregion im *agr*-Lokus, vermutlich zusammen mit dem Transkriptionsfaktor *sarA*, und führt zur Expression von RNAII und RNAIII (siehe Abb. 1). Das P3 Transkript RNAIII kodiert für  $\delta$ -Hämolyysin und ist der eigentliche intrazelluläre Effektor des *agr*-Systems. RNAIII beeinflusst die Expression verschiedener Virulenzfaktoren. Die Expression mancher Oberflächenproteine, wie

zum Beispiel Protein A (SpA), wird herunterreguliert, während die Expression einiger sezernierter Proteine, wie  $\alpha$ -Hämolysin, gesteigert wird, sobald RNAIII transkribiert wird. Struktur und Funktionsanalysen von RNAIII legen mehrere mögliche Mechanismen nahe, die die Regulation auf Transkriptionsebene ermöglichen. Es ist allerdings unklar, auf welche Weise die Expression gesteuert wird (Novick, 2003; Novick et al., 1993). Für  $\alpha$ -Hämolysin und Protein A konnte gezeigt werden, dass RNAIII auch auf Translationsebene agieren kann (Morfeldt et al., 1995; Novick et al., 1993).

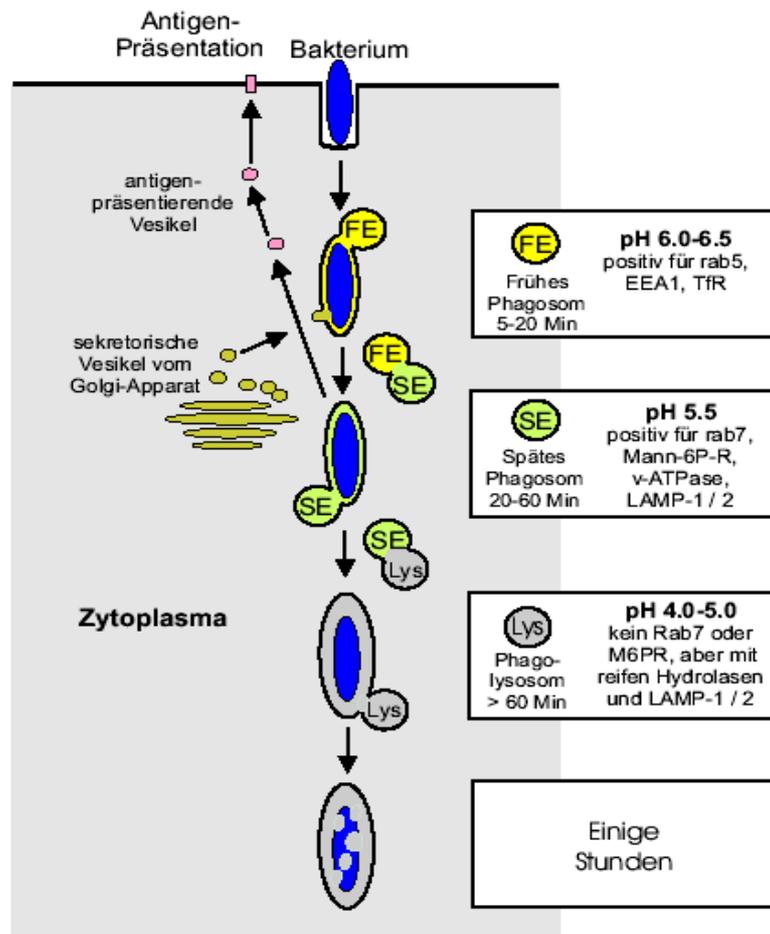
#### **1.4 *S. aureus* als intrazelluläres Pathogen**

*S. aureus* wurde als klassisch extrazelluläres Pathogen beschrieben (Finlay and Cossart, 1997). Heute wird *S. aureus* auch als fakultativ intrazelluläres Bakterium angesehen, da es die Fähigkeit besitzt, an nicht-professionellen Phagozyten, wie Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, und Keratinozyten, zu adhären und diese zu infiltrieren (Almeida et al., 1996; Nuzzo et al., 2000; Ogawa et al., 1985). Dieses Verhalten wird mit der Pathogenese von invasiven und metastasierenden *S. aureus* Infektionen in Verbindung gebracht (Sinha and Herrmann, 2005). Adhärenz und Invasion von Wirtszellen ist Voraussetzung für endovaskuläre Infektionen, wie die infektiöse Endokarditis (Petti and Fowler, 2003; Sinha and Herrmann, 2005). Auch eine systemische Ausbreitung von *S. aureus* (Bakteriämie und Sepsis) setzt das Überwinden einer zellulären Barriere, wie der Epithelialschicht, voraus.

Das Vermögen in die Wirtszellen einzudringen, ist unter *S. aureus* Stämmen weit verbreitet. Aktuelle Studien zeigen, dass die meisten pathogenen klinischen *S. aureus* Isolate diese Fähigkeit besitzen (Krut et al., 2003; Sinha et al., 1999).

## 1.5 Modulation der Phagozytose von intrazellulären Bakterien

Werden Mikroorganismen in Wirtszellen aufgenommen, werden sie normalerweise von dem wirtszelleigenen Abwehrsystem durch Phagozytose eliminiert. Phagozytose findet in professionellen Phagozyten (Makrophagen und Neutrophilen), aber auch in einem geringeren Ausmaß in nicht-professionellen Phagozyten, wie Fibroblasten, Endothel- und Epithelialzellen, statt. Initiiert wird der Prozess durch die Bindung des Pathogens an Rezeptoren der Zelloberfläche (Fc-Rezeptor und Komplement-Rezeptor). Interaktionen dieser Rezeptoren und deren Liganden mit dem Pathogen führen zu einer Reorganisation der Plasmamembran, zur Bildung des Phagosoms und zur Aufnahme des Pathogens in die Zelle. Das Phagosom unterliegt dann einem Reifungsprozess. Dabei fusioniert das Phagosom sequentiell mit Vesikeln des Endozytoseweges bis zur Bildung des Phagolysosoms. Die Fusionsprozesse sind von Rab-GTPasen reguliert. Die Phagosomenreifung geht mit dem Einbau oder Verlust verschiedener Proteine einher, die das jeweilige Reifestadium markieren (Abb.2). Nach der Aufnahme fusioniert das Phagosom mit frühen Endosomem und kann dadurch anhand der GTPase Rab5, EEA1 (*early endosome antigen 1*) und dem Transferrin-Rezeptor (TfR) charakterisiert werden. Späte saure Phagosomen sind durch Rab7, LAMP-1 (*lysosome-associated membrane protein-1*), die Untereinheiten der Protonenpumpe (v-ATPase) und den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR) gekennzeichnet. Im Phagolysosom werden dann die Mikroorganismen durch Hydrolasen (CathepsinD) und reaktive Sauerstoffverbindungen getötet und verdaut (Desjardins et al., 1997; Haas, 2002; Meresse et al., 1999; Tjelle et al., 2000; Vieira et al., 2002).



**Abb. 2 Schematische vereinfachte Darstellung des phagoendozytischen Weges.**

Der Weg von der Aufnahme eines phagozytierten Partikels bis zu dessen kompletten Abbau ist gezeigt. Die Reifung des Phagosoms erfolgt entlang des endozytischen Weges. FE, frühes Endosom; SE, spätes Endosom; Lys, Lysosom (Haas, 2002).

Trotz dieser effizienten Eliminierungsstrategie haben einige intrazelluläre Mikroorganismen Pathogen-spezifische Mechanismen entwickelt, um sich dem tödlichen Transport zum Lysosom zu entziehen. Sie interagieren an verschiedenen Schritten des phagoendozytischen Prozesses der Wirtszelle. *Mycobacterium tuberculosis* blockiert die Reifung des eigenen Phagosoms zum Phagolysosom. Die Mykobakterien enthaltenden Phagosomen besitzen LAMP, akquirieren aber keine v-ATPase und werden entsprechend nicht angesäuert. Das Bakterium verhindert die Anlagerung der Protonenpumpe, indem es Lipide produziert, welche das humane Phosphatidylinositol (PI) imitieren (Sturgill-Koszycki et al., 1994). Dadurch werden PI3-Phosphat-abhängige Wege inhibiert (Vergne et al., 2004) und darunter fällt auch

der PI3-Kinase-abhängige Transport der v-ATPase vom Transgolginetzwerk zu den Phagosomen (Fratti et al., 2003).

Auch *Salmonella enterica serovar Thyphimurium* blockiert die Reifung zum kompletten Phagolysosom. Deren Phagosomen mangelt es an Mannose-6-Phosphat-Rezeptor und lysosomalen Enzymen. In dieser modifizierten Salmonella-Vakuole vermehren sich die Bakterien. Dafür verantwortlich sind bakterielle Effektorproteine, welche über das TTSS (*type III secretion system*) in die Wirtszelle appliziert werden (Meresse et al., 1999).

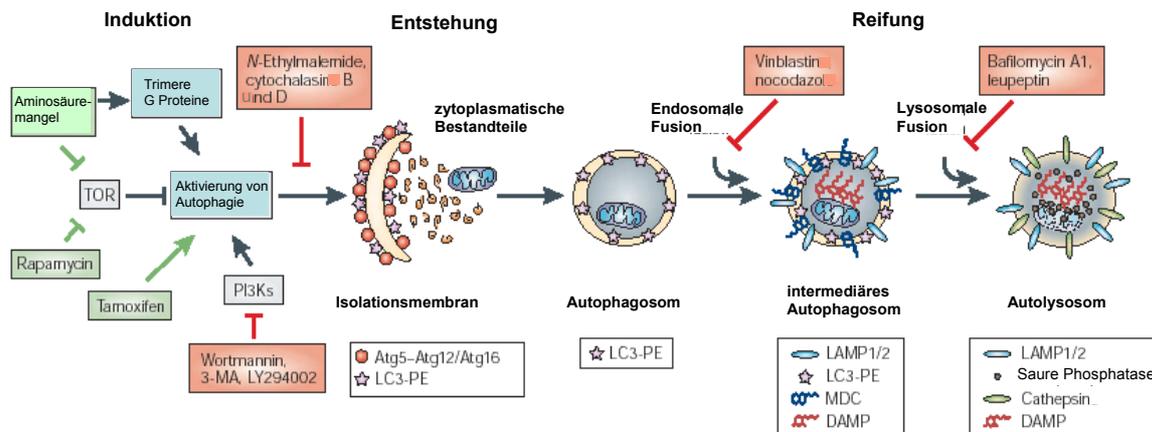
Ein anderer Weg den Abwehrmechanismen der Zelle zu entgehen, ist die Flucht aus dem phagoendozytischen Weg in das Zytoplasma. Diese Strategie benutzen *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* und *Rickettsia conorii*. Kurz nach der Aufnahme in die Zelle lysieren Listerien die sie ummantelnde Vakuole mit dem porenbildende Toxin Listeriolysin O, treten in das Zytoplasma über und vermehren sich dort. Danach löst ein *actA*-kodierte Protein die Rekrutierung humanen Aktins aus, welches dem Bakterium durch einen Aktinkometenschwanz zur Beweglichkeit verhilft. Die Listerien können dadurch benachbarte Zellen infizieren (Brundage et al., 1993; Cossart and Lecuit, 1998; Gouin et al., 1999). Bei den Shigellen besitzt der IpaB-Faktor eine solch lytische Aktivität (High et al., 1992).

*S. aureus* ist ebenfalls in der Lage dem phagoendozytischen Weg zu entkommen. Nach Infektion von Epithelialzelllinien flüchtet *S. aureus* in das Zytoplasma der Zelle und induziert dort Wirtszelltod (Bayles et al., 1998; Kahl et al., 2000), wobei es zu keiner lysosomalen Degradation von *S. aureus* kommt (Krut et al., 2003).

Ferner ist über das intrazelluläre Verhalten von *S. aureus* wenig bekannt. Weder weiß man, in welche phagozytischen Kompartimente *S. aureus* aufgenommen wird, ob es die Phagosomen moduliert, noch an welchem Schritt der Phagozytose sich *S. aureus* in das Zytoplasma befreit.

## 1.6 Autophagie

Zu dem phagoendosomal Abbauweg gibt es in Wirtszellen einen zusätzlichen Abwehrmechanismus zu der Eliminierung von Bakterien. Durch Autophagie kann die Zelle Bakterien aus dem Zytoplasma in Vesikeln isolieren, welche der phagolysosomalen Degradation entgehen und sich frei im Zytoplasma befinden. Autophagie ist ein hoch konservierter Prozess in Eukaryoten, bei dem zytoplasmatische Bestandteile, wie langlebige Proteine oder Organellen durch doppelmembranständige Vesikel, so genannte Autophagosomen, abgesondert werden. Die Autophagosomen reifen durch Fusion mit Lysosomen zu Autolysosomen, in denen der Inhalt verdaut wird. Am besten untersucht ist Autophagie in der Hefe. In Eukaryoten wird hauptsächlich, die in Hefe entdeckte Makroautophagie beschrieben und wird deshalb generalisiert als Autophagie bezeichnet (Mizushima et al., 2002). Autophagie spielt in physiologischen Prozessen, wie Morphogenese, Zellhomeostase (Umschlag von Mitochondrien), Zelldifferenzierung, Gewebeumbildungen und Antigenpräsentation, eine Rolle. Es ist außerdem eine zelluläre Reaktion auf unterschiedliche Stress-Situationen, wie Nährstoffmangel, oxidativen Stress oder die Anreicherung von falsch gefalteten Proteinen. Bei Aminosäuremangel der Zellen (*Starvation*), wird Autophagie induziert, um endogene Proteine zu Aminosäuren zu verdauen, welche wiederum zur Synthese von lebensnotwendigen Proteinen recycelt werden. Auch an pathophysiologischen Prozessen ist Autophagie beteiligt. Es wird ihr eine Rolle bei Krebs, muskulären Erkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimer- oder Parkinson Erkrankung zugeschrieben. (Meijer and Codogno, 2004; Ogier-Denis and Codogno, 2003; Yorimitsu and Klionsky, 2005).



**Abb. 3 Der Autophageweg.**

Induktion, Exekution und Reifung des Autophagosoms. Grüne Linien führen zur Aktivierung von Autophagie und Rote führen zur Inhibition. 3-MA, 3-Methyladenin; DAMP, N-(3-[2,4-dinitrophenyl]-amino)propyl-N(3-aminopropylmethylamin)dihydrochlorid; LAMP, *lysosom-associated membrane-protein*; LC3, *microtubule-associated-protein light-chain3*; MDC, Monodansylcadaverin; PE, Phosphatidylethanolamin; PI3K, Phosphatidylinostol-3-Kinase; TOR, *target of rapamycin*. Weitere Erklärung im Text (Kirkegaard et al., 2004).

Die ATG-Gene zur Regulierung von Autophagie wurden in der Hefe entdeckt (Tsukada and Ohsumi, 1993). Der Signaltransduktionsweg zwischen Hefen und Säugetieren ist hoch konserviert und daher der molekulare Mechanismus sehr ähnlich (Abb.3). Die Proteinkinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) reguliert negativ Autophagie. Unter Aminosäuremangel (*Starvation*) wird mTOR dephosphoryliert, was zu einer Aktivierung der Signalkaskade führt. Die Bildung der Autophagosomen oder zunächst der Isolationsmembran (*sequestration crescent*) läuft über zwei koordinierte Konjugationssysteme ab. Es kommt erstens zu einer kovalenten Bindung zwischen ATG5 und ATG12 und zweitens zwischen ATG8 und Phosphatidylethanolamin (PE). Die Bildung des ATG5-ATG12 Komplexes wird von den ubiquitinomologen Enzymen ATG3, ATG7 und ATG10 katalysiert. ATG12 und ATG5 bilden schließlich einen Komplex mit ATG16L.

ATG5 besitzt eine membranverankernde Domäne und ist für die Ausdehnung der Isolationsmembran verantwortlich. Der ATG5-ATG12 x ATG16L-Komplex dissoziiert vom fertigen doppelmembranösen Autophagosom. Der Knockout des *atg5*-Gens in Mäusen resultiert in Verlust von Autophagie, was zu reduziertem Aminosäuregehalt im Plasma und Gewebe, Energieverlust und nach 24 Stunden *postpartum* zum Tod führt (Kuma et al., 2004). Bei der Konjugation von LC3/ATG8 (*microtubule-*

*associated protein light-chain 3*) an PE wird zytosolisches LC3 C-terminal proteolytisch durch ATG4 gespalten und über ATG3 und ATG7 an PE an die Isolationsmembran gebunden (Kabeya et al., 2000). LC3 wird als einziger spezifischer Marker für Autophagosomen betrachtet, da er von der Bildung bis zur autophagolysosomalen Zerstörung des Autophagosoms anwesend ist (Mizushima, 2004). Nach der Entstehung des vollständigen doppeImembranständigen Autophagosoms fusionieren die Autophagosomen mit Vesikeln des Endozytoseweges. Diese intermediären Autophagosomen fusionieren wiederum mit Lysosomen zu Autolysosomen. Dabei wird die innere autophagosomale Membran degradiert und es entsteht ein Autolysosom mit einfacher Membran, welches mit den bekannten lysosomalen Markern dekoriert ist. Die lysosomalen Enzyme verdauen dann den Inhalt der Autolysosomen (Yorimitsu and Klionsky, 2005).

Die Serin-Threonin-Kinase mTOR ist nicht nur das Schlüsselenzym für den Ablauf von Autophagie, sondern ist auch in eine Vielzahl anderer physiologischer Prozesse der Zelle involviert, wie Transkription, Translation und Organisation des Zytoskeletons. mTOR selber wird von unterschiedlichen Signalen reguliert. Ein Beispiel ist das Insulin-Akt Signalnetzwerk. Insulin und Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren initiieren die Signalkaskade am Insulinrezeptor, was zu der Aktivierung von IRS1 (*insulin receptor substrate 1*) und PI3K (Phosphatidylinositol-3-phosphatkinase) führt. Es kommt zur Rekrutierung von Akt zur Plasmamembran und Akt dephosphoryliert mTOR (Corradetti and Guan, 2006). Autophagie lässt sich daher pharmakologisch durch die PI3K-Inhibitoren 3-Methyladenin oder Wortmannin inhibieren. Der immunsupprimierende Wirkstoff Rapamycin aktiviert Autophagie spezifisch an mTOR. Aminosäuremangel (Starvation) führt in der Zelle ebenfalls zu der Aktivierung von Autophagie. Wie Aminosäuren mechanistisch die Aktivierung von Autophagie über mTOR regulieren ist nicht geklärt. Es ist bekannt, dass Aminosäuren den Phosphorylierungsgrad der Zelle beeinflussen und auch die Funktion von verschiedenen Proteinen, welche an der über den mTOR Signalweg regulierte mRNA-Translation beteiligt sind. Am besten untersucht ist hier die ribosomale S6 Proteinkinase, die mit mTOR interagiert (Beugnet et al., 2003).

## 1.7 Autophagie und Bakterien

Aktuelle Studien zeigen, dass Autophagie als zellulärer Abwehrmechanismus gegenüber Bakterien wie auch Viren fungiert (Abb. 4) (Kirkegaard et al., 2004). Gruppe A *Streptococcus* (GAS) wird über den Phagoendozytoseweg in die Wirtszelle aufgenommen. Nach dem Eintritt sezerniert das Bakterium Streptolysin, zerstört die ummantelnde Vakuole und befindet sich somit frei im Zytoplasma. Die daraus resultierende Induktion von Autophagie führt zur Aufnahme von GAS in LC3-positive Autophagosomen, welche mit Lysosomen fusionieren und zu Autolysosomen reifen. Im Autolysosom wird GAS von der Wirtszelle verdaut und getötet (Nakagawa et al., 2004). Auch *Listeria monocytogenes* vermag aus dem Phagosom ins Zytoplasma überzutreten. Inhibiert man dieses Bakterium metabolisch mit Chloramphenicol, wird es durch Autophagosomen eingefangen und unterliegt der lysosomalen Degradation (Rich et al., 2003). Wie zuvor beschrieben, blockiert *Mycobacterium tuberculosis* die Phagosomenreifung. Wird in infizierten Makrophagen pharmakologisch mit Rapamycin Autophagie induziert, kommt es zu einer Fusion mit autophagosomalen Membranen und anschließend zum autolysosomalen Abbau der Mykobakterien. Auch Interferon- $\gamma$  aktivierte Makrophagen induzieren Autophagie, um die Mykobakterien zu eliminieren (Gutierrez et al., 2004).

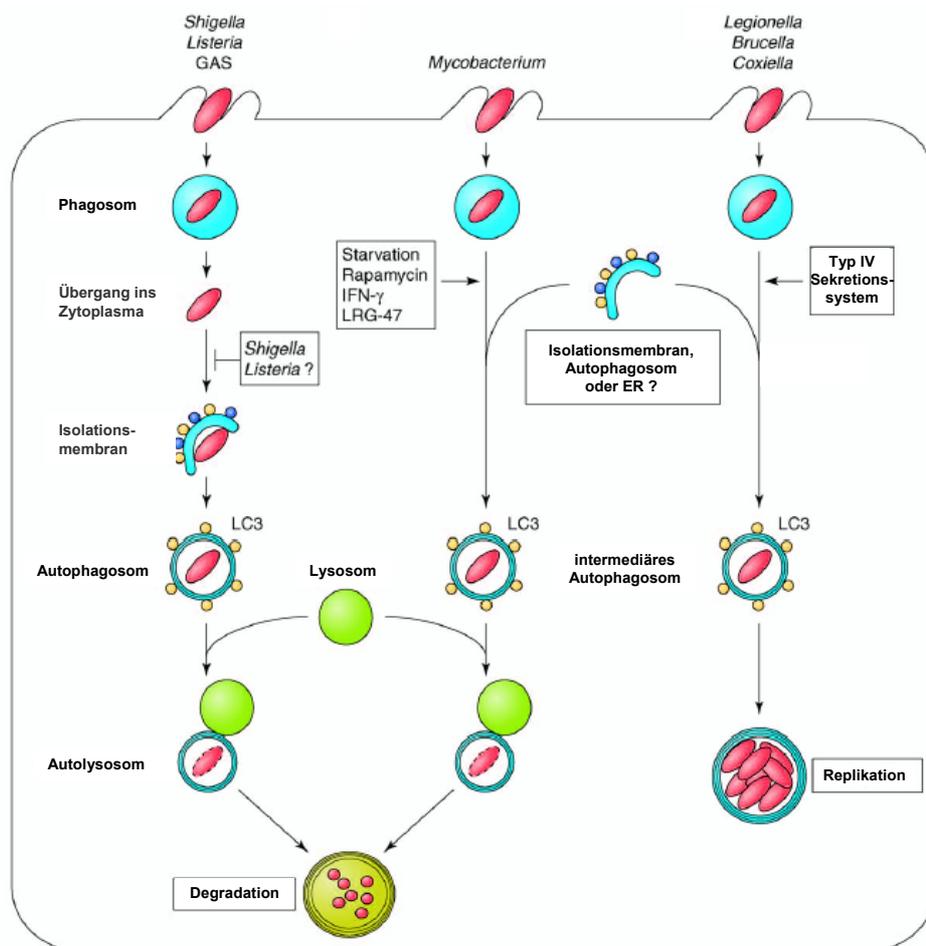
Diese Studien zeigen, dass Autophagie einen zusätzlichen Eliminierungsmechanismus der Wirtszelle darstellt, um intrazelluläre Bakterien, welche dem Phagozytoseweg entkommen, wieder zu kontrollieren. Wie dieser Vorgang auf molekularer Ebene in der Zelle aktiviert wird, liegt noch völlig im Unklaren.

Auf der anderen Seite gibt es Bakterien, die Mechanismen entwickelt haben der autophagischen Wirtszellabwehr zu entgehen (Abb. 4). *Shigella flexneri* antagonisiert die Bindung zu Molekülen, die am Aufbau des Autophagosoms beteiligt sind. Shigellen besitzen auf ihrer Oberfläche den Faktor VirG. ATG5 bindet an dieses Protein und es kommt zu einer Assoziation von autophagosomalen Membranen an dem Bakterium. Gleichzeitig injiziert *Shigella flexneri* via TTSS (*type III secretion system*) das Effektorprotein IcsB, welches stärkere Affinität zu VirG hat und dadurch ATG5 aus der Bindung verdrängt (Ogawa et al., 2005).

Eine dritte Gruppe, die aus den Gram-negativen Bakterien *Brucella abortus*, *Legionella pneumophila*, *Porphyromonas gingivalis* und *Coxiella burnetii* besteht,

profitiert von dem Autophagieweg der Wirtszelle (Abb. 4). Sie nutzen die Autophagosomen als Nische zum Überleben und Replizieren. *Brucella abortus* hat ein TFSS (*type IV secretion system*), genannt VirB, welches essentiell für die Biogenese der Autophagosomen und die Replikation des Bakteriums ist. *Brucella abortus*, wie auch *Porphyromonas gingivalis*, enthaltende phagoendosomale Kompartimente fusionieren schnell mit späten Autophagosomen. Diese Vakuolen werden kurz nach der Fusion negativ für LAMP-1 und die v-ATPase und werden von den Bakterien zur Vermehrung genutzt (Dorn et al., 2001; Pizarro-Cerda et al., 1998). *Legionella pneumophila* überlebt in sauren Autolysosomen, die LAMP-1, sowie Cathepsin D, akquiriert haben. *Coxiella burnetii* lebt und repliziert ebenfalls in sauren, hydrolasereichen Vakuolen, welche über den Autophagieweg entstanden sind (Dorn et al., 2002; Gutierrez et al., 2005; Ogawa and Sasakawa, 2006; Sturgill-Koszycki and Swanson, 2000).

Ob und welche Rolle Autophagie bei einer *S. aureus* Infektion spielt, wurde bis jetzt noch nicht untersucht.



