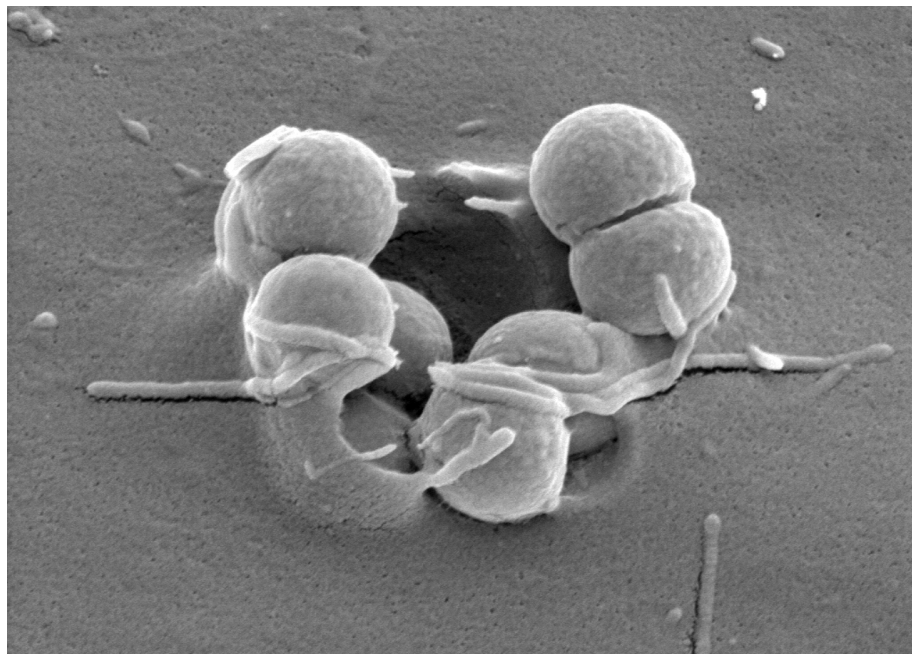


**Integrin-vermittelte Invasion von
Staphylococcus aureus in Säugerzellen**
Rezeptorvermittelte Internalisierung und Signaltransduktion



**F. Agerer
aus Landshut**

2005

Integrin-vermittelte Invasion von
***Staphylococcus aureus* in Säugerzellen**
Rezeptorvermittelte Internalisierung und Signaltransduktion

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften der Fakultät für Biologie
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Franziska Agerer
aus Landshut
2005

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: PD Dr. C.R. Hauck

Gutachter: Prof. Dr. J. Reidl

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation

**„Integrin-vermittelte Invasion von Staphylococcus aureus in Säugerzellen:
Rezeptor-vermittelte Internalisierung und Signaltransduktion“**

selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

.....
(Franziska Agerer)

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die ihren Beitrag geleistet haben zum Gelingen dieser Arbeit. Die Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit vom 15.9.2000 bis zum 15.11.2004 am Zentrum für molekulare Infektionsbiologie, Würzburg unter der Anleitung von PD Dr. C.R. Hauck durchgeführt. Im Besonderen

Herrn Prof. Dr. J. Hacker für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes,

Herrn PD Dr. C.R. Hauck für die gute Betreuung, seine kontinuierliche Unterstützung und seinen endlosen Ideenfundus bei methodischen oder inhaltlichen Schwierigkeiten,

Herrn Prof. Dr. J. Reidl für die Bereitschaft als Zweitgutachter dieser Arbeit zu fungieren,

Hilde Merkert und Arthur Altenhöfer für die stete Hilfsbereitschaft und Geduld bei Computerproblemen,

Dr. K. Ohlsen und Antje Michel für die immer gute Zusammenarbeit und die vielen guten Ratschläge in Staphylokokken-Fragen,

Julia Blass-Warmuth und Doris Deininger als gute Seelen im Labor, die immer ein offenes Ohr hatten, wenn es wieder mal turbulent wurde,

meinen Mitstreitern im Labor Markus Hupp, Jürgen Meier, Lisa Petersson, Petra Münzner-Voigt, Stefanie Waeckerle, Sigrid Lux, Stefan Pils, Florian Neske, Katrin Küspert, Jeeva Varadarajulu und Tim Schmitter für die lustige, meist mit schwarzem Humor erfüllte Atmosphäre, die das Laborleben in stressigen und schwierigen Situationen sehr erleichterte,

meinen Freunden Urs, Ilona, Nedde, Tim und Anne für ihre Hilfe und Freundschaft insbesondere in der Zeit nach der Operation,

meinen Eltern für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Staphylokokken	1
1.1.1	Pathogenitätsfaktoren von <i>S. aureus</i>	1
1.1.2	Extrazelluläre Matrix-Bindeproteine von <i>S. aureus</i>	3
1.1.3	<i>S. aureus</i> , ein intrazelluläres Bakterium?	6
1.2	Integrine	8
1.2.1	Integrin Familie und Struktur	8
1.2.2	Aktivierung und Deaktivierung von Integrinen (<i>inside-out/outside-in</i>)	9
1.2.3	Transmembranständige und zytoplasmatische Interaktionspartner (Organisation von fokalen Kontakten)	11
1.3	Integrin-vermittelte Signaltransduktion	14
1.3.1	FAK als zentrales Signaltransduktionsmolekül in Fokalen Adhäsionen	15
1.3.2	SFK/FAK Signaltransduktionsweg	17
1.4	Ziele der Arbeit	20
2	Entwicklung einer Immunfluoreszenzfärbemethode	21
2.1	Einleitung	21
2.2	Ergebnisse	24
2.2.1	Doppelzyklische Antikörper-basierende Färbemethode zur Detekti- on von intrazellulären <i>N. gonorrhoeae</i>	24
2.2.2	Nachweis von intrazellulären Bakterien mittels FBA Färbemethode	26
2.2.3	Aktindynamik und die Kinasen der Src Familie sind essentiell für die CEACAM3-vermittelte Aufnahme von Opa-exprimierenden <i>N. gonorrhoeae</i>	27
2.2.4	FBA Färbemethode zur Ermittlung des invasiven Potentials kom- mensaler <i>Neisserien</i>	28
2.2.5	FBA-Färbung von Gram-positiven <i>S. aureus</i>	29
2.3	Diskussion	31

3 Die Rolle der Src-Kinasen für die Invasion von <i>S. aureus</i>	34
3.1 Einleitung	34
3.2 Ergebnisse	35
3.2.1 <i>S. aureus</i> dringt in humane Zellen ein	35
3.2.2 Die Invasion von <i>S. aureus</i> Cowan wird durch das Kontaktieren von FnBP an zelluläre Integrine vermittelt	37
3.2.3 Das Wirtszell-Aktinzytoskelett ist für die Aufnahme von <i>S. aureus</i> verantwortlich	40
3.2.4 Invasion von <i>S. aureus</i> Cowan benötigt die Aktivität von Protein-Tyrosin Kinasen des Wirtes	41
3.2.5 Die Aktivität der Src Kinase ist essentiell für die Integrin-vermittelte Aufnahme von <i>S. aureus</i>	43
3.2.6 Src-defiziente Zellen sind resistent gegenüber der Invasion von <i>S. aureus</i>	46
3.2.7 Die Aktivität der Src Kinase wird nach einer Infektion mit <i>S. aureus</i> gesteigert	49
3.3 Diskussion	51
4 Funktionelle Verbindung zwischen FAK und Cortactin	54
4.1 Einleitung	54
4.2 Ergebnisse	56
4.2.1 Aktindynamik während Integrin vermittelter Aufnahme von <i>S. aureus</i>	56
4.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> rekrutiert Fokale Adhäsions Proteine zum Ort der Aufnahme	58
4.2.3 Aktivität von FAK ist für die Integrin-vermittelte Internalisierung von <i>S. aureus</i> wichtig.	61
4.2.4 Der Ort der Aufnahme von <i>S. aureus</i> ist mit phosphotyrosinhaltigen Proteinen und Cortactin angereichert	69
4.2.5 Die Beeinträchtigung der Cortactin Funktion blockiert die Invasion von <i>S. aureus</i>	73

4.2.6	Tyrosinphosphorylierung von Cortactin aufgrund Integrinaktivierung ist von FAK und Src PTKen abhängig	76
4.3	Diskussion	79
5	Schlussbetrachtung	84
6	Material	88
6.1	Bakterien	88
6.1.1	Neisseria - Stämme	88
6.1.2	<i>Escherichia coli</i> - Stämme	88
6.1.3	Staphylokokken - Stämme	88
6.2	Zelllinien	89
6.3	Nährmedien für Bakterien und Zellkultur	89
6.3.1	Medien und Platten für Bakterien	89
6.3.2	Medien für Zellkultur	90
6.4	Antikörper, Enzyme und Proteine	91
6.4.1	Antikörper	91
6.4.2	Enzyme und Proteine	92
6.5	Plasmide und Oligonukleotide	94
6.5.1	Plasmide	94
6.5.2	Oligonukleotide	94
6.6	Lösungen und Puffer	94
6.6.1	Lösungen und Puffer für eukaryotische Zellen	94
6.6.2	Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie	95
6.6.3	Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot	96
6.7	Chemikalien und Kits	97
6.8	Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	97
7	METHODEN	98
7.1	Kultur von Bakterien	98
7.2	Kultur von Zelllinien	98

7.2.1	Zelllinien	98
7.2.2	Auftauen und Einfrieren von Zellen	99
7.2.3	Bestimmung der Zellzahl	99
7.2.4	Transfektion von eukaryotischen Zellen mittels der Calcium-Phosphat-Kopräzipitationsmethode	99
7.3	Arbeiten mit DNA: Klonierung und Expression von rekombinanten DNA-Konstrukten	100
7.3.1	Polymerase-Kettenreaktion	100
7.3.2	Analytische und präparative Gelelektrophorese	101
7.3.3	In-Fusion PCR Klonierungsmethode	101
7.3.4	Cre-lox site spezifische Rekombination	103
7.3.5	Plasmidisolierung durch Minipräparation	104
7.3.6	Restriktionsverdau von Klonierungsprodukten	104
7.3.7	Sequenzierung	105
7.3.8	Herstellung kompetenter Bakterien	105
7.3.9	Transformation von Bakterien mittels Temperaturschock	106
7.4	Infektionsexperimente	106
7.4.1	Antibiotika-Protektions-Assay	106
7.4.2	Infektion von Zellen für die Analyse durch konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	106
7.4.3	Replating-Assay	107
7.5	Immunfluoreszenzfärbungen und Elektronenmikroskopie	107
7.5.1	Kovalente Farb-Markierung von Bakterien und Doppelimmunfluoreszenzfärbung von eukaryotischen Proteinen nach dem 1-Zyklus Protokoll	107
7.5.2	Differentielle Immunfluoreszenzfärbung von intra- und extrazellulären Bakterien und Markierung eines eukaryotischen Proteins nach dem Doppelzyklus Protokoll	108

7.5.3	FBA-Markierung von Bakterien zur differentiellen Färbung von intra- und extrazellulären Bakterien sowie Markierung eines eukaryotischen Proteins	109
7.5.4	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	109
7.5.5	Fixierung von Präparaten für Raster-Elektronenmikroskopie	110
7.6	Arbeiten mit Proteinen	110
7.6.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Coomassie-Färbung von Proteingelen	110
7.6.2	Western-Blot: Nass-Transfer und Semidry-Verfahren	111
7.6.3	Herstellung von Ganzzell-Lysaten und Nachweis der zellulären Proteinmengen	112
7.6.4	Immunpräzipitation	112
7.6.5	Src in Vitro Kinaseassay	113
8	Zusammenfassung	114
9	Summary	116
10	Literaturverzeichnis	118
11	Anhang	141
11.1	Abkürzungen	141
11.2	Publikationen	143
11.3	Tagungsbeiträge	143
11.4	Lebenslauf	144

1 Einleitung

1.1 Staphylokokken

Staphylokokken sind grampositive, unbewegliche und sporenlose Bakterien. Bei bis zu zwei Dritteln der gesunden Bevölkerung zählt *Staphylococcus aureus* zur normalen gesunden Haut- und Schleimhautflora. *S. aureus* unterscheidet sich von den anderen derzeit 33 Staphylokokkenarten durch seine gelbfarbene Pigmentierung der Kolonien und kann durch positive Tests auf Coagulase und Mannitolvermentierung diagnostiziert werden (Wilkinson and Holmes, 1979).

S. aureus ist die Ursache für ein breites Spektrum an Krankheiten, von harmlosen Wundinfektionen, lokalen Furunkeln und Abszessen bis hin zu lebensbedrohlichen Infektionen wie Endocarditis, Osteomyelitis, Sepsis oder dem „*toxic shock syndrome*“ (Lowy, 1998). *S. aureus* bleibt trotz einer ganzen Reihe sehr wirksamer Medikamente einer der wichtigsten und vielseitigsten Erreger in der klinischen Medizin (Lowy, 1998). Dies resultiert einerseits aus seiner extremen Anpassungsfähigkeit an veränderte Umweltbedingungen (z.B. Bildung von *small-colony-variants* (SCV) (Vesga et al., 1996, Brouillette et al., 2004) und seiner großen pathogenetischen Vielseitigkeit (genauer in Kapitel 1.1.1), andererseits aus dem momentan immer größer werdenden Problem der Entwicklung von Resistenzmechanismen gegen bisher wirksame Antibiotika. Das Problem der Bildung von Multiresistenzen gegen Antibiotika stellt insbesondere im Krankenhaus für immunsupprimierte Patienten eine große Gefahr dar.

1.1.1 Pathogenitätsfaktoren von *S. aureus*

Die pathogenetische Vielseitigkeit von *S. aureus* kommt durch eine große Anzahl von Virulenzfaktoren zum Ausdruck. Diese Faktoren dienen dem Pathogenen zum Eindringen ins Gewebe, der Aufrechterhaltung der Infektion sowie der Abwehr von Immunmechanismen.

Viele Staphylokokken exprimieren eine Reihe von Oberflächenproteinen, die ein erstes Anheften an und später die Kolonisation von Wirtsgeweben ermöglichen (genauer in Kapitel 1.1.2). Die Ausbildung einer Mikro-Kapsel und die Expressierung des zellwandgebundenen Proteins A verhindert weitgehend die Phagozytose durch Wirtszellen (Lee,

1996). Protein A ist in der Lage den Fc-Teil von IgG zu binden. Dadurch wird die Phagozytose dieser antikörperbeladenen Staphylokokken über den Fc-Rezeptor professioneller Phagozyten behindert.

Eine weitere wichtige Rolle spielen Toxine. *S. aureus* ist in der Lage, hochpotente Toxine zu produzieren. Darunter zählt man Enterotoxine, die für Lebensmittelvergiftungen verantwortlich sind (Harris et al., 1993). Das bekannte „*toxic shock syndrome toxin1*“ ist den Enterotoxinen strukturell sehr ähnlich und wird in 20 % der *S. aureus*-Isolate gebildet. Dieses Toxin gilt als Superantigen und führt zu toxischen Schockzuständen, die durch hohes Fieber, Blutungen und Multiorganversagen gekennzeichnet sind (Marrack and Kappler, 1990, Bohach et al., 1990).

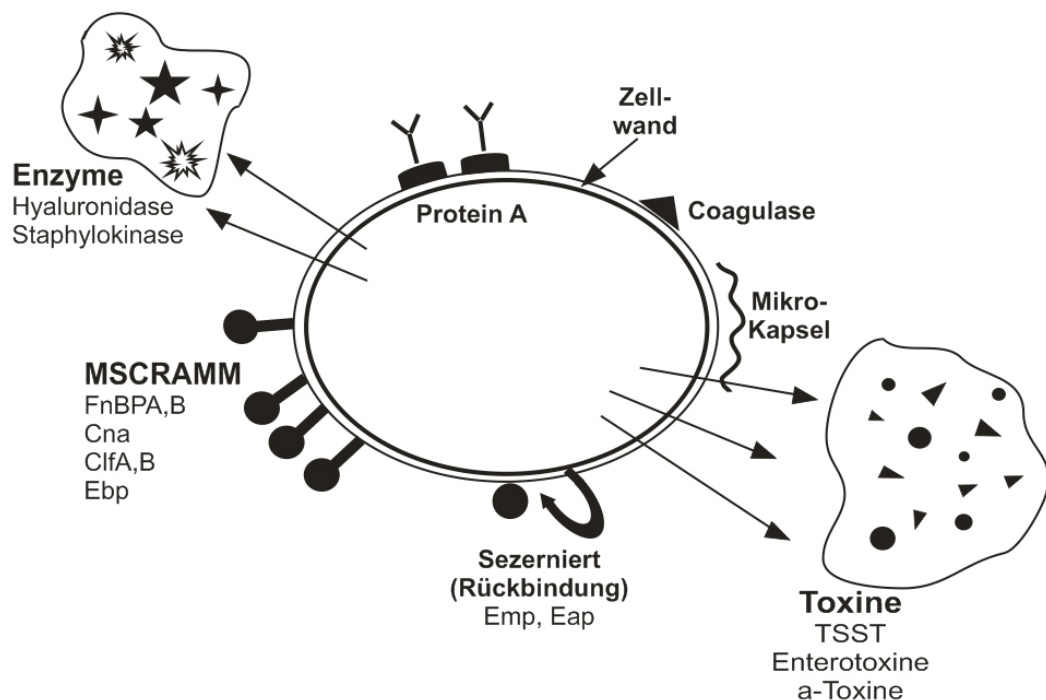


Abb. 1.1: Virulenzfaktoren von *S. aureus*. Die Abbildung zeigt eine Aufstellung der meisten Pathogenitätsfaktoren, die für den Krankheitsverlauf eine Rolle spielen. Die Bildung vieler dieser Proteine ist von der akuten Wachstumsphase des Pathogenen abhängig und wird unter anderem durch das Regulationsgen *agr* kontrolliert.

Cytotoxine wie das alpha-Toxin sind für Porenbildung und für proinflammatorische Veränderungen in Säugerzellen verantwortlich. Diese kontinuierliche Zerstörung der Zellen geht einher mit dem Syndrom der Sepsis (Bhakdi and Tranum-Jensen, 1991). Epidermiolytische Toxine A und B sind für die Krankheit des „scalded skin syndrome“ verantwortlich, indem sie innerhalb der Epidermis lebende von toten Schichten trennen (Iandolo, 1989).

Leukocidin ist ein leukocytolytisches Toxin, das eine bakterielle Ausbreitung im Gewebe zulässt. Dieses Toxin ist ein wichtiger Faktor bei nekrotisierenden Hautinfektionen (Cribier et al., 1992).

Zur Zerstörung von Geweben produzieren Staphylokokken zusätzlich eine Reihe von verschiedenen Enzymen wie Proteasen, Lipasen und Hyaluronidasen. Bei der Ausbildung von Abszessen spielen die Coagulase und die Staphylokinase eine besondere Rolle. Die Coagulase bindet Prothrombin und bildet einen Komplex mit dem Namen Staphylothrombin. Die Aktivierung von Thrombin führt zur Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin, so dass die Bakterien sich so in einem schützenden Fibrinmantel ungestört vermehren können (Dickinson et al., 1995, Moreillon et al., 1995). Die Auflösung der fibrinen Schutzschicht wird von der Staphylokinase bewerkstelligt. Die Bildung eines Komplexes aus Staphylokinase und Plasminogen führt zur Aktivierung der proteolytischen Enzymaktivität, was die Auflösung der Fibrinbündel zur Folge hat. Damit ist die Weiterverbreitung des Erregers wieder gesichert (Jin et al., 2004, Collen and Lijnen, 1994).

1.1.2 Extrazelluläre Matrix-Bindeproteine von *S. aureus*

Lange Zeit wurde *S. aureus* als ein ausschließlich extrazellulärer Erreger angesehen. Dies gilt vor allem bei durch Fremdkörper (Katheter, Implantate) hervorgerufenen Infektionen und der damit einhergehenden Besiedelung von fast allen Wirtsgeweben. *S. aureus* besitzt allerdings nicht nur die Fähigkeit zu kolonisieren, sondern auch zu invadieren. Die erfolgreiche Invasion von *S. aureus* erfordert als ersten Schritt die Adhäsion an Wirtsstrukturen wie Matrix- und Plasmaproteine. Die Adhärenz an Proteine wie Fibronectin, Kollagen oder Vitronectin wird durch eine Reihe spezifischer bakterieller Oberflächenproteine vermittelt (Patti et al., 1994, Foster and Hook, 1998). Diese Adhäsine kann man in zwei große Gruppen einteilen: die sekretorischen Proteine und die kovalent zellwandgebundenen Proteine (MSCRAMMs, *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*).

Sekretorische Adhäsine sind dadurch gekennzeichnet, dass sie nach der Sekretion nicht-kovalent an die Zellwand binden und mit einer breiten Bindungsspezifität mit verschiedenen Matrixproteinen (z.B. Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin, Kollagene) interagieren können. Dazu gehören die Proteine Eap (*extracellular adherence protein*) (Hussain et al., 2001a), (Hagggar et al., 2003)) und Emp (*extracellular matrix protein-binding protein*) (Hussain et al., 2001b)). Eap ist in der Lage Oligomere zu bilden und zurück ans Bakterium zu binden. Durch diese duale Affinität gegenüber ECM Proteinen und dem Bakterium

wird die bakterielle Adhärenz verstärkt (Palma et al., 1999). Zudem besitzt Eap eine immunmodulatorische Funktion. Eap verringert die Rekrutierung von Leukozyten in einem murinen Peritonitis-Infektionsmodell. Die verminderte Adhäsion und Transmigration von Leukozyten resultiert aus der gestörten Interaktion von β_2 -Integrinen und ICAM-1 (Chavakis et al., 2002).

Viele MSCRAMMs sind durch eine LPXTG Aminosäuresequenz, welche durch das Enzym Sortase gespalten wird, kovalent an das Peptidoglykan der Zellwand gebunden (Navarre and Schneewind, 1994, Schneewind et al., 1995, Mazmanian et al., 1999). Hierzu zählen unter anderem *Staphylococcal protein A* (SpA), *fibronectin-binding proteins* (FnBPs), *collagen adhesin* (Cna), Fibrinogen-bindende Proteine (*clumping factors* (ClfA, B)) sowie weitere in Tabelle (Tab. 1.1) aufgeführte Adhäsine. MSCRAMMs gelten als sehr spezifisch gegenüber ihren Wirtsproteinen, jedoch sind inzwischen auch mehrere Liganden für einzelne Proteine beschrieben worden, wie Fibrinogen und Fibronectin für FnBPA (Wann et al., 2000) oder den von-Willebrand-Faktor und den Fc-IgG für Protein A (Hartleib et al., 2000).

MSCRAMM	Wirtspartner
Fibronectin binding protein A (FnBPA)	Fibronectin, Fibrinogen
Fibronectin binding protein B (FnBPB)	Fibronectin
Collagen binding protein (Cna)	Kollagen
Clumping factor A (ClfA)	Fibrinogen
Clumping factor B (ClfB)	Fibrinogen
Vitronectin binding protein (VnBP)	Vitronectin
Laminin binding protein (LnBP)	Laminin
Trombospondin binding protein (TsBP)	Thrombospondin
Elastin binding protein (Ebp)	Elastin
Protein A	IgG, von-Willebrand-Faktor
Plasmin binding protein (PIBP)	Plasmin
Bone sialoprotein binding protein (BsBP)	Knochen Sialoprotein

Tab.1.1: Auflistung einer Auswahl an MSCRAMMs mit ihren zugehörigen Wirtsproteinen. Diese bakteriellen Proteine binden mit hoher Spezifität an Matrix- und Plasmaproteine. Alle Isolate von *Staphylococcus aureus* besitzen MSCRAMMs, die mit Fibrinogen und Fibronectin interagieren können, und die meisten Isolate exprimieren Kollagen-bindende Proteine (Ryding et al., 1997).

Am N-Terminus der FnBPs befindet sich die A-Region, die die Signalsequenz für den Transport über die zytoplasmatische Membran enthält. Der C-Terminus hingegen besteht aus einer hydrophoben Membran-durchspannenden Region und dem LPXTG-Motiv, das für die Bindung an Peptidoglykan eine große Rolle spielt. Die fibronektinbindende D-Region besteht, allerdings nicht an einem Stück, aus fünf Teilen (D1, D2, D3, D4, DU). Jede D-Untereinheit kann spezifisch an Fibronektin binden. Später wurde noch eine weitere fibronektinbindende Region gefunden, die B-Region (Schwarz-Linek et al., 2003, Massey et al., 2001).

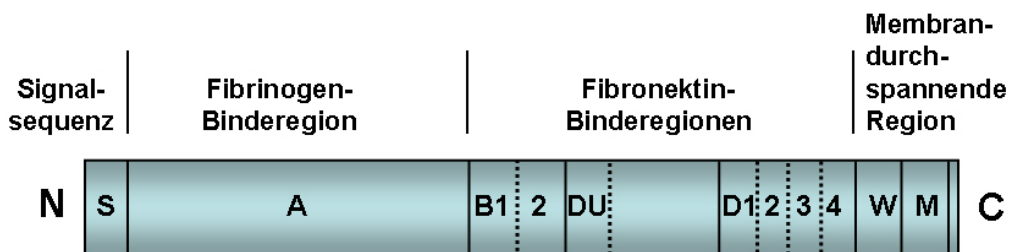


Abb. 1.2: Schematische Darstellung von FnBP-A von *S. aureus*. S, Signalsequenz; A, Fibrinogen-Binderegion; B1, B2, Fibronektin-Binderegion; DU, D1, D2, D3, D4, Fibronektin-Binderegionen; W, *wall-spanning region*; M, Membran durchspannende Region.

Die FnBPA und FnBPB spielen für die Internalisierung von *S. aureus* eine besondere Rolle. Die erwähnten D- und B-Domänen von FnBPA und B binden an die N-terminale Heparin-Bindungsstelle eines Fibronektin-Monomers. FnBP-defiziente Mutanten konnten in nur sehr reduziertem Maße in die Wirtszellen aufgenommen werden. Antikörper gegen Fibronektin zeigten ebenfalls eine reduzierende Wirkung auf die Aufnahme der Pathogenen. Diese und weitere hier nicht beschriebene Experimente zeigen, dass die intrazelluläre Invasion von *S. aureus* von den fibronektinbindenden Proteinen und von Fibronektin abhängig ist (Sinha et al., 1999, Agerer et al., 2003). Eine mehr zentral gelegene Sequenz des Fibronektinmonomers, die Aminosäuresequenz RGD (Arginin-Glycin-Aspartat), dient als Integrin-Bindungsstelle, die den Kontakt zur Wirtszelle herzustellen vermag. Fibronektin dient hierbei als Brückenmolekül, das die Adhärenz vom Bakterium an Integrine vermittelt (Fowler et al., 2000). Mit nur wenigen Ausnahmen geht die Invasivität von *S. aureus* mit der Bindung sowohl von löslichem als auch von immobilisiertem Fibronektin einher (Sinha et al., 1999). Eap kann bei dem Verlust von FnBPen einen teilweise kompensatorischen Effekt bewirken (Haggart et al., 2003). Interessanterweise können auch

andere grampositive Bakterien an Eap binden, so dass *S. aureus* bei einer Mischinfektion eventuell das Fundament für die Adhärenz Eap-negativer Mikroorganismen legen könnte.

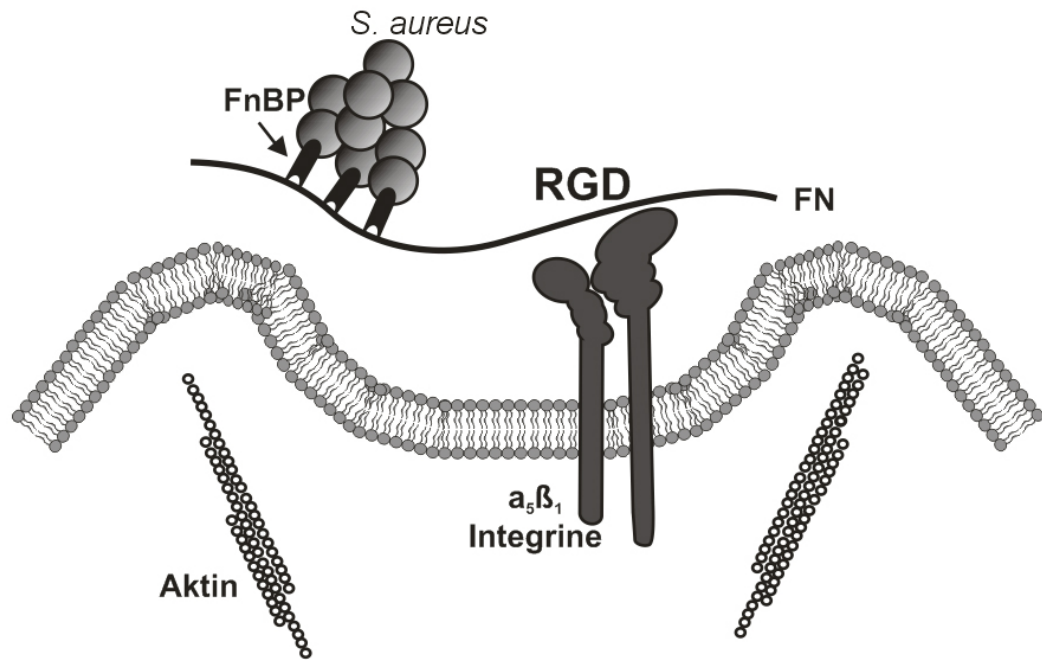


Abb.1.3: Invasionsmechanismus von *S. aureus*. Fibronektin (FN) spielt für den Internalisierungsprozess von *S. aureus* eine große Rolle. Es dient als Brückenmolekül, das das Bakterium mit den Integrinen des Wirts verbindet. Die daraus resultierende Aktivierung der Integrine führt zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts und im Endeffekt zur Aufnahme des Mikroorganismus.

1.1.3 *S. aureus*, ein intrazelluläres Bakterium?

Staphylococcus aureus wurde lange Zeit als ein klassischer extrazellulärer, pathogener Mikroorganismus angesehen (Finlay and Cossart, 1997). Jedoch sprechen einige Merkmale der von Staphylokokken hervorgerufenen Krankheitsbildern dafür, dass *S. aureus* die Fähigkeit besitzt, intrazellulär leben zu können. Dazu zählt die Eigenschaft, endovasculäre Infektionen hervorrufen zu können, die zu systemischen, metastasierenden Infektionen führen, sowie die hohe Frequenz der nicht ansprechenden, antimikrobiellen Therapien (Lowy, 1998, Lowy, 2000). Ein allgemein bekannter Mechanismus, der Abwehr der Wirtszellen zu entkommen, ist, von diesen aufgenommen zu werden. Einige weitere grampositive Bakterien wie *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* und *Enterococcus faecalis* umgehen das Immunsystem des Wirts durch Internalisierung in Wirtszellen (Isberg and Leong, 1990, Jadoun et al., 1998, Sartingen et al., 2000, Wells et al., 2000). Die Fähigkeit

von *S. aureus* in Wirtszellen einzudringen würde eine Erklärung für die hohe Rate an Gewebemetastasen und chronischer Persistenz nach einer Bakteriämie liefern.

In vitro-Studien zeigten, dass *S. aureus* von verschiedenen, nicht-professionell phagozytierenden Zellen wie Endothelzellen (Yao et al., 1995, Menzies and Kourteva, 1998), Epithelzellen (Bayles et al., 1998, Kahl et al., 2000), Fibroblasten (Fowler et al., 2000, Agerer et al., 2003), Osteoblasten (Hudson et al., 1995, Jevon et al., 1999) sowie alveolaren Zellen und Makrophagen aus Kuhmilch (Hebert et al., 2000) aufgenommen wird.

Über den genauen Aufnahmemechanismus ist man sich noch nicht ganz im Klaren. Befunde legen nahe, dass nach Stimulierung der Aktinpolymerisierung der Wirtszelle adhärente Staphylokokken in eine membranumschlossene Vakuole (Phagosom) aufgenommen und in die Zelle transportiert werden (Lowy, 1998). Andere Arbeiten deuten darauf hin, dass *S. aureus* das Phagosom verlassen und frei im Cytosol Apoptose induzieren kann (Bayles et al., 1998, Wesson et al., 1998, Gresham et al., 2000). Es ist ebenfalls noch nicht geklärt, inwiefern der von *S. aureus*-induzierte Zelltod (Bayles et al., 1998, Wesson et al., 1998, Menzies and Kourteva, 1998) eine Folge der Invasion oder der Produktion von Toxinen ist. Allgemeiner formuliert, stellt sich die Frage, ob die Fibronectin-abhängige Internalisierung von *S. aureus* ein pathogener Mechanismus oder eher ein Mechanismus der wirtseigenen Abwehr ist.

Um diese Fragen eindeutig klären zu können, sollte sich der Blick von reinen *in vitro*-Studien auf die unabdingbaren *in vivo*-Versuche richten. Kürzlich wurde die Rolle der FnBPe für die Pathogenese der Pneumonie in einem Rattenmodell untersucht. Die Gruppe konnte zeigen, dass die Überlebensfähigkeit der Bakterien im Lungengewebe und die damit verbundene Schädigung des Lungengewebes bei Ratten, die mit einer FnBP-Doppelmutante infiziert waren, im Vergleich zum Wildtyp stark erhöht wurde (McElroy et al., 2002). Die daraus hervorgehende Spekulation, dass FnBPs die Funktion von Neutrophilen und alveolaren Makrophagen aktivieren können, konnte durch eine weitere Veröffentlichung unterstützt werden (Heyer et al., 2002). Diese Gruppe konnte zeigen, dass eine fibronectinbindende Mutante von *S. aureus* nicht fähig war, die Expression eines *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* in Epithelzellen zu aktivieren. Bei der Verwendung von FnBP-defizienten *S. aureus*-Stämmen ist allerdings zu beachten, dass FnBPe nicht nur die Invasion in Wirtszellen vermitteln, sondern ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Adhäsion an Proteine der extrazellulären Matrix spielen (Foster and Hook, 1998). Ebenso können verschiedenste funktionell redundante Faktoren die Funktion der mutierten Proteine komplementieren. So ist es auch nicht weiter verwunderlich, dass es bei der Verwendung von FnBP-defizienten Stämmen bei *in vivo*-Experimenten

zu gegensätzlichen Ergebnissen kommt (Kuypers and Proctor, 1989, Flock et al., 1996). Um diesem Problem entgegen zu wirken, setzte eine Gruppe einen nur schwach pathogenen Stamm *Lactococcus lactis*, der FnBPA von *S. aureus* exprimierte, in einem experimentellen Endokarditis-Modell ein. Der rekombinante Stamm zeigte sich gegenüber dem Wildtypstamm als stark virulent (Que et al., 2001). Eine Verabreichung von rekombinanten Fn-Bindungsdomänen von FnBPA blockierte die Invasion von *S. aureus in vitro* und inhibierte die Abszessbildung bei einer Wundinfektion von Meerschweinchen *in vivo* (Menzies et al., 2002). Kürzlich konnte *in vivo* gezeigt werden, dass *S. aureus* trotz Eliminierung von FnBP in einem Mastitis-Maus-Modell intrazelluläre Infektionen hervorrufen kann, wenn auch in stark vermindertem Maße. Dies zeigt deutlich, dass FnBPs für die bakterielle Invasion in Epithelzellen von Säugern nicht absolut notwendig sind. Die stark verringerte Aufnahme der Mutante bestätigt allerdings die Bedeutung dieses Proteins für den Infektionsprozess (Brouillette et al., 2003). Weiterhin konnte bislang die Internalisierung von *S. aureus in vivo* bei embryonalen Hühnerosteoblasten (Reilly et al., 2000) und in Marophagen und alveolaren Zellen in der Kuhmilch (Hebert et al., 2000) nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse geben wenig klare Antworten, werfen dafür viele noch ungelöste Fragen über den genauen Mechanismus, die Bedeutung für spezifische Behandlungsmethoden und die klinische Relevanz von *Staphylococcus aureus* als intrazelluläres, pathogenes Bakterium.

1.2 Integrine

1.2.1 Integrin Familie und Struktur

Integrine sind eine Familie von glykosylierten, heterodimeren, transmembranen Adhäsionsmolekülen, die Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) binden oder membrangebundene Rezeptoren auf anderen Zellen erkennen können. Funktionelle Integrine bestehen aus jeweils einer nicht-kovalent gebundenen α - und β -Untereinheit, die beide eine große extrazelluläre sowie, mit Ausnahme von β_4 , eine kurze zytoplasmatische Domäne besitzen (Hynes, 2002). Integrine gelten in der Evolution als hoch konserviert und finden sich bereits bei niederen Metazoen, wie bei Schwämmen und Weichtieren (Burke, 1999, Hynes and Zhao, 2000). Bei Säugetieren gibt es 18 α und 8 β Untereinheiten, die durch unterschiedliche Kombination bis zu 24 verschiedene Integrine bilden können. Alternatives Splicing der mRNA von extrazellulären und zytoplasmatischen Domänen führt zu einer zusätzlichen Komplexität der Integrinfamilie (de Melker and Sonnenberg, 1999). Die Variation der Untereinheiten legt die Liganden-Spezifität der Integrine fest, da die

Ligandenbindungsstelle der Integrine innerhalb der Kopfdomäne liegt, welche gemeinsam von den α - und β -Untereinheiten gebildet wird. Die Affinität der Integrine gegenüber ihren Liganden kann allerdings, abhängig vom Zelltyp, variieren (Diamond and Springer, 1994, Hughes and Pfaff, 1998, Dedhar, 1999). Die Bindungsspezifitäten einiger Integrine gelten denselben Liganden, so dass die Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Collagen und Laminin jeweils durch mehrere Integrine erkannt werden. Trotz dieser Tatsache führt der Verlust von fast allen Integrin-Untereinheiten in *knockout*-Mäusen zu ernstzunehmenden biologischen Defekten. Die spezifischen Auswirkungen des Genverlustes variieren sehr und gehen in einigen Fällen bis zur Letalität im Embryonalstadium (Hynes and Wagner, 1996, Brakebusch et al., 1997, Darribere et al., 2000).

Die extrazelluläre Matrix ist ein komplexes Netzwerk aus Proteinen wie Laminin, Collagen oder Fibronectin und Polysacchariden, das von den Zellen selbst sekretiert und organisiert wird (Timpl, 1996). Einige Komponenten der ECM (Fibronectin und Vitronectin) besitzen ein RGD (Arg-Gly-Asp) Peptid, das von Integrinen mit den Untereinheiten α_4 , α_5 , α_8 , α_{IIb} oder α_V erkannt wird. Weitere ECM-Komponenten wie Laminin und Collagen werden durch Integrine mit α_{3-} , α_{6-} oder α_{7-} Untereinheiten (Laminin) oder Integrine mit α_{1-} , α_{2-} , α_{10-} oder α_{11-} Untereinheiten (Collagen) gebunden (van der Flier and Sonnenberg, 2001). Der Name „Integrine“ geht auf ihre Funktion der Verbindung (Integration) von extrazellulärer Matrix mit dem intrazellulären Zytoskeletts zurück (Hynes, 1987). Daher ist es nicht weiter verwunderlich, dass Integrinaktivierung, Integrin-abhängige Signaltransduktion und die Assoziation mit dem Zytoskelett so eng miteinander verknüpft sind.

1.2.2 Aktivierung und Deaktivierung von Integrinen (*inside-out/outside-in*)

Eine kontrollierte Integrinaktivierung ist für eine große Bandbreite von Entwicklungsprozessen von Bedeutung. Dazu zählen die Kontrolle der Zelladhäsion, die Zellmigration und die Organisation der extrazellulären Matrix (Palecek et al., 1997, Wu et al., 1995). Eine deregulierte Integrinaktivierung kann zu Schädigungen bei der Embryonalentwicklung (Martin-Bermudo et al., 1998) sowie der Immunantwort (McDowall et al., 2003) führen.

Integrine können ihre Konformation aufgrund einer Bindung an ECM ändern. Ihre zytoplasmatischen Domänen interagieren daraufhin über *linker*-Moleküle mit dem Aktinzytoskelett sowie mit weiteren Signalproteinen (*outside-inside-signalling*). Integrine kommen allerdings ebenso in einem inaktiven oder nur teilweise aktiven Zustand vor und können so auf intrazelluläre Signale mit einer Konformationsänderung reagieren, die sie

in einen voll aktiven Zustand versetzt (*inside-outside-signalling*) (Ginsberg et al., 1992). Diese Mechanismen garantieren eine perfekte Anpassung an die jeweilige Situation. Sowohl extrazelluläre Liganden als auch intrazelluläre Aktivatoren (Talin, Calpain) können den Aktivierungszustand von inaktiv zu aktiv verändern und so durch eine transmembrane Verbindung einen beidseits gerichteten Kontakt von mechanischer Kraft zu biochemischen Signalen über die Plasmamembran hinweg aufrecht erhalten. Diese allosterischen Veränderungen aufgrund bidirektionaler Signaltransduktion durch Integrine sind aufgrund neuer Strukturdaten detailliert beschrieben (Liddington and Ginsberg, 2002, Shimaoka et al., 2002, Hynes, 2002, Xiong et al., 2003, Humphries et al., 2003).

Bei der Aktivierung durch intrazelluläre Proteine konnte Talin als ein Hauptfaktor identifiziert werden. Talin ist ein Aktin-bindendes Protein, das allerdings auch mit Integrinen interagieren kann und dadurch eine wichtige Rolle bei der Integrinaktivierung spielt (Tadokoro et al., 2003). Im N-terminalen Bereich von Talin liegt eine FERM-Domäne (*four-point-one*, Ezrin, Radixin, Moesin Homologie) und erlaubt dadurch eine Bindung an das NPXY-Motiv der zytoplasmatischen β -Untereinheit der Integrine. Diese Bindung verhindert die inhibitorische Interaktion der $\alpha - \beta$ -Untereinheiten (Schlessinger and Lemmon, 2003, Garcia-Alvarez et al., 2003, Calderwood, 2004b). Zur Regulation der Talinbindung gibt es verschiedene Mechanismen, wie die Proteolyse von Talin (Yan et al., 2001), die Bindung von Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat [PtdIns(4,5)P₂] (Martel et al., 2001), Integrinphosphorylierung (Tapley et al., 1989) sowie die kompetitive Inhibition durch weitere zytoplasmatische, integrinbindende Proteine wie 3-Endonexin und Zytoshesin (Bouvard et al., 2003). Die Protease Calpain bietet *in vivo* einen Mechanismus zur Trennung des N- und C-terminalen Teils von Talin, das wiederum zur Freilegung der Integrinbindungsstelle führt. *In vitro* konnte die Integrinbindung von Talin durch Calpain-Proteolyse gesteigert werden (Yan et al., 2001).

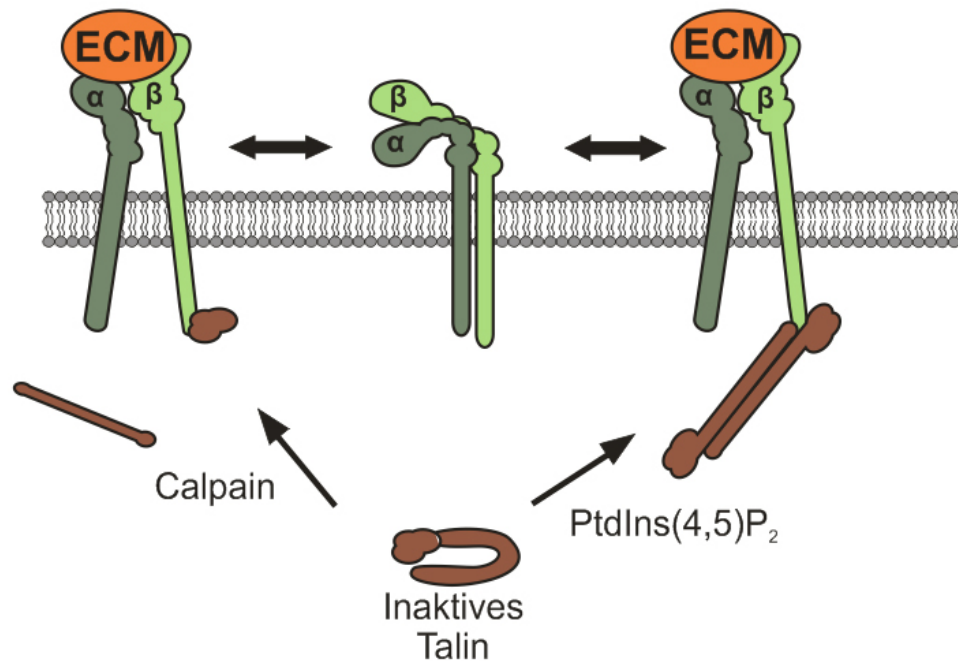


Abb.1.4: Modell zur Aktivierung von Integrinen. Calpain, Talin sowie PtdIns(4,5)P₂, können durch direkte oder indirekte Interaktion mit den zyttoplasmatischen Domänen, Integrine in einen aktiven Zustand versetzen. (modifiziert nach (Calderwood, 2004a))

Die Bindung von PtdIns(4,5)P₂ an Talin bewirkt eine Konformationsänderung, die zu einer gesteigerten Assoziation mit der β -Untereinheit der Integrine führt. Die Integrinphosphorylierung durch die Familie der Src Kinasen im Bereich des NPXY-Motivs fungiert in verschiedenen Bereichen als ein wichtiger Negativregulator der Integrinaktivierung (Datta et al., 2002, Sakai et al., 1998). Durch eine fein regulierte Aktivierung der Integrine kann die Zelle sehr spezifisch und flexibel auf Veränderungen reagieren.

1.2.3 Transmembranständige und zyttoplasmatische Interaktionspartner (Organisation von fokalen Kontakten)

Eine große Gruppe von Molekülen, die mit Integrinen assoziieren können, sind transmembranständige oder Membran-assoziierte Proteine. Darunter gibt es Vertreter der Tetraspasmine (Dedhar, 1999), Proteine der Ig Superfamilie (Wang et al., 1998), Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Moro et al., 1998, Borges et al., 2000, Gambaletta et al., 2000), GPI-verankerte Rezeptoren (Carriero et al., 1999, Petty and Todd, 1996), Ionenkanäle (Skinner and Wildeman, 1999) und weitere Proteine.

In den letzten Jahren konnten durch biochemische Analysen und *yeast two hybrid*-Assays eine große Anzahl an Integrin-bindenden Proteinen identifiziert werden. Zytoplas-

matische Proteine, die mit den zytoplasmatischen Domänen der Integrine interagieren, kann man in größere funktionelle Gruppen einteilen. Zum einen in Adaptor-Proteine, die mit dem Zytoskelett assoziiert sind und so Integrine mit dem Zytoskelett verbinden und zugleich als Interaktionspartner für weitere Signalmoleküle dienen (z.B. Talin, α -Actinin, Filamin) (Calderwood et al., 1999, Sampath et al., 1998, Pfaff et al., 1998). Zum anderen gibt es die Gruppe der Signalmoleküle, die von einigen Protein-Kinasen wie ILK (Dedhar, 1999) und FAK (Parsons et al., 2000) vertreten wird. Des Weiteren findet man Calcium-bindende Proteine, einige Transkriptionsfaktoren und eine große Zahl an Proteinen, deren genauere Funktion noch nicht bekannt ist (van der Flier and Sonnenberg, 2001, de Hoog et al., 2004).

Die Bindung von Liganden an Integrine führt zu einer Clusterbildung der Integrine und zur Rekrutierung von Signalmolekülen und Aktinfilamenten an die zytoplasmatischen Enden der Integrine. Fokale Komplexe oder Adhäsionen dienen der Gewährleistung von Substratbindung und gerichteter Lokalisation von Aktinfilamenten sowie Signalmolekülen (Burrige and Chrzanowska-Wodnicka, 1996, Giancotti and Ruoslahti, 1999). Diese Prozesse sind für die gerichtete Zellmigration, die Polarität der Zellen sowie für die Beständigkeit von Zellwachstum und für das Überleben der Zellen von essentieller Wichtigkeit. Die Verbindung zwischen dem Aktinzytoskelett und den Integrinen ist hoch dynamisch und durch verschiedene Faktoren sogar innerhalb einer Zelle unterschiedlich reguliert. Bei wandernden Zellen lässt sich beobachten, wie sich am vorderen Rand beständig neue FK bilden und Aktin rekrutiert wird. Am hinteren Ende lösen sich Integrine von der ECM, das gebildete Aktinzytoskelett verschwindet und FK/FA lösen sich auf (Ballestrem et al., 2001, Laukaitis et al., 2001).

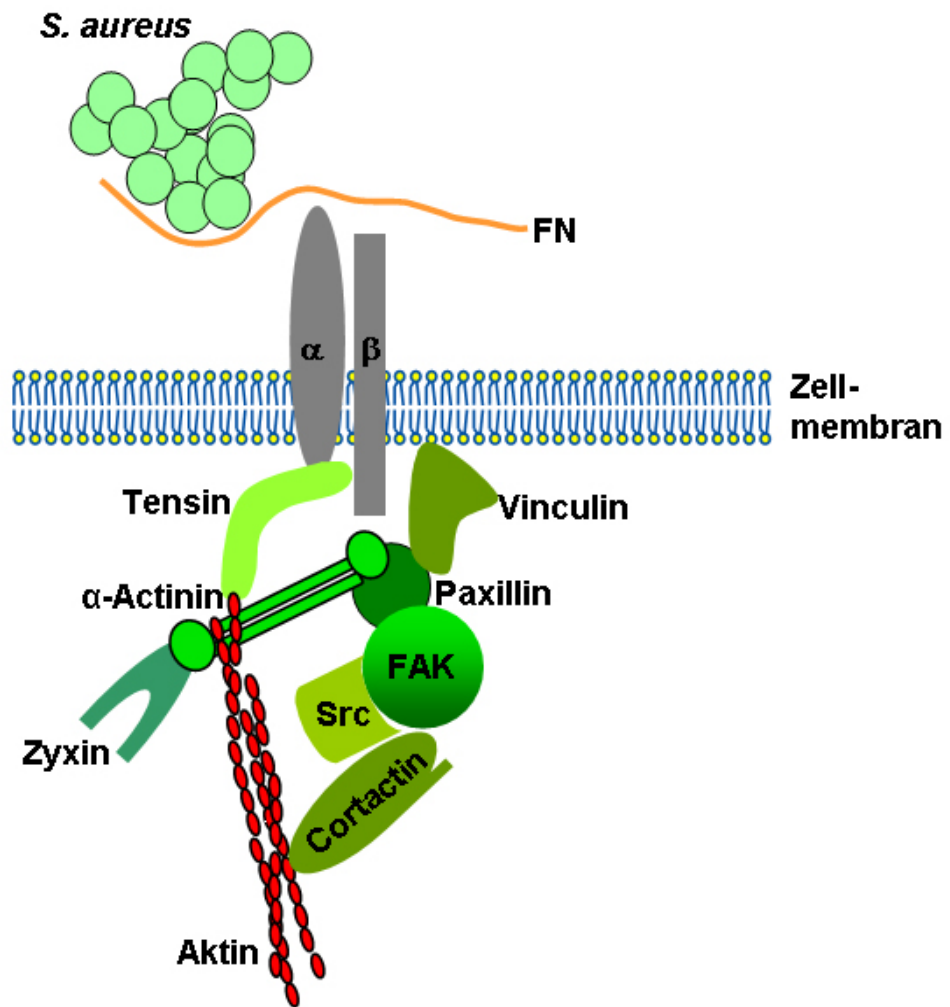


Abb. 1.5: Schematische Übersicht von fokalen Kontakten. Die gezeigten Proteine sind Markerproteine von FK. FN, Fibronectin; FAK, fokale Adhäsionskinase; Src, Familie der Src-Kinasen.

Zell-Matrix-Adhäsionen werden von allen adherenten Zelltypen gebildet, allerdings können sie sich in ihrer Form, Größe und Zellverteilung stark unterscheiden. Man differenziert daher in Bezug auf ihre Lokalisation, Morphologie und Größe drei Typen: Fokale Adhäsionen sind flache, längliche, 2-5 μ m-große Strukturen, die oft in der Nähe der Zellperipherie zu finden sind (Sastry and Burridge, 2000, Zamir and Geiger, 2001). Die Entwicklung von fokalen Adhäsionen wird durch die kleine GTPase Rho-A stimuliert. Als charakteristische Proteine findet man in FA Vinculin, Talin, Paxillin sowie tyrosinphosphorylierte Proteine. In zentraleren Regionen der Zelle befinden sich fibrilläre Adhäsionen (früher fokale Kontakte), die eine längliche oder auch punktartige Struktur aufweisen und in ihrer Größe stark variieren (1-10 μ m). Typische Merkmale sind extrazelluläre Fibronectin-Fibrillen und das zytoplasmatische Protein Tensin (Zamir et al., 1999,

Zamir et al., 2000). Eine weitere wichtige Gruppe unter den Matrixadhäsionen sind fokale Komplexe, kleine punktartige Adhäsionen, die sich vor allem am Rand der Lamellipodien befinden. Fokale Komplexe werden durch die kleine GTPase Rac induziert und besitzen als bezeichnende Komponenten Paxillin, Vinculin sowie tyrosinphosphorylierte Proteine (Rottner et al., 1999).

