
Induktion von Pro-Autophagie-Signalen durch einen extra- oder intrazellulären Alpha-Toxin Angriff

Dissertation
Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Gisela von Hoven
geboren am 11. September 1980 in Sigmaringen

Mainz, 10. Oktober 2012

Dekan: XXX

1. Berichterstatter: XXX

2. Berichterstatter: XXX

Tag der mündlichen Prüfung: 6. März 2013

für Helena

Inhaltsverzeichnis

KAPITEL 1.....	15
1.1 Autophagie	15
1.1.1 Einführung.....	15
1.1.2 Autophagie auf molekularer Ebene	18
1.2 Porenbildende Toxine	30
1.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> α -Toxin	32
1.2.2 Abwehrmechanismen und Reparatur der Plasmamembran in eukaryotischen Zellen nach Exposition mit porenbildenden Toxinen	34
1.2.3 Signaltransduktionswege	36
1.3 Autophagie von Bakterien	37
1.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	37
1.3.2 Manipulation der Autophagie durch Bakterien	38
1.4 Zielsetzung	39
KAPITEL 2 MATERIAL UND METHODEN	41
2.1 Material	41
2.1.1 Chemikalien und Materialien	41
2.1.2 Antikörper.....	45
2.1.3 Geräte	47
2.1.4 Software und Datenbanken.....	49
2.1.5 Lösungen und Puffer	50
2.2 Methoden.....	55
2.2.1 Zellkultur und Bakterienkultur	55
2.2.2 Plasmide und Transfektion	58
2.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> α -Toxin	60
2.2.4 Herstellung von F(ab) ₂ -Fragmenten	62
2.2.5 Behandlung von Zellen mit <i>Staphylococcus aureus</i> α -Toxin oder Infektion mit <i>Staphylococcus aureus</i>	63
2.2.6 Immunfluoreszenz	65
2.2.7 Elektronenmikroskopie.....	66
2.2.8 Mikroskopie.....	70
2.2.9 Lipid-Raft Präparation.....	72
2.2.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)	73
2.2.11 Western Blot (Towbin et al, 1979)	74
2.2.12 Immunpräzipitation mit Protein A und G – Agarose Beads.....	75

KAPITEL 3 RESULTATE	77
3.1 Aufnahme von <i>Staphylococcus aureus</i> in nicht-professionelle Phagozyten	77
3.2 Analyse der Lokalisation und Morphologie des bakterientragenden, intrazellulären Kompartiments	80
3.2.1 Galektin-3 – Marker für die Lyse der endosomalen Membran	80
3.2.2 Autophagie-assoziierte Proteine	82
3.2.3 Ubiquitinierung von α -Toxin oder α -Toxin-assoziierten Proteinen als Signal für p62	96
3.3 Darstellung von α-Toxin im Kontext mit seinem Produzenten <i>Staphylococcus aureus</i>...	98
3.4 <i>Staphylococcus aureus</i> α-Toxin	102
3.4.1 Ultrastrukturelle Analyse von Zellen nach Inkubation mit <i>Staphylococcus aureus</i> α -Toxin	102
3.4.2 α -Toxin induziert die Phosphorylierung von eIF2 α	104
3.4.3 α -Toxin induziert LC3-positive Vesikel	116
3.4.4 α -Toxin induziert die Rekrutierung von p62/SQSTM1	118
3.4.5 Ubiquitinierung von α -Toxin oder α -Toxin-assoziierten Proteinen als Signal für p62 ..	120
KAPITEL 4 DISKUSSION	127
4.1 Aufnahme, intrazelluläre Lokalisation und Induktion von Pro-Autophagie-Signalen durch <i>Staphylococcus aureus</i>	127
4.1.1 Aufnahme von <i>Staphylococcus aureus</i> in nicht-professionelle Phagozyten.....	127
4.1.2 Intrazelluläre <i>Staphylococcus aureus</i>	128
4.1.3 Induktion von Pro-Autophagie-Signalen durch <i>Staphylococcus aureus</i>	133
4.1.4 Analyse der Lokalisation des sekretierten α -Toxins im Kontext mit intrazellulären <i>Staphylococcus aureus</i>	142
4.1.5 Modell für die intrazelluläre Lebensweise der untersuchten <i>Staphylococcus aureus</i> -Varianten	144
4.2 <i>Staphylococcus aureus</i> α-Toxin	145
4.2.1 Ultrastrukturelle Analyse der Zellstruktur nach extrazellulärem α -Toxin-Angriff.....	145
4.2.2 Induktion von Pro-Autophagie-Signalen durch Inkubation mit α -Toxin.....	146
4.3 Zusammenspiel aus Hunger-assoziiertter Autophagie und selektiver Autophagie.....	153
ZUSAMMENFASSUNG	157
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	159
LITERATURVERZEICHNIS	161
ANHANG A: BISHERIGE PUBLIKATIONEN	179
ANHANG B: BILDRECHTE	181

Glossar und Abkürzungsverzeichnis

3-MA: 3-methyladenine; Inhibitor der Klasse I und III PtdIn3K und damit der Autophagie

4E-BP: eIF2 α 4E-binding protein; nicht phosphoryliertes 4E-BP bindet eIF2 α 4E und hemmt damit die Bindung an mRNA und reduziert die Translationsaktivität; 4E-BP wird durch mTORC1 phosphoryliert und setzt eIF2 α 4E frei

A

ActA: actin-assembly-inducing-protein; Oberflächenmolekül von *Listeria monocytogenes*

ADAM10: a disintegrin and metalloprotease 10; spaltet Membranproteine an der Zelloberfläche; möglicher spezifischer Rezeptor für α -Toxin

agr: accessory gene regulator; beeinflusst die Expression vieler Virulenzgene in *Staphylococcus aureus*

AK: Alzheimer Krankheit *lat. Morbus Alzheimer*; altersabhängige, neurodegenerative Erkrankung

Ambra-1: activating molecule in Bcl-1-regulated autophagy; mögl. Bestandteil des PtdIn3K; reguliert Generierung von PIP₃

AMP: Adenosinmonophosphat

AMPK: Adenosinmonophosphat-activated protein kinase; wird durch LKB1 oder CaMKK β aktiviert; AMPK aktiviert TSC 1/2

Arp2/3-Komplex: actin related protein complex; Regulation des Aktinzytoskeletts

Asp: Asparaginsäure; Aminosäure

ATF3: activating transcription factor 3; eIF2 α -abhängiger Transkriptionsfaktor induziert die Expression von CHOP und GADD34

ATF4: activating transcription factor 4; eIF2 α -abhängiger Transkriptionsfaktor induziert die Expression von ATF3

ATF6: activating transcription factor 6; Teil der UPR; ER-Stress regulierter Transkriptionsfaktor für ER-Chaperone

ATG: AuTophagy-related; ATG Gene kodieren für Atg-Proteine, die für die Autophagie wichtig sind

Atg: AuTophagy-related; Atg-Proteine sind Proteine, die für die Bildung von Autophagosomen wichtig sind

Atg1: Atg-Protein 1; Pendant zu ULK1 in Säugetieren; Serin/Threonin-Proteinkinase, notwendig für die Rekrutierung von anderen Atg-Proteinen an die PAS

Atg1/ULK1-Komplex: 3MDa großer Komplex aus ULK1/ULK2, mAtg13, FIP200 und Atg101; wichtig für die Autophagieinduktion

Atg3: Atg-Protein 3; fungiert als E2 (verbindendes Enzym)-ähnliches Enzym bei der LC3-PE-Konjugation nach der Aktivierung des C-terminalen Glycinrests durch Atg7

Atg4: Atg-Protein 4; Cysteinprotease, spaltet C-Terminus von LC3 ab und legt damit den C-terminalen Glycinrest frei, der durch Atg7 (E1-ähnliches Enzym) und Atg3 (E2-ähnliches Enzym) an PE gebunden wird

Atg5: Atg- Protein 5; Bestandteil des multimerischen Atg16L-Komplexes

Atg7: Atg-Protein 7; fungiert als E1 (aktivierendes Enzym)-ähnliches Enzym bei der Atg12-Atg5-Bindung, sowie bei der LC3-PE-Konjugation

Atg10: Atg-Protein 10; fungiert als E2 (verbindendes Enzym)-ähnliches Enzym bei der Atg12-Atg5-Bindung

Atg101: Atg-Protein 101; Gerüstprotein im Atg1/ULK1-Komplex

Atg12: Atg-Protein 12; Bestandteil des Ubl-Protein-Systems; Ubl-Protein; bindet Atg 5 kovalent über C-terminalen Glycinrest

Atg14L/Barkor: Atg 14 like protein/Bcl1-associated autophagy related key regulator; Pendant zu Atg14 in der Hefe; Bestandteil des PtdIn3K Klasse III Komplex

Atg16L: Atg 16 like protein; Atg16-ähnliches Protein; Bestandteil des multimerischen Atg16L-Komplexes; bindet Atg12-Atg5

Atg16L-Komplex: Atg16-ähnlicher Protein-Komplex; großer multimerischer Komplex aus oligomerisierten Atg16L-Atg12-Atg5-Verbindungen; beteiligt an der LC3-PE-Konjugation

ATP: Adenosintriphosphat

B

Bcl1: b-cell lymphoma/leukemia 1; Beclin 1; Pendant zu Atg6 in der Hefe; Bestandteil des PtdIn3K Klasse III Komplex

Bif-1: Bax-interacting factor 1; enthält N-BAR Domäne und kann Membranen binden und krümmen

C

CA-MRSA: Community-associated Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*

CaMKK β : calcium-activated calmodulin-dependent kinase kinase- β ; Teil der UPR; induziert über die Aktivierung von AMPK Autophagie in Folge einer erhöhten Kalziumkonzentration im Zytosol

cAMP: cyclic adenosinmonophosphat; zyklisches Adenosinmonophosphat; second messenger bei der zellulären Signaltransduktion; Aktivierung von PKA

CDC: cholesterol-dependent cytolysins; eine Familie der β -Poren-bildenden Toxine; Porendurchmesser bis zu 50nm möglich

CFT1: Zelllinie aus humanen Bronchienepithelzellen eines Patienten mit Zystischer Fibrose

CFU: colony forming units; Kolonie-bildende Einheit; Maß bei der Quantifizierung von Mikroorganismen

CHO: chinese hamster ovary; Zelllinie aus den Eierstöcken des chinesischen Hamsters

CHOP: CCAT/enhancer-binding protein homologous protein auch GADD153 growth arrest and DNA-damage inducible protein 153; Transkriptionsfaktor für die Expression von GADD34

CMA: chaperone-mediated autophagy; selektive Form der Autophagie, die spezifische, zytosolische Proteine einzeln durch die lysosomale Membran transportiert

COS7: african green monkey ceropithecus fibroblast-like kidney cells; Fibroblastenzelllinie aus der Niere der grünen Meerkatze

CReP: constitutive repressor of eIF2 α phosphorylation auch PP1R15B; protein phosphatase 1 regulatory subunit 15B; Untereinheit der Holophosphatase PP1; wird konstitutiv und unabhängig vom Phosphorylierungsstatus von eIF2 α exprimiert.

CRM1: chromosomal maintenance/exportin 1; vermittelt den Export von Cargoproteinen über den NPC und kann durch Leptomycin B selektiv inhibiert werden

D

DAMP: danger associated molecular pattern

Deptor: DEP-domain containing and mTOR interacting protein; negativ-regulierende Komponente des mTORC1

Dectin-1: auch CLEC7A, ist der Haupt-Beta-Glukanrezeptor; Typ II-Transmembran-C-Typ-Lectin; Teil der Immunantwort gegen Pilze

DFCP1: double FYVE-containing protein 1; bindet an PIP₃; Markerprotein für das Omegasom

DsRed: rot fluoreszierendes Protein drFP583 aus *Discosoma*

E

EA hy 926: primäre Endothelzellen aus der humanen Nabelschnurvene

EGF: epidermal growth factor; Wachstumsfaktor

EGFR: epidermal growth factor-receptor; Rezeptor für Wachstumsfaktoren; Aktivierung und Dimerisierung erfolgt durch Bindung der EGF

eIF2 α : eukaryotic initiation factor 2 α ; Phosphorylierung von eIF2 α durch HRI, PKR, PERK oder GCN2 führt zu einem globalen Translationsstopp und Autophagieinduktion

Ena/VASP: enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein; involviert in Zellmotilität und Actinpolymerisation

ER: Endoplasmatisches Retikulum

ERK 1/2: MAPK; aktiviert Autophagie

ESCRT-Komplex: endosomal sorting complex required for transport; vermittelt die Erkennung und Sortierung von ubiquitinierten Proteinen in die intraluminalen Vesikel von MVBs

F

FIP200/RB1CC1: FAK-family interacting protein of 200kDa/retinoblastoma 1-inducible coiled-coil 1; Gerüstprotein des Atg1/ULK1-Komplexes

FnBPA: Fibronectin-bindendes Protein A; Adhäsion auf der Oberfläche von *Staphylococcus aureus*

FnBPB: Fibronectin-bindendes Protein B; Adhäsion auf der Oberfläche von *Staphylococcus aureus*

G

GABARAB: γ -aminobutyrate receptor associated protein, Pendant zu Atg8; Atg-Proteinfamilie

GADD34: Growth arrest and DNA-damage inducible protein 34; auch PP1R15A protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A; Untereinheit der Holophosphatase PP1; wird in Folge der Phosphorylierung von eIF2 α exprimiert und fördert die Dephosphorylierung von eIF2 α ; Rückkopplungsmechanismus

GAP: GTPase activating protein

GAS: Group A Streptococcus; z.B. *Streptococcus pyogenes*

GCN2: general control, non-derepressible 2; EIF2 α -Kinase 4; eine der insgesamt vier eIF2 α -Kinasen; wird durch Aminosäurenmangel (unbeladene t-RNA) aktiviert; löst globalen translationalen Stillstand aus und induziert Autophagie

GDP: Guanosindiphosphat

GFP: green fluorescent protein; grün fluoreszierendes Protein aus *Aequorea victoria*

Glu: Glutaminsäure; Aminosäure

GTP: Guanosintriphosphat

H

HaCaT: human non-virally transformed keratinocytes; humane Keratinozytenzelllinie

HDAC6: histone deacetylase 6, Autophagieadapterprotein

HEK-293: human embryonic kidney 293; Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen

HeLa: immortalisierte Zelllinie aus Gebärmutterhalskrebs

HlyA: *E. coli* hämolysin A; *E.coli* Toxin

HRI: heme regulated inhibitor; EIF2 α -Kinase 1; eine der insgesamt vier eIF2 α -Kinasen; reagiert auf Häm-Mangel

HRP: horseradish peroxidase; Meerrettich-Peroxidase; katalysiert in Anwesenheit eines Oxidationsmittels die Oxidation von Luminol

Huh7: hepato cellular carcinoma; Zelllinie aus einem Leberkarzinom

hVps34: mammalian vacuolar protein sorting 34; Klasse III Phosphatidylinositol 3-OH Kinase, die PtdIn (3)P an der PAS herstellt

I

IL 1 β : Interleukin 1 beta; Entzündungsmediator; entsteht durch die Spaltung des inaktiven IL1 beta-Vorläuferproteins durch die aktive Caspase 1; die Sekretion erfolgt unabhängig vom ER-Golgi-Sekretionsweg durch unkonventionelle Autosekretion

IL8: Interleukin 8; auch CXCL8; CXC-Motiv-Chemokin 8; Entzündungsmediator; chemotaktische Rekrutierung von Leukozyten

IL 18: Interleukin 18; wird wie IL-1 beta als Vorläuferpeptid synthetisiert und durch die aktive Caspase 1 in seine bioaktive Form gespalten; die Sekretion erfolgt unabhängig vom ER-Golgi-Sekretionsweg durch unkonventionelle Autosekretion

IRGM: immunity related GTPase family M protein

IRE1: inositol requiring kinase 1; Teil der UPR, Serin/Threonin-Kinase

IRS1: insulin receptor substrate 1; Teil der Insulin-Signaltransduktion; Aktivierung von PtdIn3K Klasse I Signalweg und MAPK Signalweg

IRS2: insulin receptor substrate 2; Teil der Insulin-Signaltransduktion; Aktivierung von PtdIn3K Klasse I Signalweg und MAPK-Signalweg

ISR: integrated stress response; Stress-induzierter, eIF2 α -abhängiger Signalweg

J

JNK: c-Jun N-terminal kinase; phosphoryliert Bcl2 und führt so zur Dissoziation des inhibitorischen Bcl1/Bcl2-Komplexes und schließlich zur Autophagieinduktion

K

KIR-Motiv: KEAP1 interaction region; Motiv, über welches u.a. p62 mit dem Stresssensorprotein Keap1 interagieren kann

Klasse C Vps-Proteinkomplex: beteiligt an mehreren Schritten des Vakuolentransports; homo- und heterotypische Fusion von Endosomen und Lysosomen

L

LAMP-1: lysosome associated-membrane protein 1; Lysosom-assoziiertes Glykoprotein

LC3-I: Leichte Kette 3-I; zytosolische Form von LC3; wird mit PE konjugiert und bildet LC3-II

LC3-II: Leichte Kette 3-II; lipidierte Form von LC3; entsteht durch Konjugation von LC3-I und PE

LDL: low-density lipoprotein; Lipoproteine geringerer Dichte

LIR-Motiv: LC3 interaction region; Motiv, über welches u.a. p62 mit LC3 interagieren kann

LKB1: liver kinase B 1; aktiviert und phosphoryliert AMPK in Folge eines sinkenden zellulären ATP-Levels

LLO: Listeriolysin O; Toxin von *Listeria monocytogenes*

Lys: Lysin; Aminosäure

M

MAP1-LC3: microtubule associated protein1-light chain 3; Pendant zu Atg8 in der Hefe; Bestandteil des Ubl-Protein-Systems; Ubl-Protein; Autophagiemarker; dekoriert die Innen- und Außenseite der Autophagosomen

MAPK: mitogen activated Kinase; über den MAPK-Signalweg werden z.B. Änderungen der Genexpression reguliert

mAtg9: mammalian atg-protein 9; Pendant zu Atg9 in der Hefe; Transmembranprotein im Trans-Golgi-Netzwerk und Endosomen; Lipidrekrutierung für die Expansion der Phagophore

mAtg13: mammalian atg-protein 13; Pendant zu Atg13 in der Hefe; wichtiger Bestandteil des Atg1/ULK1-Komplexes; notwendig für Atg1/ULK1-Kinaseaktivität

MEF: mouse embryonic fibroblast; Zelllinie aus Fibroblasten, die aus Mäuseembryonen isoliert wurden

MEK 1/2: Teil der Raf-MAPK-Kaskade

MHC: major histocompatibility complex; Haupthistokompatibilitätskomplex; MHC-Moleküle vermitteln Wechselwirkungen zwischen Leukozyten und Somazellen

MRSA: Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*

MVBs: multi vesicular bodies; entstehen durch die Invagination der endosomalen Membran; Ubiquitinierte Proteine werden in MVBs sortiert und entweder in Recyclingvesikel abgegeben oder durch die Fusion mit Lysosomen abgebaut; MVBs sind häufige Fusionspartner von Autophagosomen

mLST8: mammalian lethal with sec-13; oder auch GβL; G-Protein β-subunit-like protein; Bestandteil des mTORC1-Komplexes

MRSA: Methicillin-resistente Staphylokokkus aureus

mTOR: mammalian target of rapamycin; Pendant zu TOR in der Hefe; Negativregulator der Autophagie; Proteinkinase

mTORC1: mammalian target of rapamycin complex 1; Pendant zur TORC1 in der Hefe; Rapamycin-empfindlicher Proteinkomplex aus mTOR, Raptor, mLST8, PRAS40 und Deptor

MyD88: myeloid differentiation factor 88; Adapterprotein für TLRs; Signalweiterleitung und Autophagieinduktion

N

NBR1: neighbor of BCRN1 gene 1; Autophagieadapterprotein

NDP 52: nuclear dot protein 52 kDa, Autophagieadapterprotein

NES: nuclear export signal; ermöglicht den Export eines Proteins über den NPC aus dem Zellkern ins Zytoplasma

NFκB: nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells; spezifischer Transkriptionsfaktor; Regulation der Immunantwort, Zellproliferation und Zelltod

NLR: NOD-like receptor; Nucleotide Oligomerization Domain receptor; zytosolische Proteine, die als PRR dienen und mikrobielle Produkte im Zytoplasma der Zelle erkennen können

NLS: nuclear localization signal; ermöglicht den Import eines Proteins über den NPC aus dem Zytoplasma in den Zellkern

NPC: nuclear pore complex; Kernporen sind Proteinkomplexe in der Hülle des Kerns und erlauben den Transport von bestimmten Molekülen in den Kern und aus dem Kern

O

OD: Optische Dichte

ODORA: Zelllinie aus Vorläuferzellen von Riechsinneszellen

P

p27^{kib1}: Zyklin-abhängiger Kinasen-Inhibitor

p38 MAPK: p38-mitogen-aktivatied protein kinase; Stress-regulierte MAPK

p62: SQSTM1; sequestosome 1; Autophagieadapterprotein

p70S6K: p70 ribosomal protein S6 kinase; Serin/Threonin-Kinase; phosphoryliert mehrere Reste des Ribosomenproteins S6 (Bestandteil der S40 Untereinheit und führt zu einer erhöhten Proteinsynthese und Zellproliferation)

p150: phosphoinositide 3-kinase adaptor protein 150kDa; Bestandteil des PtdIn3K Klasse III Komplex

PAMP: pathogen associated molecular pattern; Pathogen assoziierte Moleküle z.B Lipoteichonsäure, dsRNA, unmethyliertes CpG, etc. werden durch TLRs oder andere PRRs erkannt

PARP-1: poly(ADP-ribose)polymerase-1; beteiligt an ssDNA-Reparaturmechanismen; kann LKB-1-AMPK-Signalweg aktivieren

PAS: phagophore assembly site/pre autophagosomal structure; Ort oder Kompartiment in einer Zelle, an der sich Autophagosomen bilden

PB-1: Protein-Protein-Interaktions-Domäne; ermöglicht u. a. Interaktionen mit PKC ζ , PKC γ , MEKK3, MEK5, NBR1 und die Homooligomerisierung von u.a. p62

PDK1: phosphoinositide-dependent protein kinase 1; Aktivator von PKB/Akt; wird durch PIP $_3$ an die Plasmamembran rekrutiert

PE: Phosphatidylethanolamin; wird mit LC3-I (zytosolische Form von LC3) konjugiert und bildet LC3-II (lipidierte Form von LC3)

PERK: PKR-like ER Kinase; EIF2 α -Kinase 3; Teil der UPR, phosphoryliert eIF2 α in Folge von ER-Stress

PFT: pore forming toxins; Poren-bildende Toxine

PIP $_3$: Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphat; PIP $_3$ wird durch PtdIn3K Klasse I und PtdIn3K Klasse III erzeugt

PK: Parkinson-Krankheit; *lat. Morbus Parkinson*; altersabhängige, neurodegenerative Erkrankung

PKA: protein kinase A; Proteinkinase A

PKB/Akt: protein kinase B; Serin/Threonin-Kinase; Negativregulator für die Autophagieinduktion

PKC δ : protein kinase C δ ; beteiligt an der Autophagieinduktion in Folge von Sauerstoffmangel

PKR: dsRNA dependent protein kinase; EIF2 α -Kinase 2; eine der insgesamt vier eIF2 α -Kinasen, wird durch dsRNA aktiviert

PP2A: protein phosphatase type 2A; Proteinphosphatase Typ 2A; Serin/Threonin-Proteinphosphatase

PRAS40: proline-rich Akt substrate of 40kDa; negativ-regulierende Komponente des mTORC1

PRR: pattern recognition receptor; erfassen PAMPS, die mit mikrobiellen Pathogenen oder Zellstress assoziiert sind

PtdIn3K Klasse I Komplex: Klasse I Phosphatidylinositol 3-OH Kinase Komplex; Insulin und Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren regulieren mTOR über den PtdIn3K Klasse I Komplex

PtdIn3K Klasse III Komplex: Klasse III Phosphatidylinositol 3-OH Kinase Komplex; wichtig für die Autophagieinduktion, besteht aus hVps34, Bcl1, p150 und Barkor oder UVRAG

R

RBS: ribosomale Bindungsstelle

Rab5: kleine GTPase; lokalisiert auf frühen Endosomen oder auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran

raf-1/MAP-Kinasen: rat fibrosarcoma 1/mitogen-activated protein kinase; raf wird durch RasG in Folge der Bindung eines Mitogen an den Membranrezeptor phosphoryliert und aktiviert als MAPKKK den MAPK-Signalweg und damit die Erk 1/2 vermittelt Autophagieinduktion; Aminosäuren inhibieren die raf-Kinase

Rag-Proteine: Familie aus vier Ras-ähnlichen kleinen GTPasen; binden Raptor und aktivieren mTORC1 in Gegenwart von Aminosäuren; bewirken Translozierung von mTORC1 zu Rheb

Raptor: regulatory associated protein of mTOR; beeinflusst Kinaseaktivität von mTORC1 durch die Regulation der Rekrutierung von mTORC1 Komponenten und Substraten

Ras: rat sarcoma; Protoonkogen; das für ein kleines (monomeres) G-Protein kodiert; GTP-gebundenes Ras (RasG) kann mit Signalproteinen (Effektoren) interagieren, Signalweiterleitung

Rheb: Ras homolog enriched in brain; kleines GTP-bindendes Protein, in GTP-gebundener Form mTORC1-Aktivator

RLRs: RIG-I-like receptors; PRR erkennt doppelsträngige, virale RNA

ROS: reactive oxygen species; chemisch reaktive Sauerstoffverbindungen

RTK: Rezeptortyrosinkinase; autophosphoryliert bei Bindung an Substrat

Rubicon: RUN domain an cysteine rich domain containing, Beclin 1 interacting; bildet Komplex mit UVRAG-Bcl1-hVps34-p150 und wirkt negativregulierend auf die Reifung der Autophagosomen

S

S6K: ribosomal protein S6 Kinase; Serin/Threonin-Kinase, phosphoryliert mehrere Reste des Ribosomenproteins S6 (Bestandteil der S40 Untereinheit) und führt zu einer erhöhten Proteinsynthese und Zellproliferation

SCV: small colony forming variant; alternativer Phänotyp von *Staphylococcus aureus*; bildet Kolonien mit geringerer Pigmentierung, Wachstum und Hämolyseaktivität sowie veränderter Resistenz gegenüber Antibiotika

SDS-PAGE: Polyacrylamidgelelektrophorese in Anwesenheit von SDS (Natriumdodecylsulfat)

SER: *Shigella* entry region; homolog zu SPI-1; codiert u. a. für das TTSS

SLO: Streptolysin O; Streptokokken Toxin; gehört zu den CDCs

SLR: sequestosome (p62)-like receptor; PPR

SPI-1: *Salmonella* pathogenicity island 1; Kodiert u.a für Strukturproteine und Regulatoren für das TTSS sowie für einige Effektorproteine

T

TAP42: Two A-associated protein 42 kDa; die Phosphorylierung von TAP42 aktiviert Typ2A Protein Phosphatase PP2A

TLR: Toll-like receptor; Rezeptoren, die PAMPs erkennen können und Autophagie induzieren

TLR 2: Toll-like receptor, erkennt bakterielle Lipoproteine

TLR 7: Toll-like receptor 7; erkennt ssRNA

TNFR1: TNF (tumor necrosis factor) receptor 1; auch CD120a; Rezeptor für TNF

TSC1/2 Komplex: tuberous sclerosis complex 1/2; stabiles Heterodimer aus TSC1 (hamartin) und TSC2 (tuberin); Phosphorylierung durch PKB/Akt und Erk1/2 führt zur Dissoziation des Dimers und damit zur Inhibierung; AMPK aktiviert TSC 1/2 durch Phosphorylierung von TSC2; TSC 1/2 fungiert als GTPase-aktivierendes Protein für Rheb

TSS-Toxin 1: toxic shock syndrom-Toxin 1; Pathogenitätsfaktor von *Staphylococcus aureus*; kann das Toxische Schock-Syndrom auslösen

TTSS: type III secretion system; bakterielles Sekretionssystem mit Nadel-ähnlicher Struktur, die es den Bakterien erlaubt Effektorproteine in eukaryotische Zellen zu injizieren

U

UBA-Domäne: ubiquitin-associated-domane; Bindestelle für Ubiquitinketten z.B. bei p62

Ubl: ubiquitin-like; Ubiquitin-ähnlich

ULK1: uncoordinated-51-like kinase 1; Pendant zu Atg1 in der Hefe; Serin/Threonin-Proteinkinase; notwendig für die Rekrutierung von anderen Atg-Proteinen an die PAS

ULK2: uncoordinated-51-like kinase 2; Pendant zu Atg1 in der Hefe; Serin/Threonin-Proteinkinase; notwendig für die Rekrutierung von anderen Atg-Proteinen an die PAS

UPR: unfolded protein response; konservierte zelluläre Stressreaktion verursacht durch die Akkumulation von ungefalteten oder missgefalteten Proteinen im ER

UVRAG: ultraviolet irradiation resistant associated gene; mögl. Bestandteil des PtdIn3K Klasse III Komplex; reguliert Autophagie auf verschiedene Weise

V

VCC: *Vibrio cholera* cytolysin; *Vibrio cholerae* Toxin

VMP1: vacuole membrane protein; Transmembranprotein im ER; interagiert mit Beclin 1

W

WIPI: WD-repeat protein interacting with phosphoinositides; bindet PIP₃ und fördert vermutlich die Bindung der Ubl-Proteine

Z

ZZ-Typ Zinkfinger Domäne: Zinkfingerdomänen, die zwei Zinkionen binden können z.B. in Transkriptionsfaktoren oder E3 Ubiquitin Ligasen

α -PFT: α -pore forming toxins; α -Porenbildende Toxine; durchspannen die Membran mit α -helikalen Strukturen

β -PFT: β -pore forming toxins; β -Porenbildende Toxine; durchspannen die Membran mit β -Faltblatt-Strukturen

Kapitel 1

1.1 Autophagie

1.1.1 Einführung

1963 wurde der Begriff Autophagie erstmals auf dem CIBA Foundation Symposium on Lysosomes in London vorgestellt (Klionsky, 2007). Autophagie setzt sich aus den Worten auto (altgriechisch *autos* = selbst) und phagie (altgriechisch *phagein* = essen) zusammen und beschreibt einen in eukaryotischen Zellen ubiquitären Prozess, der im Abbau von Zytoplasma, als Reaktion auf Stressbedingungen, resultiert. Autophagie erlaubt der Zelle, sich an wechselnde Umwelt- oder Entwicklungsbedingungen anzupassen (Klionsky, 2007). Die Aufrechterhaltung der Balance zwischen Synthese und Abbau ist lebenswichtig und essentiell für die Funktionstüchtigkeit und die zelluläre Homöostase. Intrazellulärer Proteinabbau ist nötig um diese Balance aufrechtzuerhalten und wird in fast allen Zelltypen von zwei Hauptsystemen bewerkstelligt – dem Ubiquitin-Proteasom-System und dem Autophagie-Lysosom-System. Der Proteinabbau fungiert als Recyclingsystem und übernimmt das Aufspalten von Proteinen, die nicht mehr gebraucht werden, in Aminosäuren, die wiederum für die Synthese neuer Proteine zur Verfügung gestellt werden können (Ciechanover, 2006). Der Abbau von Proteinen dient der Qualitätskontrolle und stellt sicher, dass beschädigte oder fehlerhaft synthetisierte Proteine aus den Zellen entfernt werden (Goldberg, 2003). Eine wichtige Rolle nimmt der Abbau von Proteinen auch als zellulärer Abwehrmechanismus ein, indem er zur proteolytischen Aufspaltung einzelner Bestandteile eingedrungener Pathogene beiträgt (Deretic, 2009). Die zelluläre Homöostase kann durch den Abbau von Proteinen gewährleistet werden, indem der kontinuierliche Abbau der meisten intrazellulären Proteine den Zeitraum begrenzt, in dem ein Protein den oftmals rauen und möglicherweise schädigenden Umständen in der Zelle ausgesetzt ist. Auf diese Weise bietet der Proteinabbau die Möglichkeit, eventuellen Schädigungen oder gar der Dysfunktion von Proteinen vorzubeugen (Goldberg, 2003). Durch das schnelle Modulieren der Abbauraten einzelner Proteine kann eine Zelle die Komponenten ihres Proteoms (die Gesamtheit aller Proteine in der Zelle), z.B. als Reaktion auf Stress oder sich ändernde extrazelluläre Bedingungen, individuell anpassen (Deretic, 2009). Autophagie bewerkstelligt eine Vielzahl dieser zellulären Vorgänge. Konstitutives Recycling von Proteinen und Zellorganellen unter Normalbedingungen, Generierung von Aminosäuren, freier Fettsäuren und Zuckern unter ernährungsbedingtem Stress oder Hunger, das Umformen von Geweben während der Entwicklung und der Embryogenese, Antigenpräsentation und die Zerstörung von Pathogenen als Sensor für das angeborene Immunsystem, sogar das Entfernen von veränderten oder beschädigten zellulären Bestandteilen sowie der programmierte Zelltod (Typ II) und die Beseitigung von apoptotischen Körpern fallen in das Ressort der Autophagie (He & Klionsky, 2009; Mizushima et al, 2008). Erst seit Kurzem wird der Autophagie eine weitere wichtige Funktion zugeschrieben. Autophagie scheint eine wichtige Rolle bei der Proteinsekretion und dem Transport von integralen Membranproteinen an die Plasmamembran zu spielen (Deretic et al, 2012).

Autophagie umfasst drei wichtige intrazelluläre Zellfunktionen bei Eukaryoten: Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA chaperone-mediated autophagy), Mikroautophagie und Makroautophagie; sie führen letztlich alle zum lysosomalen Abbau ihrer Fracht, sind aber mechanistisch sehr unterschiedlich (Klionsky, 2005; Massey et al, 2006). Chaperon-vermittelte Autophagie ist eine einzigartig selektive Form der Autophagie, die spezifische zytosolische Proteine einzeln durch die lysosomale Membran transportiert. Anders als andere Formen der Autophagie, die Teile des Zytoplasms in einer relativ großen Menge verschlingen, ist die CMA extrem selektiv für einen Teil löslicher, zytosolischer Proteine. Größere Bestandteile oder gar ganze Organellen können durch CMA nicht abgebaut werden (Orenstein & Cuervo, 2010). Mikroautophagie verschlingt Bestandteile aus dem Zytoplasma durch die direkte Invagination der lysosomalen Membran; darauf folgt die Bildung intralysosomaler Vesikel. Diese schnüren sich dann nach Innen ab und werden anschließend samt ihrer Fracht durch die lysosomalen Hydrolasen abgebaut (Ahlberg & Glaumann, 1985). Makroautophagie erfordert die Ausbildung einer Doppelmembranstruktur, der sogenannten Phagophore. Die Phagophoren können Teile des Zytoplasmas, z.B. auch ganze Organellen abteilen und sich anschließend zu doppelmembranumgebenen Vesikeln schließen. Diese Doppelmembranvesikel werden Autophagosomen genannt. Die vollausgebildeten Autophagosomen reifen, indem sie mit einem Endosom und/oder einem Lysosom (Autolysosombildung) verschmelzen. Der von der inneren Membran umgebene Vesikel wird in das Lumen abgegeben. Dieser Schritt bringt den Vesikel samt seiner Fracht mit den lysosomalen Hydrolasen in Kontakt und ermöglicht den Abbau. Die daraus entstehenden Makromoleküle werden durch Membranpermeasen wieder zurück ins Zytoplasma transportiert und der Proteinsynthese wieder zur Verfügung gestellt (Yang & Klionsky, 2010). Das basale Niveau der Autophagie spielt eine wichtige Rolle, um die Homöostase der Zelle aufrechtzuerhalten. Ubiquitinierte Proteinaggregate und beschädigte oder überflüssige Organellen können selektiv und zielgerichtet durch Autophagie abgebaut werden. Um die Selektivität dieser Vorgänge zu beschreiben, wurden verschiedene Begriffe geprägt (Klionsky et al, 2007): Mitophagie nennt sich der selektive Abbau von Mitochondrien (Kim et al, 2007; Kundu et al, 2008), Ribophagie der selektive Abbau von Ribosomen (Kraft et al, 2008), Pexophagie bedeutet selektiver Abbau von Peroxisomen (Dunn et al, 2005), Retikulophagie beschreibt den selektiven Abbau des Endoplasmatischen Retikulums (Bernales et al, 2006) und Xenophagie wird die spezifische Beseitigung von intrazellulären Bakterien, Pilzen, Viren oder Parasiten durch Autophagie-ähnliche Prozesse genannt (Levine, 2005).