**Abb. 4 Bakterien interagieren mit dem Autophagieweg.**

Die Wirtszelle nutzt Autophagie, um Bakterien zu eliminieren (z. B. GAS). Einige Bakterien sind in der Lage dem Autophagieweg zu entkommen (Shigellen und Listerien). Andere Bakterien nutzen die Autophagosomen als replikative Nische (Brucellen, Legionellen, Coxiellen). (Ogawa and Sasakawa, 2006)

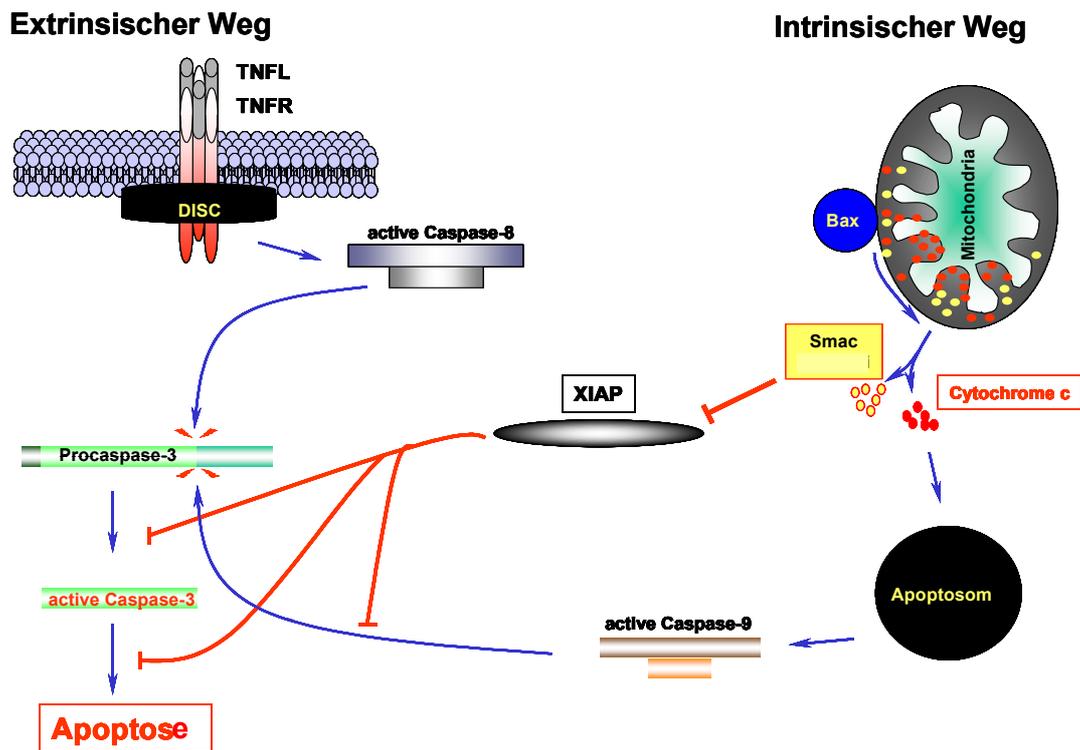
## 1.8 Programmierter Zelltod: Apoptose und Autophagie

Apoptose oder programmierter Zelltod Typ I ist der Hauptmechanismus zur Eliminierung von Zellen in Metazoen. Morphologisch charakterisiert ist Apoptose durch Veränderungen der Plasmamembran (*membrane blebbing*), Chromatinkondensation und Fragmentierung der Zelle in apoptotische Körper, welche von Nachbarzellen phagozytiert werden.

Die Haupteffektoren sind Aspartat-spezifische Proteasen, die so genannten Caspasen. Die Aktivierung dieser Caspasen kann über zwei Apoptosesignalwege stattfinden (Abb. 5).

Der externe Signalweg verläuft über die Aktivierung der *Tumor Necrosis Factor*-Rezeptorfamilie (TNF). Zu diesen so genannten Todesrezeptoren gehören der FAS/CD95 Rezeptor, der TNF- $\alpha$  Rezeptor 1 und die Rezeptoren DR4/DR5, die beide an TRAIL (*TNF- $\alpha$  related apoptosis-inducing ligand*) binden. Bindet ein Ligand an seinen Rezeptor kommt es innerhalb des Rezeptors zur Clusterbildung der Todesdomäne DD (*death domain*). Dadurch kann FADD (*FAS-associated protein with death domain*) am Rezeptor assoziieren. Zum Beispiel resultiert die Aktivierung durch FADD am CD95-Rezeptor in der Formation von DISC (*death inducing signaling complex*), welcher sich aus CD95, FADD und Procaspase-8 zusammensetzt (Scaffidi et al., 1998). Es kommt zur Aktivierung von Caspase-8, welche ihrerseits Caspase-3 aktiviert. Die aktivierte Caspase-3 degradiert Apoptose-spezifische Substrate in der Zelle und führt dadurch in den späten Schritten der Apoptose zum Abbau der Zelle.

Im zweiten intrinsischen Signalweg spielen Mitochondrien eine zentrale Rolle (Abb. 5). Durch einen internen Stimulus werden aus den Mitochondrien proapoptotische Moleküle, wie Cytochrom C und Smac/DIABLO freigesetzt. Das freigesetzte Cytochrom C initiiert die Bildung des Apoptosoms, welches aus APAF-1, Caspase-9 und Cytochrom C besteht. Dort wird die Caspase-9 aktiviert, um wiederum Caspase-3 zu aktivieren (Li et al., 1997). Die proapoptotische Aktivität der Mitochondrien wird durch die Proteine der Bcl-2-Familie reguliert. Diese Proteinfamilie besteht aus pro- und antiapoptotischen Proteinen, von denen das antiapoptotische Bcl-2, wie das proapoptotische Bax am besten untersucht sind. In apoptotischen Zellen fungieren Bax-Oligomere in der Außenmembran der Mitochondrien als Kanäle für die proapoptotischen Proteine (Cytochrom C und Smac/DIABLO). Diese proapoptotische Wirkung von Bax kann durch Bcl-2 antagonisiert werden, welches die Cytochrom C Freisetzung verhindert (Kroemer, 1999). Die Aktivität der Caspasen wird zusätzlich durch eine weitere Proteingruppe, die IAPs (*inhibitor of apoptosis*), moduliert. XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) unterdrückt Apoptose durch direkte Bindung der Caspasen-3, -7 und -9 (Stennicke et al., 2002).



**Abb. 5 Die zwei Apoptosesignalwege.**

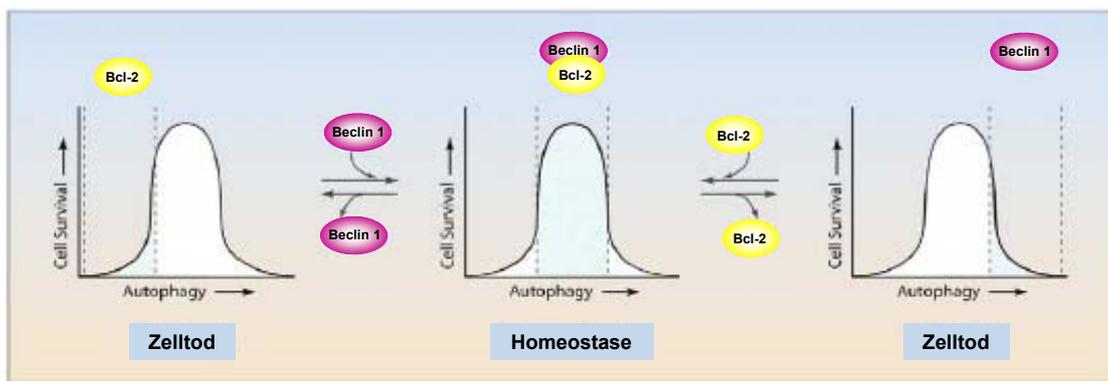
Es führen verschiedene Signalwege zu Apoptose. Der extrinsische Weg wird durch die TNF-Rezeptorfamilie initiiert. Der intrinsische Weg verläuft über die Mitochondrien der Zelle. Abkürzungen und Erklärung im Text.

Der autophagosomale Zelltod oder programmierter Zelltod Typ II ist vom Zelltod durch Apoptose abzugrenzen. Primär erscheint Autophagie als ein Mechanismus, der das Überleben der eukaryotischen Zellen sichert. Dies trifft auf die Eliminierung von zytoplasmatischen Bakterien, der Wiederverwertung von Proteinen und Organellen und der Nährstoffbereitstellung bei Mangelerscheinungen zu.

Andererseits führt Autophagie durch exzessive Eigenverdauung oder Degradation essentieller Zellbestandteile zum Zelltod (Levine and Klionsky, 2004). Hauptsächlich wird diese morphologisch durch eine übermäßige Vakuolisierung der gesamten Zelle mit Autophagosomen charakterisiert. Der autophagosomale Zelltod verläuft caspaseunabhängig und ist auf die Proteine des Autophagieweges, wie ATG5, ATG7 und Beclin 1 angewiesen (Shimizu et al., 2004).

Beclin 1, humanes Homolog des Hefe ATG6, ist Teil des Klasse III PI3K-Komplexes, welcher an der Initiierung zur Autophagosomenbildung beteiligt ist (Kihara et al.,

2001). Das antiapoptotische Protein Bcl-2 kann das proautophagische Beclin 1 binden. Dadurch kommt es nicht zur Formation des Beclin 1-PI3K-Komplexes. In Zellen, welchen es an Aminosäuren mangelt (*Starvation*), wird somit der eigentlich resultierende Autophagie-Zelltod verhindert. Die Signalkaskaden der beiden Zelltodwege sind scheinbar miteinander verknüpft. Es wird vermutet, dass Bcl-2 antiautophagisch regulierend an der Grenze von physiologischen Autophagie-Leveln zur Autophagie-Überstimulation, welcher zum Zelltod führt, wirkt (Abb. 6) (Pattingre et al., 2005).



**Abb. 6 Model zur Funktion des Bcl-2-Beclin 1-Komplexes zur Autophagieregulation.**

Physiologische Autophagie-Level sind für die Zellhomeostase essentiell (schattierte Fläche des mittleren Graphen). Bei Abwesenheit von Autophagie kommt es bei Nährstoffmangel oder anderen Stress-Stimuli zum Zelltod (schattierte Fläche linker Graph). Überhöhte Autophagie-Level führen zum Autophagie-Zelltod (schattierte Fläche rechter Graph). (Pattingre et al., 2005)

Alternativ zu Apoptose kann Autophagie unter bestimmten Bedingungen zum Zelltod führen. Es kommt zum Autophagie-Zelltod, wenn Apoptose von der Zelle nicht ausgeführt werden kann. In Bax/Bak Doppelknockout Maus-Fibroblasten kommt es nach proapoptischen Stimuli trotzdem zum Zelltod. Dieser Zelltod kann durch Autophagieinhibitoren, wie 3-MA unterdrückt werden und ist abhängig von ATG5 und Beclin 1 (Shimizu et al., 2004).

## 1.9 *S. aureus* induziert Wirtszelltod

*Staphylococcus aureus* induziert nach Invasion von nicht-professionellen Phagozyten Tod in den Wirtszellen. Über ein Drittel untersuchter klinischer *S. aureus* Isolate ist zytotoxisch (Krut et al., 2003). Der zum Zelltod führende Mechanismus ist nicht geklärt und wird kontrovers diskutiert.

Bayles et al. (1998) und Menzies und Kourteva (1998) beschreiben, dass internalisierte und metabolisch aktive *S. aureus* Apoptose in Wirtszellen induzieren. Diese Beobachtung wird von Bantel et al. (2001) bestätigt. Sie zeigen, dass das von *S. aureus* sezernierte Hämolysin  $\alpha$ -Toxin für die Induktion von Apoptose verantwortlich ist. Der Zelltod in Jurkat-Zellen soll über einen caspaseaktivierten, Bcl-2-kontrollierten, intrinsischen Apoptoseweg verlaufen. Gleichzeitig wird von Baran et al. (2001) ein CD95-abhängiger Apoptoseweg für *S. aureus* in Monozyten postuliert.

Später stellen Essmann et al. (2003) fest, dass sich keine klassische Apoptose in  $\alpha$ -Toxin behandelten Zellen abspielt. Denn weder Caspaseinaktivierung mit zVAD-fmk noch Bcl-2-Überexpression konnten den Zelltod verhindern. Zusätzlich zeigen die Zellen morphologische Indizien für Nekrose, aber auch eine extreme untypische Vakuolisierung. Diese Beobachtungen führten zu der Schlussfolgerung, dass es trotz aktiver Caspasen überwiegend zu Nekrose in den infizierten Zellen kommt. In peripheren mononukleären Blutzellen wird durch  $\alpha$ -Toxin, im Gegensatz zu Jurkat-Zellen, die TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) Produktion stimuliert, was zur todesrezeptorabhängigen Apoptose in diesen Zellen führt (Haslinger et al., 2003). In der aktuellsten Studie (Haslinger-Löffler et al., 2005) über den von *S. aureus* induzierten Wirtszelltod wird belegt, dass  $\alpha$ -Toxin nicht allein als Stimulus ausreicht, um in verschiedenen Endothelzellen Apoptose auszulösen. Die Autoren kamen zu der Erkenntnis, dass nur stark invasive *S. aureus* CD95-unabhängig, aber caspaseabhängige Apoptose induzieren können.

Wie die unterschiedlichen Ergebnisse der Veröffentlichungen zeigen, konnte noch kein einheitlicher von *S. aureus* induzierter Wirtszelltodmechanismus beschrieben werden.

Obwohl noch kein *S. aureus* Faktor, der den Wirtszelltod verursacht, identifiziert ist, weiß man, dass einige unter der Kontrolle von *agr* stehen müssen. *Agr*-Mutanten zeigen höhere Internalisierungsraten während der Infiltration von

Rinderbrustepithelialzellen auf. Allerdings haben sie die Eigenschaft verloren, den Wirt zu töten (Wesson et al., 1998). Auch menschliche Nabelschnurendothelialzellen überleben die Infektion mit *agr*-Mutanten (Haslinger-Löffler et al., 2005). In welcher Weise *agr* regulierend auf den zum Zelltod führenden Mechanismus wirkt, ist nicht bekannt.

## 1.10 Zielsetzung

Einige klinische, invasive *S. aureus* Stämme infiltrieren nicht-professionelle Phagozyten und induzieren den Tod der Wirtszellen.

In dieser Arbeit sollte die intrazelluläre Kompartimentalisierung von *S. aureus* während der Infektion nicht-professioneller Phagozyten charakterisiert werden. Insbesondere sollte die Kolokalisation der intrazellulären Bakterien mit Markern der Phagosomenreifung im Zeitverlauf dargestellt werden.

In diesem Zusammenhang sollte auch geklärt werden, ob der eukaryotische Autophagieweg für das intrazelluläre Überleben von *S. aureus* eine Rolle spielt.

Außerdem sollte im Rahmen dieser Arbeit präzisiert werden, wie *S. aureus* die Wirtszellabwehrmechanismen überwindet und wie der von *S. aureus* induzierte Todesmechanismus in der Wirtszelle abläuft.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Substanzen

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
1, 10-Phenanthrolin	Merck
2-Mercaptoethanol	Merck
3-Methyladenin	Fluka
Agarose	BMA
APS (Ammoniumpersulfat)	AppliChem
ARALDYT® Accelerator DY 964	Serva
ARALDYT® CY 212	Serva
ARALDYT® Hardener HY 964	Serva
Bacto Agar	Difco
Benzonase	Roche
Blasticidin	Invitrogen
Bromphenolblau	Sigma
BSA (Albumin aus Rinderserum)	Merck
Complete Proteaseinhibitorcocktail	Roche Doagnostics
Cytochalasin B	Fluka
DABCO (Diazabicyclo-(2,2,2)-octan)	Merck
E64	Sigma
EDTA (Etylendiamintetraessigsäure)	Merck
EGTA (Etylendioxybis(ethylnitrilo)-tetraessigsäure)	AppliChem
Ethanol	Riedel de Haen

---

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Ficoll 70, Type 70	Sigma
Formaldehyd	Roth
Glycerin	Merck
Hefeextrakt	Difco
HEPES (Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure)	Serva
Leupeptin	Sigma
Lysostaphin	Sigma
Magermilch	Frema-Neuform
Methanol	Merck
Natriumcacodylat	Roth
Natriumchlorid	Merck
Pefabloc	Roche
Pepstatin A	Sigma
Propan-2-ol	Roth
Propylenoxid	Merck
Rapamycin	Sigma
Saccharose	Sigma
Salzsäure	Merck
Saponin	Sigma
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Merck
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth
Trypton	Gibco
Tween 20	Sigma
Vancomycin	Sigma
Wortmannin	Sigma
z-VAD(Ome)-FMK	Alexis

## 2.1.2 Medien, Lösungen und Puffer

Alle Lösungen wurden, falls nicht anders angegeben, mit deionisiertem bidestilliertem Wasser aus einer EASY-pur UV/UF Reinstwasseranlage angesetzt.

### 2.1.2.1 Zellkultur-Reagenzien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Zusammensetzung</b>
Dulbecco's MEM (1x)	Biochrom
Trypsin-Lsg. (10x)	Biochrom
FCS (Fötales Kälberserum)	Biochrom
Penicillin-Streptomycin	Biochrom
PBS-Puffer	Biochrom
Trypanblau	Biochrom
Starvation-Medium	0,035% NaHCO <sub>3</sub> in Hanks' Balanced Salt Solution

### 2.1.2.2 Bakterienkultur

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Zusammensetzung</b>
LB (Luria-Bertani)-Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl

### 2.1.2.3 SDS-PAGE

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Zusammensetzung</b>
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
Rainbow Protein Marker (High Range)	Amersham Pharmacia
Page Ruler Protein Marker	Fermentas

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Zusammensetzung</b>
Acrylamid 4K Lösung (40%) Mix 37,5:1	Appllichem
APS-Lsg.	10% APS

### 2.1.2.4 Western Blot

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Zusammensetzung</b>
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
Block-Puffer	5% Magermilch 2% BSA in 1 x TBST

### 2.1.2.5 Mikroskopie

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Zusammensetzung</b>
DABCO Einbettmedium	2,5% DABCO, Diazabicyclo-(2,2,2)-octan 10% Glycerol in PBS
Prolonge Gold Antifade PFA	Invitrogen 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
Karnovsky-Puffer	2,5 ml Paraformaldehyd (8%) 1,0 ml Glutaraldehyd (25%) 5,0 ml Cacodylat Puffer (200 mM), pH 7,2 1,5 ml Wasser

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Zusammensetzung</b>
Uranylacetat-Lsg.	1,5% Uranylacetat in 70% Ethanol
Cacodylat-Puffer	0,1 M Natriumcacodylat, pH 7,2
Osmiumtetroxid-Lsg.	1:1 OsO <sub>4</sub> :Cacodylt-Puffer 0,2 M
Araldyt-Einbettungsplastik	8 g Araldit Cy212 11,6 g Araldit-Hardener Hy964 0,4 g Araldit-Accelerator Dy964
Bleicitrat nach Reynolds	120 mM Natriumcitrat 80 mM Bleinitrat 8 ml Natronlauge 1N, pH 12,0 auf 50,0 ml Wasser

### 2.1.2.6 Phagosomenisolation

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Zusammensetzung</b>
Homogenisierungs-Puffer (HB)	250 mM Saccharose 20 mM HEPES KOH, PH 7,2
HB+EGTA	0,5 mM EGTA in HB
Proteaseinhibitorcocktail	1 µM Leupeptin 0,75 M 1,10-Phenanthrolin 1 µM Pepstatin A 2 µM E64 1 mM Pefablock
Saccharose-Lsg.	65%, 55%, 32,5% oder 10% Saccharose 0,5 mM EDTA 20 mM HEPES/KOH, pH 7,2
Ficoll Kissen	15% Ficoll (Mw 70000) 5% Saccharose 0,5 mM EGTA 20 mM HEPES/KOH, pH 7,2

### 2.1.2.7 Zellextrakte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Zusammensetzung</b>
Puffer A	20 mM HEPES, pH 7,5 10 mM KCl 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EGTA 10 µM Cytochalasin B 1 mM Dithiothreitol Protease Complete Cocktail
TNE-Puffer (ohne NaCl)	100 mM TRIS, pH 7,2 10 mM EDTA 1% NP-40 Complete Proteaseinhibitorcocktail

### 2.1.3 Antikörper

<b>Bezeichnung</b>	<b>Anwendung</b>	<b>Hersteller</b>
Huhn Anti-Human APG5L	Western Blot 1 :500	Abcam
Kaninchen Anti-Huhn-IgG-HRP	Western Blot 1:1000	Dianova
Kaninchen Anti-Ziege IgG-HRP gekoppelt	Western Blot 1:10000	Dianova
Maus Anti-Human Lamp-2 monoklonal	Immunofluoreszenz 1:1000	Southern Biotech
Maus Anti- <i>S. aureus</i> Protein A monoklonal	Immunofluoreszenz 1 :1000	Sigma
Maus Anti-β-Actin monoklonal A5441	Western Blot 1:2500	Sigma
Schaf Anti-Maus IgG-HRP	Western Blot 1:100	Amersham
Ziege anti-Human Cathepsin D monoklonal SC6486	Western Blot 1:100	Santa Cruz
Ziege Anti-Maus IgG-Alexa Fluor 568 gekoppelt	Immunofluoreszenz 1:1000	Molecular Probes

### 2.1.4 Primer

Alle Primer wurden bei Sigma Genosys synthetisiert.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
EGFPf	CACCATGGTGACAAGGGC
EGFP <sub>r</sub>	CTTAAAGCTTGTACAGCTCGTCCATG
LC3f	CACCAAGCTTATGCCGTCGGAGAAGACCTTCAAGCA
LC3 <sub>r</sub>	TTACACTGACAATTTTCATCCCG
Δ20G120A-LC3 <sub>r</sub>	TTAGGCGAACGTCTCCTGGGAGGCATAG

### 2.1.5 Template-DNA und Vektoren

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Full Length</i> LC3-cDNA Klon	RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung)
pENTR-D-TOPO Vektor	Invitrogen
Vektor pEGFP-N1	Clontech Laboratories

### 2.1.6 Kits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
BCA Protein Assay	Pierce
DC-Protein Assay	Biorad
ECL Detection Reagent Kit	Amersham Pharmacia
ViraPower™ II Lentiviral Gateway® Expression System	Invitrogen

### 2.1.7 Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Blutagarplatten	Oxoid
Criterion Fertiggassette	Biorad
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Mueller-Hinton-Platten	Oxoid
Nitocellulose Membran Protran 0,2mm	Schleicher & Schuell

### 2.1.8 Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Criterion Blotter BR 8,7x13 cm	Biorad
Criterion Cell 8,7x13 cm	Biorad
EDDY-Jet	IUL Instruments Königswinter, Deutschland
ELISA Reader MRX TC	Dynex Technology
Gewebehomogenisator Dura-Grind Tissue Grinder	Wheaton
Heißluftofen	Biometra
Leica TC SL-Mikroskop	Leica
Power Supply EPS-3501 XL	Amersham Pharnacia
Roller Cat RM5	Zipperer
Scanner Umax	Amersham Pharnacia
Schüttler Comfort	Eppendorf
Schüttler WT 12	Biometra
SW41Ti Rotor	Beckman
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf
Ultracut UCT Ultramicrotom	Reichert
Ultrazentrifuge Sorvall Discovery 90SE	Sorvall/Kendro
Umkehrmikroskop Olympus IX81 mit F-View II Trigger Camera	Olympus/Soft Imaging System
UV Crosslinker UVC 500	Hofer
Zeiss EM 902	Zeiss
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus
Zentrifuge RC5C plus	Sorvall

### 2.1.9 Software

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
analySISD Software	Soft Imaging System
Cell <sup>P</sup> Software	Soft Imaging System
Leica Confocal Software	Leica

### 2.1.10 Eukaryotische Zell-Linien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>
HeLa (ATCC CCI-2)	ATCC (American Type Culture Collection), Manassas, USA
HeLa-Bcl-2	Dr. Hamid Kashkar Institut für med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene Köln, Deutschland
HeLa-XIAP	Dr. Hamid Kashkar
HeLa-EGFP-LC3	diese Arbeit
HeLa-EGFP-Δ20G120A-LC3	diese Arbeit
MEF-Knockout (KO) ATG5 <sup>-/-</sup>	Dr. Noboru Mizushima The Tokyo Metropolitan Institute for Medical Science Tokio, Japan
MEF-Wildtyp (WT) ATG5 <sup>+/+</sup>	Dr. Noboru Mizushima
MKSA	Dr. Olaf Utermöhlen Institut für med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene Köln, Deutschland
MCF7 (ATCC HTB-22)	ATCC

### 2.1.11 Bakterienstämme

<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>
ATCC 29213	DMSZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), Braunschweig, Deutschland

<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>
MW2 (NRS123)	NARSA (The network on antimicrobial resistance in <i>Staphylococcus aureus</i> ), Herdon, USA
NCTC 8325 (NRS77)	NARSA
NRS 151	NARSA
RN 4220 (NRS144)	NARSA
USA 300 (NRS384)	NARSA
ATCC 29213-GFP (Ampicillin/Chloramphenicol-Resistenz)	Sonja Leggio Institut für med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Köln, Deutschland
RN 4220-GFP (Chloramphenicol-Resistenz)	Sonja Leggio

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung der Bakterien

Zur Kultivierung von *S. aureus* Stämmen wurde der zu untersuchende Stamm dem bei  $-40^{\circ}\text{C}$  gelagerten Glycerolstock entnommen und auf einer Blutagarplatte ausgestrichen. Nach mindestens 12 h Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurde eine Kolonie der Blutagarplatte in 5 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 200 Umdrehungen/min inkubiert (Vorkultur). Mit dieser Vorkultur wurde der Hauptansatz (50 ml LB-Medium) angeimpft und auf eine Start- $\text{OD}_{600}$  (optische Dichte) von 0,05 eingestellt. Die Kultur wurde bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 200 U/min im Brutschrank inkubiert. Der Verlauf des Bakterienwachstums wurde durch Messen der OD kontrolliert. Wurde die gewünschte OD erreicht, so erfolgte die Entnahme der Bakteriensuspension unter sterilen Bedingungen. Je nach Versuchsansatz wurde die Bakteriensuspension weiterverarbeitet.

### 2.2.2 Kultivierung der eukaryotischen Zellen

HeLa-Zellen, HeLa-Bcl-2-Zellen, HeLa-XIAP-Zellen, HeLa-EGFP-LC3-Zellen, HeLa-EGFP- $\Delta$ 20G120A-LC3-Zellen, MCF7-Zellen, MKSA-Zellen, MEF-KO-ATG5<sup>-/-</sup>, MEF-WT-ATG5<sup>+/+</sup> wurden in Dulbecco's MEM, ergänzt mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin G und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin, kultiviert. Die Zellen wurden in einem Zellkulturschrank bei 37°C und 5% Kohlendioxid gehalten.