Die Regulierung dieser dynamischen Prozesse wird von einer Vielzahl unterschiedlichster Faktoren bewerkstelligt. Die molekulare Komplexität ist um einiges größer als in vielen Veröffentlichungen beschrieben, da noch viele Komponenten unbekannt sind. Andere wiederum werden posttranslational modifiziert, proteolytisch gespalten, verändern ihre Konformation oder existieren in verschiedenen Splicevarianten (van der Flier and Sonnenberg, 2001, Zamir and Geiger, 2001). Eine Gruppierung nach funktionellen Gesichtspunkten gibt einen kleinen Einblick in die Diversität der involvierten Faktoren. Darunter gibt es Proteine des Zytoskeletts (Tensin, Vinculin, Paxillin, α -Actinin, Talin), Tyrosinkinasen (Src, FAK, PYK2, Csk, Abl), Serin/Threoninkinasen (ILK, PKC, p21-aktivierte Kinase (PAK)), Modulatoren von kleinen GTPasen (ASAP1, DOCK180, PIX, GRAF), Tyrosinphosphatasen (SHP-2, LAR PTP) und andere Enzyme (PI 3-Kinase, Calpain). Viele verschiedene Gruppen konnten bislang einzelne Zusammenhänge und Protein-Protein-Bindungen einiger Interaktionspartner identifizieren. Viele der Interaktionen in fokalen Kontakten beruhen auf bekannten Bindungsmotiven wie Prolin-reichen Domänen, die mit SH3 Domänen (*Src homology 3*) interagieren oder SH2 Domänen (*Src homology 2*), die Bindungsstellen für tyrosinphosphorylierte Proteine darstellen. Vinculin, ein Protein, das nicht direkt mit Integrinen in Kontakt tritt, kann durch jeweilige Regulierung der Konformation mit folgenden Proteinen interagieren: α -Actinin (Kroemker et al., 1994), Talin (Johnson and Craig, 1994), intramolekulare Bindungsstelle innerhalb einer Vinculindomäne (Johnson and Craig, 1994, Miller et al., 2001), Paxillin (Wood et al., 1994), F-Aktin (Huttelmaier et al., 1997), PtdIns(4,5)P₂ (Sechi and Wehland, 2000), VASP (Brindle et al., 1996), Ponsin (Mandai et al., 1999) und Vinexin (Kioka et al., 1999). Dieses Beispiel verdeutlicht die weitreichende dynamische Komplexität der unterschiedlichen Bindungsmöglichkeiten und der daraus resultierenden Signalwege in fokalen Kontakten.

1.3 Integrin-vermittelte Signaltransduktion

Integrine sind eine große und stark differenzierte Familie von Adhäsionsrezeptoren. Daher gestalten sich die unterschiedlichen Signalwege, die durch Integrine aktiviert werden, auf vielfältige Art und Weise. Viele der Integrin-spezifischen Signale finden in den mei-

sten, einige dagegen nur in ganz speziellen Zelltypen statt. Durch diese Bandbreite an verschiedenen Regulationsmechanismen spielt die Integrin-induzierte Signalkette bei der Regulierung des Zelltodes, der Zellproliferation sowie der Zellmigration eine große Rolle.

1.3.1 FAK als zentrales Signaltransduktionsmolekül in Fokalen Adhäsionen

Viele Komponenten der fokalen Adhäsionen sind Substrate von Tyrosinkinassen, sowie die Tyrosinkinassen selbst. Eine der wichtigsten „nicht-Rezeptor“-Tyrosinkinassen in Integrin-induzierten fokalen Adhäsionen ist die fokale Adhäsionskinase (FAK). FAK wird in fast allen Geweben und Zelltypen exprimiert und ist während der Evolution in vielen Spezies, von der Fruchtfliege zur Maus bis zum Menschen, stark konserviert (Kornberg et al., 1992, Lipfert et al., 1992, Schaller et al., 1992).

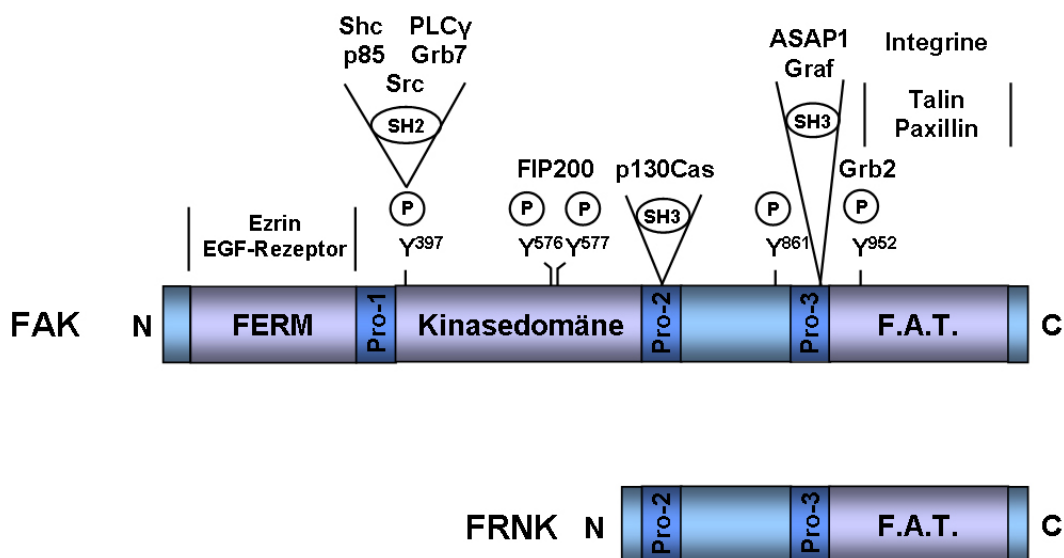


Abb.1.6: Schema der Domänenstruktur des FAK Proteins. FAK besitzt eine zentrale Kinasedomäne, eine N-terminale FERM-Domäne sowie eine FAT-Domäne (*focal adhesion targeting domain*) am C-terminalen Ende. FAK besitzt eine Reihe von Tyrosinresten, die nach Phosphorylierung Interaktionen mit anderen Proteinen vermitteln können. Drei Prolin-reiche Regionen (Pro-1, Pro-2, Pro-3) ermöglichen Interaktionen mit SH3-Domänen (z.B. p130 CAS). FRNK (FAK-related non-kinase) umfasst den C-terminalen Teil von FAK.

Am C-terminalen Teil von FAK befindet sich die sogenannte F.A.T.-Domäne (*focal adhesion targeting*), die für die indirekten Interaktionen mit dem zytoplasmatischen Ende der Integrine verantwortlich ist. Diese Domäne enthält Bindungsstellen für die Integrin-assoziierten Proteine Paxillin und Talin (Turner, 2000, Schaller, 2001). Der C-terminale Teil von FAK besitzt zwei Prolin-reiche Domänen, die Bindungsstellen für Proteine mit SH3 Domänen darstellen, und somit Interaktionen mit dem Adapterprotein p130Cas

(Bouton et al., 2001), dem Rho-GTPase-aktivierenden Protein (GAP) Graf und ASAP1 Arf-GAP (Randazzo et al., 2000, Parsons, 2003) ermöglichen. Die unabhängige Expression der C-terminalen Domäne von FAK, genannt FRNK (*FAK related non-kinase*), kann als endogener, dominant negativer Inhibitor von FAK fungieren (Parsons et al., 2000, Walker et al., 2003).

In der N-terminalen Region von FAK befindet sich eine FERM Homologie-Domäne, die mit ihren drei Untereinheiten Bindungsmotive für Lipide und Signalproteine bietet (Pearson et al., 2000). Diese Region wird gefolgt von einer weiteren Prolin-reichen Domäne, die als SH3-Bindungsstelle für die Kinasen der Src-Familie identifiziert werden konnte.

Die zentrale Kinase-Region gilt als hochkonserviert von *Drosophila* bis zum Menschen (Schaller, 2001) und besitzt eine wichtige Autophosphorylierungsstelle (Y397), die für die Aktivität von FAK eine besondere Rolle spielt.

Die Aktivität und Tyrosinphosphorylierung von FAK wird aufgrund des Kontakts mit Zellmatrixproteinen, löslichen zellulären Aktivatoren oder mechanischen Stimulatoren erhöht (zur Übersicht siehe (Parsons et al., 2000), (Hauck et al., 2002b), (Schlaepfer and Mitra, 2004)). Bei der Regulierung der FAK-Aktivität unterscheidet man zwischen intermolekularer und intramolekularer FAK-Phosphorylierung. In den verschiedensten Zelltypen führt eine FAK-Aktivierung zur Bindung von Src Kinasen mittels ihrer SH2-Domäne an ein Motiv, das die FAK-Phosphorylierungsstelle Y-397 umgibt. Die Bindung von Src an FAK resultiert in einer gesteigerten Src-Aktivität, was zu einer Src-vermittelten Phosphorylierung von FAK innerhalb der Kinasedomäne an den Tyrosinen Y-576 und Y-577 führt, die für eine maximale Aktivität von FAK unabdingbar ist (Ruest et al., 2000). Im weiteren Verlauf führt dieser Src-FAK-Komplex zur Phosphorylierung der Tyrosinreste Y-861 sowie Y-925 im C-terminalen Teil von FAK (Hanks et al., 2003), die nun als Bindungsstelle für die SH2-Domäne des Adaptorproteins Grb2 fungieren können (Schlaepfer et al., 1999).

Für die intramolekulare Regulierung der FAK-Aktivität spielt die FAK FERM-Domäne eine entscheidende Rolle. Da die FAK FERM-Domäne bei exogener Exprimierung die Phosphorylierung von FAK inhibieren kann und fähig ist an die FAK Kinasedomäne zu binden, wurde daraus auf eine Funktion der FERM-Domäne als intramolekularer Inhibitor der FAK-Aktivität geschlossen (Cooper et al., 2003). Die Bindung der FERM-Domäne an das katalytische Zentrum von FAK führt zu einer allosterischen oder konformellen Behinderung der katalytischen Aktivität. Daher wird vermutet, dass die Änderung der Konformation der FAK-Kinasedomäne zur maximalen Aktivierung von Nöten ist.

Letztendlich wird die Aktivität von FAK durch viele weitere Proteine, wie FIP200 (*FAK-inhibitory protein* 200kDa), das an die Kinasedomäne bindet (Abbi et al., 2002) und Proteintyrosinphosphatasen (PTPs) wie die SH2-tragende Tyrosinphosphatase2 (SHP2) (von Wichert et al., 2003), PTEN oder PTP-PEST (Schaller, 2001), reguliert. FAK kann während des Zellzyklus im C-terminalen Teil stark serinphosphoryliert werden. Diese Serinphosphorylierung nahe den prolinreichen Domänen von FAK kann zur Dissoziation von SH3-gebundenen Proteinen, wie p130Cas, führen (Yamakita et al., 1999, Ma et al., 2001, Hunger-Glaser et al., 2003).

Ein bekanntes Modellsystem zur Untersuchung verschiedener FAK-Funktionen sind FAK-null *knock-out* Fibroblasten. Sie zeichnen sich durch sehr eingeschränkte Motilität und gesteigerte Bildung von fokalen Kontakten aus (Schlaepfer et al., 1999, Ren et al., 2000, Chen et al., 2002). Dieses zelluläre Verhalten ist exklusiv für den Verlust von FAK, verglichen mit weiteren FK-assozierten Proteinen wie Paxillin (Hagel et al., 2002) oder Src PTK (Klinghoffer et al., 1999), die keinen ähnlichen morphologischen Phänotyp aufweisen. FAK-null Zellen sind verglichen mit den Wildtypzellen, rundlich und wenig ausgebreitet (Ilic et al., 1995). FAK-null Zellen bieten ein einmaliges Modellsystem zur Untersuchung von Wildtyp FAK oder den zahllosen FAK-Mutanten in Funktionsstudien.

Die biologische Rolle von FAK ist eng mit der Aktivierung von Integrinen bei der Formation von fokalen Kontakten verknüpft. Zur Regulierung dieser komplexen Signalkette bei der Umstrukturierung von fokalen Kontakten und bei der Zellwanderung ist die Bildung eines sogenannten Src-FAK-Komplexes ein zentrales und kritisches Ereignis (Sieg et al., 2000, Schlaepfer et al., 1999).

1.3.2 SFK/FAK Signaltransduktionsweg

Die Bildung eines Src-FAK-Komplexes und die daraus resultierenden Phosphorylierungen von Signalproteinen haben zwei gegensätzliche Aufgaben bei der Regulierung der Dynamik in fokalen Adhäsionen. Ein Src-FAK-Komplex erleichtert molekulare Interaktionen zwischen involvierten Proteinen und damit verbunden die Entwicklung der fokalen Adhäsionen. Andererseits ist er bei der Umstrukturierung von fokalen Adhäsionen beteiligt, die zu der Bildung von fibrillären Adhäsionen oder Podosomen führen (Volberg et al., 2001). Diese konträren Aufgaben des Src-FAK-Komplexes lassen sich nur durch eine fein abgestimmte Regulation bewältigen.

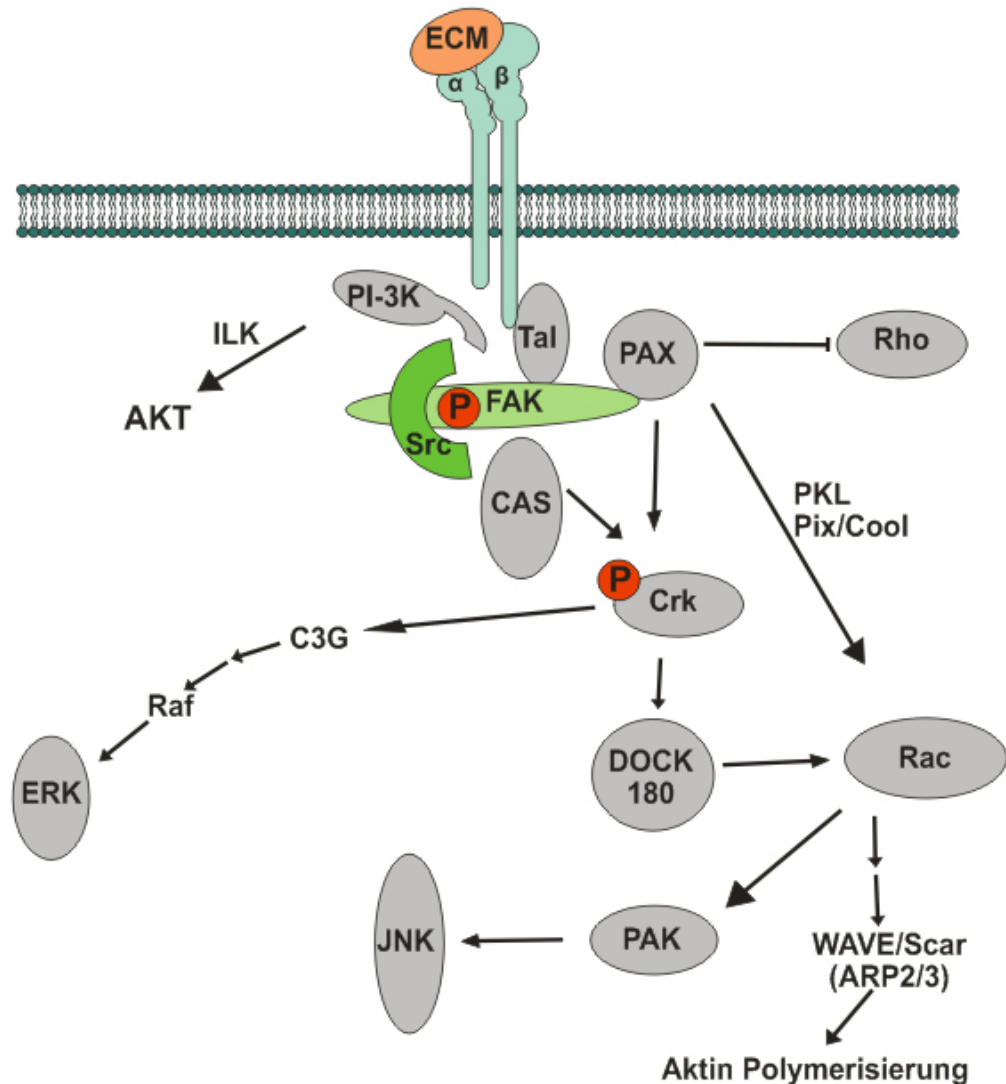


Abb.1.7: Auswahl an molekularen Interaktionen des Src-FAK-Komplexes mit Signalmolekülen nach Integrinaktivierung. Die Phosphorylierung von FA- oder Aktin-assoziierten Substraten des Src-FAK-Komplexes ermöglicht die Bindung von Adaptermolekülen, die zur direkten oder indirekten Umwandlung der kleinen GTPasen (Rho, Rac) führt.

Integrine können eine Vielzahl an Proteintyrosinkinasen aktivieren. Der Weg der FAK- und Src-Kinasen-Aktivierung aufgrund Integrin vermittelter Signale und deren Bedeutung für weitere Signalmoleküle wird im Folgenden beschrieben.

FAK wird von den meisten Integrinen aktiviert. Hierfür wird FAK zu sich entwickelnden fokalen Adhäsionen durch direkte Interaktion oder mittels der Proteine Talin und Paxillin an die β -Untereinheit der Integrine rekrutiert (Miyamoto et al., 1995b, Liu et al., 2000, Schlaepfer and Mitra, 2004).

Bei der Regulierung des Aufbaus von fokalen Kontakten spielt die Phosphorylierung von PIPKI γ (Phosphatidylinositol-phosphat-kinase-TypI-isoform- γ) durch FAK ei-

ne große Rolle (Ling et al., 2002), da es sowohl die Produktion von PI(4,5)P₂, als auch die Assoziation von PI(4,5)P₂ mit Talin erhöht. Die Bedeutung von PI(4,5)P₂ für die Zusammensetzung von *scaffolding*-Proteinen, sowie für den Aufbau von fokalen Kontakten, ist dadurch sehr groß (Critchley, 2000).

Nach Integrinstimulierung bildet sich ein Komplex aus autophosphoryliertem FAK (Y-397) und der SH2-Domäne der Src-Kinase (Schlaepfer and Hunter, 1998, Cary and Guan, 1999). Jedoch scheint es möglich, dass Src sowohl *upstream* als auch *downstream* von FAK wirkt, da Src FAK Y-397 phosphorylieren und anschließend binden kann (Cary et al., 2002). Nach der Interaktion mit FAK phosphoryliert die Src-Kinase eine Reihe von wichtigen fokalen Adhäsionskomponenten wie Paxillin und Talin, zwei zytoplasmatische Signalproteine, sowie p130Cas, ein Adapter-Protein. p130Cas besitzt in seinem C-terminalen Teil eine prolinreiche Domäne, mittels derer es mit der SH3-Domäne der Src-Kinasen interagiert. Im N-terminalen Teil von p130Cas befindet sich eine SH3-Domäne, die an die prolinreiche Region von FAK binden kann. Wiederum bindet Src mit seiner SH2-Domäne an phosphoryliertes FAK und vermittelt dadurch die Formation eines Dreier-Komplexes aus FAK, c-Src und p130Cas (Schlaepfer and Hunter, 1998, Huang et al., 2002). In der mittleren Substratbinderegion von p130Cas befinden sich mehrere Phosphorylierungsstellen, die nach Integrinaktivierung und Tyrosinphosphorylierung durch den aktiven FAK-Src-Komplex als Bindestellen für die SH3-SH2-Adaptorproteine Crk und Nck fungieren (O'Neill et al., 2000). Crk seinerseits interagiert mit DOCK180, einem GEF (*guanin nucleotide exchange factor*) für die kleine GTPase Rac, so dass sich nach Tyrosinphosphorylierung von p130Cas ein Komplex aus Crk, ELMO und DOCK180 bildet (Klemke et al., 1998, Hasegawa et al., 1996, Brugnera et al., 2002). Die Bildung dieses Komplexes führt zur Aktivierung von Rac und darüber hinaus zur Aktivierung von JNK (Dolfi et al., 1998, Oktay et al., 1999). Durch die von FAK hervorgerufene Rekrutierung und Aktivierung von GRAF, einem negativen Regulator der Rho GTPasen, greift FAK direkt in die Regulierung der Aktivität der Rho GTPase ein (Hildebrand et al., 1996). Die Aktivierung von Rac und Cdc42, gekoppelt mit der Inhibition der Rho Aktivität durch FAK, ist eine bedeutende Verbindung, die zu einer dynamischen Regulation des Aktinzytoskeletts beiträgt.

Die Aktivierung der Signalachse DOCK180 zu Rac spielt in dem Signalweg Paxillin-Crk eine zentrale Rolle. Paxillin, ein Adaptorprotein, wird durch Kinasen der Src Familie an zwei Tyrosinresten phosphoryliert und erlangt dadurch, wie Cas, die Fähigkeit, Crk zu rekrutieren (Turner, 2000). Paxillin bindet allerdings nicht nur Crk sondern bietet in seiner N-terminalen Region mit einem Leucin-reichen Motiv (LD Motiv) eine Bindestelle

für FAK und Vinculin. Die Region LD4 assoziiert mit einem Proteinkomplex aus PAK (p21 aktivierte Kinase), dem SH2/SH3-Adapterprotein Nck, zwei Mitgliedern der Cdc42/Rac GEF Familie (PIX/COOL) sowie einem multidomänen ARF-GAP-Protein, PKL (*paxillin-kinase linker*).

PKL bindet direkt an Paxillin und PIX, was dazu führt, dass Paxillin für eine Rekrutierung von PKL und PIX zu adhäsiven Strukturen verantwortlich ist. Paxillin dient somit sowohl der Regulierung von Rac als auch von Pak, einem Regulator des Aktinzytoskeletts (Bagrodia and Cerione, 1999, Bagrodia et al., 1999, Turner et al., 1999, West et al., 2001).

Das Zusammenspiel von FAK und Src aufgrund Integrinaktivierung kann durch die beschriebenen komplexen Interaktionsmöglichkeiten, die zur Rekrutierung und Phosphorylierung von Schlüsselproteinen führen, auf wichtige Funktionen wie den dynamischen Auf- und Abbau von fokalen Komplexen und die Umstrukturierungen des Aktinzytoskeletts regulierend Einfluss nehmen.

1.4 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Integrin-vermittelte Aufnahme von *S. aureus* durch nicht professionell phagozytierende Zellen auf molekularer und zellulärer Ebene genauer zu charakterisieren.

- Zur genauen Unterscheidung von extrazellulären und intrazellulären *S. aureus* gab es bislang keine verlässliche Färbemethode. Zur Detektion von intrazellulären *S. aureus* wurde daher ein neues und schnelles antikörperunabhängiges Färbeprotokoll entwickelt (Kapitel 2).
- Durch Interaktion von *S. aureus* mit zellulären Integrinen kommt es zur Aufnahme der Pathogenen. Da diesem Prozess eine Reihe von Signalen, die am Ende zur Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts führen, vorausgehen, sollten chemische und genetische Untersuchungen erste Hinweise auf involvierte Faktoren, im Speziellen der Src Kinase, liefern (Kapitel 3).
- Bei der Suche nach verbindenden Elementen zwischen Integrinen, der Src Kinase und dem Aktinzytoskelett wurde ein besonderes Augenmerk auf die fokale Adhäsionskinase (FAK) gelegt. Es wurde durch biochemische und genetische Methoden die zentrale Rolle von FAK, sowie die Verbindung zu dem aktinbindenden Protein Cortactin untersucht (Kapitel 4).

2 Mikroskopische Quantifizierung der bakteriellen Invasion durch eine neue Antikörper-unabhängige Färbemethode

2.1 Einleitung

Ein Thema, das beim Studium von Infektionskrankheiten auf zellulärer Ebene immer wieder auftritt, ist das vom pathogenen Organismus gesteuerte Eindringen in eukaryotische Zellen, die man als bakterielle Invasion bezeichnet (Falkow, 1991, Finlay and Cossart, 1997). Um Beispiele von potentiell invasiven Bakterien handelt es sich bei *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* sowie *Staphylococcus aureus*. Im Falle von *Neisseria gonorrhoeae* stellt der Pilus den initialen Kontakt zu Epithelzellen her, jedoch wird die Invasion durch sogenannte *opacity* (Opa) Proteine vermittelt. Diese integralen Membranproteine sind für den opaquen Kolonie-Phänotyp verantwortlich und können unabhängig voneinander exprimiert werden (Meyer et al., 1990, Meyer, 1990). Es konnte gezeigt werden, dass Opa_{CEA} spezifisch mit einigen Rezeptoren der CEACAM (*carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule*) Familie interagieren kann. Vertreter der CEACAM Familie werden auf verschiedenen Zelltypen exprimiert, jedoch findet man sie gehäuft auf Granulozyten und auf Epithelzellen (Hauck and Meyer, 2003). Im Fall von *S. aureus* wird die Invasion durch Rekrutierung von Fibronectin zur Oberfläche dieser Gram-positiven Mikroorganismen initiiert. Fibronectin dient in diesem Fall als molekulare Brücke, um die Anheftung der Bakterien und Wirts- β_1 -Integrine zu ermöglichen (siehe Kapitel 1.1.2). Es werden generell zwei experimentelle Ansätze eingesetzt, um die bakterielle Invasion *in vitro* zu analysieren und das invasive Potential der Pathogene zu quantifizieren. Einerseits ermöglicht der Antibiotika-Protektions-Assay eine bequeme Quantifizierung intrazellulärer Bakterien, andererseits basiert diese Art von Assay auf der Erfassung lebender Bakterien nach Internalisation von eukaryotischen Zellen. Hierbei kann man nicht zwischen effizienter bakterieller Invasion in Kombination mit niedrigem intrazellulärem Überleben und niedriger Invasivität verbunden mit effektivem intrazellulärem Überleben unterscheiden (Booth et al., 2003). Daher ist es notwendig, die Daten dieser Versuchsansätze mit mikroskopischen Untersuchungen von infizierten Proben zu verifizieren und gegebenenfalls zu vervollständigen. Um nun zwischen angehefteten, aber extrazellulären und tatsächlich intrazellulären Mikroorganismen unterscheiden zu können,

wurde ein umfangreiches Färbeprotokoll für Immunofluoreszenz entwickelt (Heesemann and Laufs, 1985), das in allgemeiner Benutzung ist (Dehio et al., 1997, Williams et al., 1998, Luhrmann et al., 2001). Diese doppelzyklische Antikörper-basierenden Färbemethode basiert auf der für Antikörper unpermeablen intakten Wirtszellmembran. Demgemäß werden extrazelluläre Bakterien im ersten Zyklus mit einem bakterienspezifischen Antikörper und anschließend mit einem farbstoffgekoppelten Zweitantikörper (z.B. FITC-gekoppelt) inkubiert. Anschließend wird die Membran durch Detergentien oder Methanol permeabilisiert und intrazelluläre Bakterien können nun mit dem gleichen Erstantikörper, allerdings mit einem andersfarbig-gekoppelten Zweitantikörper (z.B. Cy5) behandelt werden. Am Ende sind extrazelluläre Bakterien mit beiden Farbstoffen gefärbt (FITC und Cy5), während intrazelluläre Bakterien nur mit dem Farbstoff aus dem zweiten Zyklus (in unserem Beispiel in Abb. 2.1, Cy5) markiert sind. Mit Hilfe von Proben, die nach dieser doppelzyklischen Antikörper-basierenden Färbemethode hergestellt wurden, können nun präzise intrazelluläre Bakterien zu jedem Zeitpunkt während des Invasionsprozesses erfasst werden. Da dieses Protokoll auf mehrfachen Zyklen der Immunofluoreszenzfärbung basiert, benötigt man nicht nur merkliche Mengen an spezifischen Antikörpern gegen den Mikroorganismus, es ist auch mit erheblichem Zeitaufwand verbunden.

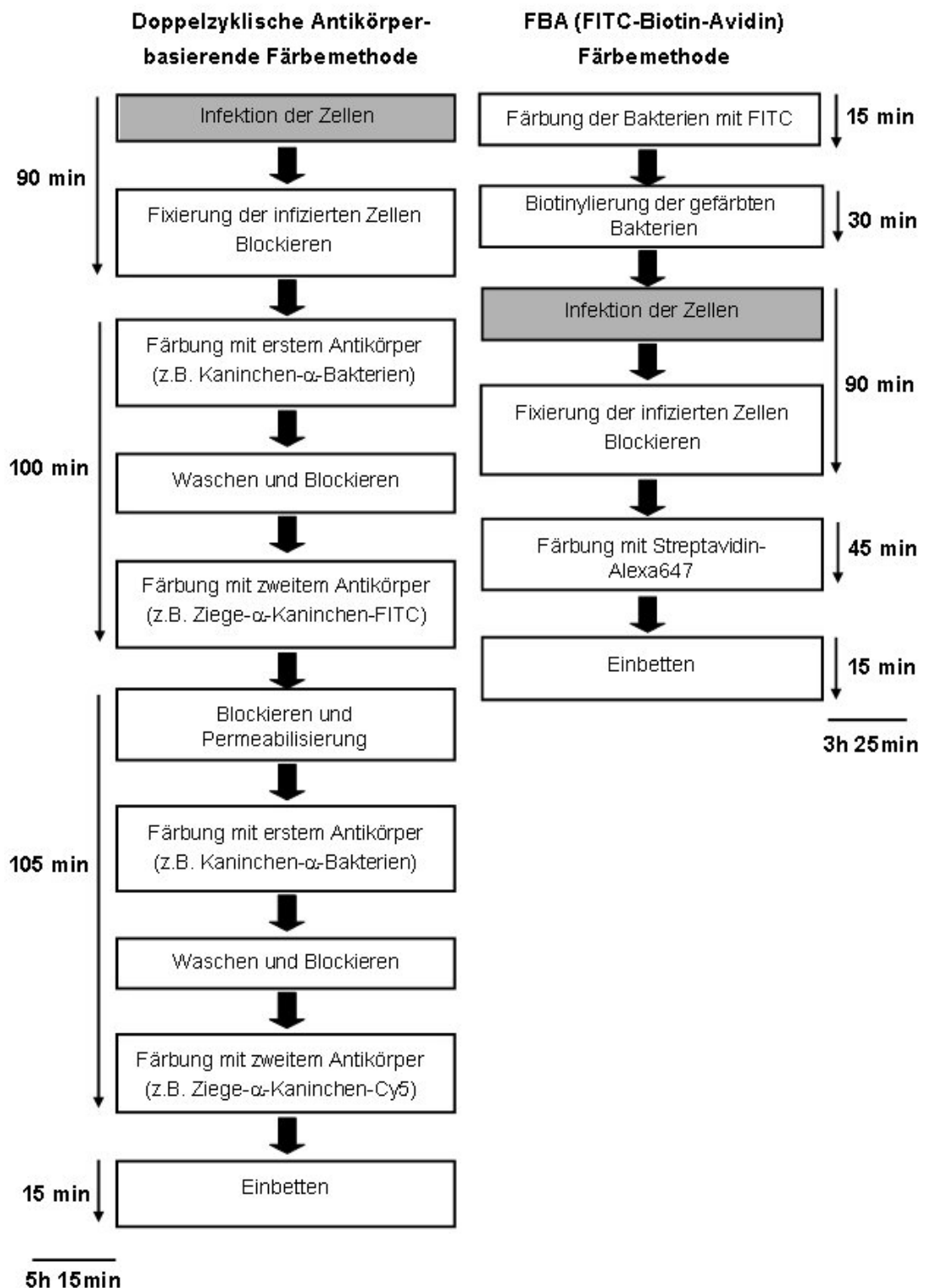


Abb. 2.1 Schematische Verlaufsskizze der verwendeten Färbeprotokolle. Die linke Spalte umfasst das konventionelle doppelzyklische Antikörper Färbeprotokoll. Die rechte Spalte liefert einen Überblick über die Antikörper-unabhängige FITC-Biotin-Avidin (FBA) Färbemethode. Die Pfeile an der Seite geben die benötigten Zeitspannen für die einzelnen Schritte an.

In dieser Arbeit wurde eine neue Färbemethode zur Unterscheidung von extra- und intrazellulären Bakterien, allerdings unabhängig von bakterienspezifischen Antikörpern, etabliert. Diese Unabhängigkeit von Antikörpern bei der Erfassung von Bakterien macht diese Methode in Situationen, in denen spezifische Antikörper noch nicht zur Verfügung stehen, sehr nützlich. Zusätzlich ist dieses Protokoll weniger zeitaufwendig und spart Ressourcen, da es im Gegensatz zu der doppelzyklischen Antikörper Färbung nur einen Färbezyklus benötigt. Diese neue und schnelle Methode erlaubt eine quantitative Erfassung von intrazellulären Bakterien und stellt eine wertvolle Technik für Fragestellungen der zellulären Mikrobiologie und der Immunologie dar.

2.2 Ergebnisse

2.2.1 Doppelzyklische Antikörper-basierende Färbemethode zur Detektion von intrazellulären *N. gonorrhoeae*

Um die CEACAM-vermittelte Internalisierung von *N. gonorrhoeae* durch Fluoreszenzmikroskopie zu analysieren, wurden humane 293T Zellen mit einem Konstrukt transfiziert, das für CEACAM3, fusioniert mit einem rotfluoreszierendem Protein (CEACAM3-RFP) codierte. Diese transfizierten Zellen wurden nach 1h Infektion mit Gonokokken fixiert. Vorausgehende Studien zeigten, dass 293T Zellen, die mit einem leeren Kontrollvektor transfiziert waren, die Opa-vermittelte Invasion von *N. gonorrhoeae* innerhalb dieser Zeitspanne nicht aufweisen konnten (Schmitter et al., 2004). Fixierte Präparate wurden später nach der konventionellen doppelzyklischen Antikörper-basierenden Färbemethode weiterbehandelt. Mittels dieser Färbemethode konnte man zwischen extrazellulären und intrazellulären Mikroorganismen unterscheiden (doppelzyklische AK Färbung; Abb. 2.1). In einem ersten Resultat konnten Opa-exprimierende Gonokokken detektiert werden, die positiv für den fluoreszenten Farbstoff waren, der nach Permeabilisation der Zellen verwendet wurde. Sie zeigten allerdings kein Signal für den Farbstoff vom ersten Zyklus. Dies demonstrierte die intrazelluläre Lokalisation dieser Bakterien (Abb. 2.2: kleine Pfeile). Wie nicht anders erwartet, waren alle Bakterien in Proben, die mit nicht opaquen Gonokokken infiziert waren, nach der Färbung mit beiden Farbstoffen markiert und damit extrazellulär. Diese Resultate bestätigten, dass diese Methode korrekt zwischen extrazellulären und intrazellulären Bakterien unterscheiden kann.

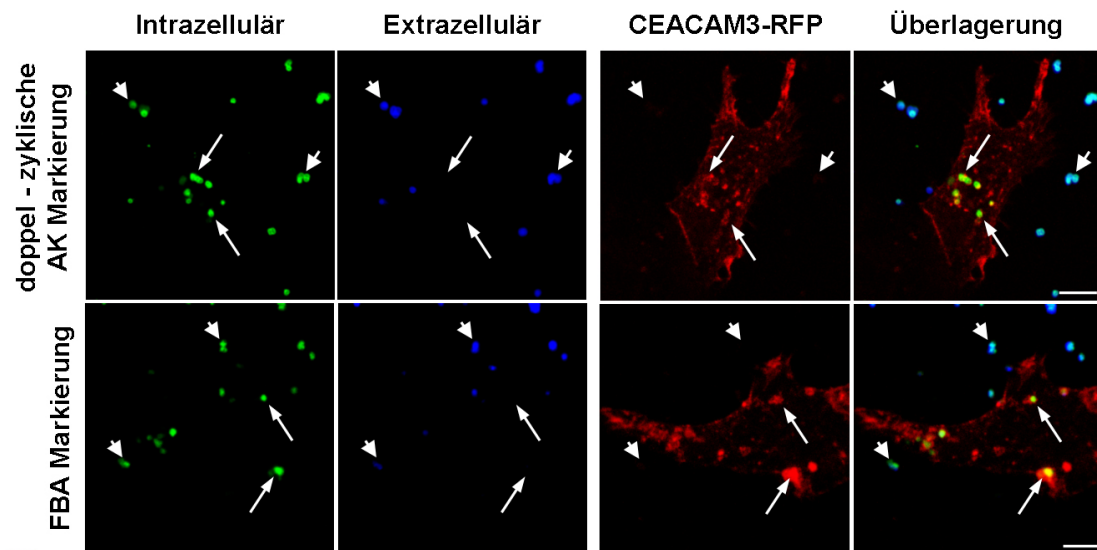


Abb 2.2 Gegenüberstellung der konventionellen doppelzyklischen Antikörper-basierenden Färbemethode und dem FBA-Protokoll im Hinblick auf eine unterschiedliche Färbung von extra- und intrazellulären Bakterien. CEACAM3-exprimierende 293T Zellen wurden für 1h mit Opa_{CEA} -exprimierenden *N. gonorrhoeae* infiziert. Bakterien wurden einerseits vor der Infektion mit FITC und Biotin (FBA Färbung; untere Reihe) markiert oder unbehandelt (obere Reihe) verwendet. Die Proben wurden anschließend anhand der beiden Protokolle gefärbt. Extrazelluläre (Pfeilkopf) sowie intrazelluläre (kleiner Pfeil) Bakterien konnten mittels beider Protokolle einfach voneinander unterschieden werden. Größenbalken repräsentieren $10\ \mu\text{m}$.

Eine Quantifizierung der Proben zeigte, dass schon nach 1 h Infektion 56 % der zellassozierten Opa -positiven *N. gonorrhoeae* in CEACAM3-exprimierenden 293T Zellen intrazellulär waren (Abb. 2.3 A, B). Bakterien, die jedoch kein CEACAM-bindendes Opa Protein aufwiesen, wurden nicht internalisiert (Abb. 2.3 A, B). Obwohl die Auszählung von parallel produzierten Proben die Reproduzierbarkeit dieser Methode demonstrieren konnte, war die Färbeintensität doch abhängig, sowohl von der Qualität des Antiserums als auch von der richtigen Permeabilisierung der Wirtszellmembran, die beide von Experiment zu Experiment variieren können. Zusätzlich zeigte sich diese Methode aufgrund des doppelten Färbezyklus als sehr zeitintensiv (Abb. 2.1). Daher wurde ein neues Färbeprotokoll, das unabhängig von spezifischen Antikörpern sowie von der Permeabilisierung der infizierten Zellen war und einen geringeren Zeitaufwand darstellte, etabliert.

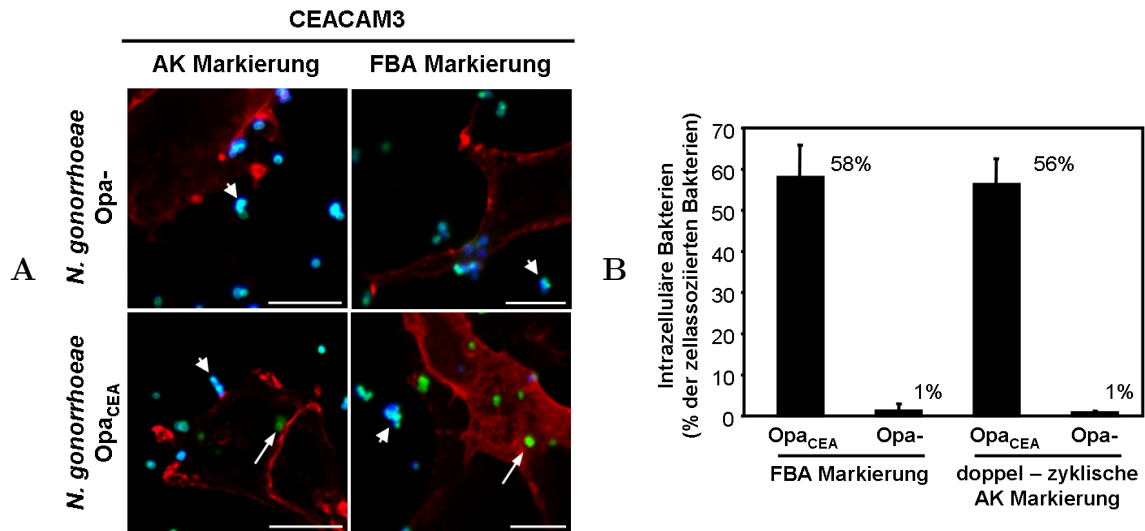


Abb 2.3 Vergleich der doppelzyklischen AK-Färbemethode und der neuen FBA-Methode bei der Evaluierung der Invasivität von opaquen versus nicht-opaquen *N. gonorrhoeae*. CEACAM3-RFP exprimierende 293T Zellen wurden für 1h mit Opa_{CEA}-exprimierenden (Ngo Opa_{CEA}) oder nicht-opaquen (Ngo Opa-) *N. gonorrhoeae* infiziert und anschließend nach doppelzyklischer AK-Methode oder FBA-Färbemethode behandelt. Extra- (Pfeilkopf) und intrazelluläre (kleiner Pfeil) Bakterien sind gekennzeichnet (A). Diese Proben wurden quantitativ nach intra- und extrazellulären Bakterien ausgewertet. Die Säulen geben den durchschnittlichen Prozentsatz von intrazellulären Bakterien gegenüber allen zellassozierten Bakterien von vier unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung wieder (es wurden jeweils 100 infizierte Zellen in einem Feld ausgezählt) (B). Größenbalken repräsentieren 10 μ m.

2.2.2 Nachweis von intrazellulären Bakterien mittels FBA Färbemethode

Da dieses neue Protokoll auf der Verwendung von FITC, Biotin und Avidin basiert, wurde das Verfahren FBA-Färbung genannt. Für die FBA-Färbung wurden Gonokokken vor der Infektion kovalent mit 5-(6)-Carboxyfluorescein-Succinylester (FITC) markiert sowie simultan mit Sulfo-NHS-LC-Biotin (Biotin) biotinyliert (Abb. 2.1). Nach Infektion und Fixierung wurden die Proben ohne Permeabilisierung in einer einzigen Runde mit Streptavidin-Alexa647 gefärbt. Als Resultat sollten nun sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre Bakterien FITC-positiv erscheinen, während nur die extrazellulären Bakterien mit Alexa647 gefärbt sein sollten. Um nun die neue mit der konventionellen Färbemethode vergleichen zu können, wurden dieselben CEACAM3-RFP-transfizierten 293T Zellen wie in vorhergehendem Versuchsansatz verwendet. Nachdem CEACAM3-RFP-exprimierende und infizierte 293T Zellen gemäß der FBA-Färbemethode behandelt wurden, konnte man wiederum leicht zwischen extra- und intrazellulären Bakterien unterscheiden (Abb.2.2). Wie schon zuvor beobachtet werden konnte, detektierte man nur in Zellen, die mit Opa-exprimierenden Gonokokken infiziert waren, intrazelluläre Bakte-

rien, wogegen nicht-opaque Bakterien ausschließlich extrazellulär vorkamen (Abb. 2.2). Ein Vorteil der neuen Technik war das stärkere Fluoreszenzsignal der kovalent gefärbten Bakterien im Vergleich zur herkömmlichen doppelzyklischen AK-Färbung, das die Unterscheidung von extra- und intrazellulären Bakterien stark vereinfachte (Abb. 2.3A). Wichtig war ebenfalls, dass die Quantifizierung der intrazellulären Bakterien durch die neue FBA-Färbung nahezu zu identischen Ergebnissen führte (58 % intrazelluläre Bakterien), verglich man sie mit der herkömmlichen und aufwendigeren doppelzyklischen AK-Methode (56 % intrazelluläre Bakterien) (Abb. 2.3 A, B). Dieses Ergebnis demonstrierte in überzeugender Weise die Tauglichkeit dieser neuen Methode als gute Alternative zur etablierten Methode. Es zeigte ebenfalls, dass die kovalente Modifikation der bakteriellen Oberfläche mit FITC und Biotin vor der Infektion keinen Einfluss auf die CEACAM-vermittelte Internalisierung Opa-exprimierender *N. gonorrhoeae* hatte.

2.2.3 Aktindynamik und die Kinasen der Src Familie sind essentiell für die CEACAM3-vermittelte Aufnahme von Opa-exprimierenden *N. gonorrhoeae*

Um unsere bisherigen Ergebnisse zu bestätigen wurden Proben aus CEACAM3-exprimierenden Zellen, die vor der Infektion mit *N. gonorrhoeae* zuerst mit pharmakologischen Inhibitoren behandelt wurden, mit Hilfe der neuen FBA-Methode gefärbt. Beide Inhibitoren, das Aktin depolymerisierende Mittel Cytochalasin D sowie Inhibitoren von Src-Kinasen, beeinflussten die CEACAM3-vermittelte Internalisierung stark (Hauck et al., 1998, Billker et al., 2002, Schmitter et al., 2004, McCaw et al., 2003). Wie zuvor schon beobachtet, konnten wiederum eine Vielzahl an intrazellulären Gonokokken nach der FBA-Färbung in CEACAM3-transfizierten Zellen festgestellt werden (Abb. 2.4). Bei gleichzeitiger Färbung des filamentösen Aktins durch Phalloidin-Rot konnte man nicht nur eine Zerstörung der Organisation des Aktin Zytoskeletts nach Behandlung der Zellen mit Cytochalasin D oder dem Inhibitor der Src Kinasen ausmachen, sondern ebenso die ausnahmslose Blockierung der Aufnahme von Opa-exprimierenden *N. gonorrhoeae* feststellen (Abb. 2.4). Die Färbung mittels FBA-Methode konnte bestätigen, dass alle zellassoziierten Gonokokken nach Behandlung der Zellen mit PP2 oder CytochalasinD extrazellulär vorlagen (Abb. 2.4).

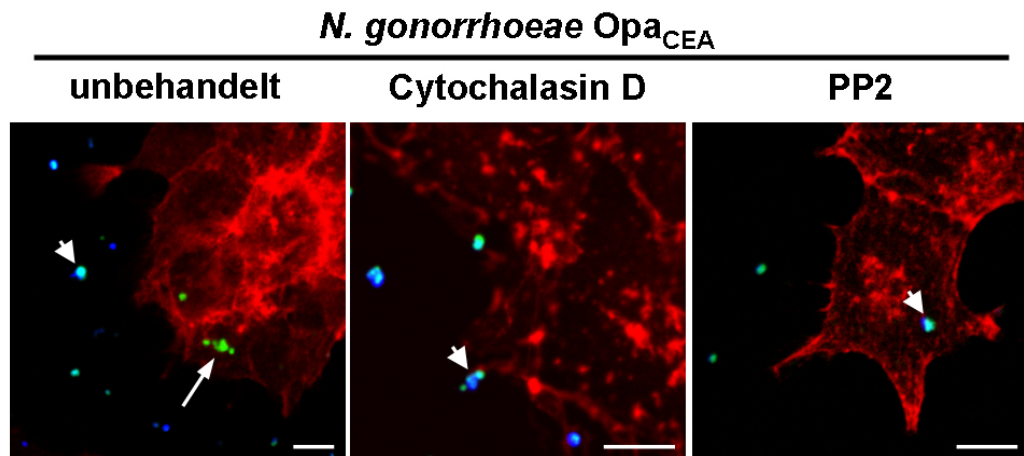


Abb 2.4 Untersuchung der neuen FBA-Methode bei Verwendung zellulärer Inhibitoren

293T Zellen wurden mit CEACAM3 transfiziert. Die Zellen wurden mit $1\mu\text{g}/\text{ml}$ Cytochalasin D oder mit $1\mu\text{M}$ PP2 vorbehandelt und für 1h mit Opa_{CEA}-exprimierenden *N. gonorrhoeae* infiziert. Fixierte Präparate werden nach dem FBA-Protokoll auf extra- (Pfeilkopf) und intrazelluläre (kleiner Pfeil) Bakterien gefärbt und anschließend das polymerisierte Aktin durch Färbung mit Phalloidin-Rot sichtbar gemacht. Größenbalken repräsentieren $10\mu\text{m}$.

2.2.4 FBA Färbemethode zur Ermittlung des invasiven Potentials kommensaler *Neisserien*

Da die FBA-Färbemethode unabhängig von Antikörpern funktioniert, sollte sie in Situationen, in denen das invasive Potential von Bakterienstämmen evaluiert werden sollte, aber keine spezifischen Antikörper gegen diese Mikroorganismen zur Verfügung stehen, von großem Nutzen sein. Demgemäß wurde das neue Färbeprotokoll zur Evaluierung der CEACAM-vermittelten Internalisierung von verschiedenen kommensalen *Neisseria* Spezies, für die noch keine kommerziellen Antikörper zur Verfügung stehen und die nicht durch unser polyklonales Antiserum gegen den *N. gonorrhoeae* Stamm MS11 erkannt wurden, verwendet. Verglichen mit den invasiven Opa-exprimierenden *N. gonorrhoeae*, wurden alle vier getesteten kommensalen Spezies, *Neisseria mucosa*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria cinerea* und *Neisseria sicca* nicht von CEACAM-exprimierenden 293T Zellen internalisiert (Abb. 2.5). Alle kommensalen Bakterien in den infizierten Proben waren folglich sowohl mit FITC als auch mit Streptavidin-Alexa647 markiert, wogegen eine Hauptfraktion der opaquen Gonokokken ausschließlich mit FITC markiert war, was auf ihre intrazelluläre

Lokalisation verwies (Abb. 2.5). Diese Ergebnisse wiesen nicht nur eine schnelle und klare Differenzierung zwischen extra- und intrazellulären Bakterien auf, sondern demonstrieren auch die weitläufigen Anwendungsmöglichkeiten der neuen FBA-Färbemethode bei einer Großzahl von Bakterien, gegen die noch keine Antikörper zur Verfügung stehen.

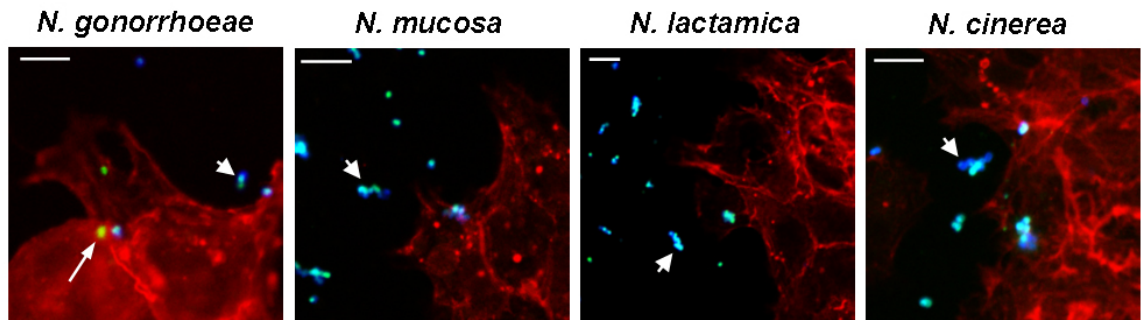


Abb. 2.5 Verwendung des neuen FBA-Färbeprotokolls zur Analyse des invasiven Potentials von kommensalen *Neisseria*. 293T Zellen wurden mit CEACAM3-RFP transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen für 1 h mit FITC- und Biotin-markierten kommensalen *Neisseria mucosa*, *N. cinerea*, *N. lactamica* oder den pathogenen Opa_{CEA}-exprimierenden *N. gonorrhoeae* mit einer MOI 30 infiziert. Die Präparate wurden gemäß des FBA-Protokolls auf extra- (Pfeilkopf) und intrazelluläre (kleiner Pfeil) Bakterien gefärbt. Zusätzlich wurde das Aktin-zytoskelett mittels Phalloidin-Rot sichtbar gemacht. Größenbalken repräsentieren 10 μm .