Mit fortschreitendem Alter verringert sich die Aktivität sowohl der CMA als auch der Makroautophagie. Angesichts der Vielzahl von physiologischen Funktionen, die der Autophagie zugeordnet werden, lässt sich leicht schlussfolgern, dass der Rückgang der Autophagieaktivität Einfluss auf die normalen Zellfunktionen nimmt und zu diversen Aspekten des alternden Phänotypus beiträgt. Ein häufiges Merkmal aller alternden Zellen ist die Akkumulation von beschädigten Proteinen und Organellen. Diese Anhäufungen von veränderten Bestandteilen sind besonders schädlich für Zellen, die sich nach ihrer Differenzierung nicht mehr teilen, z.B. Nervenzellen (Neuronen), Hepatozyten (Leberzellen) oder Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) (Cuervo, 2008; Mizushima et al, 2008). Im Gegenzug scheint eine eingeschränkte Kalorienaufnahme (die einzige bekannte Interventionsmöglichkeit, die das Altern verlangsamen kann) die Autophagieinduktion, wahrscheinlich auf Grund des geringeren Insulinspiegels, zu verbessern; denn Insulin wirkt als Autophagieinhibitor (Mizushima et al, 2008).

Zu den altersbedingten Störungen, die mit den Prozessen der Autophagie im Zusammenhang stehen, gehört eine große Gruppe von Krankheiten, die eine höhere Prävalenz in der älteren

Bevölkerung haben und bei denen Altern als Risikofaktor gilt. Dazu zählen Krebserkrankungen, neurodegenerative Krankheiten wie die Alzheimer-Krankheit (AK) (*lat. Morbus Alzheimer*) oder die Parkinson-Krankheit (PK) (*lat. Morbus Parkinson*) oder aber auch metabolische Störungen, wie Diabetes mellitus (Cuervo, 2008). AK und PK sind vorwiegend im Alter auftretende, neurodegenerative Störungen mit der größten Krankheitshäufigkeit in unserer Gesellschaft. Bei der AK wurde in den betroffenen Neuronen, als eine der ersten Änderungen, eine veränderte Makroautophagieaktivität identifiziert, während bei der PK der wichtigste Defekt in der CMA beobachtet wird. Die Neuronen reagieren auf ein Versagen der Autophagie, indem sie andere proteolytische Prozesse hochregulieren (inklusive der Autophagiemechanismen, die von der Krankheit nicht betroffen sind). Dieser Ausgleichsversuch könnte im Alter auf Grund der funktionellen Verschlechterung der Autophagie abgeschwächt sein. Dieser Defekt würde dann schließlich in der Akkumulation der pathogenen Produkte, im Zelltod und dem Auftreten der Krankheitsymptome resultieren (Cuervo, 2008; Yu et al, 2005).

Autophagie könnte möglicherweise sowohl in der Förderung als auch in der Prävention von Krebserkrankungen ausschlaggebend sein. Autophagie wirkt als KrebsSuppressor, indem sie beschädigte Organellen entfernt und genomische Instabilitäten reduziert. Damit verhindert Autophagie das unbegrenzte Wachstum von präkanzerösen Zellen. Mit der altersbedingten Abnahme der autophagischen Aktivität nimmt die Zunahme von intrazellulären Schäden, funktionsgestörten Organellen und Chromosomenaberrationen zu. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich somatische Zellen in Krebszellen verwandeln, steigt. Wenn der Tumor dann wächst, sind die Krebszellen, insbesondere in den inneren Regionen des Tumors, auf Grund der schlechten Durchblutung auf Autophagie angewiesen, um z.B. den Nährstoffmangel auszugleichen (Shintani & Klionsky, 2004). Fehlfunktionen der Autophagiemechanismen können, außer zu den genannten Beispielen, auch noch zu einer Reihe weiterer Erkrankungen führen u.a. Myopathien, Lebererkrankungen und Immunoseneszenz.

Autophagie ist ein wichtiger Mechanismus der angeborenen Immunität, um intrazelluläre Pathogene, direkt durch die Aufnahme und Zersetzung in Autophagosomen, zu entfernen. Die Autophagosomen können intrazelluläre Pathogene sogar fassen und zerstören, wenn sie sich in schützenden Vakuolen, wie z.B. dem Phagosom des *Mycobacterium tuberculosis*, befinden (Singh et al, 2006). Zusätzlich zu diesen zellautonomen Abwehrfunktionen unterstützt Autophagie das Absondern von endogen synthetisierten, viralen oder Selbst-Antigenen in Autophagosomen und ihre anschließende Lieferung an den MHC (major histocompatibility complex) Klasse II und damit zur Präsentation der zytoplasmatischen Antigene für das Immunsystem (Schmid & Munz, 2007).

In den folgenden Texten wird Makroautophagie zur Vereinfachung nur noch als Autophagie bezeichnet.

1.1.2 Autophagie auf molekularer Ebene

Atg-Proteine – molekulare Core-Maschinerie der klassischen Autophagie

Die Entdeckung der Autophagie zugehörigen ATG Gene (ATG = AuTophagy-related) im Genom der Hefe war der Durchbruch für das Verständnis der molekularen Mechanismen der Autophagie (Klionsky et al, 2003). Aktuell sind mehr als 30 ATG Gene bekannt, die in die Prozesse der Autophagie involviert sind (Mizushima, 2010; Xie & Klionsky, 2007). Unter diesen Atg-Proteinen gibt es eine Gruppe von Proteinen, die für die Bildung von klassischen Autophagosomen essentiell sind und deshalb als die molekulare Core-Maschinerie bezeichnet werden. Diese Core-Atg-Proteine setzen sich aus vier Gruppen zusammen. Gruppe 1 besteht aus dem Klasse III Phosphatidylinositol 3-OH Kinase (PtdIn3K)/hVps34 (mammalian vacuolar protein sorting 34)-Komplex, Gruppe 2 bildet der Atg1/ULK1 (unc-51-like kinase 1)-Komplex, Gruppe 3 umfasst zwei Ubiquitin-ähnliche Proteine und deren Konjugationssysteme und Gruppe 4 besteht aus den zwei Transmembranproteinen mAtg9 (mammalianAtg9) und VMP1 (vacuole membrane protein 1) (Yang & Klionsky, 2010).

Klasse III Phosphatidylinositol 3-OH Kinase-Komplex

Autophagie findet in mehreren Schritten statt. Zuerst muss eine Phagophorenmembran an einer PAS (Phagophore assembly site)-ähnlichen Struktur gebildet werden. Anschließend findet die Verlängerung und Ausdehnung dieser Membran statt. Die Phagophorenmembran schließt sich dann zu einem Autophagosom, um als reifes Autophagosom mit einem Lysosom verschmelzen zu können. Die Autophagosombiogenese beginnt an einer becherförmigen Ausstülpung in oder nahe der Membran des rauen Endoplasmatischen Retikulums oder eines Mitochondriums (Omegasom) mit der Bildung einer Doppel-Membran/Phagophore (Tooze & Yoshimori, 2010). An solch einem Omegasom generiert die Lipidkinase hVps34 reichlich Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat (PIP₃), um die Rekrutierung von weiteren Atg-Proteinen möglich zu machen (Mizushima et al, 2011; Yang & Klionsky, 2010). hVps34 kommt in zwei unterschiedlichen Komplexen vor. Der Klasse III Phosphatidylinositol 3-OH Kinase (PtdIn3K)-Komplex besteht entweder aus hVps34, Beclin1/Bcl1 (b-cell lymphoma/leukemia-1) und p150 (phosphoinositide 3-kinase adaptor protein 150kDa) und Atg14L (Atg14 like protein)/Barkor oder aus hVps34, Beclin1, p150 und UVRAG (ultraviolet irradiation resistant associated gene) (Itakura et al, 2008; Liang et al, 2006). Die Lipidkinase hVps34 ist nötig, um PIP₃ am Omegasom zu generieren und dadurch die Rekrutierung von anderen Atg-Proteinen möglich zu machen (Yang & Klionsky, 2010). Diese Komplexe sind notwendig, um andere Klassen von Atg-Proteinen zu rekrutieren. Bif-1 (Bax-interacting factor 1) und Ambra1 (activating molecule in Beclin1-regulated autophagy) werden ebenfalls in diese Komplexe eingebaut, um die Generierung von PIP₃ zu regulieren und interagieren über UVRAG (Bif-1) oder direkt mit Beclin1 (Ambra1). Bif-1 kolokalisiert während eines Nährstoffmangels mit Atg5, LC3 und mAtg9. Man nimmt an, dass Bif-1 und UVRAG die Membran formen können, denn Bif-1 enthält eine N-BAR (bin-amphiphysin-Rvs mit N-terminaler amphipathischer Helix)-Domäne und kann Membranen binden und krümmen (Takahashi et al, 2007; Takahashi et al, 2009). Das Rubicon (RUN domain an cysteine rich domain containing, Beclin 1-interacting)-Protein bildet einen Komplex mit UVRAG-Bcl1-hVps34-p150, lokalisiert an den späten Endosomen/Lysosomen und wirkt negativ regulierend auf die Aktivität der Klasse III Phosphatidylinositol 3-OH Kinase hVps34 und die Reifung der Autophagosomen (Matsunaga et al, 2009; Zhong et al, 2009).

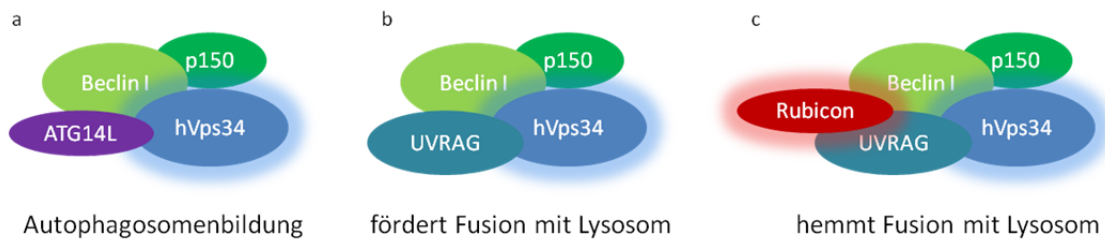


Abb. 1-1: PtdIns3K-Komplexe. Die Lipidkinase hVps34 kann in mindestens drei verschiedenen Komplexen vorliegen. **a:** Der Komplex aus hVps34, Beclin1, p150 und Atg14L (Atg14 like protein)/Barkor ist für die Produktion von PIP₃ zu Beginn der Phagophorenbildung notwendig. **b:** Der Komplex aus hVps34, Beclin1, p150 und UVRAG ist für die Reifung und Fusion der Autophagosomen mit dem Lysosom notwendig. **c:** Der Komplex aus hVps34, Beclin1, p150, UVRAG und Rubicon hemmt die Reifung der Autophagosomen.

Atg1/ULK1-Komplex

Die Serin/Threonin-Kinase Atg1 der Hefe hat eine Schlüsselfunktion in der Induktion der Autophagie und wirkt in der Signalkaskade unterhalb von mTOR (mammalian target of rapamycin)-Komplex 1 (mTORC1). Innerhalb der ATG1-Genfamilie der Säugetiere haben ULK1 (uncoordinated-51-like kinase 1) und ULK2 (uncoordinated-51-like kinase 2) die größten Gemeinsamkeiten mit Atg1 aus der Hefe. ULK1 und ULK2 befinden sich in einem großen Komplex (3MDa), der sowohl mAtg13 (mammalian Atg13) als auch die Gerüstproteine FIP200/RB1CC1 (FAK-family interacting protein of 200 kD/retinoblastoma 1-inducible coiled-coil 1) und Atg101 umfasst (Jung et al, 2009; Mizushima, 2010). ULK1, mAtg13, FIP200 und Atg101 sind für die Autophagieinduktion essentiell und im Zytosol hauptsächlich in Assoziation mit den Membranen, der sich formenden Phagophore zu finden (Mizushima, 2010). mAtg13 kann direkt und unabhängig von seinem Phosphorylierungsstatus mit ULK1, ULK2, FIP200 und Atg101 interagieren. Unter nährstoffreichen Bedingungen wird der große ULK1-mAtg13-FIP200-Atg101-Komplex durch die Bindung an den mTORC1 gehemmt, während mTORC1 bei Nährstoffknappheit nach einigen Phosphorylierungsschritten schnell vom ULK1-Komplex dissoziiert (Hosokawa et al, 2009; Yang & Klionsky, 2010).

DFCP1 (Double-FYVE-containing protein 1) bindet an PIP₃ und ist ein Marker für das Omegasom am ER, obwohl es für die Autophagieinduktion nicht essentiell ist (Axe et al, 2008). Atg14L/Barkor rekrutiert die Phosphatidylinositol 3-OH Kinase hVps34 an das ER. hVps34 reichert PIP₃ in der ER-Membran an, welche das Lipid normalerweise nicht enthält. Diese PIP₃-reiche Membran fungiert als Plattform für die Rekrutierung von Atg-Proteinen und der Entstehung der Phagophore (Mizushima et al, 2011). Säugetiere besitzen vier Proteine, die Atg18-homologen Proteine (WIPI 1-4). WIPI-1 (WD-repeat protein interacting with phosphoinositides-1) und WIPI-2 (WD-repeat protein interacting with phosphoinositides-2) binden an PIP₃ und fördern möglicherweise die Bildung der Ubl (ubiquitin-like)-Atg8-Protein-positiven Struktur, die der Startpunkt für die beginnende Ausdehnung der sichelförmigen Phagophore sein könnte (Proikas-Cezanne & Robenek, 2011). Sowohl DFCP1 als auch WIPI 1/2 sind PIP₃-abhängige Effektoren, jedoch ist DFCP1 ausschließlich am Omegasom lokalisiert, während WIPI 1/2 auf der Phagophorenmembran zu finden sind, die sich aus dem Omegasom entwickelt (Mizushima et al, 2011).

Ubiquitin-ähnliche Proteine

Für die Verlängerung und Ausdehnung der Phagophorenmembran wird das Ubl (ubiquitin-like)-Protein-System, welches aus Atg12 und Atg8/LC3/MAP1-LC3 (microtubule associated protein 1–light chain 3) und deren Konjugationssystemen besteht, benötigt. Obwohl ihre primären Sequenzen keine eindeutigen Homologien zu Ubiquitin aufweisen, zeigen die Kristallstrukturen von Atg12 und LC3 eine Ubiquitinfalte an ihrem C-Terminus (Paz et al, 2000; Suzuki et al, 2005). Um Atg12 mit Atg5 zu verbinden, werden Atg7 und Atg10 als E1 (aktivierendes Enzym) bzw. E2 (verbindendes Enzym)-ähnliche Enzyme benötigt (Mizushima et al, 1998). Anschließend wird die Atg12-Atg5-Verbindung an Atg16L (Atg16 like protein) gebunden und oligomerisiert, um den großen multimerischen Atg16L-Komplex zu bilden (Kuma et al, 2002). Bevor die Atg8/LC3-Proteine mit Phosphatidylethanolamin (PE) verbunden werden können, um die lipidierte Form II zu bilden (LC3-II), muss zunächst die zytosolische Form I (LC3-I) der Proteine gebildet werden. Die Cysteinprotease Atg4 spaltet spezifisch den C-Terminus der Atg8/LC3-Proteine ab und legt den C-terminalen Glycinrest frei, der anschließend wiederum durch die Beteiligung von Atg7 als E1-ähnliches Enzym und Atg3 als E2-ähnliches Enzym an PE gebunden wird. Die Bindung von Atg8/LC3-Form I-Proteinen an PE kann durch Atg4 später wieder proteolytisch gelöst werden. PE-konjugierte Atg8/LC3-Form II-Proteine können fest an die innere und die äußere Membran der Phagophore binden und sind notwendig für die Hemifusion des Autophagosoms mit dem Lysosom. Vor der Fusion mit dem späten Endosom/Lysosom dissoziieren die Atg8/LC3-Form II-Proteine von der äußeren Membran des Autophagosoms (Yang & Klionsky, 2009). Bei Säugetieren wurden bislang sieben Atg8-Proteine entdeckt, drei MAP1 LC3-Proteine (LC3A, LC3B und LC3C) und vier GABARAB (γ -aminobutyrate receptor associated protein)-Proteine (GABARAP und GABARAP-like proteins, Atg8L/GABARAP1, GABARAPL2/GATE-16 und GABARAPL3). LC3B fungiert als Hauptakteur der Atg8-Proteine bei der Hunger-induzierten Autophagie, obwohl jedes der sieben Atg8-Proteine unverzichtbar für die klassische Autophagosomenbiogenese ist (Mizushima et al, 2011).

Transmembranproteine

Aktuell sind zwei Transmembranproteine bekannt, die für die Autophagie bei Säugetieren wichtig sind: mAtg9 (mammalian Atg9) und VMP1 (vacuole membrane protein 1). mAtg9 durchspannt die Membran sechsmal, wobei sowohl der N- als auch der C-Terminus ins Zytosol ragen. Unter nährstoffreichen Bedingungen befindet sich das Protein im Trans-Golgi-Netzwerk und den späten Endosomen, während es bei Nährstoffmangel oder während einer Rapamycinbehandlung in periphere Bereiche umverteilt wird und dann mit LC3 positiven Autophagosomen kolokalisiert. Nach einer solchen Hungerperiode wandert mAtg9 wieder zurück. Diese Mechanismen sind ULK1- und hVps34-abhängig. Eventuell trägt Atg9 auf diese Weise zur Anlieferung von Membranen an die PAS-ähnliche Struktur bei, die für die Ausdehnung der Phagophore benötigt werden (Yang & Klionsky, 2010). Die PAS-ähnliche Struktur kann als Kombination von entstehenden Phagophoren und den Proteinen der Core-Maschinerie definiert werden. Das Zusammenwirken der Core-Maschinerie-Proteine führt zur Ausdehnung und Metamorphose der Phagophore zu einem Autophagosom. Während dieses Prozesses lösen sich die meisten Proteine der Core-Maschinerie mit Ausnahme von LC3 wieder vom fertiggestellten Autophagosom und wandern zurück an ihren Non-PAS Aufenthaltsort (Xie & Klionsky, 2007). Das zweite Transmembranprotein VMP1 findet sich in Säugetierzellen während der Autophagieinduktion sowohl an der Plasmamembran als auch an der PAS-ähnlichen Struktur zusammen mit LC3 und

Bcl1. Überexpression von VMP1 löst sogar unter nährstoffreichen Bedingungen Autophagie aus, während die VMP1-Depletion die Autophagieinduktion durch Hunger oder Rapamycin verhindert. Vermutlich ist die Funktion des Transmembranproteins VMP1 die Rekrutierung von Bcl1 und anderen Komponenten zum Klasse III PtdIns3K-Komplex der Phagophore (Ropolo et al, 2007; Yang & Klionsky, 2010).

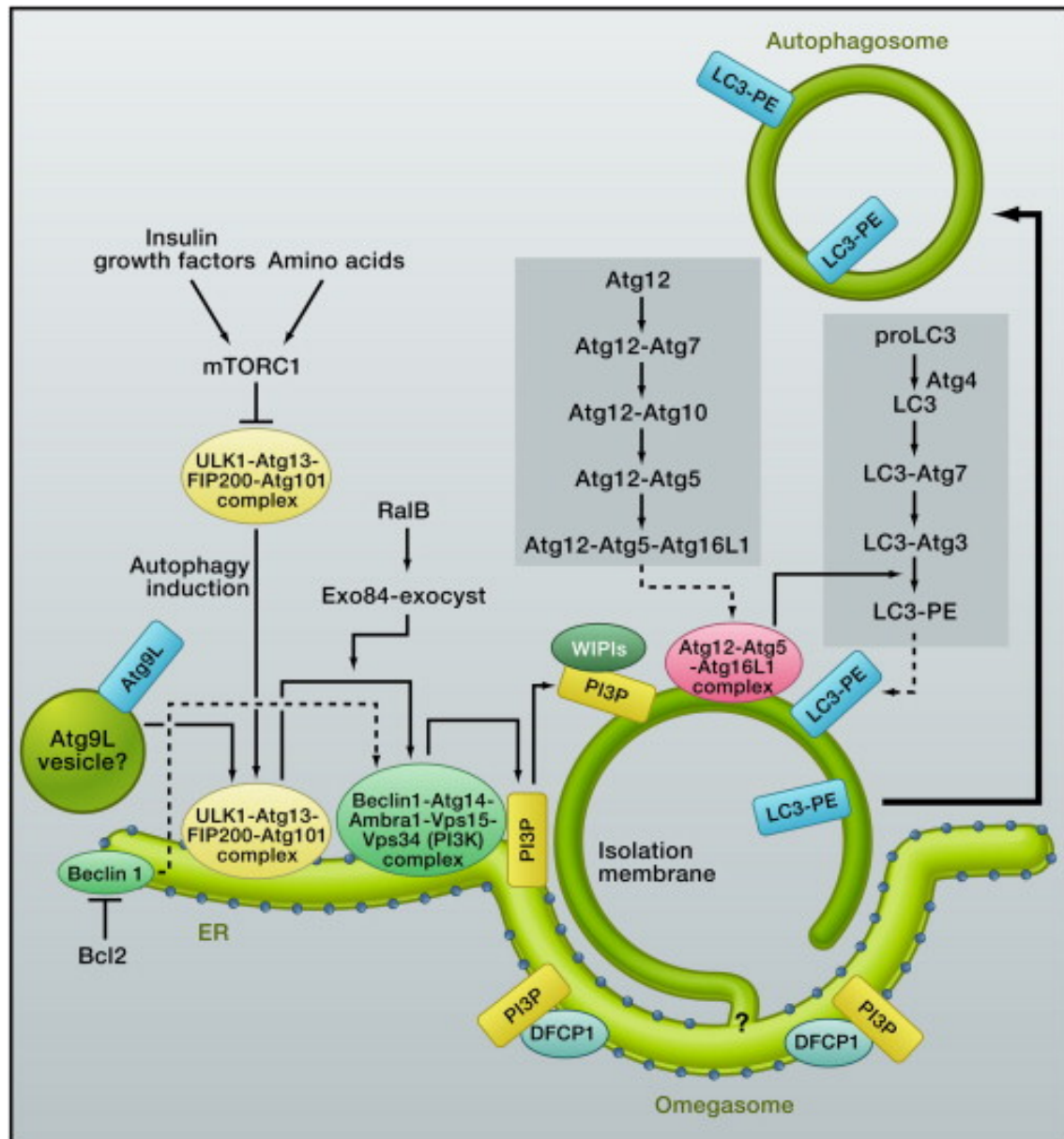


Abb. 1-2: Entstehung von klassischen Autophagosomen. Unter nährstoffreichen Bedingungen (normales Level an ATP, Aminosäuren und Wachstumsfaktoren (Insulin)) hemmt der mTORC1-Komplex den ULK1-mAtg13-FIP200-Atg101-Komplex. Unter Mangelbedingungen transloziert der ULK1-mAtg13-FIP-200-Atg101-Komplex zum ER. Dort reguliert der ULK1-Komplex den Klasse III PtdIns3K-Komplex (bestehend aus Beclin1, Atg14, Ambra1, Vps15 und der Klasse III PtdIns3-Lipidkinase Vps34 (PI3K)). RaiB und der Exo48-exocyst-Komplex fördern die ULK1-vermittelte Regulation des PtdIns3K. Bcl1 wird unter Mangelbedingungen ebenfalls an den PtdIns3K rekrutiert. Auch das Transmembranprotein Atg9 ist in der frühen Phase der Autophagosomenbiogenese involviert. Die Lipidkinase Vps34 reichert PIP₃ an einer becherförmigen Ausstülpung des ERs an (Omegaosome), damit weitere Atg-Proteine rekrutiert werden können. Auch DFCP1 wird durch die PIP₃-Generierung rekrutiert und fördert die Entstehung des

Omeegasoms (Omeegasome). Die PIP₃-bindenden Proteine WIPI sind ebenfalls notwendig für die Entstehung und Reifung des Omeegasoms und der Phagophore (Isolation membrane). Die lipidierte Form von LC3 (LC-PE) ist notwendig für die Verlängerung, Ausdehnung und das Schließen der Phagophore. An der Bildung von LC3-PE sind Atg4, Atg7, Atg3 und der Atg12-Atg5-Atg16L-Komplex beteiligt (Mizushima & Komatsu, 2011).

Nicht-kanonische Autophagie

Für jeden Schritt der klassischen Autophagosomenbiogenese ist die hierarchische Aktivierung von Atg-Proteinen und nicht-Atg-Proteinen, wie der PdtIn3K, p150, Ambra1 oder DFCP1 notwendig. Seit Kurzem gibt es Hinweise darauf, dass es möglich ist, einige dieser klassischen Proteine bei der Biogenese der Autophagosomen zu umgehen. Diese alternativen Formen der sogenannten nicht-kanonischen Autophagie können Proteine umgehen, die für die Verlängerung und Ausdehnung der Phagophore verantwortlich sind, wie z.B. Atg5, Atg7 und Atg8/LC3-Proteine (Codogno et al, 2012; Nishida et al, 2009). Aber auch Proteine, die für die Initiation der Phagophore wichtig sind, wie z.B. ULK1 und Beclin1, können umgangen werden (Codogno et al, 2012).

Überblick über einige Autophagie-regulierende Signaltransduktionsmechanismen

Autophagie ermöglicht der Zelle sich auf unterschiedlichste Umweltbedingungen einzustellen. Eine Vielzahl von zellulären Funktionen, von der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase bis hin zum programmierten Zelltod (Typ II), wird über den Mechanismus der Autophagie abgewickelt. Die Autophagie ist deshalb streng reguliert und muss durch spezifische extra- und intrazelluläre Signale induziert oder inhibiert werden können. Durch Sensoren für Nährstoffangebot, Wachstumsfaktoren, Energiestatus, Zellstress oder die Infektion durch Pathogene werden spezifische Signaltransduktionswege angestoßen, die dann zur Induktion oder Inhibition der Autophagie führen. Dabei wird zwischen der unspezifischen Hunger-assoziierten Autophagie, die unspezifisch einen Teil des Zytoplasmas abbaut, um der Zelle während einer Hungerperiode oder anderen Stressbedingungen Energie und Aminosäuren zur Verfügung zu stellen und der selektiven Autophagie, die spezifisch einzelne Zellorganellen, Proteinkomplexe und Aggregate abbauen kann, unterschieden.

Target of Rapamycin-Komplex 1-vermittelte Signalwege

Der Rapamycin-empfindliche mTOR-Komplex 1 (mTORC1) fungiert als Sensor für intra- und extrazelluläre Signale und reguliert eine Vielzahl von zellulären Biosyntheseprozessen sowie Zellwachstum und Zellproliferation. Wachstumsfaktoren und Mitogene, wie beispielsweise Insulin und EGF (epidermal growth factor) oder Nährstoffe wie Aminosäuren und Glukose, aktivieren den mTORC1-Signalweg und hemmen damit die Autophagieinduktion. Die Inhibierung der mTORC1 Kinaseaktivität durch Zellstress oder Mangel an Wachstumsfaktoren und Nährstoffen, hat die Dephosphorylierung der p70S6K oder S6K (ribosomal protein S6 Kinase) und des 4E-BP (eIF2 α 4E-binding protein) zur Folge und unterstützt eine reduzierte Translationsaktivität und verstärkt die Autophagieinduktion (Zinzalla & Hall, 2008). Der mTORC1 besteht aus mTOR (mammalian target of rapamycin), Raptor (regulatory associated protein of mTOR), mLST8/G β L (mammalian lethal with sec-13/G-Protein β -subunit-like protein), PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40kDa) und Deptor (DEP-domain containing and mTOR interacting protein) (Laplante & Sabatini, 2009). mTOR ist die katalytische Untereinheit des mTORC1. Raptor beeinflusst die Kinaseaktivität von mTORC1, indem es den Aufbau des mTORC1 und die Rekrutierung seiner Substrate reguliert. PRAS40 und Deptor wirken negativ-regulierend auf mTORC1. Die Funktion von LST8/G β L ist nicht bekannt (Laplante & Sabatini, 2009). mTORC1 kombiniert vier Hauptsignale: die An- oder Abwesenheit von Wachstumsfaktoren, den Energiestatus, die Sauerstoffversorgung und die Verfügbarkeit von Aminosäuren. Der wichtigste Sensor für die mTORC1-Aktivierung ist der TSC1/TSC2-Komplex (tuberous sclerosis complex 1/2), ein Heterodimer bestehend aus TSC1 (oder auch hamartin) und TSC2 (oder auch tuberin). Der TSC1/TSC2-Komplex wirkt negativ-regulierend auf den mTORC1, indem es als Rheb (Ras homolog enriched in brain)-spezifisches GAP (GTPase-activating protein) fungiert und Rheb durch die Induktion der Hydrolyse von GTP zu GDP in seine inaktive GDP-gebundene Form umwandelt (Aspuria & Tamanoi, 2004). Phosphorylierung von TSC2 durch Akt/PKB führt zur Dissoziation des TSC1/TSC2-Komplexes und damit zur Inaktivierung. Aktives GTP-gebundenes Rheb aktiviert dann mTORC1 (Inoki et al, 2002).

Insulin

Insulin und Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren regulieren mTOR über die Klasse I PtdIn3K. Nach Bindung von Insulin autophosphoryliert die Rezeptortyrosinkinase (RTK) und rekrutiert und phosphoryliert IRS1 und IRS2 (insulin receptor substrate 1 und 2). Auf diese Weise entsteht ein Gerüst, an dem Adapterproteine u.a. die Untereinheiten der Klasse I PtdIn3K binden können. Die Erzeugung von PIP₃ durch die Klasse I PtdIn3K erhöht die Rekrutierung von PKB/Akt (protein kinase B) und dessen Aktivator PDK1 (phosphoinositide-dependent protein kinase 1) an die Membran. Die durch PDK1 aktivierte PKB/Akt phosphoryliert TSC2 und führt zur Dissoziation des TSC1/TSC2-Komplexes. Rheb liegt nun in seiner aktiven GTP-gebundenen Form vor und kann mTORC1 direkt binden und aktivieren. Sobald die Hormone fehlen, wird mTOR inaktiviert und sein inhibitorischer Effekt auf die Autophagie aufgehoben (Furuta et al, 2004). Zusätzlich übermittelt Ras die Signale von der Rezeptortyrosinkinase an intrazelluläre Effektoren, wie Raf-1/MAP(mitogen-activated protein)-Kinasen und der Klasse I PtdIns3K. Aminosäuren inhibieren die Raf-1-Kinase und damit auch die MEK1/2 (MAPK (mitogen-activated protein kinase)/ERK kinase 1/2) und ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2)-Kinasen und somit schließlich die Autophagie. Das Fehlen von Aminosäuren kehrt diesen Vorgang um und aktiviert die ERK1/2 und Autophagieinduktion (Pattingre et al, 2003).

ATP

In einer intrazellulären metabolischen Stresssituation ist die Autophagieinduktion für die Lebensfähigkeit der Zelle entscheidend. Ein sinkender ATP (Adenosintriphosphat)-Level wird in Säugetierzellen durch die AMPK (5'-AMP (Adenosinmonophosphat)-activated protein kinase) erfasst und an den mTORC1 signalisiert. AMPK wird bei einem verschlechterten Verhältnis von ATP zu AMP (Adenosinmonophosphat) durch die LKB 1 (liver kinase B1) aktiviert. Aktives AMPK phosphoryliert TSC2. TSC2 erhöht seine Aktivität als GTPase-aktivierendes Protein für Rheb und reduziert damit die mTORC1-Aktivierung. Auf diese Weise verringert sich die Kinaseaktivität des mTORC1 (Inoki et al, 2003). Daraufhin kann ULK1 mit AMPK interagieren. AMPK phosphoryliert und aktiviert ULK1 und induziert die Autophagosomenbiogenese (Kim et al, 2011). Die ATP-Produktion erhöht sich auf Grund der durch die Autophagie frei werdenden Nährstoffe. Das Verhältnis von ATP zu AMP normalisiert sich wieder. Zusätzlich phosphoryliert und stabilisiert LKB1-AMPK den Zellzyklus Inhibitor p27^{kib1} (zyklinabhängiger Kinaseninhibitor) und induziert Autophagie unter Stressbedingungen (Liang et al, 2007). Neben LKB1 kann CaMKK β (Kalzium/calmodulin-dependent kinase kinase β) die Aktivierung von AMPK während eines Anstiegs der zytosolischen Kalzium-Konzentration regulieren (Hoyer-Hansen et al, 2007).

Aminosäuren

Die Anwesenheit von Aminosäuren ist ein starkes positiv-regulierendes Signal für den mTORC1. Allerdings unterscheidet sich die Aktivierung von mTORC1 durch Aminosäuren vom Insulinsignalweg. Die Verfügbarkeit von Aminosäuren wird unabhängig von der Klasse I PtdIn3K und dem TSC1/TSC2-Komplex an mTORC1 übermittelt. Stattdessen ist die Klasse III PtdIn3K hVps34 in die Signalübermittlung involviert (Nobukuni et al, 2005). Im Kontrast dazu steht die Rolle von hVps34 in der frühen Phase der Autophagieinduktion. Die Regulatoren der

mTORC1-Aktivierung durch Aminosäuren sind die Rag-Proteine (Ras-ähnliche kleine GTPasen). In Anwesenheit von Aminosäuren interagieren Rag-Heterodimere (beinhalten GTP-gebundenes RagA/B) mit der Raptoruntereinheit von mTORC1 und vermitteln die Translokation von mTORC1 an die Oberfläche des Lysosoms, an dem der mTORC1-Aktivator Rheb (Ras homolog enriched in brain) lokalisiert ist (Sancak et al, 2010; Sancak et al, 2008). p62/SQSTM1 kann sowohl an den Rag-Proteinen als auch an Raptor binden und fördert die Entstehung der aktiven Rag-Heterodimere, die wiederum von Raptor stabilisiert werden (Duran et al, 2011). TORC1 hemmt die Autophagie sowohl über den ULK1-Komplex als auch über die Phosphorylierung von TAP42 (Two A-associated protein 42 kDa), das wiederum die autophagie-inhibitorisch wirkende, katalytische Untereinheit von PP2A (serine/threonine protein phosphatase 2A) aktiviert (Yorimitsu et al, 2009).

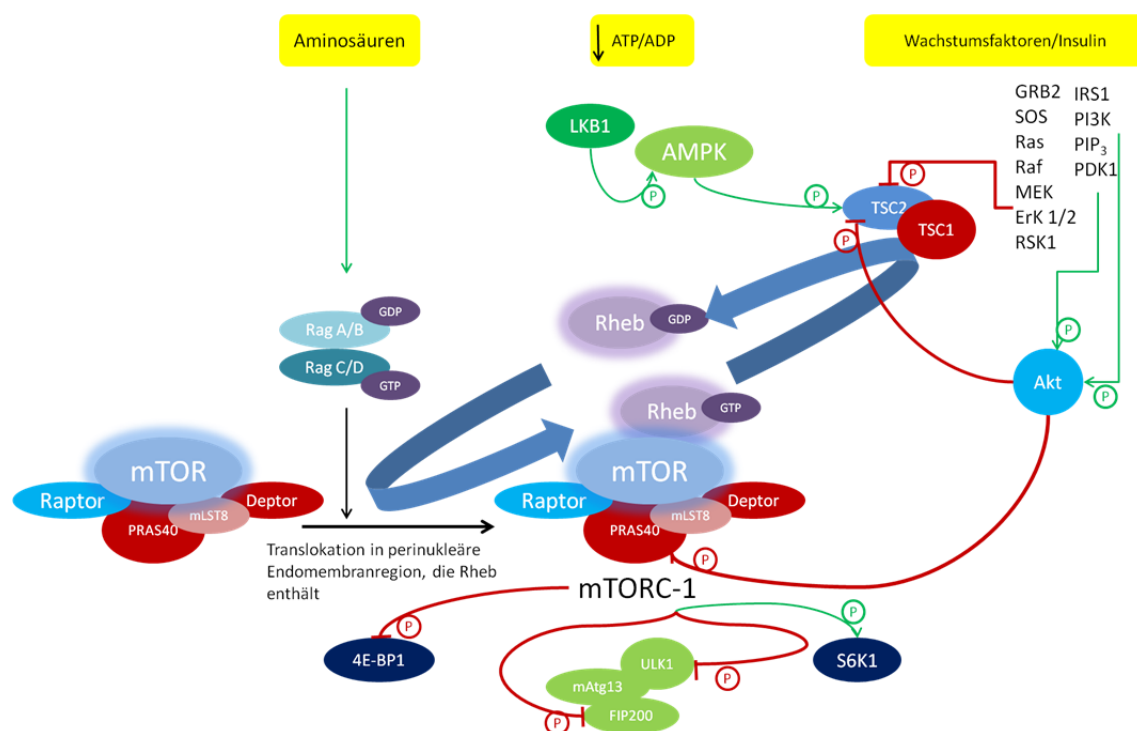


Abb. 1-3: Target of Rapamycin-vermittelte Signaltransduktionswege. mTOR Komplex 1 (mTORC1) fungiert als Sensor für intra- und extrazelluläre Signale und reguliert u.a. Zellwachstum und Zellproliferation. **Wachstumsfaktoren** oder Nährstoffe aktivieren den mTORC1-Signalweg und hemmen damit die Autophagieinduktion. Die Inhibierung der mTORC1 Kinaseaktivität, durch Zellstress oder Mangel an Wachstumsfaktoren und Nährstoffen, hat die Dephosphorylierung der p70S6K oder S6K (ribosomal protein S6 Kinase) und des 4E-BP1 (eIF2 α 4E-binding protein) zur Folge, unterstützt eine reduzierte Translationsaktivität und verstärkt die Autophagieinduktion. In Anwesenheit von **Aminosäuren** interagieren Rag-Heterodimere mit der Raptoruntereinheit von mTORC1 und vermitteln die Translokation von mTORC1 in ein Zellareal, an dem der mTORC1-Aktivator Rheb lokalisiert ist. Der wichtigste Sensor für die mTORC1-Aktivierung ist der TSC1/TSC2-Komplex. Er wirkt negativ-regulierend auf den mTORC1, indem er als Rheb-spezifisches GTPase-aktivierendes Protein fungiert und Rheb in seine inaktive GDP-gebundene Form umwandelt. **AMPK** wird bei einem verschlechterten Verhältnis von ATP zu AMP durch die LKB1 aktiviert und phosphoryliert TSC2. TSC2 erhöht seine Aktivität als GTPase-aktivierendes Protein für Rheb und verringert damit die Kinaseaktivität des mTORC1. Auch die durch PDK1 aktivierte PKB/Akt phosphoryliert TSC2 und führt zur Dissoziation des TSC1/TSC2-Komplexes.