### 2.2.3 Generierung der stabil exprimierenden Zelllinien EGFP-LC3-HeLa und EGFP- $\Delta$ 20G120A-LC3-HeLa

Um HeLa-Zelllinien herzustellen, welche stabil die Fusionsproteine EGFP-*microtubule-associated-protein-light-chain-3* (LC3) und dessen EGFP- $\Delta$ 20G120A-LC3-Mutante exprimieren, wurde das ViraPower™ II Lentiviral Gateway® Expression System eingesetzt. Mittels der Primer EGFPf und EGFP<sub>r</sub> wurde EGFP aus dem Vektor pEGFP-N1, welcher hier als DNA-Vorlage diente, amplifiziert. Für die Amplifizierung von LC3 und dessen Mutante, bei welcher die 5 C-terminalen Aminosäuren deletiert sind und an deren Position 120 Glycin durch Alanin substituiert ist, diente der Full Length LC3-cDNA Klon als *Template*-DNA. Bei der PCR wurden für LC3 die Primer LC3f und LC3r und für  $\Delta$ 20G120A-LC3 LC3f und  $\Delta$ 20G120A-LC3r benutzt. An die Sequenz der 5'-Primer wurde jeweils eine HindIII-Schnittstelle angefügt. Die aufgereinigten PCR-Fragmente wurden mit dem Restriktionsenzym HindIII geschnitten, anschließend durch Ligation fusioniert und reamplifiziert. Die so entstandenen DNA-Segmente kodieren für die Fusionsproteine EGFP-LC3 und EGFP- $\Delta$ 20G120A-LC3. Diese wurden in den pENTR-D-TOPO Vektor kloniert und weiter nach den Anweisungen des Herstellers zu lentiviralen Partikeln prozessiert. HeLa-Zellen wurden mit den Lentiviren bei MOI1 transduziert. Die rekombinanten Zellen wurden mit Blastizidin (10  $\mu$ g/ml) zwei Wochen lang selektiert und anschließend subkloniert.

### 2.2.4 Infektion von eukaryotischen Zellen mit *S. aureus*

Zur Durchführung der *in vitro* Infektionen wurden jeweils 500.000 Zellen pro Vertiefung in einer 6-Loch-Zellkulturplatte 18 h vor der Infektion ausgesät. Eine Stunde vor der Infektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und frisches antibiotikafreies Medium zugeführt. Die in Kap. 2.2.1 gewonnene Bakteriensuspension wurde 10 min bei 4000 rpm 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in dem gleichen Medium resuspendiert und mittels OD-Bestimmung auf eine Konzentration von  $1 \times 10^8$  CFU/ml eingestellt. Die Zellen wurden mit einer definierten Bakterienmenge MOI200 (*Multiplicity of Infection*; Infektionsrate) infiziert. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit Trypsin von der Oberfläche der Zellkulturplatten abgelöst und zweimal mit PBS gewaschen. Nicht aufgenommene, extrazelluläre Bakterien wurden durch Inkubation mit 100 µg/ml Lysostaphin 15 min bei 37°C getötet. Nach erneutem zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS, wurden die infizierten Zellen mit antibiotikahaltigem Medium in eine neue 6-Loch-Zellkulturplatten überführt und bis zu indizierten Zeitpunkten inkubiert.

Die Vitalität der Zellen wurde mikroskopisch mittels Trypanblaufärbung (Bonifacio, 2000) bestimmt.

### 2.2.5 CFU-Analyse

Zur Bestimmung der intrazellulären Bakterienmenge wurden die infizierten Zellen, um Antibiotikarückstände zu entfernen, zunächst mit PBS gewaschen und dann mit 0,05% Triton X-100 in PBS lysiert. Die Zellysate wurden mit PBS verdünnt und auf Mueller-Hinton-Platten mit dem EDDY-Jet spiralförmig ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Auszählung der gewachsenen Bakterienkolonien und die CFU-Analyse (*Colony Forming Unit*, Kolonienbildende Einheit) wurden entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt.

## 2.2.6 Induktion und Inhibition von Autophagie und Apoptose

Während der in Kap. 2.2.4 beschriebenen *in vitro* Infektion wurde Autophagie 1 h post Infektion induziert. Die Zellen wurden mit Rapamycin in den Konzentrationen von 20-80 µg/ml für 2 h behandelt. Alternativ wurden die Zellen auch in Starvation-Medium für 2 h inkubiert. Zur Inhibition von Autophagie wurden die Zellen über den gesamten Zeitraum der Infektion mit 50-200 nM Wortmannin oder 5 mM 3-Methyladenin behandelt.

Es wurde durch die Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht bei 20mJ/cm<sup>2</sup> Apoptose induziert.

Um während der Infektion eukaryotische Caspasen zu hemmen, wurden die Zellen 30 min vor der Infektion bei 37°C mit dem Pancaspaseinhibitor zVAD(OMe)-FMK (100 µM) vorbehandelt.

## 2.2.7 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Herstellung der Präparate wurden 50.000 Zellen auf Deckgläschen in einer 24-Loch-Zellkulturplatte ausgesät und wie in Kap. 2.2.4 beschrieben mit Bakterien (MOI20) infiziert. Nach einer Stunde Infektion wurden hier allerdings die adhärennten Zellen zur Lysostaphin-Behandlung nicht von der Oberfläche der Zellkulturplatten abgelöst, sondern direkt in der Platte behandelt. Nach indizierten Infektionszeiten wurden die infizierten Zellen mit PBS gewaschen und dann 30 min mit 3% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Vor der Färbung mit Antikörpern wurden die Zellen mit saponinhaltigem Wasch-Puffer 10 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Danach wurde 15 min bei Raumtemperatur mit Block-Puffer inkubiert. Die Zellen auf den Deckgläschen wurden zunächst mit dem spezifischen 1. Antikörper in angegebenen Verdünnungen in Block-Puffer für 30 min in einer feuchten abgedunkelten Kammer inkubiert. Der überschüssige Antikörper wurde durch anschließendes Waschen mit Block-Puffer entfernt. Es erfolgte die Inkubation mit dem 2. fluoreszenzmarkierten Antikörper für 30 min. Auch der 2. Antikörper im Überschuss wurde weggewaschen. Das Präparat wurde an der Luft ca. 3 min angetrocknet und mit ProLong Gold Antifade Reagent oder DABCO auf einem

Objektträger eingebettet. Bei der Einbettung in DABCO wurde das Deckgläschen am Rand luftdicht mit Nagellack verschlossen.

Zur Fluoreszenzmikroskopie wurde das Umkehrmikroskop Olympus IX81 verwendet, welches mit einer F-View II Trigger Kamara ausgestattet ist. Die Aufnahmen wurden mittels Cell<sup>P</sup> Software analysiert. Zur konfokalen Fluoreszenzmikroskopie wurde das Leica TC SL-Mikroskop verwendet, welches mit der Leica Confocal Software ausgestattet ist.

### **2.2.8 Elektronenmikroskopie**

Für die Elektronenmikroskopie wurden die zu untersuchenden Proben über Nacht in frisch hergestelltem Karnovsky-Puffer bei 4°C fixiert. Das Präparat wurde ausreichend mit 0,1 M Cacodylat-Puffer gewaschen und anschließend für eine Stunde in Osmiumtetroxid-Lsg. behandelt. Nach erneutem Waschen mit Cacodylat-Puffer wurde das Präparat mit einer ansteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70% Ethanol) dehydriert. Über Nacht wurde mit Uranylacetat-Lsg. kontrastiert. Es folgte Dehydrierung mit 90% Ethanol, 100% Ethanol, 1:1 Gemisch: absoluter Ethanol: Propylenoxid und reinem Propylenoxid. Das entwässerte Präparat wurde in Araldyt-Einbettungsplastik eingebettet und 1 h bei 45°C, 12 h bei 40°C und 60 h bei 60°C in einem Heißluftofen gebacken. Die ausgehärteten Proben wurden mit einem Reichert Ultracut UCT Microtom ultradünn geschnitten und die Schnitte mit Hilfe eines Katzenschnurrbarthaars auf ein Kupfergitter überführt. Dort wurden die Schnitte nochmals mit Reynolds Bleicitrat nachkontrastiert und an dem Transmissionselektronenmikroskop Zeiss EM 902 bei 80 kV Kathodenspannung mikroskopiert. Die aufgenommenen Bilder wurden mit der analySISD Software analysiert.

### 2.2.9 Isolation der *S. aureus* enthaltenden Phagosomen

Die Isolation bakterienhaltiger Phagosomen wurde nach der von Luhrmann and Haas (2000) beschriebenen Methode durchgeführt. Die vorhergehende *in vitro* Infektion von HeLa-Zellen mit *S. aureus* ist in Kap. 2.2.4 beschrieben. Allerdings wurde hier ein größerer Versuchsansatz von  $1 \times 10^8$  Zellen gewählt. Die synchronisierte Aufnahme der Bakterien wurde gewährleistet, indem die Zellen zunächst für 30 min bei 37°C mit den Bakterien inkubiert wurden. Danach wurden die nicht aufgenommenen Bakterien mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Die weitere Inkubation erfolgte in 37°C warmem antibiotikahaltigem Medium bis zu den bestimmten Infektionszeiten. Die Infektion wurde durch Zugabe von eiskaltem PBS gestoppt und die Zellen mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst. Alle weiteren Isolationsschritte erfolgten bei 4°C. Die Zellen wurden in 10 ml eiskaltem Homogenisierung-Puffer (HB)+EGTA vereinigt und gewaschen, danach in 2 ml HB-EGTA und darin enthalten 20 µl Proteaseninhibitorcocktail in einen gekühlten Gewebehomogenisator überführt. Die Zellen wurden durch fünf starke schaumfreie Stöße mit dem Pistill aufgebrochen. Dies wurde durch Lichtmikroskopie kontrolliert. Nicht lysierte Zellen, Zelldebris und Nuklei wurden bei 440 g abzentrifugiert. Um störende DNA zu verdauen, wurde der Überstand mit 2 µl Benzonase und 20 µl Proteaseinhibitorcocktail für 5 min bei 37°C im Wasserbad behandelt. Erneut wurde bei 440 g zentrifugiert und 2 ml Überstand mit 2,4 ml 65%-iger Saccharose vermischt, so dass eine 39%-ige Saccharose-Lsg. entstand. Die Bakterien enthaltenden Phagosomen wurden über drei Zentrifugationsschritte separiert, konzentriert und aufgereinigt.

Die Probe wurde auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten geladen, welcher aus 1 ml 65%, 2 ml 55%, 4,4 ml Probe (in 39% Saccharose-Lsg.), 2 ml 32,5% und 2 ml 10% Saccharose-Lsg. in einem SW42Ti-Röhrchen bestand. Es wurde 1 h bei 100000 g, 4°C mit einem SW41Ti-Rotor in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die Phagosomen migrierten zwischen die 55%- und 65%-Saccharosephasen. Die Phagosomensuspension wurde HB auf 11% Saccharose-Lsg. eingestellt. Diese Lösung wurde auf ein 15%-iges Ficoll Kissen geschichtet und bei 18000 g, 4°C für 20 min zentrifugiert. Das lockere Phagosomenpellet wurde in 11 ml HB resuspendiert und für 10 min bei 18000 g, 4°C konzentriert. Die Qualität der *S. aureus* enthaltenden Phagosomen wurde durch Elektronenmikroskopie Kap. 2.

2.8 kontrolliert. Zur Western Blot Analyse wurden die Phagosomen in 200 µl 0,1% Triton X-100 in PBS 30 min bei 4°C lysiert. Es wurde bei 14000 g, 4°C für 20 min zentrifugiert und der so erhaltene Überstand im Western Blot durch Immunodetektion (Kap. 2.2.14) analysiert.

### **2.2.10 Gewinnung eukaryotischer, zytosolischer, mitochondrienfreier und nukleifreier Zellextrakte**

Die zu untersuchenden abgelösten HeLa-Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS und einmal kurz in Puffer A gewaschen. Das Zellpellet wurde mit der Hälfte des Eigenvolumens in Puffer A resuspendiert. Die Zellen inkubierten 20 min auf Eis. Danach wurden die Zellen aufgebrochen, indem sie 15 Mal durch eine 27A-Gauche Injektionsnadel aufgezogen wurden. Es wurde durch Lichtmikroskopie kontrolliert, ob 80% bis 90% der Zellen lysiert wurden. Danach wurde bei 14000 g, 4°C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand stellte den erworbenen eukaryotischen, zytosolischen, mitochondrienfreien Zellextrakt dar und wurde durch Western Blot und Immunodetektion (Kap.2.2.14) analysiert.

### **2.2.11 Gewinnung eukaryotischer, nukleifreier Totalzellextrakte**

Die zu untersuchenden abgelösten HeLa-Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit dem Zweifachen des Eigenvolumens in eiskaltem TNE-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden durch häufiges Pipettieren aufgebrochen. Es wurde durch Lichtmikroskopie kontrolliert, ob es zu 80% bis 90% Zellyse gekommen ist. Danach wurde bei 14000 g, 4°C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand stellte den erworbenen eukaryotischen, zytosolische Zellextrakt dar und wurde durch Western Blot und Immunodetektion (Kap. 2.2.14) analysiert.

### **2.2.12 Proteingehaltsbestimmung**

Zur Proteingehaltsbestimmung wurde der DC Protein Assay von Biorad, wie vom Hersteller angewiesen, verwendet.

War die zu bestimmende Probe in TNE-Puffer gelöst, wurde der BCA Protein Assay von Pierce verwendet, da die Reagenzien mit diesem Puffer kompatibel sind. Als Eichlösung wurde BSA in gleichem Probelösungsmittel vermessen.

### **2.2.13 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Es wurde das Criterion System von Bio-Rad verwendet. Falls nicht anders angegeben, wurden 10%-ige Polyacrylamidgele eingesetzt. Gegossen wurde in eine Bio-Rad Criterion Fertiggassette 13,3 x 8,7cm. Das Trenngel besteht aus 10,0 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 und 30 min gewartet bis das Trenngel polymerisiert war. Die Oberfläche des Trenngels wurde mit Isopropanol geglättet. Darauf wurde das Sammelgel, bestehend aus 1,0 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. Das Sammelgel polymerisierte in ca. 30 min.

Die Proben wurden vorbereitet, indem 10-50 µg Protein oder entsprechend Probenvolumina gleichen Gehalts mit 50%-iger Glycerol-Lösung und der berechneten Menge fünffachem Lämmli-Proben-Puffer versetzt wurden und diese bei 95°C für 5 min denaturiert wurden. Die Proben wurden anschließend auf das Gel aufgetragen und bei 100 V konstant in einer Criterion Elektrophoresezelle in Tris/Tricine/SDS-Laufpuffer aufgetrennt.

### **2.2.14 Western Blot und Immunodetektion**

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

Nach der Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE, Kap.2.2.13, 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 die übertragenen Proteine durch spezifische Antikörper detektiert (Immunodetektion). Die freien Bindungsstellen auf der Membran wurden zunächst mit Block-Puffer über Nacht bei 4°C abgesättigt. Die Membran wurde dann mit dem 1. spezifischen Antikörper, wie in Kap. 2.1.3 angegeben, verdünnt in Block-Puffer, für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen in TBST-Puffer entfernt. Es erfolgte die Inkubation mit einem HRP konjugiertem Sekundärantikörper in den Kap. 2.1.3 angebenen Verdünnungen in Block-Puffer für 2 h bei Raumtemperatur.

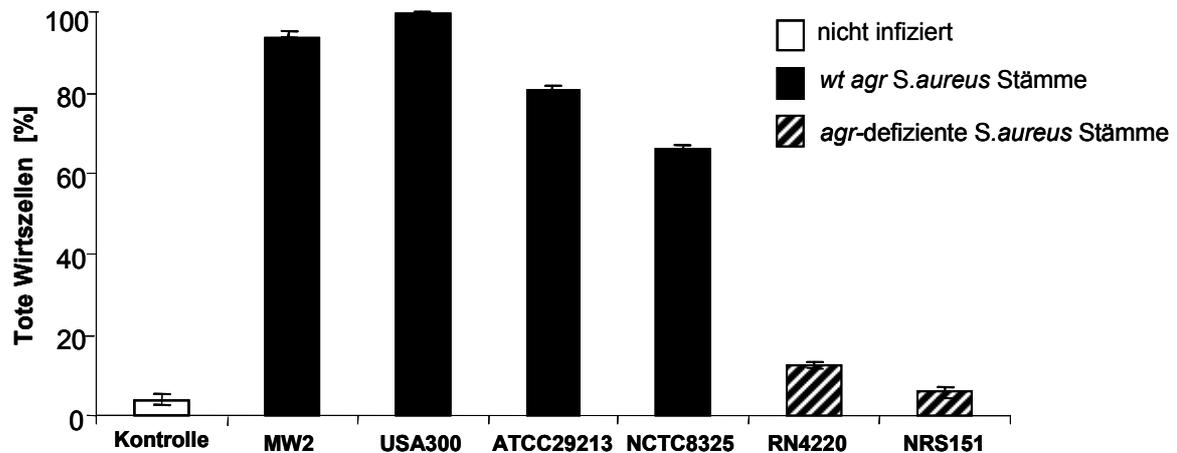
Es wurde erneut mit TBST-Puffer gewaschen. Zur Visualisierung wurden die Membranen mit ECL-Reagenz nach Gebrauchsanweisung des Herstellers versetzt und nach Belichtung eines Hyperfilm ECL in der Entwicklermaschine entwickelt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die *S. aureus* Zytotoxizität ist abhängig von *agr*

In dieser Arbeit wurden verschiedene invasive *S. aureus* Laborstämme in Abhängigkeit von *agr* auf ihre Zytotoxizität untersucht. Als Wirtszellsystem wurden HeLa-Zellen gewählt, welche für den Prototyp der nicht-professionellen Phagozyten stehen. In einer *in vitro* Infektion wurden HeLa-Zellen mit einer Infektionsrate (MOI, *multiplicity of infection*) von 200 mit vier individuellen Wildtyp (wt) *agr* *S. aureus* Stämmen (NCTC8325, ATCC29213, USA300 und MW2) und zwei *agr*-defizienten *S. aureus* Stämmen (NRS151 und RN4220) infiziert. Bei NRS151 handelt es sich um eine isogene *agr*-Deletionsmutante von NCTC8325, während RN4220, auch isogen zu NCTC8325, nur partiell defizient in *agr* ist. Nach 24 Stunden wurde der Anteil toter Wirtszellen nach Trypanblaufärbung lichtmikroskopisch bestimmt. Die *agr*-positiven *S. aureus* Wildtypstämme NCTC8325, ATCC29213, MW2 und USA300 verhielten sich zytotoxisch (65%, 82%, 95% und 98% tote Wirtszellen). Im Gegenteil zu den *agr*-defizienten *S. aureus* Stämmen NRS151 und RN4220, welche die Wirtszellvitalität nicht signifikant reduzieren konnten (Abb. 7).

Alle *S. aureus* Stämme wurden von den HeLa-Zellen mit vergleichbarer Kinetik und Quantität aufgenommen. Die *S. aureus* Zytotoxizität ist demnach an *agr* gebunden.



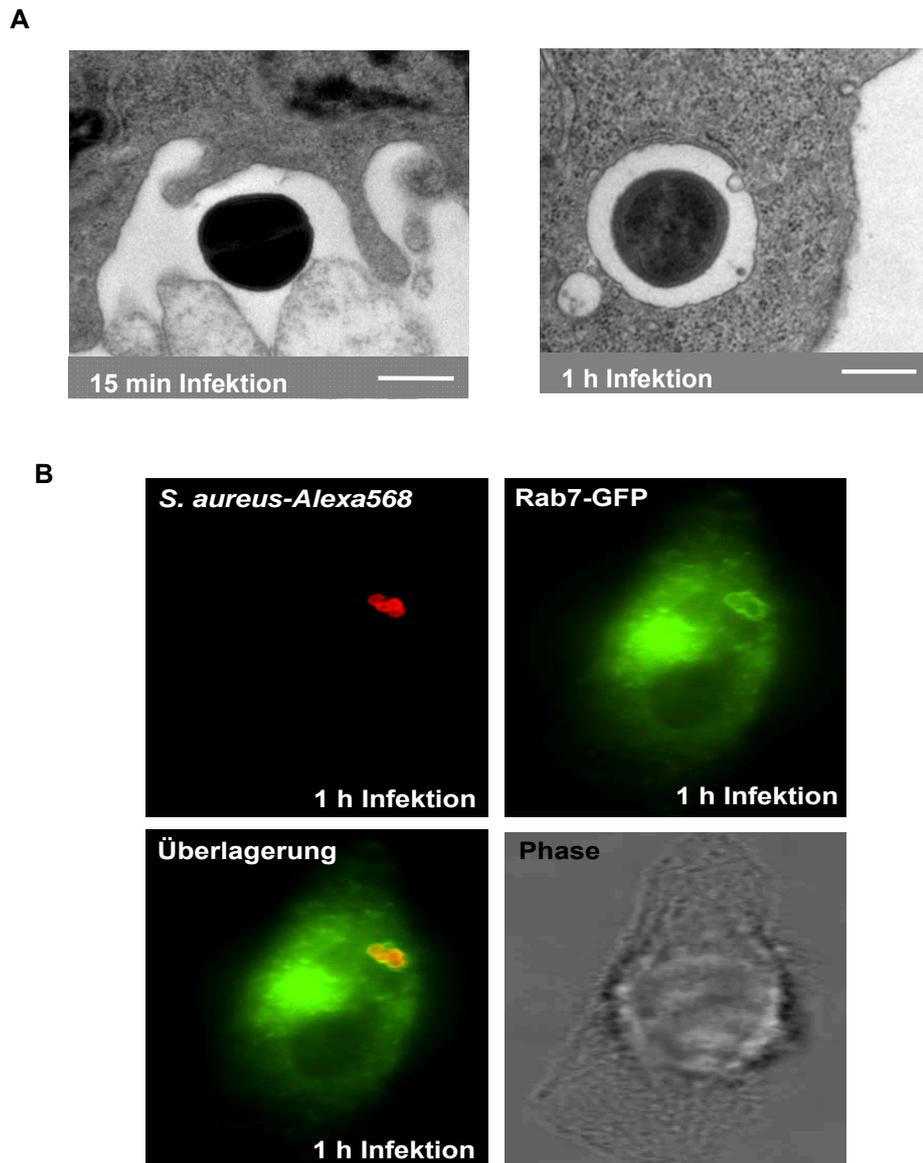
**Abb.7 Die *S. aureus*-Zytotoxizität ist abhängig von *agr*.**

Zytotoxizität von wt *agr* und *agr*-defizienten *S. aureus* Stämmen. HeLa-Zellen wurden mit wt *agr* *S. aureus* Stämmen (MW2, USA300, ATCC29213 und NCTC8325; schwarze Balken) oder *agr*-defizienten *S. aureus* Stämmen (RN4220 und NRS151; gestreifte Balken) mit MOI200 infiziert. Nach 24 h wurde die Wirtszellvitalität mittels Trypanblauauszählung bestimmt.

### 3.2 *S. aureus* kolokalisiert mit Autophagosomen

Es wurden über den gesamten Verlauf einer Infektion von HeLa-Zellen mit dem *S. aureus* Stamm MW2 transmissionselektronische Aufnahmen gemacht, um mehr Erkenntnisse über das intrazelluläre Verhalten der Bakterien und der Wirtszelle zu erfahren, wie z. B. Veränderungen im frühendosomal Stadium.

Wie in Abb. 8A gezeigt, wurden die Staphylokokken über eine becherförmige Ausstülpung (*cup formation*) innerhalb von 20-30 min in die Zelle aufgenommen. Die Bakterien befanden sich eine Stunde nach Infektion in einem Rab7-positiven Phagoendosom (Abb. 8A/B). *S. aureus* wird von der Wirtszelle zunächst in den phagoendosomal Abbauweg aufgenommen.



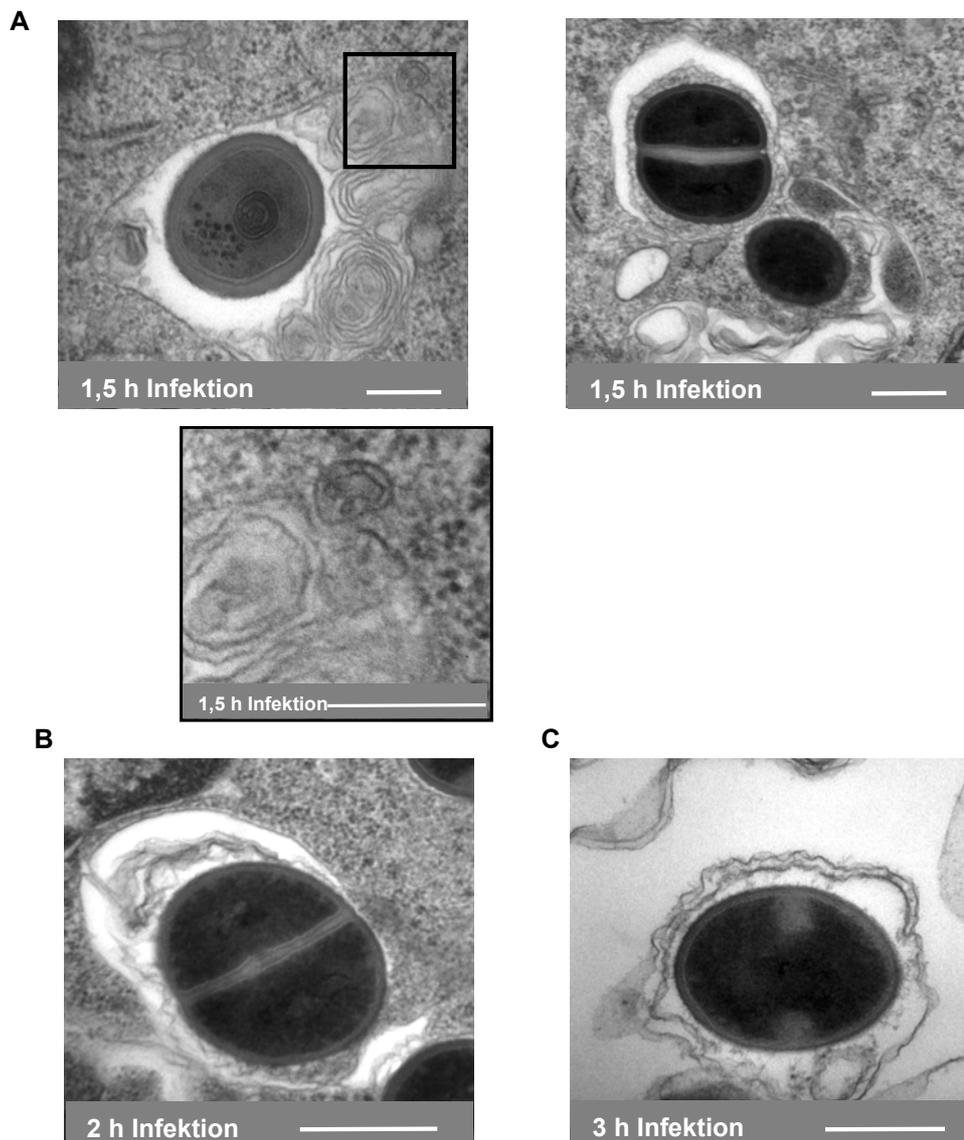
**Abb. 8 *S. aureus* wird in der Zelle in den phagoendosomal Weg aufgenommen.**

A) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen infiziert mit *S. aureus* MW2 für 15 min und 1 h. Maßstab: 0,5  $\mu\text{m}$ .