2.2.5 FBA-Färbung von Gram-positiven *S. aureus*

Um nun die Anwendbarkeit der FBA-Färbemethode auf andere Bakterien als Gram-negative *Neisserien* zu überprüfen, wurde zusätzlich die Invasion von *S. aureus* in humane Zellen untersucht. Vorausgehend konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* fähig ist, Fibronectin und β_1 -Integrine der Wirtszelle zu nutzen um Zugang zu intrazellulären Kompartimenten zu erlangen. Die dazugehörige, nicht pathogene Spezies *S. carnosus* konnte dagegen nicht in eukaryotische Zellen eindringen (Sinha et al., 1999, Fowler et al., 2000, Agerer et al., 2003). Daher wurden beide Spezies der Staphylokokken mit FITC und Biotin markiert und 293T Zellen für 2h infiziert. Abermals konnte durch Behandlung der Präparate laut FBA-Protokoll klar zwischen extrazellulären und intrazellulären Bakterien unterschieden werden (Abb. 2.6). Bei genauerer Betrachtung konnte eine große Fraktion von *S. aureus* innerhalb der humanen Zellen gefunden und daher nicht durch Streptavidin-Alexa647 detektiert werden (Abb. 2.6, kleiner Pfeil). Zusätzlich bestätigte die Co-Färbung mit Phalloidin-Rot eine Akkumulation von polymerisiertem Aktin im Bereich der gebundenen Bakterien (Abb. 2.6, doppelter Pfeilkopf). Im Gegensatz dazu war der nicht pathogene *S. carnosus* ausschließlich außerhalb der Zelle zu lokalisieren und konnte keine

Aktinpolymerisierung stimulieren (Abb. 2.6). Ein vergleichbares invasives Verhalten wurde bei der Verwendung von Antibiotika-Protektions-Assays und Antikörper-abhängigen Färbemethoden festgestellt (Agerer et al., 2003), was wiederum darauf hinweist, dass der Integrin-vermittelte Prozess der Invasion durch die kovalente Modifikation von *S. aureus* durch FITC und Biotin nicht beeinflusst wurde. Zusammengefasst zeigen diese Resultate, dass die neue Antikörper-unabhängige Färbemethode eine bequeme und verlässliche Methode zur Diskriminierung von extra- und intrazellulären Bakterien ist. Zusätzlich ist diese Methode auf eine Vielzahl von Pathogen-Wirtszell-Systemen anwendbar und macht dadurch vergleichende Untersuchungen möglich.

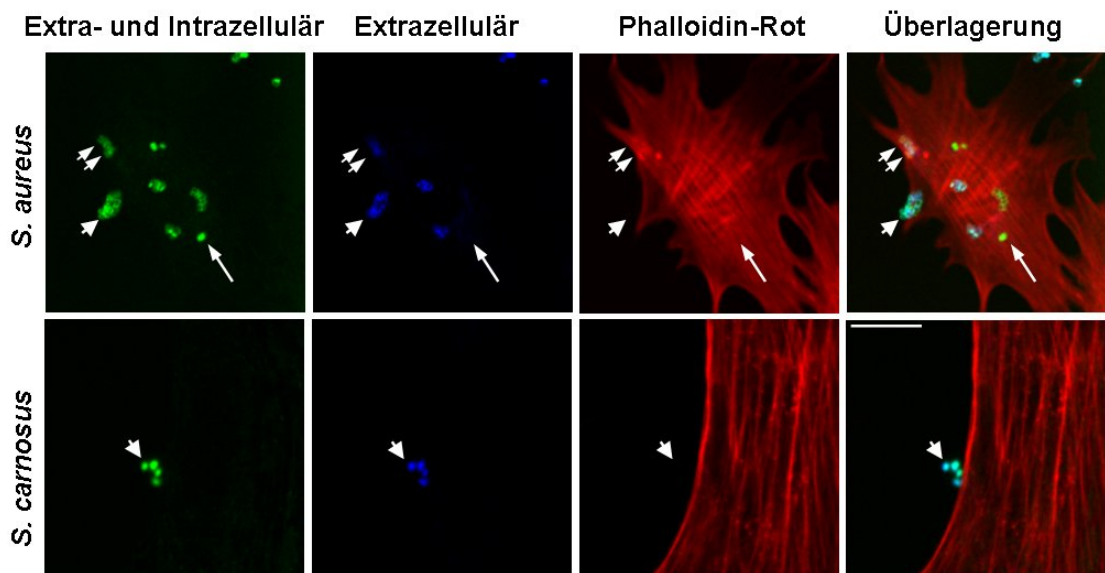


Abb 2.6 Verwendung des neuen FBA-Färbeprotokolls zur Analyse des invasiven Potentials von Gram-positiven Staphylokokken. Mausfibroblasten wurden für 2 h mit dem invasiven *S. aureus* (Cowan) und dem nicht-pathogenen Stamm *S. carnosus* mit einer MOI 40 infiziert. Fixierte Präparate wurden nach dem FBA-Protokoll auf extra- (Pfeilkopf) und intrazelluläre (kleiner Pfeil) Bakterien gefärbt und anschließend das polymerisierte Aktin durch Färbung mit Phalloidin-Rot sichtbar gemacht. Es konnte deutlich eine Aktinpolymerisierung am Ort von zelladhärenten *S. aureus* beobachtet werden (doppelter Pfeilkopf). Größenbalken repräsentieren $10\mu\text{m}$.

2.3 Diskussion

Um die Invasivität von Mikroben abschätzen zu können, ist eine Unterscheidung von extra- und intrazellulären Organismen eine wichtige Voraussetzung. Demzufolge wurden schon einige mikroskopische Methoden in diesem Zusammenhang entwickelt (Heesemann and Laufs, 1985, Drevets and Campbell, 1991, Drevets and Elliott, 1995). In dieser Arbeit wurde eine neue Färbemethode vorgestellt, die einen Vorteil aus der simultanen Markierung der Bakterien mit FITC und Biotin zieht. Die vier Hauptmerkmale dieser neuen Methode sind: (1) die Unabhängigkeit von spezifischen Antikörpern, (2) die starken und spezifischen Signale, (3) die Unnötigkeit der Permeabilisierung von infizierten Zellen sowie (4) das zuverlässige und schnelle Protokoll.

Der offensichtlichste Vorteil des FBA Färbeprotokolls ist die Unabhängigkeit von spezifischen Antikörpern zur Detektion von Bakterien. Dies könnte in Situationen wichtig werden, in denen keine Antiseren gegen einen Mikroorganismus zur Verfügung stehen, wichtig werden. Diese Methode erlaubte uns zum ersten Mal, eine mikroskopische Analyse der CEACAM3-vermittelten Erkennung und Aufnahme von kommensalen *Neisserien* durchzuführen. Mit Hilfe dieser FBA Färbemethode konnte beobachtet werden, dass *N. mucosa*, *N. lactamica*, *N. cinerea* sowie *N. sicca* durch diesen Rezeptor nicht in humane Wirtszellen aufgenommen wurden. Daher könnte die FBA Färbemethode auch für weitere Bakterien-Wirts-Interaktionen in Hinblick auf Rezeptor-vermittelte Aufnahmeprozesse ein nützliches Mittel darstellen.

Anstatt in jedem Fall ein spezifisches Antiserum zu verwenden, erlaubte das FBA Färbeprotokoll zur Darstellung der Aufnahme von diversen Bakterien die Verwendung von identischen Reagenzien. Wie in dieser Arbeit mittels einer großen Bandbreite von Gram-negativen sowie Gram-positiven Bakterien gezeigt werden konnte, sparte man durch die FBA Färbung nicht nur Ressourcen, sondern konnte gleichzeitig verschiedene Proben direkt miteinander vergleichen. Dies war früher durch unterschiedliche Serumqualitäten oftmals problematisch. Schwierigkeiten, die im Zusammenhang mit Antiseren auftraten, wie schlechte Affinität gegenüber den Bakterien oder Kreuzreaktionen mit Wirtszellstrukturen, konnten durch die Direktmarkierung der Bakterien umgangen werden. In solchen Situationen konnte festgestellt werden, dass eine klare Unterscheidung von extra- und intrazellulären Bakterien nach der konventionellen Antikörperfärbung schwierig war, da einerseits intrazelluläre Bakterien nach Permeabilisierung der Zellen nur schwach gefärbt waren, aber andererseits eine Hintergrundfärbung der Wirtszellstrukturen das Verhältnis Signal zu Hintergrund erheblich minderte.

Andererseits basiert das FBA Färbeprotokoll auf der kovalenten Modifikation von bakteriellen Oberflächenstrukturen. Daher könnte die Markierung potentiell in der normalen Adhäsion des Mikroorganismus an die eukaryotische Zelle interferieren. Allerdings konnten keine negativen Effekte von FITC und Biotin auf das invasive Potential von *N. gonorrhoeae* oder *S. aureus* bei den verwendeten Konzentrationen festgestellt werden. Allerdings sollte man in allen Fällen, in denen eine solche Beeinflussung nicht ausgeschlossen werden kann, vorsichtig sein und entsprechende Kontrollen durchführen. Unsere Resultate zeigten klar, dass diese Methode sowohl auf Gram-negative als auf Gram-positive Bakterien anwendbar war und zu fast identischen Resultaten im Vergleich zur konventionellen doppelzyklischen Antikörper-basierende Färbemethode führte.

Ein weiterer Vorteil, der beobachtet werden konnte, war die gesteigerte Signalintensität der direkt markierten Mikroorganismen, speziell der intrazellulären Fraktion. Dies könnte an der gleichmäßigen Markierung der Bakterienpopulation kurz vor der Infektion während des FBA Protokolls liegen, während intrazelluläre Bakterien bei der konventionellen doppelzyklischen Antikörperfärbung für Antikörper nach Permeabilisierung der Wirtszellmembran weitaus weniger zugänglich sind. Demgemäß waren nach Verwendung des FBA Protokolls die Detektierung von intrazellulären Bakterien sowie die Unterscheidung zwischen extra- und intrazellulären Mikroorganismen in aufeinanderfolgenden Experimenten konstant gut und daher sehr verlässlich. Als Fluoreszenzfarbstoffe bei der FBA Färbung wurde FITC und Alexa 647 verwendet, allerdings existieren noch viele andere Farbstoffe mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften. Daher kann das FBA Protokoll verschiedentlich modifiziert werden, zum Beispiel durch die Verwendung von reaktiven Rhodaminderivaten zur kovalenten Markierung der Bakterien oder mit Hilfe eines der vielen fluoreszenzmarkierten Avidinderivaten, um auf die jeweilige mikroskopische Ausrüstung bestens abgestimmt zu sein. Im vorliegenden Fall konnten die besten Resultate erzielt werden, wenn zur differenziellen Markierung der Bakterien FITC und Alexa 647 gewählt wurden, da ihre Spektren weit auseinander liegen. Dadurch konnte trotz starker Markierung ein Durchstrahlen der fluoreszenten Signale bei separaten Filtersets verhindert werden. Es ist jedoch anzumerken, dass Proben, die FITC-markierte Bakterien enthalten, so bald wie möglich mikroskopisch ausgewertet werden sollten, da die FITC Signale bei Lagerung über eine Woche (auch bei 4°C und im Dunkeln) stark abnehmen.

Ein interessanter Aspekt der neuen Methode ist das Wegfallen der Zellpermeabilisierung zur Diskriminierung zwischen extra- und intrazellulären Bakterien. Normalerweise wurde die Permeabilisierung der Wirtszellmembran durch Detergenzien wie Saponin, Tri-

ton X-100 oder Cholesterolchelatoren wie Filipin erreicht (Dehio et al., 1997, Hauck et al., 1998, Holtta-Vuori et al., 2002). Jedoch zeigten unsere eigenen Beobachtungen, dass es bei Verwendung der konventionellen doppelzyklischen Antikörperfärbung zu Unterschieden in der Zellpermeabilisierung als Folge von Variationen bei aufeinander folgenden Experimenten kam. Da das neue FBA Färbeprotokoll nicht auf den Schritt der Zellpermeabilisierung angewiesen ist, wurde dadurch eine potentielle Quelle der experimentellen Variation eliminiert. Tatsächlich erfordert die Markierung der Bakterien vor Infektion nach dem FBA Färbeprotokoll einen zusätzlichen Schritt. Jedoch bleibt die aufzuwendende Zeit für die Erstellung der mikroskopischen Proben mittels der neuen Methode verglichen mit den herkömmlichen Methoden deutlich niedriger (Abb. 2.1). Bei der Gegenüberstellung der doppelzyklischen Antikörper-Färbemethode mit dem neuen FBA- Protokoll zeigte sich eine Zeitersparnis von 50 % bei der Fertigstellung der Proben nach der neuen Methode. Dies ist hauptsächlich auf den fehlenden zweiten Färbezyklus zurückzuführen. Obwohl die meiste Zeit bei der Unterscheidung von extra - und intrazellulären Bakterien am Mikroskop und/oder bei der Auswertung am Computer verbracht werden musste, erlaubte es das schnelle FBA Protokoll, mehrere Proben parallel herzustellen. Ebenfalls wurde dabei die Anzahl der auszuführenden Schritte reduziert und somit die Zeit, in der die Proben dem Licht ausgesetzt waren. Dies führte zu einer besseren Qualität der markierten Proben.

Zusammengefasst bot das neue Färbeprotokoll zur Diskriminierung von extra- und intrazellulären Bakterien eine bequeme und zuverlässige Alternative zu existierenden Färbetechniken. Zusätzlich öffnet dieser antikörperunabhängige Ansatz neue Wege, um das invasive Potential nun auch von unkonventionellen oder neu erscheinenden Pathogenen ermitteln zu können.

3 Integrin vermittelte Invasion von *Staphylococcus aureus* in humane Zellen ist auf Kinasen der Src Familie angewiesen

3.1 Einleitung

Der Gram-positive Mikroorganismus *Staphylococcus aureus* ist die häufigste Ursache von so genannten nosokomialen Infektionen (Steinberg et al., 1996, Lowy, 1998). Die Einführung von Staphylokokken in den Körper ist durch medizinische Implantate, die eine ideale Oberfläche zur Kolonisation und Ausgangspunkt für spätere Verbreitung darstellen, erleichtert. Diese Tatsache, sowie häufig auftretende multiple Antibiotikaresistenzen sind die Ursache der immer schwieriger werdenden Behandlungsmethoden.

Insbesondere mittels der Zellwand assoziierten Fibronectinbindeproteine A und B (FnBPA und FnBPB) können die Bakterien eine enge Bindung mit dem ECM Protein Fibronectin (Fn) eingehen (Flock et al., 1987, Jonsson et al., 1991). Multiple Fn-Bindedomänen des bakteriellen Proteins binden mit verlängerten antiparallelen β -Strängen an Typ 1 Module im aminoterminalen Teil von Fn (Schwarz-Linek et al., 2003). Da Fn ein allgemeiner Bestandteil der extrazellulären Matrix ist, sowie frei im Medium vorkommt, vermutet man, dass Fn-Ablagerung auf Fremdkörpern wie metallischen Knochenimplantaten das Anheften von *S. aureus* an medizinische Implantate begünstigt (Fischer et al., 1996). Tatsächlich konnte kürzlich gezeigt werden, dass Fn als molekulare Brücke fungiert, indem es FnBP-exprimierende *S. aureus* mit dem Integrin $\alpha_5\beta_1$ auf der Oberfläche von humanen Zellen verbindet (Joh et al., 1999). Diese Interaktion gewährleistet nicht nur eine feste Bindung von *S. aureus* an seine eukaryotische Wirtszelle, sondern fördert die Internalisierung der Mikroorganismen in Epithel- und Endothelzellen (Sinha et al., 1999, Dziewanowska et al., 1999, Jett and Gilmore, 2002) sowie in Maus Fibroblasten (Fowler et al., 2000). Interessanterweise sind β_1 -Integrine bekannt für ihre Rolle in der Zelladhäsion sowie für ihre Fähigkeit zur intrazellulären Signalweiterleitung als Antwort auf die Anheftung von Zellen an die extrazelluläre Matrix (Schwartz and Ginsberg, 2002). Jedoch sind die meisten Liganden für diese Integrine immobilisiert und β_1 -Integrine werden nicht als endozytische Rezeptoren gesehen. Daher ist noch nicht allzu viel über intrazelluläre Signale, die für diesen Integrin-vermittelten Internalisierungsprozess verantwortlich sind, bekannt.

In diesem Kapitel wurden intrazelluläre Signale, ausgehend von der Integrin β_1 -ver-

mittelten Aufnahme von *S. aureus*, untersucht. Es konnte eine bedeutende Rolle der Phosphotyrosinkinasen und des Aktin Zytoskeletts aufgezeigt, sowie die Phosphotyrosinkinasen der Src-Familie als wichtigen Faktor bei der Vermittlung von Signalen, die zur Invasion von *S. aureus* führen, identifiziert werden. Src Kinasen werden nur aufgrund einer Infektion mit pathogenen *S. aureus*, nicht aber mit nichtpathogenen *S. carnosus* aktiviert. Pharmakologische oder genetische Beeinflussung der Funktion von Src Kinasen verringert deutlich die bakterielle Internalisierung. Bedeutend ist ebenfalls, dass Src-defiziente Zellen resistent gegenüber der Invasion von *S. aureus* sind, was die Bedeutung der wirtseigenen Phosphotyrosin-Kinasen der Src Familie für die Integrin β_1 -vermittelte Aufnahme von *S. aureus* noch verdeutlicht.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 *S. aureus* dringt in humane Zellen ein

Es wurde beschrieben, dass *S. aureus* fähig ist in humane nicht professionelle Phagozyten wie Epithelzellen und Fibroblasten einzudringen (Sinha et al., 1999, Fowler et al., 2000). Tatsächlich nahmen humane 293T Zellen *S. aureus* Cowan, ein klinisches Isolat eines septischen Arthritispatienten, bereits nach 60 min Infektion auf. Die Anzahl von internalisierten Bakterien, gemessen in einem Gentamicin/Lysostaphin Protektions Assay, stieg über einen Zeitraum von 4 h weiter an (Abb. 3.1). Bei einer Infektionsdauer größer als 4 h, war eine toxische Schädigung der Zellen festzustellen. Diese Schädigung der Zellen nach längerer Inkubationszeit wurde auf das Wachstum der Bakterien und deren Freisetzung von Toxinen zurückgeführt. Folglich wurde die Infektionsdauer bei Internalisierungsassays auf 2 h beschränkt. Interessanterweise wurde eine kommensale Spezies *S. carnosus*, von den Zellen nicht aufgenommen (Abb. 3.1), was auf einen spezifischen pathogen-induzierten Vorgang hinweist. Bakterien, die mit Gentamicin/Lysostaphin in Abwesenheit von Zellen behandelt wurden, konnten später nicht mehr detektiert werden. Dies zeigte, dass sowohl *S. aureus* als auch *S. carnosus* sensitiv gegenüber der Antibiotika Behandlung waren und somit nur intrazelluläre Bakterien die Anwesenheit von Gentamicin/Lysostaphin überleben konnten (Abb. 3.1).

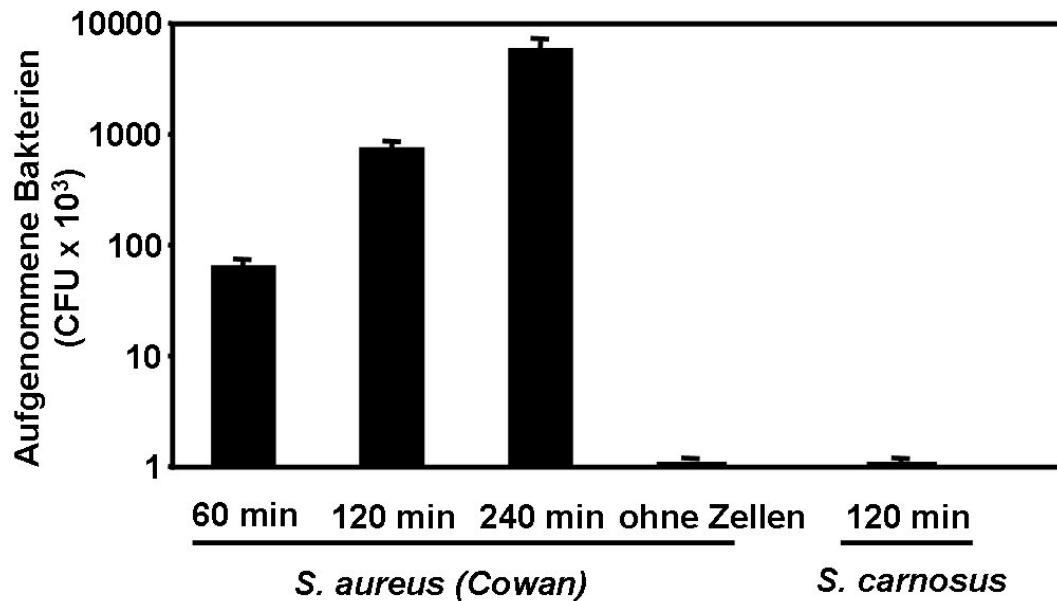


Abb. 3.1 *S. aureus* (Cowan) wurde von humanen 293T Zellen internalisiert. Die Aufnahme von *S. aureus* (Cowan) und *S. carnosus* wurde nach angegebenen Zeiten mittels eines Gentamicin/Lysostaphin Protektionsassays gemessen. Die Graphen repräsentieren einen Mittelwert \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen dreifach angesetzten Experimenten. Als weitere Kontrolle wurde *S. aureus* (Cowan) in der Abwesenheit von Zellen mit Gentamicin/Lysostaphin behandelt.

Mittels Fluoreszenzfärbung von infizierten Zellen konnten intrazelluläre *S. aureus* durch die Kolokalisation der Bakterien mit h-lamp-2, einem Marker des späten Endosoms, nachgewiesen werden (Abb. 3.2). Im Gegensatz dazu konnte *S. carnosus* in infizierten Ansätzen nur extrazellulär detektiert werden, da keine Kolokalisation mit h-lamp-2 festgestellt werden konnte (Abb. 3.2). Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass eine Internalisierung von *S. aureus* Cowan in humane nicht professionelle Phagozyten stattfindet und bestätigten somit die Ergebnisse des Gentamicin/Lysostaphin Protektions Assays.

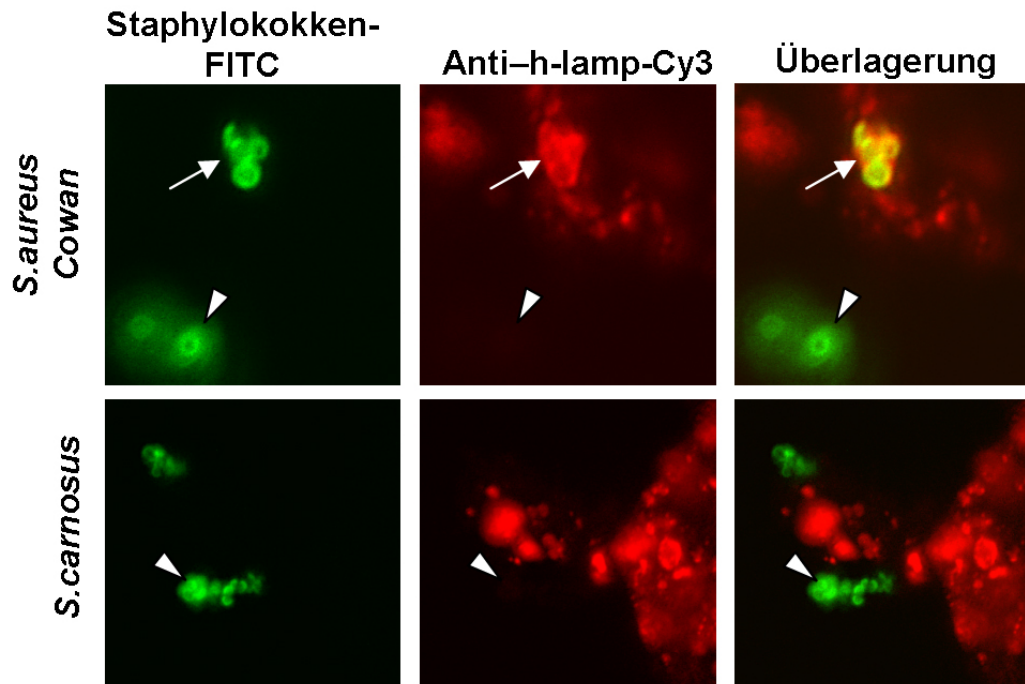


Abb. 3.2 Kolokalisation von intrazellulären *S. aureus* (Cowan) mit dem Lysosomen-assoziierten Membranprotein 2 (h-lamp 2). Immunofluoreszenzfärbung von Zellen, die 2h mit FITC-markierten *S. aureus* (Cowan) (obere Reihe) oder *S. carnosus* (untere Reihe) infiziert waren. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen h-lamp 2 markiert. Mittels konfokaler Mikroskopie konnten extrazelluläre Bakterien (Pfeilkopf) sowie intrazelluläre *S. aureus* (Cowan), die mit dem späten endosomalen/phagosomalen Marker h-lamp 2 kolokalisieren (kleiner Pfeil), detektiert werden.

3.2.2 Die Invasion von *S. aureus* Cowan wird durch das Kontaktieren von FnBP an zelluläre Integrine vermittelt

Kürzlich wurde berichtet, dass die Invasion von *S. aureus* in humane Zellen überwiegend durch das zellwandverbundene FnBP ausgelöst wird, das Fn zur Oberfläche der Bakterien rekrutiert (Fowler et al., 2000, Sinha et al., 1999, Dziewanowska et al., 1999). Übereinstimmend konnte gezeigt werden, dass eine FnBP-A und FnBP-B Doppelmutante des *S. aureus* Stammes 8325-4 in seiner Invasionsfähigkeit *in vitro* stark eingeschränkt war (Fowler et al., 2000, Sinha et al., 1999, Dziewanowska et al., 1999). Ferner konnten Fn-Bindungsdomänen, abgeleitet aus dem FnBP-A, die Rekrutierung von Fn an die bakterielle Oberfläche verhindern und somit die Anheftung an und Invasion in humane Zellen behindern (Massey et al., 2001, Joh et al., 1999). Um zu untersuchen, inwiefern die Internalisation des *S. aureus* Cowan Stammes auf die FnBP abhängigen Interaktionen angewiesen ist, wurde in Anwesenheit der B-Domäne von FnBP-A (ein GST-Fusionsprotein, die AS 303-568 von FnBP-A umfassend) ein Gentamicin/Lysostaphin Protektions Assay

durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass FnBP-vermittelte Ereignisse durch diese Domäne blockiert werden konnten (Massey et al., 2001). Tatsächlich konnte nach Zugabe von GST-FnBPA-B die Internalisierung von *S. aureus* Cowan in humane Epithelzellen dosisabhängig inhibiert werden, wohingegen Zugabe von GST alleine keinen Einfluss auf die bakterielle Invasion zeigte (Abb. 3.3).

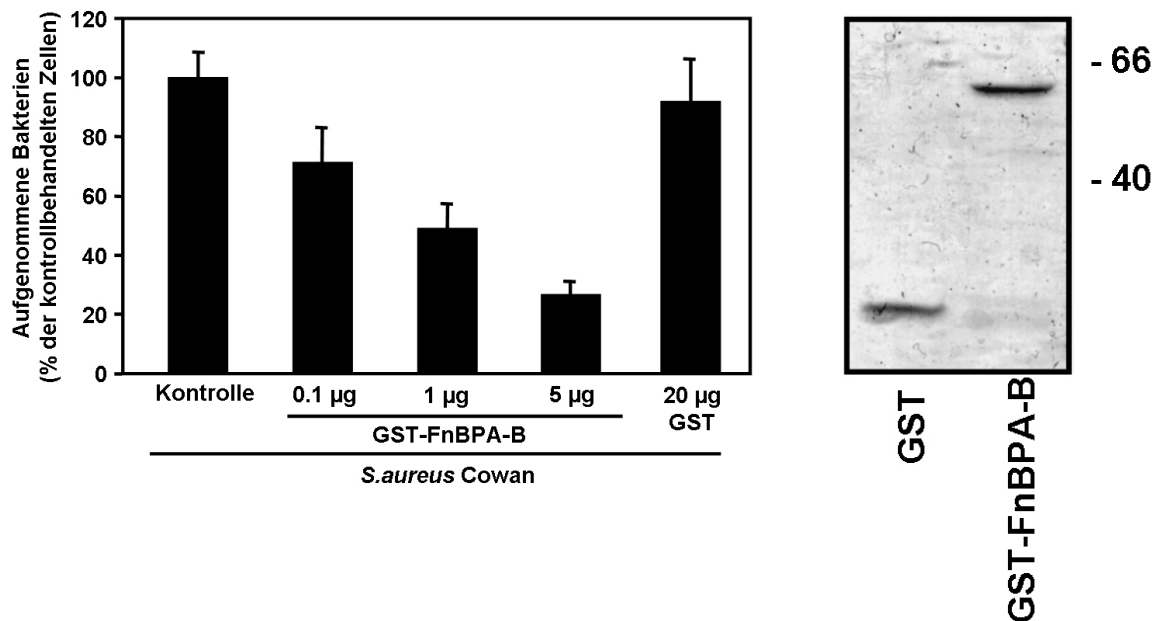


Abb. 3.3 Die Aufnahme von *S. aureus* (Cowan) war von FnBPs, die indirekt an Wirtszell-Integrine binden, abhängig. 293T Zellen wurden in Anwesenheit eines GST-Fusionsproteins der B-Domäne des FnBPA (GST-FnBPA-B) in angegebenen Konzentrationen oder von 20 µg GST für 2 h mit *S. aureus* (Cowan) infiziert. Die bakterielle Invasion wurde mittels eines Gentamicin/Lysostaphin Protektionsassays ermittelt. Die Graphen repräsentieren einen Mittelwert \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen dreifach angesetzten Experimenten. Rechts daneben zeigt ein Coomassie Blau-gefärbtes SDS-PAGE Gel jeweils 5 µg von GST oder GST-FnBPA-B.

Fn fungiert als Brücke und indirekte Verbindung zwischen Bakterien und Integrinen auf humanen Zellen. Diese Aussage unterstützend konnte die Internalisierung von *S. aureus* effizient durch monoklonale anti- β_1 Integrin Antikörper inhibiert werden, wogegen ein Kontrollantikörper gegen ICAM-1 keinen Einfluss hatte (Abb. 3.4).

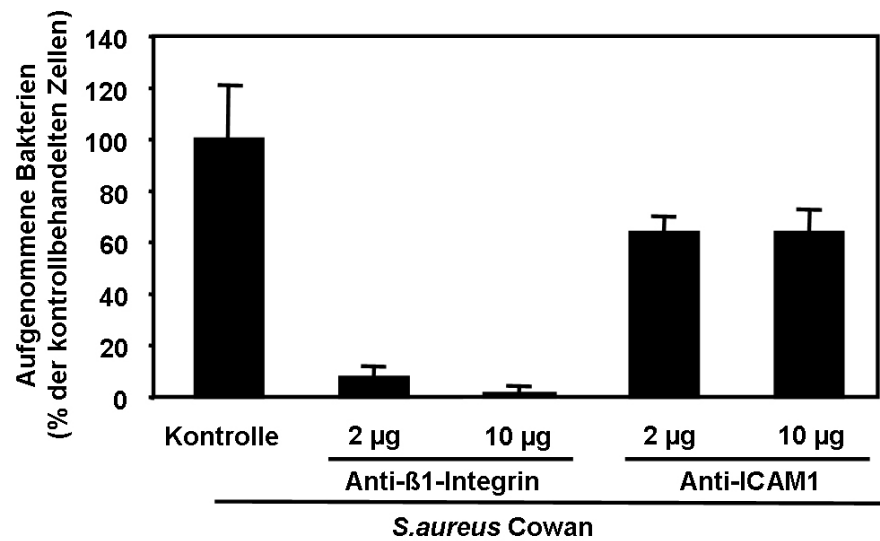


Abb. 3.4 β_1 -Integrine sind für die Internalisierung von *S. aureus* (Cowan) von großer Bedeutung. 293T Zellen wurden ohne oder in Anwesenheit von 2 µg oder 10 µg monoklonalen Antikörpern gegen β_1 -Integrine oder gegen ICAM 1 für 2 h mit *S. aureus* (Cowan) infiziert. Die bakterielle Aufnahme wurde mittels eines Gentamicin/Lysostaphin Protektionsassays ermittelt. Die Graphen repräsentieren einen Mittelwert \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen dreifach angesetzten Experimenten.

Ergänzend konnte gezeigt werden, dass ein GRGDS-Peptid, ein kompetitiver Inhibitor von β_1 -Integrinen, dosisabhängig die Aufnahme von *S. aureus* blockieren kann (Abb. 3.5), wohingegen ein reverses Kontrollpeptid (SDGRG) keinen Einfluß hatte. Zusammenfassend unterstützen die neu gewonnenen Daten die These, dass Invasion von *S. aureus* in humane Zellen auf FnBP-Fn- β_1 -Integrin Interaktionen angewiesen ist.

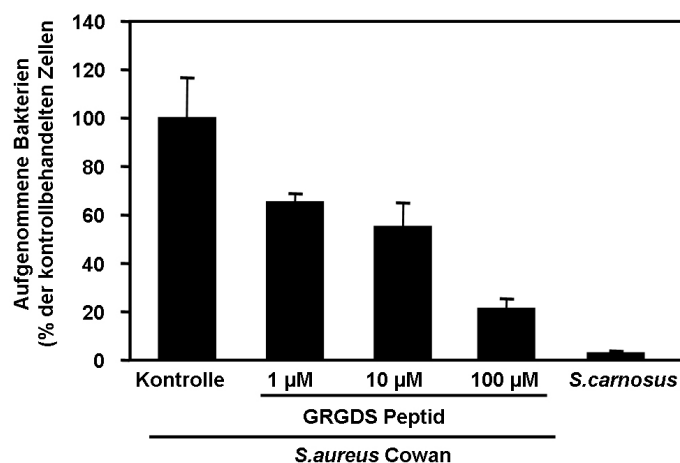


Abb. 3.5 Durch aktives Interferieren in die Bindung von FN an β_1 -Integrine wird die Aufnahme von *S. aureus* (Cowan) blockiert. Es wurde ein Gentamicin/Lysostaphin Protektionsassay in Anwesenheit eines GRGDS-Peptides in den angegebenen Konzentrationen durchgeführt. Die Zellen wurden dafür 2 h mit *S. aureus* (Cowan) infiziert. Die Graphen repräsentieren einen Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen dreifach angesetzten Experimenten.

3.2.3 Das Wirtszell-Aktinzytoskelett ist für die Aufnahme von *S. aureus* verantwortlich

Integrine sind mit verschiedenen intrazellulären Signalwegen verbunden. Daher stellte sich die Frage, welche Integrin-initiierten Signale zur Internalisierung von *S. aureus* führen. Pharmakologische Inhibition der Polymerisation des Aktin Zytoskeletts durch Cytochalasin D führte zur effizienten Erniedrigung der Invasion von *S. aureus*, was darauf hinwies, dass die Verknüpfung von Aktin Zytoskelett und Integrinen zur Aufnahme der Mikroorganismen benötigt wird (Abb. 3.6).

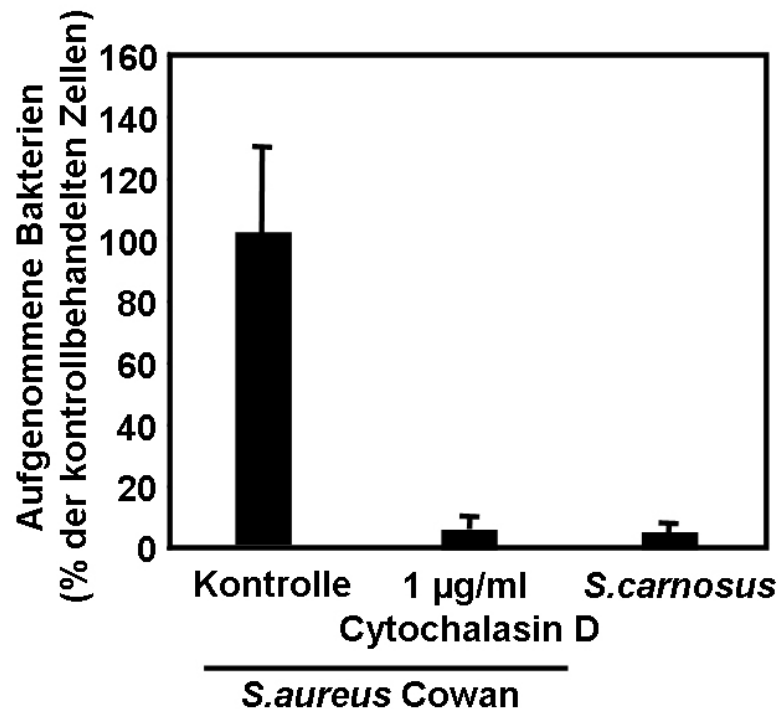


Abb. 3.6 Die Invasion von *S. aureus* (Cowan) ist auf das Aktin Zytoskelett angewiesen. 293T Zellen wurden für 2 h in Anwesenheit von 1 µg/ml Cytochalasin D mit *S. aureus* (Cowan) oder *S. carnosus* infiziert. Intrazelluläre Bakterien wurden mit Hilfe eines Gentamicin/Lysostaphin Protektionsassays ermittelt. Die Graphen repräsentieren einen Mittelwert \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen dreifach angesetzten Experimenten.

Um nun die Dynamik des Aktin Zytoskeletts während der Infektion zu untersuchen, wurden 293T Zellen mit einem GFP-fusionierten Aktinkonstrukt transfiziert und für eine halbe Stunde mit *S. aureus* und entsprechend mit *S. carnosus* infiziert. Durch konfokale Mikroskopie ließ sich eine lokale Akkumulation von polymerisiertem Aktin in der Nähe von gebundenen *S. aureus* feststellen (Abb. 3.7). Diese Aktinpolymerisierung scheint nur transient eine Rolle zu spielen, da sie nur während einer kurzen Zeitphase (20-60 min),

der Initialphase, zu beobachten war. Im Gegensatz dazu konnte keine Aktinpolimerisation in Kontaktzonen von *S. carnosus* und 293T Zellen festgestellt werden (Abb. 3.7). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die bakterielle Invasion, beginnend mit dem Binden von *S. aureus* an Wirtszellintegrine, dynamische Umlagerungen des Aktin Zytoskeletts zur Folge hat.

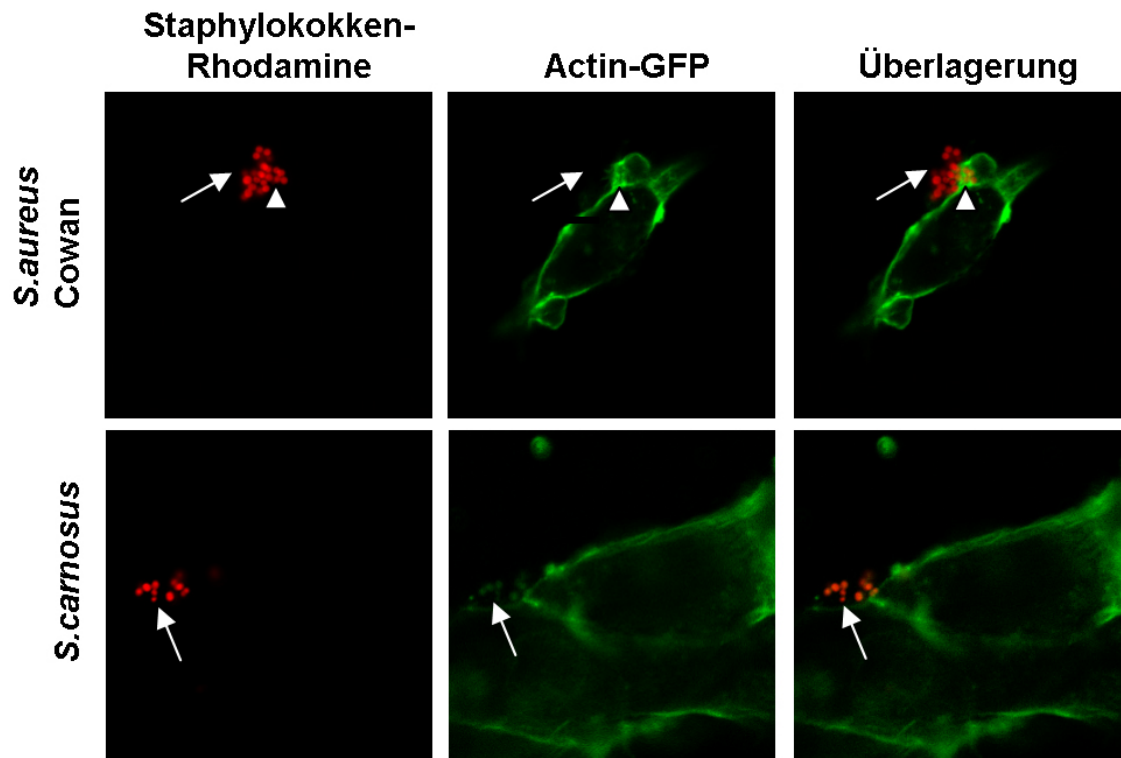


Abb. 3.7 Lokale Akkumulation von Aktin am Ort von zellgebundenen *S. aureus* (Cowan). Es wurden mittels konfokaler Laserskanningmikroskopie GFP-Aktin exprimierende 293T Zellen, die mit Rhodamin-markierten *S. aureus* (Cowan) oder *S. carnosus* infiziert waren, beobachtet. Der Pfeilkopf deutet auf die Akkumulationen von F-Aktin am Ort von zellgebundenen *S. aureus*.

3.2.4 Invasion von *S. aureus* Cowan benötigt die Aktivität von Protein-Tyrosin Kinasen des Wirtes

Da es Integrinen an intrinsischer Enzymaktivität fehlt, treten bei Integrinclustern in Orten der zellulären Adhäsion vermehrt unterschiedliche Signalezyme auf, wie Phosphotyrosinkinase, die integrininduzierte Signale weiter in die Zelle leiten, auf (Aplin et al., 1998). Tatsächlich ist gesteigerte Protein-tyrosin-phosphorylierung eine der ersten zellulären Antworten auf eine Integrinstimulierung. Um nun die Bedeutung von zellulären

Proteinkinasen für die Invasion von *S. aureus* festzustellen, wurde ein allgemeiner Inhibitor der PTK-Aktivität verwendet. Die Aufnahme von *S. aureus* konnte dosisabhängig, nach Behandlung von 293T Zellen mit steigenden Konzentrationen an Genistein, blockiert werden. Dieses Ergebnis unterstützt die Ansicht, dass Integrin-induzierte wirtseigene PTK eine kritische Rolle bei der Regulation der Aufnahme von *S. aureus* spielen (Abb. 3.8).

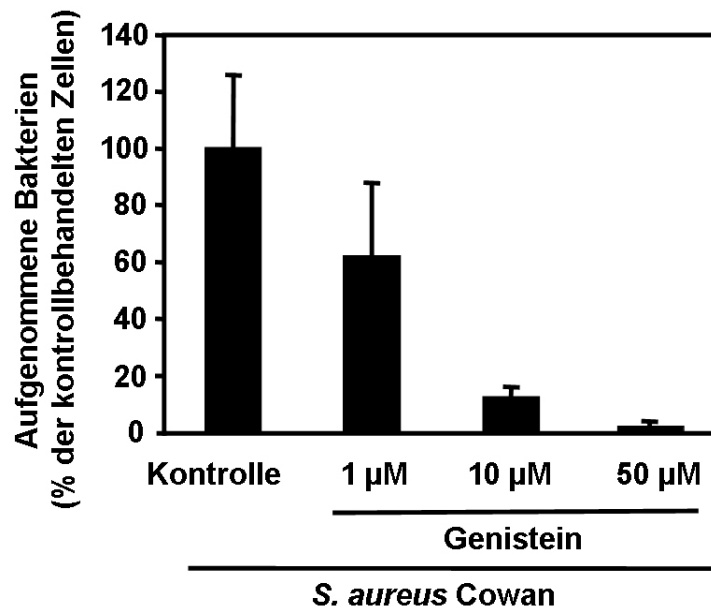


Abb. 3.8 Die Tyrosinkinaseaktivität der Wirtszelle ist für die Internalisierung von *S. aureus* essenziell. 293T Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Genistein (einem allgemeinen Inhibitor der Tyrosinkinase) vorbehandelt und für 2 h mit *S. aureus* infiziert. Intrazelluläre Bakterien wurden mittels eines Gentamicin/Lysostaphin Protektionsassays ermittelt. Die Graphen repräsentieren einen Mittelwert \pm von zwei unabhängigen dreifach angesetzten Experimenten.

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene wirtseigene PTK als Antwort auf Integrin-Stimulierung durch ECM Proteine aktiviert werden (Parsons and Parsons, 1997, Lewis et al., 1996). Inwiefern spezielle integrinstimulierte Kinasen bei der Aufnahme von *S. aureus* involviert sind, wurde mittels gezielter Hemmung von PTK der Src Familie sowie der PTK c-Abl durch spezifische Inhibitoren PP2 und AG957 (Abb. 3.9A) getestet. Bei Inhibition der PTK der Src Familie durch PP2 konnte ein starker Rückgang der Aufnahme von *S. aureus* verzeichnet werden, wohingegen AG957 keinen Effekt zeigte (Abb. 3.9A). PP2 hemmte die Internalisierung des Pathogenen dosisabhängig, resultierend in einem Rückgang von 90 % bei einer Konzentration von 10 µM Inhibitors (Abb. 3.9B). Diese Ergebnisse wiesen auf eine Involvierung von Kinasen der Src Familie bei der Integrin-vermittelten Aufnahme von *S. aureus* hin.

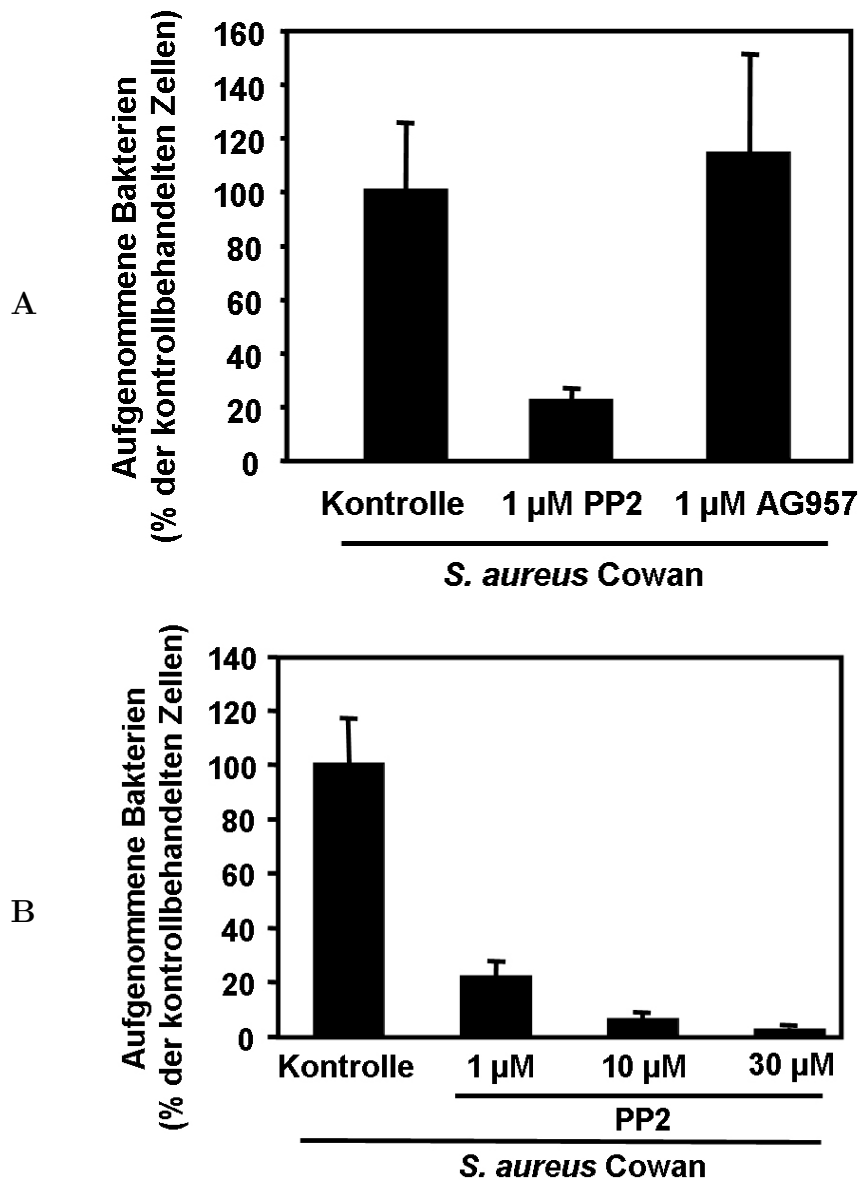


Abb. 3.9 Die Tyrosinkinase Src spielt für die Aufnahme von *S. aureus* eine besondere Rolle. Vor der Infektion wurden 293T Zellen mit 1 µM PP2 (Inhibitor der Familie der Src Kinasen) oder mit 1 µM AG957 (Inhibitor von c-Abl) behandelt (A). Hier wurden vor der Infektion mit *S. aureus* die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen an PP2 vorbehandelt (B). Bei beiden Experimenten wurden nach 2 h Infektion intrazelluläre Bakterien mittels Gentamicin/Lysostaphin Protektionsassays ermittelt. Die Graphen repräsentieren einen Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen dreifach angesetzten Experimenten.

3.2.5 Die Aktivität der Src Kinase ist essentiell für die Integrin-vermittelte Aufnahme von *S. aureus*

Als nächsten Schritt wurde ein genetischer Ansatz zur weiteren Bestätigung der Rolle von Kinasen der Src Familie für die Invasion von *S. aureus* gewählt. Die C-terminale

Src Kinase (Csk) fungiert als ein negativer Regulator der Aktivität von Src PTK, da dabei Src an der regulativen Stelle Tyr-529 (Tyr-527 in c-Src vom Huhn) phosphoryliert wird. Bei Überexpression von Csk wurde gezeigt, dass eine inhibitorische Wirkung auf die Aktivität der Src PTK besteht, sowie Src PTK-abhängige zelluläre Ereignisse blockiert wurden (Imamoto et al., 1993). Daher wurden 293T Zellen transient mit einem Expressionsplasmid transfiziert, das für Wildtyp Csk (Csk WT) oder zur Kontrolle eine kinase-inaktive Form von Csk (Csk K222M) codierte. In einem Gentamicin/Lysostaphin-Protektionsassay konnte bestätigt werden, dass Überexpression von Csk WT die Internalisierung von *S. aureus* um 45 % im Vergleich zu Zellen transfiziert mit einem leeren Kontrollvektor (pcDNA) vermindert (Abb. 3.10). Gleichzeitig konnte die kinase-inaktive Form von Csk, obwohl in gleichen Mengen exprimiert, die Invasion der Staphylokokken nicht beeinflussen (Abb. 3.10). Dies unterstützt wiederum die Hypothese, dass die Aktivität der Src-Kinasen für die Integrin-vermittelte Aufnahme von *S. aureus* unerlässlich ist. Wichtig ist, noch darauf hinzuweisen, dass das verwendete Transfektionsprotokoll zu einer transienten Transfektionsrate von 60-70 % der Zellpopulation führte, was mittels FACS Analyse von GFP-transfizierten 293T-Zellen gemessen wurde. Daher korrelierten 45 % Reduktion der Invasionsrate von *S. aureus* in der Gesamtheit von transfizierten Zellen mit 60-70 % Reduktion der Aufnahme in der transfizierten Zellpopulation.

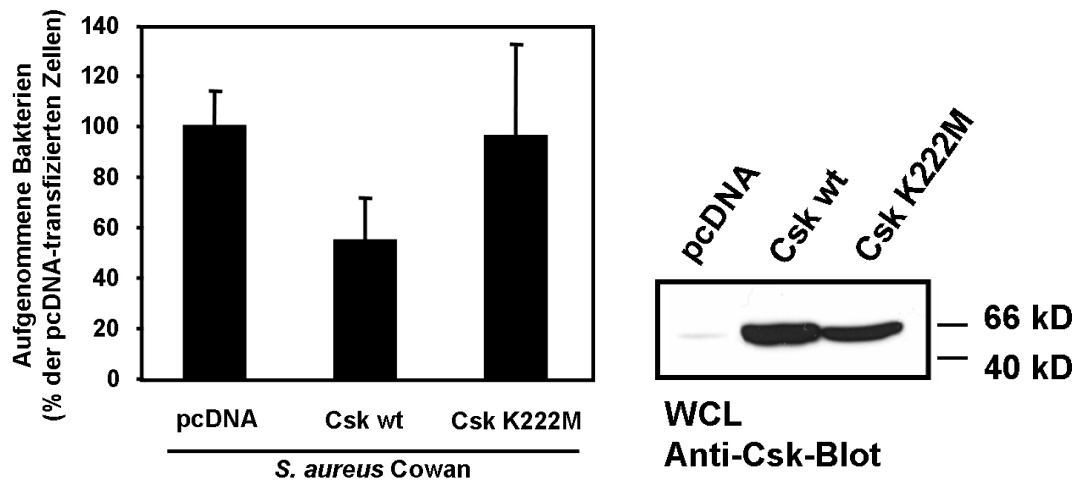


Abb. 3.10 Das Eingreifen in die Funktion der Src Kinase blockiert die Invasion von *S. aureus*. 293T Zellen wurden transient mit einem Konstrukt transfiziert, das für die C-terminale wildtyp Src Kinase (Csk WT), für eine kinase-inaktive Form von Csk (Csk K222M) oder für einen leeren Kontrollvektor (pcDNA) kodiert. Transfizierte Zellen wurden in einem Gentamicin/Lysostaphin Protektionsassays mit *S. aureus* (Cowan) eingesetzt. Die Graphen repräsentieren einen Mittelwert \pm von zwei unabhängigen dreifach angesetzten Experimenten. Western Blot Analysen von Ganzzell-lysaten (WCL; *whole cell lysate*) der transfizierten Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen Csk demonstrieren jeweils die Expression des transfizierten Csk.