UPR - Unfolded protein response

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) besetzt die zentrale Rolle in der Lipid- und Proteinbiosynthese und dient als intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher. An der Membran des ERs werden alle Transmembranproteine und die Lipide für die meisten Zellorganellen und die Plasmamembran produziert. Auch die Faltung von neusynthetisierten Proteinen findet im ER statt. Übermäßige Expression von ungefalteten oder missgefalteten Proteinen, zur Aggregation neigende Proteine, Glukose- und Sauerstoffmangel, oxidativer Stress und das Ausströmen von Ca^{2+} können eine Vielzahl von ER-Stress-Konditionen verursachen. Diese Stressbedingungen können durch zelluläre Signalmechanismen erkannt werden, die zusammengefasst als UPR (unfolded protein response) oder ER-Stress bezeichnet werden. In den Zellen von Säugetieren gibt es drei UPR-Sensoren: die Typ I Transmembranprotein Endonuklease/Proteinkinase IRE1 (inositol-requiring kinase 1), das Typ II Transmembranprotein ATF6 (activating transcription factor 6) und die PERK (RNA-dependent PKR-like ER kinase) (Ogata et al, 2006). Diese Faktoren können die Akkumulation von ungefalteten Proteinen im ER erkennen und zelluläre Reaktionen auslösen, die einen generellen Stopp der Proteinsynthese, selektive Protein-Translation sowie die Transkription von Genen der Stressantwort bewirken. Ein Zielenzym von IRE1 ist die Stresskinase JNK (c-Jun N-terminal kinase). JNK phosphoryliert Beclin2 (Bcl2), welches dann Beclin1 (Bcl1) freigibt, die inhibitorische Wirkung des Bcl1-Bcl2-Komplexes aufhebt und so Autophagie induziert (Wei et al, 2008). ATF6 fungiert als Transkriptionsfaktor für ER-Chaperone. PERK phosphoryliert die α -Untereinheit von eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2 α). Die Phosphorylierung von eIF2 α an Serin 51 bewirkt Autophagieinduktion und eine verminderte Proteinsynthese, indem sie den Translationsstart inhibiert. Auch der Umbau der Atg8/LC3-Form I-Proteine in die lipidierte Form II ist von eIF2 α -Phosphorylierung durch PERK abhängig (Kouyama et al, 2007). Zusätzlich kann die UPR des ERs Autophagie über einen Ca^{2+} -Ausstrom induzieren. Durch den erhöhten Ca^{2+} -Spiegel im Zytosol wird die CaMKK β (calcium-activated calmodulin-dependent kinase kinase- β) aktiviert, die dann durch die Aktivierung von AMPK schließlich die Autophagieinduktion bewirkt (Hoyer-Hansen et al, 2007).

eIF2 α -vermittelte Autophagieinduktion

Autophagieinduktion durch Hunger oder einer viralen Infektion wird durch die eIF2 α -Kinasen GCN2 und PKR aktiviert. Die konservierte eIF2 α -Kinase GCN2 (general control, non-repressible 2/eIF2 α -kinase 4/eIF2AK4) wird durch unbeladene t-RNAs aktiviert und löst globalen translationalen Stillstand aus (Wek et al, 2006). In Zellen von Säugetieren sind insgesamt vier eIF2 α -Kinasen bekannt, die durch verschiedene Stresstypen aktiviert werden können. HRI (heme regulated inhibitor) oder eIF2 α -Kinase 1 (EIF2AK1) reagiert auf einen Häm-Mangel, PKR (dsRNA dependent protein kinase) oder eIF2 α -Kinase 2 (EIF2AK2) reagiert auf doppelsträngige RNA, PERK oder eIF2 α -Kinase 3 (EIF2AK3) reagiert auf ER-Stress, während GCN2 oder eIF2 α -Kinase 4 (EIF2AK4) bei Aminosäurenmangel aktiviert wird und eIF2 α phosphorylieren kann (Wek et al, 2006). Die Phosphorylierung von Serin 51 an der α -Untereinheit von eIF2 führt zum Verlust der GTPasenaktivität. eIF2 α kann nicht mehr durch eIF2B (nucleotide-exchange factor von eIF2) „aufgeladen“ werden. Die Verfügbarkeit von aktiven Translationsinitiationskomplexen sinkt immer mehr und führt schließlich zum globalen translationalen Stillstand (Scheu et al, 2006). Einige wenige Gene sind allerdings davon ausgenommen und werden stattdessen überexprimiert. Dieser Prozess wird ISR (integrated stress response) genannt. Es wird angenommen, dass die ISR, die Akkumulation von ungefalteten

Proteinen unter Stressbedingungen verhindern soll, Energie einsparen und schließlich die Genexpression nach der Stresssituation wieder anwerfen soll (Harding et al, 2000).

Selektive Autophagie

Durch den Mechanismus der Autophagie werden in Folge eines Mangels an Nährstoffen oder Wachstumsfaktoren nicht nur Teile des Zytoplasms unspezifisch verdaut, um der Zelle Energie und Aminosäuren für die Proteinbiosynthese zur Verfügung zu stellen, sondern auch der selektive, gezielte Abbau von einzelnen Zellorganellen oder Proteinaggregaten wird mittels Autophagie bewerkstelligt. Eine Schlüsselfunktion übernehmen bei der Induktion der selektiven Autophagie die sogenannten Autophagie-Adapterproteine (Autophagierezeptoren). Das humane p62/SQSTM1 (sequestosome1)-Protein besteht aus 440 Aminosäuren und enthält eine Reihe von Protein-Protein-Interaktions-Domänen. p62 besteht aus einer N-terminalen PB1-Domäne, einer ZZ-Typ Zinkfinger-Domäne, einem NLS (nuclear localization signal), einem NES (nuclear export signal), einem LIR (LC3-interacting region)- und einem KIR (KEAP1 interacting region)-Motiv, sowie einer UBA (UB-associated)-Domäne am C-Terminus. Die PB1-Domäne ist eine Protein-Protein-Interaktions-Domäne, die es p62 ermöglicht, mit den Proteinkinasen PKC ζ , PKC γ , MEKK3, MEK5 sowie mit NBR1 (neighbor of BCRN1 gene 1) zu interagieren (Lamark et al, 2003). Die PB1-Domäne ermöglicht auch die Homopolymerisierung von p62 (Wilson et al, 2003). Die aktiven NLS- und NES-Signale erlauben p62, zwischen der Kernregion und dem Zytoplasma hin und her zu bewegen (Pankiv et al, 2010). Über die UBA-Domäne kann p62 Ubiquitin binden (Vadlamudi et al, 1996). Die direkte Bindung von p62 über sein LIR-Motiv an LC3, ist für den Abbau von p62 durch Autophagosomen notwendig. Die Bindung an sämtliche Mitglieder der mAtg8/LC3-Proteinfamilie (LC3- und GABARAP- Subfamilien) erfolgt über das 11-Aminosäuren-lange LIR-Motiv (Ichimura et al, 2008). Um den selektiven Abbau der vielen, sehr unterschiedlichen Substrate durch Autophagie zu ermöglichen, ist die Erkennung der Autophagiesubstrate durch zelluläre Systeme eine notwendige Voraussetzung. Die Substrate werden durch Polyubiquitinierung als Autophagiesubstrat gekennzeichnet. p62 wird über seine UBA-Domäne rekrutiert und organisiert die ubiquitinierten Autophagiesubstrate in größere Einheiten oder Aggregate. Anschließend kann p62 über seine LIR-Domäne mit dem LC3 der Phagophore interagieren und diese rekrutieren. Daraufhin formt und schließt sich die Phagophore zu einem Autophagosom, welches die aggregierten Substrate umschließt (Johansen & Lamark, 2011). Die Funktion der Ubiquitinierung bei der selektiven Autophagie ist die essentielle Rekrutierung der verschiedenen Autophagieadapterproteine, wie u.a. p62, HDAC6 (histone deacetylase 1) und NBR1. Die Konjugation an Ubiquitin ist eine komplexe Reaktion und erfordert E1-, E2- und E3-Enzyme und führt zu einer Isopeptid-Bindung zwischen dem C-terminalen Glycinrest von Ubiquitin und der ϵ -Aminogruppe eines Lysin-Restes des Substratproteins. Abhängig von der Verfügbarkeit innenliegender Lysin-Reste, kann Ubiquitin aneinander gefügt werden, so dass Ubiquitin-Ketten mit verschiedenen Topologien und Funktionen entstehen. Die Modifikation eines Proteins durch die Polyubiquitinierung markiert es als Substrat für die selektive Autophagie oder den proteasomalen Abbauweg. Miss-gefaltete Proteine, Proteinaggregate, Proteinkomplexe, Peroxisomen, Mitochondrien, aber auch einige zytosolische, intrazelluläre Bakterien können nach der Ubiquitinierung und Rekrutierung von Autophagie-Adapterproteinen selektiv durch Autophagosomen abgebaut werden (Kirkin et al, 2009). p62 wird konstitutiv durch Autophagie abgebaut. Wird der konstitutive Abbau von p62 durch Inhibierung der Autophagie gehemmt, kommt es zur Entstehung von p62-Aggregaten. Autophagieinhibition

in der Leber und die damit verbundene Entstehung von p62-Aggregaten führt z.B. zu Lebertoxizität (Komatsu et al, 2007; Moscat & Diaz-Meco, 2011).

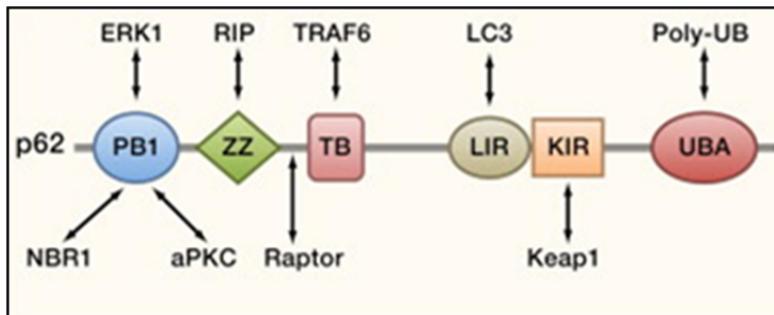


Abb. 1-4: p62-Domäne. p62 besteht aus einer N-terminalen PB1-Domäne, einer ZZ-Typ Zinkfinger-Domäne, einem TRAF6 Bindungsmotiv und einem LIR (LC3-interacting region)- und einem KIR (KEAP1 interacting region)-Motiv, sowie einer UBA (UB-associated)-Domäne am C-Terminus. Die PB1-Domäne ist eine Protein-Protein-Interaktions-Domäne, die es p62 ermöglicht, mit den Proteinkinasen PKC ζ , PKC γ (aPKC), MEKK3, MEK5, ERK1 sowie mit NBR1 (neighbor of BCRN1 gene 1) zu interagieren. Die PB1-Domäne ermöglicht auch die Homopolymerisierung von p62. Über die UBA-Domäne kann p62 Mono- und Polyubiquitin binden. Die direkte Bindung von p62 über sein LIR-Motiv an LC3 ist für den Abbau von p62 durch Autophagosomen notwendig (Moscat & Diaz-Meco, 2011)

Zellautonome Abwehr durch Autophagieinduktion

Neben ihrer unspezifischen Rolle bei Nährstoffmangel und ihrer selektiven Funktion in Reaktion auf verschiedenste intra- und extrazelluläre Signale und Belastungen als Kontrollmechanismus für die Qualität und die Quantität der intrazellulären Biomasse von Organellen und Nährstoffen, übernimmt die Autophagie eine weitere wichtige Rolle als Prozess der angeborenen Abwehr. Die immunologischen Funktionen der Autophagie umfassen die angeborene und adaptive Immunität und variieren von spezifischen immunologischen Effektoren und regulatorischen Funktionen bis hin zum allgemeinen Einfluss auf die Homöostase der Immunzellen. Dabei agiert die Autophagie in verschiedenen Rollen: Als spezialisiertes zytoplasmatisches System, um intrazelluläre Bakterien direkt zu bekämpfen, als Lieferant für die MHC II (major histocompatibility complex class II)-Präsentation endogener Antigene und als antimikrobielles System, welches zum Ziel von vielen spezifischen bakteriellen Adaptionen geworden ist, die die Bakterien vor dem autophagischen Abbau schützen sollen. Bei viralen Infektionen wird Autophagie durch den antiviralen eIF2 α -Kinase-Signalweg aktiviert (Talloczy et al, 2002). Verbindungen zwischen der Autophagie und dem konventionellen Immunsystem umfassen TLRs (Toll-like receptors), NLRs (Nod-like receptors), RLRs (RIG-I-like receptors), DAMPs (danger-associated molecular patterns), und einige weitere bekannte Rezeptoren und Zytokine der angeborenen und adaptiven Immunität sowie SLRs (sequestosome (p62)-like receptors) (fungieren als Autophagieadapter) und die IRGM (immunity related GTPase). Auch einige angeborene und adaptive Funktionen von Makrophagen und dendritischen Zellen und verschiedene Effekte auf die Entwicklung und die Homöostase von T- und B-Lymphozyten-Untergruppen markieren Schnittpunkte zwischen der Autophagie und dem konventionellen Immunsystem (Deretic, 2011). TLRs übernehmen sowohl bei der zellautonomen Abwehr durch Autophagieinduktion als auch bei der angeborenen und adaptiven Immunantwort eine wichtige Rolle. Antibakterielle Autophagie ist Rezeptor-vermittelt und selektiv. TLRs sind Membranrezeptoren, die sich auf der Zelloberfläche und den Endosomen

befinden. Die verschiedenen TLRs erkennen PAMPs (pathogen associated molecular patterns) und binden die pathogenspezifischen Liganden. TLR7 z.B. bindet ssRNA (single-stranded RNA). Die TLRs rekrutieren Adapterproteine, um ihre Signale zu übermitteln. MyD88 (myeloid differentiation factor 88) wird fast von allen aktivierten TLRs als Adapterprotein genutzt und vermittelt z.B. die Autophagieinduktion durch TLR7 (Delgado et al, 2008). Infizierte Zellen versuchen durch die Autophagie die bakterielle Proliferation einzuschränken, indem sie die Bakterien durch die Membran der Phagophore vom nährstoffreichen Zytosol trennen und sie in Autolysosomen überführen. Bei der sogenannten Xenophagie werden zytosolische Bakterien zunächst ubiquitiniert und anschließend durch die Rekrutierung von Autophagie-Adapterproteinen und der Phagophore selektiv abgetötet. Erst kürzlich wurde eine weitere immunologische Funktion der SLRs entdeckt. So kann p62 zytoplasmatische Protein-Vorläufer für den Umbau in Autolysosomen liefern, die dort durch den Verdau in kleinere Peptide eine neue biologische Aktivität erhalten und die anti-mikrobielle Kapazität der Autophagolysosomen erweitern (Ponpuak et al, 2010; Ponpuak & Deretic, 2011).

1.2 Porenbildende Toxine

Unter den, von Bakterien, gebildeten Toxinen repräsentieren die porenbildenden Toxine (PFT = pore forming toxins) mit einem Anteil von 30% die größte Klasse der bis heute bekannten bakteriellen Toxine (Iacovache et al, 2008). PFT werden allerdings nicht nur von Bakterien, sondern auch von höheren Organismen produziert. Nesseltiere (Sher et al, 2005), Seeanemonen (Bernheimer & Avigad, 1976), Erdwürmer (Shogomori & Kobayashi, 2008), Pilze (Mancheno et al, 2005) und Pflanzen (de Sousa & Morhy, 1989) produzieren PFT (Aroian & van der Goot, 2007). Sogar Säugetiere verwenden PFT-ähnliche Proteine, wie z.B. Perforine als Teil der angeborenen Immunantwort (Gonzalez et al, 2008; Pipkin & Lieberman, 2007). Die Bakterien sondern die PFT in einer wasserlöslichen Form ab, die anschließend an der Zelle bindet und zu einer amphipathischen Struktur multimerisiert, die sich schließlich als Pore in die Membran der Zielzelle einfügen kann (Song et al, 1996). Die Porenbildung kann nicht nur an der Plasmamembran der Zielzelle (extrazelluläre Bakterien z.B. α -Toxin von *Staphylococcus aureus*) stattfinden (Aroian & van der Goot, 2007). Nach der Internalisierung von Bakterien in die Wirtszelle können PFT auch intrazellulär von Bakterien abgegeben werden, um aus ihren Phagosomen ins Zytosol zu gelangen (intrazelluläre Bakterien z.B. Lysteriolysin O von *Listeria monocytogenes*) (Cossart & Sansonetti, 2004). Eine Fähigkeit, die alle PFT gemeinsam haben ist, von einer löslichen zu einer transmembranen Form wechseln zu können. Diese Gemeinsamkeit gehört zu ihren bemerkenswertesten Eigenschaften (Gonzalez et al, 2008). PFT werden nach den Strukturen, mit denen sie während der Porenbildung die Lipiddoppelschicht durchspannen, eingeordnet, z.B. als α -Helices (α -PFT) oder als β -Faltblatt (β -PFT) (Iacovache et al, 2008).

Als Vertreter der α -PFT sind die von *Escherichia coli* produzierten Colicine (Lakey & Slatin, 2001; Zakharov & Cramer, 2002), die Actinoporine der Seeanemonen (Kristan et al, 2004), das Diphtheria Toxin des *Corynebacterium diphtheria* (Collier, 2001), das Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa*, sowie das insektizid wirkende Cry Toxin des *Bacillus thuringiensis* zu nennen (Grochulski et al, 1995). α -PFT bilden eine dreischichtige Struktur von bis zu zehn α -Helices, die eine hydrophobe, helikale Haarnadelstruktur umgeben. Vermutlich wird diese zentrale, hydrophobe Haarnadelstruktur durch die teilweise Entfaltung des Proteins bei niedrigen pH-Werten exponiert und kann sich dann spontan in die Membran einfügen (Gonzalez et al, 2008; Parker & Feil, 2005). Im Gegensatz zu den α -PFT besitzen β -PFT keine nachweisbaren hydrophoben Abschnitte (Parker & Feil, 2005).

Die Mehrheit der bakteriellen Toxine bilden die β -PFT. Als Vertreter dieser Klasse muss die große Familie der CDC (cholesterol-dependent cytolysins) (Tweten et al, 2001), die vielen, von *Staphylococcus aureus* gebildeten PFT (Menestrina et al, 2003), die Cyt δ -Endotoxine von *Bacillus thuringiensis* (Bravo et al, 2007) sowie die Translokationsuntereinheiten von verschiedenen AB-Typ Toxinen (Anthrax Toxin) (Young & Collier, 2007) genannt werden (Iacovache et al, 2008). Wie auch die α -PFT werden die β -PFT von den Bakterien in löslicher Form abgesondert. Die β -PFT diffundieren dann frei im extrazellulären Medium zur Zielzelle. Einige β -PFT binden über hochaffine spezifische Rezeptoren (Barrows et al, 2007; Wilke & Bubeck Wardenburg, 2010), aber auch die Bindung über eine Anhäufung von Phosphocholinkopfgruppen innerhalb von Cholesterin-/Sphingomyelin-Mikrodomänen wird diskutiert (Valeva et al, 2006). Sobald die Monomere gebunden haben, oligomerisieren die β -PFT. Dieser Prozess wird von dem Konzentrierungseffekt begünstigt, der durch den Wechsel zwischen dem extrazellulären Raum (3D) und der Membranoberfläche (2D) entsteht. Einige Vertreter der β -PFT-Familie benötigen aber auch die Aktivierung durch wirtsspezifische

Proteasen, um oligomerisieren zu können (Howard & Buckley, 1985; Iacovache et al, 2008). Bei den meisten β -PFT durchspannen die gebildeten Oligomere die Membran aber noch nicht und werden deshalb zunächst Prä-Pore genannt. Für die Insertion der Pore in die Membran ist eine Reihe von weiteren Konformationsänderungen nötig (Iacovache et al, 2008). Während der Oligomerisierung steuert jedes Monomer ein (z.B. bei α -Toxin von *Staphylococcus aureus*) oder zwei (z.B. bei CDC) amphipathische Haarnadelstrukturen bei, um einen amphipathischen Zylinder (β -barrel) aus β -Faltblattstrukturen zu bilden. Dieses β -barrel weist einen hydrophilen Hohlraum und eine hydrophobe Oberfläche auf. Diese Form erlaubt den Einbau in die Doppellipidschicht der Wirtszelle. Die Anzahl der Monomere variiert von sieben im Fall von α -Toxin von *Staphylococcus aureus* bis zu 50 Monomeren bei CDC (z.B. Streptolysin O (SLO)). Auch die Größe der Poren variiert von 2nm Durchmesser bei α -Toxin bis zu 50nm bei CDC. Die Poren von CDC erlauben daher nicht nur den Durchtritt von Ionen (wie bei α -Toxin), sondern sogar von Proteinen in ihrer voll entfalteten Tertiärstruktur (Gonzalez et al, 2008).

1.2.1 *Staphylococcus aureus* α -Toxin

Die Pathogenität von Bakterien beruht auf Virulenzfaktoren, unter anderem der Freisetzung spezialisierter Proteintoxine. PFT sind biologische Waffen, die Zielzellen durch die Bildung von oligomeren Poren töten können (Parker & Feil, 2005). Indem sie die Leukozyten abtöten und somit die Immunabwehr des Wirtes schwächen, ermöglichen die PFT den Bakterien den Zugang zu Nährstofflagern in den Zellen. *Staphylococcus aureus* ist eines der häufigsten Bakterien, die in klinischen Proben isoliert werden. Es ist besonders gefährlich auf Grund der Vielzahl von Infektionen, die es hervorrufen kann, der Häufigkeit Antibiotika-resistenter Stämme und der großen Anzahl von Toxinen, die es ausschütten kann (Menestrina et al, 2003). *Staphylococcus aureus* produziert eine Vielzahl von extrazellulären Proteinen, unter anderem zytolytische Toxine wie das α -, β -, γ - und δ -Hemolysin, einer Coagulase, den Enterotoxinen A-E, TSS (toxic shock syndrom)-Toxin 1 und einige andere. Diese Exoproteine können eine große Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung von Staphylokokken-Infektionen spielen (Tomita & Kamio, 1997).

α -Toxin wird durch die Bakterien als hydrophiles, 34kDa Polypeptid freigesetzt und bindet in monomerischer Form an die Membran der Zielzelle. Das Molekül besteht aus 293 Aminosäuren, enthält kein Cystein und keine ausgedehnten Areale von hydrophoben Aminosäuren (Tomita & Kamio, 1997). Der Zusammenstoß von membrangebundenen Monomeren führt letztendlich zur Bildung von fest verbundenen Heptameren, die die Transmembranpore umgeben. Ob die Bindung der Monomere über ADAM10 (a disintergrin and metalloprotease 10) als hoch affinen Proteinrezeptor für das *Staphylococcus aureus* α -Toxin erfolgt (Wilke & Bubeck Wardenburg, 2010), oder dass Phosphocholinkopfgruppen von Sphingomyelin konzentriert in einer Phosphocholin-Cholesterol Mikrodomäne als Bindungsstelle dienen, wird aktuell kontrovers diskutiert (Valeva et al, 2006). Nach der Bindung bilden nicht-lytische Heptamere eine intermediäre Prä-Pore. Diese Zwischenstufe wird zur vollständigen, wassergefüllten Pore, indem durch eine zweite Konformationsänderung ein kleiner Teil jedes Protomers in die Membran eingefügt wird (Aminosäuren 118-140) (Song et al, 1996; Valeva et al, 1997).

Die Struktur der heptamerischen, aktiven Form des α -Toxins konnte nur durch Kokristallisierung mit einem Detergenz bestimmt werden, da α -Toxin in hohen Konzentrationen die Tendenz hat, amorphe, filamentöse Aggregate zu bilden (Song et al, 1996). Der Proteinkomplex besteht fast ausschließlich aus β -Strukturen und ist wie ein Pilz mit den ungefähren Dimensionen von 100Å x 100Å geformt. Die siebenfach-Symmetrieachse verläuft parallel zum wassergefüllten Kanal, der die gesamte Länge des Proteingefüges durchspannt. An seiner weitesten und engsten Stelle hat der Kanal einen Durchmesser von 46Å beziehungsweise 15Å. Die gesamte Architektur des Proteins wird in drei Domänen aufgeteilt: Die Kappe als externer Part, der Rand, der die Domäne an der Membran verankert und der Stamm, der als β -Barrel die Membran der Zielzelle durchzieht. Die etwa 48Å hohe Kappe ist sehr hydrophil und sitzt mit der Randdomäne auf der extrazellulären Membran auf, entsprechend den Vorwölbungen, die auf elektronenmikroskopischen Bildern zu erkennen sind. Eine 14-strängige β -Barrel-Struktur (jeweils 2 Stränge pro Monomer) bilden die transmembrane Stammdomäne (Montoya & Gouaux, 2003). Geladene Aminosäurereste im Lumen des Stamms bilden gepaart, zwei alternierend geladene Ringe: Glu111-Lys147 an einem Ende und Asp127-Lys131 am anderen Ende. Die α -Toxin Pore ermöglicht den Durchtritt von kleinen Molekülen bis zu einer Größe von 2 kDa und ist selektiv für Anionen (Menestrina et al, 2003).

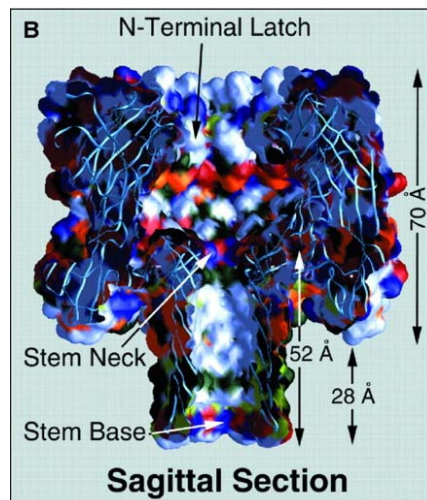


Abb. 1-5: Struktur der α -Toxin-Pore. Der Proteinkomplex besteht fast ausschließlich aus β -Strukturen und ist wie ein Pilz geformt. Die Pore wird in drei Domänen aufgeteilt: Die Kappe als externer Part, der Rand, der die Domäne an der Membran verankert und der Stamm, der als β -Barrel die Membran der Zielzelle durchzieht (Song et al, 1996).

1.2.2 Abwehrmechanismen und Reparatur der Plasmamembran in eukaryotischen Zellen nach Exposition mit porenbildenden Toxinen

Während zuvor die Bakterien und deren Pathogenitätsfaktoren im Mittelpunkt der Forschung standen, wurde 1996 der Begriff „zelluläre Mikrobiologie“ geprägt, um eine neues interdisziplinäres Feld zu definieren, welches Mikrobiologie und Zellbiologie einbezieht (Cossart et al, 1996). Dabei stehen die zellulären Ereignisse in Folge eines bakteriellen Angriffs im Vordergrund. Die Zerstörung der Integrität der Plasmamembran durch porenbildende Toxine hat verheerende Folgen für eine Zelle. Bei Erythrozyten führt die Exposition mit *Staphylococcus aureus* α -Toxin zu kolloidosmotischer Lyse, während α -Toxin bei Zellen, die einen Zellkern enthalten, Nekrose oder Apoptose verursacht. Die Poren machen die Plasmamembran, über ihre elektrochemische Norm hinaus, permeabel für Ionen. Dies führt zu einer starken Veränderung der Ionenzusammensetzung im Zytoplasma der Wirtszelle (Aroian & van der Goot, 2007). Die großen Poren der CDC lassen zusätzlich den Ausfluss intrazellulärer Proteine zu (Walev et al, 2001). Tod und Lyse der Zelle nach einer Membran-Schädigung durch PFT sind aber nicht immer die Folge (Thelestam & Mollby, 1983). Das Eintreten des Zelltods ist abhängig vom Zelltyp und der Dosis der PFT. Kernhaltige Säugetierzellen können ein moderates Maß an Membranschädigung überstehen. Wenn die Zellen einer sublytischen Dosis, wie unter physiologischen Bedingungen bei einer bakteriellen Infektion, ausgesetzt sind, haben die meisten Zellen die Möglichkeit, auf den Angriff mit Reparaturmaßnahmen zu reagieren und eventuell sogar andere Zellen zu warnen (Yarovinsky et al, 2008).

Mechanische Verletzungen oder eine Läsion durch große Membranporen, z.B. wie durch SLO, führen zu einem schnellen Kalzium-abhängigen Austausch der beschädigten Membran. α -Toxin-Poren sind Kalzium-undurchlässig und können nicht durch diesen Mechanismus repariert werden. Stattdessen konnte für HaCaT-Zellen (human non-virally transformed keratinocytes) und Cos7-Zellen (african green monkey ceropithecus fibroblast-like kidney cells) gezeigt werden, dass sie *Staphylococcus aureus* α -Toxin durch Dynamin-abhängige Endozytose des beschädigten Membranabschnitts aufnehmen und so die Poren von der Zelloberfläche entfernen können. Die endozytotisch aufgenommenen Porenkomplexe werden nicht proteolytisch abgebaut, sondern gelangen in Exosom-ähnlichen Strukturen (Toxosomen) wieder ins extrazelluläre Milieu. Allerdings sind nicht alle Zellarten in der Lage, die α -Toxin Läsionen durch diesen Mechanismus zu schließen. Huh7 (hepato cellular carcinoma)-Zellen und HEK-293-Zellen (human embryonic kidney cells) nehmen das α -Toxin nicht auf, können sich somit nicht von den Folgen der Membranperforation erholen und sterben schließlich (Husmann et al, 2009).

Zusätzlich haben eukaryotische Zellen komplexe Verteidigungsmechanismen entwickelt, mit denen sie auf PFT reagieren können. Nach einer Exposition mit α -Toxin produzieren Zellen des Immunsystems eine Reihe inflammatorischer Moleküle wie z.B. IL8 (Interleukin 8) in Folge der Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs (Dragneva et al, 2001). Nicht-Immunzellen reagieren nach der Behandlung mit PFT mit der vermehrten Bildung von Vakuolen (Abrami et al, 1998), Freisetzung von Kalzium aus dem ER oder der Aktivierung des EGF (epidermal growth factor)-Rezeptors und Zellproliferation (Haugwitz et al, 2006). Nicht nur den Zellen des Immunsystems stehen zahlreiche Antwortmöglichkeiten auf einen Angriff mit PFT zur Verfügung. Die Exposition mit PFT kann neben der Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs (Chopra et al, 2000; Walev et al, 2002), des p38 MAPK-Signalwegs (Huffman et al, 2004; Porta et al, 2011), des Inflammasoms (Chopra et al, 2000) und der UPR (Bischof et al, 2008) auch zur Inhibierung der SUMOylierung

(Ribet et al, 2010) und zur Dephosphorylierung von Histonen führen (Hamon et al, 2007). Einige PFT wie das VCC (Vibrio cholera cytolyisin) (Gutierrez et al, 2007), LLO (Listeriolysin O) (Meyer-Morse et al, 2010), SLO (Streptolysin O) und Aerolysin induzieren Pro-Autophagie-Signale.

1.2.3 Signaltransduktionswege

Die Exposition mit Poren-bildenden Toxinen aktiviert verschiedene Kategorien von Signalwegen in den Zellen. Eine Gruppe besteht aus Signalwegen, die mit der Immunantwort zusammenhängen. Dazu zählt die Aktivierung des Inflammasoms und die Regulierung und Expression der entsprechenden Gene. Der zweiten Kategorie gehören Signalwege an, die ohne Transkription ablaufen, wie z.B. die Toxin-induzierte Endo- und Exozytose und auch die MAPK-Signalwege. Diese Signalwege sorgen dafür, dass die Integrität der Plasmamembran, und damit der Ionenzusammensetzung im Zytoplasma, wieder hergestellt wird. Da die ATP-abhängige Reparatur der kleinen *Staphylococcus aureus* α -Toxin Poren einige Stunden in Anspruch nimmt, bringt die dritte Gruppe der Signalwege die Zelle in ein Ruhestadium, indem sie nur ein Minimum an Energie verbraucht. Die Proteintranslation wird gestoppt und Bestandteile des Zytosols werden durch Autophagie recycelt (Gonzalez et al, 2011).

Durch die Permeabilisierung der Plasmamembran durch PFT werden Stress-assoziierte Proteinkinasen als Abwehrreaktion in einigen eukaryotischen Zellen aktiviert (Porta et al, 2011). Der entscheidende Faktor für die Aktivierung der Stresskinase p38 MAPK bei einer Membranperforation durch das *Staphylococcus aureus* α -Toxin ist der Efflux von K^+ -Ionen (Kloft et al, 2009). Der K^+ -Efflux wird aber derzeit nicht nur für die Aktivierung von p38 MAPK, sondern als einer der Hauptregulatoren der zellulären Antwortreaktionen auf einen PFT-Angriff diskutiert. Wird der Toxin-induzierte K^+ -Efflux verhindert, finden kein Translationsstopp und keine Autophagieinduktion statt. Auch die Aktivierung der MAPK p38 und Erk bleibt aus (Gonzalez et al, 2011; Kloft et al, 2009).

1.3 Autophagie von Bakterien

1.3.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus ist ein Gram-positives Bakterium, welches raffinierte Mechanismen entwickelt hat, um der Immunantwort zu trotzen. Zusätzlich tragen zahlreiche, ausgefeilte Virulenzfaktoren zur Vielfalt und Schwere der Staphylokokken-Infektionen bei. *Staphylococcus aureus* hat die Fähigkeit, die Haut und die Schleimhäute der meisten Menschen asymptomatisch zu besiedeln. Geschätzte 20% der Weltbevölkerung sind persistente *Staphylococcus aureus*-Träger. *Staphylococcus aureus* ist die häufigste Ursache für Infektionen von Haut und Weichgewebe. Sobald es in die subkutanen Gewebe eindringen kann und das Blut erreicht, kann *Staphylococcus aureus* beinahe jedes Organ infizieren, vor allem Knochengewebe und Herzklappen. Das Auftreten der hochvirulenten Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämme ist eine ernste und alarmierende weltweite Bedrohung für die Gesundheit. Besonders nennenswert ist die Fähigkeit von *Staphylococcus aureus* kommensal in der menschlichen Nase zu leben, ohne offensichtliche Krankheiten auszulösen. Trotzdem ist die Koloniesierung der Nase ein anerkannter Risikofaktor für eine Staphylokokken-Infektion (Garzoni & Kelley, 2009; Gordon & Lowy, 2008; Lowy, 1998).