B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen, welche transient mit einem Rab7-GFP für 24 h transfiziert und dann mit *S. aureus* MW2 infiziert wurden. Die Zellen wurden 1 h nach Infektion fixiert und die Bakterien mit Anti-Protein A Antikörper, gefolgt von Alexa-568 markierten Sekundärantikörper gefärbt.

Nach 90 Minuten Infektion lagerten sich multilamellare Strukturen an die *S. aureus* enthaltenden Kompartimente an. Die multilamellaren Membranen fusionierten mit den phagoendosomal Membranen. Das ursprüngliche Vesikel wurde zerstört und zytoplasmatische Bestandteile flossen in das ehemalige Kompartiment ein (Abb.9A).

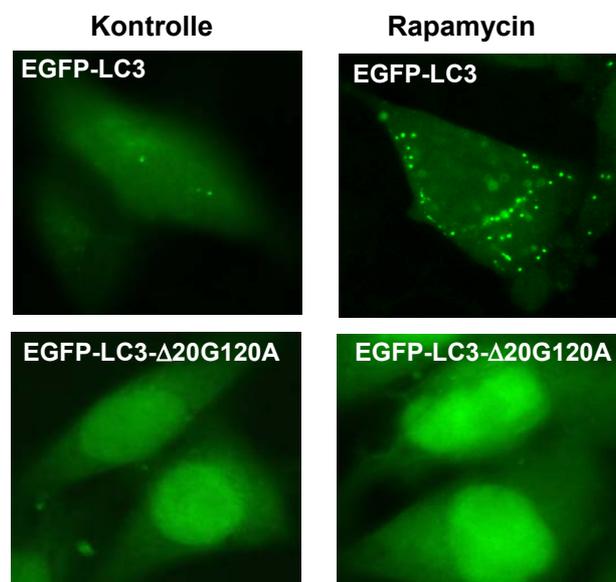
Die multilamellaren Membranen legten sich um die Staphylokokken, wickelten sie ein, isolierten sie vom Zytoplasma und bildeten neue Vesikel um die Bakterien in der Zelle (Abb. 9B). Diese Vesikel sind durch eine Doppelmembran charakterisiert, was das morphologische Kennzeichen von Autophagosomen ist (Abb.9C). Drei Stunden nach Infektion befanden sich die meisten *S. aureus* in doppelmembranständigen Autophagosomen. Dieser Prozess konnte mit zwei weiteren wt *agr* *S. aureus* Stämmen (ATCC29213 und NCTC8325) gleichermaßen beobachtet werden.



**Abb.9 *S. aureus* gelangt in Autophagosomen.**

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen infiziert mit *S. aureus* (MW2). Die Zellen wurden zu indizierten Zeitpunkten mit Karnovsky-Puffer fixiert und nach standardelektronenmikroskopischen Methoden weiterverarbeitet.

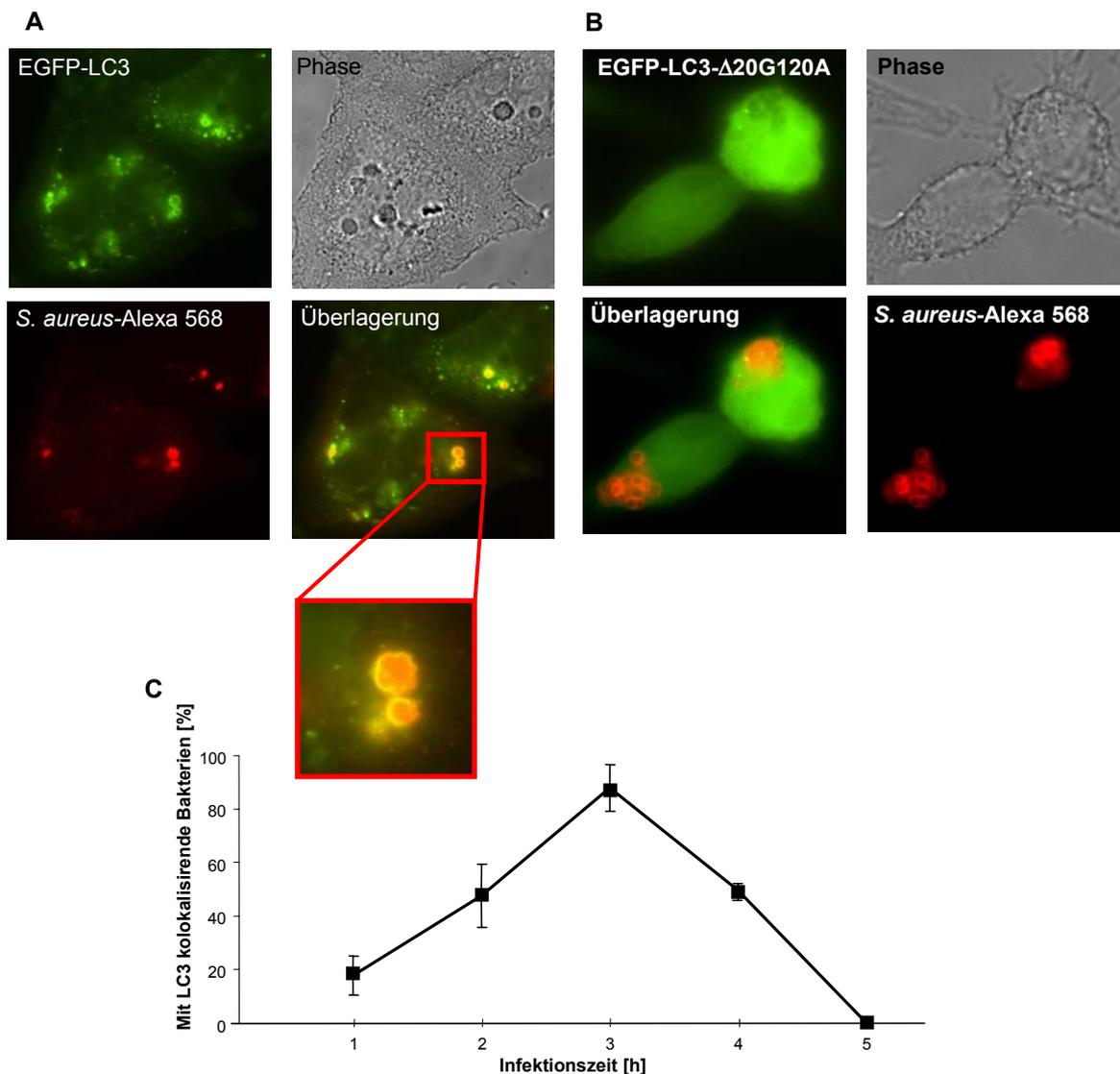
Um den morphologischen Befund einer Interaktion des Autophagieweges mit *S. aureus* zu bestätigen, sollte das Vorkommen von LC3/Atg8 (*microtubule-associated protein light chain 3*) auf der Autophagosomenmembran untersucht werden. LC3 wird bei der Bildung der Autophagosomen rekrutiert und befindet sich während der Autophagosomenreifung auf der inneren und äußeren Membran (Kabeya et al., 2000; Yorimitsu and Klionsky, 2005). LC3 ist der meist anerkannte Marker bei der Identifikation von Autophagosomen. Es wurde EGFP an LC3 fusioniert und eine stabil exprimierende EGFP-LC3-HeLa-Zelllinie generiert. Zusätzlich zu der stabil EGFP-LC3 exprimierenden HeLa-Zelllinie wurde die EGFP- $\Delta$ 20G120A-Mutante von LC3 konstruiert, bei der die 5 C-terminalen Aminosäuren deletiert wurden und an Position 120 Glycin gegen Alanin substituiert wurde. Diese Mutante kann kein Phosphatidylethanolamin binden, was zur Assoziation an die autophagosomale Membran notwendig ist (Kabeya et al., 2000). Die erfolgreiche Generierung der Zelllinien wurde aus den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 10) ersichtlich. EGFP-LC3 lag diffus im Zytoplasma der unbehandelten Zellen vor, während sich bei Induktion von Autophagie durch Rapamycin das typisch punktierte Verteilungsmuster von LC3 ergab. EGFP-LC3 $\Delta$ 20G120A wurde entsprechend nicht zu den Autophagosomen rekrutiert.



**Abb. 10 Erfolgreiche Generierung der stabil EGFP-LC3 exprimierenden HeLa-Zelllinie.**

Es wurde Autophagie in EGFP-LC3 und EGFP-LC3- $\Delta$ 120G120A exprimierenden HeLa-Zellen mit Rapamycin (80  $\mu$ g/ml) induziert. Nach 2 h wurde die Bildung der EGFP-positiven Autophagosomen untersucht.

Bei der Infektion dieser Zellen mit wt *agr* *S. aureus* (MW2, NCTC8325, USA300 und ATCC29213) zeigte sich, dass sich nach 150 min die Mehrheit der *S. aureus* in LC3-positiven Kompartimenten befand (Abb. 11A). Es wurde keine Kolokalisation von *S. aureus* und der EGFP-LC3 $\Delta$ 20G120A HeLa-Mutante beobachtet (Abb.11B). Nach drei Stunden Infektion waren über 90% der *S. aureus* enthaltenden Kompartimente LC3-positiv (Abb.11C).



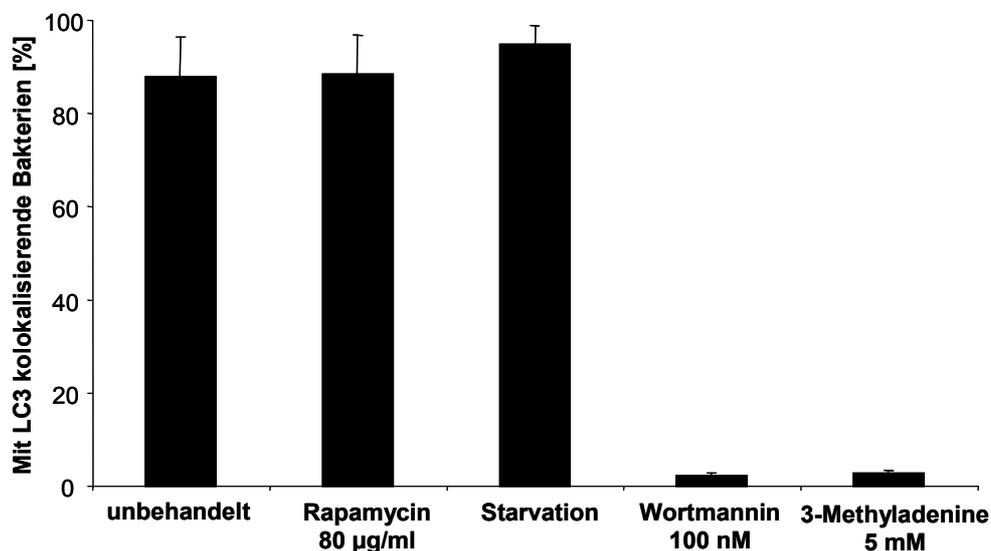
**Abb. 11 *S. aureus* Kompartimente kolokalisieren mit dem Autophagosomenmarker LC3.**

A und B) HeLa-Zellen, welche stabil EGFP-LC3 oder EGFP-LC3- $\Delta$ 20G120A exprimieren, wurden mit dem wt *agr* *S. aureus* Stamm MW2 infiziert. Die Zellen wurden nach 3 h fixiert und die Bakterien anschließend mit Anti-Protein A Antikörper, gefolgt von einem Alexa 568-markierten Sekundärantikörper gefärbt.

C) Kinetik von EGFP-LC3 exprimierenden HeLa-Zellen, infiziert mit wt *agr* *S. aureus* Stamm MW2 mit MOI20. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden quantitativ nach *S. aureus* / EGFP-LC3-Kolokalisation analysiert. Es wurden pro Experiment 100 Zellen mikroskopisch ausgewertet. Diese Daten repräsentieren die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

Die im Elektronenmikroskop entdeckten, doppelmembranständigen Kompartimente um *S. aureus* sind demnach auch LC3-positiv, wodurch die Annahme bestätigt wird, dass *S. aureus* von Kompartimenten des phagoendosomaligen Weges, in solche des autophagosomalen Weges übergeht.

Durch Behandlung der Zellen während der Infektion mit den Autophagie-Inhibitoren 3-Methyladenin oder Wortmannin wurde die Kolokalisation von *S. aureus* mit LC3 aufgehoben (Abb. 12). Die Inhibitoren verhindern die Initiierung des Autophagieprozesses (Kirkegaard et al., 2004). *S. aureus* befindet sich also in Kompartimenten, die ihren Ursprung im Autophagieweg besitzen.



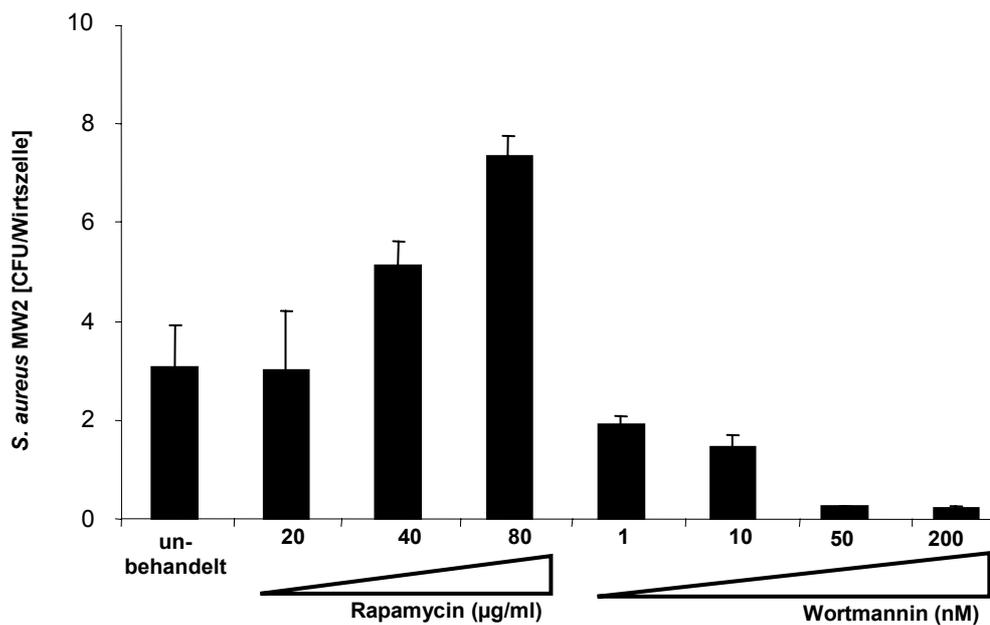
**Abb, 12 Inhibierung von Autophagie verhindert den Übergang von *S. aureus* in Autophagosomen.**

HeLa-Zellen wurden insgesamt für 3 h mit wt *agr S. aureus* MW2 (MOI20) infiziert. Autophagie wurde während der Infektion durch Behandlung mit Rapamycin (80 µg/ml) oder durch Inkubation in Starvation Medium für 2 h herbeigeführt. Durch die Zugabe von Wortmannin (100nM) oder 3-Methyladenin (5mM) während der gesamten Infektionszeit wurde Autophagie inhibiert. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden quantitativ nach *S. aureus* / EGFP-LC3-Kolokalisation analysiert. Es wurden Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten errechnet. Je Experiment wurden 100 Zellen analysiert.

### 3.3 Induktion von Autophagie steigert die Replikationsrate von *S. aureus*

Welche Konsequenzen hat die Induktion von Autophagie für *S. aureus* und wie wirkt sie sich im speziellen auf dessen intrazelluläre Replikation aus? Um dies zu beantworten, wurde während der Infektion als pharmakologischer Autophagie-Induktor oder -Inhibitor entsprechend Rapamycin oder Wortmannin eingesetzt. HeLa-Zellen wurden mit dem *S. aureus* Stamm MW2 infiziert. Eine Stunde später wurde Rapamycin in steigenden Konzentrationen für zwei Stunden hinzugegeben. Längere Inkubationszeiten mit Rapamycin waren toxisch für die Wirtszellen. Wortmannin wurde in steigenden Konzentrationen über die gesamte Infektionszeit eingesetzt. Die Anzahl der Bakterien pro Zelle wurde nach sechs Stunden Infektion bestimmt. Wie in Abbildung 13 gezeigt, erhöhte Rapamycin die Replikation von *S. aureus* dosisabhängig. Bei einer Rapamycin-Konzentration von 80 µg/ml verdoppelte sich die Anzahl der *S. aureus* in der Zelle. Im Gegensatz dazu unterdrückte Wortmannin das Wachstum von *S. aureus* in der Zelle fast gänzlich. Rapamycin, wie auch Wortmannin, haben allein keinen Einfluss auf das Wachstum von *S. aureus*. Dies deutet darauf hin, dass die Autophagosomen eine Replikationsnische für *S. aureus* in der Zelle bieten.

Der Autophagie-Inhibitor Wortmannin hemmt PI3-Kinasen unspezifisch. Um die Frage für Notwendigkeit von Autophagosomen für die intrazelluläre *S. aureus* Replikation spezifisch zu beantworten, wurden aus Knockout-Mausembryonen stammende *atg5*<sup>-/-</sup> Fibroblasten (*atg5*<sup>-/-</sup> MEF) mit *S. aureus* infiziert. Die Replikation von *S. aureus* in diesen Zellen war stark beeinträchtigt (Abb.14). *S. aureus* vermehrte sich nicht in *atg5*-defizienten MEFs. Im Gegensatz dazu vermehrte sich *S. aureus* in der Kontrolle, der wt MEFs, vergleichbar zu HeLa-Zellen. Da Atg5 essentiell für den Ablauf von Autophagie ist (Kuma et al., 2004), beweist dies, dass *S. aureus* für dessen intrazelluläre Replikation auf Proteine aus dem autophagosomalen Prozess angewiesen ist. Gleiche Ergebnisse wurden bei Infektionen mit den anderen oben genannten wt *agr S. aureus* Stämmen erzielt. *S. aureus* nutzt das Autophagosom zur intrazellulären Vermehrung.

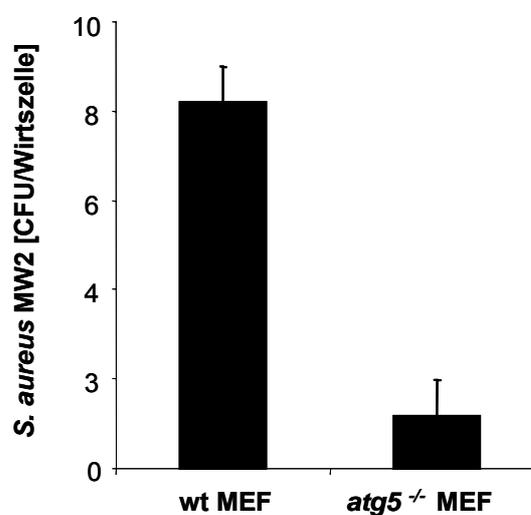


**Abb. 13 Autophagieformation steigert die intrazelluläre *S. aureus* Replikation.**

HeLa-Zellen wurden mit wt *agr S. aureus* Stamm MW2 mit MOI200 infiziert. Nach 1 h Infektion wurden extrazelluläre *S. aureus* durch Behandlung mit Lysostaphin eliminiert. Die weitere Inkubation erfolgte in antibiotikahaltigem Medium. Autophagie wurde durch Rapamycin für 2 h induziert, während der Autophagie-Inhibitor Wortmannin über den gesamten Zeitraum der Infektion gegenwärtig war. Nach 6 h Infektion wurden die Zellen lysiert und auf Mueller-Hinton-Platten ausplattiert. Die Bakterienmenge wurde mittels CFU-Analyse bestimmt.

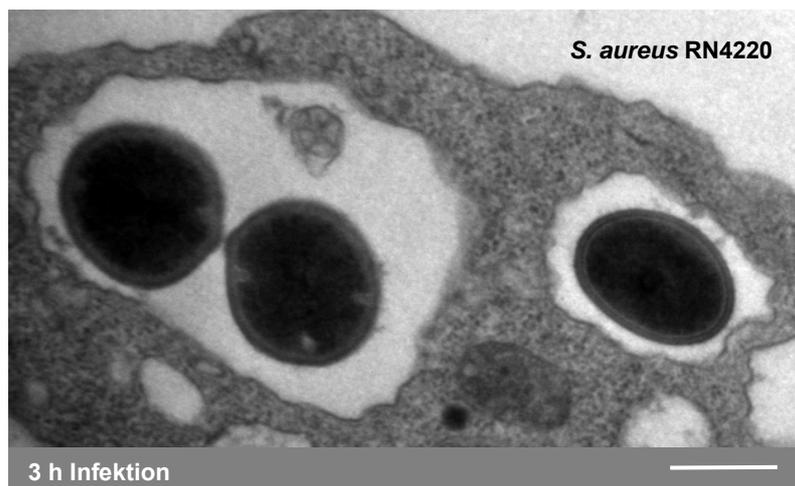
**Abb. 14 In *atg5*<sup>-/-</sup> MEFs ist die *S. aureus* Replikation unterdrückt.**

Wt MEFs oder *atg5*<sup>-/-</sup> MEFs wurden mit *S. aureus* Stamm MW2 mit MOI100 infiziert. Nach 1 h Infektion wurden extrazelluläre *S. aureus* durch Behandlung mit Lysostaphin eliminiert. Die weitere Inkubation erfolgte in antibiotikahaltigem Medium. Nach 6 h Infektion wurden die Zellen lysiert und auf Mueller-Hinton-Platten ausplattiert. Die Bakterienmenge wurde mittels CFU-Analyse bestimmt.



### 3.4 Rapamycin-induzierte Autophagie stellt die Replikationsfähigkeit von *agr*-defizienten *S. aureus* her

Wie in Abbildung 1 gezeigt wurde, waren die *agr*-defizienten *S. aureus* Stämme NRS151 und RN4220 nicht zytotoxisch. Dies bedeutet, dass sie die Vitalität der HeLa-Zellen nach 24 Stunden Infektion nicht signifikant reduzieren konnten. Weiter ist bekannt, dass diese Stämme innerhalb von drei Tagen vollständig von der Wirtszelle eliminiert werden (Krut et al., 2003). Es stellte sich die Frage, ob sich *agr*-defiziente *S. aureus* in ihrer intrazellulären Lokalisation unterschiedlich zu den zytotoxischen *S. aureus* verhalten und ob auch hier der Autophagieweg der Wirtszelle eine Rolle spielt?

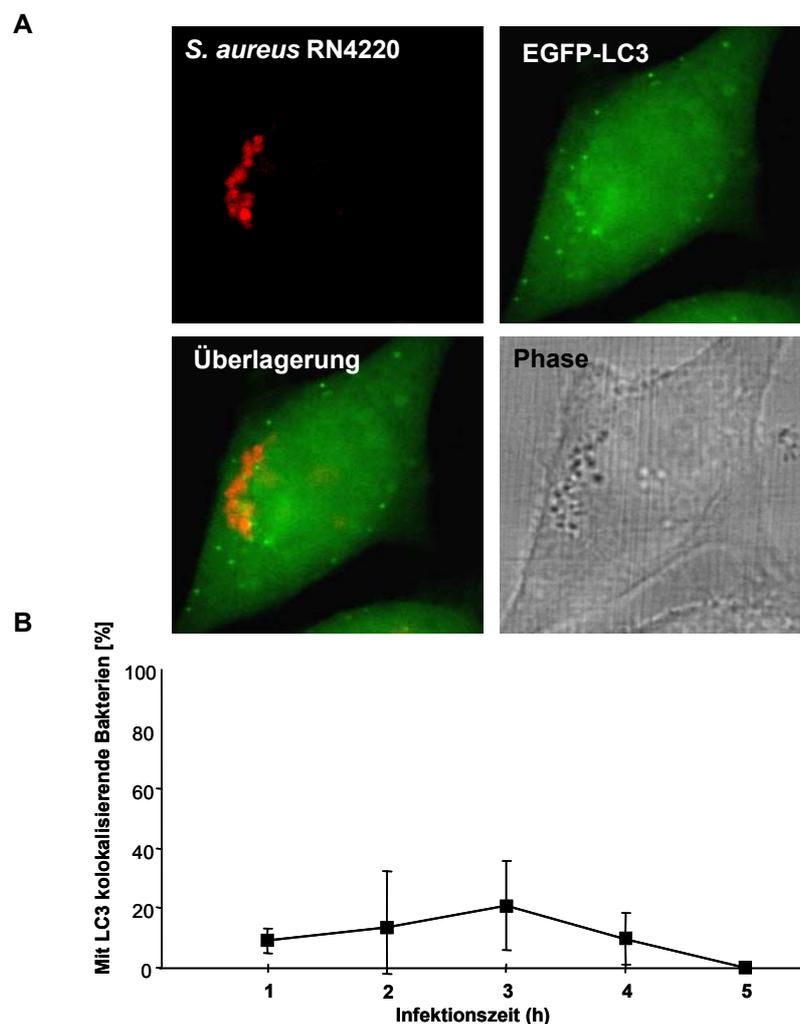


**Abb. 15** *Agr*-defiziente *S. aureus* befinden sich nicht in doppelmembranständigen Kompartimenten.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen infiziert mit dem *agr*-defizienten *S. aureus* Stamm RN4220 (MOI200). Nach 3 h wurden die Zellen mit Karnovsky-Puffer fixiert und nach standardelektronenmikroskopischen Methoden weiterverarbeitet. Maßstab: 0,5  $\mu$ m.

Die elektronenmikroskopische Aufnahme (Abb.15) veranschaulicht, dass der *agr*-defiziente *S. aureus* Stamm RN4220 drei Stunden nach Infektion nicht von multilamellaren Strukturen umwandert wurde und sich auch nicht in doppelmembranständigen Kompartimenten befand, sondern in cargofreien einfachmembranständigen Vesikeln. Diese Kompartimente akkumulierten auch nur sehr gering den autophagosomalen Marker LC3, wie die fluoreszenzmikroskopische

Aufnahme veranschaulicht (Abb. 16A). Die Kinetik über fünf Stunden zeigt eine maximale Kolokalisation von 20% des *agr*-defizientem *S. aureus* RN4220 und EGFP-LC3 nach drei Stunden Infektion (Abb. 16B). Die Resultate zeigen, dass *agr*-defiziente *S. aureus* nicht in Kompartimente des Autophagieweges gelangen. Die Wirtszelle reagiert nicht mit der Aktivierung des Autophagieweges auf eine Infektion mit *agr*-defizienten *S. aureus*. Daher müssen *S. aureus* *agr*-abhängige Faktoren für die Induktion von Autophagie in der Wirtszelle verantwortlich sein.