Um diese Erkenntnisse zu unterstützen, wurde eine dominant-negative, Kinase-inaktive Version von c-Src (Src K297M) verwendet und in 293T Zellen überexprimiert. Bemerkenswerterweise zeigten Zellen, die Src K297M exprimierten einen deutlichen Rückgang bei der Aufnahme von *S. aureus* (Abb. 3.11). Dies war wiederum ein Hinweis auf die Bedeutung der Src PTK Aktivität bei der Integrin-vermittelten Aufnahme von *S. aureus* und bestätigte unsere vorhergehenden Resultate durch den pharmakologischen Inhibitor PP2 sowie durch die Überexpression von Csk.

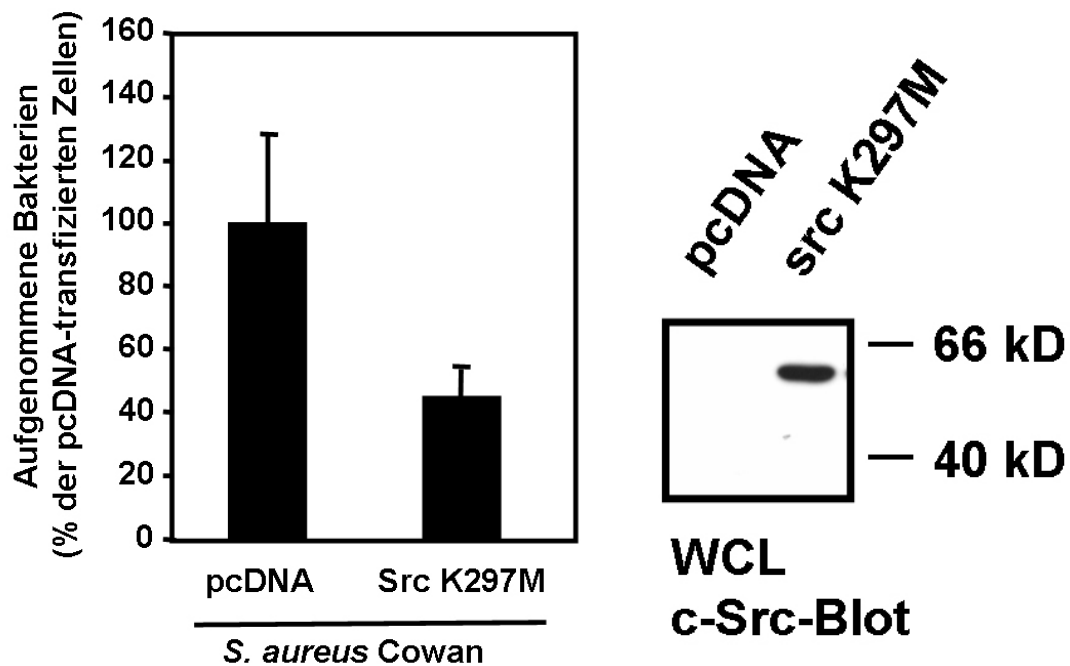


Abb. 3.11 Die Src Aktivität ist für die Integrin-vermittelte Internalisierung von *S. aureus* wichtig. 293T Zellen wurden transient mit einem leeren Kontrollvektor (pcDNA) oder einer kinase-inaktiven Form von c-Src (Src K297M) transfiziert und mit *S. aureus* (Cowan) infiziert. Die Anzahl der internalisierten Bakterien wurde mit Hilfe eines Gentamicin/Lysostaphin Protektionsassays ermittelt. Die Graphen repräsentieren einen Mittelwert \pm von drei unabhängigen dreifach angesetzten Experimenten. Western Blot Analysen von Ganzzell-lysaten der transfizierten Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen c-Src verifizierten die Expression des transfizierten Src-Konstruktes.

3.2.6 Src-defiziente Zellen sind resistent gegenüber der Invasion von *S. aureus*

Da Src PTK bislang eine essentielle Rolle bei der Integrin-vermittelten Aufnahme von *S. aureus* spielten, wurde vermutet, dass Src-defiziente Zellen resistent gegenüber Invasion von Staphylokokken sein sollten. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden Fibroblasten aus Src, Yes und Fyn-defizienten Mausembryonen (SYF-Zellen (Klinghoffer et al., 1999)) verwendet. SYF Zellen fehlen alle drei wichtigen Kinasen der Src-Familie, die normalerweise in diesem Zelltyp exprimiert werden. Als Kontrolle wurden c-Src re-exprimierenden SYF Zellen (SYF + c-Src) verwendet. Wichtig zu erwähnen ist, dass SYF + c-Src Fibroblasten *S. aureus* mit gleicher Kinetik aufnehmen konnten, wie bei 293T Zellen beobachtet (Abb. 3.12). Ebenso waren die absoluten Zahlen von *S. aureus*, die nach einer Gentamicin/Lysostaphin-Behandlung aus SYF + c-Src Fibroblasten bestimmt wurden vergleichbar mit Zahlen von infizierten und Gentamicin/Lysostaphin-behandelten 293T Zellen. Wiederum konnte *S. carnosus* nicht von SYF + c-Src Zellen internalisiert werden,

was darauf hinwies, dass Invasion in Fibroblasten ein Prozess ist, der ausschließlich von Pathogenen induziert werden kann (Abb. 3.12).

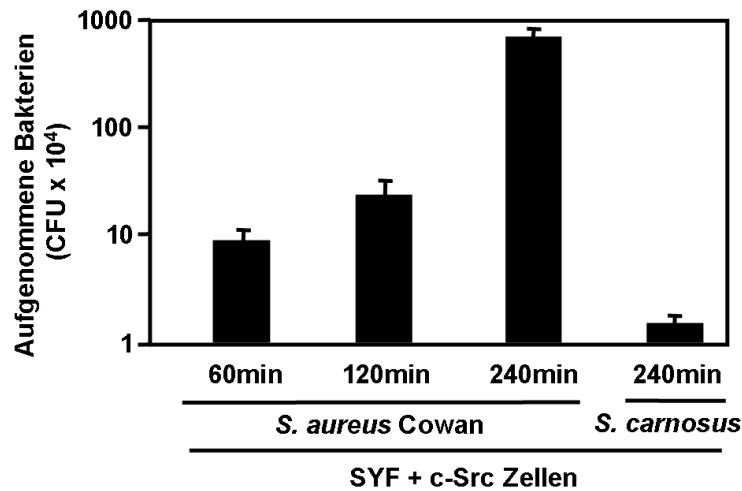


Abb. 3.12 Maus-Fibroblasten nehmen *S. aureus* ebenso effektiv auf, wie humane Epithelzellen. In einem Gentamicin/Lysostaphin Protektionsassay wurde die Invasion von *S. aureus* (Cowan) und *S. carnosus* in SYF + c-Src Fibroblasten nach angegebenen Zeiten gemessen. Die Graphen repräsentieren einen Mittelwert \pm von zwei unabhängigen dreifach angesetzten Experimenten.

Bedeutenderweise konnten SYF-defiziente Zellen, eingesetzt in einem Infektionsassay mit *S. aureus*, die Staphylokokken nur in geringem Maße aufnehmen. Dieses Resultat verifiziert die wichtige Rolle der PTK der Src Familie für die Invasion von *S. aureus* über Integrine (Abb. 3.13).

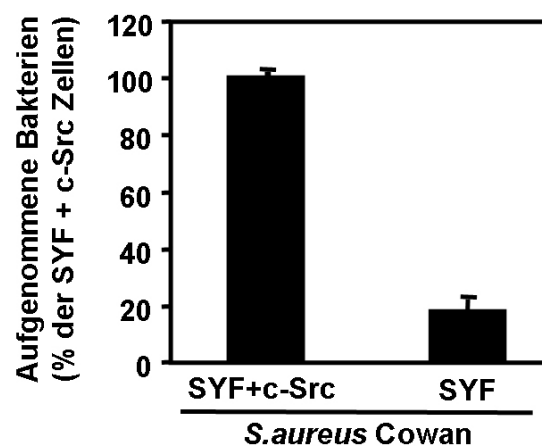


Abb. 3.13 Src-defiziente Zellen sind gegenüber einer Invasion von *S. aureus* resistent. Src-defiziente (SYF) und c-Src reexprimierende SYF Zellen (SYF + c-Src) wurden für 2 h mit *S. aureus* (Cowan) infiziert und in einem Gentamicin/Lysostaphin Protektionsassays eingesetzt. Die Graphen repräsentieren einen Mittelwert \pm von drei unabhängigen dreifach angesetzten Experimenten.

Unterschiedliche fluoreszente Färbungen von extra- und intrazellulären Bakterien in infizierten Kulturen bestätigten, dass in SYF + c-Src Zellen nach 2 h intrazelluläre *S. aureus* vorkamen (Abb. 3.14). Infizierte Kulturen von SYF Zellen besaßen gleiche Mengen an oberflächengebundenen Bakterien, jedoch konnte die Fluoreszenzfärbung zeigen, dass beinahe alle dieser Staphylokokken extrazellulär lokalisiert waren (Abb. 3.14). Zusammengefasst zeigen diese Resultate eine bedeutende Verbindung von Kinasen der Src Familie und der Integrin-vermittelten Invasion von pathogenen *S. aureus* auf.

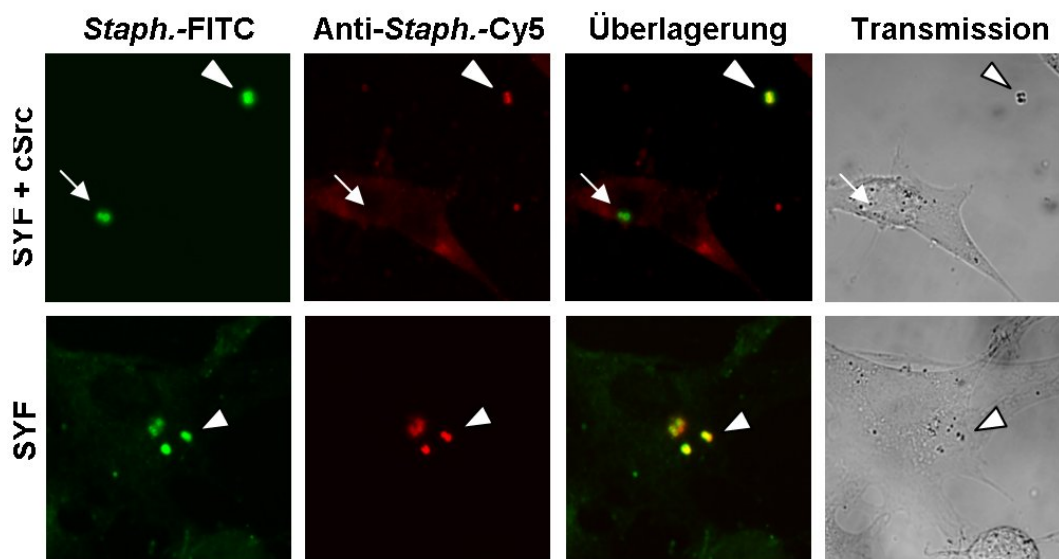


Abb. 3.14 Mikroskopische Bestätigung der Resistenz von Src-defiziente Zellen gegenüber einer Invasion von *S. aureus*. SYF und SYF + c-Src Fibroblasten wurden für 2 h mit FITC-markierten *S. aureus* infiziert. Nach der Fixierung wurden extrazelluläre Bakterien mit einem polyklonalen Antikörper gegen *S. aureus* sowie Cy5-gekoppelten Zweitantikörpern markiert. Extrazelluläre Bakterien (Pfeilkopf) konnten nun durch ihre Zweifach-Färbung mit FITC und Cy5 von den einfach markierten (nur FITC!) intrazellulären Bakterien (kleiner Pfeil) unterschieden werden.

3.2.7 Die Aktivität der Src Kinase wird nach einer Infektion mit *S. aureus* gesteigert

Da *S. aureus* die Fähigkeit fehlte, in SYF Zellen einzudringen, sowie ein inhibitorischer Effekt nach Behandlung der Zellen mit PP2 oder Überexpression von Src K297M festzustellen war, wurde daraus geschlossen, dass die Aktivität der Src Kinase für die Integrin-vermittelte Aufnahme der Staphylokokken verantwortlich ist. Um nun zu testen, inwiefern sich die Aktivität der Src Kinase nach Infektion der Zellen verändert, wurde der Status der Aktivierung von Src in SYF+c-Src Zellen auf zwei Weisen untersucht: Zum Einen wurde ein phosphospezifischer Antikörper zur Detektion der Phosphorylierung von regulativen Tyrosinresten von Src verwendet, zum Anderen eine biochemische Untersuchung in Form eines *in vitro* Kinaseassays. Demgemäß wurden SYF+c-Src Zellen, die in serum-reduziertem Medium kultiviert wurden, in eine Poly-L-Lysin beschichtete Platte eingesät, um die Verbindung und Aktivierung der Integrine durch das Zellkultursubstrat zu minimieren. Zwei Stunden nach Aussaat wurden die Zellen für die angegebenen Zeiträume mit Fn-vorbehandelten *S. aureus* infiziert oder uninfiziert belassen und anschließend lysiert. Nach Immunopräzipitation mit einem Src-spezifischen monoklonalen Antikörper wurden die Proben mittels Western Blot Technik analysiert. Die Membranen wurden mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen den phosphorylierten Tyrosinrest 419 des humanen Src (Src Tyr-419; Tyr-416 in Src aus dem Huhn) behandelt. Da sich dieser Tyrosinrest in der Aktivierungsschleife der Src Kinase Domäne befindet, zeigt seine Phosphorylierung die Aktivierung von Src an (Owens et al., 2000). Wie in Abb. 3.15 gezeigt werden konnte, war die Phosphorylierung von Tyr-419 in *S. aureus*-infizierten Zellen im Vergleich zu uninfizierten Zellen erhöht. Jedoch umfasste die Menge an Pathogen-induzierter Src Tyr-419 Phosphorylierung in infizierten Kulturen nur eine kleine Fraktion der absoluten Menge an Src. Die maximale Src Tyr-419 Phosphorylierung in Zellen in der Gegenwart von Serum war um das 10-fache gesteigert (Abb. 3.15). Diese kleine aber signifikante Steigerung der Src Aktivität zeigte, dass Integrin-gebundene Staphylokokken einen lokal begrenzten und transienten Stimulus gaben. Dieselbe Membran wurde mit einem anti-Src Antikörper behandelt, um gleiche Mengen an gesamtem Src (phosphoryliertes wie nicht phosphoryliertes Src) in den Proben zu detektieren (Abb. 3.15).

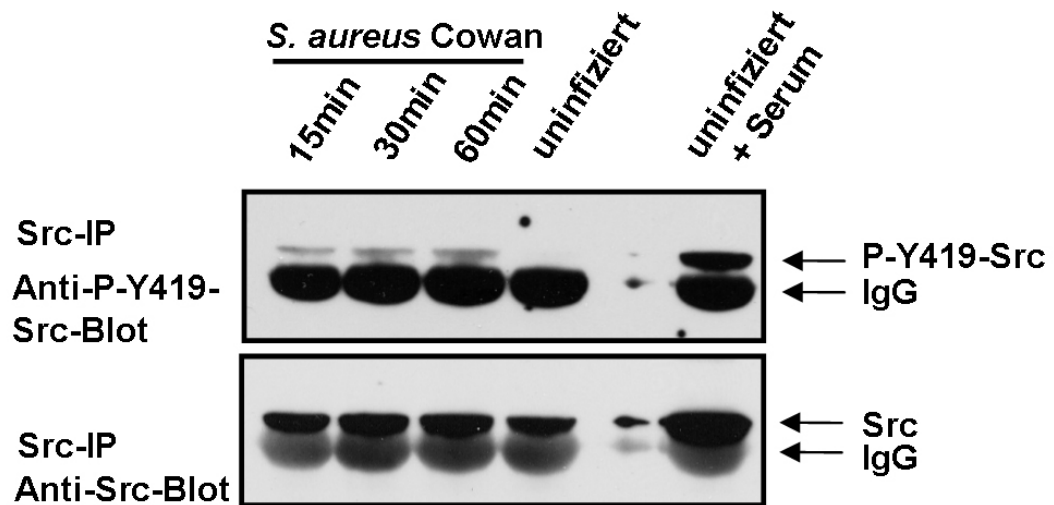


Abb. 3.15 Gesteigerte Src-Kinasen Aktivität als Antwort auf eine Infektion mit *S. aureus*. Serumgehungerte SYF + c-Src Zellen wurden auf eine Poly-L-Lysin beschichtete Platte ausgesät und für die angegebenen Zeiten mit *S. aureus* infiziert oder unfiziert belassen. Anschließend wurden die Zellen lysiert und in einer Src-Immunopräzipitation (Src-IP) eingesetzt und mittels Western Blot Analyse sequenziell mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen Src P-Y-419 (obere Reihe) und einem monoklonalen Antikörper gegen Src (untere Reihe) beprobt. Zellen, die in Anwesenheit von Serum ausgesät wurden, dienen als Positivkontrolle für maximale Src Aktivierung.

Um nun die enzymatische Aktivität von Src direkt zu messen, wurde Src aus verschiedenen Proben immunopräzipitiert. Die Proben umfassten unfizierte, *S. aureus*- und *S. carnosus*-infizierte SYF+c-Src Zellen sowie *S. aureus*-infizierte SYF Zellen. Im Anschluss an die Immunopräzipitation wurde ein *in vitro* Kinaseassay durchgeführt. Sowohl unfizierte als auch mit Fn-vorbehandelten *S. carnosus* infizierte Zellen zeigten eine basale Src Aktivierung. Jedoch war die Kinaseaktivität von Src in Fn-vorbehandelten *S. aureus*-infizierten Zellen um das 2,5 fache stärker als in unfizierten Zellen (Abb. 3.16). Dies zeigte die Änderung der Enzymaktivität aufgrund der Staphylokokkeninfektion. Wie zu erwarten war konnte keine Src Kinaseaktivität in *S. aureus*-infizierten SYF Zellen festgestellt werden (Abb. 3.16). Zusammenfassend bewiesen diese Resultate, dass die Enzymaktivität von Src aufgrund Infektion mit pathogenen Staphylokokken erhöht wurde. Dies bestätigte unsere Hypothese, dass die Funktion der zellulären Src Kinase bedeutend ist für die Integrin-vermittelte Invasion von *S. aureus*.

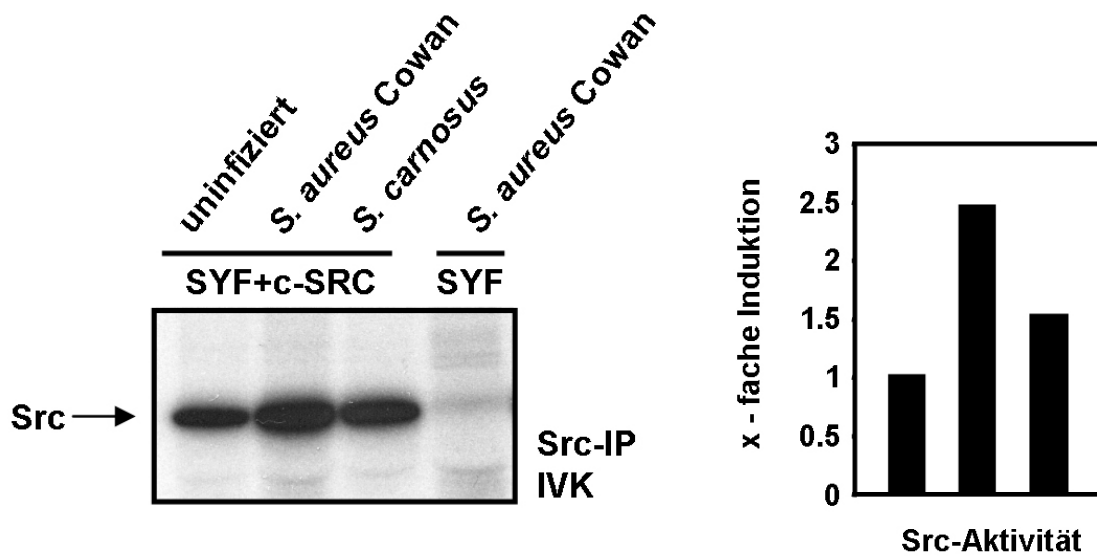


Abb. 3.16 Die Aktivität der zellulären Src Kinase ist nach Infektion von *S. aureus* erhöht. SYF + c-Src Zellen wurden unbehandelt belassen oder für 1 h mit *S. aureus* oder *S. carnosus* infiziert. Zusätzlich wurden SYF Zellen für 1 h mit *S. aureus* infiziert. Nach der Lyse wurde Src immunpräzipitiert (Src-IP) und in einem *in vitro* Kinase Autophosphorylierungs-Assay (IVK) eingesetzt. Die Proteine wurden anschließend mittels SDS-PAGE separiert, auf eine Polyvinylidene Difluorid Membran transferiert und die Src Aktivität durch Autoradiographie gemessen. Die Membranen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen Src beprobt, um die Mengen an immunpräzipitiertem Src detektieren zu können. Der Graph zeigt die x-fache Steigerung der Kinaseaktivität in Bezug genommen auf die in den Immunpräzipitaten anwesenden Mengen an Src-Kinase. Dieses Ergebnis zeigt ein repräsentatives Experiment aus drei Experimenten.

3.3 Diskussion

Das Integrin $\alpha_5\beta_1$ ist ein essentieller Oberflächenrezeptor, der die Anheftung von eukaryotischen Zellen an das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin vermittelt (Hynes, 1996). Vergleichbar zu anderen Integrinen findet man diesen Rezeptor gehäuft in fokalen Adhäsionen (FA) vor, wo er zur Kontaktierung der Zelle an die extrazelluläre Matrix durch Organisation des intrazellulären Zytoskeletts beiträgt. Obwohl FA Strukturen für die mechanische Unterstützung der Zelle notwendig sind, sind sie hochdynamisch und steuern durch die Bindung der Integrine an Proteine der ECM die Reorganisation des Zytoskeletts (Schwartz and Ginsberg, 2002). Tatsächlich induzierte die indirekte Bindung von $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen an die FnBP von *S. aureus* die Aufnahme des Mikroorganismus durch die Wirtszelle mittels des Aktinzytoskeletts. Unsere Resultate verdeutlichen, dass die Integrin-induzierte Invasion von *S. aureus* von zusätzlichen Faktoren der Wirtszelle abhängig ist. Hierbei konnte die zelluläre Src PTK als ein wichtiger Faktor in diesem

Prozess identifiziert werden. Insbesondere wurde die Aktivität der Src Kinase nach Infektion mit *S. aureus* gesteigert, sowie die Aufnahme der Staphylokokken in Epithelzellen und Fibroblasten nach pharmakologischer und genetischer Inhibition dieser Rezeptor unabhängigen Kinase drastischer verringert. Wichtig zu erwähnen ist, dass Src-defiziente Fibroblasten resistent gegenüber Invasion durch Staphylokokken sind, was die essentielle Rolle dieses Enzyms für die Integrin-vermittelte Aufnahme demonstriert.

Es konnte beobachtet werden, dass andere Pathogene ebenfalls den Weg der Integrin-vermittelten Internalisierung nutzen (Hauck, 2002). Speziell *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* verwenden Invasin, ein äußeres Membranprotein, zur direkten Assoziation mit β_1 -Integrinen. Diese Verbindung induziert am Ende die Aufnahme der Pathogenen in eukaryotische Zellen (Isberg and Barnes, 2001). Dieser Prozess der Aufnahme scheint eine wichtige Rolle *in vivo* zu spielen, da Invasin-defiziente Bakterien in der initialen Phase der Infektion aus infizierten Tieren reisoliert werden konnten (Pepe and Miller, 1993). Es wird vermutet, dass Invasin den oral aufgenommenen Yersinien durch Nutzung der β_1 -Integrine auf M-Zellen erlaubt, die intestinale Barriere zu überwinden, um Zugang zu Peyer's Plaques-assozierten Lymphknoten zu erlangen (Clark et al., 1998).

Interessanterweise exprimieren die human-spezifischen Pathogenen *Neisseria gonorrhoeae* sowie *Neisseria meningitidis*, ein, den MSCRAMMs der Staphylokokken vergleichbares äußeres Membranprotein, das die Bindung an die extrazelluläre Matrix vermittelt und dadurch indirekt die Mikroben mit den wirtszelleigenen Integrinen verbindet (Hauck and Meyer, 2003). *Streptococcus pyogenes* nehmen ebenfalls die Integrine der Wirtszellen durch Fibronectin für ihre Zwecke in Anspruch (Ozeri et al., 1998, Talay et al., 2000). Eine lokale Rekrutierung von β_1 -Integrinen unterhalb von gebundenen Bakterien induziert die Internalisierung der Streptokokken sowohl in Endothelzellen als auch in Fibroblasten (Ozeri et al., 2001). Diese Tatsache demonstriert wiederum, dass diese Integrine die Aufnahme von gebundenen Partikeln veranlassen können.

β_1 -Integrine sind durch zusätzliche FA-assozierte Moleküle wie Tensin, Vinculin, Paxillin, α -Actinin, Cortactin und Filamin, die allesamt in hierarchischer Ordnung zu geclusterten, Liganden gebundenen Integrinen rekrutiert werden, mit dem Aktinzytoskelett verbunden (Miyamoto et al., 1995b). Zusätzlich befinden sich Signalmoleküle, vor allem die fokale Adhäsionskinase (FAK) und Phosphotyrosinkinase der Src-Familie, in Strukturen der FA (Miyamoto et al., 1995b). Erwähnenswert ist ebenfalls, dass mehrere FA-assozierte Proteine des Zytoskeletts Substrate der Tyrosinkinase FAK und Src sind (Izaguirre et al., 2001, Brown and Cooper, 1996, Thomas and Brugge, 1997). Obwohl man schon umfassende Erkenntnisse bei den regulatorischen Phosphorylierungsereignissen im

Zusammenhang der Umstrukturierung von FA gewonnen hat (Zamir and Geiger, 2001), ist die Natur der Signalmoleküle, die bei Integrininternalisierungen involviert sind, noch völlig unklar. Früher konnte schon gezeigt werden, dass PTKen der Src Familie fähig sind, die Bindung zwischen dem Aktinzytoskelett und der zytoplasmatischen Domäne der Integrine zu lösen (Felsenfeld et al., 1999). Ebenfalls scheint FAK bei dem dynamischen Umbau der FA während gerichteter Zellmigration eine wichtige Rolle zu spielen (Hauck et al., 2002b). Daher wurde spekuliert, inwiefern Src Kinasen gemeinsam mit FAK die Verfügbarkeit von Integrinen auf der Zelloberfläche für die Bindung von Bakterien durch die Freisetzung der Rezeptoren aus FA Strukturen erhöhen (Isberg and Barnes, 2001). In unseren Experimenten wurden Zellen auf eine Poly-L-Lysin beschichtete Oberfläche ausgesät, da somit der Kontakt mit der Oberfläche integrinunabhängig war und so die Rezeptoren für die Bakterien verfügbar waren. Dadurch schien die Aktivität der Src Kinase, vermutlich durch die Regulierung der Aktin-assoziierten Proteine, die bei der Reorganisation des Zytoskeletts und dadurch für die Aufnahme der Bakterien notwendig waren, eine direkte Rolle für den Integrin-vermittelten Internalisierungsprozess zu spielen.

Obwohl *S. aureus* im Besitz von verschiedenen Bindungsproteinen der extrazellulären Matrix ist (Foster and Hook, 1998), beschränkt sich die Vermittlung der Invasion in eukaryotische Zellen *in vitro* auf die beiden Fn-bindenden Proteine FnBPA und FnBPB (Sinha et al., 1999, Dziwanowska et al., 1999). Jedoch ist die Rolle der Interaktion zwischen dem FnBP von *S. aureus*, Fn und den Integrinen der Zelle für den Infektionsprozess *in vivo* noch nicht verstanden. Es scheint plausibel, dass diese indirekte Bindung des Mikroorganismus an die Integrine der Wirtszelle ebenfalls *in vivo* dessen Internalisierung veranlassen und dadurch die Bakterien vor der gerichteten Immunabwehr schützen kann. Tatsächlich konnte in 163 klinischen Isolaten von *S. aureus* entweder ein oder beide FnBP-Gene detektiert werden. Die Expression von beiden FnBP scheint mit dem invasiven Krankheits-typ, verglichen mit Stämmen aus dem nasalen Bereich, einher zu gehen (Peacock et al., 2000). Da jedoch Integrinstimulierung in diversen zellulären Antworten wie Änderung der Genexpression, Zellmorphologie und Zellproliferation resultieren kann, liegt es nahe zu spekulieren, inwiefern die Bindung der Staphylokokken und die Integrine der Wirtszelle ebenfalls Prozesse auslösen kann, die unabhängig von der zellulären Aufnahme stattfindet. In welchem Maße nun solche Reaktionen die dynamischen Interaktionen zwischen Wirt und Bakterium bei Erkrankung beeinflussen, wird eine neue Herausforderung für weitere Untersuchungen sein.

4 Integrin vermittelte Internalisierung von *S. aureus* zeigt eine funktionelle Verbindung zwischen Fokaler Adhäsions Kinase und Cortactin

4.1 Einleitung

Eine große Anzahl von verschiedenen Pathogenen nutzen Integrine, um mit Wirtszellen und Geweben in Kontakt zu treten (Hauck, 2002, van der Flier and Sonnenberg, 2001). Ein berühmtes Beispiel dafür sind die enteropathogenen Bakterien *Yersinia enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*, die das äußere Membranprotein Invasin exprimieren, ein Protein mit hoher Affinität zur Integrin β_1 Untereinheit. Die Invasin-vermittelte Bindung des β_1 -Integrins ist ausreichend, um die Aufnahme des Pathogens durch eukaryotische Zellen zu veranlassen, ein Prozess der leicht *in vitro* in Zellkulturen veranschaulicht werden kann (Isberg and Barnes, 2001). Im Gegensatz zur direkten Integrinbindung von Invasin exprimierenden *Yersinia* sind andere Mikroorganismen fähig, indirekt an Integrine zu binden. Mikroben wie die Gram-positiven *Staphylococcus aureus* oder *Streptococcus pyogenes* haben Oberflächenstrukturen entwickelt, die an Proteine der extrazellulären Matrix binden (Schwarz-Linek et al., 2004). Wie im Fall der Invasin-exprimierenden *Yersinien*, löst die FnBP-vermittelte Bindung an β_1 -Integrine von *S. aureus* sowohl die Clusterbildung von Integrinen als auch die Internalisation der Bakterien in Wirtszellen *in vitro* aus (Agerer et al., 2003, Fowler et al., 2000, Sinha et al., 2000). Obwohl Fn-bindende Varianten von *S. aureus* überwiegend bei klinischen Isolaten auftreten (Peacock et al., 2000) ist die Rolle der *S. aureus*-FnBP-Fn-Integrin Interaktion bei dem Infektionsprozess *in vivo* noch unklar (Menzies, 2003). Zum Beispiel tritt eine Mutante von *S. aureus* mit geringer Fn-Bindungskapazität in einem Endokarditismodell der Ratte nur in geringem Maße auf (Kuypers and Proctor, 1989), wogegen eine FnBP-A/FnBP-B Doppelmutante bei der Kolonisierung von Herzklappen der Ratte nicht beeinträchtigt ist (Flock et al., 1996). Eine Verabreichung einer rekombinanten Fn-bindungs-domäne von FnBP-A, was die *S. aureus*-Invasion *in vitro* blockiert, inhibierte die Abszessformierung bei einer Wundinfektion im Meerschweinchen (Menzies et al., 2002). Die Expression des FnBPs verstärkt dramatisch die Fähigkeit von *S. aureus*, die Brustdrüse der Maus zu kolonisieren und in Epithelzellen der Brust *in vivo* einzudringen (Brouillette et al., 2003). Nichtsdestotrotz ist es nahe liegend, dass die FnBP-vermittelte Invasion von *S. aureus* in eukaryotische Zellen zur Persistenz des Mikroorganismus in seinem Wirt führt (Menzies, 2003).

Es ist noch nicht geklärt, wie die Bindung und Bildung von Integrinclustern von Fn-bedeckten Bakterien in ein Signal zur Aufnahme übersetzt wird, da β_1 -Integrine normalerweise im Zusammenhang auf immobilisierte Proteine der extrazellulären Matrix agieren (van der Flier and Sonnenberg, 2001). Es ist bekannt, dass die Bildung von Integrinclustern aufgrund Zelladhäsion an immobilisierte ECM Proteinen der Auslöser für die Zusammensetzung von charakteristischen Proteinkomplexen an der intrazellulären Seite der Plasmamembran ist (Miyamoto et al., 1995b, Miyamoto et al., 1995a, Zaidel-Bar et al., 2003, Zamir and Geiger, 2001). Integrinreiche fokale Kontakte sind an der intrazellulären Seite der Plasmamembran angereichert an Proteinen wie Talin, Vinculin, Paxillin, Tensin, α -Actinin oder Zyxin sowie Signalenzyme wie die Fokale Adhäsions Kinase (FAK), Phosphatidylinositolphosphatkinase Typ 1 γ , die integrin-verbundene Kinase oder Kinase der Src Familie, die zusammen die dynamische Verbindung von Integrinclustern und dem Aktinzytoskelet steuern (Zamir and Geiger, 2001, Ling et al., 2002). Der Zusammenbau und Abbau von Integrin-assoziierten Proteinkomplexen, gelenkt durch die Phosphorylierung von Lipiden und Proteinen, wird als Hauptregulationsmechanismus zur Kontrolle bei der Umsetzung der fokalen Kontakte gesehen (Geiger et al., 2001). Als ein Beispiel ist die Protein Tyrosin Kinase (PTK) FAK, ein Schlüsselenzym, das nach Integrin-vermittelter Stimulierung der Zellen stark aktiviert ist (Schlaepfer and Mitra, 2004). Aktive FAK und Src PTK sind verantwortlich für die Phosphorylierung von Integrin- oder Aktinassoziierten Proteinen, wie Paxillin, α -Actinin und p130CAS. Eine Beeinträchtigung der Aktivität des FAK-Src-Komplexes verschlechtert die Motilität der Zellen bei verschiedenen adhären-ten Zelltypen, was einen Hinweis auf die wichtige Rolle der beiden Enzyme bei der Umwandlung von fokalen Kontakten gibt. Interessanterweise ist die β_1 -Integrin-vermittelte Aufnahme von *S. aureus* von der Aktivität der Src PTK abhängig. Dies deutet darauf hin, dass die Umwandlung von Integrin-assoziierten Proteinkomplexen wichtig für die bakterielle Aufnahme ist (Fowler et al., 2003, Agerer et al., 2003). Jedoch ist noch ungeklärt, inwiefern die von FnBP eingeleitete Aufnahme von *S. aureus* zusätzliche strukturelle Faktoren oder Komponenten der integrinreichen fokalen Kontaktstellen, die für das Signalling verantwortlich sind, benötigt. Ebenfalls ist unbekannt, welche Substrate der aktiven Src PTKn wichtig für den Internalisierungsprozess sind.

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass *S. aureus*, nicht aber *S. carnosus* die Rekrutierung der fokalen Kontaktproteine Vinculin, Tensin, Zyxin, α -Actinin und FAK auslösen. FAK ist ein kritischer Faktor für die Integrin-vermittelte Aufnahme von *S. aureus*, da dominant negative Versionen von FAK die Internalisierung von *S. aureus* blockierten und FAK-defiziente Zellen in ihrer Fähigkeit, *S. aureus* aufzunehmen stark

beeinträchtigt waren. Obwohl die Rekrutierung von einigen FA assoziierten Proteinen in FAK-defizienten Zellen noch stattfand, war die Integrin abhängige Tyrosin Phosphorylierung des Src Substrates Cortactin aufgehoben. Da Mutationen von Cortactin ihre Fähigkeit zur Interaktion mit Dynamin oder dem Arp2/3 Komplex beeinträchtigen oder an wichtigen Stellen der Tyrosinphosphorylierung mutiert sind, behindern sie die Aufnahme von *S. aureus*. Unsere Resultate zeigen eine neue Verbindung von Integrinbindung, FAK Aktivierung und posttranslationaler Modifikation von Cortactin. Da die Endozytose von Integrinclustern ebenso unabhängig einer bakteriellen Infektion stattfinden kann, könnte die Integrin-FAK-Cortactin Signalachse wichtig zur Kontrolle der adhäsiven Eigenschaften von Zellen sein.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Aktindynamik während Integrin vermittelter Aufnahme von *S. aureus*

Die Integrin-vermittelte Aufnahme von Fibronectin-bindenden *Staphylococcus aureus* war vom Aktinzytoskelett abhängig. Dies zeigte sich, als Cytochalasin D, welches die Verlängerung der Aktinfilamente durch direkte Bindung der F-Aktin *barbed ends* blockiert, deutlich in den Prozess der Aufnahme interferierte (Abb. 4.1) (Agerer et al., 2003, Sinha et al., 1999). Zwei weitere wichtige Inhibitoren des Aktinzytoskeletts, Latrunculin B, das die Verbindung von Aktinmonomeren zu F-Aktin verhindert, sowie Jaspakinolide, das die Depolymerisierung von F-Aktin blockiert, zeigten einen stark negativen Effekt auf die Integrin-vermittelte Internalisierung von *S. aureus*. Dies deutete auf eine kritische Rolle der dynamischen Umordnungen von Aktinzytoskelettstrukturen hin (Abb. 4.1).

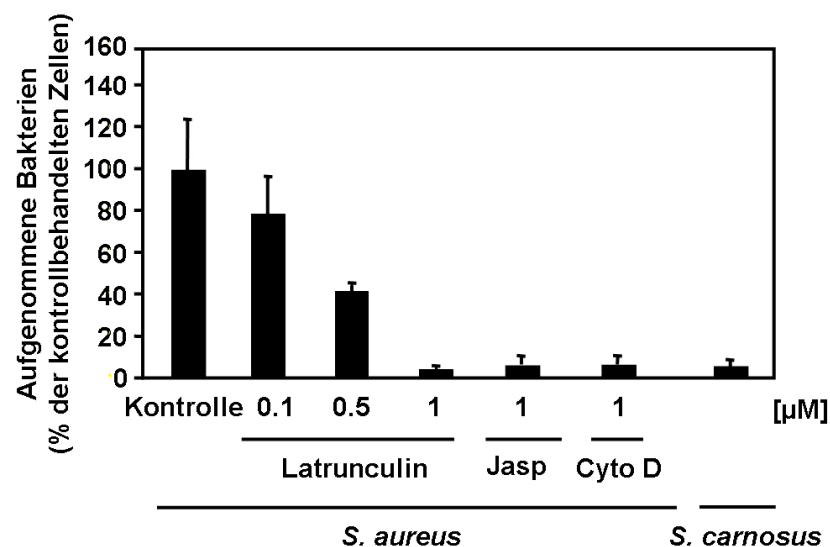


Abb 4.1 Internalisierung von *S. aureus* benötigt die Aktin-Dynamik der Wirtszelle. 293T Zellen wurden für 2 h mit einer MOI 20 mit *S. aureus* (Cowan) und *S. carnosus* in Anwesenheit der angegebenen Konzentrationen von Latrunculin, Cytochalasin D oder Jaspachinolin infiziert. Die Anzahl an intrazellulären Bakterien wurde mit Hilfe eines Gentamicin/Lysostaphin Protektionsassays bestimmt. Die Graphen repräsentieren einen Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen dreifach angesetzten Experimenten.

Um nun die Dynamik des Aktins während der Aufnahme der Staphylokokken genauer untersuchen zu können, wurden 293T Zellen mit einer cDNA transfiziert, die für ein GFP-Aktin Fusionsprotein codierte. Mittels zeitlaufender konfokaler Mikroskopie konnte die Lokalisation von Aktin in der transient transfizierten Zellpopulation während der Infektion mit Rhodamin markierten *S. aureus* dargestellt werden. Interessanterweise konnte *S. aureus* innerhalb von Minuten nach Kontakt mit der Wirtszelloberfläche lokale Akkumulationen von GFP-Aktin induzieren (Abb. 4.2), während eine Infektion von GFP-Aktin exprimierenden Zellen mit *S. carnosus* zu keiner Aktinakkumulation führte (Agerer et al., 2003). Im Falle von *S. aureus*-infizierten Zellen persistierte die Aktinakkumulation an der Zellperipherie. Bakterien wurden hingegen tiefer in die Zelle aufgenommen, verloren dabei aber die Assoziation zu Aktin (Abb. 4.2; kleiner Pfeil). Der Prozess der Internalisierung von *S. aureus* war oftmals nach 3-5min abgeschlossen. Zusätzlich konnte in einigen Fällen (10% der beobachteten Interaktionen) nach Anheftung der Bakterien an die Zelle die Bildung von massiven „Aktin-Armen“, ausgehend von der zellulären Oberfläche, beobachtet werden, die zur bakteriellen Aufnahme führte (Abb. 4.2; Pfeilkopf). Dies ließ auf zusätzliche Eintrittspfade der Staphylokokken in die Zelle schließen.

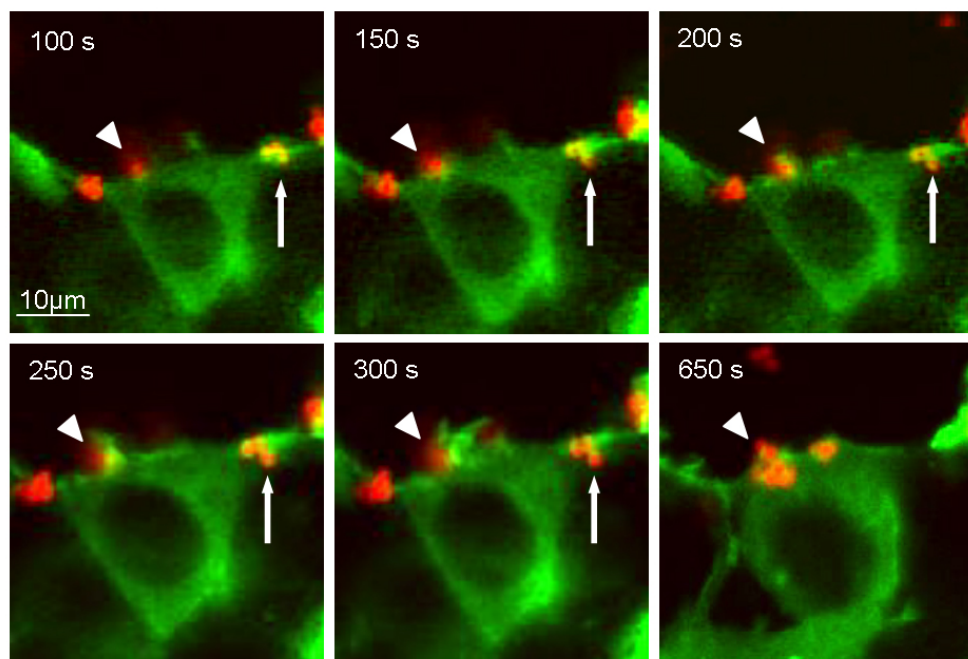


Abb 4.2 *S. aureus* induziert innerhalb weniger Minuten eine starke Aktin-Akkumulation. 293T Zellen wurden transient mit GFP-Aktin transfiziert und mit Rhodamin-markierten *S. aureus* infiziert. Durch Verwendung einer *time-lapse* Mikroskopie konnten in transfizierten Zellen 30 min nach Infektion mit *S. aureus* dynamische Umlagerungen von GFP-Aktin beobachtet werden. Invasive Bakterien induzierten transient eine lokale Akkumulation aus polymerisiertem Aktin (kleiner Pfeil). In einigen Fällen konnten massive, aus Aktin bestehende Membranausstülpungen, die invasive Bakterien umgeben, beobachtet werden (Pfeilkopf). Die angegebene Zeit gibt den Zeitpunkt ab dem Anfang der Aufnahme in Sekunden an.

4.2.2 *Staphylococcus aureus* rekrutiert Fokale Adhäsions Proteine zum Ort der Aufnahme

Unter physiologischen Bedingungen konnten substratgebundene Integrine eine Aktinpolymerisierung an Kontaktstellen zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix hervorrufen. Diese so genannten fokalen Kontakte waren durch die Anwesenheit charakteristischer zytoplasmatischer Proteine, die indirekt die Verbindung zwischen den zytoplasmatischen Teilen der Integrine mit dem Aktinzytoskelett herstellten, gekennzeichnet. Um nun die Möglichkeit der durch invasive *S. aureus* und somit einhergehenden Integrinaktivierung hervorgerufene Bildung von Proteinkomplexen untersuchen zu können, wurden 293T Zellen transient mit GFP-Vinculin, GFP-Tensin oder GFP-Zyxin transfiziert und mit Rhodamin markierten *S. aureus* infiziert. Interessanterweise wurden alle drei Proteine GFP-Vinculin (Abb.4.3), GFP-Tensin (Abb.4.4A) sowie GFP-Zyxin (Abb.4.5) in Zellen, die mit *S. aureus* infiziert waren, stark an den Ort der bakteriellen Anheftung rekrutiert. Im Gegenzug dazu konnte bei keinem der drei Proteine (Abb.4.3, 4.4A, 4.5) eine Rekrutierung nach Infektion der Zellen mit dem nicht pathogenen *S. carnosus* festgestellt werden.

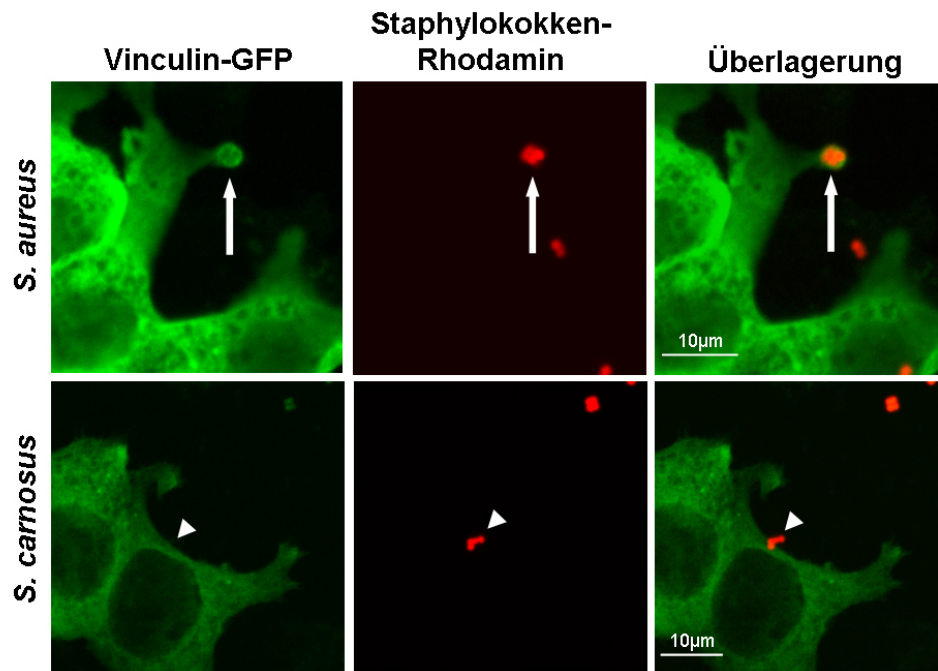


Abb 4.3 Rekrutierung von GFP-Vinculin an den Ort von zellassozierten *S. aureus*. 293T Zellen wurden mit GFP-Vinculin transfiziert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen für 1 h mit Rhodamin-markierten *S. aureus* oder *S. carnosus* infiziert und anschließend fixiert und mittels konfokaler Mikroskopie ausgewertet. Zellassozierte *S. aureus* (kleiner Pfeil) oder *S. carnosus* (Pfeilkopf) sind markiert. Größenbalken repräsentieren $10\mu\text{m}$.

Eine Quantifizierung der Fluoreszenzsignale, die einzeln im GFP- oder Rhodaminkanal gemessen wurden, zeigte einen starken Anstieg der lokalen Konzentration von GFP-Tensin in einem Abstand von $1 - 2\mu\text{m}$ zu den gebundenen *S. aureus* (Abb.4.4B). Dagegen beeinflussten zellassozierte *S. carnosus* die lokale Verteilung von GFP-Tensin (Abb.4.4B) nicht. Diese Daten demonstrierten, dass Integrinaktivierung, durch pathogene *S. aureus* initiiert, eine lokale Rekrutierung von Proteinen fokaler Kontakte hervorrufen konnte, was für eine mögliche Rolle dieser Proteine bei der Aktinordnung und damit für die Internalisierung der Staphylokokken sprach.

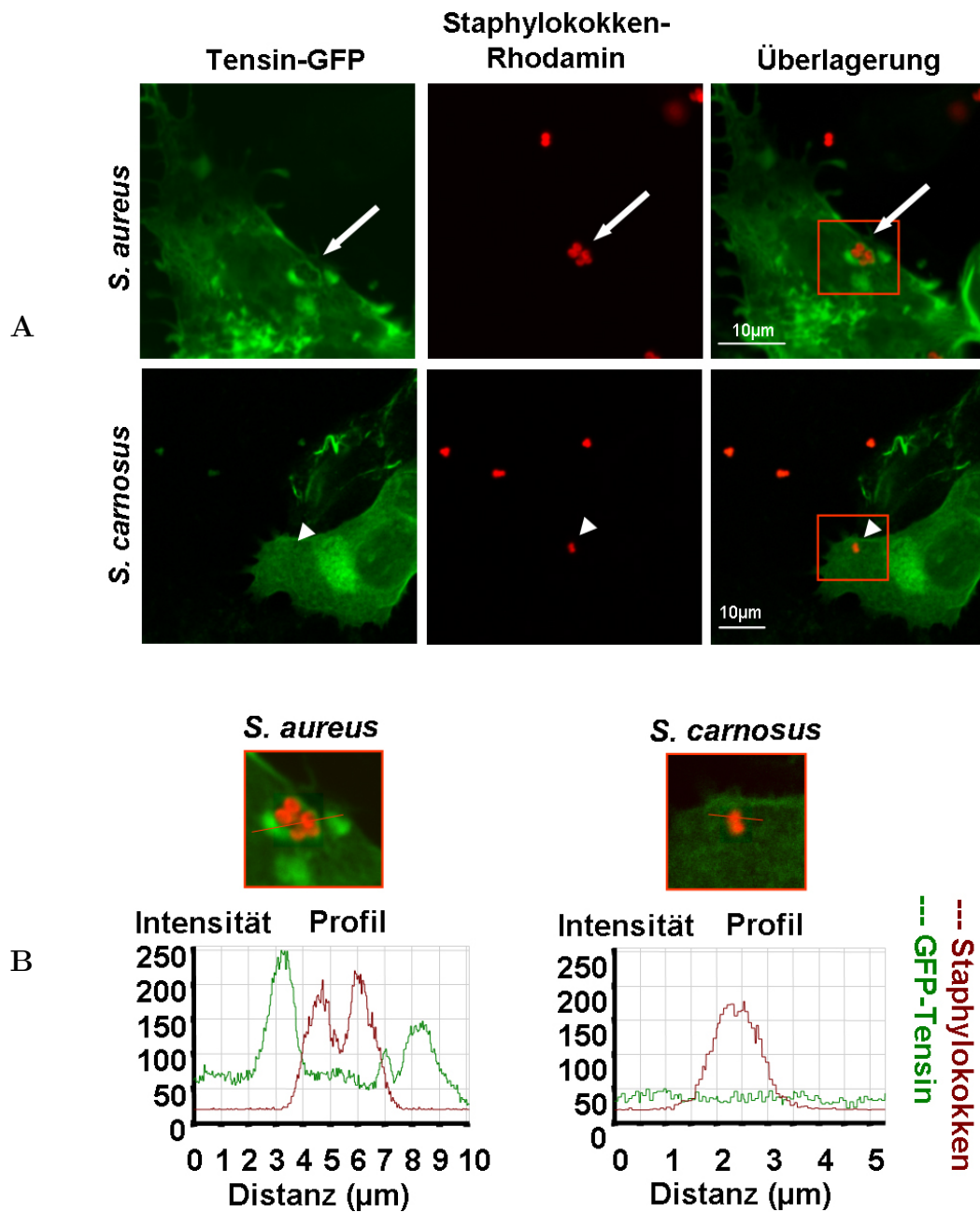


Abb 4.4 Akkumulation von GFP-Tensin, einem fokalen Markerprotein, an den Ort von zellgebundenen *S. aureus*. 293T Zellen wurden mit GFP-Tensin transfiziert und für 1 h mit Rhodamin-markierten *S. aureus* oder *S. carnosus* infiziert. Nach der Fixierung wurden die Präparate mittels konfokaler Laserskannting Mikroskopie untersucht. Zellossoziierte *S. aureus* (kleiner Pfeil) oder *S. carnosus* (Pfeilkopf) sind markiert. Größenbalken repräsentieren 10µm (A). Die lokale Rekrutierung von GFP-Tensin zu zellossoziierten Bakterien wurde durch Anlegen eines Quantifizierungsprofils der Fluoreszenzintensität entlang der markierten roten Linie quantifiziert (B).