Invasion und Persistenz von *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus wurde konventionell als ausschließlich extrazellulär lokalisiertes Bakterium angesehen, obwohl bereits 1986, im Kontext einer gleichzeitigen Inkubation (*in vitro*) von *Staphylococcus aureus* und nicht-professionell-phagozytierenden Endothelzellen von einer intrazellulären Lokalisation von *Staphylococcus aureus* berichtet wurde (Hamill et al, 1986). *Staphylococcus aureus* besitzt auf seiner Oberfläche zwei Fibronektine FnBPA und FnBPB mit denen es an den $\alpha_5\beta_1$ Integrinen seiner Wirtszellen binden kann und damit das Eindringen der Bakterien möglich wird (Sinha & Herrmann, 2005). Es gibt Hinweise darauf, dass *Staphylococcus aureus* zwischen dem klassischen Phänotyp und dem SCV (small colony forming variant)-Phänotyp wechseln können und diese Metamorphose einen wesentlichen Bestandteil des Lebenszyklus darstellt (Garzoni & Kelley, 2009). SCVs sind durch Verringerung der Pigmentierung, des Wachstums und der Hämolyseaktivität sowie durch eine veränderte Resistenz gegenüber Medikamenten gekennzeichnet. Besonders während einer Antibiotikatherapie können SCVs plötzlich auftreten. Die Invasion und Persistenz durch *Staphylococcus aureus* könnte als intrazelluläre Nische, geschützt vor immunologischen Abwehrmechanismen und Antibiotika, als Reservoir für chronische und wiederkehrende Infektionen dienen (Garzoni & Kelley, 2009; Sendi & Proctor, 2009).

1.3.2 Manipulation der Autophagie durch Bakterien

Autophagie ist ein zellautonomer, angeborener Abwehrmechanismus für die Beseitigung intrazellulärer Mikroorganismen aus dem Zytosol. Sie übernimmt einen großen Anteil bei der Entdeckung von mikrobiellen Infektionen durch die Erkennung von DAMPs (danger-associated molecular patterns) und durch die direkte Kontrolle der eingedrungenen, intrazellulären Pathogene (Ogawa et al, 2011). *Mycobacterium tuberculosis* oder Streptokokken der Gruppe A, werden durch Autophagie effektiv abgetötet. Allerdings haben viele Bakterien, die in das Zytosol eindringen und sich dort aufhalten, Mechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen, die Erkennung und Beseitigung durch die Autophagiemaschinerie zu umgehen. Andere Bakterien können Autophagosomen und Signalwege der Autophagie sowie den Prozess der Endozytose unterwandern und zu ihrem Vorteil nutzen. *Listeria monocytogenes* beispielsweise können sich mit Hilfe ihres Toxins LLO aus ihrer Vakuole befreien und ins Zytoplasma flüchten. Um der Erkennung durch Autophagiesignalwege im Zytosol zu entgehen, maskiert sich *Listeria monocytogenes*, indem es die biomimetischen Möglichkeiten seines Oberflächenmoleküls ActA (actin-assembly-inducin-protein) nutzt und sich mit den Proteinen der Wirtszelle Ena/VASP (enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein) und dem Arp 2/3-Komplex (actin-related protein complex) bedeckt. ActA, Ena/VASP und Arp 2/3 ermöglichen *Listeria monocytogenes*, sich durch Actin-Polymerisierung frei im Zytosol bewegen zu können. *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia pestis* nutzen Autophagosomen, die nicht mehr mit Lysosomen fusionieren können, als Replikationsnische, um der Immunantwort zu entgehen. Inwieweit *Staphylococcus aureus* ähnliche Mechanismen nutzt, um den zellulären Abwehrmechanismen zu entgehen, wird aktuell kontrovers diskutiert. Schnaith et al. berichteten 2006, dass sie eine Autophagieinduktion durch *Staphylococcus aureus* schon kurz nach der Endozytose durch HeLa Zellen beobachten konnten. Zunächst befanden sich die Bakterien in Autophagosomen, während die Bakterien zu einem späteren Zeitpunkt in das Zytoplasma gelangten und dort Kaspasen-unabhängig den Zelltod induzierten. Für die Zytotoxizität von *Staphylococcus aureus* erklärten Schnaith et al. die Induktion der Autophagie durch agr (accessory gene regulator)-regulierte Pathogenitätsfaktoren zur Voraussetzung (Schnaith et al, 2007).

1.4 Zielsetzung

Staphylococcus aureus ist weltweit eine der Hauptursachen für chronische und akute Infektionen (Garzoni et al, 2007). Die Schwere und Vielfalt der Staphylokokkeninfektionen sowie die Fähigkeit des Erregers, rasch Resistenzen gegen Antibiotika zu erlangen oder zu entwickeln, ist eine ernste Gesundheitsbedrohung (Fey et al, 2003). Dazu kommt, dass sich Infektionen, die durch MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) verursacht werden, zunehmend auch außerhalb eines Krankenhaus- oder Gesundheitswesen-assoziierten Umfeldes häufen (CA-MRSA oder community-assoziiated MRSA) (Chambers & Deleo, 2009).

Um Infektionen zielgerichtet bekämpfen oder verhindern zu können, muss man verstehen wie das infektiöse Agens mit seinem Wirt interagiert. Während die Erforschung der Wirt-Pathogen-Interaktion im Falle der viralen Erkrankungen schon vor Jahrzehnten zellbiologische Untersuchungen beinhaltete, ist die zelluläre Mikrobiologie bakterieller Erreger ein noch recht junges Feld. Die vorliegende Dissertation befasst sich mit einem Thema aus diesem Gebiet, hierbei liegt der Fokus auf einem Phänomen, dessen Bedeutung für die Interaktion von Bakterien und Zelle erst in allerjüngster Zeit erkannt wurde - der Autophagie.

Ziel war es hier, potentielle Wirkungen des gut charakterisierten Membranporen-bildenden α -Toxins von *Staphylococcus aureus* auf Autophagie-assoziierte Signalwege in humanen Zellen zu erfassen; dabei sollten sowohl Wirkungen berücksichtigt werden, die von extrazellulärem α -Toxin ausgehen wie auch solche, die von α -Toxin herrühren, welches von internalisierten Bakterien produziert wird.

Für diese Arbeiten stand eine breite Palette von Werkzeugen zur Verfügung, die in der Arbeitsgruppe teilweise bereits etabliert worden waren, um umfassende zellbiologische Untersuchungen mit α -Toxin erstmals zu ermöglichen. So lag α -Toxin in aktiver, gereinigter Form vor, ebenso wie nicht-lytische Mutanten, und auch Bakterien, die Wildtyp- oder mutiertes Toxin produzieren, oder keines von beiden. Auch Methoden zur radioaktiven oder Fluoreszenz-Markierung des Toxins waren etabliert.

Die Endozytose des α -Toxins und die Freisetzung unverdauter Oligomere waren kurz vor Beginn der vorliegenden Arbeit durch die Arbeitsgruppe entdeckt worden. Informationen zu einer potentiellen Rolle der Autophagie für die Reaktion von Säugerzellen auf α -Toxin lagen zu Beginn der Arbeit allerdings nicht vor. Jedoch hatten *Gutierrez et al.* postuliert, dass Autophagie als Abwehrmechanismus gegen VCC, ein anderes Mitglied der „small β -barrel-family of PFT“ fungiert, indem Autophagie den Abbau dieses Toxins bewirkt (Gutierrez et al, 2007). Da unsere Arbeitsgruppe aber gefunden hatte, dass (oligomeres) α -Toxin eben nicht effizient abgebaut, sondern von Zielzellen exozytiert wird, stellte sich die Frage, ob α -Toxin überhaupt Autophagie auslöst, und – falls dies der Fall sein sollte – welche Funktion der Autophagie hier zukommen könnte. Der Verdacht, dass α -Toxin Autophagie induzieren könnte, wurde durch Vorarbeiten der Gruppe geweckt, die gezeigt hatten, dass die transiente Perforation von Epithelzellen durch α -Toxin mit einem transienten Stopp der Translation und mit einer transienten Phosphorylierung des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors eIF2 α und der konservierten eIF2 α -Kinase GCN2 und der Expression von GADD34 einhergeht (Haugwitz et al, 2006). Andere Autoren hatten eine essentielle Rolle von GCN2/eIF2 α für die Hunger-assoziierte Autophagie beschrieben (Talloczy et al, 2002).

Vor dem oben beschriebenen Hintergrund sollten ultrastrukturelle, lichtmikroskopische und biochemische Daten gewonnen werden, um zu beurteilen, ob und gegebenenfalls wie, *Staphylococcus aureus* α -Toxin Autophagie-assoziierte Signalwege in Säugerzellen beeinflusst. Diese Untersuchungen führten zu einem Modell der bi-modalen Aktivierung der Autophagie in Abhängigkeit vom Ausgangspunkt des α -Toxin-Angriffs.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Materialien

Chemikalie/Material	Firma
Kultur-Platten 12 well	greiner bio-one, Frickenhausen, DE
Agarose, Type II	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Agarose SeaPlaque®, low gelling temperature agarose derived from agar	FMC®, Rockland, ME, USA
Agarose-Beads, Protein A/G Plus Agarose immunoprecipitation reagent	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Inc.®, Santa Cruz, USA
4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride ≥97%	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Aprotinin from bovine lung, lyophilized powder, 3-8 TIU/mg, solid	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
bisBenzimide H 33342 trihydrochloride for fluorescence, ≥97.0% (HPLC)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Calciumchlorid ≥98 %, getrocknet, Pulver, Chlorcalcium	ROTH GmbH, Karlsruhe, DE
Calpain Inhibitor Peptide ≥95% (HPLC)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Chloramphenicol	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Bestatin hydrochloride ≥98% (HPLC)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Bleicitrat, rein	SERVA FEINBIOCHEMICA, Heidelberg, DE
Chemilumineszenz Kit, BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
BIO-Rad Protein Assay, Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad, München, DE
Blutplatten, Columbia Agar Platten mit 5% Schafsblut, BD BBL™ Stacker Plates	Beckton Dickinson GmbH, Heidelberg, DE
BSA, Albumin Fraktion 5 ≥98%, pulv. bovine	ROTH GmbH, Karlsruhe, DE

Deckgläser	Menzel-Gläser, Thermo Scientific, in vitro diagnostics, Braunschweig, DE
Diamantmesser, DIATOME ultra 45° MF504	W. Reichert Labtec, Wolfratshausen, DE
di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat, Na₂HPO₄	ROTH GmbH, Karlsruhe, DE
DMSO, Dimethylsulfoxid für die Molekularbiologie	ROTH GmbH, Karlsruhe, DE
E 64 Protease Inhibitor	Calbiochem®, Merck, Darmstadt, DE
<i>E.coli</i> T7 S30 Extract System for Circular DNA Kit	Promega GmbH, Mannheim, DE
Epoxy-Einbettungsmittel, Fluka Analytical	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Epoxy-Einbettungsmittel, Härter DDSA, Fluka Analytical	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Epoxy-Einbettungsmittel, Härter, MNA, Fluka Analytical	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Epoxy-Einbettungsmittel, Beschleuniger, Fluka Analytical	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Ethanol ≥99,5% Ph. Eur., reinst.	ROTH GmbH, Karlsruhe, DE
Filterpapier, Rundfilter	Schleicher & Schuell, Dassel, DE
Filterpipettenspitzen, One Touch Barrier Tip 1000µl, 200µl, 10µl	Sorenson Bio Science, Salt Lake City, USA
Fluoprep	BioMérieux®sa, Marcy l'Etoile, FR
Gelatinekapseln, Größe 2	PLANO, GmbH, Wetzlar, DE
Gelfiltrationssäule, PD10 Column, Sephadex G25M	GE Health Care, München, DE
Glasmesser, Glass Strips	LKB-Produkte AB, Bromma, SE
Glaspasteur Pipetten, 150mm	VWR™ International, Darmstadt, DE
Glutaraldehyd, Glutaraldehyde solution, Grade I, 25%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Glycine, minimum 99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Grids, Kupfer-Grids Athene®Grids 200 copper 3,05mm	Ted Pella, Inc., Redding, CA, USA
Grids, Nickel-Grids Athene®Grids 200 Nickel 3,05mm	Ted Pella, Inc., Redding, CA, USA
Hefeextrakt, Bacto™ Yeast Extract	Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA
HEPES, 1M	GIBCO (Invitrogen™), Paisley, UK
Kaliumchlorid, KCl	MERCK, Darmstadt, DE
Kaliumdihydrogenphosphat, KH₂PO₄	MERCK, Darmstadt, DE

Kescher	Balzers Union Aktiengesellschaft, Balzer, LI
Kryoröhrchen, Cryovial® sterile	Simport, Beloeil, QC, CA
Kulturflaschen, Cellstar Tissue Culture Flasks 250ml	greiner bio-one, Frickenhausen, DE
Kulturschalen, Petrischalen Ø 35mm und Ø 94mm	greiner bio-one, Frickenhausen, DE
Leupeptin hemisulfate salt microbial, ≥90% (HPLC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Magnesiumchlorid ≥98,5 %, wasserfrei	ROTH GmbH, Karlsruhe, DE
Medium, DMEM + GlutaMAX™-I	GIBCO (Invitrogen™), Paisley, UK
Medium, DMEM/F-12 + GlutaMAX™-I	GIBCO (Invitrogen™), Paisley, UK
Methylcellulose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Natriumchlorid, NaCl	ROTH GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumsulfat, Na₂SO₄, Suprapur®	MERCK, Darmstadt, DE
Natriumhydroxid, NaOH, Plätzchen	MERCK, Darmstadt, DE
Natriumhydrogencarbonat, Na₂HCO₃, NP40, IGEPAL (CA-630)	MERCK, Darmstadt, DE Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Objektträger, Mattrand	DIAGONAL GmbH & Co. KG, Münster, DE
OptiPrep™ Density Gradient Medium	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Osmiumtetroxid, osmium tetroxide 99+%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Parafilm	PECHINEY PLASTIC PACKAGING, Menasha, WI, USA
Paraformaldehyd, reinst.	MERCK, Darmstadt, DE
PenStrep	GIBCO (Invitrogen™), Paisley, UK
Pepstatin A, microbial	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Phosphatase Inhibitor Cocktail, PhosSTOP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Pinzette, Dumostar, Präzision Typ 5	PLANO GmbH, Wetzlar, DE
Pipetten, Cellstar 10ml und 25ml Pipetten	greiner bio-one, Frickenhausen, DE
Pasteur Pipetten Kunststoff, Einweg-Pasteurpipetten, graduiert	ROTH GmbH, Karlsruhe, DE
Polyvinylpyrrolidon, Molecular Biology Reagent	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Protein G Sepharose Säule	Amersham, GE- Healthcare, München, DE
Protease Inhibitor Cocktail, complete Mini EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE

Protein Labeling Kit, Alexa Fluor®546 Protein Labeling Kit	Molecular Probes® (Invitrogen™), Paisley, UK
Rifampicin	SIGMA-Aldrich Inc., St.Louis, MO, USA
[³⁵S]-Methionin 1mCi/ml, NEG 709A00	Perkin Elmer, Rodgau, DE
Schnappdeckelgläser, 7ml Glass Vials	Agar Scientific, Essex, UK
Schnappdeckel und Becher 125ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, DE
SDS, Sodiumdodecylsulfat, ultrapure ≥ 99% f. d. Elektrophorese	ROTH GmbH, Karlsruhe, DE
Spritzen, Omnifix®	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Sucrose, C₁₂H₂₂O₁₁, analytical grade	SERVA FEINBIOCHEMICA, Heidelberg, DE
Sucrose ≥99.5% (GC)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
SynapTEK™, GridStick™ Kit	Pelco®, Ted Pella, Inc., Redding, CA, USA
Tannin, Gerbsäure purum, Tannin 86,3%, Nicht-Tannin 6,5%, Wasser 7,2%	ROTH GmbH, Karlsruhe, DE
Transfektionsreagenz, jet PEI™DNA Transfection Reagent	Polyplus Transfektion™, Illkirch, FR
Transfektionsreagenz, AMAXA™Cell Line Nucleofector™KitV	LONZA, Amaxa biosystems, Köln, DE
Tris Ultra Qualität, PUFFERAN® ≥99,9%	ROTH Gumbly, Karlsruhe, DE
Triton X 100	ROTH Gumbly, Karlsruhe, DE
Trypsin, 0,5% Trypsin-EDTA (10x)	GIBCO (Invitrogen™), Paisley, UK
Trypton, Bacto™Tryptone	Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA
Verstärker, Amplify Fluorographic Reagent	Amersham Biosciences, GE, München, DE
Zellschaber, Cell Scraper 23cm, NUNK™ Brand Produkts	Thermo Scientific, Langenselbold, DE
Zentrifugenröhrchen, Cellstar Tubes 15ml und 50ml	greiner bio-one, Frickenhausen, DE
Zentrifugenröhrchen Glas	Spezialanfertigung

Tabelle 2-1: Chemikalien und Material

2.1.2 Antikörper

Primäre Antikörper

Anti-Alpha Tubulin T5168, mouse monoclonal; SIGMA-Aldrich, Inc.; St.Louis, MO; USA

Anti-Caveolin-1 (N20), produced in rabbit; SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Inc.®; Santa Cruz; USA

Anti-E-Cadherin, Uvomorulin, L-CAM clone 5H9 (mouse mAb); MONOSAN®, Uden; NL

Anti-EIF2S1 (phospho S51) antibody [E90] (rabbit mAb); abcam plc; Cambridge; UK

Anti-Galectin-3 (M3/38), produced in rat; SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Inc.®; Santa Cruz; USA

Anti-IgG Light Chain (IVA285-1), produced in mouse; SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Inc.®; Santa Cruz; USA

Anti-LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3B) clone SF10 (mouse mAb); nanoTools Antikoerper Technik GmbH&Co.; Teningen; DE

Anti-Phospho-AMPK (Thr 172)(40H9) (rabbit pAb); CellSignaling Technology®, Inc.; Danvers, MA; USA

Anti-SQSTM/p62 (mouse mAb); abcam plc; Cambridge; UK

Anti-Staphylococcal α -Toxin (α -Hemolysin), produced in rabbit; SIGMA-Aldrich, Inc.; St.Louis, MO; USA

Anti-Ubiquitin (P4D1) (mouse mAb); CellSignaling Technology®, Inc.; Danvers, MA; USA

Anti-Ubiquitin (multi ubiquitin chains)(mouse mAb); Stressgen Biotechnologies; SanDiego; CA; USA

Sekundäre Antikörper/ F(ab)₂-Fragmente

Antikörper gegen Maus:

Alexa Fluor®488 goat anti-mouse IgG (H+L); highly cross-absorbed; Molecular Probes®; Oregon; USA

Alexa Fluor®594 goat anti-mouse IgG (H+L); highly cross-absorbed; Molecular Probes®; Oregon; USA

Alexa Fluor®647 goat anti-mouse IgG (H+L); highly cross-absorbed; Molecular Probes®; Oregon; USA

Antikörper/F(ab)₂-Fragmente gegen Hase:

Alexa Fluor®488 goat anti-rabbit IgG (H+L); Molecular Probes®; Oregon; USA

Alexa Fluor®594 goat anti-rabbit IgG (H+L); Molecular Probes®; Oregon; USA

Alexa Fluor®647 goat anti-rabbit IgG (H+L); highly cross-absorbed; Molecular Probes®; Oregon; USA

Goat anti-Rabbit IgG F(ab')₂ (H+L) (AH) 10nm gold conjugate; BBI British BioCell International; Cardiff; UK

Anti-Rabbit IgG HRP-linked Antibody (7074); CellSignaling Technology®, Inc.; Danvers, MA; USA

Antikörper gegen Ratte:

Alexa Fluor®488 goat anti-rat IgG (H+L); Molecular Probes®; Oregon; USA

2.1.3 Geräte

Gerät	Firma
Brutschrank Zellkultur	Binder, Tuttlingen, DE
Brutschrank Bakterienkultur	Heraeus Instruments, Langenselbold, DE
Bunsenbrenner, Fireboy eco	IBS, Integra Bio Science, Fernwald, DE
Elektronenmikroskop, Zeiss EM 109	Carl ZEISS, Jena, DE
Epifluoreszenzmikroskop, Axiovert 200M mit Plan-Apochromat 100x/1.4oil Objektiv	Carl ZEISS, Jena, DE
Gefrierschrank -20°C Liebherr Premium	Liebherr, Biberach, DE
Gefrierschrank -20°C Bosch economic-super	Bosch, Stuttgart, DE
Gefrierschrank -70°C, Hera freeze	Heraeus Instruments, Langenselbold, DE
KnifeMaker	W. Reichert Labtec, Wolfratshausen, DE
Kryo-Ultramikrotom, Ultracut E mit FC4E, Reichert-Jung	W. Reichert Labtec, Wolfratshausen, DE
Kühlzentrifuge, GPKR Centrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld, DE
Laserscanmikroskop, Zeiss 510 Meta-Microscope mit Plan-Apochromat 63x/1.4oil Objektiv	Carl ZEISS, Jena, DE
Nanodrop, ND 1000 Spektrometer	Peqlab, Biotechnologie, Erlangen, DE
Neubauerkammer, Neubauer improved	ROTH GmbH, Karlsruhe, DE
Ofen, Advantage-Lab	Advantage-Lab GmbH, Schilde, BE
Phasenkontrastmikroskop, Wilovert	Will, Wetzlar, DE
pH-Meter, WTW pH320	WTW, Weilheim, DE
Pipetus®-junior	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, DE
Rotierscheibe, Model-Nr.1053	Ted Pella, Inc., Redding, CA, USA
Schüttler Inkubator, GFL	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, DE
Schüttler	Edmund Bühler Laborgeräte, Glastechnik, Umwelttechnik, Tübingen, DE
Schüttler Inkubator, controlled environment incubator shaker	New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, N.J., USA
Spannungsquelle, Desatronic 500/400	DESAGE, Heidelberg, DE
Spektrometer, Ultraspec 2100 pro, UV/Visible	Amersham Biosciences, GE-Healthcare, München, DE

Sterilbank, Mikroflow, Biological safety cabinet	Astec, Bioquell, Hampshire, UK
Transfektionsgerät, Nucleofector®II	LONZA, Amaxa biosystems, Köln, DE
Trimmfräse Leica EM Trim	Leica AG, Solms, DE
Ultramikrotom, Ultracut E, Reichert-Jung	W. Reichert Labtec, Wolfratshausen, DE
Ultrazentrifuge, Optima™ LE-80K	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
Waage, Mettler P5,	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, DE
Waage, Feinwaage 1201 MP2	Sartorius AG, Göttingen, DE
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Uetze, DE
Wasserbadrüttler, Certomat WR	B. Braun Biotech International, Sartorius AG BBI Systems, Göttingen, DE
Wasserstrahlpumpe	ROTH GmbH, Karlsruhe, DE

Tabelle 2-2: Geräte

2.1.4 Software und Datenbanken

Programm	Firma
AxioVision Release 4.8.2	Carl Zeiss GmbH, Heidelberg, DE
Carl Zeiss AxioVision LE, Release 4.3	Carl Zeiss Vision GmbH, DE
Laser Scanning Microscope LSM 510 Version 3.2 SP2	Carl Zeiss GmbH, Heidelberg, DE
LSM Image Browser, Release 4.2	Carl Zeiss GmbH, Heidelberg, DE
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems Inc.
EndNote X4	Thomson Reuters
Microsoft® Office Word 2007	Microsoft Corporation
Microsoft® Office Power Point 2007	Microsoft Corporation
Microsoft® Office Excel 2007	Microsoft Corporation
ITEM 5.0	Soft Imaging Systems, Münster, DE
IrfanView	IrfanView Inc.

Tabelle 2-3: Software und Datenbanken

2.1.5 Lösungen und Puffer

A

3% Agarose: 3% (w/v) Agarose in Aqua dest. (entspricht: 30g Agarose ad 1l Aqua dest.)

3% low gelling Agarose: 3% (w/v) low gelling Agarose in Aqua dest.

(entspricht: 30g low gelling Agarose ad 1l Aqua dest.)

Ammoniumsulfat 10%: 44 μ M Ammoniumsulfat in Aqua dest.

(entspricht: 100g Ammoniumsulfat ad 1l Aqua dest.)

B

Base-Puffer: 20mM Tris-HCl (pH 7,4), 250mM Sucrose, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ in Aqua dest.

(entspricht: 20ml Tris-HCl (pH 7,4) +85,5g Sucrose +111mg CaCl₂ +95,2mg MgCl₂ ad 1l Aqua dest.)

Base-Puffer + Inhibitoren: 20mM Tris-HCl (pH 7,4), 250mM Sucrose, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 0,2mM Aminoethyl-benzene-sulfonylfluoride, 0,1% (w/v) Aprotinin, 10 μ M Bestatin, 3 μ M E-64, 1% (w/v) Leupeptin, 2 μ M Pepstatin, 5% (w/v) Calpain-Inhibitor in Aqua dest.

(entspricht: 20ml Tris-HCl (pH 7,4) +85,5g Sucrose +111mg CaCl₂ +95,2mg MgCl₂ +400 μ l Aminoethyl-benzene-sulfonylfluoride (0,5M) +20 μ g Aprotinin, 1ml Bestatin (50mM), 300 μ l E-64 (10 mM) + 2g Leupeptin + 1,36g Pepstatin, 50mg Calpain-Inhibitor ad 1l Aqua dest.)

0,2% Bleicitratlösung: 100 μ M NaOH, Bleicitrat 2 μ M in Aqua dest. (entgast)

(entspricht: 10ml NaOH 10M+ 2g Bleicitrat ad 1l Aqua dest. (entgast))

Bradford-Reagenz: 200ml Bio-Rad Protein Assay Farbstoffkonzentrat ad 1l Aqua dest.

1% BSA (Albumin Fraktion V) in PBS: 0,17 μ M BSA in PBS

(entspricht: 8g NaCl +0,2g KCl +1,4g Na₂HPO₄ +0,24g KH₂PO₄ ad 1l Aqua dest., titriert auf pH 7,4 +10g Albumin Fraktion V)

3%BSA (Albumin Fraktion V) in PBS: 0,5 μ M BSA in PBS

(entspricht: 8g NaCl +0,2g KCl +1,4g Na₂HPO₄ +0,24g KH₂PO₄ ad 1l Aqua dest., titriert auf pH 7,4 +30g Albumin Fraktion V)

C

Chloramphenicol-Lösung: Chloramphenicol 0,1M in Ethanol 96%

(entspricht: 33g ad 1l Ethanol 96%)

E

Elektrophoresepuffer: Tris 25 μ M, Glycin 0,2M, SDS 3,5 μ M in Aqua dest.

(entspricht: 3g Tris +14g Glycin +1g SDS ad 1l Aqua dest.)

Epon: 45,92% Epoxy-Einbettungsmittel, Fluka Analytical, 25,58% Epoxy-Einbettungsmittel, Härter DDSA, Fluka Analytical, 27,5% Epoxy-Einbettungsmittel Härter, MNA, Fluka Analytical 0,97% Epoxy-Einbettungsmittel, Beschleuniger, Fluka Analytical

(entspricht für 1l Epon: 459,2ml Epoxy-Einbettungsmittel, Fluka Analytical +255,8ml Epoxy-Einbettungsmittel, Härter DDSA, Fluka Analytical, +275,3ml Epoxy-Einbettungsmittel Härter, MNA, Fluka Analytical +9,7ml Epoxy-Einbettungsmittel, Beschleuniger, Fluka Analytical)

30% Ethanollösung: 30% (v/v) EtOH \geq 99,5% in Aqua dest.

(entspricht: 300ml EtOH \geq 99,5% ad 1l Aqua dest.)

50% Ethanollösung: 50% (v/v) EtOH \geq 99,5% in Aqua dest.

(entspricht: 500ml EtOH \geq 99,5% ad 1l Aqua dest.)

70% Ethanollösung: 70% (v/v) EtOH \geq 99,5% in Aqua dest.

(entspricht: 700ml EtOH \geq 99,5% ad 1l Aqua dest.)

80% Ethanollösung: 80% (v/v) EtOH \geq 99,5% in Aqua dest.

(entspricht: 800ml EtOH \geq 99,5% ad 1l Aqua dest.)

G

0,1M Glycin-HCl-Puffer: 0,1M Glycin in Aqua dest.; pH 2,7

(entspricht: 7,5g Glycin ad 1l Aqua dest., mit HCl titriert auf pH 2,7)

H

Höchst-Stocklösung: bisBenzimide H 33342 trihydrochloride 16 μ M in Aqua dest.

(entspricht: 10g bisBenzimide H 33342 trihydrochloride ad 1l Aqua dest.)

Höchst/PBS: 3,3% (v/v) bisBenzimide H 33342 trihydrochloride-Stocklösung in PBS

(entspricht: 33 μ l ad 1l PBS)

L

Luria-Bertani-Bouillon: 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, NaCl 0,18M in Aqua dest.; pH 7,4

(entspricht: 10g Trypton + 5g Hefeextrakt + 10gNaCl ad 1l Aqua dest., titriert auf pH 7,4)

M

2% Methylzellulose: Methylzellulose 97,9 μ M in Aqua dest.

(entspricht: 20g Methylzellulose ad 1l Aqua dest.)

Methylzellulose/Uranylacetatlösung: 1:10 aus 2% Uranylacetatlösung und 2% Methylzellulose

5% MMP/TBST: 5%(v/v) MMP (Magermilchpulver) in TBST

(entspricht: 50g MMP (Magermilchpulver) ad 1l TBST)

N

1M NaCl: NaCl 1M in Aqua dest.

(entspricht: 58,4g NaCl ad Aqua dest.)

1% Natriumsulfatlösung: Na₂SO₄ 70,4μM, 20μM HEPES in Aqua dest.

(entspricht: 10g Na₂SO₄ +20ml 1M HEPES ad 1l Aqua dest.)

NP-40-Lysepuffer: 5% (v/v) 1M Tris-HCl (pH 7,4), 30% (v/v) 1M NaCl, 0,2% (v/v) IGEPAL CA-630(NP40), 1 Tablette pro 10ml Protease Inhibitor Cocktail, 1 Tablette pro 10ml Phosphatase Inhibitor Cocktail in Aqua dest.

(entspricht: 50ml 1M Tris-HCl (pH 7,4) +300ml 1M NaCl +2ml IGEPAL CA-630(NP40) +100 Tabletten Protease Inhibitor Cocktail +100 Tabletten Phosphatase Inhibitor Cocktail ad 1l Aqua dest.)

O

1% Osmiumtetroxidlösung: 0,4μM OsO₄ in PBS

(entspricht: 8g NaCl +0,2g KCl +1,4g Na₂HPO₄ +0,24g KH₂PO₄ ad 1l Aqua dest., titriert auf pH 7,4 +10ml OsO₄)

P

2% Paraformaldehyd (CH₂O)/PBS: CH₂O 6,7μM, NaCl 0,14M, KCl 2,7μM, Na₂HPO₄ 9,9μM, KH₂PO₄ 1,8μM in Aqua dest.

(entspricht: 8g NaCl +0,2g KCl +1,4g Na₂HPO₄ +0,24g KH₂PO₄ ad 1l Aqua dest., titriert auf pH 7,4 + 20g CH₂O)

PBS: NaCl 0,14M, KCl 2,7μM, Na₂HPO₄ 9,9μM, KH₂PO₄ 1,8μM in Aqua dest.; pH 7,4

(entspricht: 8g NaCl +0,2g KCl +1,4g Na₂HPO₄ +0,24g KH₂PO₄ ad 1l Aqua dest., titriert auf pH 7,4)

Pepsin: 1% (w/v) Pepsin in Aqua dest. (entspricht 10mg/ml Aqua dest. (ca. 4000U/mg = 40U pro 1μl))

Probenpuffer ohne Mercaptoethanol: 13% (v/v) 4xTris/SDS-Puffer (pH 6,8), 10% (v/v) Glycerol, 2% (w/v) SDS, 0,5% Bromphenolblau in Aqua dest.

(entspricht: 130ml 4xTris/SDS (pH 6,8) Puffer +100ml Glycerol +20g SDS +5g Bromphenolblau ad 1l Aqua dest.)

Probenpuffer mit Mercaptoethanol: 13% (v/v) 4xTris/SDS Puffer (pH 6,8) +10% (v/v) Glycerol +5% (v/v) 2-Mercaptoethanol +2% (w/v) SDS +0,05% (w/v) Bromphenolblau in Aqua dest.

(entspricht: 130ml 4xTris/SDS (pH 6,8) Puffer +100ml Glycerol +50ml 2-Mercaptoethanol +20g SDS +5g Bromphenolblau ad 1l Aqua dest.)

S

2M-Sucroselösung: Sucrose 2M, 20 μ M Polyvinylpyrrolidon (MW10000), NaCO₃ 1M, Na₂HPO₄ 66 μ M, NaN₃ 15,3 μ M in Aqua dest.

(entspricht: 684g Sucrose +200g Polyvinylpyrrolidon (MW10000) +91,2g NaCO₃ +14,2g Na₂HPO₄ +1g NaN₃ ad 1l Aqua dest.)

2,3M Sucroselösung: Sucrose 2,3M, Polyvinylpyrrolidon (MW10000) 20 μ M, NaCO₃ 1M, Na₂HPO₄ 66 μ M in Aqua dest.

(entspricht: 786,6g Sucrose +200g Polyvinylpyrrolidon + 91,2g NaCO₃ +14,2g Na₂HPO₄ ad 1l Aqua dest.)

T

Tanninlösung: Tannin 0,1% (w/v), HEPES 50 μ M in Aqua dest.

(entspricht: 1g Tannin +50ml HEPES 1M ad 1l Aqua dest.)

TBST: Tris 50 μ M, NaCl 0,15M, Tween 0,1% (v/v) in Aqua dest.

(entspricht: 6g Tris +8,8g NaCl +1ml Tween ad 1l Aqua dest., titriert auf pH 7,5)

Transferpuffer: Tris 48 μ M, Glycin 39 μ M, SDS 13 μ M, 20% (v/v) Methanol in Aqua dest.

(entspricht: 5,8g Tris +2,9g Glycin +3,75g SDS +200ml Methanol ad 1l Aqua dest.)

20mM Tris-HCl: Tris 20mM in Aqua dest.; pH 7,5

(entspricht: 2,4gTris ad 1l Aqua dest., mit HCl titriert auf pH 7,5)

0,5M Tris-HCl-Puffer: Tris 0,5M in Aqua dest.; pH 9

(entspricht: 60,57g Tris ad 1l Aqua dest., mit HCl titriert auf pH 9)

1M Tris-HCl: Tris 1M in Aqua dest. +HCl, pH7,4

(entspricht: 121,14g Tris ad 1l Aqua dest., mit HCl titriert auf pH7,4)

4xTris/SDS pH 6,8 Puffer: Tris 0,5M, SDS 14 μ M in Aqua dest.

(entspricht: 60,6g Tris +4g SDS ad 1l Aqua dest., titriert auf pH 6,8)

4xTris/SDS pH 8,8 Puffer: Tris 1,5M, SDS 14 μ M in Aqua dest.

(entspricht: 181,7g Tris +4g SDS ad 1l Aqua dest., titriert auf pH 8,8)

0,1% Triton X 100 in PBS: 0,1% Triton X 100 (v/v) in PBS

(entspricht: 8g NaCl +0,2g KCl +1,4g Na₂HPO₄ +0,24g KH₂PO₄ ad 1l Aqua dest., titriert auf pH 7,4 +1ml Triton X 100)

1x Trypsin: 1:10 Verdünnung von Invitrogen Gibco® 0,5% 10x Trypsin-EDTA mit PBS

U

2% Uranylacetatlösung: UO₂(CH₃COOH)₂ 59 μ M in Aqua dest.

(entspricht: 20g Uranylacetat ad 1l Aqua dest.)

5% Uranylacetatlösung: $UO_2(CH_3COOH)_2$ 0,15M in Aqua dest.

(entspricht: 50g Uranylacetat ad 1l Aqua dest.)

W

Waschpuffer I: 6,25% (v/v) Tris-HCl 1M (pH7,4), 18,75% (v/v) NaCl 1M, 0,16% (v/v) IGEPAL CA-630(NP40), in Aqua dest.

(entspricht: 62,5ml Tris-HCl 1M (pH7,4) +187,5ml NaCl 1M + 1,6ml IGEPAL CA-630(NP40) ad 1l Aqua dest.)

Waschpuffer II: 6,25% (v/v) Tris-HCl 1M (pH7,4), 0,36% (v/v) NaCl 1M, 0,16% (v/v) IGEPAL CA-630(NP40) in Aqua dest.

(entspricht: 62,5ml Tris-HCl 1M (pH7,4) +3,60 ml NaCl 1M + 1,6ml IGEPAL CA-630(NP40) ad 1l Aqua dest.)

Waschpuffer III: 6,25% (v/v) Tris-HCl 1M in Aqua dest.