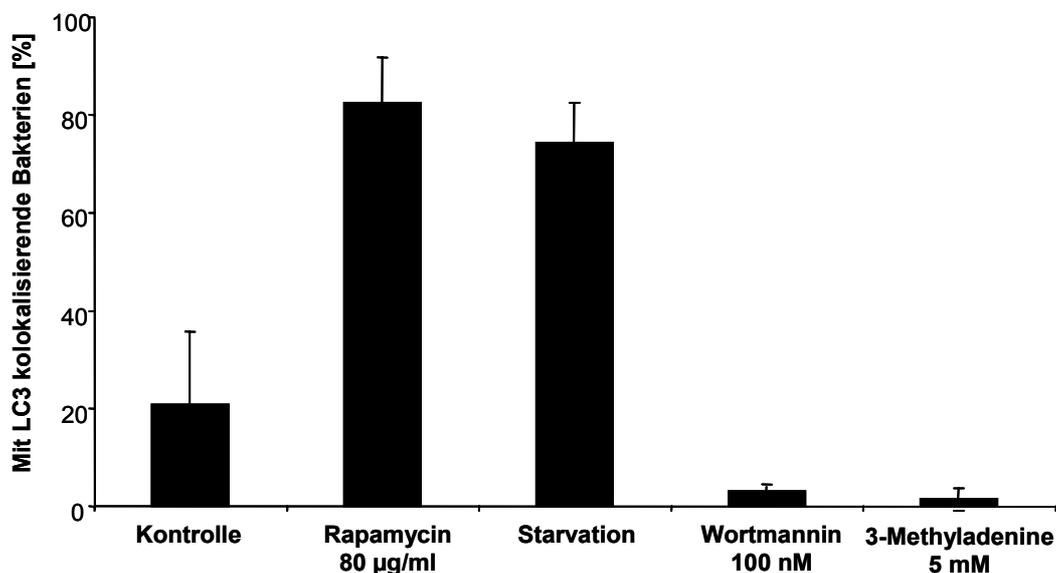


**Abb. 16** Nur 20% der *agr*-defizienten *S. aureus* kolokalisieren mit dem Autophagosomenmarker LC3.

A) Stabil EGFP-LC3 exprimierende HeLa-Zellen wurden mit dem *agr*-defizienten *S. aureus* Stamm RN4220 infiziert. Die Zellen wurden nach 3 h fixiert und die Bakterien anschließend mit Anti-Protein A Antikörper, gefolgt von einem Alexa 568-markierten Sekundärantikörper gefärbt.

C) Kinetik von EGFP-LC3 exprimierenden HeLa-Zellen, infiziert mit *agr*-defizientem *S. aureus* Stamm RN4220 mit MOI20. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden quantitativ nach *S. aureus* / EGFP-LC3-Kolokalisation analysiert. Es wurden je Experiment 100 Zellen mikroskopisch ausgewertet. Diese Daten repräsentieren die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

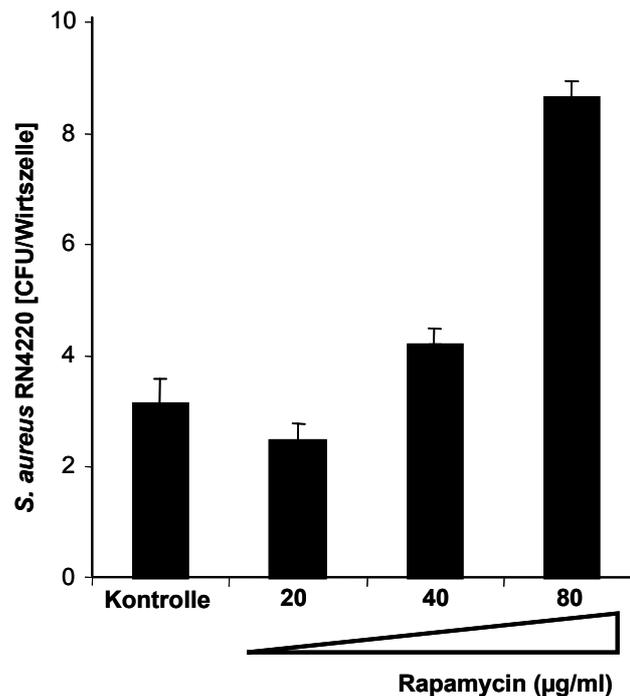
Als nächstes wurde untersucht, welche Auswirkungen die Induktion von Autophagie auf die intrazelluläre bakterielle Lokalisation und Replikation der *agr*-defizienten *S. aureus* Stämme hat. Wurde in der Zelle Autophagie pharmakologisch durch Rapamycin oder physiologisch durch Kultivierung der Zellen in aminosäuerarmen Medium (*Starvation*) induziert, war auch RN4220 in der Lage in LC3-positive Autophagosomen zu gelangen. In Rapamycin behandelten Zellen kolokalisierte RN4220 in über 80% mit LC3 drei Stunden nach Infektion (Abb. 17).



**Abb. 17** Pharmakologische Induktion von Autophagie ermöglicht *agr*-defizienten *S. aureus* in Autophagosomen zu gelangen.

Kolokalisation von *agr*-defizienten *S. aureus* mit EGFP-LC3 während Autophagie-Induktion und -Inhibition. HeLa-Zellen wurden mit dem *agr*-defizienten *S. aureus* Stamm RN4220 (MOI20) infiziert. Die Zellen wurden nach 3 h fixiert und die Bakterien anschließend mit Anti-Protein A Antikörper, gefolgt von einem Alexa 568-markierten Sekundärantikörper gefärbt. Autophagie wurde während der Infektion durch Behandlung mit Rapamycin (80 µg/ml) oder durch Inkubation in Starvation Medium für 2 h herbeigeführt. Autophagie wurde inhibiert durch die Zugabe von Wortmannin (100nM) oder 3-Methyladenin (5mM) während der gesamten Infektionszeit. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden quantitativ nach *S. aureus* / EGFP-LC3-Kolokalisation analysiert. Es wurden Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten errechnet. Je Experiment wurden 100 Zellen analysiert.

Durch die Rapamycin vermittelte Autophagie waren die *agr*-defizienten *S. aureus* Stämme in der Lage das Autophagosom, so wie die wt *agr* *S. aureus* Stämme, zur Replikation zu nutzen. Abbildung 18 zeigt, dass sich die Anzahl von RN4220 pro Zelle in Abhängigkeit von der Rapamycin-Konzentration erhöhte. Diese Ergebnisse wurden auch für die *agr*-Nullmutante NRS151 erzielt.



**Abb. 18** Rapamycin-induzierte Autophagie ermöglicht *agr*-defizienten *S. aureus* intrazellulär zu replizieren.

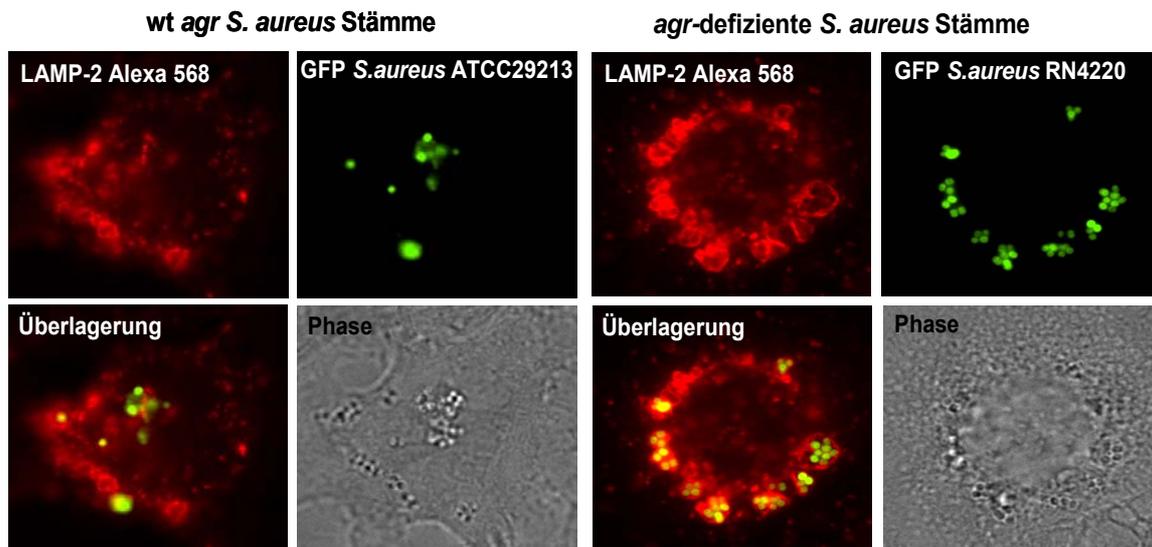
Autophagie erlaubt *agr*-defizienten *S. aureus* intrazellulär zu überleben. HeLa-Zellen wurden mit dem *agr*-defizienten *S. aureus* Stamm RN4220 infiziert. Nach 6 h Infektion wurden die Zellen lysiert und auf Mueller-Hinton-Platten ausplattiert. Die Bakterienmenge wurde mittels CFU-Analyse bestimmt.

### 3.5 Autophagie-induzierende *S. aureus* verhindern die phago-lysosomale Fusion

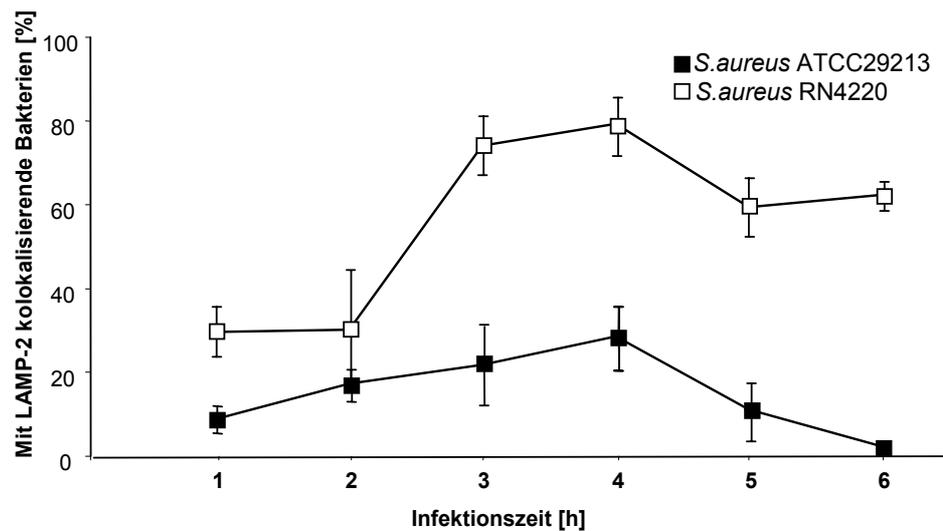
Autophagie ist ein kataboler Abbauprozess, bei dem die eukaryotische Zelle Organellen und auch intrazelluläre Bakterien in Autophagosomen isoliert. Im Reifungsprozess fusionieren die Autophagosomen dann mit Lysosomen, in denen der Inhalt schließlich verdaut wird. In diesem Zusammenhang wurde überprüft, ob auch die *S. aureus* enthaltenden Autophagosomen mit Lysosomen fusionieren. Lysosomen können durch charakteristische Bestandteile, wie LAMP-2 (*lysosome-associated membrane protein-2*), identifiziert werden. Anhand von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde eine mögliche Kolokalisation von wt *agr* *S. aureus* Stämmen und *agr*-defizienten *S. aureus* Stämmen mit LAMP-2 während der Infektion von HeLa-Zellen analysiert.

Wie Abb. 19A zeigt, kolokalisierte nur ein geringer Anteil (ca. 25%) der wt *agr* *S. aureus* ATCC29213 enthaltenden Kompartimenten mit LAMP-2. Im Gegensatz dazu akkumulierten die *agr*-defizienten *S. aureus* Stamm RN4220 enthaltenden Kompartimente LAMP-2. Maximale Kolokalisation ergab sich drei bis vier Stunden nach Infektion mit dem *agr*-defizienten *S. aureus* Stamm RN4220 (Abb. 19B). Diese Ergebnisse konnten im Western Blot bestätigt werden (Abb. 20). Nach Infektion von HeLa-Zellen mit ATCC29213 besaßen die Bakterien enthaltenden, isolierten Phagosomen nur geringe Mengen LAMP-2, während RN4220 enthaltende Phagosomen ein starkes LAMP-2 Signal im Westernblot erzeugten.

A



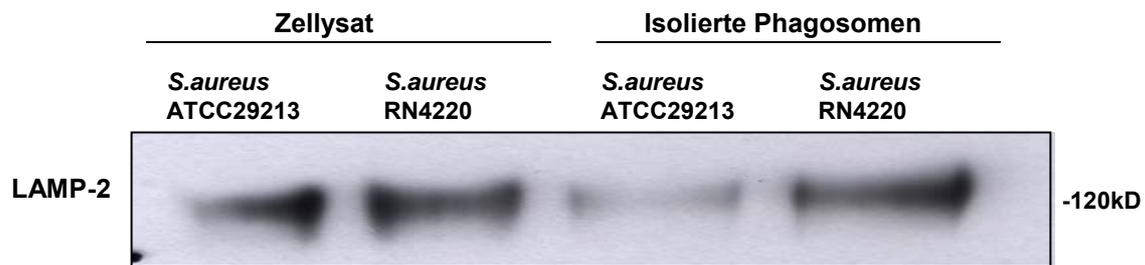
B



**Abb. 19 Autophagie-induzierende *S. aureus* verhindern die phago-lysosomale Fusion.**

A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von wt *agr* und *agr*-defizienten *S. aureus* mit dem lysosomalen Marker LAMP-2. HeLa-Zellen wurden mit GFP exprimierenden *S. aureus* infiziert. Die Zellen wurden nach 4 h fixiert und die Lysosomen anschließend mit Anti-LAMP-2 Antikörper, gefolgt von einem Alexa 568-markierten Sekundärantikörper gefärbt.

B) Kinetik der Kolokalisation von wt *agr* (ATCC29213) und *agr*-defizienten (RN4220) *S. aureus* mit LAMP-2. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden quantitativ nach *S. aureus* / LAMP-2 Kolokalisation analysiert.



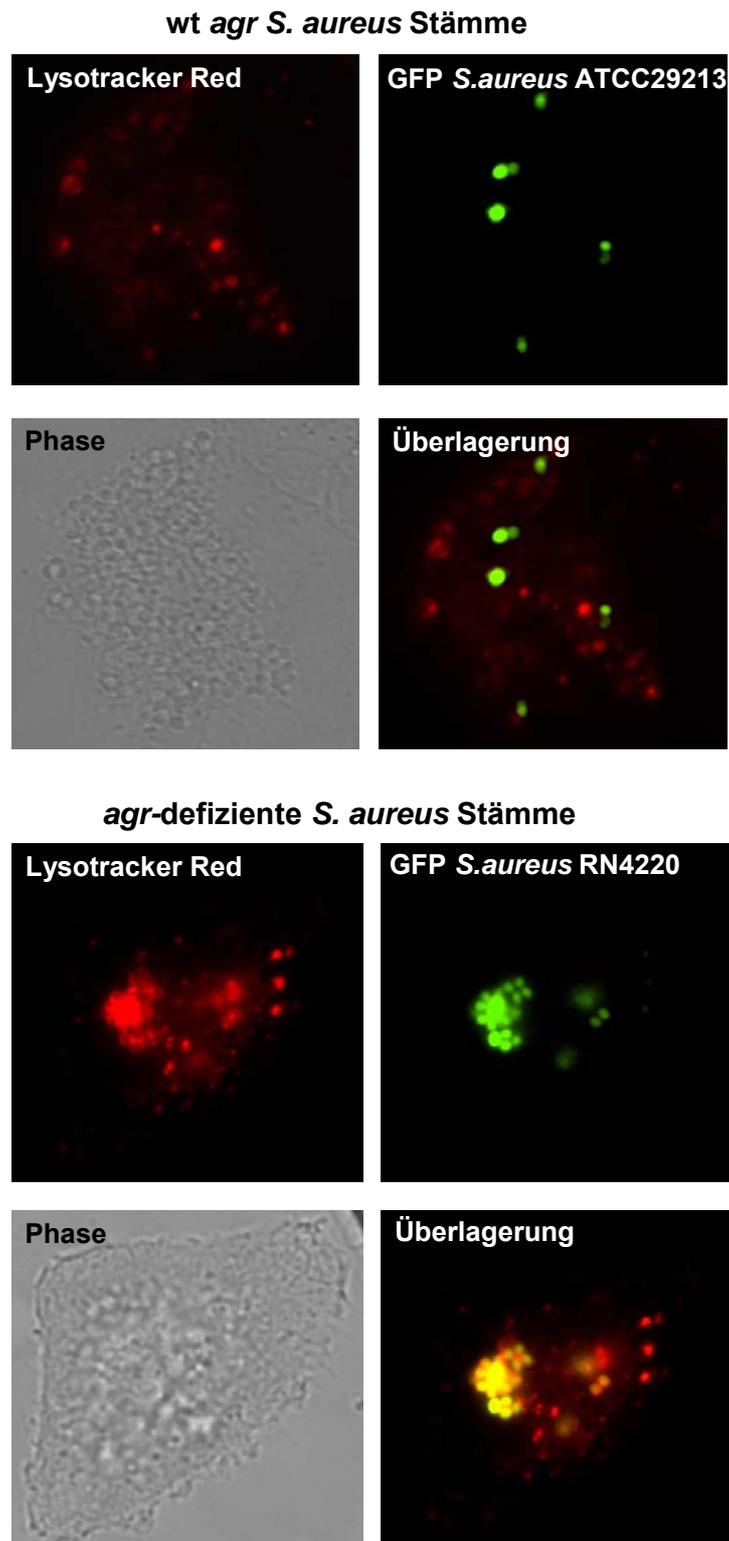
**Abb. 20** Autophagie-induzierende *S. aureus* verhindern die phago-lysosmale Fusion (Western Blot).

Phagosomen, welche wt *agr* (ATCC29213) oder *agr*-defiziente (RN4220) *S. aureus* enthalten, wurden 4 h nach Infektion wie in Material und Methoden beschrieben, isoliert. Ganze Zellysate dienten als Kontrolle.

Die Zellysate wurden durch SDS-PAGE getrennt und mittels Western Blot/Immunodetektion wurde LAMP-2 detektiert. Die Proteinkonzentration wurde durch den BCA-Assay bestimmt. Es wurden gleiche Mengen an Protein aufgetragen.

Lysosomen sind durch ihren geringen pH-Wert gekennzeichnet. Entsprechend lassen sie sich mit *LysotrackerRed* anfärben. Die LAMP-2-positiven RN4220 enthaltenden Kompartimente kolokalisierten vier Stunden nach Infektion mit dem *LysotrackerRed*-Farbstoff im Fluoreszenzmikroskop. Dahingegen akkumulierte der wt *agr* *S. aureus* Stamm ATCC29213 den Farbstoff nicht, was auf eine verminderte Azidifizierung der Kompartimente schließen lässt (Abb.21).

Die *agr*-defizienten *S. aureus* Stämme befinden sich demnach im phagoendosomal Abbauweg. Deren Kompartimente reifen und fusionieren mit Lysosomen, was schließlich zum Abbau der *agr*-defizienten *S. aureus* in den Lysosomen führt. Die wt *agr* *S. aureus* Stämme enthaltenden Kompartimente fusionieren nicht mit LAMP-2-positiven Lysosomen und zeigen auch sonst keine Reifungsmerkmale, wie hier die Ansäuerung. Somit kodiert *S. aureus* *agr*-abhängige Faktoren, welche nicht nur für die oben beschriebene Induktion der Autophagosomenformation verantwortlich ist, sondern verzögert und blockiert auch das eigentlich folgende autophago-lysosomale Fusionsereignis.



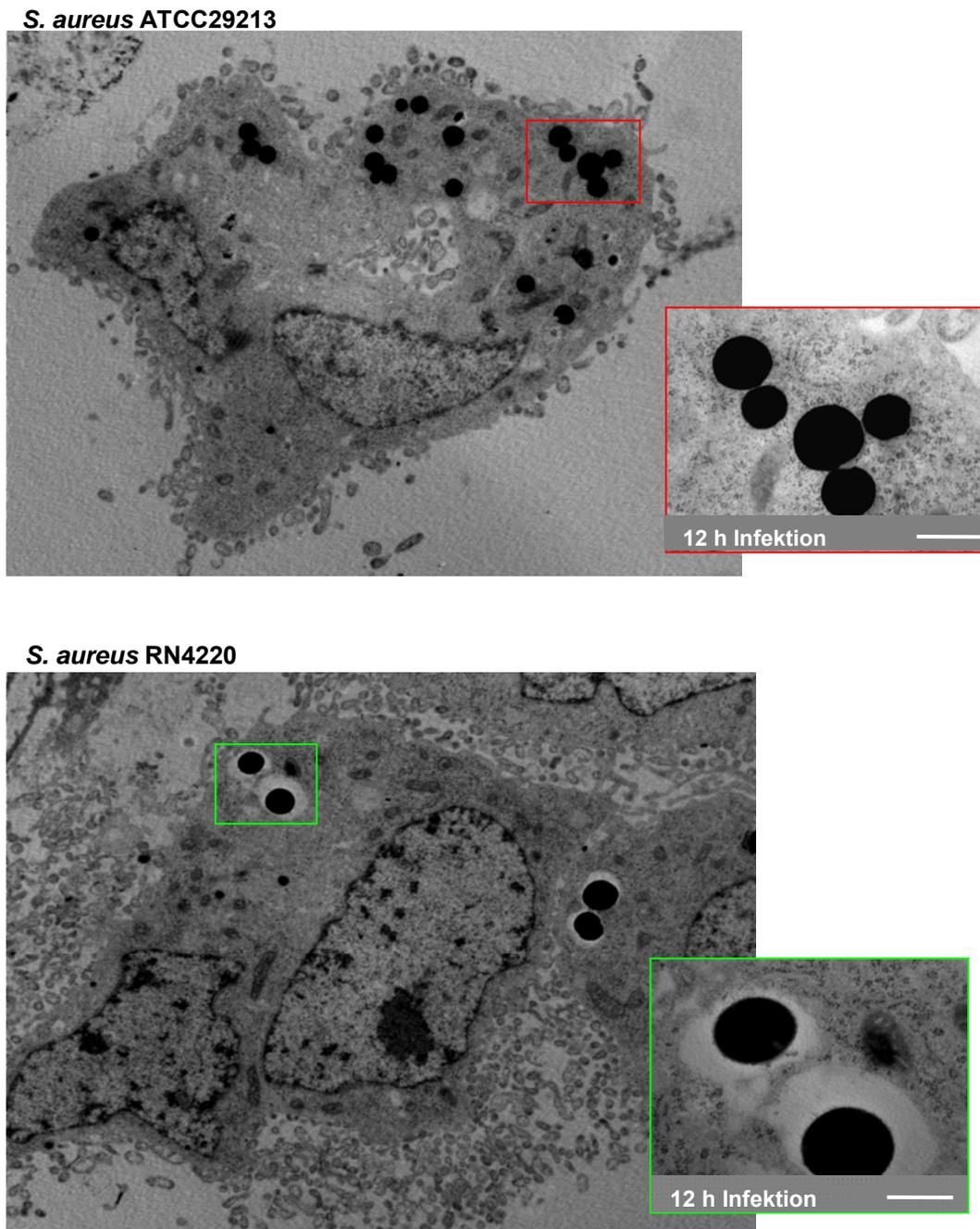
**Abb. 21** Wt *agr* *S. aureus* enthaltende Kompartimente haben keinen sauren pH-Wert.

HeLa-Zellen wurden mit GFP exprimierenden wt *agr* ATCC29213 *S. aureus* (obere Reihe) und *agr*-defizientem RN4220 *S. aureus* (untere Reihe) mit MOI20 infiziert. 4 h Stunden nach der Infektion wurden saure subzelluläre Kompartimente mit *LysotrackerRed* gefärbt.

### **3.6 *S. aureus* tritt aus den Autophagosomen in das Zytoplasma über**

Im weiteren Verlauf der Infektion wurde im Elektronenmikroskop nach 12 Stunden Infektion beobachtet, dass sich die wt *agr S. aureus* Stämme vorwiegend frei im Zytoplasma der Wirtszelle befanden (Abb. 22), während die noch verbliebenen *agr*-defizienten *S. aureus* Stämme in Lysosomen isoliert waren. Diese Ergebnisse wurden mit jeweils zwei weiteren wt *agr* und *agr*-defizienten *S. aureus* Stämmen bestätigt.

*S. aureus* scheint die induzierte Blockade der Autophagosomenreifung, nämlich die phago-lysosomale Fusion zu nutzen, indem es aus den Autophagosomen in das Zytoplasma übertritt und sich vor dem lysosomalen Abbau schützt. Somit befindet sich *S. aureus* frei im Zytoplasma der Zelle und entkommt dem eliminierenden Abbauweg der Wirtszelle.