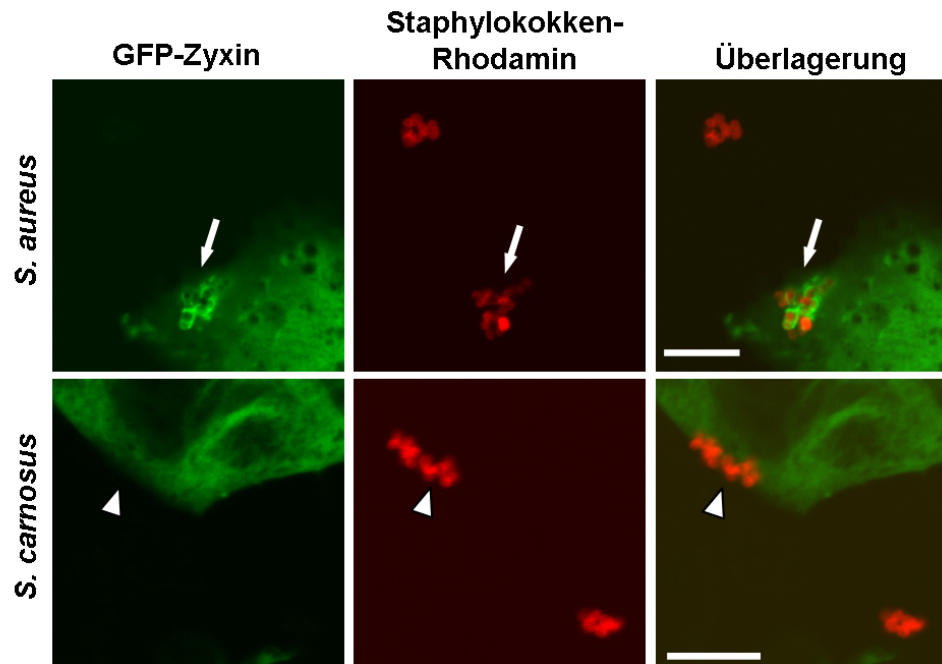


Abb 4.5 Kolokalisierung von zellassoziierten *S. aureus* mit GFP-Zyxin. GFP-Zyxin transgenierte 293T Zellen wurden für 1 h mit Rhodamin-markierten *S. aureus* und *S. carnosus* infiziert und anschließend mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Zellassoziierte *S. aureus* (kleiner Pfeil) oder *S. carnosus* (Pfeilkopf) sind markiert. Größenbalken repräsentieren $10\mu\text{m}$.

4.2.3 Aktivität von FAK ist für die Integrin-vermittelte Internalisierung von *S. aureus* wichtig.

Die fokale Adhäsionskinase (FAK) ist ein wichtiger Modulator der Integrin abhängigen fokalen Kontakte. Dadurch kann FAK auf verschiedene Prozesse wie Ausbreitung der Zellen, Zellwanderung sowie Integrin-initiierte Signalvermittlung Einfluss nehmen (Hauck et al., 2002b). Im Speziellen scheint FAK die Umwandlungen der fokalen Adhäsionsproteinkomplexe zu regulieren, was zu einer verstärkten Dynamik an den Orten der Zellanheftung führt. Um untersuchen zu können, inwiefern FAK für die Integrin initiierte Internalisierung von *S. aureus* von Bedeutung ist, wurden 293T Zellen transient mit einem leeren Kontrollvektor (pcDNA) oder verschiedenen FAK-Mutanten transfiziert, die entweder in ihrer Kinaseaktivität beeinträchtigt waren (FAK K454M), die Fähigkeit zur Autophosphorylierung verloren hatten (FAK Y397F) oder denen verschiedene Prolin-reiche Stellen fehlten, die für die Assoziation mit SH3-besitzenden Proteinen wie p130CAS oder GRAF notwendig sind (FAK Pro-) (Hauck et al., 2002b). Mittels Gentamicin/Lysostaphin Protektionsassays konnte bestätigt werden, dass die Überexpression von allen FAK-Mutanten stark die Internalisierung von *S. aureus* reduzierte (Abb.4.6). In allen Fällen war die Aufnahme von *S. aureus* durch Zellen, die mit FAK-Mutanten transfiziert waren, weniger

als 40 %, verglichen mit kontrolltransfizierten Zellen (pcDNA). Obwohl transfizierte Gene gleich gut exprimiert wurden, lag die normale Transfektionseffizienz zwischen 60 und 70 % der totalen Zellpopulation (Abb.4.6). Daher ging die beobachtete Aufnahmereduktion von 60 bis 70 % mit einer Blockade der Internalisation bei fast allen transfizierten Zellen einher.

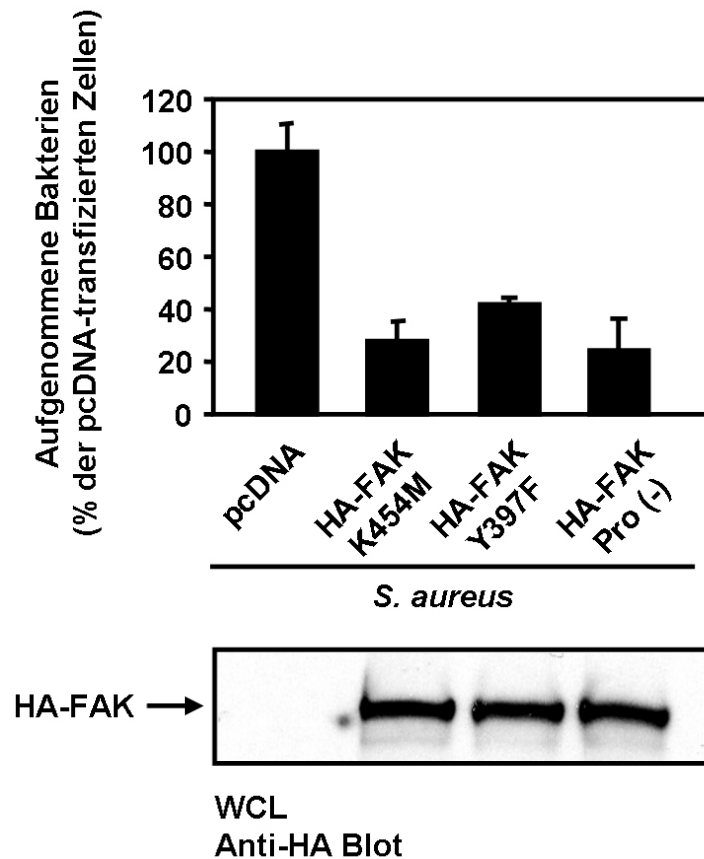


Abb 4.6 Durch Beeinträchtigung der Funktion von FAK wird die Aufnahme von *S. aureus* blockiert. 293T Zellen wurden transient mit einem leeren Kontrollvektor (pcDNA) oder verschiedenen FAK-Mutanten (HA-FAK K454M, HA-FAK Y397F, HA-FAK Pro(-)) transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen für 2 h mit *S. aureus* infiziert. Die Anzahl der internalisierten Bakterien wurde mit Hilfe eines Gentamicin/Lysostaphin Protektionsassays ermittelt. Die Graphen repräsentieren einen Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen dreifach angesetzten Experimenten. Western Blot Analysen von Ganzzell-Lysaten (WCL) mit einem Antikörper gegen HA bestätigten die Expression der HA-markierten FAK-Konstrukte.

Um diese Daten zu untermauern, wurde transient in 293T Zellen FRNK (*FAK related non-kinase*, ein gut charakterisierter endogener FAK-Inhibitor, transfiziert. Wie schon bei den anderen FAK-Mutanten gezeigt werden konnte, konnte in FRNK-exprimierenden Zellen eine bemerkenswerte Reduktion der Aufnahme von *S. aureus* festgestellt werden (Abb.

4.7), was zusammengefasst auf eine wichtige Rolle von FAK für die Integrin vermittelte Aufnahme von *S. aureus* weist.

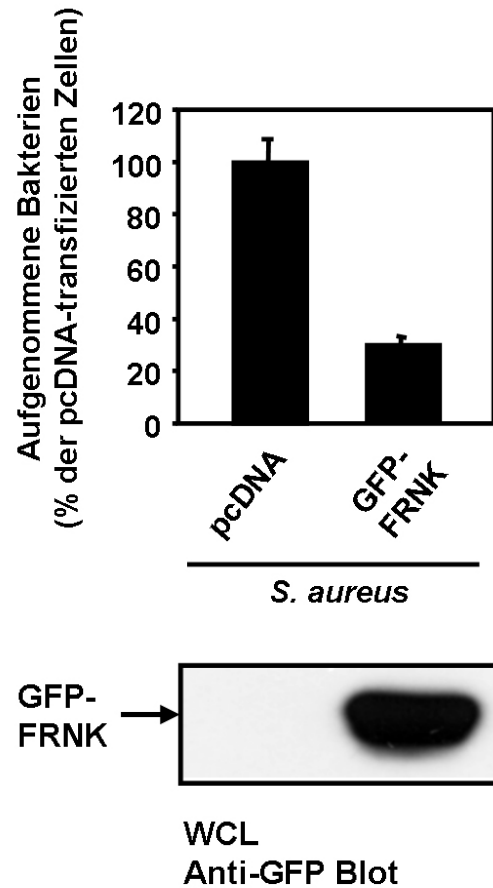


Abb 4.7 Die Aktivität von FAK ist für die Integrin-vermittelte Aufnahme von *S. aureus* von großer Bedeutung. 293T Zellen wurden transient mit einem leeren Kontrollvektor (pcDNA) oder einem endogenen Inhibitor von FAK (GFP-FRNK) transfiziert, für 2 h mit *S. aureus* infiziert und anschließend die Zahl der intrazellulären Bakterien mittels eines Gentamicin/Lysostaphin Protektionsassays ermittelt. Die Graphen repräsentieren einen Mittelwert \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen dreifach angesetzten Experimenten (A). Ganzzell-Lysate (WCL) wurden mit einem Antikörper gegen GFP beprobt, um die Expression von GFP-FRNK bestätigen zu können (B).

Es wurde vermutet, falls FAK eine bedeutende Rolle für die Aufnahme von *S. aureus* spielt, dass FAK-defiziente Zellen resistent gegenüber der Integrin vermittelten Aufnahme des Pathogenen sein sollten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Fibroblasten aus FAK-defizienten Mausembryos (FAK(-) Zellen) sowie HA-FAK reexprimierende Zellen (FAK(+) Zellen) in einem Gentamicin / Lysostaphin Protektions Assay getestet. FAK reexprimierende Zellen zeigten eine Invasionskinetik von *S. aureus* vergleichbar mit der in humane Epithelzellen oder Mausfibroblasten (Abb.4.8, (Agerer et al., 2003)). Bedeutenderweise wurde auch hier der nicht pathogene *S. carnosus* durch die FAK(+) Zellen

nicht internalisiert. Diese Tatsache deutet in Bezug auf die Invasion in Mausfibroblasten auf einen Pathogen-spezifischen Prozess hin (Abb. 4.8).

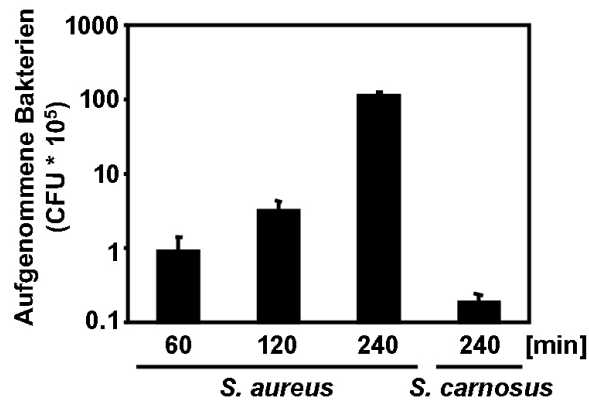


Abb 4.8 FAK reexprimierende Mausfibroblasten nehmen *S. aureus* ebenso effektiv auf, wie humane Epithelzellen. Die Internalisierung von *S. aureus* oder *S. carnosus* durch FAK-reexprimierende Fibroblasten wurde nach den angegebenen Zeiten mittels eines Gentamicin/Lysostaphin Protektionsassays gemessen. Die Graphen repräsentieren einen Mittelwert \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen dreifach angesetzten Experimenten.

Verglichen mit FAK(+) Zellen konnte in FAK(-) Zellen anhand eines Gentamicin / Lysostaphin Protektions Assays kaum Invasion von *S. aureus* (Cowan) beobachtet werden, was für die bedeutende Rolle von FAK bei der Aufnahme von *S. aureus* in Zellen sprach (Abb.4.9).

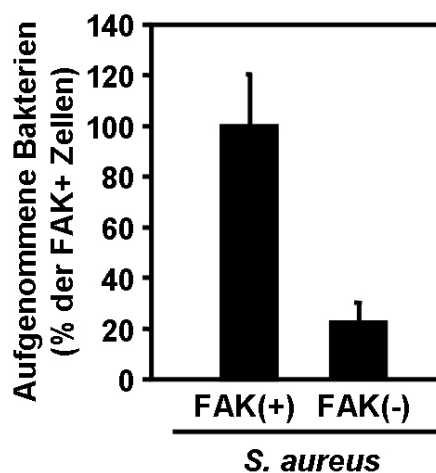


Abb 4.9 FAK-defiziente Zellen sind gegenüber einer Invasion von *S. aureus* resistent. FAK-reexprimierende (FAK(+)) oder FAK-defiziente (FAK(-)) Mausfibroblasten wurden für 2h mit *S. aureus* infiziert und in einem Gentamicin/Lysostaphin Protektionsassays eingesetzt. Die Graphen repräsentieren einen Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen dreifach angesetzten Experimenten.

Um diese Resultate der Antibiotika Protektionsassays zu verifizieren, wurden infizierte Proben von FAK-defizienten und FAK reexprimierenden Zellen auf eine extra- und intrazelluläre Lokalisation der Bakterien gefärbt (Agerer et al., 2004). Die konfokale Mikroskopie bestätigte, dass innerhalb von 2 h Infektion eine große Anzahl der zellassozierten Bakterien in FAK(+) Zellen intrazellulär waren (Abb.4.10), wogegen in FAK(-) Zellen nur in seltenen Fällen intrazelluläre Bakterien detektiert werden konnten. Allerdings konnten die Bakterien gleich gut an FAK(+) wie an FAK(-) Zellen binden. Dies deutet darauf hin, dass FAK die Rezeptoraffinität gegenüber den Bakterien nicht beeinflusst, aber für die Internalisierung der Integrin-gebundenen *S. aureus* in die Zellen unerlässlich ist.

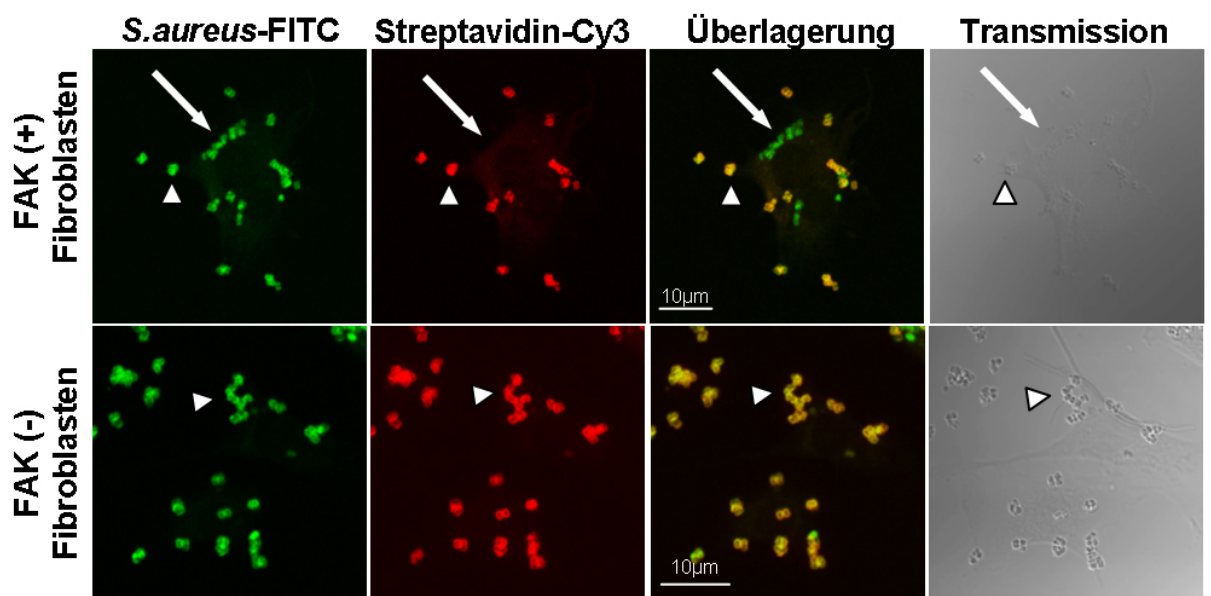


Abb 4.10 Mikroskopische Bestätigung der Resistenz von FAK-defizienten Zellen gegenüber einer Invasion von *S. aureus*. FAK(+) oder FAK(-) Fibroblasten wurden mit FITC- und Biotin-markierten *S. aureus* für 2 h infiziert. Nach der Fixierung wurden extrazelluläre Bakterien durch Zugabe von Streptavidin-Cy5 detektiert. Extrazelluläre Bakterien (Pfeilkopf) sind positiv mit FITC und Cy5 gefärbt, wogegen intrazelluläre Bakterien (kleine Pfeile) ausschließlich mit FITC markiert sind. Größenbalken repräsentieren 10µm.

Diese Beobachtung konnte durch Aufnahmen von 1h *S. aureus*-infizierten FAK(+) und FAK(-) Zellen durch *Scanning* Elektronenmikroskopie bestätigt werden. Obwohl in beiden Fällen gleich viele Mikroorganismen an die Zellen gebunden hatten, konnten sich nur in FAK(+) Fibroblasten Membranausstülpungen um die Bakterien bilden, die zu guter letzt zur Internalisierung der Pathogenen führten (Abb.4.11). Zusätzlich wurden in FAK(+) Zellen große Membraneinstülpungen um gebundene Bakterien beobachtet, die in FAK(-) Zellen fehlten (Abb.4.11). Zusammengefasst bestätigten diese Ergebnisse die

essentielle Rolle von FAK für die Integrin vermittelte Aufnahme der pathogenen *S. aureus* und suggerieren, dass die zelluläre Internalisierung der Integrine durch die Aktivität von FAK kontrolliert werden könnte.

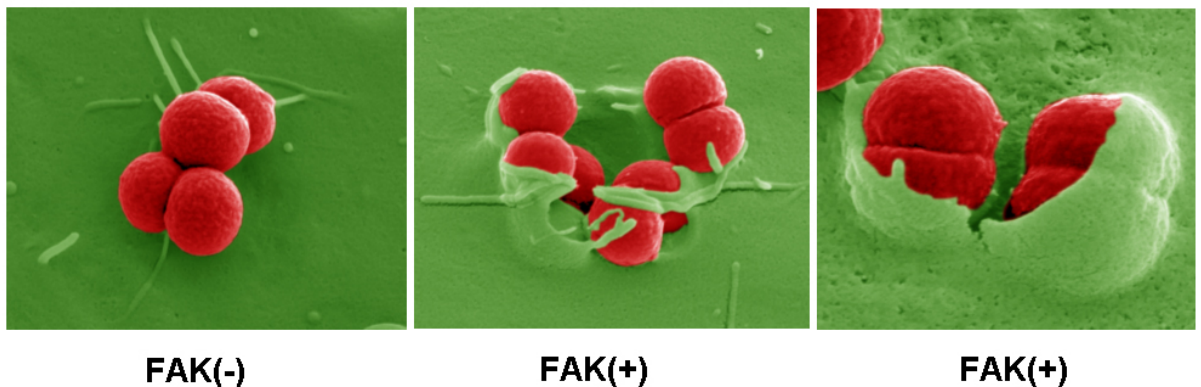
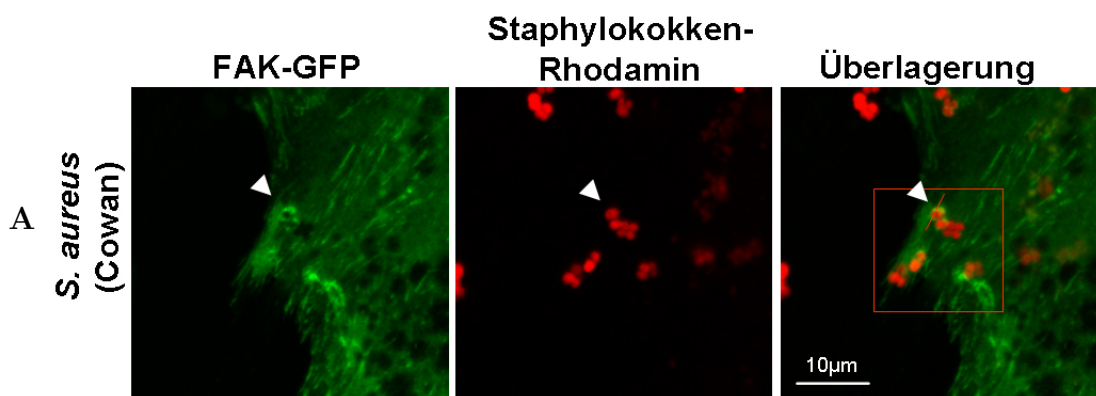


Abb 4.11 Elektronenmikroskopische Verifizierung der Bedeutung von FAK für die Internalisierung von *S. aureus*. FAK(+) und FAK(-) Zellen wurden für 1 h mit *S. aureus* infiziert und mittels *scanning* Elektronenmikroskopie analysiert. Pseudocolorierte Bilder stellen die Bakterien in Rot und die Oberfläche der Fibroblasten in Grün dar.

FAK wirkt während der Umordnung von fokalen Adhäsionen lokal in fokalen Adhäsionsstellen, an die FAK durch Determinanten seines C-terminalen Teils rekrutiert wird (Hildebrand et al., 1993, Klingbeil et al., 2001). Um nun zu untersuchen, ob sich FAK auch an Orten auf eukaryotischen Zellen findet, an die Staphylokokken gebunden waren, wurden FAK defiziente Zellen mit GFP-FAK transfiziert. Nach Infektion dieser Zellen mit *S. aureus* konnte eine starke Rekrutierung von FAK an den Ort der bakteriellen Anheftung beobachtet werden (Abb.4.12).



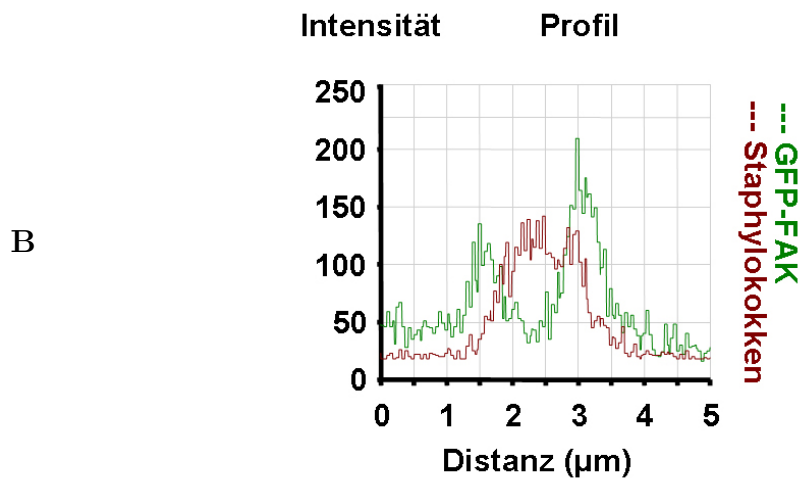


Abb 4.12 Rekrutierung von FAK an den Ort der Invasion von *S. aureus*. FAK-defiziente Fibroblasten wurden transient mit GFP-FAK transfiziert und mit Rhodamin-markierten *S. aureus* mit einer MOI 20 für 1h infiziert. Die Pfeilköpfe zeigen auf Akkumulierungen von GFP-FAK in der Umgebung von zelladhärenten *S. aureus* (A). Lokale Rekrutierungen von GFP-FAK zu zellassoziierten Bakterien wurden durch Analyse eines Fluoreszenz-Intensitäts-Profiles entlang der gekennzeichneten roten Linie quantifiziert. GFP- oder Rhodamin-Kanäle wurden gegen die Distanz aufgetragen (B). Größenbalken repräsentieren $10\mu\text{m}$.

Die Rekrutierung von FAK zu gebündelten Integrinen auf der Zellmembran ist ein wichtiger Schritt für die Aktivierung von FAK. Diese Aktivierung äußert sich in verstärkter Phosphorylierung einiger Tyrosinreste von FAK, die wiederum zu gesteigerter Tyrosinphosphorylierung von *downstream* Effektoren führt. Um den Status der Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine nach einer Infektion mit *S. aureus* untersuchen zu können, wurden FAK reexprimierende Zellen in einem ersten Schritt mittels Serumentzugs ausgehungert. Diese ausgehungerten Zellen wurden anschließend für 1h auf eine Poly-L-Lysin beschichtete Platte ausgesät, um eine Involvierung der Integrine durch Matrixproteine zu minimieren und zusätzlich maximale Integrin-vermittelte Interaktionen mit pathogenen *S. aureus* zu erlauben. Die Zellen auf Poly-L-Lysin blieben uninfiziert oder wurden für 1h mit *S. aureus* oder *S. carnosus* infiziert, bevor sie lysiert und durch Western Blotting mit einem Anti-Phosphotyrosin Antikörper untersucht wurden. Einige Proteine zeigten nach der Infektion von 1h mit *S. aureus* klar eine verstärkte Tyrosinphosphorylierung (Abb.4.13). Am Auffallendsten legten Proteine mit einem ungefähren Molekulargewicht von ca. 210 kDa, ca. 116 kDa, ca. 80 kDa und ca. 60 kDa eine gesteigerte Tyrosinphosphorylierung als Antwort auf *S. aureus*, verglichen mit uninfizierten oder *S. carnosus*-infizierten Zellen, an den Tag. Durch Wiederbeprobung der Membran konnten zwei der tyrosinphosphorylierten Proteine als FAK (ca. 120 kDa) sowie als das Aktin-bindende Protein Cortactin (ca. 80 kDa) identifiziert werden und zugleich gleiche Proteinmengen

in den untersuchten Proben aufzeigen (Abb.4.13).

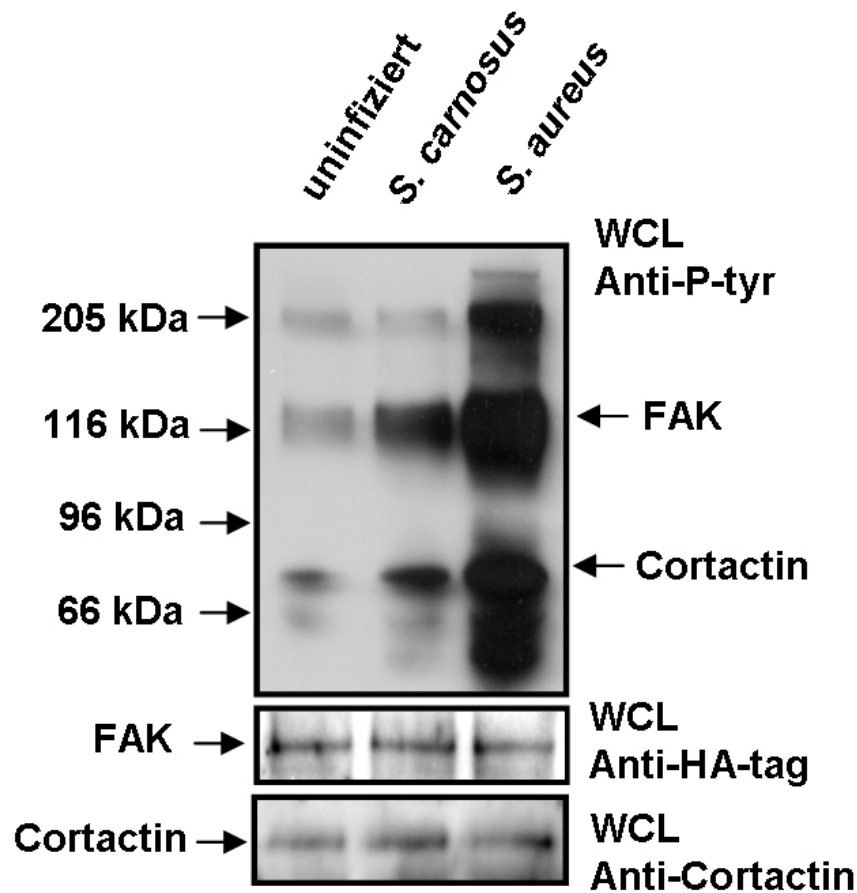


Abb 4.13 FAK wird Aufgrund der Invasion von *S. aureus* phosphoryliert. FAK reexprimierende Fibroblasten wurden auf Poly-L-Lysin ausgesät und entweder uninfiziert belassen oder mit einer MOI 50 für 1h mit *S. aureus* oder *S. carnosus* infiziert. Die Zellen wurden 10 min vor der Lyse mit Pervanadat behandelt. Ganzzell-Lysate (WCL) werden durch Western Blot Analyse mit einem monoklonalen Antikörper gegen Phosphotyrosine (obere Reihe) analysiert. Die Membranen werden „gestrippt“ und anschließend mit einem Antikörper gegen HA (mittlere Reihe) oder gegen Cortactin (untere Reihe) wiederbeprob.

Um nun die Kinetik der gesteigerten Tyrosinphosphorylierung während der Infektion mit *S. aureus* zu untersuchen, wurden FAK(+) Zellen einerseits uninfiziert belassen, andererseits für verschiedene Zeitpunkte mit *S. aureus* sowie mit dem nicht pathogenen *S. carnosus* infiziert. Interessanterweise stieg die Tyrosinphosphorylierung von FAK und anderen Proteinen zeitabhängig von der Infektion mit *S. aureus*. Dagegen konnte so gut wie keine Steigerung der Tyrosinphosphorylierung nach Infektion der Zellen mit dem nicht pathogenen *S. carnosus* festgestellt werden (Abb.4.14). Die Kinetik der FAK Tyrosinphosphorylierung spiegelt eng die Kinetik der Internalisierung von *S. aureus* durch die Zellen wieder (verglichen mit Abb.4.8), was wiederum für eine kritische Rolle von FAK für den Integrin vermittelten Aufnahmeprozess spricht. Interessanterweise konnte eine vergleichbare

Kinetik der gesteigerten Tyrosinphosphorylierung für einige andere Proteine, Cortactin eingeschlossen, beobachtet werden. Diese Tatsache lässt eine eventuelle Verbindung zur *S. aureus*-induzierten FAK-Aktivierung vermuten (Abb.4.14). Die Wiederbeprobung der Membran mit einem Anti-Desmin Antikörper konnte gleiche Proteinmengen in den Proben nachweisen (Abb.4.14). Zusammen zeigten diese Resultate, dass sich die Aktivität von FAK während der Aufnahme von *S. aureus* in eukaryotische Zellen ändert und dass eventuell eine potentielle Verbindung von FAK und Cortactin bei der Internalisierung von Integrin-assoziierten Partikeln besteht.

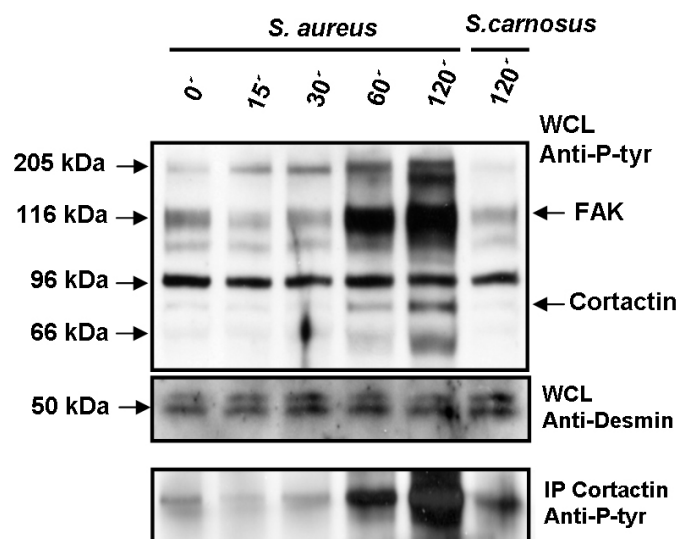


Abb 4.14 FAK wird mit ansteigender Infektionszeit von *S. aureus* zunehmend phosphoryliert. FAK reexprimierende Fibroblasten wurden auf Poly-L-Lysin ausgesät und entweder uninfiziert belassen oder für die angegebenen Zeiten mit *S. aureus* oder *S. carnosus* mit MOI 50 infiziert. Ganzzell-Lysate wurden durch Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen Phosphotyrosine (obere Reihe) oder einem Kontrollantikörper gegen Desmin (mittlere Reihe) analysiert. Die gleichen Proben wurden mit einem Antikörper gegen Cortactin immunopräzipitiert und ebenfalls mit einem Antikörper gegen Phosphotyrosine analysiert (untere Reihe).

4.2.4 Der Ort der Aufnahme von *S. aureus* ist mit phosphotyrosinhaltigen Proteinen und Cortactin angereichert

Die Anwesenheit von aktiviertem FAK am Ort von zellassozierten *S. aureus* sollte in einer gesteigerten Tyrosinphosphorylierung von *downstream* Effektoren des FAK-Src Komplexes resultieren. Tatsächlich konnte nach 1 h Infektion von FAK(+) Zellen mit *S. aureus* durch Immunofluoreszenzfärbung eine massive Akkumulation der Tyrosinphosphorylierung in der Umgebung zellgebundener Bakterien bestätigt werden (Abb.4.15). Im Gegensatz dazu konnte, trotz höherer basaler Tyrosinphosphorylierung in FAK(-) Zellen,

keine gesteigerte lokale Konzentration an phosphorylierten Tyrosinen nach Infektion mit *S. aureus*, beobachtet werden (Abb.4.15).

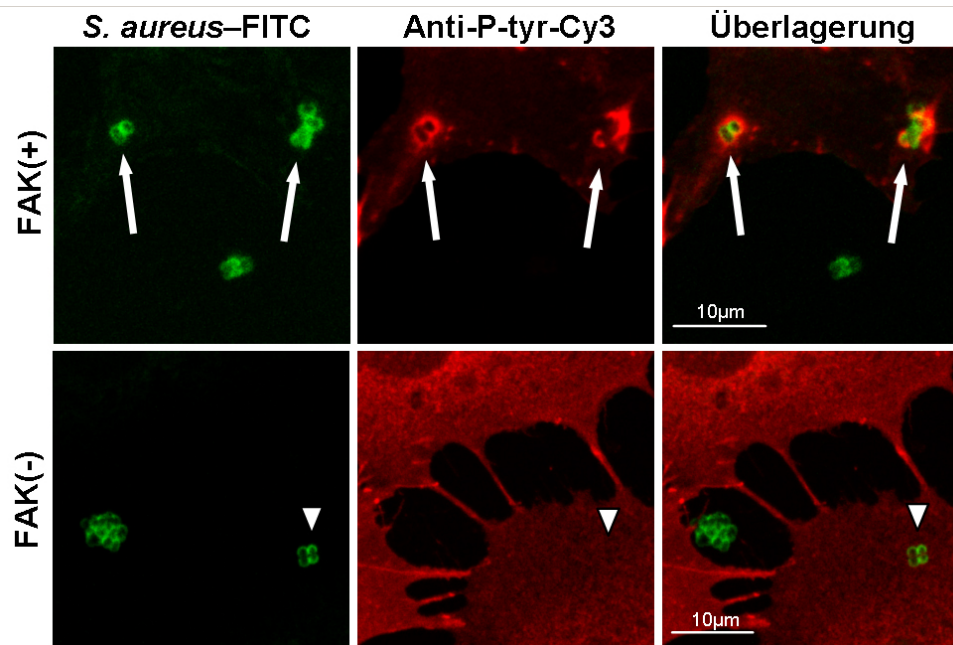


Abb 4.15 Akkumulation von phosphotyrosin-haltigen Proteinen am Ort der Invasion von *S. aureus*. FAK(+) oder FAK(-) Fibroblasten wurden mit FITC-markierten *S. aureus* für 1 h infiziert. Nach der Fixierung und Permeabilisierung wurden die Proben mit einem monoklonalen Antikörper gegen Phosphotyrosine (P-tyr) behandelt. An Orten, an denen *S. aureus* in FAK(+) Zellen eine massive Akkumulation von tyrosin-haltigen Proteinen (kleine Pfeile) hervorrief, konnte in FAK(-) Zellen keine Bakterien-assoziierte Tyrosinphosphorylierung beobachtet werden (Pfeilkopf). Größenbalken repräsentieren 10 μm.

Ferner induzierte eine Infektion von FAK(+) Zellen mit *S. carnosus* keinen lokalen Anstieg in der Tyrosinphosphorylierung von zellulären Proteinen (Abb.4.16).

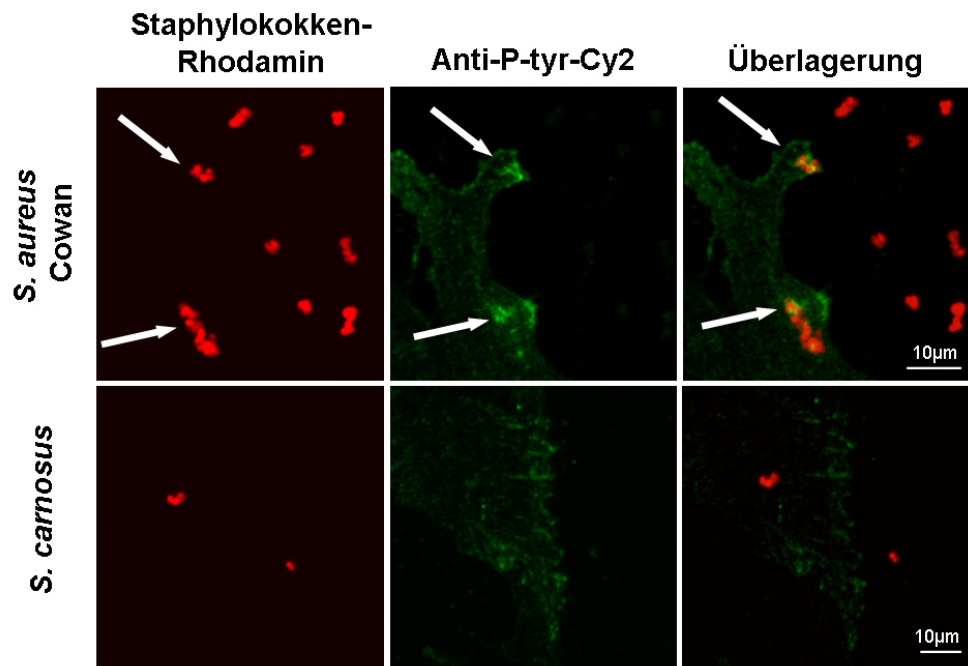


Abb 4.16 Lokale Akkumulation von tyrosinphosphorylierten Proteinen ist selektiv für die Invasion von *S. aureus*. FAK(+) Fibroblasten wurden für 1h mit Rhodamin-markierten *S. aureus* oder *S. carnosus* infiziert. Die Proben wurden fixiert und mit einem monoklonalen Antikörper gegen Phosphotyrosine sowie einem Cy2-gekoppelten Zweitantikörper behandelt. Ausschließlich bei mit *S. aureus*-infizierten Zellen konnte eine Ansammlung von phosphotyrosin-haltigen Proteinen am Ort von zellassoziierten Bakterien festgestellt werden. Größenbalken repräsentieren 10µm.

Um zu untersuchen, inwieweit Cortactin ein Substrat dieser Tyrosinkinase ist, das zum Ort der bakteriellen Aufnahme rekrutiert wird, wurden 293T Zellen transient vor der Infektion mit RFP-Cortactin transfiziert. Interessanterweise konnte 60 min nach Infektion mit *S. aureus* eine deutliche Rekrutierung von RFP-Cortactin zur Stelle des gebundenen Bakteriums beobachtet werden, wogegen *S. carnosus* die zelluläre Verteilung von Cortactin nicht beeinflusste (Abb.4.17A). Wiederum zeigte die quantitative Analyse der Cortactinverteilung eine lokal begrenzte Akkumulation von Cortactin im Abstand von 1 – 2µm um das eindringende Bakterium (Abb.4.17B). Da Cortactin nach Infektion mit *S. aureus* eine stark erhöhte Tyrosinphosphorylierung aufwies und spezifisch am Ort der bakteriellen Internalisierung angereichert war, liegt die Vermutung nahe, dass dieses Protein eine entscheidende Rolle für den Integrin-vermittelten Internalisierungsprozess spielt.

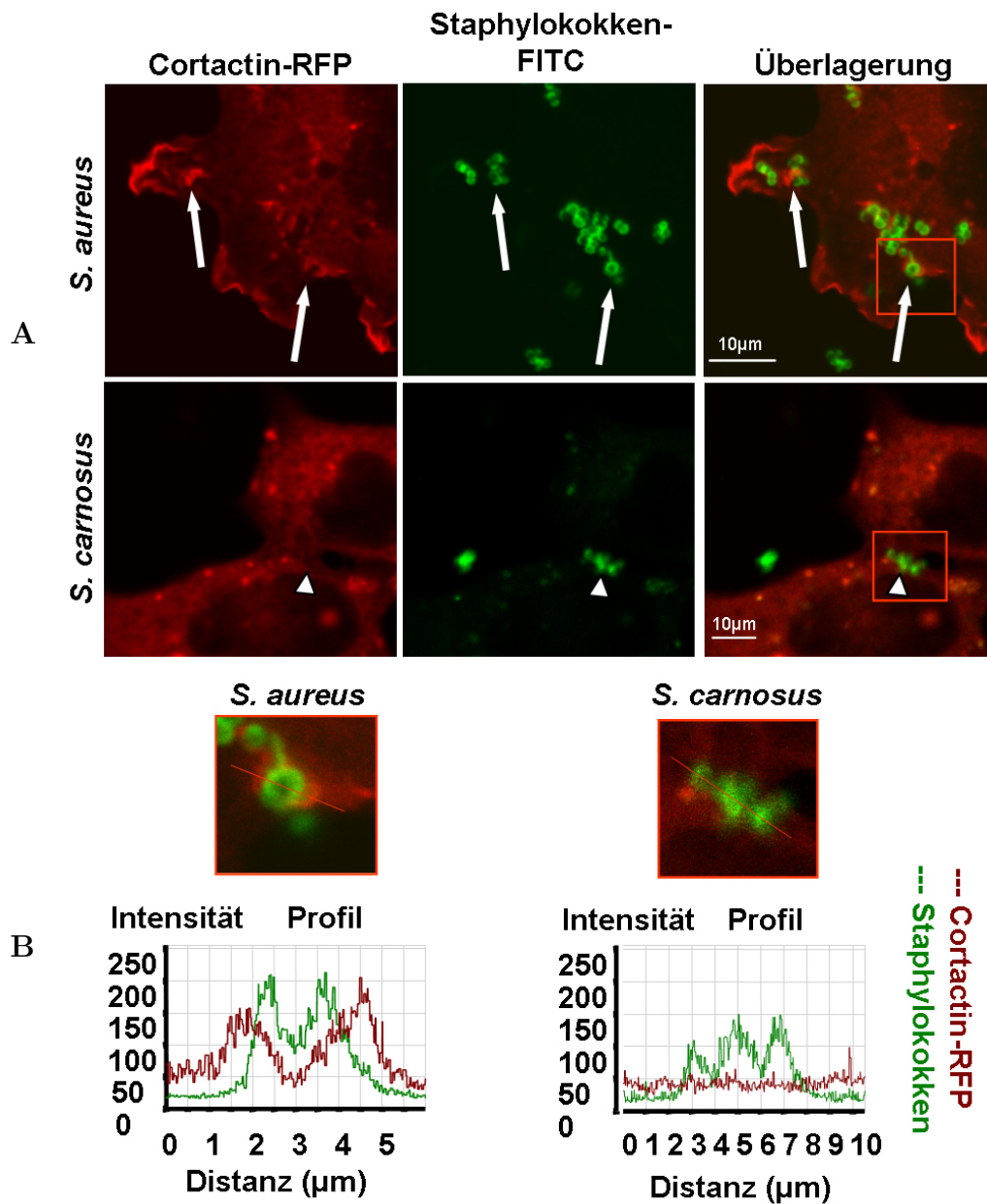


Abb 4.17 Cortactin wird zum Invasionsort von *S. aureus* rekrutiert. 293T Zellen wurden transient mit RFP-Cortactin transfiziert und für 1 h mit FITC-markierten Staphylokokken infiziert. Im Kontrast zu *S. carnosus* (Pfeilkopf), induzierte *S. aureus* eine starke Akkumulation von RFP-Cortactin (kleine Pfeile). Größenbalken repräsentieren 10µm (A). Die lokale Rekrutierung von RFP-Cortactin zu zellassozierten Bakterien wurde durch Erstellung eines Fluoreszenz-Intensitäts-Profiles entlang der gekennzeichneten roten Linie quantifiziert. GFP- oder Rhodamin-Kanäle wurden jeweils gegen die Distanz aufgetragen (B).

4.2.5 Die Beeinträchtigung der Cortactin Funktion blockiert die Invasion von *S. aureus*

Cortactin ist ein Substrat der Src Kinase sowie ein aktinbindendes Protein, welches das corticale Aktinzytoskelett organisiert und die Membran-Dynamik durch Steuerung der Aktivitäten des Arp2/3 Komplexes sowie des Dynamins beeinflusst (Weed and Parsons, 2001). Um zu testen, inwiefern Cortactin eine funktionelle Rolle für die Integrin-vermittelte Aufnahme von *S. aureus* hat, wurde mittels siRNA die Expression von Cortactin reduziert. 24 h nach Behandlung von 293T Zellen mit gegen Cortactin gerichteten doppelsträngigen RNA-Oligonukleotiden war die Proteinmenge von Cortactin um mehr als 80 % reduziert gegenüber Zellen, die mit einem Kontrolloligonukleotid behandelt wurden (Abb.4.18). Die reduzierte Cortactin-Expression führte zu einem starken Rückgang der Aufnahme von *S. aureus* durch die Zellen. Dies deutet auf eine funktionelle Rolle dieses Aktin-bindenden Proteins hin (Abb.4.18).

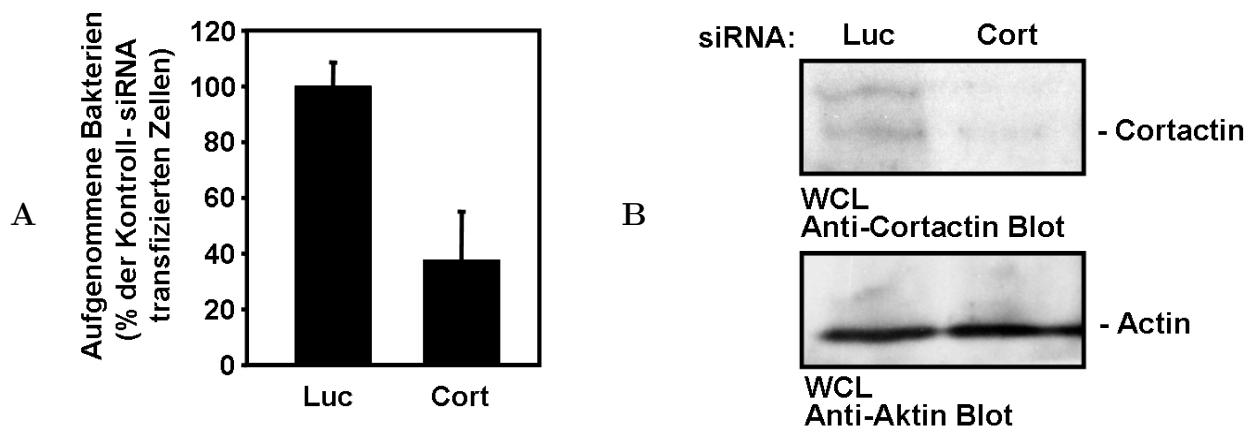


Abb 4.18 Durch das Interferieren in die Expression von Cortactin wird die Invasion von *S. aureus* massiv inhibiert. 293T Zellen wurden zum einen mit einer siRNA gegen Cortactin (Cort) zum anderen mit einer Kontroll siRNA gegen Luciferase (Luc) transfiziert. 24h später wurden die Zellen in einem Gentamicin/Lysostaphin Protektionsassay mit *S. aureus* eingesetzt. Die Graphen repräsentieren einen Mittelwert \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen dreifach angesetzten Experimenten (A). Western Blot Analysen der Ganzzell-Lysate mit einem Antikörper gegen Cortactin (obere Reihe) bestätigten die negative Genregulierung durch die siRNA. Die Wiederbeprobung der gleichen Membran mit einem Antikörper gegen Aktin diente als Ladekontrolle (untere Reihe)(B).

Um weiterhin festzustellen, welche molekularen Strukturen von Cortactin für die Integrin-vermittelte Aufnahme von *S. aureus* benötigt werden, wurden 293T Zellen transient mit zwei Cortactin-Mutanten transfiziert, die einerseits ihrer Fähigkeit, den Arp2/3 Komplex (Cortactin W22A) und andererseits Dynamin binden zu können (Cortactin W525K),

verloren haben (Schafer et al., 2002). Beide Mutanten wurden gleich gut von den transfizierten Zellen exprimiert und beide waren fähig, die Aufnahme von *S. aureus* um 60 % zu vermindern, verglichen mit kontrolltransfizierten Zellen (pcDNA), (Abb.4.19).

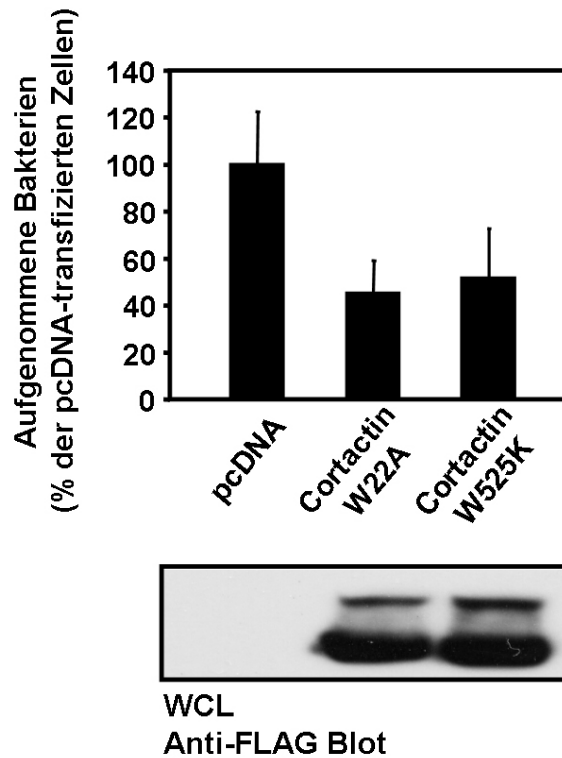


Abb 4.19 Die aktive Behinderung der Cortactinfunktion führt zur Inhibierung der Aufnahme von *S. aureus*. 293T Zellen wurden transient mit einem leeren Kontrollvektor (pcDNA) oder Cortactin-Mutanten, die einerseits in die Assoziation mit dem Arp2/3 Komplex interferieren (W22A) oder andererseits die Bindung von Dynamin blockieren (W525K). Transfizierte Zellen wurden in einem Gentamicin/Lysostaphin Protektionsassay mit *S. aureus* eingesetzt. Die Graphen repräsentieren einen Mittelwert \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen dreifach angesetzten Experimenten. Ganzzell-Lysate wurden mit Hilfe von Western Blot Analysen mit einem Antikörper gegen FLAG auf die Expression der Cortactin-Mutanten untersucht.