(entspricht: 62,5ml Tris - HCl 1M (pH7,4) ad 1l Aqua dest.)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Bakterienkultur

Zelllinien, Bakterienstämme und α -Toxin-Varianten

Zelllinie	Eigenschaften	Kulturmedium	Referenz
HaCaT	humane Keratinozyten	DMEM/F-12 + GlutaMAX TM -I (Gibco) mit 10% FCS, 10mM HEPES, 100 units/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin	(Boukamp et al, 1988)
Huh7	humane Leberkarzinomzellen	DMEM/F-12 + GlutaMAX TM -I (Gibco) mit 10% FCS, 10mM HEPES, 100 units/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin	(Nakabayashi et al, 1982)
ODORA	Vorläuferzellen von Riechsinneszellen der Ratte	DMEM/F-12 + GlutaMAX TM -I (Gibco) mit 10% FCS, 10mM HEPES, 100 units/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin	(Murrell & Hunter, 1999)
MEF_{wt}	embryonale Fibroblasten der Maus	DMEM + GlutaMAX TM -I (Gibco) mit 10% FCS, 10mM HEPES, 100 units/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin	(Drab et al, 2001)
MEF_{cav-/-}	embryonale Fibroblasten der Maus; Caveolin defizient	DMEM + GlutaMAX TM -I (Gibco) mit 10% FCS, 10mM HEPES, 100 units/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin	(Drab et al, 2001)

Tabelle 2-4: Zelllinien

Stamm	Eigenschaften	Kulturmedium	Referenz
<i>Staphylococcus aureus</i> hla(-)	entspricht dem Stamm DU 1090 (Variante von 8324-4 mit Deletion im hla-Gen) produziert kein α -Toxin	Columbia-Platten oder LB-Medium ohne Chloramphenicol	(Jursch et al, 1994)
<i>Staphylococcus aureus</i> hla(+)	entspricht DU 1090 (Variante von 8324-4 mit Deletion im hla-Gen); durch die Transformation von Plasmid pDU1212 kann der Stamm α -Toxin produzieren und besitzt die Resistenz gegen	Columbia-Platten oder LB-Medium + 33mg/l Chloramphenicol	(Jursch et al, 1994)

Chloramphenicol			
<i>Staphylococcus aureus</i> hla(mut)	entspricht DU 1090 (Variante von 8324-4 mit Deletion im hla-Gen); durch die Transformation von Plasmid pD152c kann der Stamm D152c- α -Toxin produzieren und besitzt die Resistenz gegen Chloramphenicol	Columbia-Platten oder LB-Medium + 33mg/l Chloramphenicol	(Jursch et al, 1994) (Walker & Bayley, 1995)

Tabelle 2-5: Bakterienstämme

α -Toxin-Variante	Modifikation	Phänotyp (Unterschiede zu wt- α -Toxin)
α -Toxin	keine	keine
K21c- α -Toxin	Austausch des Lysinrestes an Position K21 durch ein Cystein	keine
K131c- α -Toxin	Austausch des Lysinrestes an Position K131 durch ein Cystein	geringere hämolytische Aktivität
D152c- α -Toxin	Austausch des Lysinrestes an Position D152 durch ein Cystein	keine/extrem geringe hämolytische Aktivität

Tabelle 2-6: Toxin-Varianten

Zellkultur

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte mit Ausnahme der MEF_{wt}- und MEF_{cav-/-}-Zellen in MEF-Zelllinien wurde DMEM/F-12 + GlutaMAXTM-I (Gibco) Medium. Für die MEF-Zelllinien wurde DMEM + GlutaMAXTM-I (Gibco) verwendet. Den Medien wurden 10% FCS, 10mM HEPES und 100 Units/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin zugesetzt. MEF-, HaCaT- und Huh7-Zellen wurden bei 37°C, ODORA nur bei 33°C, bei einer CO₂-Sättigung von 5% in Zellkulturflaschen im Brutschrank gehalten. Die Zellen wurden entsprechend ihres Wachstums einmal bis zweimal pro Woche gesplittet.

Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um adhärent wachsende Zellen, die durch Trypsin vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst werden mussten. Dafür wurde das Medium unter sterilen Bedingungen abgenommen und die Zellen mit 10ml PBS gewaschen, um Mediumreste von den Zellen zu entfernen. Anschließend wurde das PBS abgenommen und die Zellen mit 2ml Trypsin (0,05%) bei 37°C bzw. 33°C für einige Minuten bis zur Ablösung der Zellen inkubiert. Um das Trypsin wieder zu entfernen, wurden die Zellen mit 5ml Medium aus den Kulturflaschen gespült, in ein steriles 15ml Kunststoffzentrifugenröhrchen überführt und bei 200-300 g 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5ml Medium resuspendiert. 1ml der Zellsuspension wurde anschließend mit 20ml Medium verdünnt und wie beschrieben in Zellkulturflaschen kultiviert oder es wurde für die jeweiligen Versuche die Zelldichte bestimmt und ausgesät.

Bakterienkultur

Die *Staphylococcus aureus*-Varianten wurden einmal wöchentlich auf neuen Columbia-Platten ausgestrichen, für 24h bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert. Dabei wurde jedes Mal die hämolytische Aktivität der *Staphylococcus aureus*-Varianten beurteilt. In Vorbereitung auf einen Versuch wurde 2ml Luria-Bertani-Bouillon mit den Bakterien inokuliert und für 24h in einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Um den Selektionsdruck für den Erhalt der Plasmide DU1212 und D152c aufrecht zu erhalten, wurde der Nährlösung 33mg/l Chloramphenicol zugesetzt.

Sterilisationsverfahren und Entsorgung von Zellmaterial

Für die Zell- und Bakterienkultur wurde vorwiegend sterile Einwegkunststoffware benutzt. Glasgefäße, Lösungen, Puffer und Nährmedien wurden vor Gebrauch im Autoclaven bei 121°C sterilisiert. Lösungen und Materialien, die mit Zellmaterial in Berührung kamen, wurden vor ihrer Entsorgung ebenfalls im Autoclaven sterilisiert.

2.2.2 Plasmide und Transfektion

Plasmide

Plasmid	Insert	Vektor backbone/ Ursprungsvektor	Herkunft/Referenz	
28024: DsRed-p62	p62/SQSTM1 sequestosome	ClonTech pDsRed2-C1	Addgene; Cambridge; USA	(Fan et al, 2010)
24296: pEGFP-C1- hUVRAG	UVRAG UV irradiation resistance- associate gene	ClonTech pEGFP-C1	Addgene; Cambridge; USA	(Itakura et al, 2008)
21636: pEGFP- Rubicon	Rubicon	ClonTech pEGFP-C2	Addgene; Cambridge; USA	(Matsunaga et al, 2009)
21898: CHOP- GFP	CHOP-Promotor	Promega pGL3 und pGL2	Addgene; Cambridge; USA	(Novoa et al, 2001)
pEGFP- C1-CReP	CReP	ClonTech pEGFP-C1	AG Husmann, Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene; Mainz; DE	
pEGFP- LC3	LC3	ClonTech pEGFP-C1	Prof. Yoshimori, Research Institute for Microbial Disease, Osaka; JPN	
pEGFP- Atg14L	Atg14L/Barkor	ClonTech pEGFP-C2	Addgene; Cambridge; USA	(Matsunaga et al, 2009)
pEGFP- Rab5- Q79L	Rab5Q79L	Rab5Q79L-Gen- Fragment kloniert in Plasmid 6HisT-pET11	Marino Zerial, Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden, DE	(Stenmark et al, 1994)
pK21c	K21c- α -Toxin	pT7Sf1A		(Walker & Bayley, 1995)
pK131c	K131c- α -Toxin	pT7Sf1A		(Walker & Bayley, 1995)

pD152c	D152c- α -Toxin	pT7Sf1A	(Walker & Bayley, 1995)
pDU1212	α -Toxin	<i>Hla</i> -Gen-Fragment aus pDU1148 kloniert in pBR322 mit CM ^r -Gen-Fragment aus pCW59	(Fairweather et al, 1983)

Tabelle 2-7: Plasmide

Plasmidkarte

Plasmid pEGFP-C1-CReP:

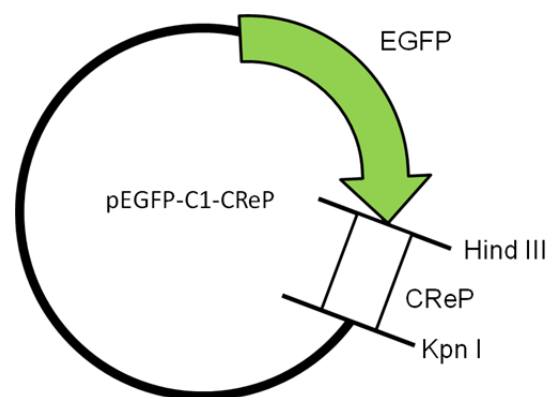


Abb. 2-1: Plasmidkarte pEGFP-C1-CReP. PPP1R15B (CReP)-full length cDNA aus Plasmid clone IRATp970E0986D von imaGenes kloniert in ClonTech pEGFP-C1 über HindIII/KpnI.

Transfektion

Die Transfektion von Plasmiden wurde mittels Elektroporation im AMAXA® Nucleofector® II mit Cell Line Nucleofector Kit V oder mittels Polyethylenimin jetPEI™ (Polyplus-transfection SA, France) nach Kit-Anleitung durchgeführt.

Alle Lösungen waren in AMAXA® Nucleofector® II mit Cell Line Nucleofector Kit V und jetPEI™ (Polyplus-transfection SA, France)-Kit enthalten.

2.2.3 *Staphylococcus aureus* α -Toxin

α -Toxin-Aufreinigung

α -Toxin wurde aus der *Staphylococcus aureus*-Variante hla(+) isoliert und aufgereinigt (Valeva et al, 1996). Nach der Isolierung und Reinigung von α -Toxin liegt das Toxin in Ammoniumacetat vor und muss für die weitere Verwendung in PBS umgepuffert werden. Dazu wurde eine PD10-Säule (Sephadex G25M) mit 70ml PBS über Nacht equilibriert. Am Folgetag wurde die Säule mit α -Toxin beladen und dreimal mit PBS gespült. Der Durchlauf wurde in 0,5ml-Fractionen aufgefangen. Von jeder Fraktion wurden 2 μ l mit 100 μ l Bradfordreagenz (1:5 Verdünnung) gemischt. Die Fraktionen, die einen Farbumschlag aufwiesen, wurden vereinigt. Wiederum 2 μ l des Pools wurden mit 1ml Bradfordreagenz gemischt. Nach Messung der Absorption bei 595nm, konnte die Proteinkonzentration errechnet werden. Als Referenz dienten 2 μ l PBS mit 1ml Bradfordreagenz .

$$\text{Konzentration [mg/ml]} = \frac{\text{Absorption bei 565nm} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{50}$$

Fluoreszenzmarkierung von α -Toxin

Für die direkte Markierung von α -Toxin mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor®546 wurde das Protokoll des Alexa Fluor®546 Protein Labeling Kits von MOLECULAR PROBES® benutzt. Der reaktionsfähige Farbstoff aus dem Protein-Labeling-Kit enthält eine Succinimidylestergruppe, die mit primären Aminen des α -Toxins reagieren kann, um ein stabiles Protein-Farbstoff-Konjugat zu bilden.

Dazu wurden 0,5ml α -Toxin (2 μ g/ml in PBS) in 50 μ l Natriumbicarbonatlösung 1M verdünnt, um den pH auf 7,5-8,5 zu erhöhen. Anschließend wurde die α -Toxin-Lösung mit der Markierungslösung vermischt und für 1h bei Raumtemperatur gerührt.

Nach der Markierungsreaktion musste ungebundener Farbstoff entfernt werden. Dazu wurde eine Säule mit Bio-Rad BioGel® P-30 Fine Size exclusion purification Granulat bestückt und danach mit dem Reaktionsansatz beladen. Anschließend wurde mit Elutionspuffer eluiert und die Fraktionen aufgefangen. Mit Hilfe einer UV-Lampe konnten zwei gefärbte Banden in der Säule sichtbar gemacht werden. Die erste Bande enthält das AlexaFluor®546-markierte α -Toxin, die zweite Bande freien Farbstoff.

Alle Reagenzien sind im Alexa Fluor®546 Protein Labeling Kit, MOLECULAR PROBES® enthalten.

***In-vitro*-Translation**

Die *in-vitro*-Synthese eines Proteins ist ein nützlicher Weg, um das Genprodukt einer bestimmten Sequenz in kleinen Mengen zu produzieren und zu untersuchen. Mit Hilfe der *in-vitro*-Translation konnte durch den Einbau von [³⁵S]-Methionin radioaktivmarkiertes α -Toxin hergestellt werden. Die *in-vitro*-Translation wurde nach dem Protokoll des Promega *E.coli* T7 S30 Extract System for Circular DNA Kits durchgeführt. Es handelt sich hierbei um ein zellfreies System für die Proteinsynthese, das auf *E.coli*-S30-Überständen basiert. Für die Durchführung wurde Plasmid-DNA (z.B. Plasmid K21c) benötigt, die einen T7 Promotor und eine RBS (ribosomale Bindungsstelle) vor dem Initiationscodon der Gensequenz für α -Toxin enthält. Das Kit enthält den T7 S30 Extrakt und alle anderen für die Transkription und Translation benötigten Komponenten, wie beispielsweise die Aminosäuren, rNTPs und tRNAs.

Die Plasmid-DNA, [³⁵S]-Methionin und die Kit-Komponenten wurden dem Pipettierschema entsprechend eingesetzt und gemischt. Im Anschluss wurde der Mix für 1,5h bei 37°C im Wasserbad inkubiert, 5min auf Eis abgekühlt und bei -20°C eingefroren.

Pipettierschema:

Plasmid-DNA	2,5 μ g
S30 Premix	20 μ l
T7S30	15 μ l
complete aminoacids minus methionine	5 μ l
[³⁵ S]-Methionin	1 μ l
RNasin (40u/ μ l)	1 μ l
Rifampicin 60,8 μ M (50 μ g/ml)	1 μ l

2.2.4 Herstellung von F(ab)₂-Fragmenten

Staphylococcus aureus schützt sich durch Protein A auf seiner Polysaccharidkapsel vor der Phagozytose durch Makrophagen. Indem Protein A Antikörper an ihrem F_c-Fragment bindet, verhindert Protein A eine effektive Opsonisierung des Bakteriums und damit die Erkennung durch Makrophagen.

Durch die unspezifische Bindung des F_c-Fragments macht Protein A auf der Bakterienoberfläche einen spezifischen immunologischen Nachweis in Anwesenheit der Bakterien mit einer Vielzahl von Antikörpern unmöglich. Ob und mit welcher Affinität Immunglobuline von Protein A gebunden werden, hängt sowohl von der Immunglobulinklasse als auch von der Spezies des Produzenten ab. Um die unspezifische Bindung des Anti-staphylococcal α -Toxin Antikörpers durch das Protein A der Bakterien zu umgehen, wurden F(ab)₂-Fragmente aus dem Anti-staphylococcal α -Toxin (α -Hemolysin) (SIGMA-Aldrich) Antikörper (whole Antiserum) hergestellt.

Reinigung von IgG aus dem Antiserum

1ml Anti-Staphylococcal α -Toxin (α -Hemolysin) (SIGMA-Aldrich) wurden bei 10000 g 15min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und im Verhältnis 1:4 mit PBS verdünnt und auf eine Protein G-Sepharose Säule (7ml) aufgetragen. Danach wurde die Säule mit 60ml PBS gespült. Anschließend wurde mit Glycin-Puffer 0,1M (pH 2,7) eluiert und die Eluate in 1,2ml-Fractionen aufgefangen und die Proteinkonzentration mit Nanodrop gemessen (4,8ml à 0,5mg/ml IgG). Die IgG-haltigen Fractionen wurden vereinigt und umgehend mit Tris-HCl-Puffer 0,5 mM (pH 9) auf pH 7 neutralisiert.

F(ab)₂-Verdau

2,75ml der vereinigten Fractionen wurden mit 0,1M HCl auf einen pH von 3,5 titriert und mit 100U Pepsin pro mg Protein (IgG) 40min bei 37°C verdaut. Anschließend wurde mit 1M Tris-HCl-Puffer wieder auf pH 8 neutralisiert.

Absorption an Protein A und G

Um den F_c-Anteil der Antikörper zu entfernen, wurden 100 μ l A/G plus Agarose Beads (Santa Cruz) in 150mM NaCl, 20mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,7) equilibriert und anschließend mit 100 μ l des Pepsinverdau für 1h bei Raumtemperatur im Schüttler inkubiert. Die F_c-Fragmente binden an den Beads und können abzentrifugiert werden. Im Überstand befinden sich die F(ab)₂-Fragmente.

2.2.5 Behandlung von Zellen mit *Staphylococcus aureus* α -Toxin oder Infektion mit *Staphylococcus aureus*

Inkubation mit α -Toxin

Die Zellen wurden für unterschiedliche Zeiträume entweder permanent bei 37°C mit α -Toxin oder Fluorochrom-markiertem-Toxin behandelt oder die Inkubation mit α -Toxin wurde durch vorherige Beladung der Zellen synchronisiert. Hierfür wurden die Zellen zunächst auf Eis abgekühlt und dann mit 1 μ g/ml α -Toxin in eiskaltem Medium für 40min auf Eis vorinkubiert. Dabei kann das α -Toxin an der Zellmembran binden und eine sogenannte Präpore bilden, allerdings erfolgt keine Insertion in die Membran. Erst bei 37°C kann α -Toxin vollständige Poren in der Zellmembran bilden. Nach der Beladung wurde nicht gebundenes α -Toxin durch einen Waschschritt mit kaltem Medium entfernt und die Zellen anschließend bei 37°C im Brutschrank für unterschiedliche Zeiträume inkubiert. Danach wurden die Zellen für 10min bei Raumtemperatur mit 2% Paraformaldehyd in PBS fixiert.

Infektion mit *Staphylococcus aureus*

Bestimmung der CFU

2ml Luria-Bertani-Bouillon wurde mit oder ohne Antibiotikum mit *Staphylococcus aureus* inokuliert und im Schüttler bei 37°C über Nacht inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension auf eine $OD_{600nm} = 0,1$ verdünnt. In 2h waren die Bakterien auf eine $OD_{600nm} = 0,4$ angewachsen und 100 μ l der Bakterien wurde in einer Verdünnungsreihe um jeweils 1:10 verdünnt. 100 μ l der Verdünnungen wurden jeweils auf 3 Blutplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die durchschnittliche Kolonienanzahl pro Platte wurde für die Verdünnungen ermittelt und die CFU/ml nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Bei } OD_{600nm} = 0,4: \quad \text{Titer [CFU] ml}^{-1} = \frac{(\text{\textcircled{O}} \text{ Koloniezahl pro Platte}) \cdot 10}{\text{Verdünnungsfaktor}}$$

Infektion mit *Staphylococcus aureus*

Die HaCaT-, ODORA- oder MEF-Zellen wurden im Verhältnis 1:30 mit *Staphylococcus aureus* infiziert. Dazu wurde die CFU (colony forming units) in der exponentiellen Phase bei einer optischen Dichte von $OD_{600nm} = 0,4$ wie oben beschrieben bestimmt. Für die in dieser Arbeit verwendeten *Staphylococcus aureus* Varianten wurde eine $CFU_{(OD_{600nm}=0,4)} = 2 \times 10^8$ /ml bestimmt. Vor jedem Infektionsversuch wurde eine *Staphylococcus aureus* Übernachtskultur auf eine $OD_{600nm} = 0,1$ mit Luria-Bertani-Bouillon verdünnt und bis zu einer $OD_{600nm} = 0,4$ inkubiert. Mit $CFU/ml = 2 \times 10^8$ wurde die entsprechende Menge Bakterien bei 4°C und 400 g für 10min abzentrifugiert in Penicillin/Streptomycin-freiem DMEM-Medium resuspendiert und auf die Zellen pipettiert. Anschließend wurden die Zellen 1h mit den Bakterien inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension abgenommen und mit Penicillin/Streptomycin-freiem Medium gewaschen.

Daraufhin wurden die Zellen für unterschiedliche Zeiten weiter in Penicillin/Streptomycin-freiem Medium inkubiert, um den aufgenommenen Bakterien Zeit zur Replikation zu geben. Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt und zweimal mit 1ml PBS gewaschen, bevor die Zellen für 10min bei Raumtemperatur mit 2% Paraformaldehyd fixiert wurden.

2.2.6 Immunfluoreszenz

Durch Fluoreszenz-markierte Antikörper ist es möglich, zelluläre und subzelluläre Strukturen schnell und unkompliziert darzustellen. Spezifische Antikörper, die gegen ein bestimmtes zelluläres Antigen gerichtet sind, können mit permeabilisierten, ganzen Zellen inkubiert werden. Ungebundene Antikörper werden durch Waschstschritte entfernt. Mit einem fluoreszenzmarkierten anti-Immunglobulin-Antikörper kann die Struktur schließlich im Epifluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Für die Immunfluoreszenzen wurden $0,2 \times 10^6$ /well adhärent wachsende Zellen direkt auf ein Deckgläschen in 12-well-Platten ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen gegebenenfalls transfiziert (2.2.2), mit Bakterien infiziert (2.2.5) oder mit α -Toxin (2.2.5) behandelt. Anschließend wurden die Zellen zweimal 5min in PBS gewaschen und 10min bei Raumtemperatur mit 2% PFA/PBS fixiert. Danach wurde das Fixans durch dreimaliges Waschen mit PBS aus den Zellen entfernt. Die Zellmembran wurde für die Antikörper durchlässig gemacht, indem die fixierten Zellen 10min bei Raumtemperatur mit 0,1% Triton X behandelt und anschließend wiederum dreimal jeweils 5min mit PBS gewaschen wurden. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren, wurde mit 3% BSA/PBS-Lösung 1h bei Raumtemperatur geblockt, bevor die Zellen mit einem oder mehreren primären Antikörpern inkubiert wurden. Die Antikörperkonzentration, die Inkubationszeit und auch die Inkubationstemperatur variierte und musste an den jeweiligen Versuch angepasst werden. Die Antikörper wurden mit 3% BSA/PBS-Lösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Vor der Inkubation mit dem Sekundäntikörper wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit einem oder mehreren Sekundäntikörpern in der Regel eine Stunde abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörperkonzentration wurde dem jeweiligen Versuch entsprechend angepasst. Danach wurden die nicht gebundenen sekundären Antikörper durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Zellkerne wurden durch eine zweiminütige Inkubation mit einer Höchst/PBS-Lösung bei Raumtemperatur angefärbt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden dann im Dunkeln getrocknet und mit Fluoprep (bioMérieux® SA, France) auf Objektträgern fixiert. Die Präparate wurden dann entweder am Epifluoreszenzmikroskop oder am Laser-Scan-Mikroskop analysiert (2.2.8).

2.2.7 Elektronenmikroskopie

Die effektive Auflösung eines Elektronenmikroskops liegt bei $0,1\text{\AA}$, das ist 200-fach besser als das Auflösungsvermögen eines Lichtmikroskops. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie kann die Ultrastruktur einer Zelle untersucht werden. Eine Zelle besteht allerdings zu großen Teilen aus Wasser und würde im Hochvakuum des Elektronenmikroskops platzen. Erschwerend kommt hinzu, dass das unlösliche Material einer Zelle aus Atomen mit einer geringen Kernladung wie Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff besteht und damit nur wenig Kontrast im Elektronenmikroskop bietet. Für die Untersuchung im Elektronenmikroskop muss ein Zellpräparat daher aufwendig vorbereitet werden.

Eponeinbettung

Fixierung

Um biologisches Material in seinem ursprünglichen Zustand für die Betrachtung zu konservieren, muss es fixiert werden. Durch die Fixierung können Änderungen durch postmortale Zytolyse oder Änderungen der Struktur aufgrund der Kontrastierung mit Schwermetallsalzen vermieden werden. Auch der Verlust verschiedener Substanzen während des Entwässerungsvorgangs wird verhindert. In dieser Arbeit wurde für die Einbettung in Epon eine sogenannte Doppelfixierung gewählt. Zunächst wurden die Zellen direkt in den Kulturflaschen in ihrem Medium mit 2,5% Glutaraldehyd für 45min bei Raumtemperatur vorfixiert und im späteren Verlauf der Einbettung mit Osmiumtetroxid nachfixiert. Glutaraldehyd bewirkt als Di-Hydrat eine gute Quervernetzung von Proteinen und damit eine gute Erhaltung der Struktur, während Osmiumtetroxid vorwiegend Lipide fixiert.

Einbettung in Agarose

Anschließend wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und dann mit einem Zellschaber abgelöst, in PBS aufgenommen und in Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 300 g für 10min wurde der Überstand verworfen und das entstandene Zellpellet im Verhältnis 1:2 mit warmer, flüssiger 3%iger Agarose in Aqua dest. (w/v) möglichst homogen gemischt und 10min auf Eis abgekühlt. Das Gemisch aus Zellmaterial und Agarose erstarrte durch die Abkühlung und konnte als Kegel aus dem Zentrifugenröhrchen geschoben werden und mit Hilfe einer Präpariernadel und eines Skalpells in ca. 1mm^3 große Würfel zerschnitten werden. Diese Würfel wurden dann in Schnapdeckelgläschen in PBS überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

Kontrastierung

Das PBS wurde mit Einweg-Pasteurpipetten abgenommen, so dass die Agarosewürfel im Schnapdeckelglas verblieben. Im nächsten Schritt wurden die Proben auf Eis gestellt und durch die Zugabe einer Osmiumtetroxidlösung (Würfel müssen bedeckt sein) für eine Stunde nachfixiert und durch die Eigenschaft als Schwermetall zugleich kontrastiert. Darauf folgten drei

Waschschritte mit PBS. Zunächst wurde die Flüssigkeit mit einer Einweg-Pasteurpipette vorsichtig aus den Schnappdeckelgläsern abgesaugt und dann durch frischen Puffer ersetzt. Der Puffer verblieb jeweils 5min auf den Agarosewürfeln. Nach den Waschschritten wurden die Agarosewürfel mit der sowohl fixierenden, als auch kontrastierenden Tanninlösung inkubiert. Dazu wurde wiederum die Flüssigkeit um die Agarosewürfel abgenommen und so viel Tanninlösung zugegeben bis alle Würfel bedeckt waren. Überflüssiges Tannin wurde anschließend durch zwei Waschschritte mit einer 1%igen Natriumsulfatlösung und drei Waschschritten mit Aqua dest., wie oben beschrieben, entfernt. Um eine bessere Kontrastierung der Proben zu erreichen, wurde zusätzlich mit einer 2%igen Uranylacetatlösung für eine Stunde in Dunkelheit inkubiert, indem das Aqua dest. wie oben beschrieben abgenommen und durch die Uranylacetatlösung ersetzt wurde. Auf die Behandlung mit Uranylacetat folgten zwei Waschschritte wie oben beschrieben mit Aqua dest.

Wassersubstitution und Einbettung in Epon

Anschließend wurde Wasser durch eine aufsteigende Alkoholreihe aus den Proben entfernt und durch Epon ersetzt. Dazu wurde die Flüssigkeit um die kontrastierten Agarosewürfel abgenommen und jeweils für 30min durch 30%igen, 50%igen, 70%igen, 80%igen, 90%igen Ethanol ersetzt. Danach folgten zwei Schritte mit 100%igem, wasserfreiem Ethanol für je 15min. Zuletzt musste der Alkohol durch Epon ersetzt werden. Hierfür wurden die Proben je 30min zunächst mit einer 3:1 Mischung, einer 2:1 Mischung und einer 1:3 Mischung aus reinem Ethanol und Epon im Rotator in Bewegung gehalten. Letztendlich wurde reines Epon zugeben und mit geöffnetem Deckel inkubiert, damit letzte Alkoholreste verdampfen konnten. Nach 1h, 24h und ca. 28h wurde das Epon nochmals ausgetauscht. Anschließend konnten die Agarosewürfel mit dem Epon in Gelatinekapseln zusammen mit der Probennummer eingebettet werden. Die Proben wurden durch Polymerisation des Epons für 48h bei 60°C im Ofen ausgehärtet. Nach der Härtung musste die Gelatine von den Proben abgewaschen werden, bevor die Probenblöckchen mit Hilfe der Trimmfräse für die Ultramikrotomie weiterverarbeitet werden konnten.

Nachkontrastierung der Ultradiünnschnitte

Mit dem Ultramikrotom wurden Schnitte in einer Stärke von 70nm angefertigt und auf Kupfernetzchen (Grids) Cu200 aufgenommen. Die Schnitte wurden dann wie folgt mit Bleicitrat und Uranylacetat behandelt, um erst jetzt zugängliche intrazelluläre Strukturen kontrastieren zu können. Dazu wurden die Grids auf einem Gridstick in der dazugehörigen Pipette fixiert und vorsichtig eine Mischung aus Ethanol und 5% Uranylacetat-Lösung im Verhältnis 2:5 soweit aufgezogen, bis die Grids bedeckt waren. Die Grids wurden 7min lichtgeschützt mit der Uranylacetatlösung inkubiert, bevor die Pipette entleert und die Grids durch siebenmaliges Aufziehen und Ablassen von Aqua dest. gewaschen wurden. Nach den Waschschritten wurde eine 0,2% Bleicitratlösung aufgezogen und 2min inkubiert. Daraufhin folgten weitere Waschschritte. Dazu wurde zunächst zweimal Aqua dest.-Na₂SO₄ (2 Tropfen Na₂SO₄-Lösung auf 20ml Aqua dest.) und anschließend siebenmal reines Aqua dest. in der Gridstickpipette aufgezogen. Im Anschluss konnten die Präparate am Elektronenmikroskop ausgewertet werden (2.2.8).

Kryomikrotomie

Im Gegensatz zur Eponeinbettung bleibt die Ultrastruktur der Zellen in Gefrierschnitten weniger gut erhalten. Allerdings bieten Kryoschnitte einen entscheidenden Vorteil – die Antigene der Probe bleiben in Kryoschnitten zugänglich für Antikörper.

Für die Kryomikrotomie wurde das Zellmaterial, wie oben bei der Eponeinbettung beschrieben, mit 2,5% Glutaraldehyd fixiert und in Agarose (low gelling) eingebettet. Die Agarosewürfel wurden in Schnappdeckelgläser überführt und in einer Sucroselösung bei 4°C eingelegt, bis die Agarosewürfel an den Boden des Gefäßes abgesunken waren.

Anschließend wurden die Sucrose-Agarosewürfel auf einen Metall-Pin für das Kryoultramikrotom fixiert und zügig in flüssigem Stickstoff eingefroren. Am Kryoultramikrotom wurden die gefrorenen Sucrose-Blöckchen zuerst getrimmt; anschließend wurden mit einem Glasmesser Kryoschnitte in einer Stärke von 350nm angefertigt. Die Schnitte wurden in einer 2M Sucroselösung auf Nickel-Grids Ni200 aufgenommen. Die Grids konnten dann auf Parafilm in einer feuchten Kammer bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert werden.

Immunogoldfärbung

Um die Sucrose von den Grids zu lösen, wurden die Grids in eine neue saubere Petrischale auf Parafilm umgesetzt und die Petrischale mit PBS gefüllt. Nach 15min erfolgten zwei Waschschrte. Dazu wurden die Grids mit einem kleinen Kescher aus dem PBS abgenommen und für je 3min in eine weitere Petrischale mit frischen PBS umgesetzt. Anschließend wurden die Grids auf einen Tropfen 1% BSA/PBS gesetzt und 15min geblockt, um unspezifische Bindungen zu reduzieren.

Primäre F(ab)₂-Fragmente:

Nach dem Blocken in BSA wurden die Grids mit 10 µg/ml gereinigten F(ab)₂-Fragmenten von rabbit anti α-Toxin (siehe 2.2.4) in BSA über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Dazu wurden die Grids direkt auf einen Tropfen verdünnter F(ab)₂-Fragmente aufgesetzt.

Sekundäre goldkonjugierte F(ab)₂-Fragmente:

Vor der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden überschüssige, ungebundene anti-α-Toxin-F(ab)₂-Fragmente durch zwei Waschschrte in PBS, wie oben beschrieben, entfernt. Danach wurden die Grids mit F(ab)₂-Fragmenten (H+L) goat anti rabbit konjugiert mit 10nm-Goldkugeln in einer feuchten Kammer für 1h bei 37°C inkubiert. Dazu wurden die Grids direkt auf einen Tropfen verdünnter goldkonjugierter-F(ab)₂-Fragmente aufgesetzt.

Einbettung in Methylcellulose

Nach der Inkubation wurden überschüssige, ungebundene F(ab)₂-Fragmente durch fünf Waschschrte in PBS und zwei Waschschrte in Aqua dest., wie oben beschrieben, entfernt. Abschließend wurden die Grids auf einen Tropfen aus 0,2% Uranylacetat in 2% Methylcellulose

aufgesetzt und für 10min auf Eis inkubiert. Nach dem Trocken konnten die Präparate im Elektronenmikroskop analysiert werden (2.2.8).

2.2.8 Mikroskopie

Epifluoreszenzmikroskopie

Fluoreszierende Moleküle absorbieren Licht einer definierten Wellenlänge und emittieren im angeregten Zustand Licht in einer bestimmten, längeren Wellenlänge. Beleuchtet man fluoreszierende Farbstoffe mit Licht ihres entsprechenden Absorptionsspektrums, kann das emittierte Licht des Fluoreszenzfarbstoffes im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Spezielle Filter, die nur für das Licht der emittierten Wellenlänge durchlässig sind, ermöglichen es, dass sich die Fluoreszenz gegen den schwarzen Hintergrund abheben kann. Ein Fluoreszenzmikroskop unterscheidet sich deshalb nur durch zwei Filtersets von einem normalen Lichtmikroskop. Ein Filtersatz filtert das Licht, bevor es auf das Objekt trifft, und der zweite Filtersatz filtert das vom Objekt emittierte Licht. Durch die Klonierung der Gensequenz eines Proteins zusammen mit der Gensequenz für ein fluoreszierendes Protein, wie z. B. GFP (green fluorescent protein), in einen Expressionsvektor, können Proteine als Fusionsprodukt exprimiert und *in vivo* detektiert werden. Aber auch die Detektion durch einen Immunnachweis mit Antikörpern, die an fluoreszierenden Molekülen gekoppelt sind, ist möglich (Alberts B., 2008).

Optische Schnitte durch Dekonvolution oder Konfokale Mikroskopie

Obwohl man ein optisches Mikroskop auf eine Fokusebene des Präparats scharfstellen kann, werden alle anderen Fokusebenen darüber oder darunter ebenfalls beleuchtet. Das Licht aus diesen Ebenen erzeugt Unschärfe im Bild und erschwert die Interpretation der Bilddetails. Es gibt einen rechnerischen und einen optischen Lösungsansatz, um optische Schnitte zu erzeugen.

Das rechnerische Verfahren nennt sich Dekonvolution. Hierbei wird davon ausgegangen, dass das Linsensystem des Mikroskops eine punktförmige Lichtquelle als unscharfe Scheibe abbildet. Dabei nimmt die Unschärfe zu, je weiter der Lichtpunkt von der Fokusebene entfernt liegt. Mit Hilfe der Strahlenverteilungsfunktion PSF (point spread function) lässt sich diese Unschärfe durch eine komplexe Berechnung entfernen und es entstehen klare optische Schnitte.

Ein konfokales Mikroskop erzeugt optische Schnitte durch die Verwendung einer Nadelloch-Apertur. Diese Nadelloch-Apertur sitzt in exakt der Position vor dem Detektor, an der ausschließlich das emittierte Licht eines Punktes in exakt einer Fokusebene des Objekts einen Brennpunkt bildet. Auf diese Weise werden Signale aus anderen Fokusebenen ausgeschlossen und erreichen den Detektor nicht. Um ein zweidimensionales Bild zu erhalten, muss jeder Punkt in der Fokusebene einzeln gescannt werden (Alberts B., 2008).

Transmissions-Elektronenmikroskopie

Im Gegensatz zur Lichtmikroskopie kommt bei der Elektronenmikroskopie ein Filament zum Einsatz, das, anstelle von Licht, Elektronen emittiert. Um eine Streuung der Elektronen durch Luftmoleküle zu verhindern, wird die Luft aus dem Strahlengang abgepumpt. Die Elektronen werden dann von der Kathode zur Anode beschleunigt. In der Anode befindet sich ein kleines Loch, das die Elektronen passieren lässt und dabei zu einem Elektronenstrahl formt. Analog zu

den Glaslinsen im Lichtmikroskop fokussieren die Magnetlinsen im Elektronenmikroskop den Elektronenstrahl. Das Objekt wird durch eine Luftschleuse in den Strahlengang geschleust. Manche Elektronen, die auf das Objekt treffen, werden durch elektronendichtes Material gestreut, während andere Elektronen das Objekt passieren können und auf einem phosphoreszierenden Schirm ein Signal erzeugen. Die gestreuten Elektronen tragen nicht zu diesen Signalen bei, so dass elektronendichte Regionen als dunkle Areale auf dem Bildschirm erscheinen. Die 200-fach höhere Auflösung des Elektronenmikroskops ermöglicht die Analyse der Ultrastruktur einer Zelle (Alberts B., 2008).