**Abb. 22 *S. aureus* tritt in das Zytoplasma über.**

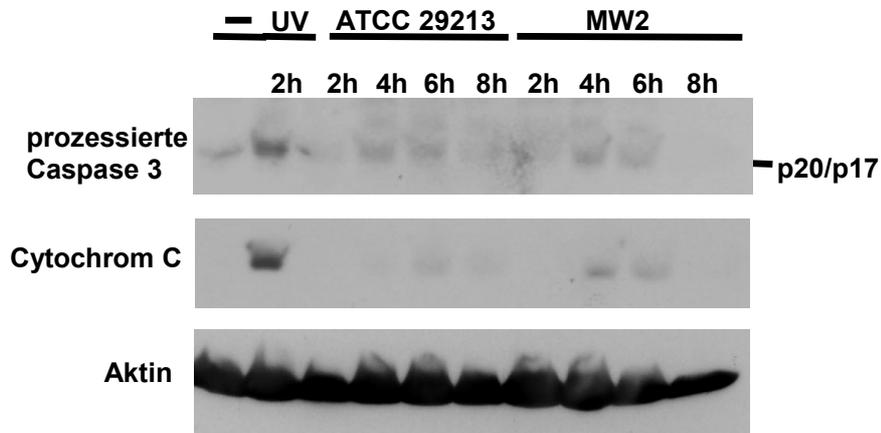
Elektronenmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen, welche mit wt *agr* *S. aureus* ATCC29213 (obere Reihe) oder *agr*-defizientem *S. aureus* RN4220 (untere Reihe) mit MOI200 infiziert wurden. Die Zellen wurden nach 12 h Infektion mit Karnovski-Puffer fixiert und nach standardelektronenmikroskopischen Methoden weiterverarbeitet. Maßstab: 0,5  $\mu$ m

### **3.7 *S. aureus* tötet Wirtszellen mit einem von Caspasen unabhängigen Mechanismus**

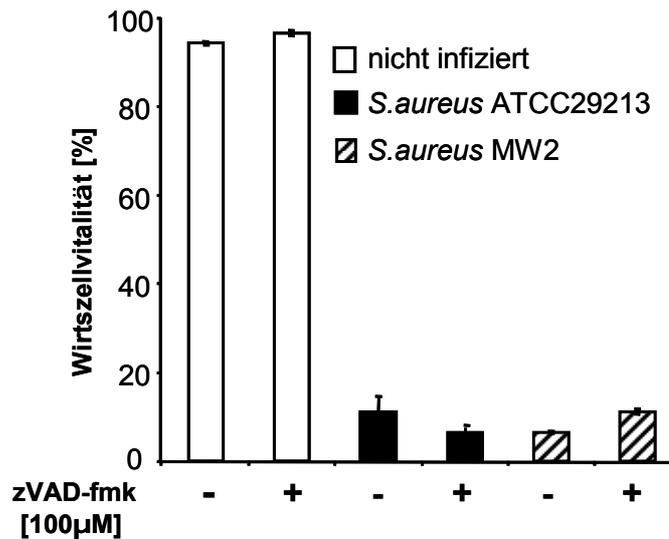
Durch den Ausbruch aus den Autophagosomen entzieht sich *S. aureus* der lysosomalen Degradation. Wie *S. aureus* anschließend den Wirtszelltod induziert, ist nicht klar. Ob *S. aureus* in der Zelle den Tod über Nekrose oder Apoptose herbeiführt und ob dazu die Aktivierung von Caspasen erforderlich ist, wird kontrovers diskutiert. Um genau diese zum Wirtszelltod führenden zellulären Mechanismen näher zu beschreiben, wurde zunächst während einer *S. aureus* Infektion die Aktivierung der Effektorcaspase-3 und die Cytochrom C Ausschüttung analysiert. Diese beiden Prozesse sind für den Ablauf der klassischen Apoptose (Programmierter Zelltod Typ I) essentiell. Dazu wurden die mit *S. aureus* infizierten HeLa-Zellen zu bestimmten Zeitpunkten lysiert und die Prozessierung der Caspase-3, wie auch die mitochondriale Cytochrom C Ausschüttung in zytosolischen Zellextrakten im Western Blot detektiert. Wie in Abb. 23A gezeigt, konnte im Vergleich zur Postivkontrolle, den UV-irradierten HeLa-Zellen, nur eine geringe Prozessierung der Caspase-3 während einer Infektion mit den wt *agr S. aureus* Stämmen ATCC29213 und MW2 beobachtet werden. Die Intensität der Banden war mit der der unbehandelten Zellen vergleichbar. Ebenso konnte nur eine geringe Ausschüttung von Cytochrom C detektiert werden.

Um eine Rolle der Caspasen beim *S. aureus* induzierten Wirtszelltod vollkommen auszuschließen, wurde weiterhin untersucht, ob der Pancaspasen-Inhibitor zVAD-fmk den Wirtszelltod verhindern oder teilweise einschränken kann. Auch durch die Vorinkubation der HeLa-Zellen mit zVAD-fmk, wie in Abbildung 23B veranschaulicht, konnte die Wirtzellvitalität nach 24 h Infektion mit *S. aureus* ATCC29213 und MW2 nicht gesteigert werden.

A



B

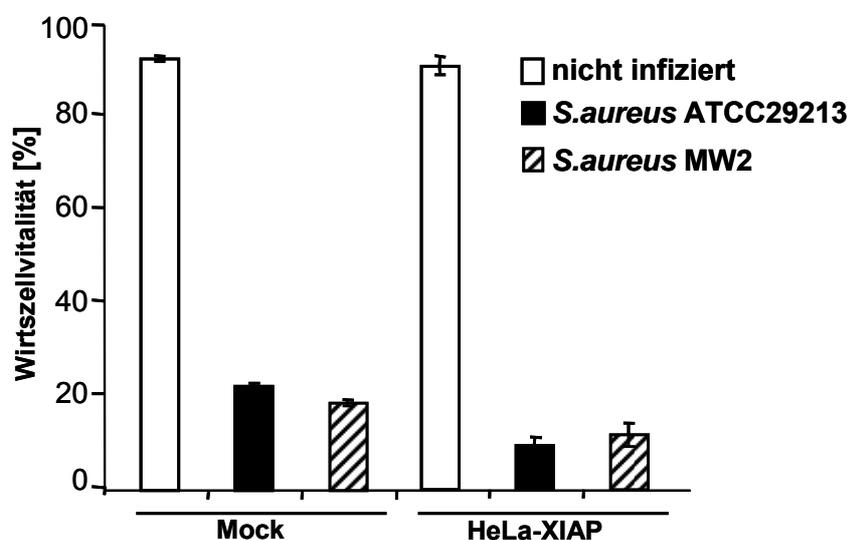


**Abb. 23 Keine Beteiligung von Caspasen an *S. aureus* induziertem Zelltod.**

A) HeLa-Zellen wurden mit wt *agr* *S. aureus* Stämmen (ATCC29213 und MW2) mit MOI200 infiziert. Zu indizierten Zeitpunkten wurden Zellysate präpariert. UV-irradierte (20mJ/cm<sup>2</sup>) und unbehandelte (-) HeLa-Zellen dienen als Kontrolle. Zellysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western Blot wurde durch Immunodetektion Caspase-3, wie auch Cytochrom C analysiert. Die Proteinkonzentration wurde durch den BCA-Assay bestimmt. Es wurden gleiche Mengen an Protein aufgetragen.

B) HeLa-Zellen wurden 30 min vor der Infektion (MOI200) mit wt *agr* *S. aureus* ATCC29213 (schwarze Säulen) und MW2 (gestreifte Säulen) mit zVAD-fmk 100 µM vorbehandelt. Nach 24 h wurde die Wirtszellvitalität mittels Trypanblauauszählung bestimmt

Das gleiche Resultat ergab sich bei der Infektion von HeLa-Zellen, welche XIAP (*x-linked inhibitor of apoptosis protein*) überexprimieren. XIAP reguliert negativ Apoptose durch direkte Bindung an und Wechselwirkung mit den Caspasen -3, -7 und -9. Auch hier war die Vitalität der für 24 Stunden infizierten Wirtszellen nicht verbessert (Abb. 24). Damit kann festgestellt werden, dass der von *S. aureus* induzierte Wirtszelltod unabhängig von der Kaskade der Caspasen des Apoptoseweges abläuft.

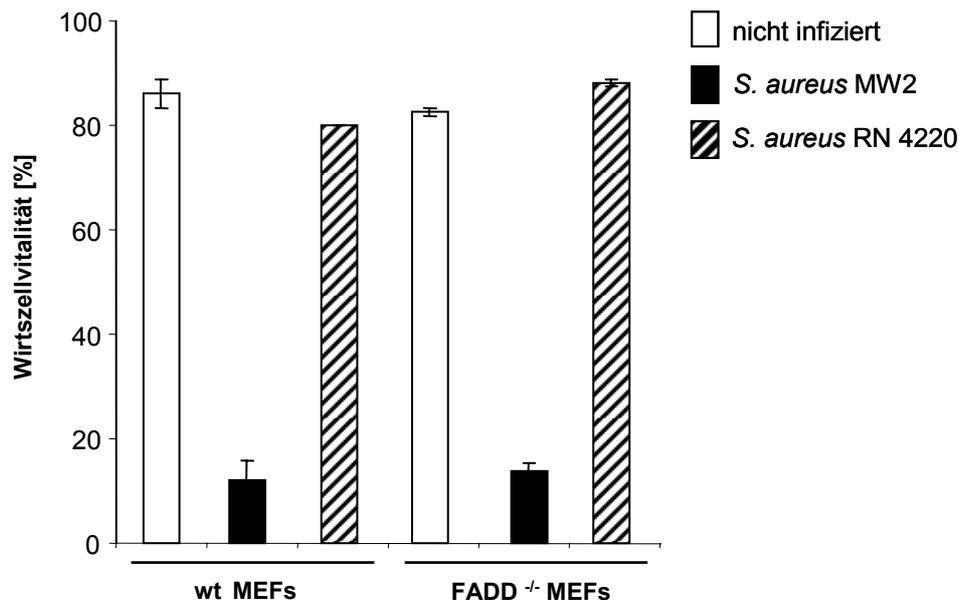


**Abb. 24** *S. aureus* induzierter Zelltod läuft nicht über XIAP ab.

HeLa-Zellen, welche stabil XIAP exprimieren, wurden mit den wt *agr S. aureus* Stämmen ATCC29213 (schwarze Balken) und MW2 (gestreifte Balken) infiziert (MOI200). Nach 24 h Infektion wurde die Wirtszellvitalität mittels Trypanblauauszählung bestimmt.

Apoptose kann auch über die extrinsische Signalkaskade induziert werden. Dabei werden die Todesrezeptoren (z. B. TNF-Rezeptor 1 und CD95-Rezeptor) an der Zelloberfläche ligandenvermittelt aktiviert. Intrazellulär wird dann durch die Todesdomäne DD (*death domain*) FADD (*FAS-associated death domain protein*) rekrutiert und die Caspase-8 aktiviert. Ob der extrinsische Apoptosesignalweg im *S. aureus* induziertem Zelltod eine Rolle spielt, wurde durch Infektion einer dominant negativen FADD<sup>-/-</sup> MEF-Zelllinie getestet. Wie Abbildung 25 zeigt, verhielten sich wt MEFs nach einer Infektion mit *S. aureus* genauso wie das vorher angewandte HeLa-Zellinfektionssystem. MEFs infiziert mit *agr*-defizientem *S. aureus* Stamm

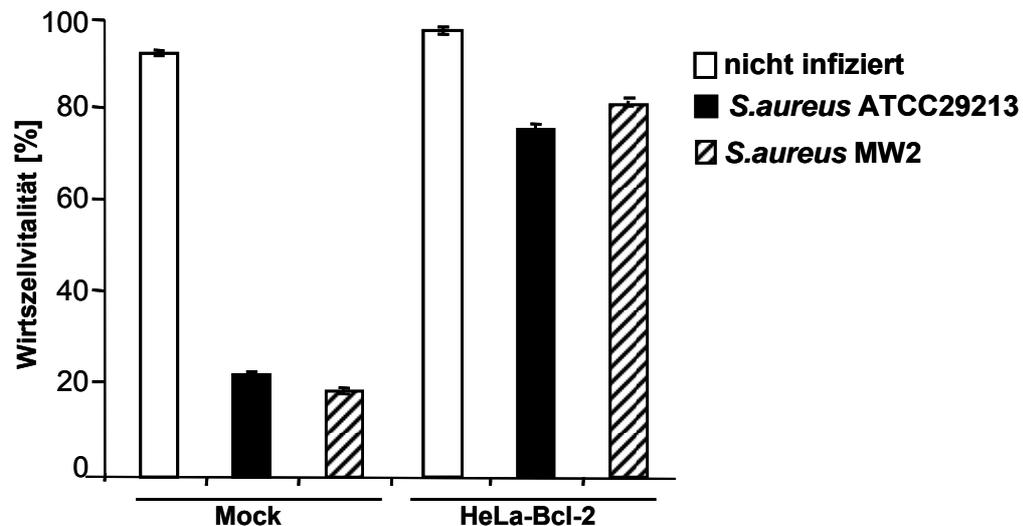
RN4220 waren nicht in ihrer Vitalität beeinträchtigt, während der wt *agr* *S. aureus* Stamm MW2 Zelltod in MEFs induzierte. Allerdings überlebten ebenso wenige FADD<sup>-/-</sup> MEFs eine Infektion mit MW2. Demnach verläuft der von *S. aureus* induzierte Tötungsmechanismus nicht über FADD und damit nicht über die extrinsische Signalkaskade.



**Abb. 25** *S. aureus* induzierter Zelltod verläuft nicht über den extrinsischen Apoptosesignalweg.

Wt MEFs und FADD<sup>-/-</sup> MEFs wurden mit wt *agr* *S. aureus* MW2 und *S. aureus* RN4220 (MOI200) infiziert. Wirtszellvitalität wurde 24 h nach Infektion mittels Trypanblauauszählung bestimmt.

Das antiapoptotische Protein Bcl-2 hat auch eine antiautophagische Funktion. HeLa-Zellen, welche Bcl-2 überexprimieren, waren vor dem von *S. aureus* induzierten Zelltod geschützt (Abb. 26). Die Ergebnisse zeigten, dass der von *S. aureus* induzierte Zelltod mechanistisch nicht dem programmierten Zelltod Typ I, der Apoptose, zuzuordnen ist. Sie deuteten auf einen von *S. aureus* induzierten Autophagie-Zelltod hin, welcher im Weiteren funktionell untersucht wurde.

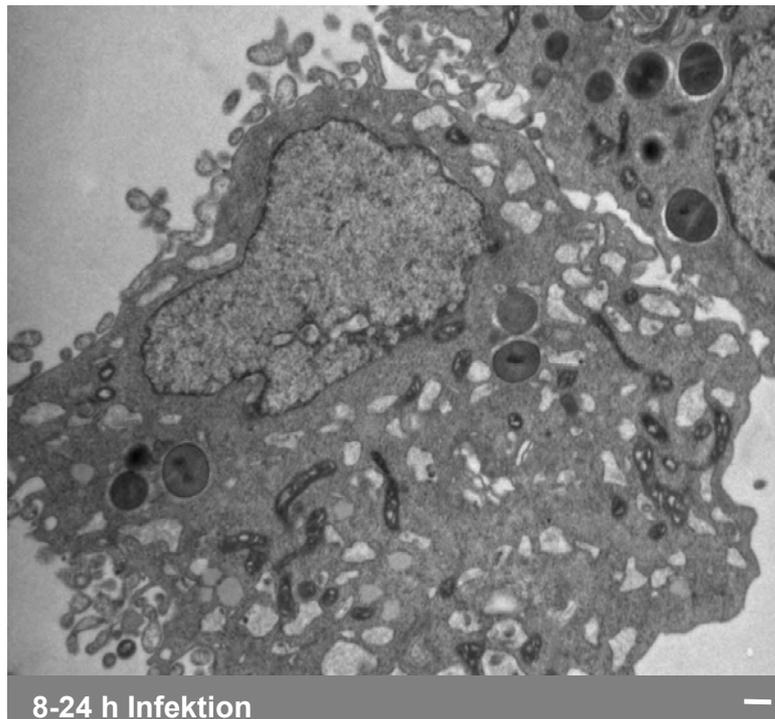


**Abb. 26** *S. aureus* induzierter Zelltod ist Bcl-2 abhängig.

HeLa-Zellen, welche stabil Bcl-2 exprimieren, wurden mit den wt *agr* *S. aureus* Stämmen ATCC29213 (schwarze Balken) und MW2 (gestreifte Balken) infiziert (MOI200). 24 h nach Infektion wurde die Wirtszellvitalität mittels Trypanblauauszählung bestimmt

### 3.8 *S. aureus* induziert Autophagie-Zelltod

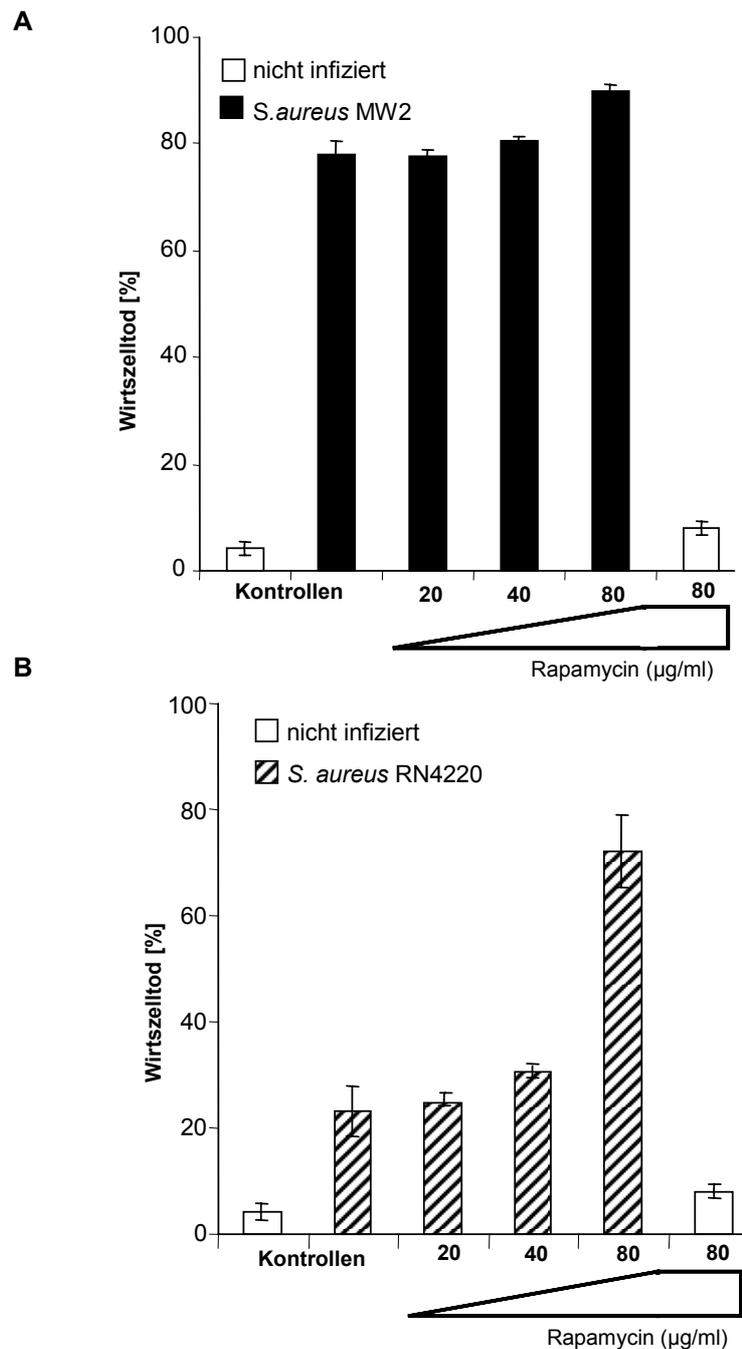
Autophagie wird von der eukaryotischen Zelle vor allem bei Nährstoffmangel und zur Wiederverwertung von subzellulären Komponenten initiiert. Es ist aber auch bekannt, dass, speziell in Fällen bei denen Apoptose in der Zelle inhibiert ist, es zu einem hohen Ausmaß an Autophagie kommen kann, das bis zum Zelltod führt. Dabei werden exzessiv essentielle zelluläre Bestandteile autophagisch degradiert und verdaut. Extreme Vakuolisierung ist ein morphologischer Indikator für Autophagie-verursachten Zelltod (Programmierter Zelltod Typ II) (Fink and Cookson, 2005; Shimizu et al., 2004). Im Falle von mit *S. aureus* ATCC29213 infizierten HeLa-Zellen wurde eine extreme Vakuolisierung der Zellen in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen festgestellt (Abb. 27). Ein vergleichbares Bild ergab sich bei der Infektion mit anderen zytotoxischen *S. aureus* Stämmen.

***S. aureus* ATCC 29213**

**Abb. 27** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer mit *S. aureus* infizierten sterbenden HeLa-Zelle.

HeLa-Zellen wurden mit wt *agr S. aureus* Stamm ATCC29213 infiziert (MOI200). Nach 8-24 h wurden die Zellen mit Karnovsky-Puffer fixiert und nach standardelektronenmikroskopischen Methoden weiterverarbeitet. Maßstab: 0,5  $\mu$ m

Die Fähigkeit von *S. aureus* Wirtszellen zu töten, korrelierte mit der Fähigkeit Autophagie zu induzieren. Durch zusätzliche Stimulation von Autophagie mit Rapamycin während der Infektion wurde die vorher schon vorhandene Zytotoxizität der wt *agr S. aureus* Stämme noch gesteigert (Abb. 28A). Noch bemerkenswerter war, dass der *agr*-defiziente *S. aureus* Stamm RN4220 in einen wt *agr S. aureus*-Phänotyp „umgewandelt“ werden konnte. Durch die Applikation von 80  $\mu$ g/ml Rapamycin war *S. aureus* RN4220 in der Lage über 70% der Wirtszellen zu töten (Abb. 28B). Dies verdeutlicht, dass die Bildung von Autophagosomen nicht nur für die Replikation der Staphylokokken notwendig ist, sondern auch für das Vermögen, die Wirtszelle zu töten.



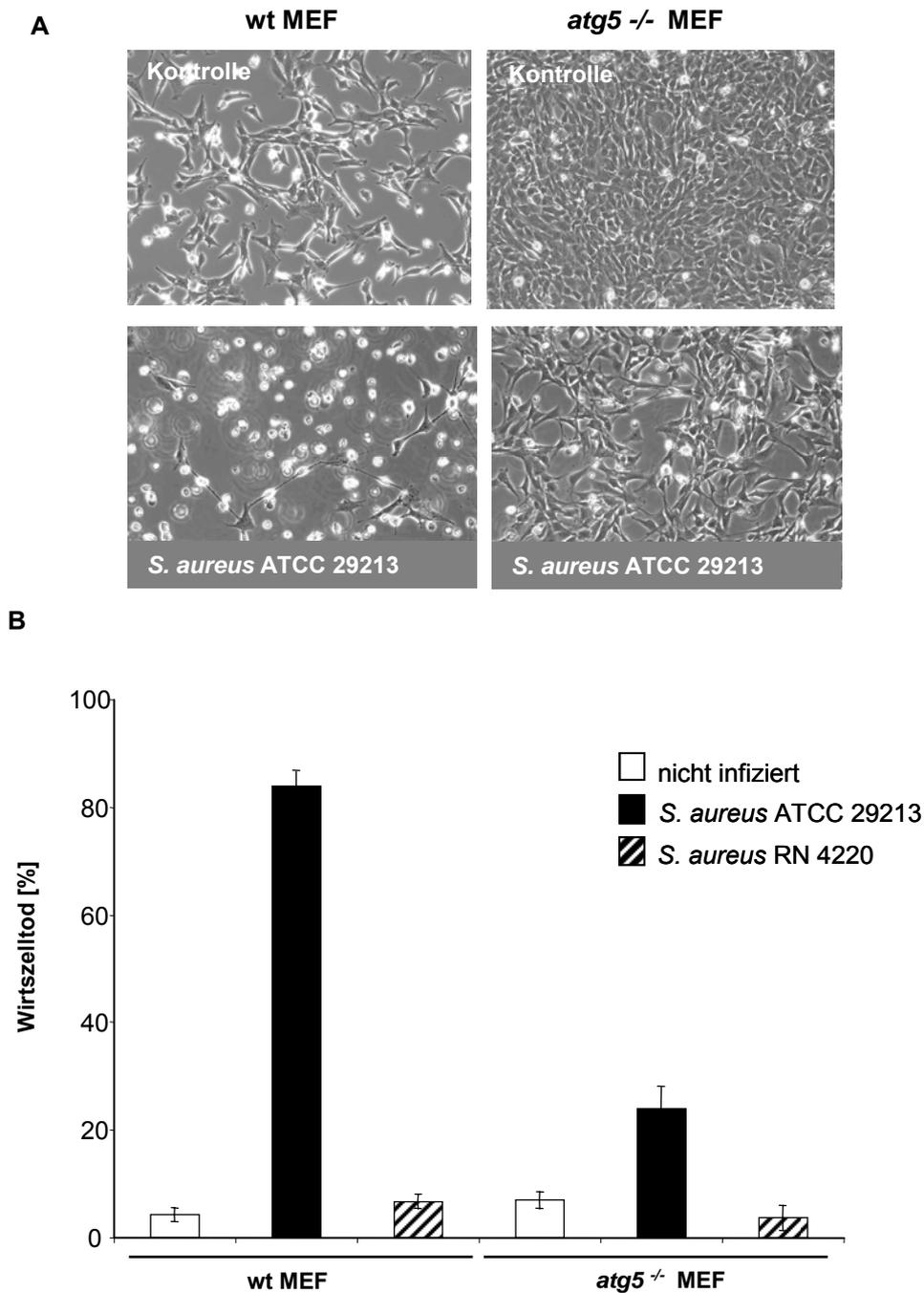
**Abb. 28 Autophagie-Induktion steigert die Zytotoxizität von *S. aureus*.**

HeLa-Zellen wurden mit wt *agr* *S. aureus* ATCC29213 (A) oder mit dem *agr*-defizienten *S. aureus* RN4220 (B) infiziert (MOI200). Rapamycin wurde nach 1 h Infektion in steigenden Konzentration (20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml) für 2 h appliziert. Die Wirtszellvitalität wurde 24 h nach Infektion mittels Trypanblauauszählung bestimmt.

Um zu bestätigen, dass Autophagie essentiell für den von *S. aureus* induzierten Zelltod ist, wurde eine Methode gewählt, welche auf einem genetischen Ansatz basiert. Es wurden aus *atg5*<sup>-/-</sup> Knockout-Mausembryonen stammende Fibroblasten

(*atg5*<sup>-/-</sup> MEF) mit *S. aureus* infiziert. ATG5 formt einen zytosolischen Komplex mit ATG12 und ist für die Ausbildung der Isolationsmembran am Anfang des Autophagieweges verantwortlich und damit essentiell für den Ablauf von Autophagie (Mizushima et al., 2001). Wildtyp MEFs zeigten im Lichtmikroskop nach 24 Stunden Infektion mit wt *agr S. aureus* starke Anzeichen von Zelltod. Die Zellen waren von der Oberfläche abgelöst und rund. Im Gegensatz dazu schienen die *atg5*<sup>-/-</sup> MEFs phänotypisch unversehrt (Abb.29A). Die Vitalitätsbestimmung der Wirtszellen mittels Trypanblau bestätigte, dass in infizierten *atg5*<sup>-/-</sup> MEFs der *S. aureus* induzierte Zelltod merklich reduziert wurde (Abb. 29B). Der Anteil toter Wirtszellen sank von über 80% auf 25%. Der von *S. aureus* induzierte Zelltod beruht auf einem autophagischen, *atg5*-abhängigen Mechanismus.