Da die gesteigerte Tyrosinphosphorylierung von Cortactin mit gesteigerter Internalisierung von *S. aureus* einher geht, stellte sich die Frage, inwiefern Tyrosinphosphorylierung von Cortactin eine funktionelle Rolle während des Aufnahmeprozesses hat. Demgemäß wurden 293T Zellen transient mit Cortactin Mutanten transfiziert, bei denen entweder drei Tyrosinreste (Cortactin Y421/466/482F) oder die Hauptphosphorylierungsstelle von c-Src in Cortactin (Cortactin Y421F) durch Phenylalanin ersetzt wurden. Mit Hilfe eines Gentamicin / Lysostaphin Protektions Assays konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Cortactin Y421F in einer Reduktion der Internalisierung von *S. aureus* von 70 % resultierte (Abb.4.20). Weiterhin wurde bei Überexpression von Cortactin Y421/466/482F

die Aufnahmerate von *S. aureus* um 90 % reduziert, verglichen mit 293T Zellen, die mit dem leeren Kontrollvektor (pcDNA) transfiziert waren (Abb.4.20). Diese Ergebnisse stellen die wichtige Funktion von Cortactin, insbesondere der Tyrosinphosphorylierung, der Bindung an Dynamin sowie der Rekrutierung des Arp2/3 Komplexes für eine effiziente Internalisierung von *S. aureus* heraus. Da der Aufnahmeprozess von FAK und Cortactin abhängig war, besteht die Möglichkeit der funktionellen Verbindung Beider.

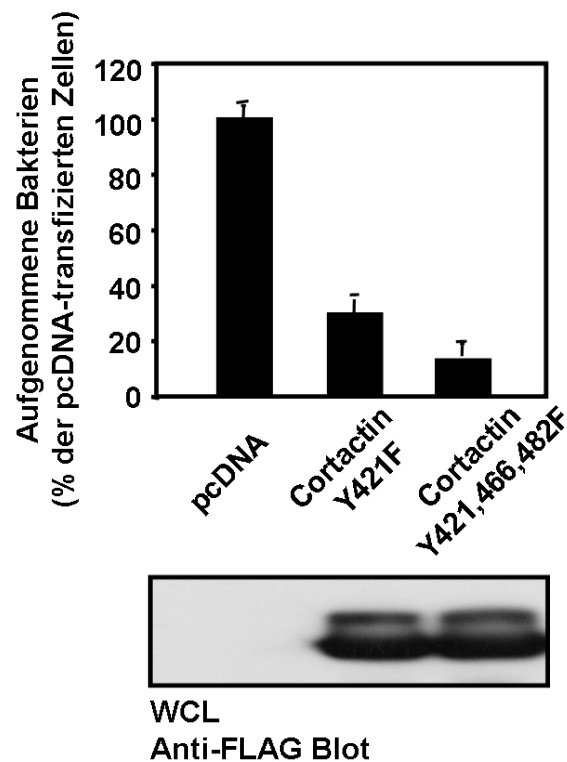


Abb 4.20 Die Beeinträchtigung von Cortactin an wichtigen Phosphorylierungsstellen blockiert die Internalisierung von *S. aureus*. 293T Zellen wurden mit einem leeren Kontrollvektor (pcDNA), einer Cortactin-Mutante, die am Tyrosinrest 421 mutiert ist (Y421F) oder einem Cortactinkonstrukt, das in allen drei C-terminalen Tyrosinresten mutiert ist (Y421, 466, 482F) transfiziert. Die Zellen wurden für 2h mit *S. aureus* (Cowan) infiziert und die Anzahl an internalisierten Bakterien mittels eines Gentamicin/Lysostaphin Protektionsassay ermittelt. Die Graphen repräsentieren einen Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen dreifach angesetzten Experimenten. Zur Überprüfung der Expression der transfizierten Cortactin-Mutanten wurden Ganzzell-Lysate (WCL) mit einem Antikörper gegen FLAG untersucht.

4.2.6 Tyrosinphosphorylierung von Cortactin aufgrund Integrinaktivierung ist von FAK und Src PTKen abhängig

Obwohl sowohl FAK als auch Cortactin aufgrund Integrinaktivierung reaktiv sind, beide als Src Substrate fungieren und beide bei der Zellmotilität eine Rolle spielen, konnte bislang noch nicht über eine funktionale Verbindung berichtet werden (Parsons, 2003, Vuori and Ruoslahti, 1995, Weed and Parsons, 2001). FAK könnte die Rekrutierung von Cortactin an die Stelle von zellassozierten *S. aureus* beeinflussen und direkt oder indirekt durch Assoziation mit Src PTK den Status der Cortactinphosphorylierung modulieren. Um diese Fragen zu klären, wurden FAK(+) und FAK(-) Zellen mit RFP-Cortactin transfiziert und für 1 h mit FITC-markierten *S. aureus* infiziert. Da sowohl in FAK(+) als auch in FAK(-) Zellen eine Akkumulation von RFP-Cortactin am Ort der gebundenen Staphylokokken mittels konfokaler Mikroskopie beobachtet werden konnte, scheint FAK für die Bestimmung der Lokalisation von Cortactin innerhalb einer Zelle keine Rolle zu spielen (Abb.4.21).

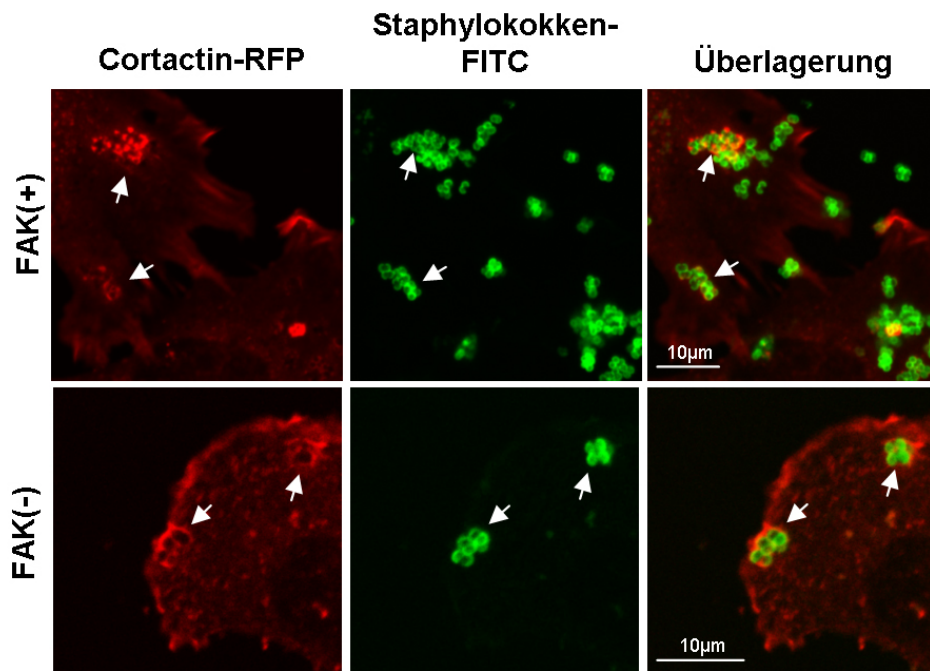


Abb 4.21 Die Rekrutierung von Cortactin an zellassozierte *S. aureus* ist nicht von FAK abhängig. FAK-defiziente und FAK-reexprimierende Fibroblasten wurden transient mit RFP-Cortactin transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen für 1 h mit FITC-markierten *S. aureus* (Cowan) infiziert. Die Pfeilköpfe zeigen auf eine Cortactin-akkumulation am Ort von zellassozierten *S. aureus*. Größenbalken repräsentieren 10 μm .

Als nächstes stellte sich die Frage, inwiefern die Integrin initiierte Tyrosinphosphorylierung von Cortactin durch FAK beeinflusst wird. Gemäß dieser Frage wurden FAK(+)

und FAK(-) Zellen durch Aussat auf Fibronectin-beschichtete Platten aktiviert, um eine Cortactinphosphorylierung zeigen zu können. Zu vermerken wäre, dass es bei Zellen in Suspension keinerlei Tyrosinphosphorylierung von Cortactin gab, die allerdings bei FAK(+) Zellen nach der Aussat stark anstieg (Abb.4.22). Allerdings konnte klar beobachtet werden, dass alleiniges Anheften der Fibroblasten auf Poly-L-Lysin, ein Substrat, das Integrin-unabhängige Anheftung der Zellen vermittelt, für eine basale Tyrosinphosphorylierung von Cortactin ausreichend war. Jedoch bestätigte sich nach Aussat der Zellen auf Fibronectin, dass Integrinaktivierung in gesteigerter Tyrosinphosphorylierung von Cortactin resultierte (Abb.4.22).

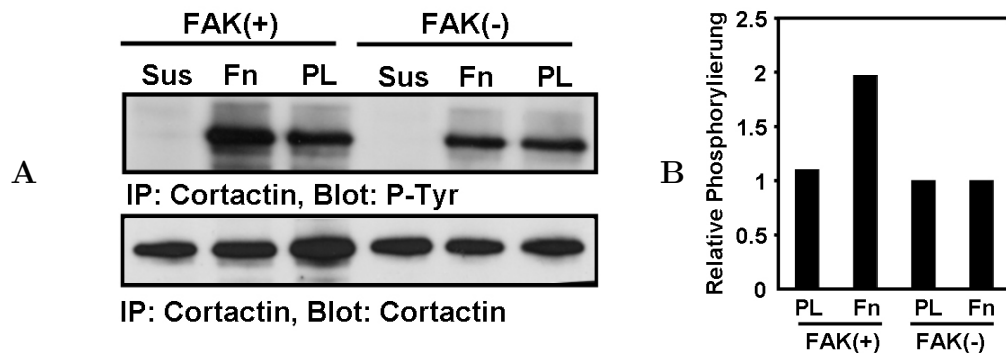


Abb 4.22 Integrin-initiierte Tyrosinphosphorylierung von Cortactin ist von FAK abhängig. Serumgehungerte FAK(+) und FAK(-) Zellen wurden entweder in Suspension (Sus) gehalten oder auf eine Fibronectin-(Fn) oder Poly-L-Lysin- (PL) beschichtete Platte für 30 min ausgesät. Die Proben wurden 5 min vor der Lyse mit Pervanadat behandelt. Nach einer Cortactin Immunpräzipitation wurden die Proben durch Western Blot Analyse mit einem monoklonalen Antikörper gegen Phosphotyrosine (P-Tyr; obere Reihe) analysiert. Nach dem *stripping* wurden die Membranen mit einem polyklonalen Antikörper gegen Cortactin (untere Reihe) wieder beprobt (A). Der Graph zeigt das Verhältnis von phosphoryliertem Cortactin zu der Gesamtmenge an Cortactin in den Immunpräzipitaten. Zum Vergleich wurde das Verhältnis der FAK(-) Zellen, die auf Poly-L-Lysin ausgesät waren auf 1 gesetzt (B).

Im Gegensatz dazu konnte bei Integrinstimulierung in FAK(-) Zellen keine gesteigerte Tyrosinphosphorylierung von Cortactin festgestellt werden. Dies demonstriert die kritische Rolle von FAK für die Integrin-abhängige Cortactinphosphorylierung. Zusätzlich wurden FAK(+) sowie FAK(-) Fibroblasten für 60 min mit *S. aureus* infiziert oder unbehandelt belassen. Westernblot Analysen bestätigten eine gesteigerte Cortactinphosphorylierung nach Infektion mit *S. aureus* in FAK-exprimierenden Zellen, während der basale Level der Cortactin Tyrosinphosphorylierung in FAK-defizienten Zellen unverändert blieb (Abb.4.23A). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Anstieg der Cortactinphosphorylierung aufgrund der Aussat von FAK(+) Fibroblasten auf Fibronectin durch Zugabe des spezifischen Src PTK Inhibitors PP2 komplett aufgehoben werden konnte (Abb.4.24). Der gleiche Effekt konnte nach Stimulierung der Zellen mit *S. aureus* beobachtet werden

(Abb.4.23B). Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, dass nach Integrinaktivierung durch immobilisiertes Fibronektin oder Fibronektin-beschichtete Bakterien nur ein aktiver FAK-Src-Komplex die Tyrosinphosphorylierung, nicht aber die Lokalisation von Cortactin beeinflussen konnte. Diese Ergebnisse zeigen eine neue FAK/Src-Cortactin Signalachse, die für die Regulation der Integrininternalisierung verantwortlich ist.

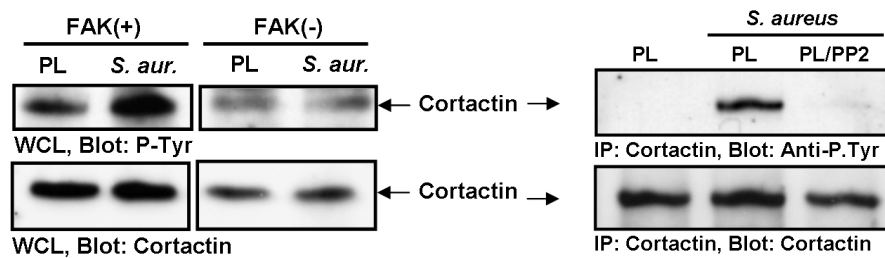


Abb 4.23 FAK und Src kooperieren bei der, durch *S. aureus*-Infektion hervorgerufenen Tyrosinphosphorylierung von Cortactin. Serumgehungerte FAK(+) oder FAK(-) Fibroblasten wurden auf Poly-L-Lysin-beschichtete Platten ausgesät und anschließend uninfiziert belassen oder für 1h mit *S. aureus* infiziert. Ganzzell-Lysate (WCL) wurden durch Western Blot Analysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen Phosphotyrosine (P-Tyr; obere Reihe) untersucht. Nach dem *stripping* wurden die Membranen mit einem polyklonalen Antikörper gegen Cortactin wieder beprobt (untere Reihe)(A). Serumgehungerte FAK(+) Zellen wurden auf Poly-L-Lysin-beschichtete Platten ausgesät und anschließend uninfiziert belassen oder für 1h in Anwesenheit oder Abwesenheit von $5\mu\text{M}$ PP2 mit *S. aureus* infiziert. Nach der Cortactin Immunpräzipitation (IP) wurden die Proben durch Western Blot Analyse mit einem monoklonalen Antikörper gegen Phosphotyrosine (P-Tyr; obere Reihe) untersucht. Nach dem *stripping* wurden die Membranen mit einem polyklonalen Antikörper gegen Cortactin wieder beprobt (untere Reihe)(B).

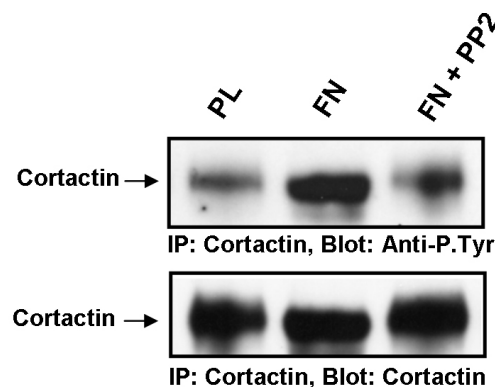


Abb 4.24 Bakterienunabhängige, Integrin-initiierte Tyrosinphosphorylierung von Cortactin ist von FAK und Src abhängig. Serumgehungerte FAK(+) oder FAK(-) Fibroblasten wurden entweder auf Poly-L-Lysin-beschichteten oder in Anwesenheit oder Abwesenheit von $5\mu\text{M}$ PP2 auf Fibronektin (Fn)-beschichteten Platten ausgesät. Nach einer Cortactin Immunpräzipitation wurden die Proben durch Western Blot Analyse mit einem monoklonalen Antikörper gegen Phosphotyrosine (P-Tyr; obere Reihe) analysiert. Nach dem *stripping* wurden die Membranen mit einem polyklonalen Antikörper gegen Cortactin (untere Reihe) wieder beprobt.

4.3 Diskussion

Integrine werden durch viele Viren und bakterielle Pathogene benutzt, um in eukaryotische Wirtszellen eindringen zu können. In dieser Arbeit wurde genauer untersucht, inwiefern FnBP-exprimierende *S. aureus* ihren Vorteil aus der integrinregulierten Aktindynamik ziehen, die zu ihrer Aufnahme führt. Die bakterielle Inanspruchnahme des $\alpha_5\beta_1$ Integrins führt zu einem Zusammenbau eines zytoplasmatischen Proteinkomplexes, der durch die Anwesenheit von Talin, Vinculin sowie Zyxin charakterisiert ist. Zusätzlich werden die integrinassoziierte Proteintyrosinkinase FAK sowie das aktinbindende Protein Cortactin zu invasiven Bakterien rekrutiert und veranlassen gemeinsam die integrinabhängige Internalisierung von *S. aureus*.

Durch Aktivierung des $\alpha_5\beta_1$ Integrins scheinen bakterielle Pathogene die Fähigkeit dieses Fn-Rezeptors, dynamisch mit dem Aktinzytoskelett zu interagieren auszunutzen. Dabei tragen sie zur Bildung von *pulling forces* bei, die wiederum für die Aufnahme der Staphylokokken durch die eukaryotische Wirtszelle verantwortlich sind.

Einige kürzlich erschienene Untersuchungen konnten eine funktionelle und morphologische Diversität von zellulären fokalen Kontakten feststellen (Geiger et al., 2001). Auf morphologischen Aspekten basierend, wurde bei der Charakterisierung von zellulären Bindungsstellen zwischen fokalen Komplexen, gereiften fokalen Adhäsionen und fibrillären Adhäsionen unterschieden (Geiger et al., 2001). Im Speziellen gilt Tensin (ein Protein, das stark zu Orten, an denen *S. aureus* an $\alpha_5\beta_1$ Integrine gebunden hat, rekrutiert wird) als ein Markerprotein von fibrillären Adhäsionen (Zamir et al., 2000). Funktionell sind fibrilläre Adhäsionen, die $\alpha_5\beta_1$ Integrine enthalten, in der Organisation der extrazellulären Matrix involviert, indem sie Fibronektinfibrillen miteinander verbinden. Bei genetischer Entfernung von β_1 Integrinen funktioniert der Zusammenbau eines extrazellulären Netzwerks aus Fibronektin nicht mehr (Danen et al., 2002, Wennerberg et al., 1996). Zelluläre *pulling forces*, die durch eine $\alpha_5\beta_1$ Integrin-vermittelte Verbindung zum Aktin-Myosin-Netzwerk erzeugt werden, scheinen für die Fn-Fibrillenformation wichtig zu sein. Dies resultiert daraus, dass kraftinduzierte konformelle Änderungen für die Verfügbarkeit von kryptischen Multimerisierungsstellen innerhalb der zweiten Typ III Repeat von Fn essenziell sind (Sechler et al., 2001).

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die fokale Adhäsionskinase (FAK) eine Schlüsselrolle bei der Formation fibrillärer Fn-Matrix spielt. FAK-defiziente Zellen *in vitro* sowie FAK-defiziente Mausembryos *in vivo* sind nicht mehr zum korrekten Zusammenschluss von Fn-Fibrillen fähig (Ilic et al., 2004). In Übereinstimmung mit der Tatsache,

dass FAK-defiziente Zellen keine korrekte Fn-Matrix herstellen können, konnte beobachtet werden, dass diese Zellen ebenfalls nicht mehr zur Internalisierung von *S. aureus* fähig waren. Wie man erwarten würde, bindet *S. aureus* gleich gut an FAK-exprimierende und FAK-defiziente Zellen. Jedoch bestätigt eine *scanning*-elektronenmikroskopische Aufnahme, dass in FAK-defizienten Zellen keine Membraneinstülpungen um gebundene Bakterien geformt werden. Dies deutet darauf hin, dass Integrinverbindungen zum Aktin-Myosin-Netzwerk zerstört werden oder *pulling forces* nicht verfügbar sind.

FAK ist auch bei anderen Integrin-vermittelten Internalisierungsprozesse in anderen Systemen ein wichtiger Faktor. Zum Beispiel wird bei der durch $\alpha_V\beta_5$ -Integrinen vermittelten Aufnahme verbrauchter äußerer Segmentfragmente eines Photorezeptors durch das retinale Pigmentepithelium die Anwesenheit von FAK benötigt (Finnemann, 2003). Dieser Internalisierungsprozess ist von einer lokalen Rekrutierung und gesteigerter Tyrosinphosphorylierung von FAK begleitet, vergleichbar mit der $\alpha_5\beta_1$ -Integrin-vermittelten Aufnahme von *S. aureus* (Finnemann, 2003). FAK ist ebenfalls bei der Internalisierung enteropathogener *Yersiniae* aufgrund Invasin-vermittelter Aktivierung von β_1 Integrinen involviert. Die Aufnahme von *Streptococcus pyogenes* ist durch das Binden des Proteins F1 an fibronectinbindende Integrine vermittelt, und auch hier spielt FAK eine entscheidende Rolle (Alrutz and Isberg, 1998, Ozeri et al., 2001). Diese Beobachtungen gehen mit der Ansicht einher, dass Signale, die von FAK koordiniert sind, für die Internalisierung diverser an Integrin-gebundene Partikel von großer Bedeutung sind.

Neben den, zur Aufnahme der Integrin gebundenen Bakterien benötigten Kräften müssen die Zellen die aufzunehmenden Partikel mit einer Membranausstülpung aus polymerisiertem Aktin umschließen. In diesem Kontext wurde Cortactin, ein Aktin bindendes Protein beobachtet, das an Orten bakterieller Anheftung stark angereichert ist. Da Cortactin direkt mit dem Arp2/3 Komplex, einem zellulären Zentralvermittler der Aktinpolimerisation, in Verbindung treten und ihn aktivieren kann (Pollard, 2003, Weaver et al., 2002), könnte Cortactin eine wichtige Rolle im Aufnahmeprozess spielen. Tatsächlich zeigt die Überexpression der Cortactin-Mutante (Cortactin W22A), die keine Assoziation mit dem Arp2/3 Komplex mehr eingehen kann (Weed et al., 2000), einen deutlichen negativen Effekt auf die Integrin-vermittelte Internalisierung von *S. aureus*. Interessanterweise scheint Cortactin und der Arp2/3 Komplex bei der Aufnahme von *Shigella flexneri* in humane Zellen ebenfalls involviert zu sein (Bougneres et al., 2004). Invasion von *S. flexneri* ist gegründet in der Assoziation mit zellulären Rezeptoren wie β_1 -Integrine oder CD44 und ein TypIII Sekretionssystem, das die Injektion von bakteriellen Effektoren vermittelt (Watarai et al., 1996, Skoudy et al., 2000). Zusätzlich scheinen diese Bakterien eine ähn-

liche Aktin-modulierende zelluläre Maschinerie zu verwenden, welche die Aktivierung der Src Kinasen ebenso wie die lokale Rekrutierung von Vinculin und Cortactin beinhaltet (Bougnères et al., 2004, Dehio et al., 1995, Tran Van Nhieu et al., 1997). In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass das Adaptormolekül Crk die Aufnahme von Shigella durch Leitung phosphorylierten Cortactins zur Stelle eindringender Bakterien beeinflussen kann (Bougnères et al., 2004). Weiterhin kann p130CAS, ein Adaptermolekül, das an die prolinreichen Stellen in der C-terminalen Domäne von FAK bindet, sowie ein wichtiges Substrat des aktiven FAK-Src-Komplexes ist, mit Crk assoziieren. Da Mutationen der prolinreichen Stellen in FAK (FAK Pro-) zu einem starken Rückgang der Aufnahme von *S. aureus* führen, könnte in diesem Zusammenhang ein ähnlicher Effekt für Crk erwartet werden. Auf der anderen Seite war die Lokalisation von Cortactin zu den Stellen gebundener *S. aureus* von FAK unabhängig, was auf die Existenz von anderen Wegen der Cortactinrekrutierung verweist. Während *S. flexneri* dieses System aktiviert, das massive Aktinakkumulationen sowie Membranumgestaltungen am Ort bakterieller Aufnahme hervorruft, konnten nur in einer kleinen Fraktion von *S. aureus*-infizierten Zellen solche dramatischen Membranausstülpungen beobachtet werden. Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass die Feinabstimmung der Aktinpolymerisation am Kontaktpunkt der Bakterien zwischen diesen Pathogenen differiert. Es liegt nahe zu spekulieren, inwiefern der mehr physiologische Weg von *S. aureus*, einen Oberflächenrezeptor der Zelle zu aktivieren, verglichen mit der Injektion von Proteinen durch das TypIII Sekretionssystem im Falle von *S. flexneri*, in einer etwas mehr eingeschränkten Aktinpolymerisation resultiert.

Für Cortactin konnte, zusätzlich zur gerichteten Aktinpolymerisierung durch Rekrutierung des Arp2/3 Komplexes, die Fähigkeit das corticale Aktin Zytoskelett mithilfe von Molekülen zu binden, beschrieben werden (McNiven et al., 2000). Cortactin bindet direkt an Dynamin-2, eine GTPase, die die Abschnürung endozytischer Vesikel von der Plasmamembran reguliert (van der Blik, 1999). Dynamin-2 kann mit Cortactin kolokalisieren und bei der Organisation von aktinreichen Strukturen involviert sein. Dies fand man vor allem in Podosomen, spezialisierten Bindungsstellen, die vor allem in Osteoblasten und Makrophagen vorkommen, aber auch in Zellen, die durch konstitutiv aktives Src transformiert waren (Ochoa et al., 2000). Die Assoziation von Cortactin und Dynamin-2 kommt durch die SH3 Domäne von Cortactin, die an das prolinreiche Motiv im C-terminalen Teil von Dynamin bindet, zustande (McNiven et al., 2000). Die Beobachtung, dass eine Überexpression der Cortactinmutante, die eine Dynaminbindung verhindert, die Integrinvermittelte Aufnahme von *S. aureus* stark negativ beeinflusst, lässt die Annahme zu, dass Cortactin eventuell die Aktinpolymerisierung sowie die Membranausstülpungen über den

Arp2/3 Komplex koordiniert. Dies könnte durch Dynamin-2-vermittelte Trennung endozytischer Vesikel, die invasive Staphylokokken enthalten, geschehen.

Unerwarteterweise bietet die Entdeckung der FnBP-vermittelten Aufnahme von *S. aureus* eine neue funktionelle Verbindung zwischen FAK und Cortactin. Genauer betrachtet spielt FAK eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Integrin $\alpha_5\beta_1$ -initiierten Signalen zu Cortactin. Obwohl sowohl FAK als auch Cortactin Substrate von aktiviertem Src sind und beide in der Regulierung der Zellmigration involviert sind, wurde bislang noch keine funktionelle Verbindung dieser beiden Moleküle beschrieben (Parsons, 2003, Vuori and Ruoslahti, 1995, Weed and Parsons, 2001). Der basale Level der Cortactin Tyrosinphosphorylierung ist durch die Anwesenheit von FAK unbeeinflusst, wogegen FAK-defiziente Zellen aufgrund Integrinaktivierung keine gesteigerte Cortactin Tyrosinphosphorylierung zeigen. Folglich ist die *S. aureus*-induzierte Tyrosinphosphorylierung von Cortactin in Abwesenheit von FAK aufgehoben. Diese Daten zeigen deutlich die essentielle Bedeutung von FAK bei der Verbindung eines Integrin $\alpha_5\beta_1$ -initiierten Stimulus mit der Tyrosinphosphorylierung von Cortactin. Die Phosphorylierung einzelner Cortactin Tyrosinreste, speziell Tyr-421, ist durch die Familie der Src Kinasen vermittelt. Es ist ebenfalls bekannt, dass Cortactinphosphorylierung die Aktin-it cross-linking-Aktivität beeinflussen kann (Huang et al., 1997). Da die Integrin-vermittelte FAK Aktivierung eng verbunden ist mit der Bildung eines aktiven FAK-Src-Komplexes (Schlaepfer et al., 1994) und die *S. aureus*-vermittelte Phosphorylierung von Cortactin durch den Src PTK Inhibitor PP2 verhindert wird, wird spekuliert, dass eine Fn-initiierte Bildung von Integrinclustern zu einer FAK-abhängigen lokalen Rekrutierung von Src und damit zu einer Src vermittelten Tyrosinphosphorylierung von Cortactin führt. Diese Daten vermitteln einen neuen Einblick in die Regulierung der Aktindynamik an fokalen Kontaktstellen und zeigen uns im Detail ein molekulares Szenario, in wieweit Integrinaktivierung mit Endozytose in Zusammenhang stehen könnte. Es ist von speziellem Interesse, dass sowohl FAK als auch Cortactin bei der Regulierung der Zellbeweglichkeit und der Invasion von Tumorzellen eine Rolle spielen. FAK ist in einer Anzahl von invasiven humanen Tumoren überexprimiert. Die Beeinflussung der Funktionstüchtigkeit von FAK verhindert die invasive Mobilität von v-Src transformierten Zellen *in vitro* und *in vivo* (Gabarra-Niecko et al., 2003, Hauck et al., 2002a, Hsia et al., 2003). Zusätzlich wurde das humane Gen für Cortactin (EMS1) in humanem Krebs amplifiziert vorgefunden (Schuuring et al., 1992). Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Cortactin in Fibroblasten zu einer *in vitro* Invasion führt (Patel et al., 1998). Die funktionelle Kooperation zwischen diesen beiden Molekülen, die während der Integrin-vermittelten Internalisierung von pathogenen *S. aureus* beobachtet

werden konnte, könnte daher auch in anderen Bereichen wie der Zellmigration während der Embryonalentwicklung oder der invasiven Motilität von transformierten Zellen von Relevanz sein.

5 Schlussbetrachtung

Viele multizelluläre Organismen exprimieren spezialisierte Oberflächenrezeptoren (z.B. Integrine), die zusätzlich zu ihrer strukturellen Rolle bei der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Bindung, eine bedeutende Aufgabe bei der Signalweiterleitung ins Innere der Zelle haben. Diese Tatsache macht Integrine zu einem idealen Ziel für Pathogene zum Anheften an oder Kommunizieren mit der Wirtszelle. Mittlerweile kennt man eine Reihe von Mikroorganismen, die Integrine erkennen, binden und die die Funktion der Rezeptoren für ihre eigenen Zwecke nutzen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* die indirekte Bindung an β_1 -Integrine nutzt, um durch Signaltransduktionsereignisse, die zur Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts führen, in die Wirtszelle aufgenommen zu werden. Eine Reihe von intrazellulären Signalen, ausgehend von der Integrin β_1 -vermittelten Aufnahme von *S. aureus*, wurden in dieser Arbeit näher untersucht. Dabei wurde eine bedeutende Rolle der Phosphotyrosinkinasen und des Aktin Zytoskeletts aufgezeigt, sowie die Phosphotyrosinkinasen der Src-Familie als wichtiger Faktor bei der Vermittlung von Signalen, die zur Invasion von *S. aureus* führen, identifiziert. Es konnte ausschließlich nach Infektion mit pathogenen *S. aureus* eine Aktivierung der Src-Kinase festgestellt werden. Die Tatsache, dass Src-defiziente Zellen resistent gegenüber der Invasion von *S. aureus* sind, verdeutlicht die Bedeutung der wirtseigenen Phosphotyrosin-Kinasen der Src Familie für die Integrin β_1 -vermittelte Aufnahme von *S. aureus*.

Eine Reihe von weiteren Bakterien, wie *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella pertussis*, *Shigella* spp., *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis* sowie Viren wie Adenovirus, Coxsackievirus, Echovirus, HIV und Pappilomavirus verwenden Integrine als Rezeptoren zur Adhäsion oder/und Invasion an/in Wirtszellen (Kerr, 1999, van der Flier and Sonnenberg, 2001, Hauck, 2002). Sie benutzen diesen Weg der Integrin-vermittelten Internalisierung, um dem wirtseigenen Immunsystem zu entkommen und gleichzeitig in einer nährstoffreichen Umgebung sein zu können (Hauck, 2002, van der Flier and Sonnenberg, 2001). *Streptococcus pyogenes* nutzt, ähnlich wie *S. aureus*, eine indirekte, durch Fibronektin vermittelte Bindung an β_1 -Integrinen zur Internalisierung in Endothelzellen und Fibroblasten (Talay et al., 2000, Ozeri et al., 2001). Das bekannteste Beispiel von Bakterien, die mittels Integrine in Wirtszellen eindringen, sind *Yersinia* spp.

Die enteropathogenen Spezies *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* exprimieren ein äußeres Membranprotein mit dem Namen Invasin, das die direkte Assoziation mit β_1 -Integrinen vermittelt. Invasin dient aber nicht nur der Bindung an Wirtszellen,

sondern auch der aktiven Invasion in β_1 -Integrin-exprimierende Zellen (Isberg et al., 1987). Es gibt eine verblüffende Ähnlichkeit in der Struktur von Invasin und Fibronectin, dem physiologischen Liganden der β_1 -Integrine. Allerdings treten keinerlei Homologien in der Sequenz auf, was auf unterschiedliche evolutionäre Entwicklungen schließen lässt (Isberg et al., 2000).

Im mittleren Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bindung von *S. aureus* an die Wirtszelle zu einem Zusammenbau eines zytoplasmatischen Proteinkomplexes führt, der durch die Anwesenheit von Talin, Vinculin sowie Zyxin charakterisiert ist. Zusätzlich werden die integrinassoziierte Proteintyrosinkinase FAK sowie das aktinbindende Protein Cortactin zu invasiven Bakterien rekrutiert. FAK ist ein kritischer Faktor für die Integrin-vermittelte Aufnahme von *S. aureus*, da sowohl FAK-defiziente Zellen in ihrer Fähigkeit, *S. aureus* aufzunehmen stark beeinträchtigt waren als auch dominant negative Versionen von FAK die Internalisierung von *S. aureus* blockierten.

Die Aufnahme von *Streptococcus pyogenes* wird durch das indirekte Binden des Proteins F1 über Fn an Integrine vermittelt, und auch hier spielt FAK eine entscheidende Rolle (Ozeri et al., 2001). Bei der Aufnahme von *Yersinia* spp. führt die hochaffine Bindung von Invasin zur Rekrutierung und Multimerisierung von β_1 -Integrinen. Diese Konzentrierung von β_1 -Integrinen ist, vergleichbar mit der Invasion von *S. aureus*, für die Rekrutierung von Proteinen des Zytoskeletts und Signalproteinen, die für die Weiterleitung der Signale nötig sind, sehr wichtig. Zur effektiven Signalweiterleitung sind Tyrosinkinasen wie Pyk2 und Src, Rac, der Arp2/3 Komplex, FAK, Crk und Crk-assoziierte Substrate (CAS) involviert (Isberg and Barnes, 2001, Alrutz et al., 2001, Bruce-Staskal et al., 2002, Weidow et al., 2000).

FAK spielt aber nicht nur bei der Aufnahme von pathogenen Bakterien eine wichtige Rolle. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass FAK ein kritischer Faktor eines Signalweges ist, der die Aufnahme von Partikeln veranlasst. Hierbei handelt es sich um die FAK-abhängige Phagozytose von äußeren Zellfragmenten mit integrin-gebundenen Photorezeptoren durch das retinale Pigmentepithel. Dieser Internalisierungsprozess ist von einer lokalen Rekrutierung und gesteigerter Tyrosinphosphorylierung von FAK begleitet, vergleichbar mit der $\alpha_5\beta_1$ -Integrin-vermittelten Aufnahme von *S. aureus* (Finnemann, 2003).

Zur Internalisierung von Partikeln oder Pathogenen ist meist eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts Voraussetzung. Es konnte beobachtet werden, dass Cortactin, ein Aktin-bindendes Protein und Src-Substrat, an Orten bakterieller Anheftung stark angereichert ist. Da Cortactin direkt mit dem Arp2/3 Komplex, einem zellulären Zentralvermitt-

ler der Aktinpolymerisation, in Verbindung treten und ihn aktivieren kann (Pollard, 2003, Weaver et al., 2002), konnte die Inhibition der Aufnahme mittels spezifischer Cortactinmutanten, sowie durch Cortactin-siRNA-Experimente die Bedeutung im Aufnahmeprozess von *S. aureus* bestätigt werden. Interessanterweise scheint Cortactin und der Arp2/3 Komplex bei der Aufnahme von *Shigella flexneri* in humane Zellen ebenfalls involviert zu sein (Bougnères et al., 2004). Diese Bakterien scheinen eine ähnliche Aktin-modulierende zelluläre Maschinerie, zu verwenden. Dieser Signalweg, der zur Reorganisation des Aktin Zytoskeletts führt, beinhaltet die Aktivierung der Src Kinasen ebenso wie die lokale Rekrutierung von Vinculin und Cortactin (Bougnères et al., 2004, Dehio et al., 1995, Tran Van Nhieu et al., 1997).

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde eine neue funktionelle Verbindung von FAK und Cortactin aufgezeigt. FAK und Cortactin gelten beide als Substrate von aktiviertem Src. Bislang wurde allerdings noch keine funktionelle Verbindung dieser beiden wichtigen Signalmoleküle beschrieben (Parsons, 2003, Vuori and Ruoslahti, 1995, Weed and Parsons, 2001). Seit langem ist bekannt, dass die Bildung eines FAK-Src-Komplexes eng mit der Integrin-vermittelten FAK-Aktivierung verknüpft ist (Schlaepfer et al., 1994). Daher wurde aufgrund der neuen Ergebnisse spekuliert, dass es aufgrund *S. aureus*-induzierter Bildung von Integrinclustern zu einer FAK-abhängigen lokalen Rekrutierung von Src kommt. Src kann nun Cortactin phosphorylieren. Diese Daten zeigen deutlich die essentielle Bedeutung von FAK bei der Verbindung eines Integrin $\alpha_5\beta_1$ -initiierten Stimulus mit der Tyrosinphosphorylierung von Cortactin. Da sowohl Cortactin als auch FAK bei der Invasion von Tumorzellen eine große Rolle spielen, könnte diese Verbindung auch in Bereichen der Krebsforschung von großer Bedeutung sein.

Eine Reihe von Integrinen konnte innerhalb von *lipid rafts* identifiziert werden. Diese Beobachtungen sind im Hinblick auf ein neues Projekt interessant. Zwei kürzlich erschienene Artikel bringen *lipid rafts* in Verbindung mit Signaltransduktionsereignissen, die durch Integrin-vermittelte Zelladhäsion an ECM initiiert wurden (del Pozo et al., 2004, Palazzo et al., 2004). Palazzo et al. konnte eine unterschiedliche Verteilung des Raft-markers GM1 (allerdings nicht bei Cholesterol oder GFP-GPI) bei FAK-defizienten im Vergleich zu FAK-exprimierenden Zellen beobachten. Dies lässt vermuten, dass verschiedene Typen von Rafts bei der Regulierung der Signaltransduktion involviert sind. Rafts wurden schon oft in Zusammenhang mit Proteinsortierung, Signaltransduktionsereignissen, Proliferation, Migration und Adhäsion gebracht (Brown and London, 2000, Simons and Toomre, 2000). Desweiteren nutzen viele Viren, Bakterien und Protozoen die wirtseigenen Mikrodomänen, um Wirtszellen zu infizieren (Rosenberger et al., 2000, Gulbins et al., 2004,

Manes et al., 2003). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Transformation von kleinen primären Rafts zu Ceramid-reichen Membrandomänen ein zentraler Punkt bei der Infektion von Säugerzellen durch pathogene Bakterien ist (Grassme et al., 2003, Grassme et al., 1997, Hauck et al., 2000).

Ceramid-reiche Membranplattformen induzieren die Aggregation von Rezeptormolekülen, die für die zelluläre Antwort auf den pathogenen Mikroorganismus und für die Rekrutierung von intrazellulären Signalmolekülen verantwortlich ist. Damit verbundene Studien wurden wiederum verstärkt mit den Bakterien *P. aeruginosa* (Grassme et al., 2003) und *N. gonorrhoeae* (Hauck et al., 2000) durchgeführt. Die Tatsache der funktionellen Lokalisation von Integrinen in Rafts, der Nutzung von Rafts durch viele bekannte pathogene Mikroorganismen, der eventuellen Beteiligung von FAK und der Funktion von Rafts als Bindungsstellen für Aktin, sind gute Gründe, die für eine nähere Untersuchung der Interaktion von *S. aureus* und *lipid rafts* bei der Integrin-vermittelten Aufnahme in Säugerzellen in einer zukünftigen Studie sprechen.

6 Material

6.1 Bakterien

6.1.1 Neisseria - Stämme

N302 (MS11-B1)	PilEB1(S), Opa30-, opaC::cat, pTH6a, (TetR), (ErmR), (CamR)
N309 (MS11-B1)	PilEB1(S), Opa30-, opaC::cat, pTH6a::opa52 (pEMK62), (TetR), (ErmR), (CamR)
N340	<i>N. cinerea</i>
N348	<i>N. lactamica</i>
N349	<i>N. sicca</i>
N350	<i>N. mucosa</i>

6.1.2 *Escherichia coli* - Stämme

NovaBlue	endA1, hsdR17(rk12-mk12+), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F'proA+B+ lacIqZΔ M15::Tn10(tetR)], (Novagen)
BL21(DE3)	F-, ompT, hsdSB (rB- mB-), gal, dcm (DE3), (Novagen)

6.1.3 Staphylokokken - Stämme

<i>S. aureus</i> (Cowan)	Klinisches Isolat eines Patienten mit septischer Arthritis
<i>S. carnosus</i> TM300	Nicht pathogene und nichtinvasive Spezies

6.2 Zelllinien

293T	humane embryonale Nierenzelllinie (adhärent)
SYF	embryonale Mausfibroblasten aus trippel - knock - out Mäusen (Src, Yes, Fyn) (adhärent, fibroblastoid) (Klinghoffer 1999)
SYF + c - Src	embryonale Mausfibroblasten aus trippel - knock - out Mäusen (Src, Yes, Fyn) mit c - Src rekonstituiert (adhärent, fibroblastoid) (Klinghoffer 1999)
FAK(-)	embryonale Mausfibroblasten aus FAK - knock - out Mäusen (adhärent, fibroblastoid) (Sieg 1999)
FAK(-) + HA-FAK	embryonale Mausfibroblasten aus FAK - knock - out Mäusen mit HA-FAK rekonstituiert (adhärent, fibroblastoid) (Sieg 1999)

6.3 Nährmedien für Bakterien und Zellkultur

6.3.1 Medien und Platten für Bakterien

TSB-Medium	22,5 g Trypsicase Soy Broth (TSB), ad 750 ml A.bidest.
TSB - Platten	22,5 g Trypsicase Soy Broth, 11 g Agar Agar, ad 750 ml A.bidest.
LB - Medium	10g Bacto-Trypton, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl, pH 7,0, ad 1l mit A.bidest.
LB - Platten	10g Bacto-Trypton, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl, 10ml MgCl ₂ (1M), 12g Agar-Agar, pH 7,0, ad 1l mit A.bidest.
GC - Platten	36g GC-Agar, ad 1l mit A.bidest., 10ml Vitaminmix
Einfriermedium	600µl LB-Medium, 600µl Glycerin (50%)
Vitaminmix	20g Dextrose, 2g L-Glutamin, 3,2g L-Cystein, 0,02g Cocarboxylase, 0,004g Fe(NO ₃) ₃ , 0,0006g Thiamin-HCl, 0,05g NAD, 0,002g Vitamin B12, 0,03g L-Arginin, 0,0026g p-Aminobenzoessäure, 0,22g L-Cystin, 0,2g Adenin, 0,1g Uracil, 0,006g Guanin, pH 3,5, ad 200ml mit A. bidest., sterilfiltrieren. (10ml auf 1l GC-Agar)

Antibiotika:

Ampicillin: 100 μ g/mlChloramphenicol: 30 μ g/ml in LB-Medium, 10 μ g/ml in GC-AgarErythromycin: 7 μ g/mlKanamycin: 30 μ g/mlLysostaphin: 20 μ g/ml**6.3.2 Medien für Zellkultur**

DMEM Synthetisches Zellkulturmedium mit L-Glutamin (PAA Laboratories)

RPMI1640 Synthetisches Zellkulturmedium mit L-Glutamin (PAA Laboratories)

Einfriermedium 70 ml DMEM, 20 ml CS, 10 ml DMSO

FCS Fötales Kälberserum (PAA Laboratories)

CS Kälberserum (PAA Laboratories)

hi CS hitzeinaktiviertes Kälberserum (30 min Inkubation bei 56°C)

Zellkultur- Penicillin: 10mg/ml (PAA Laboratories)

Zusätze

Streptomycin: 10mg/ml (PAA Laboratories)

Gentamicin: 50 μ g/ml (PAA Laboratories)Lysostaphin: 20 μ g/ml

6.4 Antikörper, Enzyme und Proteine

6.4.1 Antikörper

1. Antikörper/Spez.	Typ	Name	Herkunft	Bezug
Csk	mono	clone52	mouse	BD Biosciences
Integrin β_1	mono	cloneP5D2	mouse	Developmental Studies Hybridoma Bank
ICAM1	mono	cloneP2A4	mouse	Developmental Studies Hybridoma Bank
h - lamp 2	mono	cloneH4B4	mouse	Developmental Studies Hybridoma Bank
phospho - Src P-Tyr-418	poly			Biosource International
Src PTKs	poly	Src-2		Santa Cruz Biotechnology
Flag - tag	mono	clone M2	mouse	Sigma-Aldrich
Desmin	mono	clone DE-U-10	mouse	Sigma-Aldrich
GFP	mono	clone JL-8	mouse	BD Biosciences
HA - tag	mono	clone12CA5	mouse	Hybridoma
Cortactin	poly	H191		Santa Cruz Biotechnology
phospho - tyrosine	mono	clone4G10	mouse	Upstate
N. gonorrhoeae	poly.	AK92	rabbit	Prof. Meyer
c-Src (human)	poly.		rabbit	Santa Cruz
c-Src (human)	mono	2-17	mouse	Hybridoma
CD66 (CEA; human)	mono	D14HD11	mouse	Genovac
GFP	mono	JL-8	mouse	BD Bioscience
Opa	mono	4B12	mouse	Prof. Achtman

2. Antikörper/Spez.	Bezug
Peroxidase-conjugated rabbit- α -mouse	Jackson Immunoresearch
Peroxidase-conjugated goat- α -rabbit	Jackson Immunoresearch
Cy2-conjugated goat- α -rabbit	Jackson Immunoresearch
Cy3-conjugated goat- α -rabbit	Jackson Immunoresearch
Cy5-conjugated goat- α -rabbit	Jackson Immunoresearch
Cy2-conjugated goat- α -mouse	Jackson Immunoresearch
Cy3-conjugated goat- α -mouse	Jackson Immunoresearch
Cy5-conjugated goat- α -mouse	Jackson Immunoresearch

AK-unabhängige Markierungsagenzien
Biotin (Sulfo-NHS-LC-biotin)(Perbio Science)
FITC (5-(6)-carboxyfluorescein-succinylester)
Streptavidin-Cy3 (Jackson ImmunoR.)
Streptavidin Alexa Fluor 647conjugate (Molekular Probes)
Rhodamin (5-(6)-carboxytetramethylrhodamine-succinimidyl-ester)

Phalloidin-Konjugate
Phalloidin Alexa-Fluor-546 (Molekular Probes)

6.4.2 Enzyme und Proteine

Taq-DNA-Polymerase (BioLabs), Restriktionsenzyme (BioLabs), Trypsin (PAA Laboratories), Vent-DNA-Polymerase (BioLabs), Cre-Rekombinase (BioLabs), In-Fusion Enzym (BD Bioscience), AmpliTaq-Polymerase Gold (PE Biosystems)

Fibronectin (BD Bioscience), Cytochalasin D (Calbiochem), Jasplakinolide (Calbiochem), Latrunculin B (Calbiochem), Protein A/G-Plus Sepharose (Santa Cruz Biotechnology), Genistein (Calbiochem), AG957 (Calbiochem), GRGDS (Sigma), SDGRG (Sigma), Glutathione-Agarose FF (Amersham Biosciences), Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce). Die GST-Fusionsproteine (GST, GST-FnBPA-B) wurden in *E. coli* BL-21 exprimiert. Zur Expression von Proteinen wurde eine 2 ml-Vorkultur, die zuvor mit einer Kolonie beimpft und bei 37°C inkubiert wurde, nach 6 bis 8 h in 200 ml LB-Medium überführt und für weitere 12-14 h bei 37°C weiterinkubiert. Nach der angegebenen Zeit wurden 2 l LB-Medium mit 25 ml dieser Flüssigkultur angeimpft und wiederum bei 37°C bis zu einer OD600 von 0,5-1,0 angezogen. Die Induktion der Expression mittels IPTG (0,1 mM) wurde nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase für die Bakterien mittels French Press

lysiert; die GST-Fusionsproteine wurden durch Bindung an Glutathionagarose-Säule und nachfolgende Elution mit 20 mM Glutathion aufgereinigt. Die Reinheit der Präparation wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie Blau-Färbung untersucht.

6.5 Plasmide und Oligonukleotide

6.5.1 Plasmide

pDNR-Dual ori_{pUC*}, loxP, MCS, SD, 6xHN-tag, (Cam^R), SacB (BD Bioscience)
 pGEX4T-1 ori_{BR322}, MCS, GST-tag, , lacI, (Amp^R) (Amersham Phamacia)

6.5.2 Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'-3'
FnBP-A sense	GAAGTTATCAGTCGACAAAGATGGTATTGGGAATTATTATGCC
FnBP-A anti	ATGGTCTAGAAAGCTTTAAGAGGACTCAGTGTATCCTCCAAC
Check1-sense	GCTCACCGTCTTTCATTGCC
Check2-anti	TCCGCTCATGAGACAATAACC

Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech bezogen.