Auswertung und Abbildungen

Für die Abbildungen wurden repräsentative Bilder gewählt. Dafür wurden im Durchschnitt 10-20 Aufnahmen aus ≥ 2 unabhängigen Experimenten beurteilt.

2.2.9 Lipid-Raft Präparation

Lipid-Rafts sind kleine Cholesterol- und Sphingolipidreiche Plasmamembran-Domänen, die an vielen Prozessen in der Zelle beteiligt sind. Verschiedene Proteine, wie z.B. GPI (glycosylphosphatidylinositol)-verankerte Proteine oder Flotillin sind in den Lipid-Rafts angereichert. Caveolin, das Strukturprotein einer Subklasse der Lipid-Rafts, der sogenannten Caveolae, sind ebenfalls in Plasmamembranfraktionen von geringer Dichte enthalten. Mit Hilfe einer Dichtegradienten-Zentrifugation lassen sich die Fraktionen mit den Cholesterol und Sphingolipid-reichen Mikrodomänen isolieren (Macdonald & Pike, 2005).

Für die Lipid-Raft-Präparationen wurden 5×10^6 HaCaT-Zellen pro Kulturflasche ausgesät, mit [S^{35}]-Methionin-markiertem K21c- α -Toxin auf Eis beladen und inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein Waschschrift mit kaltem PBS, um ungebundenes α -Toxin und Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in 3ml Base-Puffer aufgenommen und bei 200 g 3min bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in 1ml Base-Puffer+Inhibitoren resuspendiert. Darauf folgte eine weitere Zentrifugation bei 2000 g für 10min bei 4°C. Der Überstand (Überstand 1) wurde abgenommen und in ein neues Tube überführt. Das Pellet wurde erneut in 1ml Base-Puffer+Inhibitoren resuspendiert und wiederum bei 2000 g für 10min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand (Überstand 2) wurde abgenommen und mit Überstand 1 aus dem vorherigen Zentrifugationsschritt vereinigt. Die vereinigten Überstände wurden mit dem gleichen Volumen 50% (v/v) OptiPreP/Base-Puffer gemischt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Mit Hilfe eines Gradientenmischers wurde ein OptiPreP-Gradient von 0% - 25% gegossen, mit dem die Probe überschichtet wurde. Anschließend wurde bei 52000 g für 90min bei 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Nach der Ultrazentrifugation wurde das Zentrifugenröhrchen angestochen und 500 μ l-Fraktionen gesammelt. Um die Proteine zu fällen, wurden 200 μ l jeder Fraktion mit 800 μ l Aceton gemischt und über Nacht bei -70°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Fraktionen auf Eis aufgetaut und bei 19000 g für 10min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im geöffneten Tube luftgetrocknet. Danach konnten die einzelnen Fraktionen in je 55 μ l Probenpuffer mit Mercaptoethanol resuspendiert werden und in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt werden (2.2.10). Daraufhin konnte das [S^{35}]-Methionin-markierte K21c- α -Toxin mittels Autoradiographie detektiert werden (siehe auch unter 2.2.12 Autoradiographie). Andere Proteine konnten nach anschließendem Western Blot immunologisch nachgewiesen werden (2.2.11).

2.2.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Die Polyacrylamidgelelektrophorese in Anwesenheit von 0,1% SDS (Natriumdodecylsulfat) im diskontinuierlichen Gel- und Puffersystem ermöglicht es, Proteine ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Für die SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) müssen die Proteine in den Proben durch Hitze, SDS und/oder 2-Mercaptoethanol zuvor denaturiert werden. Das anionische Detergenz SDS bindet und denaturiert die Proteine, so dass sie eine mehr oder weniger einheitliche Form und eine negative Ladung annehmen. Durch die Diskontinuität in der Gelstruktur und in den Pufferzusammensetzungen der Elektrophoresepuffer bzw. des Sammel- und Trenngels, wird im großporigen Sammelgel ein Konzentrierungseffekt erzielt, während die Proteine anschließend im engporigen Trenngel nach ihrer Größe aufgetrennt werden können. Die Probe und auch das Sammel- und Trenngel enthalten Chloridionen, die im Gel mit hoher Mobilität zur Anode wandern können. Im Elektrophoresepuffer befinden sich Glycin-Ionen, die im Sammelgel bei einem pH von 6,8 hauptsächlich als Zwitterion vorliegen und sich nur sehr langsam bewegen. Durch den Spannungsgradient, der zwischen den schnell wandernden Chlorid-Ionen und den langsamen Glycin-Ionen aufgebaut wird, ordnen sich die Proteine dazwischen an und werden auf diese Weise konzentriert. Im Trenngel bei pH 8,8 dissoziieren die Glycin-Ionen vollständig, wandern schneller und überholen die Proteine. Diese werden nun im engvernetzten Trenngel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt (Pingoud A., 1997).

Trenn- und Sammelgel wurden nacheinander aus denen, im Pipettierschema angegebenen, Komponenten gegossen. Die Proben wurden in 80µl Probenpuffer aufgenommen und für 5min bei 95°C im Heizblock inkubiert, auf Eis abgekühlt und in die Taschen des SDS-Gels geladen. Die Elektrophorese erfolgte für 1h bei einer Spannung von 125Volt. Anschließend wurden die Proteine im Western Blot detektiert.

Pipettierschema:

	Trenngel 10%	Sammelgel
Acrylamid	2,5ml	0,7ml
4xTris/SDS pH 8,8 Puffer	1,9ml	-
4xTris/SDS pH6,8 Puffer	-	1,25ml
Aqua dest.	3,1ml	3,1ml
Ammoniumpersulfat 10%	30µl	30µl
Tetramethylethylendiamin	10µl	7,5µl

2.2.11 Western Blot (Towbin et al, 1979)

Mit Hilfe der Western Blot-Technik können die durch eine SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen werden. Dazu wurden Membran und Filterpapiere mit Transferpuffer getränkt und in folgender Reihenfolge zwischen horizontal angeordnete Graphitplatten luftblasenfrei geschichtet. Zuerst wurden drei Filterpapiere aufgelegt, darauf folgten die Trägermembran, dann das Gel und zuletzt wiederum drei Filterpapiere. Anschließend wurde die Transferkammer verschlossen und die Proteine mit einem Strom von 100mA in einer Stunde aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran transferiert (Pingoud A., 1997).

Proteine lassen sich auf der Membran reversibel, z.B. mit Ponceaurot anfärben oder durch einen immunologischen Nachweis detektieren.

Immunologischer Proteinnachweis

Der immunologische Nachweis von Proteinen nach einer Auftrennung durch Elektrophorese und dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran, erfolgt analog zur Immunfluoreszenztechnik mit Hilfe von spezifischen primären Antikörpern gegen das nachzuweisende Protein und einem sekundären, in diesem Fall Enzym-gekoppelten, Antikörper. Die Meerrettichperoxidase (HRP; horseradish peroxidase), die an den sekundären Antikörper gekoppelt ist, ermöglicht die spezifische und sensitive Detektion der Proteine mit einem Chemilumineszenz-Kit. Die Antikörper-gekoppelte HRP katalysiert, in Anwesenheit eines Oxidationsmittels (z.B. Wasserstoffperoxid H_2O_2 oder Natriumperborat $NaBO_3$), die Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol. Das energiereiche oxidierte Luminol-Molekül ist ein instabiles Intermediat, welches während des Übergangs aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand, Licht im blauen Bereich des Lichtspektrums emittiert und einen Röntgenfilm belichten kann.

Um die unspezifische Bindung der Antikörper zu verringern, wurde die Nitrocellulosemembran für 1h in 5% MMP/TBST bei Raumtemperatur geblockt und anschließend mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper folgten drei Waschschrte mit TBST, bevor die Membran für 1h bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden sekundären HRP-gekoppelten Antikörper inkubiert wurde. Danach folgten wiederum drei Waschschrte mit TBST, bevor die Membran nach Protokoll des Chemilumineszenz-Kits auf Röntgenfilm entwickelt wurde.

2.2.12 Immunpräzipitation mit Protein A und G – Agarose Beads

Die Immunpräzipitation in Kombination mit einer SDS-PAGE eignet sich für den semiquantitativen Nachweis bestimmter Proteine aus einem Zelllysate. Für die Immunpräzipitation macht man sich die hohe Spezifität der Antigen-Antikörperreaktion sowie die hohe Affinität der Bindungsdomänen von Protein A und G für die F_c-Fragmente von Immunglobulinen des Isotyps IgG zu nutze. Von einer Co-Immunpräzipitation wird gesprochen, wenn auch Proteine, die in hochaffiner Wechselwirkung mit dem Protein stehen, gegen das die Antikörper gerichtet sind, copräzipitiert werden.

2 x 10⁶ HaCaT-Zellen wurden in Kulturflaschen ausgesät und am nächsten Tag mit 200ng/ml [³⁵S]-Methionin-markierten α-Toxin (K21c, K131c oder D152c) für 4h bei 37°C inkubiert. MEF_{wt}- oder MEF_{cav-/-}-Zellen wurden mit 2,5µg/ml [³⁵S]-Methionin-markierten α-Toxin (K21c) und 22,5µg/ml unmarkiertem, zusätzlichem α-Toxin für 40min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in 5ml PBS mit einem Zellschaber abgelöst und schließlich bei 300 g für 5min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 2ml NP-40-Lysepuffer resuspendiert und 30min auf Eis inkubiert.

Reinigungsschritt (preclearing)

Vor der Immunpräzipitation wurde ein Reinigungsschritt (preclearing) durchgeführt, um Proteine, die unspezifisch an die Protein A/G plus Agarose Beads binden, zu entfernen. Dazu wurden 50µl Protein A/G plus Agarose Beads 2-3h bei 4°C mit dem Zelllysate in einem Rotationsmischer inkubiert und anschließend wieder durch Zentrifugation aus dem Zelllysate entfernt.

Immunpräzipitation

Nach dem Reinigungsschritt wurden die Zelllysate für die Immunpräzipitation in verschiedene Reaktionsgefäße aufgeteilt. Ein Reaktionsansatz wurde zur Kontrolle mit einem Antikörper gegen α-Toxin inkubiert, während ein zweiter oder dritter Reaktionsansatz mit Antikörpern gegen mutmaßliche Bindungspartner von α-Toxin inkubiert wurde. Nach einer Inkubationszeit von 1h bei 4°C im Rotationsmischer wurden zum Präzipitieren der Antikörper-Proteinkomplexe wiederum 50µl Protein A/G plus Agarose Beads zugegeben und über Nacht bei 4°C im Rotationsmischer weiterinkubiert.

Am Folgetag wurden die Beads bei 200 g bei 4°C abzentrifugiert und anschließend für je 5min pro Waschschrift zweimal in Waschpuffer I, zweimal in Waschpuffer II und einmal in Waschpuffer III gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Beads bei 200 g für 1min bei 4°C abzentrifugiert; der Überstand wurde verworfen.

Nach den Waschschriften wurden die Beads in 55µl Probenpuffer ohne β-Mercaptoethanol resuspendiert, bei 50°C für 10min erhitzt um die Antikörper-Proteinbindung zu lösen und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Überstände auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen und aufgetrennt.

Autoradiographie

β -Strahlung kann durch fotografische Emulsionen detektiert werden. Bei diesem Prozess, der Autoradiographie genannt wird, werden durch die β -Strahlen Silberhalogenidteilchen in der Emulsion zersetzt. Es entsteht ein latentes Bild, welches durch die Entwicklung des Röntgenfilms sichtbar gemacht und fixiert wird (Pingoud A., 1997).

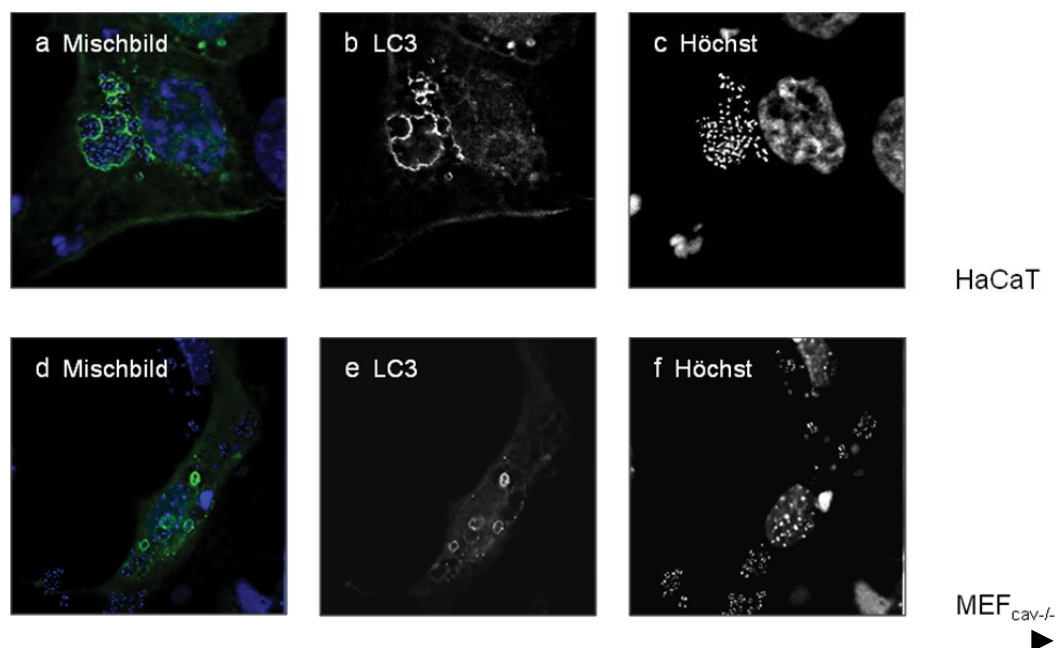
Für den Nachweis von [S^{35}]-Methionin-markierten α -Toxin mittels Autoradiographie wurde das Gel für 20min in Amplify Fluorographic Reagent-Lösung (Amersham Biosciences, GE) auf dem Rüttler inkubiert, anschließend zweimal in Aqua dest. gewaschen und danach getrocknet. Das getrocknete Gel wurde dann auf einen Röntgenfilm aufgelegt und in einer Filmkassette bei $-70^{\circ}C$ über Nacht gelagert und schließlich entwickelt.

Kapitel 3

Resultate

3.1 Aufnahme von *Staphylococcus aureus* in nicht-professionelle Phagozyten

Staphylococcus aureus gilt traditionell als klassisch extrazelluläres Bakterium. Für einige Zelltypen konnte in der Vergangenheit bereits die Aufnahme durch nicht-professionelle Phagozyten für *Staphylococcus aureus* gezeigt werden. Infektionsversuche mit *Staphylococcus aureus* hla(+) wurden mit der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT, mit murinen embryonalen Fibroblasten MEF und Percursorzellen von Riechsinneszellen ODORA durchgeführt. Bei HaCaT, MEF_{cav-/-} und ODORA-Zellen konnte die intrazelluläre Lokalisation der Bakterien durch Epifluoreszenzmikroskopie mit anschließender Dekonvolution dargestellt werden. Zusätzlich konnte eine Kumulation von LC3 an den Bakterien in allen drei Zelllinien gezeigt werden (Abb.3-1).



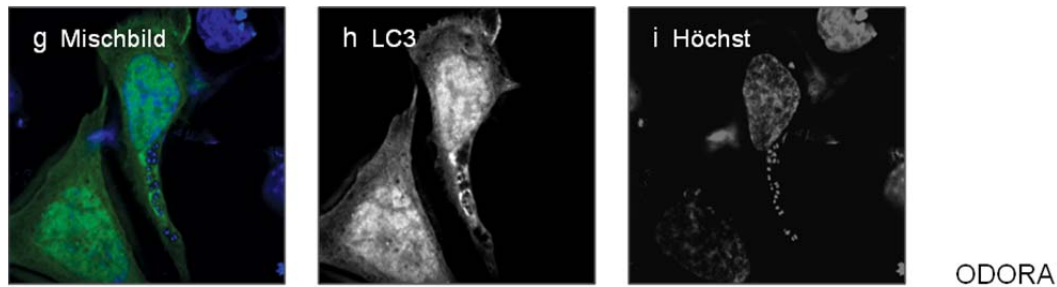


Abb. 3-1: *Staphylococcus aureus* in HaCaT, MEF_{cav-/-} und ODORA. a-c: mit pEGFP-LC3 transfizierte HaCaT wurden 30min mit *Staphylococcus aureus* hla(+), 30CFU/ml inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und für weitere 3h bei 37°C inkubiert: Juxt nukleäre Akkumulationen von EGFP-LC3 um die Höchst-gefärbten Bakterien waren zu sehen. d-f: MEF_{cav-/-} Zellen wurden wie in a-c transfiziert, 1h mit *Staphylococcus aureus* hla(+), 30CFU/ml inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und für weitere 2h bei 37°C inkubiert: Akkumulationen von EGFP-LC3 um die Höchst-gefärbten Bakterien waren ebenfalls zu sehen. g-i: ODORA Zellen wurden wie in a-c transfiziert, 1h mit *Staphylococcus aureus* hla(+), 30CFU/ml inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und für weitere 3h bei 37°C inkubiert: Akkumulationen von EGFP-LC3 um die Höchst-gefärbten Bakterien waren wiederum sichtbar.

Für die Analyse der subzellulären Lokalisation der Bakterien wurden Ultradünnschnitte von HaCaT-Zellen, die mit dem *Staphylococcus aureus* hla(+) infiziert wurden, angefertigt. Die Auswertung im Elektronenmikroskop bestätigte die intrazelluläre Lokalisation der Bakterien. Unabhängig mit welcher *Staphylococcus aureus*-Variante infiziert wurde oder welche Inkubationszeit gewählt wurde, befanden sich die Bakterien in unterschiedlichen Zellkompartimenten. Einzelne Staphylokokken konnten nach einer Inkubationszeit von insgesamt sechs Stunden frei im Zytoplasma der Zellen ohne sichtbare, limitierende Membranen beobachtet werden. Manche Bakterien zeigten Septen, die für eine Replikation im Zytoplasma der Zelle sprechen. Häufig fielen Phagophoren-ähnliche Membranstücke im Zytoplasma der Zellen in unmittelbarer Nähe zu den Bakterien auf (Abb.3-2 a-c). Unter identischen Infektionsbedingungen konnte eine Akkumulation von *Staphylococcus aureus* im Zentrum eines voluminösen, vesikulären Kompartiments beobachtet werden. Die Bakterien in diesem Kompartiment waren mehrfach mit Septen durchzogen, was für die Replikation innerhalb dieses Kompartiments spricht. Die Ränder des Kompartiments erschienen klar abgegrenzt vom Zytoplasma, jedoch waren nur vereinzelt dunkle Strukturen zu erkennen, die als Lipide einer Membran gedeutet werden könnten (Abb.3-2 d-f). Neben den zuvor beschriebenen Lokalisationen, konnten Bakterien-Akkumulationen innerhalb des gleichen Präparats, d.h. unter identischen Infektionsbedingungen, in einem dritten Kompartiment beobachtet werden. Dieses bakterientragende Kompartiment unterschied sich vor allem durch eine klar erkennbare Membran, die das Kompartiment als dunkelkontrastierte Struktur vom Zytoplasma abgrenzte. Die Bakterien lagen nicht ausschließlich im Zentrum des Kompartiments, sondern zum Teil in engen Ausbuchtungen. Die Bakterien zeigten keine Anzeichen für eine Replikation und sahen deformiert aus. (Abb.3-2 g-i).

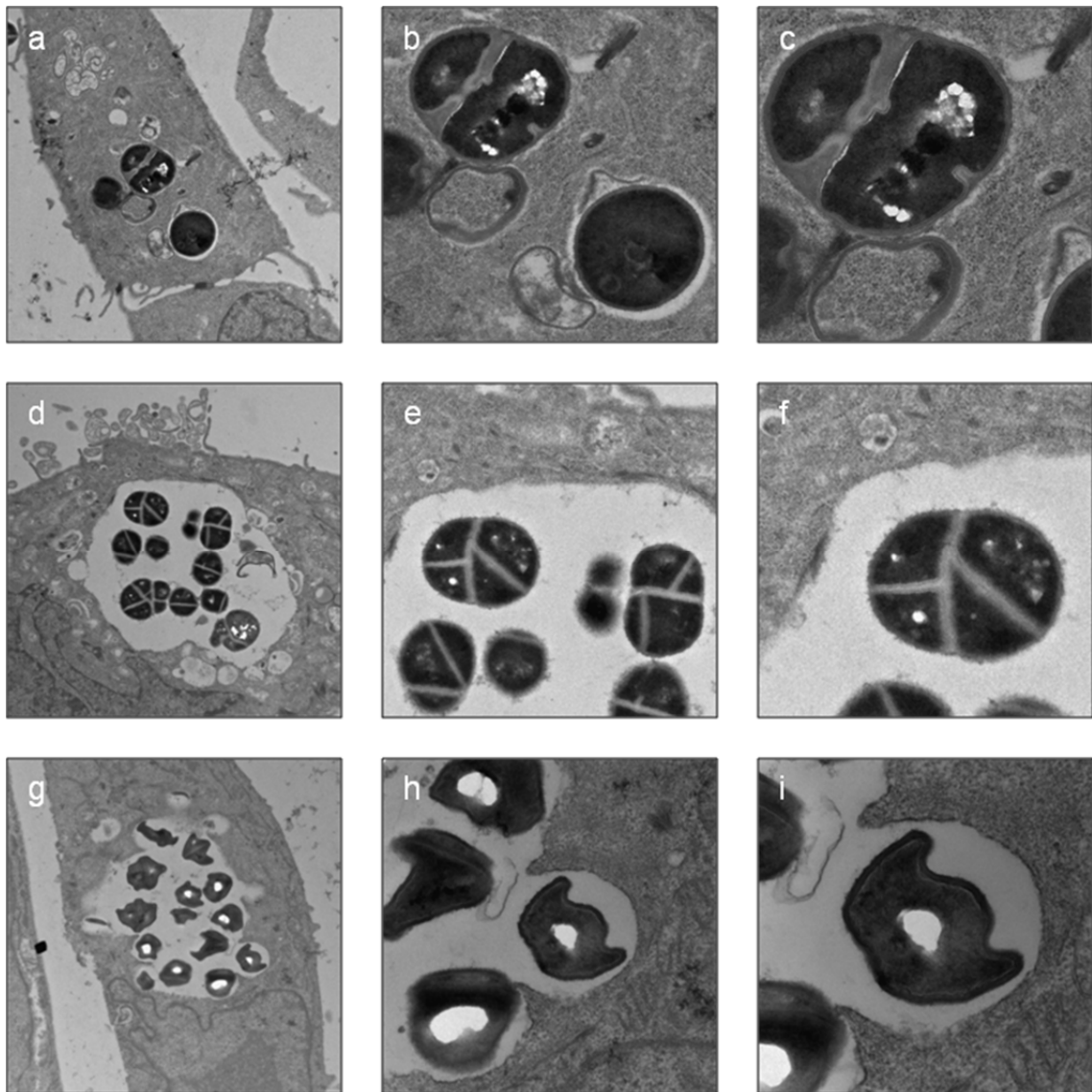


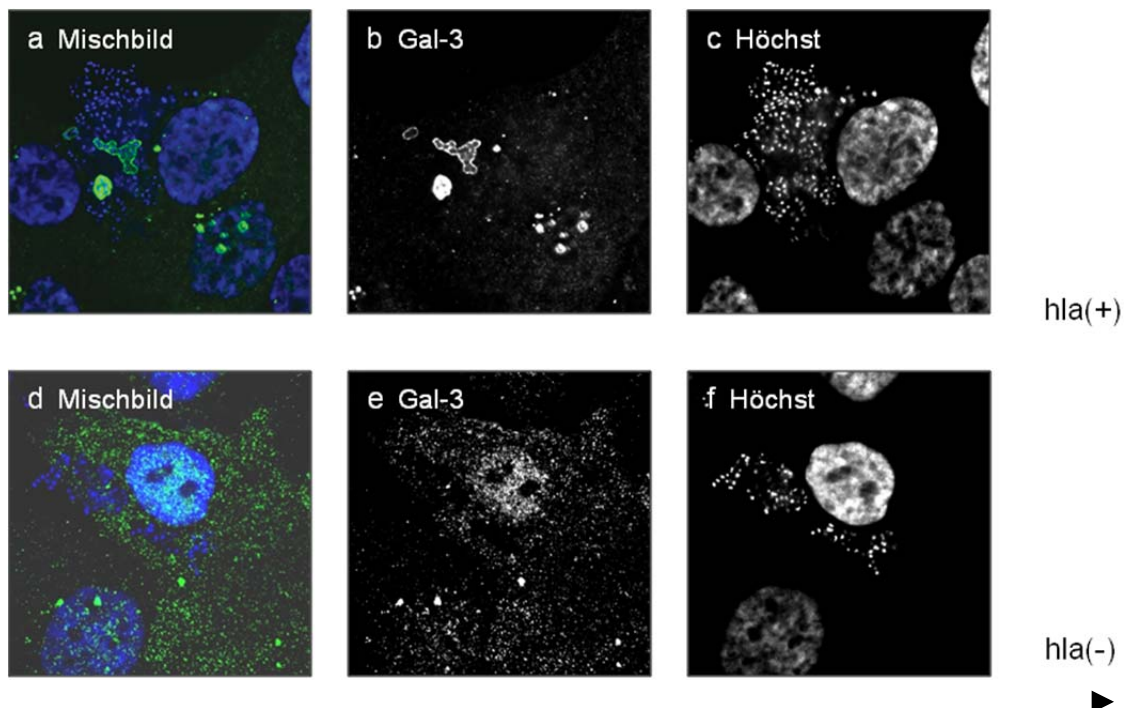
Abb. 3-2: Ultrastrukturelle Lokalisation von *Staphylococcus aureus* in HaCaT. HaCaT wurden mit α -Toxin produzierenden *Staphylococcus aureus* hla(+) 30CFU/ml für 1h bei 37° inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und weitere 5h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und für die Auswertung im Elektronenmikroskop verarbeitet. In den Übersichtsaufnahmen **a**, **d** und **g** ist die intrazelluläre Lokalisation von *Staphylococcus aureus* sichtbar. In den Vergrößerungen **b** und **c** aus Abb.3-2a befinden sich die Bakterien frei im Zytoplasma. In den Vergrößerungen aus Abb.3-2d und **g** sind die Bakterien von einem Phagosom umgeben. In Abb.3-2i befinden sich die Bakterien in einem, von einer Membran umschlossenen, Kompartiment.

Um die Kompartimente, in denen *Staphylococcus aureus* beobachtet werden konnte, näher zu charakterisieren, wurden weitere Infektionsversuche mit *Staphylococcus aureus* hla(+) und hla(-) im Kontext mit zellulären Markern durchgeführt.

3.2 Analyse der Lokalisation und Morphologie des bakterientragenden, intrazellulären Kompartiments

3.2.1 Galektin-3 – Marker für die Lyse der endosomalen Membran

Galektin-3 wurde als neues Hilfsmittel vorgeschlagen, um die Lyse der Phagozytose-Vakuolen durch invasive Pathogene zu detektieren. Galektin-3 kommt reichlich in Makrophagen und Epithelzellen vor, bindet β -Galaktose (endständige Zuckerreste von Polysacchariden) und wird an beschädigte Phagozytose-Vakuolen von *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* (*sifA* Mutante) rekrutiert. Die Rekrutierung erfolgt in strikter Abhängigkeit von der Lyse des Phagosoms. Eine LLO-defiziente Mutante von *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* Wildtyp-Bakterien konnten kein Galektin-3 rekrutieren (Dupont et al, 2009; Paz et al, 2010). Ob auch *Staphylococcus aureus* von solch einer Vakuole umgeben werden, diese Membran zerstören und Galektin-3 rekrutieren, wurde mittels Immunfluoreszenz geprüft. HaCaT-Zellen wurden mit *Staphylococcus aureus* hla(+), hla(mut) oder hla(-) infiziert und Galektin-3 mit einem Antikörper nachgewiesen. Oft konnten starke Akkumulationen von Galektin-3 um *Staphylococcus aureus* hla(+) detektiert werden, während in unmittelbarer Nähe Bakterien ohne Galektin-3-Färbung vorlagen (Abb.3-3 a-c). In Zellen, die mit hla(-) oder hla(mut) Staphylokokken infiziert wurden, konnten keine Galektin-3-gefärbten Vakuolen nachgewiesen werden. Selten konnten kleinere Akkumulationen um einzelne Bakterien beobachtet werden (Abb.3-3 d-f und Abb.3-3 g-i).



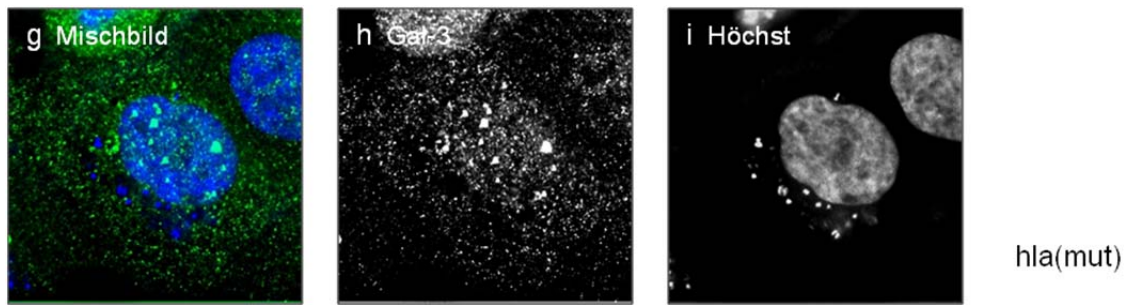


Abb. 3-3: Galektin-3 Rekrutierung an *Staphylococcus aureus* hla(+). HaCaT wurden mit *Staphylococcus aureus* hla(-), hla(+) oder hla(mut) 30CFU/ml für 1h bei 37° inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und weitere 2h bei 37°C inkubiert. Danach wurde eine Immunfluoreszenz mit dem primären Antikörper Anti Galektin-3 (M3/38) und dem sekundären Antikörper Alexa Fluor®488 goat anti-rat IgG (H+L) durchgeführt. **a-c:** Um die Höchst-gefärbten Bakterien konnte eine Galektin-3-gefärbte Vakuole nachgewiesen werden. **d-e:** nur selten konnten kleinere Akkumulationen von Galektin-3 um einzelne hla(-) Staphylokokken detektiert werden. **f-i:** nur selten konnten kleinere Akkumulationen von Galektin-3 um einzelne hla(mut) Staphylokokken detektiert werden.

Konsequenzen der Rekrutierung von Galektin-3 sind nicht bekannt. Erst kürzlich wurde entdeckt, dass neben Galektin-3 auch Galektin-8 und Galektin-9 an die Phagozytose-Vakuolen invasiver Bakterien rekrutiert werden. Im Gegensatz zu Galektin-3 und Galektin-9, kann Galektin-8 an das Autophagie-Adapterprotein NDP52 (nuclear dot protein 52kDa) binden und auf diese Weise antibakterielle Autophagie induzieren (Thurston et al, 2012a).

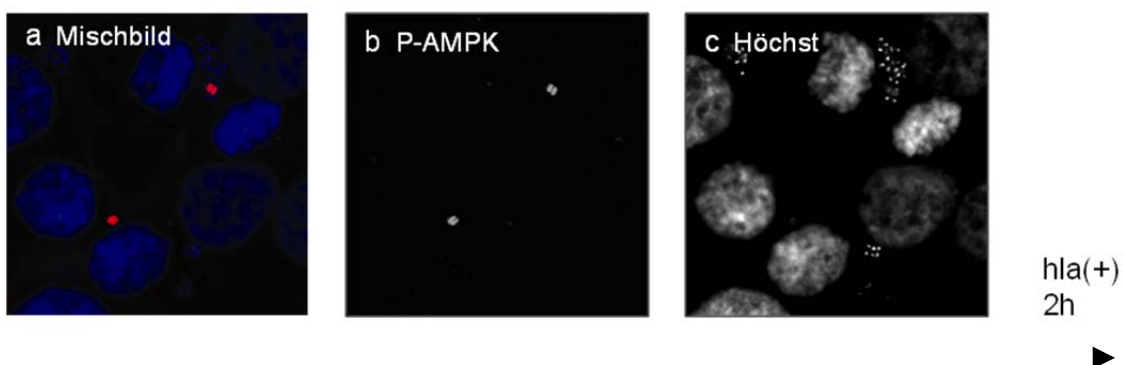
3.2.2 Autophagie-assoziierte Proteine

Autophagie ist Teil der angeborenen Immunität und kann als zellautonomer Abwehrmechanismus die Proliferation einiger invasiver Bakterien im Zytosol der Zelle unterdrücken. Für die klassische Autophagosomenbiogenese ist die hierarchische Aktivierung der Atg-Proteine und bestimmter nicht-Atg-Proteine notwendig. Obwohl es Hinweise dafür gibt, dass einige dieser Proteine bei der alternativen nicht-kanonischen Autophagie umgangen werden können, gibt die Rekrutierung Autophagie-assoziiierter Proteine Aufschluss darüber, ob intrazelluläre *Staphylococcus aureus* durch die klassische Autophagiemaschinerie erkannt und erfasst werden können. Neben der direkten Assoziation mit Autophagie-assoziierten Proteinen wurde die Aktivierung einiger Pro-Autophagie-assoziiierter Signalmechanismen durch intrazelluläre *Staphylococcus aureus* untersucht.

Pro-Autophagie-Signale

Energiemangel führt zur Aktivierung und Phosphorylierung des Energiesensors AMPK; Mangel an Aminosäuren führt durch die Aktivierung der Stresskinase GCN2 zur Phosphorylierung von eIF2 α und schließlich zur Induktion von Autophagie.

Ob der P-AMPK-Signalweg durch die Aufnahme der Bakterien aktiviert wird, wurde mittels Immunfluoreszenz überprüft. HaCaT-Zellen wurden mit *Staphylococcus aureus* hla(+) und hla(-) infiziert und P-AMPK mit einem monoklonalen Antikörper nachgewiesen. Bei einer Inkubationszeit von insgesamt 2h befanden sich nur wenige Bakterien in den Zellen und P-AMPK konnte noch nicht im Kontext mit den Bakterien nachgewiesen werden (Abb.3-4 a-c). Bei einer Inkubationszeit von insgesamt 4h oder 5h konnte sowohl um die α -Toxin produzierenden *Staphylococcus aureus* hla(+) (Abb.3-4 d-f), als auch um die hla(-) Staphylokokken Akkumulationen von P-AMPK um die Bakterien detektiert werden (Abb.3-4 g-i).