Dies beweist, dass der Übergang vom phagoendosomalen Weg in den Autophagieweg für *S. aureus* absolut notwendig ist, um die Wirtszellen zu töten.



**Abb. 29** *Atg5*<sup>-/-</sup> MEFs sind vor dem *S. aureus* induzierten Zelltod geschützt.

Wt MEF und *atg5*<sup>-/-</sup> MEFs wurden mit wt *agr* *S. aureus* ATCC29213 und *agr*-defizientem *S. aureus* RN4220 infiziert (MOI100). A) Nach 24 h Infektion wurden lichtmikroskopische Aufnahmen von den Zellen gemacht. B) Der Anteil toter Wirtszellen infiziert mit ATCC29213 (schwarze Balken) oder infiziert mit RN4220 (gestreifte Balken) wurde mittels Trypanblauauszählung bestimmt.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals gezeigt, dass invasive *S. aureus* den eukaryotischen Autophagieweg zum Überleben, Replizieren und zur Induktion von Wirtszelltod nutzen.

Nachdem *S. aureus* von der Wirtszelle in den endosomalen Phagozytoseweg aufgenommen wurde, kolokalisiert *S. aureus* mit Autophagosomen. In den Autophagosomen blockiert *S. aureus* die Reifung zu Autolysosomen und entgeht somit der lysosomalen Degradation. *S. aureus* nutzt die Umgebung des Autophagosoms zur intrazellulären Vermehrung und tritt von dort in das Zytoplasma der Wirtszelle über. Schließlich induziert *S. aureus* in der infizierten Wirtszelle Autophagie-Zelltod. Das *S. aureus* Zwei-Komponentensystem *agr* reguliert den Übergang in Autophagosomen und damit das intrazelluläre Überleben und die Vermehrung von *S. aureus*, sowie den Übergang in das Zytoplasma und die damit verbundene *S. aureus*-Zytotoxizität.

### 4.1 Das *S. aureus* Autophagosom ist einzigartig

Das *S. aureus* enthaltende Autophagosom erscheint einzigartig bezüglich seiner Entstehung, Zusammensetzung und Funktion (Abb.30).

Schon bei der Entstehung des Autophagosoms unterscheidet sich *S. aureus* von anderen intrazellulären Bakterien, welche auch wie *S. aureus* den phagoendosomal Abbauweg der Wirtszelle umgehen. *M. tuberculosis* verhindert schon die frühe Biogenese zu einem Rab7-positiven Phagosom (Vergne et al., 2004). Im Vergleich dazu kommt es bei *S. aureus* initial zu keiner Blockade der Reifung des Phagosoms. *S. aureus* tritt zunächst über eine becherförmige Ausstülpung in ein Rab7-positives Phagoendosom in die Zelle ein. Die ersten Schritte der Phagozytose des Bakteriums laufen demnach kontrolliert von Rab-GTPasen über den phagoendosomal Weg der Wirtszelle ab (Tjelle et al., 2000). Es ist allerdings auch bekannt, dass sich Rab7 auf frühen autophagosomalen Kompartimenten befindet. Man geht von einer Verbindung zwischen endozytischem

und autophagosomalem Weg aus, die über Rab7 verlaufen könnte (Dunn, 1990; Young et al., 2006). Ob es kurz nach dem Eintritt in die Wirtszelle deshalb schon zu einer Modifikation des *S. aureus* enthaltenden Kompartiments kommt, abweichend vom phagoendosomalen Weg, hin zum autophagosomalen Weg, ist nicht geklärt.

Bei *S. aureus* kommt es später nicht zur Reifung des Phagoendosoms. Die Akquirierung des spät endosomalen/lysosomalen Markers LAMP-2 (<20%) und die Senkung des pH Wertes des *S. aureus* enthaltenden Phagoendosoms bleibt aus. Dies bedeutet, dass es zu keiner Reifung der *S. aureus*-Phagosomen durch kontrollierte Fusion mit den Kompartimenten entlang des endosomalen Weges kommt. Die folgende Eliminierung des intrazellulären Bakteriums durch lysosomale Degradation findet nicht statt. Stattdessen geht *S. aureus* vom phagoendosomalen Weg in Autophagosomen über. Nach drei Stunden Infektion befinden sich über 90% der intrazellulären *S. aureus* in Autophagosomen. Die Kompartimente wurden eindeutig durch Kolo-kalisation mit LC3/ATG8 und durch Elektronenmikroskopie morphologisch durch *S. aureus* ummantelnde Doppelmembranen als Autophagosomen identifiziert.

Autophagie wird heute nicht mehr nur als hoch konservierter kataboler Abbauweg von zytoplasmatischen Komponenten, wie langlebigen Proteinen und Organellen, angesehen. Autophagie wird mit verschiedenen physiologischen Prozessen, der Zelldifferenzierung, dem Zelltod, verschiedenen Krankheitsbildern oder der zellulären Stressbewältigung in Verbindung gebracht. Autophagie wird aber auch von eukaryotischen Zellen als ein alternativer Eliminierungsmechanismus von intrazellulären mikrobiellen Pathogenen eingesetzt (Kirkegaard et al., 2004). Flüchten intrazelluläre Bakterien aus dem Phagoendozytoseweg in das Zytoplasma der Wirtszelle, kann diese sich schützen, indem sie die freien Bakterien wieder in Autophagosomen einfängt und sie dort eliminiert. Gruppe A Streptokokken (GAS) befreien sich direkt nach dem Eintritt in die Zelle aus dem frühen Phagoendosom. Sie lysieren die Membran, flüchten in das Zytoplasma und werden sogleich von der Zelle in Autophagosomen isoliert. Die Autophagosomen fusionieren mit Lysosomen und die Bakterien werden getötet (Nakagawa et al., 2004). Wird *L. monozytogenes* nach dem Eintritt ins Zytoplasma metabolisch inhibiert, vollzieht sich die bei GAS beschriebene autophagische Eliminierung des Bakteriums (Rich et al., 2003). Dieser Verlauf ist bei *S. aureus* allerdings nicht zu beobachten. Es ergibt sich ein entscheidender Unterschied zwischen der Reifung der *S. aureus* enthaltenden

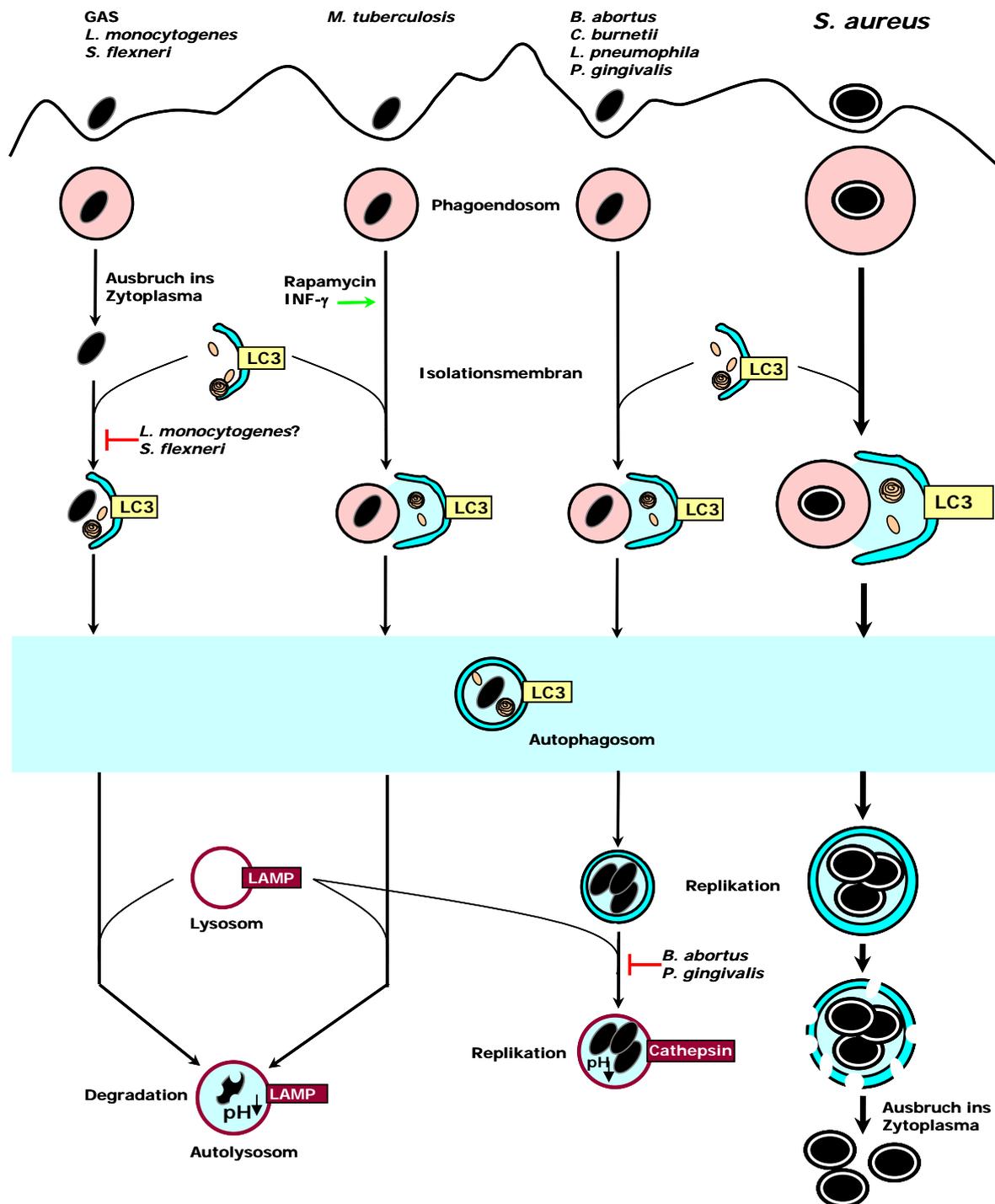
Autophagosomen und den GAS enthaltenden Autophagosomen. Im Vergleich zu GAS reifen die *S. aureus* Kompartimente nicht zu Autolysosomen. Im Verlauf von sechs gemessenen Stunden akkumulieren die Autophagosomen kein LAMP-2 und auch kein *LysotrackerRed*; das autophagosomale Milieu säuert nicht an. *S. aureus* verursacht demnach eine Blockade der autophagosomalen Reifung und die Fusion mit Lysosomen.

Ob auch *S. aureus* in der Lage ist, zunächst aus dem Phagoendosom in das Zytoplasma zu flüchten bevor es zur Verlagerung in Autophagosomen kommt, ist aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht ersichtlich. Hier scheint es eher zu einer Fusion der bestehenden endosomalen Membranen mit den multilamellaren Membranen der Autophagosomen zu kommen. Diese Frage lässt sich hier aber nicht eindeutig beantworten und müsste anhand weiterer Experimente noch geklärt werden.

Dass Gram-positive Bakterien den Autophagieweg modifizieren, wurde noch nie beobachtet. Eher sind solche Phänomene von den Gram-negativen Bakterien *B. abortus*, *L. pneumophila*, *P. gingivalis* und *C. burnetii* beschrieben. Sie sind klassische intrazelluläre Bakterien und nutzen das Autophagosom zum Überleben und zur Replikation im Wirt. Die Autophagosomen dieser Bakteriengruppe haben alle spät endosomale Marker akquiriert und zeigen eine verzögerte oder nur kurzweilige Anreicherung der lysosomalen Marker LAMP-1, Cathepsin D und v-ATPase auf (Beron et al., 2002; Dorn et al., 2002; Joshi et al., 2001; Pizarro-Cerda et al., 1998). Während *L. pneumophila* und *C. burnetii* in vollständig gereiften sauren, hydrolasereichen Autolysosomen replizieren und überleben, befinden sich *B. abortus* und *P. gingivalis* in nicht gereiften Autophagosomen. Deren autophagosomale Kompartimente sind frei von LAMP-1 und Cathepsin D. Das *S. aureus* Autophagosom ist mit den intrazellulär modifizierten Kompartimenten von *B. abortus* und *P. gingivalis* vergleichbar.

Den professionell intrazellulären Gram-negativen Bakterien ist ein Typ IV Sekretionssystem (TFSS) gemein, durch welches sie in der Lage sind, zelluläre Prozesse zu unterlaufen und so ihr intrazelluläres Kompartiment zu modifizieren (Backert and Meyer, 2006). *L. pneumophila* und *C. burnetii* besitzen ein *dot/icm* TFSS (*defective in organelle trafficking/intracellular multiplication*), durch das sie virulente Effektormoleküle in die Wirtszelle injizieren. Sie verändern den Membranverkehr und generieren so selber ihre replikative Vakuole. *B. abortus*

benutzt ein auf VirB kodierte TFSS, welches für die Biogenese des Autophagosoms und die intrazelluläre Replikation verantwortlich ist. Solche virulenten Sekretionssysteme wurden für Gram-positive Bakterien noch nicht beschrieben. Dennoch scheint *S. aureus* sein intrazelluläres Kompartiment genauso zu modifizieren. Es geht in Autophagosomen über und stoppt deren Reifung zu Autolysosomen. Die intrazelluläre Kompartimentalisierung von *S. aureus* ist mit der der oben beschriebenen Gram-negativen Bakterien zu vergleichen. Im Unterschied zu den professionell intrazellulären Bakterien, nutzt *S. aureus* das Autophagosom nicht nur zur intrazellulären Replikation, sondern tritt von dort aus in das Zytoplasma über und induziert Zelltod in den infizierten Wirtszellen (Abb. 30).



**Abb. 30 Autophagie und Bakterien.**

Modell zur Interaktion von Autophagie und Bakterien. Im Gegensatz zu allen anderen mikrobiellen Pathogenen nutzt *S. aureus* das Autophagosom nicht nur zur intrazellulären Replikation, sondern auch zum Übergang in das Zytoplasma und induziert Wirtszelltod.

Ob die Bakterien selber Autophagie induzieren oder ob die Wirtszelle auf die Infektion mit den Bakterien den Autophagieweg aktiviert, um sie zur lysosomalen Degradation zu bringen, ist nicht geklärt (Dorn et al., 2002). Aus der Sicht der Bakterien, könnte das Autophagosom nicht nur als Zufluchtsort aus dem phagoendozytischen Weg dienen. Sie könnten das Autophagosom auch als Energiequelle für ihr Wachstum nutzen. Andererseits ist bekannt, dass Autophagie als Reaktion auf verschiedenste Stress-Stimuli von eukaryotischen Zellen aktiviert wird.

Funktionell gesehen ist *S. aureus* auf die Bildung von Autophagosomen angewiesen, da in Gegenwart von Wortmannin die intrazelluläre Replikation des Bakteriums unterbunden wurde (Abb. 13). Wortmannin verhindert initial die Bildung der Autophagosomen. Der Vergleich mit *B. abortus* scheint angebracht zu sein. Dieses Bakterium unterläuft ebenso den Autophagieweg und benötigt Autophagosomen zum Überleben und zur Replikation in der Wirtszelle. Auch die Replikation von Brucellen ist vermindert, wenn Autophagie durch Wortmannin oder 3-Methyladenin verhindert wird. Darüber hinaus kann man wie bei *S. aureus* das intrazelluläre Wachstum durch die Gabe von Autophagieinduktoren wie Rapamycin oder durch *Starvation* (Aminosäuremangel) erhöhen. Funktionsverlust des VirB Operons, welches für das TFSS kodiert, führt bei *B. abortus* zur Degradation in Lysosomen. Die Brucella-VirB-Mutanten befinden sich schnell in LAMP-1 und Cathepsin D-positiven Kompartimenten. Sie können nicht aus dem phagoendosomal Weg in Autophagosomen übergehen und haben außerdem die Fähigkeit verloren, sich intrazellulär zu vermehren (Comerci et al., 2001; Delrue et al., 2001). *S. aureus* Stämmen, welchen der globale Virulenregulator *agr* fehlt, ergeht es gleichermaßen. Sie kolokalisieren nicht mit dem Autophagosomenmarker LC3. Stattdessen kolokalisieren sie mit dem lysosomalen Marker LAMP-2, vermehren sich nicht und überleben auch nicht in der Wirtszelle. Diese Resultate implizieren, dass *S. aureus* aktiv über *agr*-regulierte Faktoren in Autophagosomen übergeht.

Die Hypothese wird dadurch unterstützt, dass *agr*-defiziente *S. aureus* durch Behandlung der Wirtszellen mit Rapamycin oder Wirtszellen, welchen es an Aminosäuren mangelt (*Starvation*), zu replikationsfähigen Bakterien konvertieren. *Agr*-abhängige Faktoren scheinen die Autophagieinduktion in der Zelle und den Übergang in Autophagosomen zu steuern.

*S. aureus* nutzt das Autophagosom nicht nur zum Multiplizieren. Von dort aus findet auch der Ausbruch in das Zytoplasma statt, wo die Wirtszelle vermutlich die Kontrolle über das Bakterium verliert. Nach drei Stunden Infektion erreichte die *S. aureus*/LC3-Kolokalisation ihr Maximum und fiel nach fünf Stunden Infektion auf den Ausgangszustand herab. Grund für das Auflösen der autophagosomalen Membran war offensichtlich nicht die Fusion mit Lysosomen, sondern die Replikation des Bakteriums mit folgender Zerstörung des Autophagosoms. Nach zwölf Stunden Infektion befanden sich alle *S. aureus* frei im Zytoplasma. Wie es zu der Zerstörung und damit der Flucht aus dem Autophagosom kommt, konnte hier noch nicht geklärt werden. Es ist bekannt, dass Bakterien die sie umschließenden, intrazellulären Kompartimente lysieren können. GAS sezerniert das Streptolysin und *L. monozytogenes* das Listerolysin O, um die endosomale Membran zu zerstören (Cossart and Lecuit, 1998; Nakagawa et al., 2004). Spekulativ ist bei *S. aureus* so etwas vorstellbar, da durch die Vermehrung in den Autophagosomen die bakterielle Dichte steigt und das *Quorum-Sensing*-System *agr* aktiviert werden könnte. *Agr* wiederum reguliert die Expression vieler Virulenzfaktoren (Novick, 2003). Ist *S. aureus* erst einmal aus dem Autophagosom in das Zytoplasma entkommen, kommt es zum Wirtszelltod.

Bei der Infektion von nicht-professionellen Phagozyten mit *S. aureus* kommt es intrazellulär zu einer pathogen-spezifischen Modulation des *S. aureus* enthaltenden Kompartiments. Anders als bei bisher beschriebenen Interaktionen von Bakterien mit dem Autophagieweg, scheint *S. aureus* das Autophagosom nicht nur zur intrazellulären Replikation zu nutzen, sondern auch zur Flucht in das Zytoplasma, um den Tod der Wirtszelle zu induzieren.

## 4.2 *S. aureus* induziert ATG5 abhängigen Wirtszelltod

Die heutigen Erkenntnisse über den von *S. aureus* induzierten Wirtszelltod sind sehr heterogen. Der Zelltod wurde hinsichtlich der bekannten eukaryotischen Todesmechanismen (Apoptose und Nekrose) untersucht. Weder konnte auf Wirtszellseite ein eindeutiger Mechanismus festgestellt werden, noch konnte auf *S. aureus*-Seite der entscheidende Faktor identifiziert werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten durch variierende Infektionsmodelle erklärt werden (unterschiedliche *S. aureus* Stämme und unterschiedliche Wirtszellen). Oder der von *S. aureus* induzierte Zelltod unterliegt einem Mechanismus, der keinem der altbekannten Signaltransduktionswege entspricht?

Die meisten Publikationen beschreiben die Aktivierung des Apoptosesignalweges während einer *S. aureus* Infektion (Bayles et al., 1998; Menzies and Kourteva, 1998). Das Hauptkennzeichen der Apoptose, die Caspaseaktivierung, ist aber nicht überall gleichermaßen detailliert untersucht. Übereinstimmend mit anderen Veröffentlichungen (Essmann et al., 2003) wird in dieser Arbeit gezeigt, dass es zu keiner Caspaseaktivierung während der zytotoxischen *S. aureus* Infektion kommt. Es wurde nur eine geringe Caspase-3 Prozessierung detektiert. Darüber hinaus konnte der Pancaspaseninhibitor zVAD-fmk den Tod der mit *S. aureus* infizierten Wirtszellen nicht verhindern. In der Apoptosesignalkaskade unterdrückt XIAP durch Bindung an Caspase-3, -7 und -9 stimulierte Apoptose. Im Fall der hier beschriebenen *S. aureus* Infektion wurden XIAP überexprimierende Zelle trotzdem getötet. Der von *S. aureus* induzierte Zelltod vollzieht sich demnach caspaseunabhängig. Der extrinsische, wie auch der intrinsische, Apoptoseweg führen zur Prozessierung der Apoptoseausführenden Caspase-3. Wenn es also nicht zur Aktivierung von Caspase-3 kommt, ist die klassische Apoptose eigentlich als resultierender Wirtszelltodmechanismus auf eine *S. aureus* Infektion auszuschließen. Aufgrund der gegensätzlichen Datenlage bezüglich der Initiation von Apoptose auf eine zytotoxische *S. aureus* Infektion, wurden weitere Experimente unternommen, um die kontroversen Ergebnissen hinsichtlich intrinsischer und extrinsischer Apoptose zu überprüfen.

Die bei intrinsischer Apoptose zu erwartende Cytochrom C Freisetzung aus den Mitochondrien während einer *S. aureus* Infektion war vernachlässigbar gering. Die Ergebnisse stimmen nicht mit denen der Veröffentlichung von Bantel et al. (2001)

überein, die den intrinsischen Apoptoseweg als den von *S. aureus* induzierten Wirtszelltodmechanismus in Jurkat-Zellen beschreiben.

Auf der anderen Seite zeigen Baran et al. (2001) einen CD95-abhängigen Zelltod und damit extrinsischen Apoptosesignalweg als Reaktion der Wirtszelle auf eine *S. aureus* Infektion. Auch dieser Mechanismus liegt hier nicht als Ursache für den Wirtszelltod zu Grunde. Dominant negative FADD Zellen wurden nach Infektion mit *S. aureus* genauso wie ihre Wildtypkontrolle getötet. Die Assoziation von FADD an den Todesrezeptor ist für den extrinsischen Apoptoseweg essentiell und kommt damit nicht als Todesmechanismus der Wirtszellen in Betracht.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die in der Literatur dargestellten widersprüchlichen Ergebnisse, den von *S. aureus* induzierten Zelltod mechanistisch durch Apoptose zu erklären, in dieser Arbeit nicht reproduziert werden konnten. Stattdessen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Zelltod nicht auf der apoptotischen Signalkaskade beruht, sondern auf Proteinen des Autophagieweges, wie ATG5. ATG5 spielt eine entscheidende Rolle am Aufbau des Autophagosoms. Es bildet zusammen mit ATG12 einen Komplex und befindet sich auf der Isolationsmembran zusammen mit LC3/ATG8. ATG5xATG12 und ATG16L sind zusammen für die Ausdehnung der Isolationsmembran zuständig. Man geht davon aus, dass sie bei der Ausbildung des Autophagosoms den Vesikel ummanteln, so die Form des Vesikels vorgeben, um dann vom fertigen Autophagosom zu dissoziieren (Yorimitsu and Klionsky, 2005). Zur Durchführung von Autophagie ist ATG5 absolut notwendig (Kuma et al., 2004). *S. aureus* konnte in *atg5*<sup>-/-</sup> MEFs keinen Zelltod induzieren. Dies beweist, dass der Ablauf von Autophagie eine Voraussetzung für den von *S. aureus* verursachten Zelltod ist.

Der Autophagie-Zelltod ist noch nicht lange bekannt und nur wenige molekulare Ereignisse sind in humanen Zellen erforscht. Man weiß, dass Autophagie durch exzessive Eigenverdauung oder Degradation essentieller Zellbestandteile zum Zelltod führt (Levine and Klionsky, 2004). Die dabei auftretende extreme Vakuolisierung der Zelle konnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen während der *S. aureus* Infektion beobachtet werden. Shimizu et al. (2004) beschreiben den Autophagie-Zelltod in Bax/Bak Doppelknockout-Zellen. Diese Zellen sterben, obwohl sie apoptoseresistent sind, nach Stimulation mit Etoposid. Der Zelltod verläuft caspasenunabhängig und ist auf die Proteine des Autophagieweges,

wie ATG5 und ATG7, angewiesen. Diese Charakteristika wiesen auch sterbende mit *S. aureus* infizierte HeLa-Zellen auf.

Darüber hinaus entdeckten Pattingre et al. (2005), dass das antiapoptotische Bcl-2 auch eine regulierende antiautophagische Funktion besitzt. Bcl-2 vermag Beclin 1 zu binden. Beclin 1/ATG6 ist an der Initiierung von Autophagie beteiligt. Es bildet einen proautophagischen Komplex mit der PI3K Klasse III und vermittelt so die Assoziation der Autophagieproteine an die präautophagosomale Membran (Kihara et al., 2001). Ist Beclin 1 an Bcl-2 gebunden, kann keine Autophagie ablaufen. Dieser funktionale Zusammenhang besteht auch bei der zytotoxischen *S. aureus* Infektion. HeLa-Zellen, welche Bcl-2 überexprimieren, werden nicht von *S. aureus* getötet.