6.6 Lösungen und Puffer

6.6.1 Lösungen und Puffer für eukaryotische Zellen

PBS (1x) 24g NaCl, 0,6g KCl, 3,45g Na₂HPO₄7H₂O, 0,6g KH₂PO₄, pH 7,4,
 ad 1l mit A.bidest.
 PBS++ 1xPBS, 0,35mM CaCl₂, 0,25mM MgCl₂
 Poly-L-Lysin 20mg/ml
 Fibronektin 4μg/ml
 Gelatine-Lösung 0,1% Gelatine in 1xPBS lösen
 Paraformaldehyd 4g PFA in 80ml warmem A.bidest. lösen, 1N NaOH zugeben bis
 Lösung geklärt, pH 7,4 mit 1N HCl einstellen, 10ml 10xPBS zuge-
 ben und mit A.bidest auf 100ml auffüllen

Pervanadat	50 μ l Na-o-vanadat (100 mM), 930 μ l Wasser und 20 μ lH ₂ O ₂
Saponinlösung	1% Saponin in 1xPBS lösen
CaCl ₂ -Lösung	2,5M CaCl ₂
2x HBS	16,4g NaCl, 11,9g Hepes, 0,21g Na ₂ HPO ₄ , in 1l A.bidest. lösen, pH 7,05; sterilfiltrieren
RIPA-Puffer	1% Triton X-100, 50mM Hepes, 10% Glycerin, 150mM NaCl, 1mM EGTA, 1,5mM MgCl ₂ , 10mM Natriumpyrophosphat, 100mM Natriumfluorid, 0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS), 1% Deoxycholat, 1mM Natriumorthovanadat, 10 μ g/ml Leupeptin, 10 μ g/ml Aprotinin, 10 μ g/ml Pefabloc, 10 μ g/ml Pepstatin, 10 μ M Benzamidin; ad 250ml mit A.bidest.
Triton-Puffer	25 mM HEPES (pH 7,4), 1 % Triton X-100, 150 mM NaCl, 20 mM MgCl ₂ , 10 % Glycerol, 10 mM Natriumphosphat, 100 mM NaF, 1 mM NaVO ₄ , 10 μ g/ml Leupeptin, 10 μ g/ml Aprotinin, 10 μ g/ml Pefabloc, 10 μ g/ml Pepstatin, ad 250ml mit A.bidest.
Kinase-Puffer	25 mM Hepes (pH 7,5), 150 mM NaCl, 10 mM MnCl ₂ , 1 mM Na ₃ VO ₄ , 5 mM DTT, 0,5 % NP40

6.6.2 Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie

TAE-Puffer (1x)	4,84g Tris-Base, 1mM EDTA, 1,14ml Eisessig, ad 1l mit A.bidest.
TE-Puffer	10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8
GEBS	50mM EDTA, 20% (v/v) Glycerin, 0,5% (w/v) Sarcosyl, 0,05% (w/v) Bromphenolblau
dNTPs	1,25mM dNTPs in TE-Puffer pH 8 lösen
P1-Puffer	50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100 μ g/ml RNase A, pH 8,0, 4°C
P2-Puffer	200mM NaOH, 1% (w/v) SDS, RT
P3-Puffer	3M Kaliumacetat, pH 4,8, RT
Größenstandard	1kb DNA Ladder, Mass Ruler DNA Ladder (Fermentas)

6.6.3 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot

2xSDS-Probenpuffer	125mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% (v/v) β -Mercaptoethanol, 5% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 20% (v/v) Glycerin
SDS-PAGE-Standard	1% (w/v) Lysozym, 1% (w/v) Sojabohne-Trypsin-Inhibitor, 1% (w/v) Peroxidase, 1% (w/v) BSA, 1% (w/v) Lipoxidase, 5ml Triton-Puffer, 5ml 2x Probenpuffer
Acrylamidlösung	40% Polyacrylamid
Sammelgel-Puffer	0,5M Tris-HCl pH 6,8
Trenngel-Puffer	1,5M Tris-HCl pH 8,8
APS	10% Ammoniumperoxodisulphat
TEMED	0,1% N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
SDS	20% (w/v) SDS
Laufpuffer	25mM Tris-HCl, 192mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
Färbelösung	25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Eisessig), 0,03% (w/v) Coomassie Brillant Blue R250
Entfärbelösung	10% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Eisessig
Kathoden-Puffer (5x)	125mM Tris-Base, 200mM 6-Aminohexansäure, pH 9,4
Anoden-Puffer (5x)	125mM Tris-Base, pH 10,4
Transferpuffer	6,0g Tris-Base, 28,8g Glycin, 430ml Methanol, 0,1% (w/v) SDS, ad 2l mit A.bidest.
TBS	25mM Tris (pH 7,5), 125mM NaCl
TBS/Tween	25mM Tris (pH 7,5), 125mM NaCl, 0,1% Tween-20
Blocklösung	2% (w/v) BSA in TBST, 0,05% (w/v) NaN_3
ECL	0,225mM p-Coumaratsäure, 1,25mM Luminol, 0,1M Tris-Base pH 8,5
H_2O_2 -Lösung	30% (v/v) Wasserstoffperoxid
stripping-Puffer	0,8% (w/v) SDS, 0,8% (v/v) β -Mercaptoethanol, 80mM Tris-HCl pH 6,8

6.7 Chemikalien und Kits

Acrylamid (Roth), Agar-Agar (Roth), Agarose (Roth), Ammoniumsulfat (AppliChem), Antibiotika (Roth, AppliChem), APS (Roth), BSA (Roth), Ethanol (AppliChem), GC-Agar (Difco), Glycerin (Roth), Glycin (AppliChem), Harnstoff (Riedel-De-Ha' en), Hefeextrakt (Roth), Imidazol (Upstate), Methanol (AppliChem), mounting Medium (Sigma), Natriumchlorid (AppliChem), Nucleotide (BioLabs), Paraformaldehyd (AppliChem), PP2 (Calbiochem), Saccharose (Roth), Saponin (Roth), TEMED (Roth), Tris-Base (AppliChem), Triton-X-100 (Roth), Trypton (Roth), Tween-20 (Roth), β -Mercaptoethanol (Roth), Cytochalasin D (Calbiochem),

Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen), In-FusionPCR Cloning Kit (BD Bioscience), BD Creator DNA Cloning Kit (BD Bioscience)

6.8 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Autoklav (Varioklav), Brutschränke (Heraeus, Memmert), Deckgläschen/Objektträger (Knittel), Elektrobplot-Apparatur (Bio Rad, Schleicher & Schuell), Entwickler (Agfa), FACS-Calibur (Becton Dickinson), Fluoreszenzmikroskop (Nikon), FPLC (Bio Rad), Gelapparat für Polyacrylamidgelelektrophorese (Bio Rad), Geldokumentation (Bio Rad), Gelkammern für Agarosegele (Bio Rad), Glaswaren (Schott, VWR Brand), Heizblöcke (Roth, Grant Boekel), Konfokales Mikroskop (Zeiss), Kühl- und Gefrierschränke (Privileg), Magnetrührer (Ika), Master Cycler Gradient (Eppendorf), Mikrowelle (Electronia), pH-Meter (Beckman), Photometer (Hach), Pipetten (Gilson), Plastikwaren (Eppendorf, Greiner, Costar), PVDF-Membranen (Millipore), Röntgenfilme (Retina), Schüttler (Bühler), Sequenzierer (Abi-Prism), Spannungsgeräte (Bio Rad), Sterilbank (Heraeus), Thermomixer (Eppendorf), Vivaspin concentrator 50K (Vivascience), Vortexer (Ika), Waagen (Kern, Scaltec), Wasserbäder (Mempert, Julabo), Zählkammer (Neubauer), Zentrifugen (Heraeus, Sorvall)

7 Methoden

7.1 Kultur von Bakterien

Sowohl die kommensalen Neisseria-Stämme als auch die pathogenen Varianten von *Neisseria gonorrhoeae* MS11, wurden auf GC-Agarplatten, welche mit Vitaminmix und mit bzw. ohne den entsprechenden Antibiotika (Cam, Erm) supplementiert worden waren, bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Kompetente Stämme oder spezielle Expressionsstämme von *Escherichia coli* wurden auf LB-Agarplatten, versetzt mit entsprechenden Antibiotika bei 37°C kultiviert.

Zur Expression von Proteinen wurde eine 2 ml-Vorkultur, die zuvor mit einer Kolonie beimpft und bei 37°C inkubiert wurde, nach 6 bis 8 h in 200 ml LB-Medium überführt und für weitere 12-14 h weiter inkubiert. Im Anschluss wurde die Kultur in 2 l LB-Medium gegeben, welches bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 bei 37°C inkubiert wurde. Die Induktion der Expression mittels IPTG (0,1 mM) erfolgte für 4h bei 30 °C nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase.

Staphylokokken-Stämme wurden auf TSB-Agarplatten bei 37°C kultiviert. Zur Verwendung in einem Gentamicin/Lysostaphin Protektionsassay wurde eine Vorkultur aus 2 ml TSB-Medium mit einer Kolonie *S. aureus* (Cowan) oder *S. carnosus* beimpft und für 12-14 h bei 37°C inkubiert. Die Hauptkultur aus 10 ml TSB-Medium wurden am nächsten Tag mit einer OD₆₀₀ 0,1-0,3 beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 bei 37 °C kultiviert.

7.2 Kultur von Zelllinien

7.2.1 Zelllinien

Humane Nierenepithelzellen (293T Zellen) wurden in DMEM/10%CS bei 37°C und 5% CO₂ in Zellkulturschalen kultiviert. Kulturen, die 60-80 % konfluent waren wurden durch eine kurze Inkubation mit 1,5 ml Trypsinlösung in Suspension gebracht. Im Anschluss 3,5 ml DMEM/10%CS zugegeben. Diese Zellsuspension wurde bei 600 rpm für 3 min zentrifugiert und das Zellpellet in frischem Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden in einer 1:5 oder 1:10 Verdünnung ausgesät und weiterkultiviert.

Fibroblasten aus der Maus (SYF, SYF + c-Src, FAK(+), FAK(-)) wurden in DMEM / 10%FCS / nAA (non essential Aminoacids) / Pen (Penicillin)/Strep (Streptomycin) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Bei der Vorbereitung eines Antibiotika-Protektionsassays (siehe 7.4.1), wurden entweder 293 T Zellen (2×10^5 Zellen/well) oder Fibroblasten (2 –

4×10^4 Zellen/well) in einer 24-well Platte ausgesät. Diese Platte war zuvor mit Poly-L-Lysin ($10 \mu\text{g/ml}$) in PBS beschichtet und ÜN bei 4°C inkubiert worden. Bei Zellpräparaten, die am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert werden sollten, wurden 1×10^4 Zellen/well (Fibroblasten) bzw. 1×10^5 Zellen/well (293T Zellen) auf Glas-Deckgläschen kultiviert. Die Glas-Deckgläschen wurden, ähnlich wie die 24-well-Platten, mit einer Lösung aus Fibronectin ($4 \mu\text{g/ml}$) und Poly-Lysin ($10 \mu\text{g/ml}$) in PBS beschichtet und ÜN bei 4°C inkubiert.

7.2.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Beim Auftauen der Zellen ist es von großer Wichtigkeit, die Kryoröhrchen möglichst schnell im 37°C Wasserbad aufzutauen. Danach wurde die 1 ml Zellsuspension zu 9 ml frischem Medium gegeben und die Suspension bei 600 rpm für 3 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml frischem Medium aufgenommen und in eine Zellkulturschale gegeben. Nach ein bis zwei Tagen wurden die frisch ausgesäten Zellen zum ersten Mal subkultiviert.

Beim Einfrieren wurden semikonfluente oder konfluente Zellkulturen gewählt, die nach Trypsinierung und Zentrifugation in 1 ml Einfriermedium (DMEM / 20%CS / 10%DM-SO) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt wurden. Die Röhrchen wurden über Nacht in einer geschlossenen Styroporbox bei -80°C gekühlt und anschließend zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

7.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Bei verschiedensten Versuchsanordnungen ist die Ermittlung der genauen Zellzahl Voraussetzung. Die genaue Zellzahl einer Suspension wurde durch Auszählen in einer Neubaukammer ermittelt, indem man 10-20 μl der Zellsuspension auf die Kammer gibt und mit Hilfe des Mikroskops auszählt. Die Zellzahl pro ml ließ sich nach folgender Formel berechnen.

Anzahl der Zellen pro Großquadrat (oder 16 Kleinquadrate) $\times 10^4$ (Volumen des Großquadrates = 10^{-4} ml) = Zellzahl / ml

7.2.4 Transfektion von eukaryotischen Zellen mittels der Calcium-Phosphat-Kopräzipitationsmethode

Zur Bereitung des Transfektionsansatzes wurden max. 10 μg DNA in 500 μl sterilem A. bidest gelöst. Um einen optimalen PH-Wert zu erreichen wurden zu dem DNA-Wasser-

Gemisch 500 μ l 2xHBS-Puffer zugegeben. Unter Schütteln wurde tropfenweise 50 μ l 2,5 M CaCl₂ zugegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur 10-15 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 μ l Chloroquin (25mM) inkubiert. Anschließend wurde die Ca²⁺-DNA-Suspension tropfenweise auf dem subkonfluenten (ca. 30 %) Zellrasen aufgebracht und für 6-8 h im Brutschrank bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Das Kulturmedium wurde nach diesem Zeitraum durch Neues ersetzt. Die Zellen wurden für weitere 12-18 h im Brutschrank inkubiert innerhalb der Sie die Plasmid-DNA exprimieren. Die Transfektionseffizienz konnte bei GFP- oder RFP-gekoppelten Proteinen unter einem Fluoreszenzmikroskop abgeschätzt werden.

Die Zellen wurden zur quantitativen Analyse der Proteinexpression lysiert (siehe 7.6.3) und durch Western Blot Analysen (siehe 7.6.2) weiter untersucht.

7.3 Arbeiten mit DNA: Klonierung und Expression von rekombinanten DNA-Konstrukten

7.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

DNA-Fragmente wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion durch Verwendung geeigneter Oligonukleotide (Primer) sowie der Taq-DNA-Polymerase amplifiziert. Zur Überprüfung von Klonierungsprodukten wurde das folgende Protokoll eingesetzt:

0,4 μ l	Forward Primer (20pmol)
0,4 μ l	Reverse Primer (20pmol)
0,2 μ l	dNTPs (20mM)
1,6 μ l	MgCl ₂ (25mM)
2 μ l	10xPCR-Puffer +(NH ₄) ₂ SO ₄
0,2 μ l	Taq-Polymerase
0,2 μ l	Template (1-2ng)
15,3 μ l	A. bidest.
<hr/>	
20 μ l	Ansatz

Für die Amplifizierung im *Thermocycler* wurde folgender Reaktionszyklus verwendet:

hot start:	94°C	5min	
Denaturierung:	94°C	30sec] 20 Zyklen
Hybridisierung:	55°C	30sec	
Polymerisation:	72°C	2min	
finale Elongation:	72°C	5min	

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden durch analytische DNA-Gelelektrophorese überprüft.

7.3.2 Analytische und präparative Gelelektrophorese

PCR- und Klonierungsprodukte wurden mittels analytischen Untersuchungen durch 0,7 % bzw. 1,4 % Agarosegele untersucht.

Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1xTAE-Puffer suspendiert und durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen wurde die gelöste Agarose in eine Gelkammer mit dazugehörigem Kamm gegossen. Die Gelkammern enthielten als Laufpuffer 1xTAE-Puffer. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 6xPuffer versetzt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung von 1-3h wurden die DNA-Banden durch Färben des Gels für 10 min in einer Ethidiumbromidlösung (3 µg/ml) und einer Bestrahlung mit einer UV-Lampe ($\lambda = 366\text{nm}$) sichtbar gemacht.

Zur Fragmentisolierung wurden bei der präparativen Gelelektrophorese 1,4 % ige Agarosegele mit großen Taschen verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in diesem Fall bei 20-30 V für 12-16 h. Die DNA wurde durch Färbung mit Ethidiumbromid und Bestrahlung mit einer UV-Lampe sichtbar gemacht. Jetzt wurden die gewünschten Banden als Agaroseblöckchen aus dem Gel ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte mittels des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen).

7.3.3 In-Fusion PCR Klonierungsmethode

Für die In-Fusion Reaktion wurde der In-Fusion PCR Cloning Kit verwendet. Zuerst wurden spezielle Oligonukleotide konstruiert, die komplementär zur entsprechenden cDNA sind und zusätzlich eine 15b Sequenz an den 5'-Enden enthalten. Die In-Fusion PCR wurde mittels eines programmierten Temperaturgradienten (Hybridisierungstemperatur: 55°C/60°C in 1°C Schritten) in einem Thermocycler durchgeführt. Als Enzyme wurden bei

der Reaktion sowohl die Taq- als auch die Vent-Polymerase, die sich durch ihre „proof-reading“-Funktion auszeichnet, eingesetzt. Die Reaktionsmischung für eine In-Fusion PCR setzte sich wie folgt zusammen:

1 μ l	Forward Primer (20pmol)
1 μ l	Reverse Primer (20pmol)
1 μ l	dNTPs (20mM)
4 μ l	MgCl ₂ (25mM)
5 μ l	10xPCR-Puffer + (NH ₄) ₂ SO ₄
0,5 μ l	Taq-Polymerase
0,5 μ l	Vent-Polymerase
1 μ l	Template (10-100ng)
36 μ l	A. bidest.
<hr/>	
50 μ l	Ansatz

Für die Amplifizierung im Thermocycler wurde folgender Reaktionszyklus verwendet:

hot start:	94°C	5min	} 30 Zyklen
Denaturierung:	94°C	30sec	
Hybridisierung:	55-60°C	30sec	
Polymerisation:	72°C	50sec	
finale Elongation:	72°C	5min	

Die gewonnenen PCR-Produkte wurden danach durch analytische DNA-Gelelektrophorese überprüft und mittels einer präparativen Gelelektrophorese aufgereinigt.

Die PCR-Produkte wurden daraufhin in einer enzymabhängigen Reaktion mit dem linearisierten Vektor pDNR-Dual fusioniert. Dazu musste die Menge des PCR-Produktes bestimmt werden. Für die In-Fusion Reaktion wurden 50-100ng des PCR-Produktes eingesetzt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 μ l	10xBD In-Fusion Reaktionspuffer
1 μ l	10xBSA (500 μ g/ml)
0,5 μ l	linearisierter pDNR-Dual Vektor (100ng/ μ l)
50-100ng	PCR-Produkt
1 μ l	1:10 verd. BD In-Fusion Enzym (20U/ μ l)
x μ l	A. bidest.
<hr/>	
10 μ l	Ansatz

Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Fusionsprodukte in kompetente *E. coli* transformiert (siehe 7.3.9) und die richtigen Transformanten mittels Selektion auf LB/X-Gal/Amp-Platten ermittelt. Die unter Selektionsbedingungen herangewachsenen Kolonien wurden weiter gestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die gewachsenen Kolonien überprüft, indem man ihre Plasmide durch Plasmid-Minipräparation (siehe 7.3.5) isolierte und durch analytische Gelelektrophorese und PCR überprüfte.

7.3.4 Cre-lox site spezifische Rekombination

Für die Cre-lox-Rekombination wurde der BD Creator DNA Cloning Kit verwendet. Als Donorvektor für die Cre-lox-Rekombination wurde der Vektor pDNR-Dual mit dem entsprechenden PCR-Fragment eingesetzt. Als Akzeptorvektor diente der prokaryotische Expressionsvektor pGEX4Ti-LoxP. Die Rekombination zwischen Akzeptor- und Donorvektor wird durch das Enzym Cre-Rekombinase vermittelt. Sie erkennt die spezifischen Rekombinationssequenzen (loxP) auf beiden Vektoren. Das ideale Verhältnis Donor- zu Akzeptorvektor das im folgenden Reaktionsansatz eingesetzt wurde, war 1:2.

1 μ l	10xCre-Reaktions-Puffer
1 μ l	10xBSA
0,5 μ l	Cre-Rekombinase
100ng	Donorvektor
200ng	Akzeptorvektor
x μ l	A. bidest.
<hr/>	
10 μ l	Ansatz

Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur. Um die Reaktion zu stoppen wurde das Enzym 5 min bei 70°C hitzeinaktiviert. Anschließend wurden 5 μ l des Rekombinationsansatzes in kompetente *E. coli* transformiert und auf spezielle LB-Platten mit Chloramphenicol und 7 % Saccharose ausplattiert. Die selektierten Kolonien wurden weitergestrichen, um Sie am nächsten Tag durch Isolierung der Plasmide aus den Klonen analysieren zu können. Die Plasmide wurden zum einen durch analytische Gelelektrophorese und zum anderen durch PCR überprüft. Bei der Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden ergaben sich bei dieser Kontroll-PCR nur bei den gewünschten Rekombinationen die definierten PCR-Produkte. Um ganz sicher zu gehen, wurden die Klone, die sich bis jetzt als richtig erwiesen haben, durch Restriktionsverdau (siehe 7.3.7) und Sequenzierung (siehe 7.3.7) verifiziert.

7.3.5 Plasmidisolierung durch Minipräparation

Zur Plasmidisolierung wurden zwei verschiedene Protokolle eingesetzt. Zum einen das Protokoll nach Birnboin-Dooley und zum anderen das Protokoll des Qiaprep Spin Mini-prep Kits, das zur Gewinnung von Plasmiden mit einem hohen Reinheitsgrad verwendet wurde. Bei der Plasmidisolierung nach Birnboin-Dooley wurde eine Impföse Bakterien in $300\mu\text{l}$ kaltem P1-Puffer resuspendiert. Dies hatte die Lyse der Bakterien und die Abdaunung der RNA durch die RNase zur Folge. Zur Fällung der bakteriellen Proteine wurden der Suspension $300\mu\text{l}$ SDS-haltiger P2-Puffer beigefügt. Nach 5 min Inkubation wurde die chromosomale DNA durch Zugabe von $300\mu\text{l}$ P3-Puffer ausgefällt. Durch Zentrifugation (bei 13000 rpm, 4°C 30 min) wurde die ausgefallene chromosomale DNA pelletiert. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde durch Zugabe von 0,7 Vol Isopropanol ausgefällt. Nach erneuter Zentrifugation (bei 13000 rpm, 4°C 30 min) wurde das gewonnene Plasmid-Pellet mit 70 % EtOH gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Letztendlich wurde die Plasmid-DNA in $30\text{-}50\mu\text{l}$ TE-Puffer aufgenommen.

7.3.6 Restriktionsverdau von Klonierungsprodukten

Die in vorhergehenden Arbeiten hergestellten Expressionsvektoren wurden durch enzymabhängige Verdauung mit einem geeigneten Restriktionsenzym analysiert. Die Reaktion erfolgte für 3 h bei 37°C und hatte die folgende Zusammensetzung:

$3\mu\text{l}$	Plasmid-DNA (Mini-Präparation)
$1\mu\text{l}$	10xRestriktions-Puffer
$0,5\mu\text{l}$	Restriktionsenzym
$6,5\mu\text{l}$	A. bidest.
<hr/>	
$10\mu\text{l}$	Ansatz

Der Restriktionsverdau wurde anschließend mittels DNA-Gelelektrophorese auf das gewünschte Bandenmuster überprüft.

7.3.7 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden nach der „Zyklus-Sequenzierungs“-Methode mit Hilfe der Ampli Taq-Polymerase durchgeführt. Durch PCR und in Anwesenheit spezifischer Primer und BigDye-Terminatoren wurden die zu sequenzierenden Proben amplifiziert. Standardgemäß beinhaltet ein Sequenzierungs-reaktionsansatz folgende Reagenzien:

4 μ l	Premix (Polymerase, BigDye Terminatoren, dNTPs)
0,1-0,5 μ g	Plasmid-DNA
50pmol	Forward und Reverse Primer
x μ l	A. bidest.
10 μ l	Ansatz

Für die Amplifizierung im Thermocycler wurde folgender Reaktionszyklus verwendet:

hot start:	96°C	2min	}	25 Zyklen
Denaturierung:	96°C	30sec		
Hybridisierung:	45-60°C	15sec		
Polymerisation:	60°C	4min		
finale Elongation:	60°C	10min		

Die PCR-Produkte wurde mittels Ethanol-Fällung aufgereinigt. Der Reaktionsansatz wurde hierfür mit 90 μ l A. bidest., 10 μ l 3M Natriumacetat (pH 4,6) und 250 μ l 100% EtOH bei Raumtemperatur versetzt. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 250 μ l 70 % EtOH gelöst und erneut bei 15000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet, für 2 min bei 95°C denaturiert und am Ende in 25 μ l TSR-Puffer aufgenommen. Die Analyse der Sequenz erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung (AbiPrism 310 Standard) automatisch.

7.3.8 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Herstellung kompetenter E. coli (Stamm BL21 DE3) wurde eine 10 ml Übernachtskultur ohne Antibiotikazusätze angeimpft. Am nächsten Tag wurden von dieser Kultur je 4 ml auf 200 ml LB-Medium überimpft und im Schüttler bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 wachsen lassen. Die Bakteriensuspension wurde in mehreren Schritten in einer eiskalten 0,1 M CaCl₂-Lösung auf ein Lösungsvolumen von 1,25 ml eingeeengt. Diese konzentrierte Suspension inkubierte nun für 1 h auf Eis im Kühlraum. Anschließend wurden

die Bakterien in 520 μl Glycerin (87 %) aufgenommen und in 100 μl -Aliquots bei -80°C aufbewahrt.

7.3.9 Transformation von Bakterien mittels Temperaturschock

Zu Beginn wurden 100 μl Aliquots kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut, in Schnappdeckelröhrchen überführt und mit 0,5 μl DNA oder 5 μl des In-Fusion-Ansatzes versetzt. Dieser Reaktionsansatz inkubierte für 30 min auf Eis und wurde anschließend für 90 sec in ein Wasserbad mit 42°C gehalten. Danach stellte man die Röhrchen wieder zurück auf Eis, gab 1 ml LB-Medium dazu und ließ das Ganze für 1 h bei 37°C schütteln. Die Bakterien wurden anschließend sanft abzentrifugiert und auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert.

7.4 Infektionsexperimente

7.4.1 Antibiotika-Protektions-Assay

Für diesen Versuch wurden sowohl humane 293T Zellen (2×10^5 Zellen/well) als auch Mausfibroblasten ($2-4 \times 10^4$ Zellen/well) in Poly-L-Lysin-behandelte 24-well Platten über Nacht im Brutschrank (37°C und 5% CO_2) inkubiert. Vor einigen Infektionsexperimenten wurden die Zellen zum Teil mit Inhibitoren, Antikörpern oder Peptiden vorbehandelt. Die Zellen wurden dafür 15 min vor Infektion mit den Zusätzen inkubiert. Die Bakterien wurden 1x mit 1xPBS gewaschen und mit 20 Bakterien/Zelle (MOI 20, „multiplicity of infection“) für die Infektion eingesetzt. Die Infektionsdauer variierte, je nach Versuchsaufbau. Nach der gewünschten Infektionszeit wurde das Medium vorsichtig entfernt und durch frisches Medium mit Antibiotikazusätzen (z.B. DMEM/10%FCS/n.e.AA mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamicin und 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Lysostaphin) für 45 min ersetzt. Nach der Abtötung aller extrazellulären Bakterien wurden nach dem Absaugen des Mediums die Zellen mit 1 ml 1 % Saponin in PBS für 15 min bei 37°C lysiert. Danach wurden die Proben (10-1, 10-2, 10-3) verdünnt und wurden in zwei Spuren/Platte jeweils 20 μl Lysat verteilt. Die Platten wurden bei 37°C für 12-16 h inkubiert.

7.4.2 Infektion von Zellen für die Analyse durch konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Zur Analyse von Infektionsexperimenten mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie wurden 293T Zellen bzw. Fibroblasten auf beschichteten Deckgläschen in 24-well Platten

ausgesät (siehe 7.2.1). Bakterien wurden teilweise mit Biotin und einem Farbstoff (FITC oder Rhodamin) vor der Infektion markiert (siehe 7.5.3). Die Zellen wurden mit 20-40 Bakterien/Zelle für meist 1 h infiziert, anschließend 1-mal vorsichtig mit 1xPBS++ gewaschen und für 20 min mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach der Fixierung wurden die Präparate unbehandelt belassen oder weiter mit verschiedenen Antikörpern gegen Zellproteine oder Bakterien markiert.

7.4.3 Replating-Assay

Als Vorbereitung wurden pro Ansatz 3 Stück 60 mm-Bakterienschalen mit 1xPBS/ 20 μ g/ml Poly-L-Lysin oder 1xPBS/ 4 μ g/ml Fn ÜN bei 4°C beschichtet. Die Zellen wurden ÜN in einem serumreduzierten Medium (DMEM/0,5% FCS) im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 1-mal mit 1xPBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Die Trypsinreaktion wurde durch DMEM / 0,5 mg/ml soybean trypsin inhibitor / 0,1 % BSA inaktiviert. Nach dem Zentrifugieren wurden die Zellen in Suspensionsmedium (DMEM/ 0,1 % BSA) aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen (1 x 10⁶ Zellen/60mm Schale) verblieben für 45 min bei 37°C unter 5-minütigem Wenden in einem Falconröhrchen in Suspension. Anschließend wurden die Zellen in Poly-L-Lysin oder Fibronektin-beschichtete Bakterienschalen für 15-60 min ausgesät und uninfiziert belassen oder mit MOI 50 mit Bakterien infiziert. Um die Signalereignisse konformieren zu können, wurden die Bakterien behutsam mit 600 rpm auf die Zellen zentrifugiert und für die gewünschte Zeit inkubiert. Bei einigen Versuchsansätzen wurden zur Verstärkung der Phosphorylierungssignale 10 min vor der Lyse die Zellen mit 200 μ l Pervanadat behandelt. Pervanadat wurde jeweils frisch aus 50 μ l Na-o-vanadat (100 mM) in 930 μ l Wasser und 20 μ l H₂O₂ angesetzt. Anschließend wurden die Zellen lysiert (siehe 7.6.3).

7.5 Immunfluoreszenzfärbungen und Elektronenmikroskopie

7.5.1 Kovalente Farb-Markierung von Bakterien und Doppelimmunfluoreszenzfärbung von eukaryotischen Proteinen nach dem 1-Zyklus Protokoll

Bakterien wurden vor der Infektion mit einem Farbstoff wie FITC oder Rhodamin markiert. Hierzu wurden ein großes Pellet an Bakterien in 1 ml 1xPBS suspendiert und mit FITC (0,4 μ g/ml 5-(6)-carboxyfluorescein-succinimidyl-ester) oder Rhodamin (0,2 μ g/ml 5-(6)-carboxytetramethylrhodamine-succinimidyl-ester) versetzt. Diese Suspension wurde

20 min bei Raumtemperatur unter schütteln inkubiert und anschließend dreimal gründlich mit 1xPBS gewaschen. Die Bakteriensuspension wurde am Photometer gemessen, um die entsprechende Bakterienmenge, die für die Infektion benötigt wurde zu ermitteln.

Nach der Infektion wurden die infizierten Zellen einmal vorsichtig mit 1xPBS++ gewaschen, um nicht-adhärenente Bakterien zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen für 20 min mit 4 % Paraformaldehyd bei Raumtemperatur im Dunkeln fixiert und abermals mit 1xPBS++ gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, ohne die Zellen zu permeabilisieren, wurden die fixierten Zellen für 5 min in Blockierungslösung (1xPBS++/10%FCS) ohne Saponin inkubiert, für gleichzeitige Blockierung und Permeabilisierung wurden die Zellen für 5 min in Blockierungslösung mit Saponin (1xPBS++/10%FCS/0,2% Saponin) inkubiert.

20 μ l der primären Antikörper (verdünnt in Blockierungspuffer) wurden auf die Deckgläschen getropft, und die Ansätze wurden für 30-45 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Nach Inkubation mit den primären Antikörpern wurde dreimal mit PBS++ gewaschen. Wiederum wurden die Präparate für 5 min mit der Blockierungslösung inkubiert und nach dem Absaugen 20 μ l der Lösung der sekundären, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper (verdünnt in Blockierungspuffer) auf die Deckgläschen gegeben und für 30-45 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen dreimal mit PBS++ gewaschen und mit mounting medium (Sigma) eingebettet, mit Nagellack luftdicht versiegelt und bis zur Auswertung am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop bei 4°C gelagert.

7.5.2 Differentielle Immunfluoreszenzfärbung von intra- und extrazellulären Bakterien und Markierung eines eukaryotischen Proteins nach dem Doppelzyklus Protokoll

Nach der zuvor beschriebenen Fixierung der Präparate wurden die Ansätze mit nicht-permeabilisierender Blockierungslösung inkubiert. Extrazelluläre Bakterien wurden spezifisch durch den ersten Antikörper (z.B. polyklonalen rabbit-anti-Neisseria gonorrhoeae Antikörper) für 45 min bei RT angefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS++ wurden die Zellen abermals für 5 min mit Blockierlösung (1xPBS++/10%FCS) behandelt. Im nächsten Schritt wurden die Proben mit dem fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper (z.B. goat-anti-rabbit-Cy5) inkubiert.

Zur Färbung intrazellulärer Bakterien sowie eukaryotischer Proteine wurden die gewaschenen Zellen diesmal mit einer Blockierungs- und Permeabilisierungslösung (PBS++/

10%FCS/ 0,2%Saponin) inkubiert. Daraufhin wurden die Präparate sowohl mit dem Erstantikörper gegen die Bakterien (z.B. polyklonal rabbit-anti-Neisseria gonorrhoeae) als auch mit dem Erstantikörper gegen ein intrazelluläres eukaryotisches Protein (z.B. monoklonal mouse-anti-CEACAM) für 45 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen, Blockieren und Permeabilisieren der Proben, wurden die Präparate mit den sekundären Antikörpern (z.B. goat-anti-rabbit-Cy2 und goat-anti-mouse-Cy3) bzw. Phalloidin-TRIC (färbt spezifisch zelluläres F-Aktin an) für 45 min bei RT im Dunkeln in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Proben gewaschen, eingebettet und luftdicht mit Nagellack versiegelt.

7.5.3 FBA-Markierung von Bakterien zur differentiellen Färbung von intra- und extrazellulären Bakterien sowie Markierung eines eukaryotischen Proteins

Das gewaschene Bakterienpellet wurde in 0,5 ml PBS mit 0,4 $\mu\text{g/ml}$ FITC (5-(6)-carboxy-fluorescein-succinylester) suspendiert und bei RT für 20 min geschüttelt. Anschließend wurde 0,5 ml einer Biotinlösung (0,4-0,6 mg/ml) zugegeben und erneut 15 min bei RT geschüttelt. Nach dreimaligem intensivem Waschen wurde die Bakteriendichte durch photometrische Bestimmung ermittelt, um die entsprechende Bakterienmenge für die Infektion einsetzen zu können. Nach der Infektion wurden die Proben gewaschen, fixiert, blockiert (ohne Saponin) und zur Detektion von extrazellulären Bakterien die Präparate für 45 min mit Streptavidin-Alexa Fluor 647 (1:200) inkubiert. Durch diese Methode waren alle Bakterien FITC-markiert (grün), wobei intrazelluläre Bakterien ausschließlich FITC-markiert und extrazelluläre Bakterien FITC- und Alexa Fluor 647-markiert (blau) waren.

Im Anschluss bestand weiterhin die Möglichkeit intrazelluläre eukaryotische Proteine durch Blockierung, Permeabilisierung und Färbung mit Erst- und Zweitantikörpern oder Phalloidin-TRIC sichtbar zu machen.

7.5.4 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Durch ein konfokales Mikroskop, konnten die erhaltenen Immunofluoreszenzfärbungen mit der entsprechenden Software (Zeiss LSM) ausgewertet werden. Mit Hilfe eines Transmissionsfilters konnten die Intensitäten der drei vom Laser emittierten Wellenlängen separat justiert werden, um die verschiedenen Farbstoffe in der Probe gleichmäßig zu illuminieren. Geeignete Filterkombinationen wurden gewählt, um simultan FITC-/Cy2-markierte (Anregung bei 488nm und Detektion zwischen 515 und 545nm), Rhodamin-/Cy3-/Alexa

Fluor 546-markierte (Anregung bei 568/554/556nm und Detektion zwischen 573 und 615nm) und Cy5-markierte Strukturen (Anregung bei 647nm und Detektion bei Wellenlängen λ 680nm) zu visualisieren. Unter Verwendung von verschiedenen Objektiven (40x/oil, 63x/oil) wurden optische Einzelbilder erzielt. Bei Lebendaufnahmen wurden die Rhodamin- und GFP-Signale in 10 sec-Intervallen aufgenommen. Die ermittelten Rohdaten wurden mittels der Bildbearbeitungsprogramme LSM Image Browser (Zeiss) und Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems, Mountain View, Canada) bearbeitet, dabei wurden den, von den unterschiedlichen Kanälen des Detektors empfangenen Lichtsignalen verschiedenen Falschfarben (FITC/Cy2 Grün; Rhodamin/Cy3/Alexa Fluor 546 Rot; Cy5 Blau) zugeordnet. Bei der Überlagerung von Einzelbildern wurde die Kollokalisierung von zwei markierten Strukturen durch Entstehung einer Mischfarbe besonders deutlich.

7.5.5 Fixierung von Präparaten für Raster-Elektronenmikroskopie

Mausfibroblasten wurden auf säurebehandelten Glasplättchen, die mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fibronectin in 1xPBS beschichtet waren in 24-well Platten ausgesät (2x10⁴ Zellen/well). Am nächsten Tag wurden die Zellen für 1 h mit MOI 10 infiziert. Anschließend wurden die Proben in situ mit 2 % Glutaraldehyd/ 3 % Formaldehyd in 0,1 M Cacodylat, 0,09 M Sucrose, 0,01 M CaCl₂, 0,01 M MgCl₂, pH 6,9 für mindestens 1 h bei 4 °C fixiert. Die Präparate wurden daraufhin mit 20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,0 gewaschen und in einer Aceton-Verdünnungsreihe graduell entwässert. Nach der kritischen Punkttrocknung durch flüssiges CO₂, wurden die Proben mit 10 nm Gold bedampft. Die Präparate wurden anschließend mit 5 kV in einem Zeiss DSM982 Gemini Field Emission Scanning Elektronenmikroskop untersucht. Die Bilder wurden digital aufgenommen und mittels Adobe Photoshop 6 pseudocoloriert.

7.6 Arbeiten mit Proteinen

7.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Coomassie-Färbung von Proteingelen

Für Proteingele wurden das vertikale Gelsystem und die Gelkammern von BioRad verwendet. Die Trenngele hatten eine Polyamidkonzentration (PA) zwischen 8 und 15 %, die sich nach der Größe der zu untersuchenden Proteine richtete. Das Trenngel wurde nach der Zugabe von APS und TEMED zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit A. bi-dest. überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Wasser entfernt, das Sammel-

gel über das Trenngel gegossen und vor dessen Aushärtung mit einem Kamm versehen. Das vollständig polymerisierte Gel wurde nach Entfernen des Kamms in eine Gelkammer gespannt und mit Elektrophorese-Puffer überschichtet. Die Proteinproben wurden in 2xSDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5min bei 90°C aufgeköcht, bevor sie in die mit Elektrophorese-Puffer gespülten Taschen mit einer Hamilton-Pipette eingefüllt wurden. Die Proteinauftrennung erfolgte bei 100V für 1-2h.

Trenngel						Sammelgel	
	8%	9%	10%	12,5%	15%		5%
PA (40%)	2ml	2,25ml	2,5ml	3,1ml	3,75ml	PA (40%)	1,25ml
A. bidest.	5,5ml	5,25ml	5ml	4,3ml	3,65ml	A. bidest.	6,15ml
0,5M Tris pH 8,8	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml	0,5M Tris pH 6,8	5ml
ENTGASEN							
SDS 20%	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	SDS 20%	50 μ l
APS 10%	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l	APS 10%	30 μ l
TEMED	15 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l	TEMED	15 μ l

Zur Coomassie-Färbung wurde das Gel für 5-15 min in einer Coomassie-Färbelösung fixiert und gefärbt. Zur Entfärbung wurden die Gele in einem Methanol-Eisessig-Entfärber geschüttelt, bis alle Banden detektierbar waren.

7.6.2 Western-Blot: Nass-Transfer und Semidry-Verfahren

Beim Nasstransfer wurde das Gel zusammen mit einer PVDF-Membran (mit Methanol und Wasser vorbehandelt) in eine Elektrophoresekammer, die ganz mit Transferpuffer aufgefüllt war eingespannt und für 12-14 h bei 30 V dem Transfer unterzogen. Beim Semidry-Verfahren wurden das Gel und die PVDF-Membran nur zum Teil mit Elektrodenpuffer (Anoden- und Kathodenpuffer) befeuchtet und in einer Apparatur bei 70-90 mA für 2 h der Elektrophorese unterzogen. Die Membran wurde anschließend, um den Größenstandard sichtbar zu machen, in einer verdünnten Coomassie-Färbelösung gefärbt. Nach der Entfärbung in einer Methanol-Lösung wurde die Membran für 2h in einer BSA-haltigen Blockierlösung inkubiert. Dies diente zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Anschließend wurde die Membran für mindestens 4 h bei 4°C mit dem entsprechenden Erstantikörper (z.B. anti-phospho-tyrosin Antikörper) inkubiert. Nach einem dreimaligen 15-minütigen Waschen in TBS/Tween wurde die Membran für 2 h mit Lösung mit HRP-gekoppelten Protein G (für monoklonale Erstantikörper; 3 μ l AK auf 15 ml TBST) oder

HRP-gekoppelten Protein A (für polyklonale Erstantikörper) inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal 15 min gewaschen und anschließend mittels des ECL-Systems (10 ml ECL-Lösung, 3 μ l H₂O₂) oder eines industriell hergestellten ChemiGlow (zur Detektion von besonders schwachen Signalen) für 1 min entwickelt.

Zumeist wurde nach primärer Benutzung die Membran zur erneuten Beprobung von den gebundenen Antikörpern gereinigt (strippen). Dafür wurde die Membran für 5-10 min bei 75°C mit einer SDS- β -Mercaptoethanol-haltigen Lösung behandelt. Diese Membranen konnten nach 2 h Blockieren wieder erneut mit einem Erstantikörper inkubiert werden, was die Detektion von verschiedenen Proteinen innerhalb derselben Ausgangsprobe ermöglichte.

7.6.3 Herstellung von Ganzzell-Lysaten und Nachweis der zellulären Proteinmengen

Zur Bestimmung des zellulären Proteingehalts wurde eine bestimmte Anzahl von Zellen in RIPA-Puffer (0,5-1ml) mit Hilfe eines Zellschabers lysiert. Chromosomale DNA und Zelldebris wurden durch Zugabe von 100 μ l Sepharose-Lösung (5 min schütteln) und darauf folgender Zentrifugation bei 13000 rpm für 15 min pelletiert. Der Überstand wurde in 2xSDS-Probenpuffer aufgenommen und vor der SDS-PAGE für 5min bei 90°C aufgeköcht. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und mit entsprechenden Antikörpern beprobt.

7.6.4 Immunpräzipitation

Von infizierten und nicht infizierten Proben wurden wie in 7.6.3 beschriebene Ganzzell-Lysate hergestellt. Nach Überprüfung des Proteingehalts (Abschätzung anhand von Western Blot Analysen von Ganzzell-Lysaten) wurden gleiche Proteinmengen mit dem gleichen Volumen Triton-Puffer vermengt. Anschließend wurde in jede Probe 3-5 μ g des entsprechenden Antikörpers hinzugefügt und für 4 h bei 4°C rotiert. Die Immunkomplexe wurden sodann durch Zugabe von Agarose-gekoppeltem Protein A/G und weiterer Inkubation von 1 h immobilisiert. Protein A/G gekoppelt an Agarose konnte durch effiziente Bindung des Fc-Teils der primären Antikörper unlösliche Komplexe aus Antigen, primärem Antikörper und Agarose bilden. Diese Komplexe wurden durch Schnellzentrifugation pelletiert und dreimal mit Triton-Puffer gewaschen. Zum Schluss wurde das Pellet in 30 μ l Triton-Puffer und 10 μ l 4xSDS-Probenpuffer aufgenommen, bei 90°C für 5 min aufgeköcht und mittels SDS-PAGE und Western Blotting analysiert.

7.6.5 Src in Vitro Kinaseassay

Um die Kinaseaktivität von Src bestimmen zu können, wurde Src aus verschiedenen Proben immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden 4x mit RIPA-Puffer und zwei Mal mit Kinase-Puffer gewaschen und am Ende in 30 μ l Kinasepuffer resuspendiert. Durch Zugabe von kaltem ATP (10 μ M) und [32 P] γ ATP (19 μ Ci/Probe; 3000 Ci/mmol) und Inkubation für 20 min bei 30°C wurden die Autophosphorylierungsreaktionen gestartet. Die Kinasereaktion wurde durch Zugabe von 5 μ l kochendem 5xSDS-Probenpuffer beendet. Die Proben wurden im Anschluss an die SDS-PAGE auf die PVDF-Membran transferiert und einer Autoradiographie unterzogen. Um gleiche Mengen des immunpräzipitierten Proteins in den Proben nachweisen zu können, wurde die Membran im Anschluß einem Western Blot mit dem primären, in der Präzipitation verwendeten Antikörper (z.B. monoklonal anti-c-Src) unterzogen.

8 Zusammenfassung

Der Gram-positive Erreger *Staphylococcus aureus* ist ein Bestandteil der normalen Haut- und Schleimhautflora des Menschen, kann aber auch ein weites Spektrum von Krankheitsbildern hervorrufen. Besonders häufig tritt dieser Mikroorganismus bei nosokomialen Infektionen in Erscheinung und ist aufgrund der oftmals vorliegenden multiplen Antibiotikaresistenzen immer schwieriger therapeutisch zu begrenzen. Ein besonderes Charakteristikum dieses Pathogens besteht in der Expression von Oberflächenstrukturen, welche eine hohe Affinität für Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) von eukaryontischen Organismen aufweisen und die kollektiv als MSCRAMM (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) bezeichnet werden. Bei Patientenisolaten häufig vorliegende MSCRAMM von *S. aureus* sind die Zellwand-assoziierten Fibronektin-bindenden Proteine A und B (FnBP-A und FnBP-B), die eine direkte Assoziation der Bakterien mit dem ECM Protein Fibronektin (Fn) vermitteln. Das auf der Bakterienoberfläche gebundene Fn kann in der Folge als eine Art molekulare Brücke zwischen FnBP-exprimierenden *S. aureus* und dem Fn-Rezeptor auf der Wirtszellseite, dem Integrin $\alpha_5\beta_1$, dienen. Neben der Anheftung an das Wirtsgewebe kann die indirekte Assoziation mit Integrin $\alpha_5\beta_1$ die Aufnahme der Bakterien durch die eukaryontische Zelle auslösen. Wie die bakterielle Adhäsion an Integrin $\alpha_5\beta_1$ und die Aggregation der Integrine durch die mit Fn-beschichteten Bakterien in ein Signal zur Aufnahme der Pathogene durch die Zelle umgesetzt wird, ist nicht vollständig geklärt und sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurde ein neues und effektives Protokoll zur fluoreszenzmikroskopischen Differenzierung von extra- und intrazellulären Bakterien entwickelt. Diese Methode besitzt den Vorteil, von Bakterien-spezifischen Antikörpern unabhängig zu sein. Dadurch bietet sich die Möglichkeit, Bakterien, gegen die es noch keine spezifischen Antiseren gibt, dennoch auf ihre zelluläre Lokalisation und Invasivität mittels mikrobiologischer Methoden untersuchen zu können.

Im Hinblick auf die nähere Untersuchung der Signaltransduktion bei der Invasion von *S. aureus* war die kritische Rolle von Tyrosinkinasen für die Integrin-vermittelte Invasion ein erster wichtiger Hinweis. Diese Befunde führten zu weiteren spezifischeren Untersuchungen, wobei mit Hilfe von pharmakologischen und genetischen Inhibitoren eine wichtige Rolle für Kinasen der Src Familie gezeigt werden konnte. Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung der Src-Kinasen für die Internalisierung von *S. aureus* war ein dramatischer Rückgang der Aufnahmerate in Src/Yes/Fyn-defizienten Maus-Fibroblasten, verglichen

mit Src-rekonstituierten Zellen. Auf biochemischer Ebene konnte eine deutliche Aktivierung der Src-Kinase nach einer Infektion mit *S. aureus*, nicht aber nach Infektion mit dem nicht-pathogenen *S. carnosus* festgestellt werden.

Es ist bekannt, dass die Bildung von Integrinclustern der Auslöser für die Zusammensetzung von charakteristischen Proteinkomplexen an der intrazellulären Seite der Plasmamembran ist. Integrin-reiche fokale Kontakte (FK) sind angereichert mit Proteinen wie Talin, Vinculin, Paxillin, Tensin, α -Actinin oder Zyxin sowie Signalenzymen wie der Fokalen Adhäsions Kinase (FAK) oder Kinasen der Src Familie. Die Protein Tyrosin Kinase (PTK) FAK ist nach Integrinstimulierung eines der Schlüsselenzyme in FK. Dies war der Anlass nach der Bedeutung von FAK für die Integrin-vermittelte Internalisierung von *S. aureus* zu fragen. Ebenfalls ein wichtiger Hinweis waren die starken Rekrutierungen von Markerproteinen von fokalen Komplexen zum Ort von zellgebundenen *S. aureus* nicht aber von *S. carnosus*. Daraufhin wurde mittels dominant-negativer FAK-Mutanten und FAK-defizienter Mausfibroblasten der Einfluss von FAK für die Internalisierung von *S. aureus* untersucht. Bei beiden Versuchsansätzen konnte ein starker Rückgang der Aufnahme beobachtet werden. Zusammengefasst bestätigten diese Ergebnisse die essentielle Rolle von FAK für die Integrin vermittelte Aufnahme der pathogenen *S. aureus*.

Bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts spielen eine Reihe von Proteinen eine wichtige Rolle, darunter auch Cortactin. Cortactin ist ein bekanntes Substrat der Src-Kinasen und es lag nahe, nach einer funktionellen Verbindung von Src, FAK und Cortactin zu suchen. Dominant-negative Cortactin-Mutanten, die keine Assoziation mit dem Arp2/3 Komplex oder mit Dynamamin aufweisen, oder welche die von Src-vermittelte Phosphorylierung am C-Terminus verhindern, blockierten die Aufnahme von *S. aureus*. Mikroskopisch konnte eine starke Rekrutierung von Cortactin zu zellgebundenen *S. aureus* beobachtet werden, jedoch wurde die Rekrutierung nicht von FAK beeinflusst. Die Phosphorylierung von Cortactin aufgrund *S. aureus*-Infektion war allerdings FAK- und Src-abhängig. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine bisher unbeschriebene FAK/Src Cortactin Signalachse für die Regulation der Integrin-Internalisierung verantwortlich ist.

Die detaillierten Untersuchungen der rezeptorvermittelten Aufnahme und der dabei induzierten Signaltransduktion in Wirtszellen gaben neue Erkenntnisse über die Pathogenitätsstrategien von *S. aureus*. Darüber hinaus ermöglichen diese Arbeiten neue Einblicke in die molekularen Vorgänge, welche die Internalisierung von Integrinen steuern.

9 Summary

The gram-positive bacterium *S. aureus* is part of the normal skin and mucosal flora of humans, but it can also give rise to a wide spectrum of infectious diseases. Today *S. aureus* is a common cause of nosocomial infections that are often difficult to treat due to the presence of antibiotic resistance genes. Virulence-associated features of this pathogen include surface structures that interact with extracellular matrix (ECM) proteins of eukaryotic organisms. These adhesins have been collectively termed MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules). Most clinical isolates of *S. aureus* associate with the ECM protein fibronectin via the fibronectin-binding-proteins (FnBP-A and FnBP-B). Fibronectin (Fn) binding to bacterial FnBPs functions as a molecular bridge linking the pathogen to the principal cellular Fn receptor, the integrin $\alpha_5\beta_1$. In addition to allowing adherence of the bacteria to the host cell surface, the clustering of integrins also leads to the internalization of the microorganisms. How the integrin engagement by the fibronectin-coated bacteria is transduced into the cell and how this signal initiates bacterial engulfment is poorly characterized. Therefore, the major aim of this work was to identify host components that regulate integrin-dependent internalization of pathogenic *S. aureus*.

As a first step, a novel and elegant microscopic method for the evaluation of bacterial invasiveness into eukaryotic cells was developed. The protocol is based on differential fluorescent staining of extracellular and intracellular bacteria and allows quantification of bacterial invasiveness using a fluorescence microscope. The most important advance of this method is the fact, that the bacteria are covalently labeled and therefore, robust and invariant staining of the total bacterial population is achieved. In addition, the protocol does not rely on bacteria-specific antibodies making this the method of choice in case specific antisera against the pathogen are not available.

Functional analysis of signaling pathways involved in the uptake process revealed an important role for protein tyrosine kinases (PTKs) during integrin-mediated internalisation of *S. aureus*. These observations were further extended by the use of specific genetic and pharmacological inhibitors that demonstrated a critical role for Src family PTKs in bacterial internalization. The important function of Src PTKs was further corroborated by the dramatic decrease of *S. aureus* uptake by Src/Yes/Fyn-deficient cells compared to Src-expressing cells. Biochemically, a significant activation of Src PTKs was observed in human epithelial cells in response to infection with *S. aureus*, whereas there was no activation after an infection with the non-pathogenic *S. carnosus*.

Integrin-initiated focal contacts (FC) are enriched in specific marker proteins such as vinculin, paxillin, tensin, α -actinin, or zyxin as well as signaling enzymes including the focal adhesion kinase (FAK) or Src PTKs. As the focal adhesion kinase is a key mediator of integrin signaling, the role of this enzyme in integrin-mediated internalisation of *S. aureus* was examined. In contrast to *S. carnosus*, contact of *S. aureus* with the eukaryotic host cell membrane resulted in strong recruitment of FC marker proteins to the site of adherent bacteria. To investigate the role of FAK for the internalization of *S. aureus*, dominant-negative FAK-mutants and FAK-deficient mouse cells were infected with the pathogen. In all cases, a major reduction in the number of internalized *S. aureus* was observed. Taken together these results demonstrated an essential role of FAK for the integrin-mediated uptake of *S. aureus* and suggested that an active FAK/Src complex regulates bacterial internalization via integrins.

In a further approach, effectors of the FAK/Src complex and potential regulators of actin cytoskeleton dynamics during internalization of *S. aureus* were investigated. Biochemical analysis of infected cells revealed the actin-binding protein cortactin as a major tyrosine phosphorylated protein in response to pathogenic staphylococci. Furthermore, cortactin was recruited to the vicinity of cell-bound *S. aureus*, but not to *S. carnosus*. Various dominant-negative cortactin mutants that were either compromised in their association with the Arp2/3 complex or dynamin-2, or that lacked critical tyrosine phosphorylation sites in the C-terminal domain interfered with the uptake of *S. aureus*. As both FAK and cortactin are substrates of active Src kinases and both are responsive to integrin stimulation, it was hypothesized that there is a functional link between FAK, Src, and cortactin. Though the recruitment of cortactin to the vicinity of cell-bound *S. aureus* was not influenced by the presence of FAK, the phosphorylation status of cortactin after infection with *S. aureus* or after integrin stimulation by a fibronectin matrix was dependent on both FAK and Src. Together, these results reveal a novel FAK/Src-cortactin signalling axis regulating integrin internalisation.

The detailed examination of the FnBP-triggered, integrin-mediated bacterial uptake offers new insight into the pathogenicity strategies of *S. aureus* and might open up novel avenues for therapeutic intervention. In addition, this work furthers our understanding of the molecular processes regulating the internalisation of integrins.