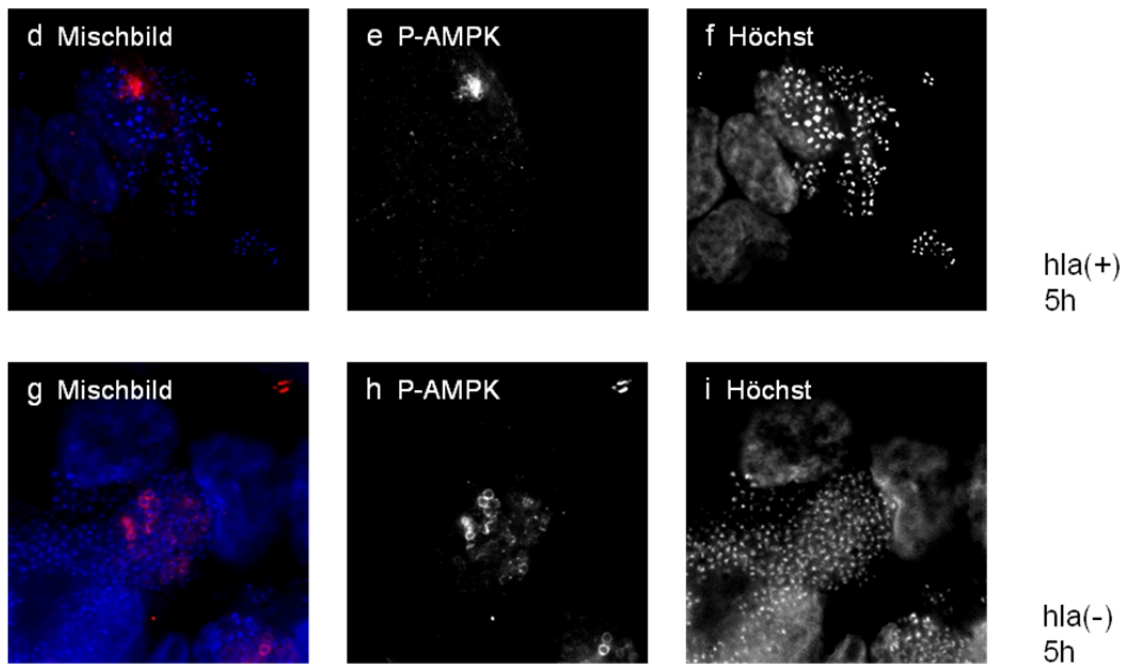


Abb. 3-4: P-AMPK wird α -Toxin-unabhängig an *Staphylococcus aureus* rekrutiert. HaCaT wurden mit *Staphylococcus aureus* hla(+) oder hla(-) 30CFU/ml für 1h bei 37° inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und weitere 1-4h bei 37°C inkubiert. Danach wurde eine Immunfluoreszenz mit dem primären monoklonalen Antikörper Anti Phospho-AMPK (Thr 172)(40H9) und dem sekundären Antikörper Alexa Fluor®594 goat anti-rabbit IgG (H+L) durchgeführt. **a-c:** Bei einer Inkubationszeit von insgesamt 2h mit *Staphylococcus aureus* hla(+) gab es noch keine Assoziation zwischen P-AMPK und den Bakterien. Das P-AMPK-Signal war jedoch deutlich an den Zentriolen mitotischer Zellen zu sehen **d-f:** P-AMPK konnte in Assoziation mit *Staphylococcus aureus* hla(+) bei einer Inkubationszeit von insgesamt 5h detektiert werden. **g-i:** Bei einer Inkubationszeit von insgesamt 5h mit *Staphylococcus aureus* hla(-) konnte ebenfalls eine Assoziation zwischen dem P-AMPK-Signal und einigen Bakterien detektiert werden.

P-eIF2 α spielt bei Aminosäurenmangel, aber auch bei einer viralen Infektion eine wichtige Rolle für die Autophagieinduktion. Um zu klären, ob eIF2 α in HaCaT-Zellen auch durch intrazelluläre *Staphylococcus aureus* aktiviert wird und diese Aktivierung von α -Toxin abhängt, wurden HaCaT Zellen mit *Staphylococcus aureus* hla(+), hla(mut) und hla(-) inkubiert und anschließend P-eIF2 α mit einem monoklonalen Antikörper in einer Immunfluoreszenz nachgewiesen. Nach Inkubationszeiten von 30min oder 1h konnte keine Aktivierung von eIF2 α festgestellt werden (Abb.3-5 **a-c**). Ab einer Inkubationszeit von 2h konnten vereinzelt ringförmige P-eIF2 α -Akkumulationen detektiert werden. Diese ringförmigen Akkumulationen konnten aber erst nach einer Inkubationszeit von 3h regelmäßig um *Staphylococcus aureus* hla(+) (Abb.3-5 **d-f**), hla(mut) (Abb.3-5 **g-i**) und hla(-) (Abb.3-5 **j-l**) in den infizierten Zellen beobachtet werden.

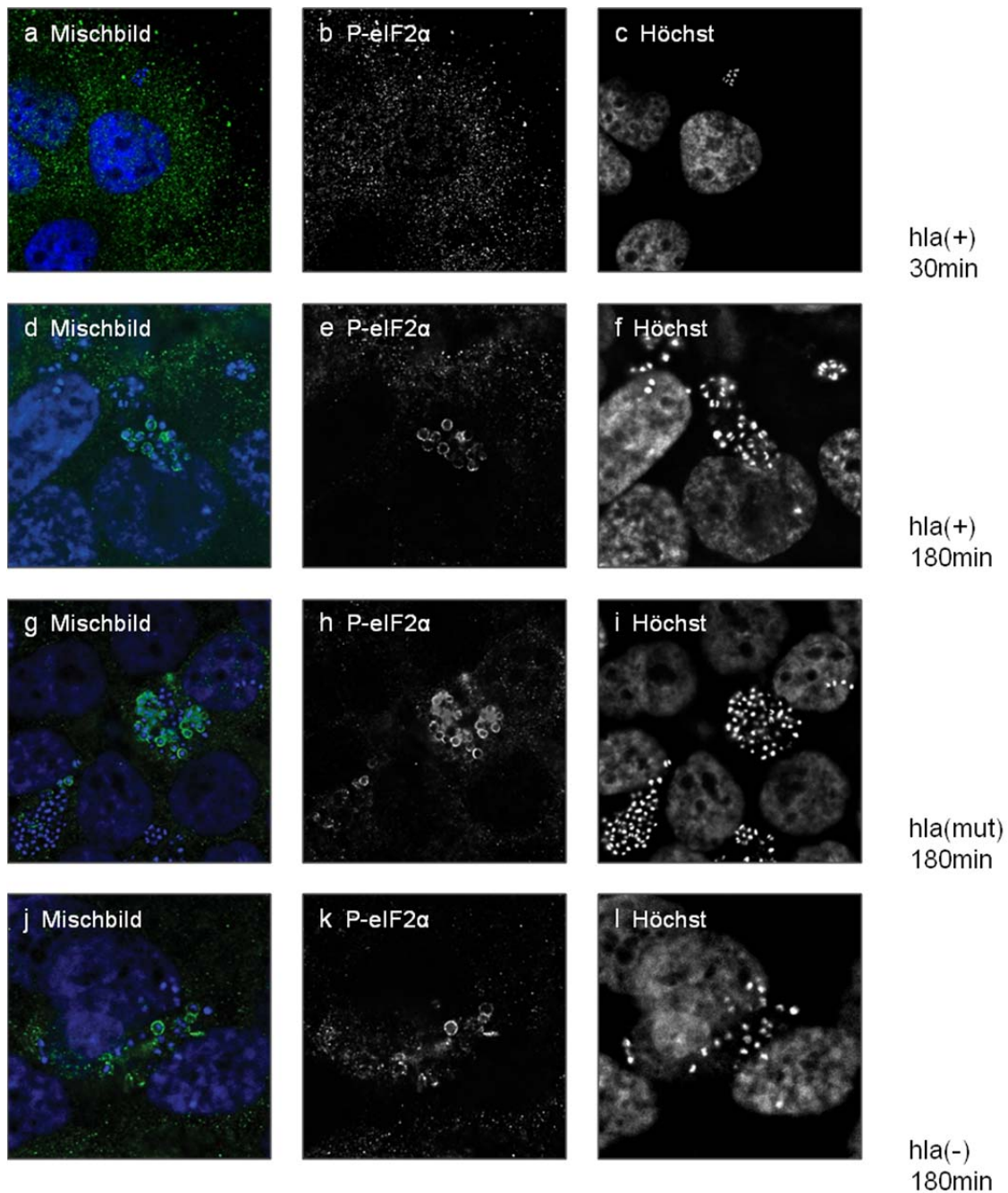


Abb. 3-5: P-eIF2 α wird α -Toxin-unabhängig an *Staphylococcus aureus* rekrutiert. HaCaT wurden mit *Staphylococcus aureus* hla(+), hla(-) oder hla(mut) 30CFU/ml für 30min oder 180min bei 37° inkubiert. Danach wurde eine Immunfluoreszenz mit dem primären monoklonalen Antikörper Anti-P-eIF2 α (Anti-EIF2S1 (phospho S51)) und dem sekundären Antikörper Alexa Fluor®488 goat anti-rabbit IgG (H+L) durchgeführt. **a-c:** Bei einer Inkubationszeit von 30min mit *Staphylococcus aureus* hla(+) sind wenige Bakterien in den Zellen und es konnten noch keine Akkumulationen von P-eIF2 α um die Bakterien detektiert werden. **d-f:** Bei einer Inkubationszeit von 180min mit *Staphylococcus aureus* hla(+) waren ringförmige Akkumulationen von P-eIF2 α um einige einzelne Bakterien erkennbar. **g-i:** Auch bei einer Infektion mit hla(mut) *Staphylokokken* waren bei einer Inkubationszeit von 180min Akkumulationen sichtbar. **j-l:** Bei einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* hla(-) waren ebenfalls ringförmige P-eIF2 α -Signale um einige Bakterien detektierbar.

Die Phosphorylierung des eukaryotischen Translations-Initiations-Faktors eIF2 α hat einen globalen Translationstopp mit Ausnahme weniger Genprodukte zur Folge. Die Reduzierung der Translation erlaubt den Zellen wertvolle Ressourcen einzusparen und die Genexpression so anzupassen, dass sie die Stresssituation überstehen können. Phosphoryliertes eIF2 α induziert aber auch die Translation von mRNAs, die unter anderem die Transkription regulieren können. ATF4 (activating transcription factor 4) wird durch die Phosphorylierung von eIF2 α exprimiert und kann dann durch die Induktion von ATF3 (activating transcription factor 3) die Expression von CHOP (CCAT/enhancer-binding protein homologous protein)/GADD153 (growth arrest and DNA-damage-inducible protein 153) induzieren. CHOP steigert die Expression von GADD34 (growth arrest and DNA-damage-inducible protein 34/PP1R15A protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A), welches die Dephosphorylierung von eIF2 α fördert und somit als Rückkopplungsmechanismus dient, um die Proteinsynthese später wieder in Gang zu setzen. Um Hinweise für eine P-eIF2 α -abhängige Genexpression von ATF4 zu erhalten, wurde die Aktivierung des CHOP-Promotors durch intrazelluläre *Staphylococcus aureus* überprüft. Dafür wurden HaCaT-Zellen mit dem Reporterplasmid pCHOP-EGFP transfiziert und mit *Staphylococcus aureus* infiziert. Weder bei einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* hla(+) (Abb.3-6 a-c) noch mit *Staphylococcus aureus* hla(-) (Abb.3-6 d-f) wurde ein stärkeres GFP-Signal detektiert.

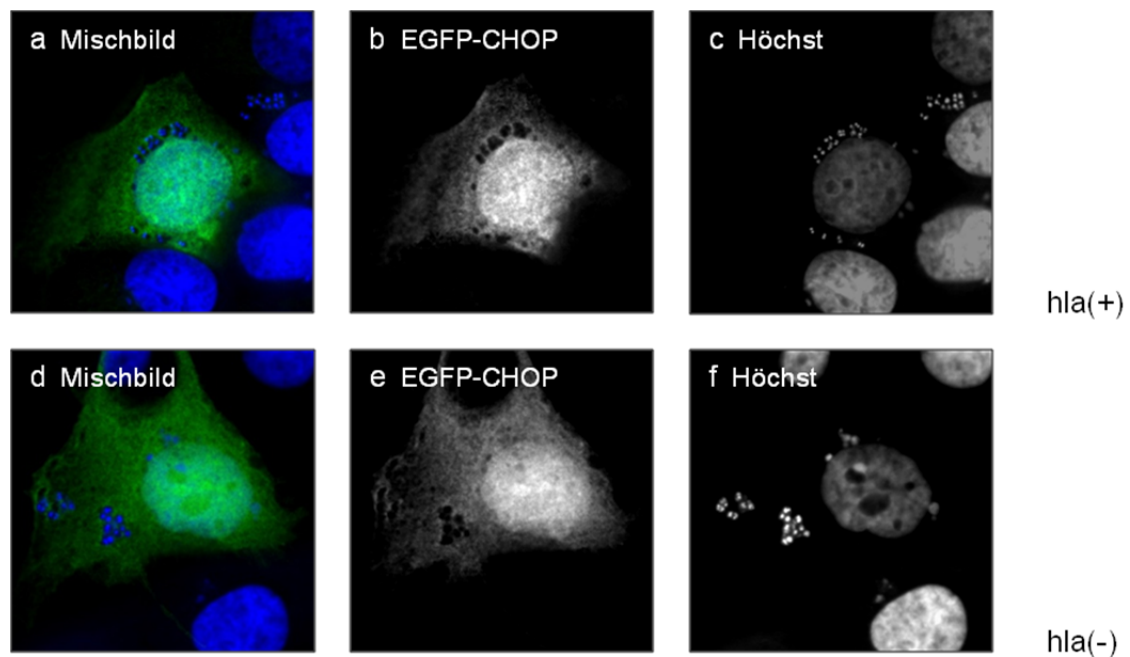


Abb. 3-6: Keine detektierbare Aktivierung des CHOP-Promotors durch intrazelluläre *Staphylococcus aureus*. HaCaT wurden mit pCHOP-GFP transfiziert und am folgenden Tag entweder mit *Staphylococcus aureus* hla(+) oder hla(-) 30CFU/ml für 1h bei 37° inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und weitere 2h bei 37°C inkubiert. **a-c:** kein verstärktes GFP-Signal um die Höchst-gefärbten *Staphylococcus aureus* hla(+) detektierbar. **d-f:** ebenfalls kein verstärktes GFP-Signal um die Höchst-gefärbten *Staphylococcus aureus* hla(-) detektierbar.

CReP (constitutive repressor of eIF2 α phosphorylation/PP1R15B protein phosphatase 1, regulatory subunit 15B) ist eine weitere Untereinheit der Holophosphatase PP1 und wird im

Gegensatz zu GADD34 konstitutiv und unabhängig vom Phosphorylierungsstatus von eIF2 α exprimiert. Eine direkte Interaktion von EGFP-CReP mit intrazellulären *Staphylococcus aureus* konnte in einem Infektionsversuch mit *Staphylococcus aureus* hla(+) und hla(-) in pEGFP-transfizierten Zellen nicht detektiert werden (Abb.3-7).

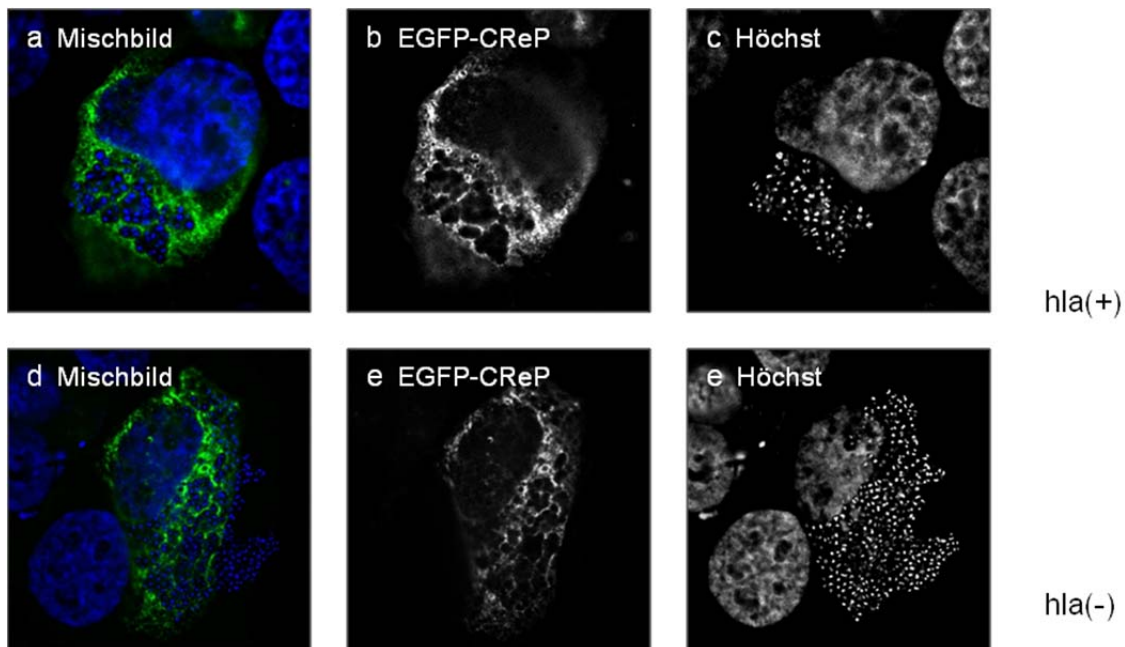


Abb. 3-7: Keine Rekrutierung von EGFP-CReP an intrazelluläre *Staphylococcus aureus*. HaCaT wurden mit pEGFP-CReP transfiziert und am folgenden Tag entweder mit *Staphylococcus aureus* hla(+) oder hla(-) 30CFU/ml für 1h bei 37° inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und weitere 2h bei 37°C inkubiert. **a-c:** keine Akkumulation von EGFP-CReP um die Höchst-gefärbten *Staphylococcus aureus* hla(+). **d-f:** ebenfalls keine Akkumulation von EGFP-CReP um *Staphylococcus aureus* hla(-).

Proteine der Autophagie-Core-Maschinerie

Vier Gruppen von Proteinen sind für die klassische Autophagosomenbiogenese notwendig: der ULK1-Komplex, Klasse III Phosphatidylinositol 3-OH Kinase-Komplexe, zwei Ubl-Proteine mit deren Konjugationssystemen und zwei Transmembranproteine.

Proteine des Klasse III Phosphatidylinositol 3-OH Kinase-Komplex

Der Klasse III Phosphatidylinositol 3-OH Kinase-Komplex besteht aus der Lipidkinase hVps34, Bcl1, p150 und Atg14L/Barkor oder UVRAG. Atg14L/Barkor und UVRAG konkurrieren um die Bindung an Bcl1. Um eine mögliche Interaktion dieser Proteine mit den aufgenommenen Bakterien zu überprüfen, wurden HaCaT-Zellen mit dem Plasmid pEGFP-Atg14L oder dem Plasmid pEGFP-C1-hUVRAG transfiziert und am folgenden Tag mit *Staphylococcus aureus* hla(+) oder hla(-) infiziert. Unabhängig davon, ob die Zellen mit den α -Toxin-produzierenden *Staphylococcus aureus* hla(+) (Abb.3-8 a-c) oder *Staphylococcus aureus* hla(-) (Abb.3-8 d-f) infiziert wurden, konnte eine geringe Akkumulation von EGFP-Atg14L um die Bakterien detektiert werden.

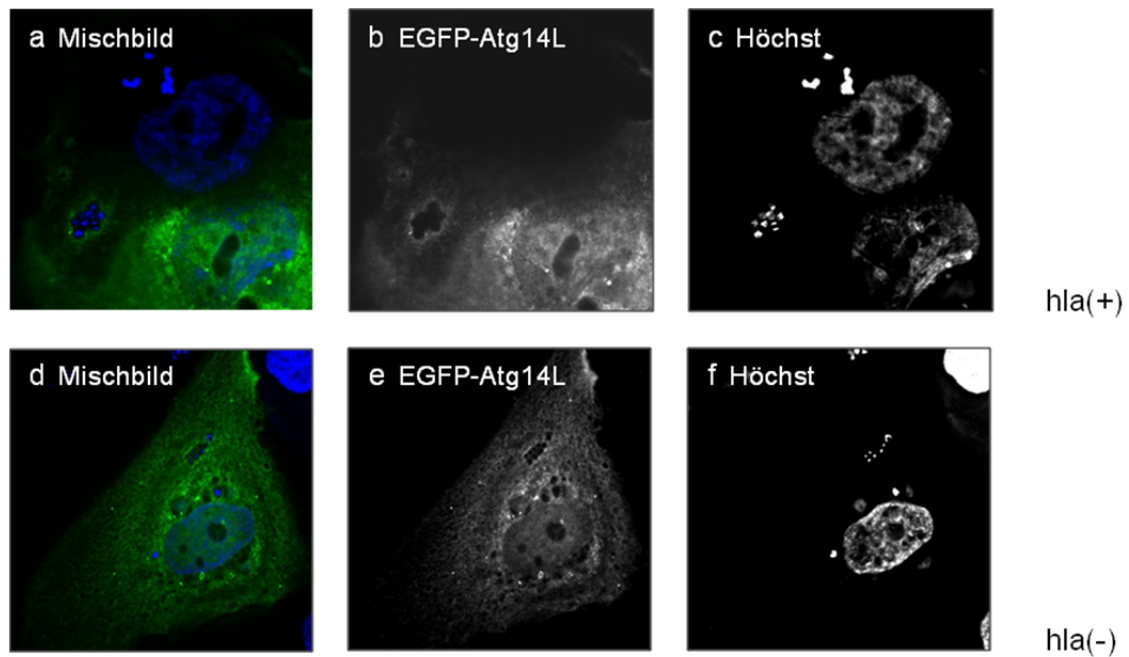
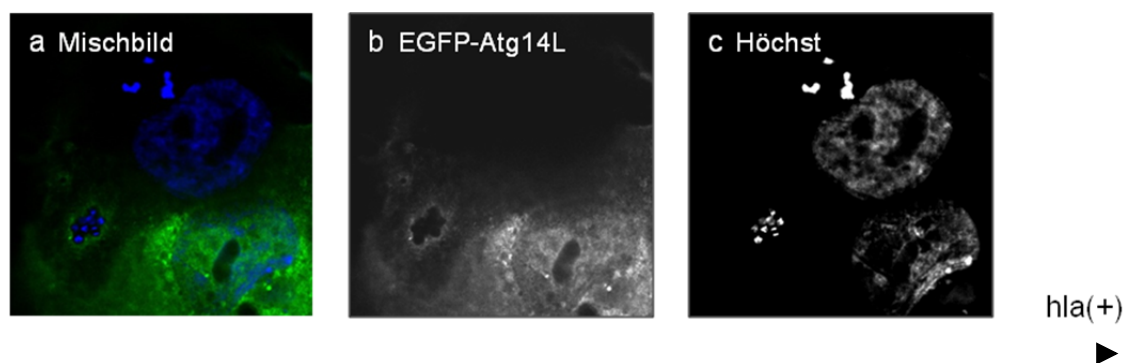


Abb. 3-8: Schwache Aktivierung von EGFP-Atg14L durch *Staphylococcus aureus*. HaCaT wurden mit pEGFP-Atg14L transfiziert und am folgenden Tag entweder mit *Staphylococcus aureus* hla(+) oder hla(-) 30CFU/ml für 1h bei 37° inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und weitere 60min bei 37°C inkubiert. **a-c:** schwache Akkumulation von EGFP-Atg14L um die Höchst-gefärbten *Staphylococcus aureus* hla(+). **d-f:** ebenfalls geringe Akkumulation von EGFP-Atg14L um *Staphylococcus aureus* hla(-).

Auch bei den mit pEGFP-C1-hUVRAG transfizierten HaCaT Zellen konnte eine geringe Akkumulation von EGFP-UVRAG um *Staphylococcus aureus* hla(+) (Abb.3-9 a-c) und hla(-) (Abb.3-9 d-f) detektiert werden.



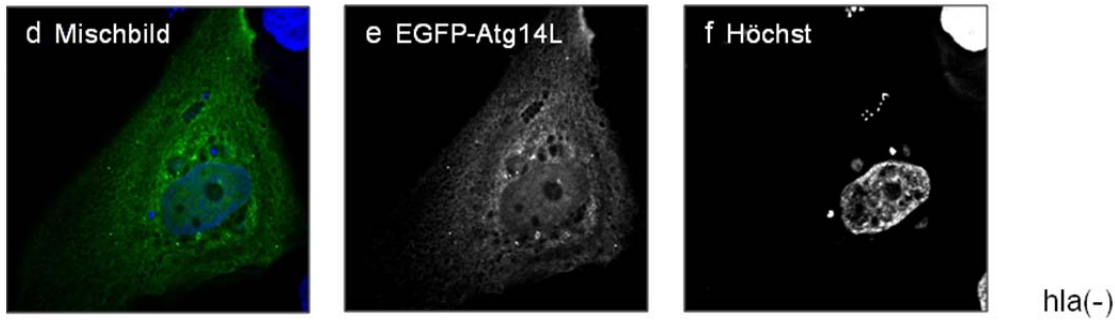


Abb. 3-9: Schwache Aktivierung von EGFP-hUVRAG durch *Staphylococcus aureus*. HaCaT wurden mit pEGFP-C1-hUVRAG transfiziert und am folgenden Tag entweder mit *Staphylococcus aureus* Stamm hla(-) oder hla(+) 30CFU/ml für 1h bei 37° inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und weitere 60min bei 37°C inkubiert. **a-c:** *Staphylococcus aureus* Stamm hla(+); schwache Akkumulation von UVRAG um die Höchst-gefärbten Bakterien sichtbar. **d-f:** *Staphylococcus aureus* Stamm hla(-); ebenfalls eine schwache Akkumulation von UVRAG um die Bakterien sichtbar.

Rubicon ist an späten Endosomen oder Lysosomen lokalisiert und wirkt unter normalen Bedingungen negativregulierend auf die Reifung der Autophagosomen, indem es einen Komplex mit UVRAG-Bcl1-hVps34-p150 bildet und die hVps34 behindert (Matsunaga et al, 2009; Zhong et al, 2009). Rubicon kann auch eine Autophagie-unabhängige Funktion erfüllen, indem es die Pathogen-spezifische Antwort von Makrophagen organisiert und verschiedene Immunkomplexe auf- und abbaut. Rubicon arbeitet in der Signalkaskade unterhalb von drei spezifischen PRRs (pattern recognition receptor), die z. B. bakterielle Lipoproteine (TLR2), Betaglukan von Pilzen (Dectin-1) oder doppelsträngige virale RNA (Rig-I) detektieren können. Während einer mikrobiellen Infektion und der TLR2-Aktivierung interagiert Rubicon mit der p22*phox*-Untereinheit des NADPH-Oxidase-Komplexes, um einen Ausstoß von ROS (reactive oxygen species) zu ermöglichen (Bradfield et al, 2012; Yang et al, 2012). Es wird angenommen, dass Rubicon die Effizienz der antimikrobiellen Aktivität der Makrophagen optimiert, indem es gleich zwei Mechanismen der angeborenen Immunität (Autophagie und Phagozytose) organisiert und zeitlich optimiert (Yang et al, 2012). Eine Autophagie-unabhängige Rolle von Rubicon ist in nicht-professionellen Phagozyten jedoch nicht bekannt. Um zu prüfen, ob Rubicon in HaCaT-Zellen an die intrazellulären *Staphylococcus aureus* rekrutiert wird, wurden HaCaT-Zellen mit pEGFP-Rubicon transfiziert und am folgenden Tag mit *Staphylococcus aureus* hla(+) oder hla(-) infiziert. Sowohl um die α -Toxin produzierenden *Staphylococcus aureus* hla(+) (Abb.3-10 a-c) als auch um die Bakterien ohne Plasmid für die α -Toxin-Produktion hla(-) (Abb.3-10 d-f), konnte ein EGFP-Rubicon-dekoriertes Kompartiment identifiziert werden.

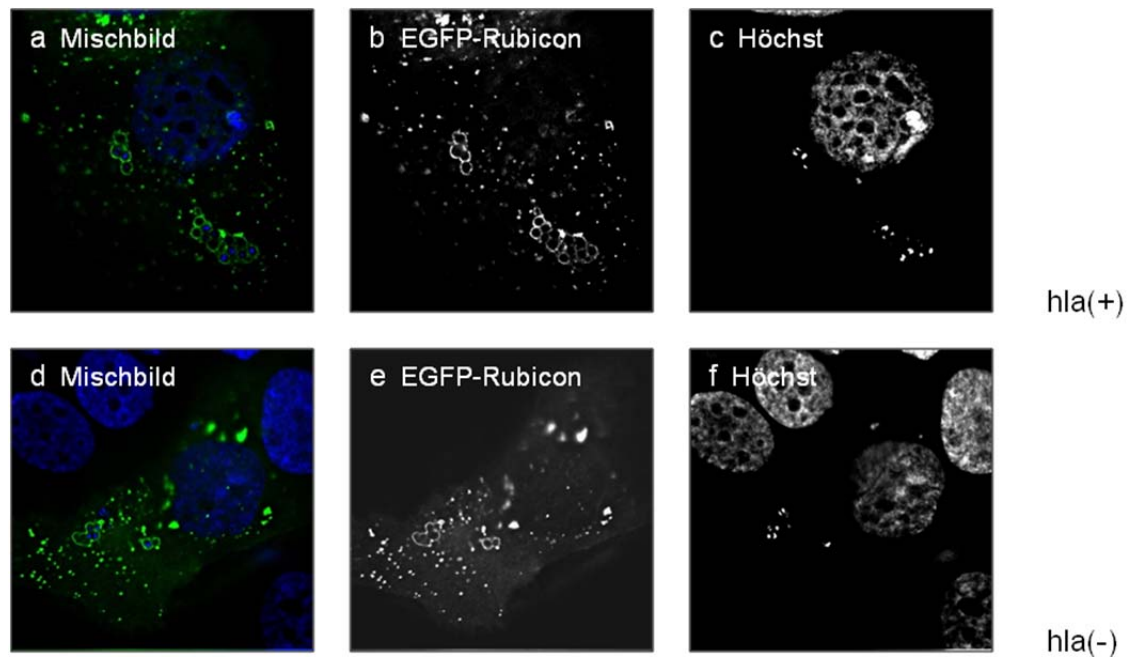


Abb. 3-10: EGFP-Rubicon Akkumulationen um intrazelluläre *Staphylococcus aureus*. HaCaT wurden mit pEGFP-Rubicon transfiziert und am folgenden Tag mit *Staphylococcus aureus* hla(-) oder hla(+) 30CFU/ml für 1h bei 37° inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und weitere 2h bei 37°C inkubiert. **a-c:** ringförmige Akkumulation von EGFP-Rubicon um die einzelnen Höchst-gefärbten *Staphylococcus aureus* hla(+). **d-f:** ebenfalls Akkumulationen von EGFP-Rubicon um die *Staphylococcus aureus* hla(-).

Proteine des Ubiquitin-like Systems - Atg8/LC3

Zwei Ubl (ubiquitin-like)-Proteine und deren Konjugationssysteme sind für die Bildung von klassischen Autophagosomen notwendig. Atg12 und LC3/MAP1-LC3 (microtubule associated protein 1- light chain 3) spielen während der Verlängerung und Ausdehnung der Phagophorenmembran sowie bei der Schließung der klassischen Phagozome eine entscheidende Rolle. Die Lipid-gebundene Form von LC3 (LC3-II) haftet auf der Innen- und Außenseite der Phagozome und wird erst vor der Fusion mit einem Lysosom von der äußeren Phagophorenmembran entfernt. Um zu prüfen, ob LC3 das Kompartiment, welches die aufgenommenen Staphylokokken umgibt, dekoriert, wurden Zellen mit pEGFP-LC3 transfiziert und am folgenden Tag mit *Staphylococcus aureus* hla(+), hla(-) und hla(mut) infiziert. In HaCaT Zellen, die mit α -Toxin produzierenden hla(+) Staphylokokken infiziert wurden (Abb.3-11 **a-c**), war eine Akkumulation von EGFP-LC3 um die Höchst-gefärbten Bakterien sichtbar, die bei einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* hla(-) ausblieb (Abb.3-11 **d-f**). *Staphylococcus aureus* hla(mut) produzieren die α -Toxin-Mutante D152c. D152c- α -Toxin zeichnet sich durch eine reduzierte Hämolyseaktivität aus. Aber auch die Infektion von HaCaT Zellen mit *Staphylococcus aureus* hla(mut) führte zur Akkumulation von EGFP-LC3 um die Bakterien (Abb.3-11 **g-i**). Diese α -Toxin-abhängigen EGFP-LC3-Akkumulationen konnten nicht nur in HaCaT Zellen (Abb.3-11), sondern auch in ODORA Zellen beobachtet werden (Abb.3-12).

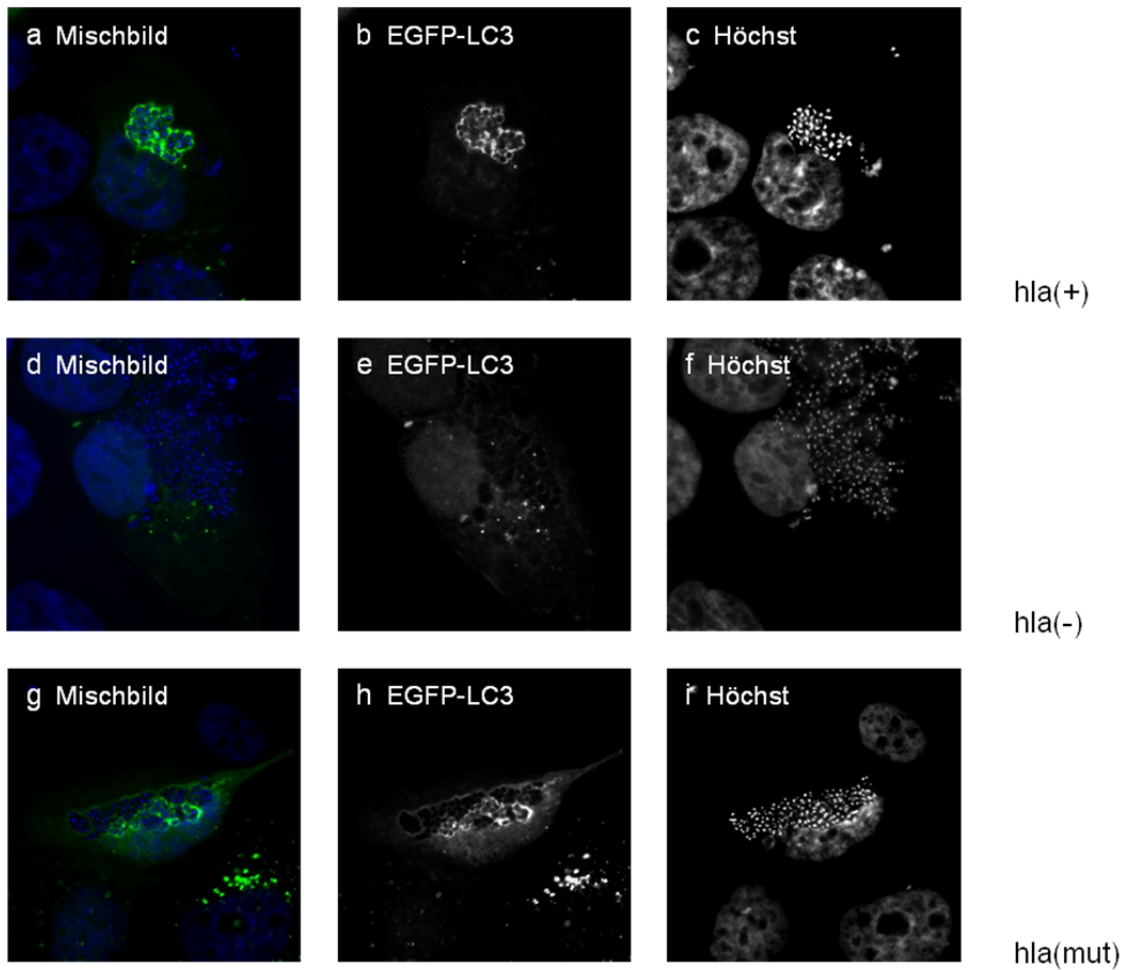
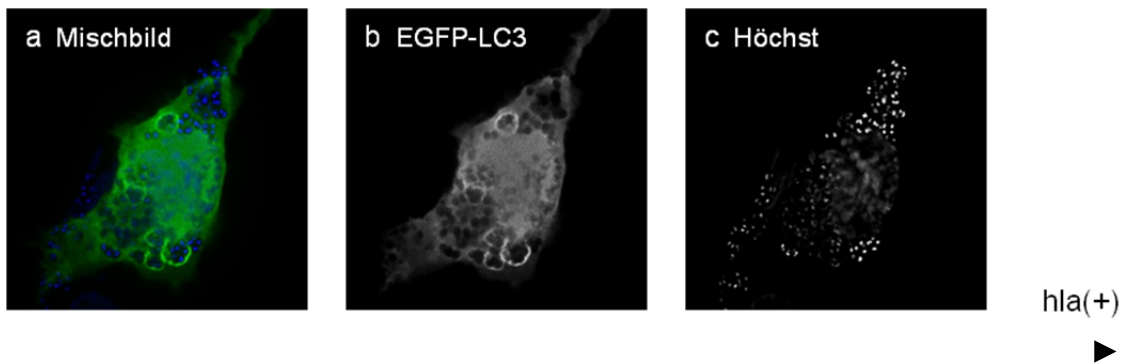


Abb. 3-11: α -Toxin-abhängige Akkumulationen von EGFP-LC3 um *Staphylococcus aureus* in HaCaT. HaCaT wurden mit pEGFP-LC3 transfiziert und am Folgetag 1h mit *Staphylococcus aureus* hla(+), hla(-) oder hla(mut) 30CFU/ml inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und für weitere 3h bei 37°C inkubiert. **a-c:** Die Höchst-gefärbten *Staphylococcus aureus* hla(+) sind von einem EGFP-LC3-dekorierten Kompartiment umgeben. **d-f:** Im Gegensatz zu den *Staphylococcus aureus* hla(+) konnte bei *Staphylococcus aureus* hla(-) keine EGFP-LC3-Akkumulation detektiert werden. **g-i:** *Staphylococcus aureus* hla(mut) waren, wie auch *Staphylococcus aureus* hla(+), ebenfalls von einem EGFP-LC3-dekorierten Kompartiment umgeben.