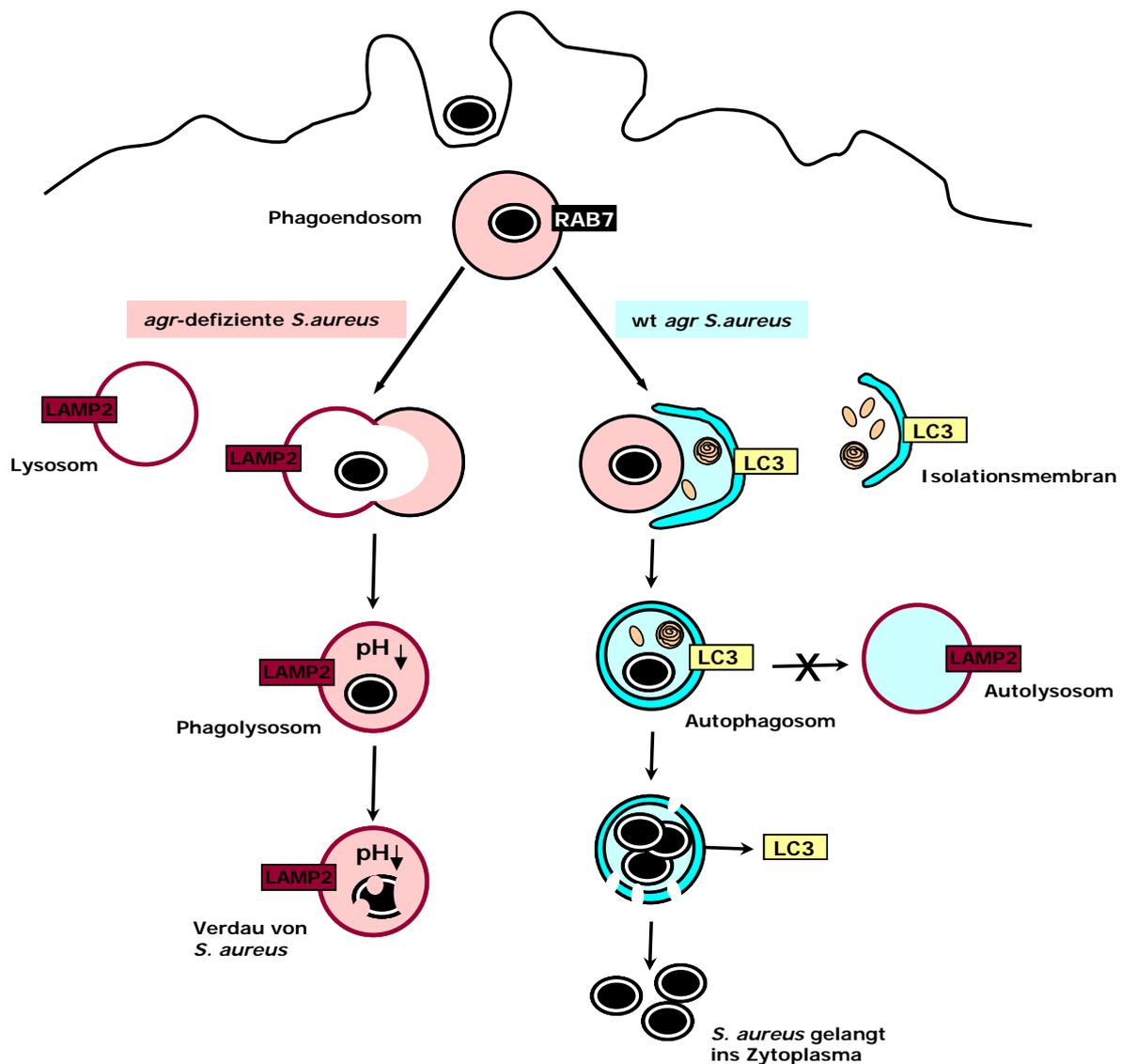
Mit *S. aureus* infizierte HeLa-Zellen besitzen die bisher beschriebenen Merkmale, die auf einen Autophagie-Zelltod hinweisen. *S. aureus* ist das einzige mikrobielle Pathogen, welches Zelltod in Abhängigkeit von Genen des Autophagieweges verursacht. Die Gram-negativen, Autophagie induzierenden Bakterien, wie *B. abortus*, *L. pneumophila* oder *C. burnetii*, sind professionell intrazellulär lebende Bakterien, die ihre Strategien zum Überleben und Replizieren in der Zelle entwickelt haben, nicht jedoch, um ihren Wirt zu töten. Sie nutzen das Autophagosom als Nische zum Replizieren. *S. aureus* nutzt Autophagie, um die Wirtszelle zu töten. Dass der Autophagie-Zelltod als Folgeereignis auf eine generelle Aktivierung von Autophagie während der *S. aureus* Infektion zurückzuführen ist, kann ausgeschlossen werden. Rapamycin führt in der Höchstkonzentration nicht allein durch exzessive Autophagie zum Zelltod. *Agr*-defiziente *S. aureus* Stämme sind von sich aus nicht zytotoxisch, wohl aber wenn Autophagie durch Rapamycin aktiviert ist. Dies impliziert, dass es zu einer synergistischen Wirkung zwischen Rapamycin und *agr*-defizienten *S. aureus* für die Induktion und Exekution des Wirtszelltodes kommen muss.

### 4.3 Der *agr*-Lokus reguliert die Induktion von Autophagie und Zytotoxizität von *S. aureus*

Über die Regulation und Expression von Virulenzfaktoren von *S. aureus* während der Infektion in der Wirtszelle ist wenig bekannt. Das Zwei-Komponentensystem *agr* ist für die Expression vieler Virulenzfaktoren bei *S. aureus* verantwortlich (Morfeldt et al., 1988; Otto et al., 1999; Peng et al., 1988). Alle hier untersuchten *S. aureus* Wildtyp Stämme besitzen das komplette *agr*-Regulon. Die Fähigkeit zum Übergang vom phagoendosomal Weg in Autophagosomen besitzen nur *agr*-positive *S. aureus* Stämme. Den *agr*-defizienten *S. aureus* Stämmen mangelt es an dieser Fähigkeit. Sie bleiben im phagoendosomal Abbauweg gefangen und werden von der Wirtszelle in Lysosomen eliminiert. Entsprechend führt die Infektion mit den *S. aureus agr*-Mutanten nicht zum Wirtszelltod. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit früheren Veröffentlichungen (Haslinger-Löffler et al., 2005; Wesson et al., 1998). Diese zeigen, dass das intrazelluläre Überleben und die Zytotoxizität von *agr* bestimmte *S. aureus* Eigenschaften sind. Im Besonderen ist zu erwähnen, dass nach Induktion von Autophagie durch einen externen pharmakologischen Stimulus *agr*-defiziente *S. aureus* in den Phänotyp des „Wildtyp-*S. aureus*“ umgewandelt werden können, welche im Autophagosom replizieren, aus diesem in das Zytoplasma entkommen und von dort aus die Wirtszelle umbringen. Die Resultate dieser Arbeit zeigen eindeutig, dass initial *agr*-abhängige Faktoren für den Übergang von *S. aureus* in das Autophagosom verantwortlich sind. Erfolgt dieses Schlüsselereignis, führt die Infektion mit *S. aureus* zum Zelltod der Wirtszelle. Das nächste Ziel sollte sein, diese Faktoren zu identifizieren.

Die Ergebnisse über das intrazelluläre Verhalten von wt *agr S. aureus* gegenüber *agr*-defizienten *S. aureus* sind in einem Model zusammengefasst dargestellt (Abb.30). Nach dem Eintritt in die Wirtszelle befindet sich *S. aureus* in einem Rab7-positiven Phagoendosom. Kurz danach kommt es zum entscheidenden Ereignis, der Infektion mit *S. aureus*, der *agr*-vermittelten Induktion von Autophagie in der Wirtszelle. Dadurch verhindert *S. aureus* die Reifung des Phagoendosoms und die anschließende phago-lysosomale Fusion, welche zur intrazellulären Eliminierung des Bakteriums führen würde. *S. aureus* geht stattdessen in Autophagosomen über und nutzt diese Umgebung zur Replikation. Auch dort verhindert *S. aureus* die Reifung der Autophagosomen zu Autolysosomen. Es gelingt *S. aureus* aus dem

Autophagosom in das Zytoplasma der Zelle zu flüchten, wo die Wirtszelle vermutlich die Kontrolle über das intrazelluläre Bakterium verliert und es zum autophagischen Zelltod kommt. Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu dem Schluss, dass allein *agr*-vermittelte Faktoren von *S. aureus* für die schnelle Induktion von Autophagie in der Zelle verantwortlich sind, welches Voraussetzung für die *S. aureus* Zytotoxizität ist.



**Abb. 30** Schematisches Modell zum intrazellulären Verhalten von *wt agr S. aureus* im Vergleich zu *agr*-defizienten *S. aureus*.

*S. aureus* infiltriert die Wirtszelle über den phagoendosomalen Weg in ein Rab7-positives Phagoendosom. Wt *S. aureus*, nicht aber die *agr*-defizienten *S. aureus* Mutanten, gehen in den Autophagieweg über und nutzen das LC3-positives Autophagosom zur Replikation. *S. aureus* verhindert die Fusion mit Lysosomen. Schließlich tritt *S. aureus* aus den Autophagosomen in das Zytoplasma über und induziert Wirtszelltod. Im Gegensatz dazu sind die *agr*-defizienten *S. aureus* Mutanten im phago-lysosomal Weg gefangen und werden von der Wirtszelle eliminiert.

## 5 Zusammenfassung

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ist weltweit eine der häufigsten Ursachen von ernstzunehmenden bakteriellen Infektionskrankheiten. *S. aureus* ist in der Lage verschiedene nicht-professionelle Phagozyten, wie Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, und Keratinozyten, zu infiltrieren und zu töten. Die Zytotoxizität von *S. aureus* wird mit der Pathogenese von invasiven und metastasierenden *S. aureus* Infektionen in Verbindung gebracht.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass *S. aureus* kurz nach der Aufnahme in HeLa-Zellen von Rab7-positiven Phagoendosomen in Autophagosomen übergeht. Die Autophagosomen sind morphologisch durch ihre Doppelmembran und die LC3-Kolokalisation charakterisiert. In aus der Maus stammenden atg5<sup>-/-</sup> embryonalen Fibroblasten kann sich *S. aureus* weder vermehren noch die Zellen töten. Die *S. aureus* enthaltenden Autophagosomen säuern nicht an und akquirieren auch kein LAMP-2. Dies deutet darauf hin, dass *S. aureus* die Reifung der Autophagosomen und damit verbundene phago-lysosomale Fusion blockiert. Die Bakterien nutzen das Autophagosom als Nische zum intrazellulären Überleben, zur Replikation und treten schließlich aus dem Autophagosom in das Zytoplasma der Wirtszelle über.

*S. aureus* induziert Wirtszelltod, welcher unabhängig von Caspasen verläuft. Der Zelltod vollzieht sich abhängig von dem autophagosomalen Protein ATG5 und weist morphologisch eine extreme Vakuolisierung auf. Dieser Mechanismus wird als Autophagie-Zelltod (Programmierter Zelltod Typ II) beschrieben.

*S. aureus* Stämme, welche defizient in dem globalen Virulenzregulator *agr* sind, gelangen nicht in Autophagosomen und werden von der Wirtszelle über den phagoendosomal Abbauweg eliminiert. Durch die Induktion von Autophagie mit Rapamycin kann die Fähigkeit zur intrazellulären Replikation in Autophagosomen, wie auch die Wirtszelle zu töten, in *agr*-defizienten *S. aureus* wieder hervorgerufen werden. *S. aureus agr*-abhängige Faktoren sind für den Übergang in Autophagosomen und den über Autophagie vermittelten Wirtszelltod verantwortlich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu dem Schluss, dass der Übergang von *S. aureus* in Autophagosomen essentiell für die intrazelluläre Replikation, den Übergang in das Zytoplasma und die damit verbundene Zytotoxizität ist.

## 6 Summary

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is a common bacterial etiology of serious infectious diseases. *S. aureus* can invade various types of non-professional phagocytes (e.g. fibroblasts, keratinocytes epithelial- and endothelial cells) to produce host cell death. *S. aureus* cytotoxicity is associated with the pathogenesis of invasive and metastatic infections.

In this thesis it is shown that shortly after invasion of Hela cells *S. aureus* transits from Rab7-positive endophagosomes to autophagosomes, which was characterized by double membranes and co-localization with LC3. *S. aureus* was not able to replicate and produce cell death in autophagy-deficient *atg5*<sup>-/-</sup> mouse embryonic fibroblasts. *S. aureus*-containing autophagosomes do not acidify nor do they acquire lysosome-associated membrane protein-2, indicating *S. aureus* inhibits autophagosome maturation and fusion with lysosomes. *S. aureus* uses the autophagosome to survive and to replicate intracellularly and eventually escapes from autophagosomes into the cytoplasm.

*S. aureus* induces a caspase-independent, but ATG5-dependent host cell death, which is accompanied by extreme vacuolization of the host cell cytoplasm. This cell death mechanism is described as autophagic cell death or programmed cell death type II.

*S. aureus* strains deficient for *agr*, a global regulator of *S. aureus* virulence, were not targeted by autophagy and did not produce host cell death. They were eliminated by the host cell. Autophagy induction by rapamycin restored both replication and cytotoxicity of *agr*-deficient *S. aureus* strains, indicating that an *agr*-regulated factor(s) is required for the transition of *S. aureus* in autophagosomes and for autophagy-mediated cytotoxicity. The results of this thesis suggest that induction of autophagy is essential for the transition into autophagosomes, for *S. aureus* replication, escape into the cytoplasm, and host cell killing.

## 7 Literatur

- 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.
- 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.
- Backert, S. and Meyer, T.F. (2006) Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, **9**, 207-217.
- Bantel, H., Sinha, B., Domschke, W., Peters, G., Schulze-Osthoff, K. and Janicke, R.U. (2001)  $\alpha$ -Toxin is a mediator of *Staphylococcus aureus*-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling. *J Cell Biol*, **155**, 637-648.
- Baran, J., Weglarczyk, K., Mysiak, M., Guzik, K., Ernst, M., Flad, H.D. and Pryjma, J. (2001) Fas (CD95)-Fas ligand interactions are responsible for monocyte apoptosis occurring as a result of phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, **69**, 1287-1297.
- 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.
- Beron, W., Gutierrez, M.G., Rabinovitch, M. and Colombo, M.I. (2002) *Coxiella burnetii* localizes in a Rab7-labeled compartment with autophagic characteristics. *Infect Immun*, **70**, 5816-5821.
- Beugnet, A., Tee, A.R., Taylor, P.M. and Proud, C.G. (2003) Regulation of targets of mTOR (mammalian target of rapamycin) signalling by intracellular amino acid availability. *Biochem J*, **372**, 555-566.
- Blevins, J.S., Elasri, M.O., Allmendinger, S.D., Beenken, K.E., Skinner, R.A., Thomas, J.R. and Smeltzer, M.S. (2003) Role of *sarA* in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infection. *Infect Immun*, **71**, 516-523.
- Bonifacio, J.S.e. (2000) *Current protocols in cell biology*.
- Brundage, R.A., Smith, G.A., Camilli, A., Theriot, J.A. and Portnoy, D.A. (1993) Expression and phosphorylation of the *Listeria monocytogenes* ActA protein in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 11890-11894.
- Chambers, H.F. (2001) The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*. *EID*, **7**, 178-182.
- Comerci, D.J., Martinez-Lorenzo, M.J., Sieira, R., Gorvel, J.P. and Ugalde, R.A. (2001) Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol*, **3**, 159-168.
- 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.
- Cossart, P. and Lecuit, M. (1998) Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *Embo J*, **17**, 3797-3806.
- Crossley, K.B. and Archer, G.L. (1997) *The staphylococci in human disease*, Churchill Livingstone Inc. New York.
- Delrue, R.M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J.P. and Letesson, J.J. (2001) Identification of

- Brucella spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol*, **3**, 487-497.
- Desjardins, M., Nzala, N.N., Corsini, R. and Rondeau, C. (1997) Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. *J Cell Sci*, **110 (Pt 18)**, 2303-2314.
- Diep, B.A., Gill, S.R., Chang, R.F., Phan, T.H., Chen, J.H., Davidson, M.G., Lin, F., Lin, J., Carleton, H.A., Mongodin, E.F., Sensabaugh, G.F. and Perdreau-Remington, F. (2006) Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **367**, 731-739.
- 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. (1990) Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol*, **110**, 1923-1933.
- 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.
- 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.
- Fink, S.L. and Cookson, B.T. (2005) Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*, **73**, 1907-1916.
- 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.
- Fratti, R.A., Chua, J., Vergne, I. and Deretic, V. (2003) Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5437-5442.
- 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.
- Gouin, E., Gantelet, H., Egile, C., Lasa, I., Ohayon, H., Villiers, V., Gounon, P., Sansonetti, P.J. and Cossart, P. (1999) A comparative study of the actin-based motilities of the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* and *Rickettsia conorii*. *J Cell Sci*, **112 (Pt 11)**, 1697-1708.
- 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.
- Haas, A. (2002) Wenn Fresszellen Verdauungsstörungen haben-ungewöhnliche Phagosomenbiogenese in Makrophagenn. *BIOspektrum*.
- Hacker, J. and Heesemann, J. (2000) *Molekulare Infektionsbiologie*, Heidelberg.
- Haslinger-Löffler, 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, B., Strangfeld, K., Peters, G., Schulze-Osthoff, K. and Sinha, B. (2003) Staphylococcus aureus alpha-toxin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cells: role of endogenous tumour necrosis factor-alpha and the mitochondrial death pathway. *Cell Microbiol*, **5**, 729-741.
- High, N., Mounier, J., Prevost, M.C. and Sansonetti, P.J. (1992) IpaB of Shigella flexneri causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. *Embo J*, **11**, 1991-1999.
- 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.
- Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C. and Hiramatsu, K. (2001) Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**, 1323-1336.
- Iwatsuki, K., Yamasaki, O., Morizane, S. and Oono, T. (2006) Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. *J Dermatol Sci*, **42**, 203-214.
- Joshi, A.D., Sturgill-Koszycki, S. and Swanson, M.S. (2001) Evidence that Dot-dependent and -independent factors isolate the Legionella pneumophila phagosome from the endocytic network in mouse macrophages. *Cell Microbiol*, **3**, 99-114.
- 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.
- Kass, E.H. and Parsonnet, J. (1987) On the pathogenesis of toxic shock syndrome. *Rev Infect Dis*, **9 Suppl 5**, S482-489.
- Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2001) Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep*, **2**, 330-335.
- King, M.D., Humphrey, B.J., Wang, Y.F., Kourbatova, E.V., Ray, S.M. and Blumberg, H.M. (2006) Emergence of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus USA 300 clone as the predominant cause of skin and soft-tissue infections. *Ann Intern Med*, **144**, 309-317.
- Kirkegaard, K., Taylor, M.P. and Jackson, W.T. (2004) Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat Rev Microbiol*, **2**, 301-314.

- Kloos, W.E. and Schleifer, K.H. (1975) Simplified scheme for routine identification of human Staphylococcus species. *J Clin Microbiol*, **1**, 82-88.
- Köhler, W., Eggers, H.J., Fleischer, B., Marre, R., Pfister, H. and Pulverer, G. (2001) *Medizinische Mikrobiologie*. 8. Auflage Urban und Fischer Verlag.
- Kong, K.F., Vuong, C. and Otto, M. (2006) Staphylococcus quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol*, **296**, 133-139.
- Kroemer, G. (1999) Mitochondrial control of apoptosis: an overview. *Biochem Soc Symp*, **66**, 1-15.
- Krut, O., Utermohlen, O., Schlossherr, X. and Krönke, M. (2003) Strain-specific association of cytotoxic activity and virulence of clinical Staphylococcus aureus isolates. *Infect Immun*, **71**, 2716-2723.
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhsa, T. and Mizushima, N. (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, **432**, 1032-1036.
- Levine, B. and Klionsky, D.J. (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, **6**, 463-477.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. and Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**, 479-489.
- 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.
- Luhrmann, A. and Haas, A. (2000) A method to purify bacteria-containing phagosomes from infected macrophages. *Methods Cell Sci*, **22**, 329-341.
- 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.
- Menzies, B.E. and Kourteva, I. (1998) Internalization of Staphylococcus aureus by endothelial cells induces apoptosis. *Infect Immun*, **66**, 5994-5998.
- Meresse, S., Steele-Mortimer, O., Moreno, E., Desjardins, M., Finlay, B. and Gorvel, J.P. (1999) Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death. *Nat Cell Biol*, **1**, E183-188.
- 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.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhsa, T., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2001) Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol*, **152**, 657-668.
- Morfeltdt, E., Janzon, L., Arvidson, S. and Lofdahl, S. (1988) Cloning of a chromosomal locus (exp) which regulates the expression of several exoprotein genes in Staphylococcus aureus. *Mol Gen Genet*, **211**, 435-440.
- Morfeltdt, E., Taylor, D., von Gabain, A. and Arvidson, S. (1995) Activation of alpha-toxin translation in Staphylococcus aureus by the trans-encoded antisense RNA, RNAlII. *Embo J*, **14**, 4569-4577.

- Naimi, T.S. (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.
- 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, M., Sussmuth, R., Vuong, C., Jung, G. and Gotz, F. (1999) Inhibition of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus* by the *Staphylococcus epidermidis* agr pheromone and derivatives. *FEBS Lett*, **450**, 257-262.
- 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.
- Peng, H.L., Novick, R.P., Kreiswirth, B., Kornblum, J. and Schlievert, P. (1988) Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **170**, 4365-4372.
- Petti, C.A. and Fowler, V.G., Jr. (2002) *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis. *Infect Dis Clin North Am*, **16**, 413-435, x-xi.
- Petti, C.A. and Fowler, V.G., Jr. (2003) *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis. *Cardiol Clin*, **21**, 219-233, vii.
- 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.
- Platt, A.T. (2001) MRSA in intensive care. *Nurs Stand*, **15**, 27-32.
- 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.
- Rich, K.A., Burkett, C. and Webster, P. (2003) Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy. *Cell Microbiol*, **5**, 455-468.

- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Kramer, P.H. and Peter, M.E. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J*, **17**, 1675-1687.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C.B. and Tsujimoto, Y. (2004) Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol*, **6**, 1221-1228.
- 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 invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *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.
- Stennicke, H.R., Ryan, C.A. and Salvesen, G.S. (2002) Reprieve from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends Biochem Sci*, **27**, 94-101.
- Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P.H., Chakraborty, P., Haddix, P.L., Collins, H.L., Fok, A.K., Allen, R.D., Gluck, S.L., Heuser, J. and Russell, D.G. (1994) Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*, **263**, 678-681.
- Sturgill-Koszycki, S. and Swanson, M.S. (2000) Legionella pneumophila replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J Exp Med*, **192**, 1261-1272.
- Tjelle, T.E., Lovdal, T. and Berg, T. (2000) Phagosome dynamics and function. *Bioessays*, **22**, 255-263.
- Tsukada, M. and Ohsumi, Y. (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Lett*, **333**, 169-174.
- Vergne, I., Fratti, R.A., Hill, P.J., Chua, J., Belisle, J. and Deretic, V. (2004) Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest: mycobacterial phosphatidylinositol analog phosphatidylinositol mannoside stimulates early endosomal fusion. *Mol Biol Cell*, **15**, 751-760.
- Vieira, O.V., Botelho, R.J. and Grinstein, S. (2002) Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J*, **366**, 689-704.
- 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.
- Witte, W. (2004) Community-acquired MRSA weltweit und in Deutschland. *Epid Bull*, **5**, 33-36.
- 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.
- Yarwood, J.M. and Schlievert, P.M. (2003) Quorum sensing in Staphylococcus infections. *J Clin Invest*, **112**, 1620-1625.
- Yorimitsu, T. and Klionsky, D.J. (2005) Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*, **12 Suppl 2**, 1542-1552.
- 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 Lebenslauf



ADRESSE	Brüsseler Platz 50672 Köln	GEBURTSDATUM	10.07.76
TELEFON	+49 (0)173 6119072	GEBURTSORT	Kirchheim/Teck
E-MAIL	<b>A.Schnaith@gmx.de</b>	NATIONALITÄT	deutsch
		FAMILIENSTAND	ledig

### AUSBILDUNG

03/2002-2007	<b>Universität zu Köln</b> Institut für med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene Promotion
12/2001	<b>Universität Hamburg</b> 3. Staatsexamen – Approbation als Apothekerin
05/2001 – 10/2001	<b>Sonnenhut-Apotheke, Hamburg</b> Pharmazeutisches Praktisches Jahr
11/2000 – 04/2001	<b>Beiersdorf AG, Hamburg</b> <b>Abteilung: Scientific &amp; Regulatory Affairs</b> Pharmazeutisches Praktisches Jahr
10/ 2000	<b>Universität Hamburg</b> 2. Staatsexamen
03/1999	<b>Universität Hamburg</b> 1. Staatsexamen
10/1996 – 09/1998	<b>J.-W.-Goethe-Universität, Frankfurt/Main</b> Beginn des Pharmaziestudiums
1993 – 1996	<b>Tellkampfschule Europagymnasium, Hannover</b> Abitur
1994	<b>Salt Lake City, Utah, USA</b> Schulaustausch
1989 – 1993	<b>Gymnasium Burgdorf</b>

### PUBLIKATIONEN

2004	Bernado K, Pakulat N, Fler S, Schnaith A, Utermöhlen O, Krut O, Muller D, Krönke M <b>Subinhibitory concentrations of linezolid reduce Staphylococcus aureus virulence factor expression.</b> Antimicrob Agents Chemother. (2004);48(2):546-444
2006	Schnaith A, Kashkar H, Leggio S, Addicks K, Krönke M, Krut O <b>Staphylococcus aureus subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death.</b> JBC (2006)

## 9 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 betreut worden.

Schnaith, A., Kashkar, H., Leggio, S., Addicks, K., Krönke, M. and Krut, O.  
**Staphylococcus aureus subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death.**

*J Biol Chem.* (2006)

## 10 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde wissenschaftlich von Prof. Dr. Martin Krönke und Dr. Oleg Krut betreut. Ich möchte mich ganz besonders bei beiden für die stetige Diskussionsbereitschaft, die kreativen Anregungen und die engagierte Unterstützung während der gesamten Promotionszeit bedanken.

Ich danke allen Kollegen des Instituts für med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene für die schöne Arbeitsatmosphäre. Im Besonderen möchte ich der Arbeitsgruppe Krut; Daniela Grumme, Eva Glowalla, Tina Tosetti und Sonja Leggio für die tägliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung danken. Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Hamid Kashkar für sein Interesse und Mitdenken an meiner Arbeit und bei seiner gesamten Apoptose-Gruppe für die Kooperation. Ebenfalls möchte ich mich bei Katja Krönke bedanken, die mir jeden Wunsch im Labor immer sofort erfüllt hat.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Tutoren des ZMMK, Prof. Dr. Karin Schnetz und Prof. Dr. Farnz-Georg Hanisch, bedanken. Prof. Dr. Angelika Noegel, Prof. Dr. Jonathan Howard, Prof. Dr. Jens Brüning und Prof. Dr. Mats Paulsson danke ich dafür, dass Sie sich für das Prüfungskollegium zur Verfügung gestellt haben. Frau Dr. Debora Grosskopf-Kroiher danke ich für ihr Engagement für den MD/PhD-Studiengang und ihre unbürokratische, flexible Art bei der Abwicklung des Promotionsverfahrens.

Zu allerletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich immer unterstützen und für mich da sind.

Danke, dass Ihr mir immer die Freiheit gegeben habt, mich beruflich so weiterentwickeln zu können, wie ich wollte.