10 Literaturverzeichnis

- Abbi, S., Ueda, H., Zheng, C., Cooper, L. A., Zhao, J., Christopher, R. and Guan, J. L. (2002). Regulation of focal adhesion kinase by a novel protein inhibitor FIP200. *Mol Biol Cell* **13**, 3178-91.
- Agerer, F., Michel, A., Ohlsen, K. and Hauck, C. R. (2003). Integrin-mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src family protein tyrosine kinases. *J Biol Chem* **278**, 42524-31.
- Agerer, F., Waeckerle, S. and Hauck, C. R. (2004). Microscopic quantification of bacterial invasion by a novel antibody-independent staining method. *Journal of Microbiological Methods* **59**, 23-32.
- Alrutz, M. A. and Isberg, R. R. (1998). Involvement of focal adhesion kinase in invasin-mediated uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 13658-63.
- Alrutz, M. A., Srivastava, A., Wong, K. W., D'Souza-Schorey, C., Tang, M., Ch'Ng, L. E., Snapper, S. B. and Isberg, R. R. (2001). Efficient uptake of pseudotuberculosis via integrin receptors involves a Rac1-Arp 2/3 pathway that bypasses N-WASP function. *Mol Microbiol* **42**, 689-703.
- Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K. and Juliano, R. L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacological Reviews* **50**, 197-263.
- Bagrodia, S., Bailey, D., Lenard, Z., Hart, M., Guan, J. L., Premont, R. T., Taylor, S. J. and Cerione, R. A. (1999). A tyrosine-phosphorylated protein that binds to an important regulatory region on the cool family of p21-activated kinase-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 22393-400.
- Bagrodia, S. and Cerione, R. A. (1999). PAK to the future. *Trends in Cell Biology* **9**, 350-355.
- Ballestrem, C., Hinz, B., Imhof, B. A. and Wehrle-Haller, B. (2001). Marching at the front and dragging behind: differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J Cell Biol* **155**, 1319-32.
- 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**, 336-42.

- Bhakdi, S. and Trantum-Jensen, J.** (1991). Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Reviews* **55**, 733-51.
- Billker, O., Popp, A., Brinkmann, V., Wenig, G., Schneider, J., Caron, E. and Meyer, T. F.** (2002). Distinct mechanisms of internalization of *Neisseria gonorrhoeae* by members of the CEACAM receptor family involving Rac1- and Cdc42- dependent and -independent pathways. *The EMBO Journal* **21**, 560-71.
- Bohach, G. A., Fast, D. J., Nelson, R. D. and Schlievert, P. M.** (1990). Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. *Critical Reviews in Microbiology* **17**, 251-72.
- Booth, J. W., Telio, D., Liao, E. H., McCaw, S. E., Matsuo, T., Grinstein, S. and Gray-Owen, S. D.** (2003). Phosphatidylinositol 3-kinases in carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule-mediated internalization of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Biol Chem* **278**, 14037-45.
- Borges, E., Jan, Y. and Ruoslahti, E.** (2000). Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain. *J Biol Chem* **275**, 39867-73.
- Bougneres, L., Girardin, S. E., Weed, S. A., Karginov, A. V., Olivo-Marin, J. C., Parsons, J. T., Sansonetti, P. J. and Van Nhieu, G. T.** (2004). Cortactin and Crk cooperate to trigger actin polymerization during *Shigella* invasion of epithelial cells. *J Cell Biol* **166**, 225-35.
- Bouton, A. H., Riggins, R. B. and Bruce-Staskal, P. J.** (2001). Functions of the adapter protein Cas: signal convergence and the determination of cellular responses. *Oncogene* **20**, 6448-58.
- Bouvard, D., Vignoud, L., Dupe-Manet, S., Abed, N., Fournier, H. N., Vincent-Monegat, C., Retta, S. F., Fassler, R. and Block, M. R.** (2003). Disruption of focal adhesions by integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 alpha. *J Biol Chem* **278**, 6567-74.
- Brakebusch, C., Hirsch, E., Potocnik, A. and Fassler, R.** (1997). Genetic analysis of beta1 integrin function: confirmed, new and revised roles for a crucial family of cell adhesion molecules. *J Cell Sci* **110** (Pt 23), 2895-904.
- Brindle, N. P., Holt, M. R., Davies, J. E., Price, C. J. and Critchley, D. R.** (1996). The focal-adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) binds to the proline-rich domain in vinculin. *Biochem J* **318** (Pt 3), 753-7.

- Brouillette, E., Grondin, G., Shkreta, L., Lacasse, P. and Talbot, B. G.** (2003). In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microb Pathog* **35**, 159-68.
- Brouillette, E., Martinez, A., Boyll, B. J., Allen, N. E. and Malouin, F.** (2004). Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. *FEMS Immunol Med Microbiol* **41**, 35-41.
- Brown, D. A. and London, E.** (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* **275**, 17221-4.
- Brown, M. T. and Cooper, J. A.** (1996). Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* **1287**, 121-49.
- Bruce-Staskal, P. J., Weidow, C. L., Gibson, J. J. and Bouton, A. H.** (2002). Cas, Fak and Pyk2 function in diverse signaling cascades to promote *Yersinia* uptake. *J Cell Sci* **115**, 2689-700.
- Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S. F., Tosello-Trampont, A. C., Macara, I. G., Madhani, H., Fink, G. R. and Ravichandran, K. S.** (2002). Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180 ELMO complex. *Nature Cell Biology* **4**, 574-82.
- Burke, R. D.** (1999). Invertebrate integrins: structure, function, and evolution. *International Review of Cytology* **191**, 257-84.
- Burridge, K. and Chrzanowska-Wodnicka, M.** (1996). Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 463-518.
- Calderwood, D. A.** (2004a). Integrin activation. *J Cell Sci* **117**, 657-66.
- Calderwood, D. A.** (2004b). Talin controls integrin activation. *Biochem Soc Trans* **32**, 434-7.
- Calderwood, D. A., Zent, R., Grant, R., Rees, D. J., Hynes, R. O. and Ginsberg, M. H.** (1999). The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 28071-4.
- Carriero, M. V., Del Vecchio, S., Capozzoli, M., Franco, P., Fontana, L., Zannetti, A., Botti, G., D'Aiuto, G., Salvatore, M. and Stoppelli, M. P.** (1999). Urokinase receptor interacts with alpha(v)beta5 vitronectin receptor, promoting urokinase-dependent cell migration in breast cancer. *Cancer Res* **59**, 5307-14.
- Cary, L. A. and Guan, J. L.** (1999). Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling. *Front Biosci* **4**, D102-13.

- Cary, L. A., Klinghoffer, R. A., Sachsenmaier, C. and Cooper, J. A.** (2002). SRC catalytic but not scaffolding function is needed for integrin-regulated tyrosine phosphorylation, cell migration, and cell spreading. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 2427-40.
- Chavakis, T., Hussain, M., Kanse, S. M., Peters, G., Bretzel, R. G., Flock, J. I., Herrmann, M. and Preissner, K. T.** (2002). *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med* **8**, 687-93.
- Chen, B. H., Tzen, J. T., Bresnick, A. R. and Chen, H. C.** (2002). Roles of Rho-associated kinase and myosin light chain kinase in morphological and migratory defects of focal adhesion kinase-null cells. *J Biol Chem* **277**, 33857-63.
- Clark, M. A., Hirst, B. H. and Jepson, M. A.** (1998). M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of pseudotuberculosis to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun* **66**, 1237-43.
- Collen, D. and Lijnen, H. R.** (1994). Staphylokinase, a fibrin-specific plasminogen activator with therapeutic potential? *Blood* **84**, 680-6.
- Cooper, L. A., Shen, T. L. and Guan, J. L.** (2003). Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 8030-41.
- Cribier, B., Prevost, G., Couppie, P., Finck-Barbancon, V., Grosshans, E. and Piemont, Y.** (1992). *Staphylococcus aureus* leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections? An epidemiological and experimental study. *Dermatology* **185**, 175-80.
- Critchley, D. R.** (2000). Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 133-9.
- Danen, E. H., Sonneveld, P., Brakebusch, C., Fassler, R. and Sonnenberg, A.** (2002). The fibronectin-binding integrins alpha5beta1 and alphavbeta3 differentially modulate RhoA-GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol* **159**, 1071-86.
- Darribere, T., Skalski, M., Cousin, H. L., Gaultier, A., Montmory, C. and Alfandari, D.** (2000). Integrins: regulators of embryogenesis. *Biol Cell* **92**, 5-25.
- Datta, A., Huber, F. and Boettiger, D.** (2002). Phosphorylation of beta3 integrin controls ligand binding strength. *J Biol Chem* **277**, 3943-9.
- Hoog, C. L., Foster, L. J. and Mann, M.** (2004). RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers. *Cell* **117**,

649-62.

Melker, A. A. and Sonnenberg, A. (1999). Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events. *BioEssays* **21**, 499-509.

Dedhar, S. (1999). Integrins and signal transduction. *Curr Opin Hematol* **6**, 37-43.

Dehio, C., Meyer, M., Berger, J., Schwarz, H. and Lanz, C. (1997). Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. *J Cell Sci* **110** (Pt 18), 2141-54.

Dehio, C., Prevost, M. C. and Sansonetti, P. J. (1995). Invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri* induces tyrosine phosphorylation of cortactin by a pp60c-src-mediated signalling pathway. *The EMBO Journal* **14**, 2471-2482.

Pozo, M. A., Alderson, N. B., Kiosses, W. B., Chiang, H. H., Anderson, R. G. and Schwartz, M. A. (2004). Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science* **303**, 839-42.

Diamond, M. S. and Springer, T. A. (1994). The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Current Biology* **4** (6), 506-517.

Dickinson, R. B., Nagel, J. A., McDevitt, D., Foster, T. J., Proctor, R. A. and Cooper, S. L. (1995). Quantitative comparison of clumping factor- and coagulase-mediated *Staphylococcus aureus* adhesion to surface-bound fibrinogen under flow. *Infect Immun* **63**, 3143-50.

Dolfi, F., Garcia-Guzman, M., Ojaniemi, M., Nakamura, H., Matsuda, M. and Vuori, K. (1998). The adaptor protein crk connects multiple cellular stimuli to the JNK signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 15394-9.

Drevets, D. A. and Campbell, P. A. (1991). Macrophage phagocytosis: use of fluorescence microscopy to distinguish between extracellular and intracellular bacteria. *Journal of Immunological Methods* **142**, 31-38.

Drevets, D. A. and Elliott, A. M. (1995). Fluorescence labeling of bacteria for studies of intracellular pathogenesis. *Journal of Immunological Methods* **187**, 69-79.

Dziewanowska, K., Patti, J. M., Deobald, C. F., Bayles, K. W., Trumble, W. R. and Bohach, G. A. (1999). Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect Immun* **67**, 4673-8.

- Falkow, S.** (1991). Bacterial entry into eukaryotic cells. *Cell* **65**, 1099-1102.
- Felsenfeld, D. P., Schwartzberg, P. L., Venegas, A., Tse, R. and Sheetz, M. P.** (1999). Selective regulation of integrin–cytoskeleton interactions by the tyrosine kinase Src. *Nature Cell Biology* **1**, 200-6.
- Finlay, B. B. and Cossart, P.** (1997). Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* **276**, 718-725.
- Finnemann, S. C.** (2003). Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors. *Embo J* **22**, 4143-54.
- Fischer, B., Vaudaux, P., Magnin, M., el Mestikawy, Y., Proctor, R. A., Lew, D. P. and Vasey, H.** (1996). Novel animal model for studying the molecular mechanisms of bacterial adhesion to bone-implanted metallic devices: role of fibronectin in *Staphylococcus aureus* adhesion. *J Orthop Res* **14**, 914-20.
- Flock, J. I., Froman, G., Jonsson, K., Guss, B., Signas, C., Nilsson, B., Raucchi, G., Hook, M., Wadstrom, T. and Lindberg, M.** (1987). Cloning and expression of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *Embo J* **6**, 2351-7.
- Flock, J. I., Hienz, S. A., Heimdahl, A. and Schennings, T.** (1996). Reconsideration of the role of fibronectin binding in endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **64**, 1876-8.
- Foster, T. J. and Hook, M.** (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology* **6**, 484-8.
- Fowler, T., Johansson, S., Wary, K. K. and Hook, M.** (2003). Src kinase has a central role in in vitro cellular internalization of *Staphylococcus aureus*. *Cell Microbiol* **5**, 417-26.
- Fowler, T., Wann, E. R., Joh, D., Johansson, S., Foster, T. J. and Hook, M.** (2000). Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur J Cell Biol* **79**, 672-9.
- Gabarra-Niecko, V., Schaller, M. D. and Dunty, J. M.** (2003). FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **22**, 359-74.
- Gambaletta, D., Marchetti, A., Benedetti, L., Mercurio, A. M., Sacchi, A. and Falcioni, R.** (2000). Cooperative signaling between alpha(6)beta(4) integrin and ErbB-2 receptor is required to promote phosphatidylinositol 3-kinase-dependent invasion. *J Biol*

Chem **275**, 10604-10.

Garcia-Alvarez, B., de Pereda, J. M., Calderwood, D. A., Ulmer, T. S., Critchley, D., Campbell, I. D., Ginsberg, M. H. and Liddington, R. C. (2003). Structural determinants of integrin recognition by talin. *Mol Cell* **11**, 49-58.

Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R. and Yamada, K. M. (2001). Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 793-805.

Giancotti, F. G. and Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science* **285**, 1028-32.

Ginsberg, M. H., Du, X. and Plow, E. F. (1992). Inside-out integrin signalling. *Curr Opin Cell Biol* **4**, 766-71.

Grassme, H., Gulbins, E., Brenner, B., Ferlinz, K., Sandhoff, K., Harzer, K., Lang, F. and Meyer, T. F. (1997). Acidic sphingomyelinase mediates entry of *Neisseria gonorrhoeae* into non-phagocytic cells. *Cell* **91**, 605-15.

Grassme, H., Jendrossek, V., Riehle, A., Von Kurthy, G., Berger, J., Schwarz, H., Weller, M., Kolesnick, R. and Gulbins, E. (2003). Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat Med* **9**, 322-30.

Gresham, H. D., Lowrance, J. H., Caver, T. E., Wilson, B. S., Cheung, A. L. and Lindberg, F. P. (2000). Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *Journal of Immunology* **164**, 3713-22.

Hagel, M., George, E. L., Kim, A., Tamimi, R., Opitz, S. L., Turner, C. E., Imamoto, A. and Thomas, S. M. (2002). The adaptor protein paxillin is essential for normal development in the mouse and is a critical transducer of fibronectin signaling. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 901-15.

Haggar, A., Hussain, M., Lonnie, H., Herrmann, M., Norrby-Teglund, A. and Flock, J. I. (2003). Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect Immun* **71**, 2310-7.

Hanks, S. K., Ryzhova, L., Shin, N. Y. and Brabek, J. (2003). Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Front Biosci* **8**, d982-96.

Harris, T. O., Hufnagle, W. O. and Betley, M. J. (1993). Staphylococcal enterotoxin type A internal deletion mutants: serological activity and induction of T-cell proliferation. *Infect Immun* **61**, 2059-68.

Hartleib, J., Kohler, N., Dickinson, R. B., Chhatwal, G. S., Sixma, J. J., Hartford, O. M., Foster, T. J., Peters, G., Kehrel, B. E. and Herrmann, M. (2000).

Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood* **96**, 2149-56.

Hasegawa, H., Kiyokawa, E., Tanaka, S., Nagashima, K., Gotoh, N., Shibuya, M., Kurata, T. and Matsuda, M. (1996). DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane. *Molecular and Cellular Biology* **16**, 1770-6.

Hauck, C. R. (2002). Cell adhesion receptors - signaling capacity and exploitation by bacterial pathogens. *Medical Microbiology and Immunology* **191**, 55-62.

Hauck, C. R., Grassme, H., Bock, J., Jendrossek, V., Ferlinz, K., Meyer, T. F. and Gulbins, E. (2000). Acid sphingomyelinase is involved in CEACAM receptor-mediated phagocytosis of *N. gonorrhoeae*. *FEBS Letters* **478**, 260-266.

Hauck, C. R., Hsia, D. A., Puente, X. S., Cheresch, D. A. and Schlaepfer, D. D. (2002a). FRNK blocks v-Src-stimulated invasion and experimental metastases without effects on cell motility or growth. *The EMBO Journal* **21**, 6289-6302.

Hauck, C. R., Hsia, D. A. and Schlaepfer, D. D. (2002b). The focal adhesion kinase - a regulator of cell migration and invasion. *IUBMB Life* **53**, 115-119.

Hauck, C. R. and Meyer, T. F. (2003). 'Small' talk: Opa proteins as mediators of *Neisseria*-host-cell communication. *Curr Opin Microbiol* **6**, 43-9.

Hauck, C. R., Meyer, T. F., Lang, F. and Gulbins, E. (1998). CD66-mediated phagocytosis of Opa52 *Neisseria gonorrhoeae* requires a Src-like tyrosine kinase- and Rac1-dependent signalling pathway. *The EMBO Journal* **17**, 443-454.

Hebert, A., Sayasith, K., Senechal, S., Dubreuil, P. and Lagace, J. (2000). Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol Lett* **193**, 57-62.

Heesemann, J. and Laufs, R. (1985). Double immunofluorescence microscopic technique for accurate differentiation of extracellularly and intracellularly located bacteria in cell culture. *Journal of Clinical Microbiology* **22**, 168-175.

Heyer, G., Saba, S., Adamo, R., Rush, W., Soong, G., Cheung, A. and Prince, A. (2002). *Staphylococcus aureus* agr and sarA functions are required for invasive infection but not inflammatory responses in the lung. *Infect Immun* **70**, 127-33.

Hildebrand, J. D., Schaller, M. D. and Parsons, J. T. (1993). Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions. *Journal of Cell Biology* **123**, 993-1005.

- Hildebrand, J. D., Taylor, J. M. and Parsons, J. T. (1996). An SH3 domain-containing GTPase-activating protein for Rho and Cdc42 associates with focal adhesion kinase. *Molecular and Cellular Biology* **16**, 3169-78.
- Holtta-Vuori, M., Tanhuanpaa, K., Mobius, W., Somerharju, P. and Ikonen, E. (2002). Modulation of cellular cholesterol transport and homeostasis by Rab11. *Mol Biol Cell* **13**, 3107-22.
- Hsia, D. A., Mitra, S. K., Hauck, C. R., Streblow, D. N., Nelson, J. A., Ilic, D., Huang, S., Li, E., Nemerow, G. R., Leng, J. et al. (2003). Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J Cell Biol* **160**, 753-67.
- Huang, C., Ni, Y., Wang, T., Gao, Y., Haudenschild, C. C. and Zhan, X. (1997). Down-regulation of the filamentous actin cross-linking activity of cortactin by Src-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **272**, 13911-5.
- Huang, D., Cheung, A. T., Parsons, J. T. and Bryer-Ash, M. (2002). Focal adhesion kinase (FAK) regulates insulin-stimulated glycogen synthesis in hepatocytes. *J Biol Chem* **277**, 18151-60.
- Hudson, M. C., Ramp, W. K., Nicholson, N. C., Williams, A. S. and Nousiainen, M. T. (1995). Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb Pathog* **19**, 409-19.
- Hughes, P. E. and Pfaff, M. (1998). Integrin affinity modulation. *Trends in Cell Biology* **8**, 359-64.
- Humphries, M. J., Symonds, E. J. and Mould, A. P. (2003). Mapping functional residues onto integrin crystal structures. *Current Opinion in Structural Biology* **13**, 236-43.
- Hunger-Glaser, I., Salazar, E. P., Sinnott-Smith, J. and Rozengurt, E. (2003). Bombesin, lysophosphatidic acid, and epidermal growth factor rapidly stimulate focal adhesion kinase phosphorylation at Ser-910: requirement for ERK activation. *J Biol Chem* **278**, 22631-43.
- Hussain, M., Becker, K., von Eiff, C., Peters, G. and Herrmann, M. (2001a). Analogs of Eap protein are conserved and prevalent in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **8**, 1271-6.
- Hussain, M., Becker, K., von Eiff, C., Schrenzel, J., Peters, G. and Herrmann, M. (2001b). Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular

matrix and plasma proteins. *J Bacteriol* **183**, 6778-86.

Huttelmaier, S., Bubeck, P., Rudiger, M. and Jockusch, B. M. (1997). Characterization of two F-actin-binding and oligomerization sites in the cell-contact protein vinculin. *Eur J Biochem* **247**, 1136-42.

Hynes, R. O. (1987). Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* **48**, 549-54.

Hynes, R. O. (1996). Targeted mutations in cell adhesion genes: what have we learned from them? *Dev Biol* **180**, 402-12.

Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-87.

Hynes, R. O. and Wagner, D. D. (1996). Genetic manipulation of vascular adhesion molecules in mice. *J Clin Invest* **98**, 2193-5.

Hynes, R. O. and Zhao, Q. (2000). The evolution of cell adhesion. *J Cell Biol* **150**, F89-96.

Iandolo, J. J. (1989). Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol* **43**, 375-402.

Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., Yamamoto, T. et al. (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* **377**, 539-544.

Ilic, D., Kovacic, B., Johkura, K., Schlaepfer, D. D., Tomasevic, N., Han, Q., Kim, J. B., Howerton, K., Baumbusch, C., Ogiwara, N. et al. (2004). FAK promotes organization of fibronectin matrix and fibrillar adhesions. *J Cell Sci* **117**, 177-87.

Isberg, R. R. and Barnes, P. (2001). Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*. *J Cell Sci* **114**, 21-28.

Isberg, R. R., Hamburger, Z. and Dersch, P. (2000). Signaling and invasin-promoted uptake via integrin receptors. *Microbes Infect* **2**, 793-801.

Isberg, R. R. and Leong, J. M. (1990). Multiple b1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* **60**, 861-871.

Isberg, R. R., Voorhis, D. L. and Falkow, S. (1987). Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* **50**, 769-778.

Izaguirre, G., Aguirre, L., Hu, Y. P., Lee, H. Y., Schlaepfer, D. D., Aneskievich, B. J. and Haimovich, B. (2001). The cytoskeletal/non-muscle isoform of

- alpha-actinin is phosphorylated on its actin-binding domain by the focal adhesion kinase. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 28676-85.
- Jadoun, J., Ozeri, V., Burstein, E., Skutelsky, E., Hanski, E. and Sela, S.** (1998). Protein F1 is required for efficient entry of *Streptococcus pyogenes* into epithelial cells. *J Infect Dis* **178**, 147-58.
- Jett, B. D. and Gilmore, M. S.** (2002). Internalization of *Staphylococcus aureus* by human corneal epithelial cells: role of bacterial fibronectin-binding protein and host cell factors. *Infect Immun* **70**, 4697-700.
- Jevon, M., Guo, C., Ma, B., Mordan, N., Nair, S. P., Harris, M., Henderson, B., Bentley, G. and Meghji, S.** (1999). Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infect Immun* **67**, 2677-81.
- Jin, T., Bokarewa, M., Foster, T., Mitchell, J., Higgins, J. and Tarkowski, A.** (2004). *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol* **172**, 1169-76.
- Joh, D., Wann, E. R., Kreikemeyer, B., Speziale, P. and Hook, M.** (1999). Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. *Matrix Biol* **18**, 211-23.
- Johnson, R. P. and Craig, S. W.** (1994). An intramolecular association between the head and tail domains of vinculin modulates talin binding. *J Biol Chem* **269**, 12611-9.
- Jonsson, K., Signas, C., Muller, H. P. and Lindberg, M.** (1991). Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *Eur J Biochem* **202**, 1041-8.
- 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**, 5385-92.
- Kerr, J. R.** (1999). Cell adhesion molecules in the pathogenesis of and host defence against microbial infection. *Mol Pathol* **52**, 220-30.
- Kioka, N., Sakata, S., Kawauchi, T., Amachi, T., Akiyama, S. K., Okazaki, K., Yaen, C., Yamada, K. M. and Aota, S.** (1999). Vinexin: a novel vinculin-binding protein with multiple SH3 domains enhances actin cytoskeletal organization. *J Cell Biol* **144**, 59-69.
- Klemke, R. L., Leng, J., Molander, R., Brooks, P. C., Vuori, K. and Cheresh,**

- D. A.** (1998). CAS/Crk coupling serves as a molecular switch for induction of cell migration. *Journal of Cell Biology* **140**, 961-72.
- Klingbeil, C. K., Hauck, C. R., Jones, K. C., Reider, S. R. and Schlaepfer, D. D.** (2001). Targeting Pyk2 to $\alpha 5$ -integrin-containing focal contacts rescues fibronectin-stimulated signaling and haptotactic motility defects of focal adhesion kinase-null cells. *Journal of Cell Biology* **152**, 97-110.
- Klinghoffer, R. A., Sachsenmaier, C., Cooper, J. A. and Soriano, P.** (1999). Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *The EMBO Journal* **18**, 2459-2471.
- Kornberg, L., Earp, H. S., Parsons, J. T., Schaller, M. and Juliano, R. L.** (1992). Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. *J Biol Chem* **267**, 23439-42.
- Kroemker, M., Rudiger, A. H., Jockusch, B. M. and Rudiger, M.** (1994). Intramolecular interactions in vinculin control alpha-actinin binding to the vinculin head. *FEBS Letters* **355**, 259-62.
- Kuypers, J. M. and Proctor, R. A.** (1989). Reduced adherence to traumatized rat heart valves by a low-fibronectin-binding mutant of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **57**, 2306-12.
- Laukaitis, C. M., Webb, D. J., Donais, K. and Horwitz, A. F.** (2001). Differential dynamics of alpha 5 integrin, paxillin, and alpha-actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells. *J Cell Biol* **153**, 1427-40.
- Lee, J. C.** (1996). The prospects for developing a vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology* **4**, 162-6.
- Lewis, J. M., Baskaran, R., Taagepera, S., Schwartz, M. A. and Wang, J. Y.** (1996). Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15174-9.
- Liddington, R. C. and Ginsberg, M. H.** (2002). Integrin activation takes shape. *J Cell Biol* **158**, 833-9.
- Ling, K., Doughman, R. L., Firestone, A. J., Bunce, M. W. and Anderson, R. A.** (2002). Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase targets and regulates focal adhesions. *Nature* **420**, 89-93.
- Lipfert, L., Haimovich, B., Schaller, M. D., Cobb, B. S., Parsons, J. T. and Brugge, J. S.** (1992). Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein

tyrosine kinase pp125FAK in platelets. *J Cell Biol* **119**, 905-12.

Liu, S., Calderwood, D. A. and Ginsberg, M. H. (2000). Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* **113**, 3563-71.

Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* **339**, 520-32.

Lowy, F. D. (2000). Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? *Trends in Microbiology* **8**, 341-3.

Luhrmann, A., Streker, K., Schuttfort, A., Daniels, J. J. and Haas, A. (2001). *Afpia felis* induces uptake by macrophages directly into a nonendocytic compartment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 7271-6.

Ma, A., Richardson, A., Schaefer, E. M. and Parsons, J. T. (2001). Serine phosphorylation of focal adhesion kinase in interphase and mitosis: a possible role in modulating binding to p130(Cas). *Mol Biol Cell* **12**, 1-12.

Mandai, K., Nakanishi, H., Satoh, A., Takahashi, K., Satoh, K., Nishioka, H., Mizoguchi, A. and Takai, Y. (1999). Ponsin/SH3P12: an I-afadin- and vinculin-binding protein localized at cell-cell and cell-matrix adherens junctions. *J Cell Biol* **144**, 1001-17.

Manes, S., del Real, G. and Martinez, A. C. (2003). Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol* **3**, 557-68.

Marrack, P. and Kappler, J. (1990). The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* **248**, 1066.

Martel, V., Racaud-Sultan, C., Dupe, S., Marie, C., Paulhe, F., Galmiche, A., Block, M. R. and Albiges-Rizo, C. (2001). Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *J Biol Chem* **276**, 21217-27.

Martin-Bermudo, M. D., Dunin-Borkowski, O. M. and Brown, N. H. (1998). Modulation of integrin activity is vital for morphogenesis. *J Cell Biol* **141**, 1073-81.

Massey, R. C., Kantzanou, M. N., Fowler, T., Day, N. P., Schofield, K., Wann, E. R., Berendt, A. R., Hook, M. and Peacock, S. J. (2001). Fibronectin-binding protein A of *Staphylococcus aureus* has multiple, substituting, binding regions that mediate adherence to fibronectin and invasion of endothelial cells. *Cell Microbiol* **3**, 839-51.

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, 760-3.

McCaw, S. E., Schneider, J., Liao, E. H., Zimmermann, W. and Gray-Owen, S. D. (2003). Immunoreceptor tyrosine-based activation motif phosphorylation during engulfment of *Neisseria gonorrhoeae* by the neutrophil-restricted CEACAM3 (CD66d) receptor. *Mol Microbiol* **49**, 623-37.

McDowall, A., Inwald, D., Leitinger, B., Jones, A., Liesner, R., Klein, N. and Hogg, N. (2003). A novel form of integrin dysfunction involving beta1, beta2, and beta3 integrins. *J Clin Invest* **111**, 51-60.

McElroy, M. C., Cain, D. J., Tyrrell, C., Foster, T. J. and Haslett, C. (2002). Increased virulence of a fibronectin-binding protein mutant of *Staphylococcus aureus* in a rat model of pneumonia. *Infect Immun* **70**, 3865-73.

McNiven, M. A., Kim, L., Krueger, E. W., Orth, J. D., Cao, H. and Wong, T. W. (2000). Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *J Cell Biol* **151**, 187-98.

Menzies, B. E. (2003). The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Curr Opin Infect Dis* **16**, 225-9.

Menzies, B. E. and Kourteva, I. (1998). Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect Immun* **66**, 5994-8.

Menzies, B. E., Kourteva, Y., Kaiser, A. B. and Kernodle, D. S. (2002). Inhibition of staphylococcal wound infection and potentiation of antibiotic prophylaxis by a recombinant fragment of the fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* **185**, 937-43.

Meyer, T. F. (1990). Pathogenic neisseriae—a model of bacterial virulence and genetic flexibility. *Int J Med Microbiol* **274**, 135-154.

Meyer, T. F., Gibbs, C. P. and Haas, R. (1990). Variation and control of protein expression in *Neisseria*. *Annu Rev Microbiol* **44**, 451-477.

Miller, G. J., Dunn, S. D. and Ball, E. H. (2001). Interaction of the N- and C-terminal domains of vinculin. Characterization and mapping studies. *J Biol Chem* **276**, 11729-34.

Miyamoto, S., Akiyama, S. K. and Yamada, K. M. (1995a). Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science* **267**, 883-5.

Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O. A., Gutkind, J. S., Burbelo, P. D.,

- Akiyama, S. K. and Yamada, K. M.** (1995b). Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *Journal of Cell Biology* **131**, 791-805.
- Moreillon, P., Entenza, J. M., Francioli, P., McDevitt, D., Foster, T. J., Francois, P. and Vaudaux, P.** (1995). Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect Immun* **63**, 4738-43.
- Moro, L., Venturino, M., Bozzo, C., Silengo, L., Altruda, F., Beguinot, L., Tarone, G. and Defilippi, P.** (1998). Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *The EMBO Journal* **17**, 6622-32.
- Navarre, W. W. and Schneewind, O.** (1994). Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **14**, 115-21.
- Ochoa, G. C., Slepnev, V. I., Neff, L., Ringstad, N., Takei, K., Daniell, L., Kim, W., Cao, H., McNiven, M., Baron, R. et al.** (2000). A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes. *Journal of Cell Biology* **150**, 377-89.
- Oktay, M., Wary, K. K., Dans, M., Birge, R. B. and Giancotti, F. G.** (1999). Integrin-mediated Activation of Focal Adhesion Kinase Is Required for Signaling to Jun NH2-terminal Kinase and Progression through the G1 Phase of the Cell Cycle. *Journal of Cell Biology* **145**, 1461-1470.
- O'Neill, G. M., Fashena, S. J. and Golemis, E. A.** (2000). Integrin signalling: a new Cas(t) of characters enters the stage. *Trends in Cell Biology* **10**, 111-9.
- Owens, D. W., McLean, G. W., Wyke, A. W., Paraskeva, C., Parkinson, E. K., Frame, M. C. and Brunton, V. G.** (2000). The catalytic activity of the Src family kinases is required to disrupt cadherin-dependent cell-cell contacts. *Mol Biol Cell* **11**, 51-64.
- Ozeri, V., Rosenshine, I., Ben-Ze'Ev, A., Bokoch, G. M., Jou, T. S. and Hanski, E.** (2001). De novo formation of focal complex-like structures in host cells by invading Streptococci. *Mol Microbiol* **41**, 561-73.
- Ozeri, V., Rosenshine, I., Mosher, D. F., Fassler, R. and Hanski, E.** (1998). Roles of integrins and fibronectin in the entry of *Streptococcus pyogenes* into cells via protein F1. *Molecular Microbiology* **30**, 625-37.
- Palazzo, A. F., Eng, C. H., Schlaepfer, D. D., Marcantonio, E. E. and Gun-**

- dersen, G. G.** (2004). Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science* **303**, 836-9.
- Palecek, S. P., Loftus, J. C., Ginsberg, M. H., Lauffenburger, D. A. and Horwitz, A. F.** (1997). Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* **385**, 537-40.
- Palma, M., Haggar, A. and Flock, J. I.** (1999). Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J Bacteriol* **181**, 2840-5.
- Parsons, J. T.** (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* **116**, 1409-16.
- Parsons, J. T., Martin, K. H., Slack, J. K., Taylor, J. M. and Weed, S. A.** (2000). Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* **19**, 5606-13.
- Parsons, T. J. and Parsons, S. J.** (1997). Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Current Opinion in Cell Biology* **9**, 187-192.
- Patel, A. S., Schechter, G. L., Wasilenko, W. J. and Somers, K. D.** (1998). Overexpression of EMS1/cortactin in NIH3T3 fibroblasts causes increased cell motility and invasion in vitro. *Oncogene* **16**, 3227-32.
- Patti, J. M., Allen, B. L., McGavin, M. J. and Hook, M.** (1994). MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* **48**, 585-617.
- Patti, J. M. and Hook, M.** (1994). Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 752-8.
- Peacock, S. J., Day, N. P., Thomas, M. G., Berendt, A. R. and Foster, T. J.** (2000). Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in *fnb* genes and adhesion to human fibronectin. *J Infect* **41**, 23-31.
- Pearson, M. A., Reczek, D., Bretscher, A. and Karplus, P. A.** (2000). Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* **101**, 259-70.
- Pepe, J. C. and Miller, V. L.** (1993). *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6473-7.
- Petty, H. R. and Todd, R. F., 3rd.** (1996). Integrins as promiscuous signal transduction devices. *Immunology Today* **17**, 209-12.

- Pfaff, M., Liu, S., Erle, D. J. and Ginsberg, M. H.** (1998). Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins. *J Biol Chem* **273**, 6104-9.
- Pollard, T. D.** (2003). The cytoskeleton, cellular motility and the reductionist agenda. *Nature* **422**, 741-5.
- Que, Y. A., Francois, P., Haefliger, J. A., Entenza, J. M., Vaudaux, P. and Moreillon, P.** (2001). Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. *Infect Immun* **69**, 6296-302.
- Randazzo, P. A., Andrade, J., Miura, K., Brown, M. T., Long, Y. Q., Stauffer, S., Roller, P. and Cooper, J. A.** (2000). The Arf GTPase-activating protein ASAP1 regulates the actin cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 4011-4016.
- Reilly, S. S., Hudson, M. C., Kellam, J. F. and Ramp, W. K.** (2000). In vivo internalization of *Staphylococcus aureus* by embryonic chick osteoblasts. *Bone* **26**, 63-70.
- Ren, X., Kiosses, W. B., Sieg, D. J., Otey, C. A., Schlaepfer, D. D. and Schwartz, M. A.** (2000). Focal adhesion kinase suppresses Rho activity to promote focal adhesion turnover. *J Cell Sci* **113**, 3673-8.
- Rosenberger, C. M., Brumell, J. H. and Finlay, B. B.** (2000). Microbial pathogenesis: lipid rafts as pathogen portals. *Curr Biol* **10**, R823-5.
- Rottner, K., Hall, A. and Small, J. V.** (1999). Interplay between rac and rho in the control of substrate contact dynamics [In Process Citation]. *Curr Biol* **9**, 640-8.
- Ruest, P. J., Roy, S., Shi, E., Mernaugh, R. L. and Hanks, S. K.** (2000). Phosphospecific antibodies reveal focal adhesion kinase activation loop phosphorylation in nascent and mature focal adhesions and requirement for the autophosphorylation site. *Cell Growth and Differentiation* **11**, 41-8.
- Ryding, U., Flock, J. I., Flock, M., Soderquist, B. and Christensson, B.** (1997). Expression of collagen-binding protein and types 5 and 8 capsular polysaccharide in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* **176**, 1096-9.
- Sakai, T., Zhang, Q., Fassler, R. and Mosher, D. F.** (1998). Modulation of beta1A integrin functions by tyrosine residues in the beta1 cytoplasmic domain. *Journal of Cell Biology* **141**, 527-38.
- Sampath, R., Gallagher, P. J. and Pavalko, F. M.** (1998). Cytoskeletal interactions with the leukocyte integrin beta2 cytoplasmic tail. Activation-dependent regulation

- of associations with talin and alpha-actinin. *J Biol Chem* **273**, 33588-94.
- Sartingen, S., Rozdzinski, E., Muscholl-Silberhorn, A. and Marre, R.** (2000). Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells in vitro. *Infect Immun* **68**, 6044-7.
- Sastry, S. K. and Burridge, K.** (2000). Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. *Experimental Cell Research* **261**, 25-36.
- Schafer, D. A., Weed, S. A., Binns, D., Karginov, A. V., Parsons, J. T. and Cooper, J. A.** (2002). Dynamin2 and cortactin regulate actin assembly and filament organization. *Curr Biol* **12**, 1852-7.
- Schaller, M. D.** (2001). Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta* **1540**, 1-21.
- Schaller, M. D., Borgman, C. A., Cobb, B. S., Vines, R. R., Reynolds, A. B. and Parsons, J. T.** (1992). pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 5192-6.
- Schlaepfer, D. D., Hanks, S. K., Hunter, T. and van der Geer, P.** (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* **372**, 786-91.
- Schlaepfer, D. D., Hauck, C. R. and Sieg, D. J.** (1999). Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* **71**, 435-78.
- Schlaepfer, D. D. and Hunter, T.** (1998). Integrin signaling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends in Cell Biology* **8**, 151-157.
- Schlaepfer, D. D. and Mitra, S. K.** (2004). Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Current Opinion in Genetics and Development* **14**, 92-101.
- Schlessinger, J. and Lemmon, M. A.** (2003). SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci STKE* **2003**, RE12.
- Schmitter, T., Agerer, F., Peterson, L., Muenzner, P. and Hauck, C. R.** (2004). Granulocyte CEACAM3 is a phagocytic receptor of the innate immune system that mediates recognition and elimination of human-specific pathogens. *Journal of Experimental Medicine* **199**, 35-46.
- Schneewind, O., Fowler, A. and Faull, K. F.** (1995). Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus*. *Science* **268**, 103-6.

- Schuuring, E., Verhoeven, E., Mooi, W. J. and Michalides, R. J.** (1992). Identification and cloning of two overexpressed genes, U21B31/PRAD1 and EMS1, within the amplified chromosome 11q13 region in human carcinomas. *Oncogene* **7**, 355-61.
- Schwartz, M. A. and Ginsberg, M. H.** (2002). Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nature Cell Biology* **4**, E65-8.
- Schwarz-Linek, U., Hook, M. and Potts, J. R.** (2004). The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. *Mol Microbiol* **52**, 631-41.
- Schwarz-Linek, U., Werner, J. M., Pickford, A. R., Gurusiddappa, S., Kim, J. H., Pilka, E. S., Briggs, J. A., Gough, T. S., Hook, M., Campbell, I. D. et al.** (2003). Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem beta-zipper. *Nature* **423**, 177-81.
- Sechi, A. S. and Wehland, J.** (2000). The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J Cell Sci* **113** Pt 21, 3685-95.
- Sechler, J. L., Rao, H., Cumiskey, A. M., Vega-Colon, I., Smith, M. S., Murata, T. and Schwarzbauer, J. E.** (2001). A novel fibronectin binding site required for fibronectin fibril growth during matrix assembly. *J Cell Biol* **154**, 1081-8.
- Shimaoka, M., Takagi, J. and Springer, T. A.** (2002). Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **31**, 485-516.
- Sieg, D. J., Hauck, C. R., Ilic, D., Klingbeil, C. K., Schaefer, E., Damsky, C. H. and Schlaepfer, D. D.** (2000). FAK integrates growth factor and integrin signals to promote cell migration. *Nature Cell Biology* **2**, 249-256.
- Simons, K. and Toomre, D.** (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Molecular and Cellular Biology* **1**, 31-9.
- Sinha, B., Francois, P., Que, Y. A., Hussain, M., Heilmann, C., Moreillon, P., Lew, D., Krause, K. H., Peters, G. and Herrmann, M.** (2000). Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect Immun* **68**, 6871-8.
- 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**, 101-17.
- Skinner, M. A. and Wildeman, A. G.** (1999). beta(1) integrin binds the 16-kDa

- subunit of vacuolar H(+)-ATPase at a site important for human papillomavirus E5 and platelet-derived growth factor signaling. *J Biol Chem* **274**, 23119-27.
- Skoudy, A., Mounier, J., Aruffo, A., Ohayon, H., Gounon, P., Sansonetti, P. and Tran Van Nhieu, G.** (2000). CD44 binds to the *Shigella* IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells. *Cell Microbiol* **2**, 19-33.
- Steinberg, J. P., Clark, C. C. and Hackman, B. O.** (1996). Nosocomial and community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremias from 1980 to 1993: impact of intravascular devices and methicillin resistance. *Clin Infect Dis* **23**, 255-9.
- Tadokoro, S., Shattil, S. J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R. C., de Pereda, J. M., Ginsberg, M. H. and Calderwood, D. A.** (2003). Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* **302**, 103-6.
- Talay, S. R., Zock, A., Rohde, M., Molinari, G., Oggioni, M., Pozzi, G., Guzman, C. A. and Chhatwal, G. S.** (2000). Co-operative binding of human fibronectin to SfbI protein triggers streptococcal invasion into respiratory epithelial cells. *Cell Microbiol* **2**, 521-35.
- Tapley, P., Horwitz, A., Buck, C., Duggan, K. and Rohrschneider, L.** (1989). Integrins isolated from Rous sarcoma virus-transformed chicken embryo fibroblasts. *Oncogene* **4**, 325-33.
- Thomas, S. M. and Brugge, J.** (1997). Cellular functions regulated by src family kinases. *Annual Reviews in Cell and Developmental Biology* **13**, 513-609.
- Timpl, R.** (1996). Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 618-24.
- Tran Van Nhieu, G., Ben-Ze'ev, A. and Sansonetti, P. J.** (1997). Modulation of bacterial entry into epithelial cells by association between vinculin and the *Shigella* IpaA invasin. *The EMBO Journal* **16**, 2717-2729.
- Turner, C. E.** (2000). Paxillin interactions. *J Cell Sci* **113**, 4139-4140.
- Turner, C. E., Brown, M. C., Perrotta, J. A., Riedy, M. C., Nikolopoulos, S. N., McDonald, A. R., Bagrodia, S., Thomas, S. and Leventhal, P. S.** (1999). Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *Journal of Cell Biology* **145**, 851-63.
- Bliek, A. M.** (1999). Functional diversity in the dynamin family. *Trends Cell Biol* **9**, 96-102.
- Flier, A. and Sonnenberg, A.** (2001). Function and interactions of integrins. *Cell and*

Tissue Research **305**, 285-98.

Vesga, O., Groeschel, M. C., Otten, M. F., Brar, D. W., Vann, J. M. and Proctor, R. A. (1996). *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu. *J Infect Dis* **173**, 739-42.

Volberg, T., Romer, L., Zamir, E. and Geiger, B. (2001). pp60(c-src) and related tyrosine kinases: a role in the assembly and reorganization of matrix adhesions. *J Cell Sci* **114**, 2279-89.

Wichert, G., Haimovich, B., Feng, G. S. and Sheetz, M. P. (2003). Force-dependent integrin-cytoskeleton linkage formation requires downregulation of focal complex dynamics by Shp2. *Embo J* **22**, 5023-35.

Vuori, K. and Ruoslahti, E. (1995). Tyrosine phosphorylation of p130Cas and cortactin accompanies integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 22259-62.

Walker, H. A., Whitelock, J. M., Garl, P. J., Nemenoff, R. A., Stenmark, K. R. and Weiser-Evans, M. C. (2003). Perlecan Up-Regulation of FRNK Suppresses Smooth Muscle Cell Proliferation via Inhibition of FAK Signaling. *Mol Biol Cell* **14**, 1941-52.

Wang, J., Gray-Owen, S. D., Knorre, A., Meyer, T. F. and Dehio, C. (1998). Opa binding to cellular CD66 receptors mediates the transcellular traversal of *Neisseria gonorrhoeae* across polarized T84 epithelial cell monolayers. *Molecular Microbiology* **30**, 657-71.

Wann, E. R., Gurusiddappa, S. and Hook, M. (2000). The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *J Biol Chem* **275**, 13863-71.

Watarai, M., Funato, S. and Sasakawa, C. (1996). Interaction of Ipa proteins of *Shigella flexneri* with alpha5beta1 integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells. *J Exp Med* **183**, 991-9.

Weaver, A. M., Heuser, J. E., Karginov, A. V., Lee, W. L., Parsons, J. T. and Cooper, J. A. (2002). Interaction of cortactin and N-WASp with Arp2/3 complex. *Curr Biol* **12**, 1270-8.

Weed, S. A., Karginov, A. V., Schafer, D. A., Weaver, A. M., Kinley, A. W., Cooper, J. A. and Parsons, J. T. (2000). Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex [In

Process Citation]. *Journal of Cell Biology* **151**, 29-40.

Weed, S. A. and Parsons, J. T. (2001). Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene* **20**, 6418-34.

Weidow, C. L., Black, D. S., Bliska, J. B. and Bouton, A. H. (2000). CAS/Crk signalling mediates uptake of *Yersinia* into human epithelial cells. *Cell Microbiol* **2**, 549-60.

Wells, C. L., Moore, E. A., Hoag, J. A., Hirt, H., Dunny, G. M. and Erlandsen, S. L. (2000). Inducible expression of *Enterococcus faecalis* aggregation substance surface protein facilitates bacterial internalization by cultured enterocytes. *Infect Immun* **68**, 7190-4.

Wennerberg, K., Lohikangas, L., Gullberg, D., Pfaff, M., Johansson, S. and Fassler, R. (1996). Beta 1 integrin-dependent and -independent polymerization of fibronectin. *J Cell Biol* **132**, 227-38.

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**, 5238-43.

West, K. A., Zhang, H., Brown, M. C., Nikolopoulos, S. N., Riedy, M. C., Horwitz, A. F. and Turner, C. E. (2001). The LD4 motif of paxillin regulates cell spreading and motility through an interaction with paxillin kinase linker (PKL). *J Cell Biol* **154**, 161-76.

Wilkinson, B. J. and Holmes, K. M. (1979). *Staphylococcus aureus* cell surface: capsule as a barrier to bacteriophage adsorption. *Infect Immun* **23**, 549-52.

Williams, J. M., Chen, G.-C., Zhu, L. and Rest, R. F. (1998). Using the yeast two-hybrid system to identify human epithelial cell proteins that bind gonococcal Opa proteins: intracellular gonococci bind pyruvate kinase via their Opa proteins and require host pyruvate for growth. *Molecular Microbiology* **27**, 171-186.

Wood, C. K., Turner, C. E., Jackson, P. and Critchley, D. R. (1994). Characterisation of the paxillin-binding site and the C-terminal focal adhesion targeting sequence in vinculin. *J Cell Sci* **107** (Pt 2), 709-17.

Wu, C., Keivens, V. M., O'Toole, T. E., McDonald, J. A. and Ginsberg, M. H. (1995). Integrin activation and cytoskeletal interaction are essential for the assembly of a fibronectin matrix. *Cell* **83**, 715-24.

Xiong, J. P., Stehle, T., Goodman, S. L. and Arnaout, M. A. (2003). New in-

sights into the structural basis of integrin activation. *Blood* **102**, 1155-9.

Yamakita, Y., Totsukawa, G., Yamashiro, S., Fry, D., Zhang, X., Hanks, S. K. and Matsumura, F. (1999). Dissociation of FAK/p130(CAS)/c-Src Complex during Mitosis: Role of Mitosis-specific Serine Phosphorylation of FAK. *Journal of Cell Biology* **144**, 315-324.

Yan, B., Calderwood, D. A., Yaspan, B. and Ginsberg, M. H. (2001). Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **276**, 28164-70.

Yao, L., Bengualid, V., Lowy, F. D., Gibbons, J. J., Hatcher, V. B. and Berman, J. W. (1995). Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression. *Infect Immun* **63**, 1835-9.

Zaidel-Bar, R., Ballestrem, C., Kam, Z. and Geiger, B. (2003). Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci* **116**, 4605-13.

Zamir, E. and Geiger, B. (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* **114**, 3583-90.

Zamir, E., Katz, B. Z., Aota, S., Yamada, K. M., Geiger, B. and Kam, Z. (1999). Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* **112** (Pt 11), 1655-69.

Zamir, E., Katz, M., Posen, Y., Erez, N., Yamada, K. M., Katz, B. Z., Lin, S., Lin, D. C., Bershadsky, A., Kam, Z. et al. (2000). Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nature Cell Biology* **2**, 191-6.

11 Anhang

11.1 Abkürzungen

Abb	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AK	Antikörper
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Celsius
Cam	Chloramphenicol
CFU	colony forming unit
Cs	Kälberserum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Erm	Erythromycin
FA	fokale Adhäsion
FAK	fokale Adhäsionskinase
FBA	FITC-Biotin-Avidin
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszinoisothiocyanat
FK	fokaler Komplex
Fn	Fibronectin
FnBP	Fibronectin-Bindeprotein
FRNK	FAK-related non-kinase
GFP	green fluorescent protein
GST	Glutathion-S-Transferase
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IVK	in vitro Kinase Assay

Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MOI	multiplicity of infection
MSCRAMM	microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PTK	Phosphotyrosinkinase
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylphosphat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SYF	Src-, Yes-, Fyn-Kinasen
Tet	Tetracyclin
WCL	Ganzzell-Lysat (whole cell lysate)
z.B.	zum Beispiel

11.2 Publikationen

Agerer F., Michel A., Ohlsen K. und Hauck C.R. (2003). Integrin-mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src family protein-tyrosine kinases. *The Journal of Biological Chemistry* bf 278 (43), S. 42524-42531.

Agerer F., Waeckerle S. und Hauck C.R. (2004). Microscopic quantification of bacterial invasion by a novel antibody-independent staining method. *Journal of Microbiological Methods* bf 59, S. 23-32.

Schmitter T., Agerer F., Peterson L., Münzner P. und Hauck C.R. (2004). Granulocyte CEACAM3 is a phagocytic receptor of the innate immune system that mediates recognition and elimination of human-specific pathogens. *Journal of Experimental Medicine* bf 199, S. 35-46.

Agerer F., Michel A., Lux S., Rohde M., Ohlsen K. und Hauck C.R. (2005). Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalisation. Zur Veröffentlichung eingereicht und akzeptiert bei *Journal of Cell Science*

11.3 Tagungsbeiträge

Schmitter T., Agerer F., Blaß J. und Hauck C.R. (2001). *Neisseria gonorrhoeae* induces CEACAM-dependent signaling. 1. French-German Congress on Cell Biology, Strasbourg, Frankreich, November 2001.

Schmitter T., Agerer F., Peterson L., Wäckerle S., Münzner P. und Hauck C.R. (2003). Human granulocyte CEACAM3 is a phagocytic receptor that activates Rac and mediates elimination of human-specific pathogens. 14th Annual international CEA Symposium, Frauenchiemsee, Deutschland, August 2003.

Agerer F., Michel A., Ohlsen K. und Hauck C.R. (2004). Integrin-mediated Invasion of *Staphylococcus aureus* into Human Cells Requires Src Family Protein-tyrosine kinases. Jahrestagung der VAAM, Braunschweig, Deutschland, März 2004.

Agerer F., Michel A., Ohlsen K. und Hauck C.R. (2004). Integrin-mediated Invasion of *Staphylococcus aureus* into Human Cells Requires Src Family Protein-tyrosine kinases. International Symposium: Threat of Infection, Würzburg, Deutschland, Juli 2004.

11.4 Lebenslauf

NAME	Franziska Agerer
GEBURTSDATUM	23. Januar 1976
GEBURTSORT	Landshut
STAATSANGEHÖRIGKEIT	Deutsch
SCHULBILDUNG	
1982 – 1986	Grundschule Kumhausen (Landshut)
1986 – 1995	Hans-Leinberger-Gymnasium in Landshut / Bayern
1995	Allgemeine Hochschulreife
AKADEMISCHE AUSBILDUNG	
1995	Studium der Biologie, Universität Würzburg
4 / 2000	Diplomprüfung im Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Biochemie, Pflanzenphysiologie
5 / 2000 – 5 / 2001	Diplomarbeit am Institut für molekulare Infektions- biologie der Universität Würzburg unter der Betreu- ung von Herrn Prof. Dr. Hacker
9 / 2001 – 4 / 2005	Diplomarbeit: Vergleichende Genomanalyse patho- gener <i>Escherichia coli</i> Stämme mittels DNA- Makroarrays
	Promotion am Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg unter der Betreuung von Herrn Priv. Doz. Dr. C.R. Hauck
	Thema: Integrin-vermittelte Internalisierung von <i>Sta- phylococcus aureus</i> durch nicht professionell phagozy- tierende humane Zellen
/ 2005	Promotionsprüfung