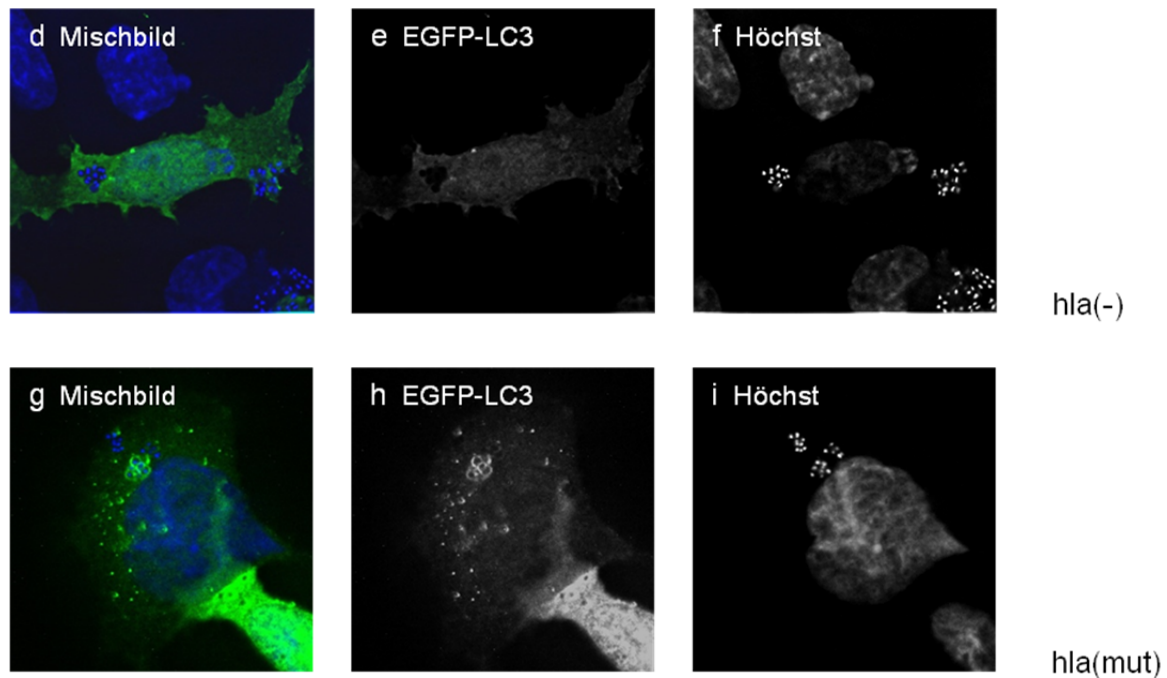


Abb. 3-12: α -Toxin-abhängige Akkumulationen von EGFP-LC3 um *Staphylococcus aureus* in ODORA. ODORA Zellen wurden mit pEGFP-LC3 transfiziert und am Folgetag 1h mit *Staphylococcus aureus* hla(+), hla(-) oder hla(mut) 30CFU/ml inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. **a-c:** Die Höchst-gefärbten *Staphylococcus aureus* hla(+) sind von einem EGFP-LC3-dekorierten Kompartiment umgeben. **d-f:** Im Gegensatz zu *Staphylococcus aureus* hla(+) konnte bei *Staphylococcus aureus* hla(-) keine EGFP-LC3-Akkumulation detektiert werden. **g-i:** *Staphylococcus aureus* hla(mut) waren, wie auch *Staphylococcus aureus* hla(+), ebenfalls von einem EGFP-LC3-dekorierten Kompartiment umgeben.

Um zu prüfen, ob exogenes α -Toxin Einfluss auf die LC3-Rekrutierung an die intrazellulären Staphylokokken haben könnte, wurden HaCaT Zellen wiederum mit pEGFP-LC3 transfiziert und am folgenden Tag mit *Staphylococcus aureus* hla(-) und entweder mit oder ohne isoliertes Alexa Fluor®546-markiertes α -Toxin inkubiert. Im Gegensatz zu den HaCaT Zellen, die nur mit *Staphylococcus aureus* hla(-) ohne Inkubation mit exogenem Alexa Fluor®546-markiertem α -Toxin (Abb.3-13 **d-f**) infiziert wurden, zeigten die Zellen, die mit Alexa Fluor®546-markiertem α -Toxin inkubiert wurden überraschenderweise eine deutliche Akkumulation von EGFP-LC3 um *Staphylococcus aureus* hla(-) (Abb.3-13 **g-j**), ähnlich wie bei einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* hla(+) ohne die Inkubation mit exogenem AlexaFluor®546-markierten α -Toxin (Abb.3-13 **a-c**). Ein weiterer überraschender Befund ist die partielle Lokalisation des exogenen AlexaFluor®546-markierten α -Toxins in der LC3-dekorierten Bakterienvakuole von *Staphylococcus aureus* hla(-) (Abb.3-13 **g** und **h**).

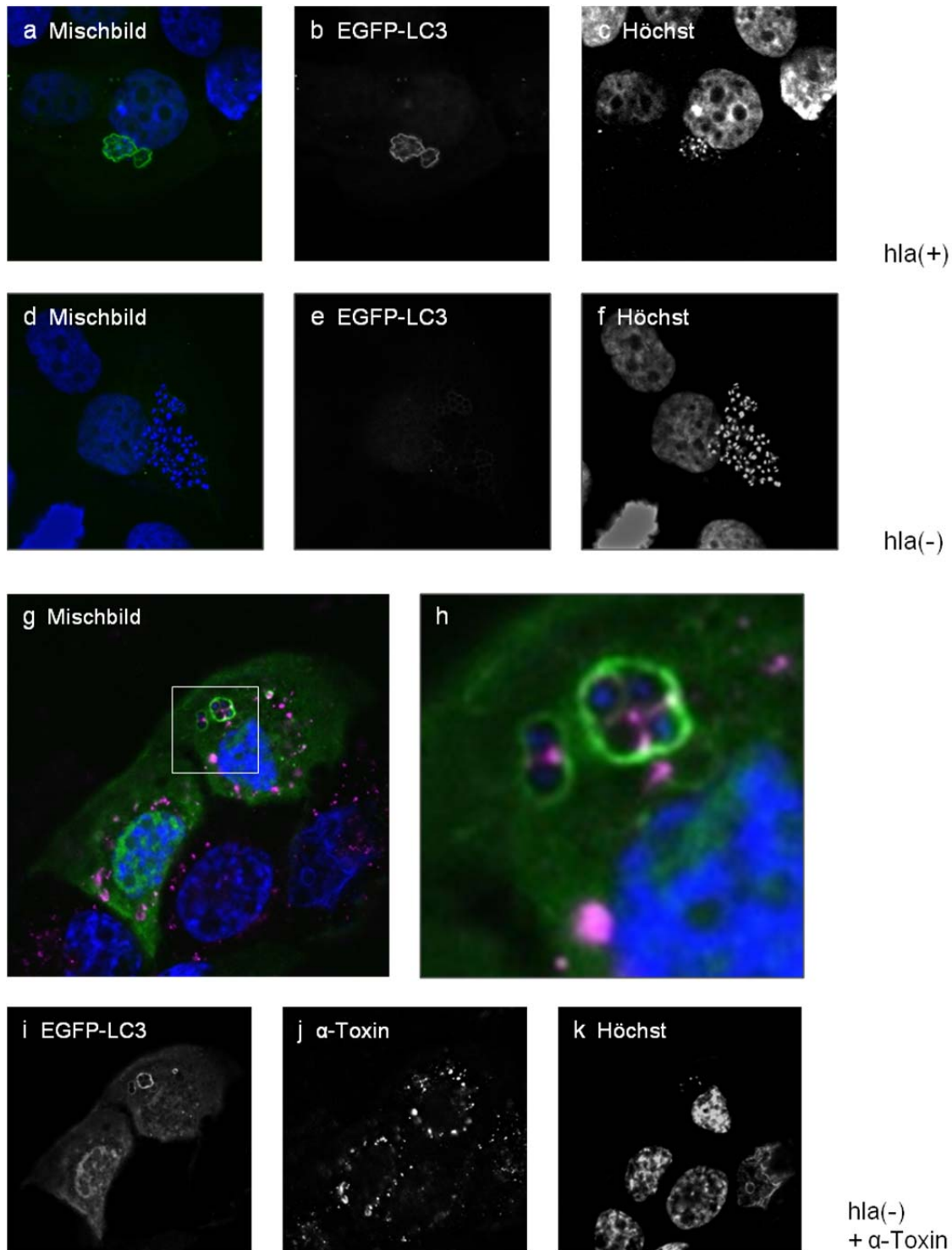


Abb. 3-13: Exogenes α -Toxin führt zur EGFP-LC3-Rekrutierung an *Staphylococcus aureus* hla(-) und lokalisiert partiell in den LC3-positiven Kompartimenten. **a-c:** HaCaT wurden mit pEGFP-LC3 transfiziert und am Folgetag 1h mit *Staphylococcus aureus* hla(+) 30CFU/ml inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und für weitere 3h bei 37°C inkubiert. Die Höchst-gefärbten *Staphylococcus aureus* hla(+) sind von einem EGFP-LC3-dekorierten Kompartiment umgeben. **d-f:** HaCaT wurden wie in a-c transfiziert und mit *Staphylococcus aureus* hla(-) infiziert. Im Gegensatz zu den *Staphylococcus aureus* hla(+) konnte bei *Staphylococcus aureus* hla(-) keine EGFP-LC3-Akkumulation detektiert werden. **g-k:** HaCaT wurden wie in a-c transfiziert und am Folgetag 1h mit *Staphylococcus aureus* hla(-) inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und in Anwesenheit von 1 μ g/ml aufgereinigtem und Alexa Fluor®546-markiertem α -Toxin für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Um *Staphylococcus aureus*

hla(-) war unter diesen Bedingungen eine Akkumulation von EGFP-LC3 detektierbar. Das exogene α -Toxin befand sich zum Teil in den LC3-dekorierten Kompartimenten.

Proteine der selektiven Autophagie -Autophagieadapterprotein SQSTM1/p62

LC3 kann direkt mit p62/sequestosome-1 (SQSTM1) interagieren. p62 ist an verschiedenen zellulären Prozessen wie der Signaltransduktion, der Rezeptorinternalisierung sowie am Abbau von Proteinen und der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase beteiligt. p62 besitzt eine Reihe von Protein-Protein-Interaktions-Domänen, unter anderem eine UBA (Ubiquitin associated)-Domäne für die Bindung an Polyubiquitin und eine LIR (LC3-interacting region)-Domäne, mit der p62 an LC3 binden kann. Durch die Interaktion mit LC3 fungiert p62 als Adapterprotein und fördert den Abbau von polyubiquitinierten Proteinaggregaten durch Autophagosomen. Für das Bakterium *Salmonella typhimurium* ist bekannt, dass p62 an die intrazellulären Bakterien rekrutiert wird. Für eine wirksame Eindämmung der intrazellulären Replikation von *Salmonella typhimurium* im Zytosol, ist die Expression von p62 notwendig (Zheng et al, 2009). Um zu prüfen, ob das Surrogatprotein DsRed-p62 auch an intrazelluläre *Staphylococcus aureus* rekrutiert wird, wurden HaCaT Zellen mit pDsRed-p62 transfiziert und am folgenden Tag mit *Staphylococcus aureus* hla(+) und hla(-) infiziert. In Abb.3-14 a-c ist eine Rekrutierung von DsRed-p62 um einige Bakterien vom *Staphylococcus aureus* hla(+) zu sehen, während in Abb.3-14 d-f keine Akkumulationen von DsRed-p62 um die Höchst-gefärbten *Staphylococcus aureus* hla(-) zu erkennen sind.

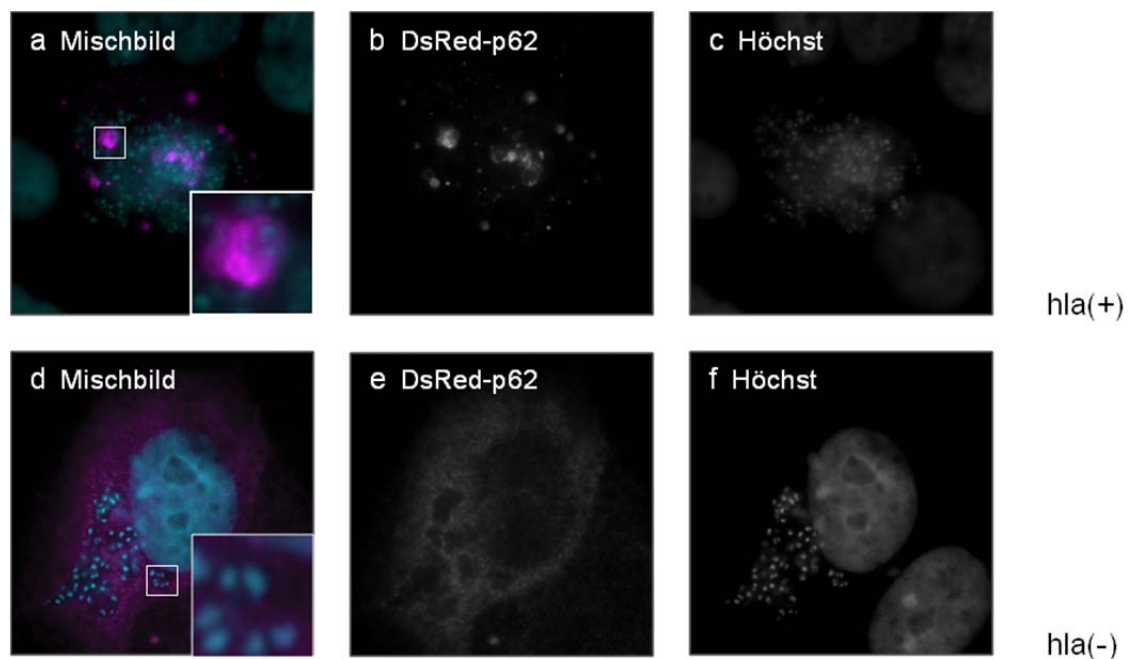
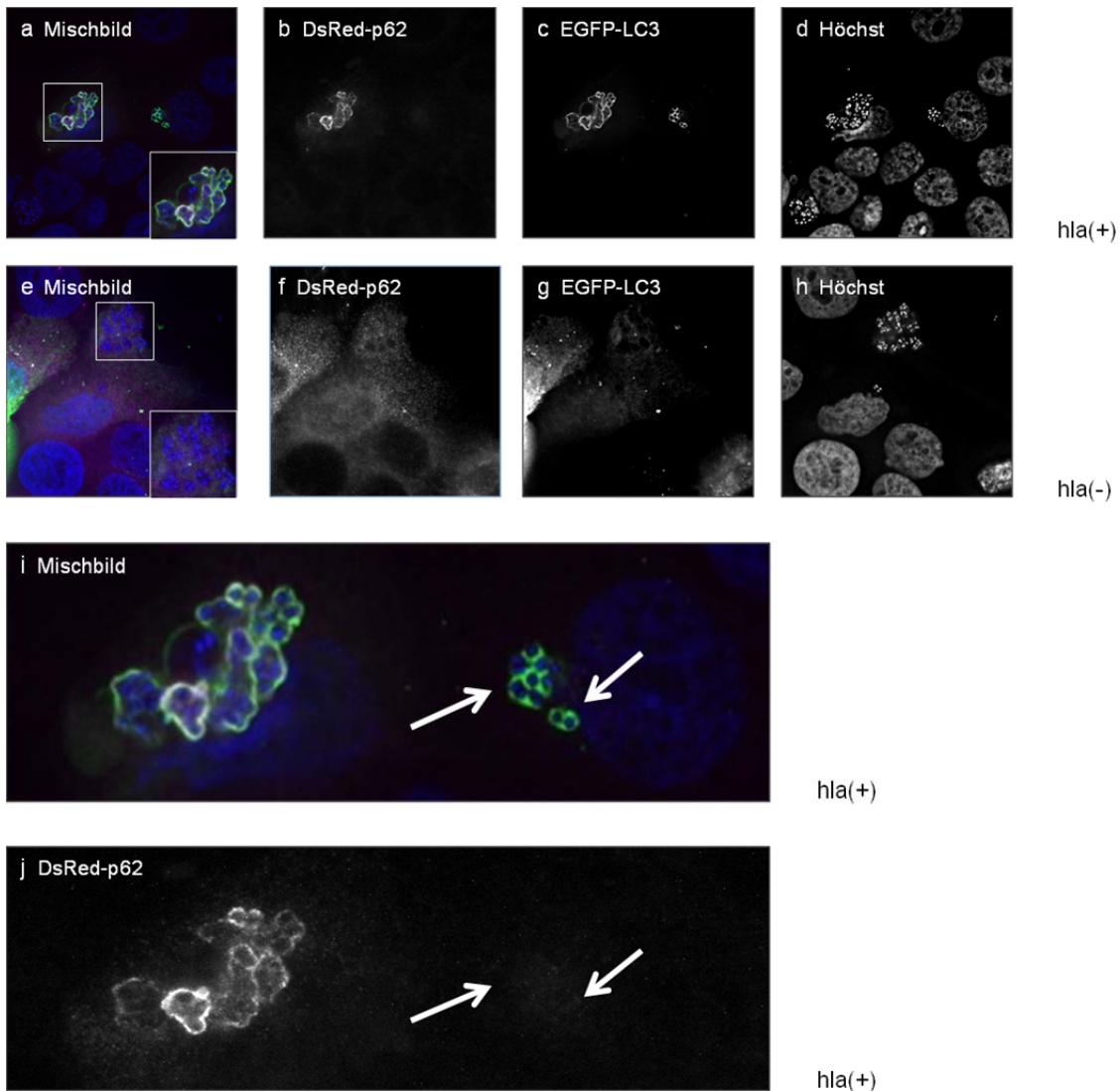


Abb. 3-14: α -Toxin-abhängige Akkumulationen von DsRed-p62 um *Staphylococcus aureus* hla(+) in HaCaT. HaCaT wurden mit pDsRed-p62 transfiziert und am Folgetag 1h mit *Staphylococcus aureus* hla(+) oder hla(-) 30CFU/ml inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und für weitere 2h bei 37°C inkubiert. **a-c:** Die Höchst-gefärbten *Staphylococcus aureus* hla(+) sind teilweise von DsRed-p62-Akkumulationen umgeben. **d-f:** Im Gegensatz zu den *Staphylococcus aureus* hla(+) konnte bei *Staphylococcus aureus* hla(-) keine DsRed-p62-Akkumulation detektiert werden.

Bei einer Kotransfektion von pEGFP-LC3 und pDsRed-p62 in HaCaT-Zellen und anschließender Infektion mit den *Staphylococcus aureus* hla(+) und hla(-) konnte wiederum eine α -Toxin-abhängige Rekrutierung von LC3 und p62 an die Bakterien beobachtet werden. Die Expression von DsRed-p62 erscheint durch die Koexpression von EGFP-LC3 verstärkt (Abb.3-15). Bei einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* hla(+) wird EGFP-LC3 und DsRed-p62 an die Bakterien rekrutiert. Alle DsRed-p62-Akkumulationen überlappen mit EGFP-LC3. Jedoch sind nicht alle EGFP-LC3-dekorierten Bakterien zugleich auch mit DsRed-p62 assoziiert (Abb.3-15 **a-d** und Pfeile in den Vergrößerungen aus **a-c** Abb.3-15 **i-k**). Bei einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* hla(-) ist weder eine Rekrutierung von EGFP-LC3, noch von DsRed-p62 an die Bakterien erkennbar (Abb.3-15 **e-h**).



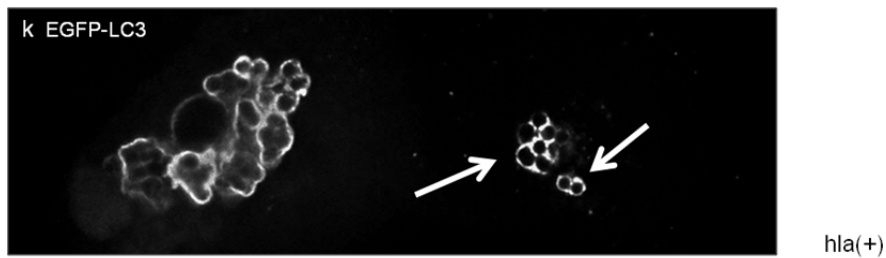


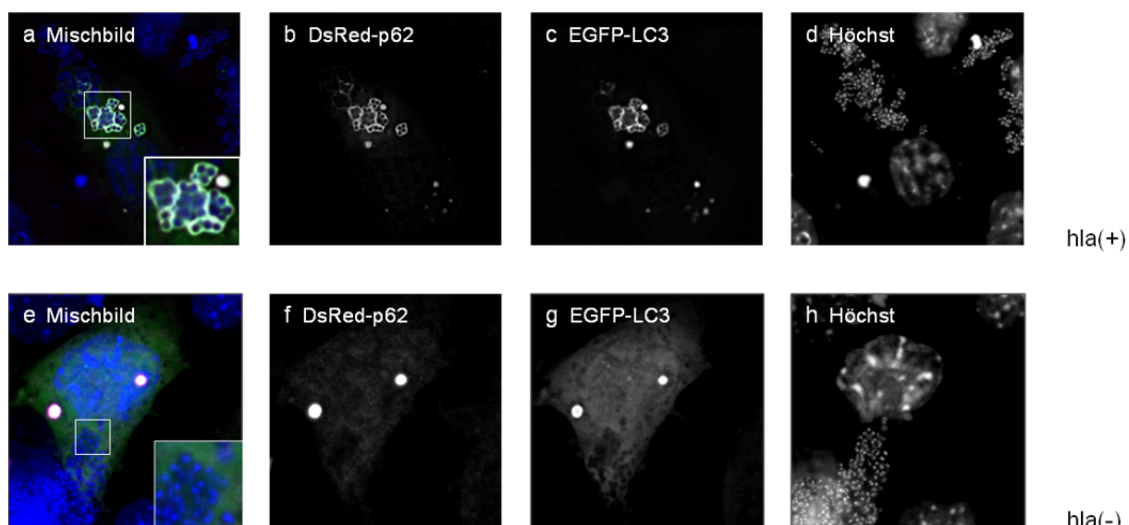
Abb. 3-15: α -Toxin-abhängige Rekrutierung von EGFP-LC3 und DsRed-p62 an intrazelluläre *Staphylococcus aureus* hla(+) in HaCaT. HaCaT wurden mit pEGFP-LC3 und pDsRed-p62 kotransfiziert und am Folgetag 1h mit *Staphylococcus aureus* hla(+) oder hla(-) 30CFU/ml inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und für weitere 2h bei 37°C inkubiert. **a-d:** Die Bakterien sind von einem EGFP-LC3-dekorierten Kompartiment umgeben, alle DsRed-p62-Akkumulationen überlappen mit EGFP-LC3-dekorierten Kompartimenten. Manche Bakterien-Kompartimente sind ausschließlich mit EGFP-LC3 umgeben. **e-h:** Im Gegensatz zu *Staphylococcus aureus* hla(+) konnte bei *Staphylococcus aureus* hla(-) weder eine DsRed-p62-Akkumulation noch eine Akkumulation von EGFP-LC3 um die Bakterien detektiert werden. **i-k:** Vergrößerungen aus a-c. Die weißen Pfeile markieren EGFP-LC3-dekorierte Bakterienvakuolen, die nicht mit DsRed-p62-Akkumulationen kolokalisieren.

3.2.3 Ubiquitinierung von α -Toxin oder α -Toxin-assoziierten Proteinen als Signal für p62

Der Autophagierezeptor p62 kann über seine UBA-Domäne polyubiquitinierte Substrate binden und den selektiven Abbau durch die Rekrutierung von LC3 und der Autophagiemaschinerie bewirken. Die α -Toxin-abhängige selektive Rekrutierung von p62 an *Staphylococcus aureus* hla(+) deutet auf die Ubiquitinierung von α -Toxin oder einem α -Toxin-assoziierten zytosolischen Protein hin, falls die Rekrutierung von p62 tatsächlich über die UBA-Domäne stattfindet.

Rekrutierung von p62 über das α -Toxin-assoziierte Protein Caveolin-1

Um eine mögliche Beteiligung des zytosolischen α -Toxin-assoziierten Proteins Caveolin-1 an der selektiven Rekrutierung von DsRed-p62 und EGFP-LC3 zu untersuchen, wurden Caveolin-defiziente murine Fibroblasten (MEF_{cav}^{-/-}) mit pEGFP-LC3 und pDsRed-p62 kotransfiziert und mit *Staphylococcus aureus* hla(+), hla(-) oder hla(mut) infiziert. In MEF_{cav}^{-/-}-Zellen konnte in Abwesenheit von Caveolin eine α -Toxin-abhängige Rekrutierung von EGFP-LC3 und DsRed-p62 an die intrazellulären Bakterien detektiert werden (Abb.3-16). Akkumulationen von EGFP-LC3 und DsRed-p62 konnten in den MEF_{cav}^{-/-}-Zellen wie in den HaCaT-Zellen wiederum ausschließlich um die Bakterien der *Staphylococcus aureus*-Varianten hla(+) und hla(mut) detektiert werden (Abb.3-16 a-d und Abb.3-16 i-l). Bei einer Infektion der MEF_{cav}^{-/-}-Zellen mit der Staphylokokken-Variante hla(-) blieb eine Rekrutierung von EGFP-LC3 und DsRed-p62 aus (Abb. 3-16 e-h). Leider erwies sich die Infektion von MEF_{wt}-Zellen als extrem ineffizient. Nur vereinzelt konnten infizierte Zellen detektiert werden. Zellen, die sowohl infiziert als auch transfiziert waren, ließen sich daher nicht identifizieren. Für die sehr viel bessere Infektionseffizienz der MEF_{cav}^{-/-}-Zellen machen Hoffmann *et al.* 2010 die verbesserte Mobilität Mikrodomänen-assoziiierter Proteine in Abwesenheit von Caveolin-1 verantwortlich. Sie konnten eine unterdrückte Aufnahme von *Staphylococcus aureus* durch die Expression von Wildtyp-Caveolin-1 beobachten (Hoffmann *et al.*, 2010).



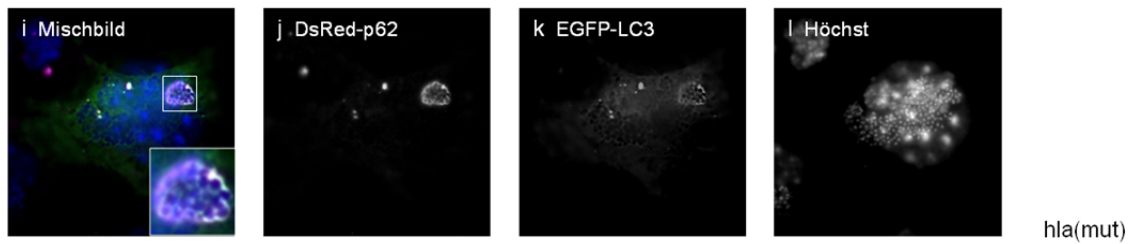
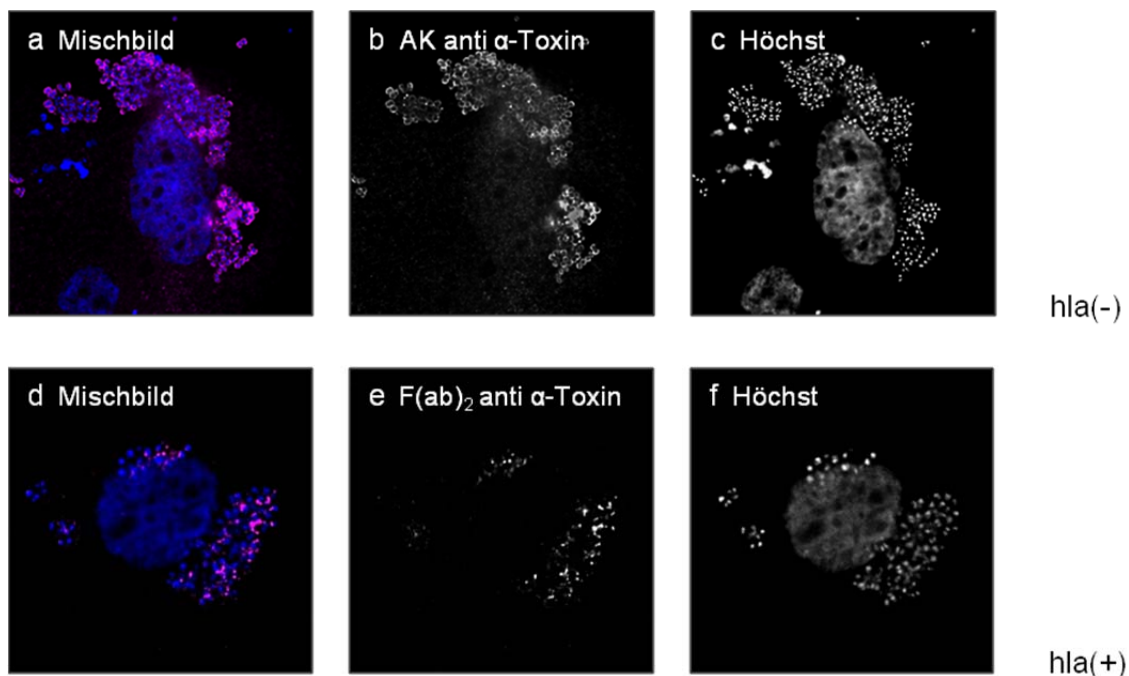


Abb. 3-16: α -Toxin-abhängige Rekrutierung von EGFP-LC3 und DsRed-p62 an intrazelluläre *Staphylococcus aureus* in $MEF_{cav-/-}$. $MEF_{cav-/-}$ -Zellen wurden mit pEGFP-LC3 und pDsRed-p62 kotransfiziert und am Folgetag 1h mit *Staphylococcus aureus* hla(+), hla(-) oder hla(mut) 30CFU/ml inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und für weitere 2h bei 37°C inkubiert. **a-d:** *Staphylococcus aureus* hla(+) sind von einem EGFP-LC3-dekorierten Kompartiment umgeben, DsRed-p62 kolokalisiert fast vollständig mit diesem Kompartiment. **e-h:** Im Gegensatz zu *Staphylococcus aureus* hla(+) konnte bei *Staphylococcus aureus* hla(-) weder eine DsRed-p62-Akkumulation noch eine Akkumulation von EGFP-LC3 um die Bakterien detektiert werden. **i-l:** An *Staphylococcus aureus* hla(mut) wurde wie bei *Staphylococcus aureus* hla(+) EGFP-LC3 und DsRed-p62 rekrutiert.

3.3 Darstellung von α -Toxin im Kontext mit seinem Produzenten *Staphylococcus aureus*

Die Rekrutierung der Autophagieproteine EGFP-LC3 und DsRed-p62 an die Bakterien erfolgte in Abhängigkeit der *Staphylococcus aureus*-Varianten, mit denen die Zellen infiziert wurden. Die *Staphylococcus aureus*-Variante hla(-) hat eine chromosomale Deletion im *hla* Gen und kann ohne zusätzlich transformiertes Plasmid kein α -Toxin produzieren. Die *Staphylococcus aureus*-Varianten, hla(+) und hla(mut), unterscheiden sich von hla(-) folgerichtig nur in der Fähigkeit, α -Toxin produzieren zu können. Variante hla(-) enthält kein Plasmid für die Produktion von α -Toxin, während hla(+) das Wildtyp α -Toxin produziert und hla(mut) die mutierte, nicht lytische Variante des α -Toxins D152c freisetzt. Um die Lokalisation des α -Toxins in Bezug zu seinem Produzenten zu analysieren, wurden HaCaT-Zellen mit den α -Toxin-produzierenden *Staphylococcus aureus*-Varianten hla(+) oder hla(-) ohne das Plasmid (ohne pDU1212) für die α -Toxin-Produktion infiziert. Der immunologische Nachweis von α -Toxin scheiterte in Anwesenheit seines Produzenten an der hohen Affinität des bakteriellen Oberflächenproteins Protein A für den F_c-Anteil von Immunglobulinen. Eine sehr starke unspezifische Bindung des Anti- α -Toxin-Antikörpers an *Staphylococcus aureus* hla(-) war die Folge (Abb.3-17 a-c). Daraufhin wurden F(ab)₂-Fragmente produziert, mit denen α -Toxin erstmals ohne unspezifische Bindung im Kontext mit seinen Produzenten *Staphylococcus aureus* detektiert werden konnten (2.2.4). In Abb.3-17 d-f ist AlexaFluor®594-gefärbtes α -Toxin in unmittelbarer Nähe zu *Staphylococcus aureus* hla(+) zu sehen. Um *Staphylococcus aureus* hla(-) wurde erwartungsgemäß kein α -Toxin nachgewiesen (Abb.3-17 g-i).



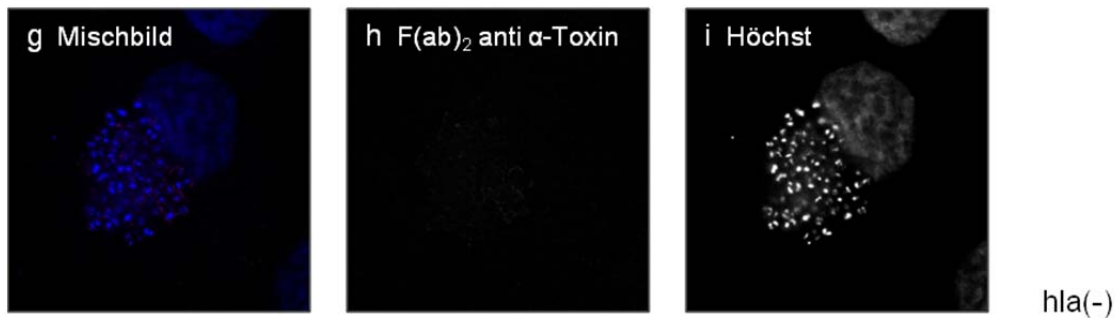


Abb. 3-17: Nachweis von α -Toxin im Kontext intrazellulärer *Staphylococcus aureus*. HaCaT wurden mit den *Staphylococcus aureus*-Varianten hla(+) oder hla(-) 30CFU/ml für 1h bei 37° inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde eine Immunfluoreszenz mit dem primären Antikörper Anti-Staphylococcal α -Toxin oder F(ab')₂-Fragmenten aus Anti-Staphylococcal α -Toxin (2.2.4) und dem sekundären Antikörper Alexa Fluor®594 goat anti-rabbit IgG (H+L) durchgeführt. **a-c:** Immunfluoreszenz mit dem Anti-Staphylococcal α -Toxin Antikörper: Starke unspezifische Bindung des Antikörpers an die Staphylokokken-Variante hla(-). **d-f:** Immunfluoreszenz mit den F(ab')₂-Fragmenten aus Anti-Staphylococcal α -Toxin: Um die Höchst-gefärbten *Staphylococcus aureus* hla(+) konnte α -Toxin ohne unspezifische Bindung an die Bakterien nachgewiesen werden **g-i:** Immunfluoreszenz mit den F(ab')₂-Fragmenten aus Anti-Staphylococcal α -Toxin: kein α -Toxin wurde um die Bakterien der *Staphylococcus aureus*-Variante hla(-) detektiert.

Um die Lokalisation des α -Toxins in Bezug auf seinen Produzenten *Staphylococcus aureus* auch auf ultrastruktureller Ebene analysieren zu können, wurden wiederum HaCaT Zellen mit den *Staphylococcus aureus*-Varianten hla(+) oder hla(-) infiziert und nach der Fixierung für die Kryomikrotomie vorbereitet. Nachdem sich das α -Toxin in den Kryoschnittbändern mit den F(ab')₂-Fragmenten gegen α -Toxin erfolgreich um die Bakterien nachweisen ließ (Abb.3-18 **a-d**), wurden Kryoschnitte der infizierten HaCaT-Zellen auf Nickel-Netzchen (Grids) aufgenommen und für die Immunogoldmarkierung vorbereitet. Die Kryoschnitte wurden auf den Grids mit den F(ab')₂-Fragmenten gegen α -Toxin inkubiert und in einem zweiten Schritt mit Gold-gekoppelten sekundären F(ab')₂-Fragmenten inkubiert und schließlich für die Auswertung im Transmissionselektronenmikroskop weiterverarbeitet.

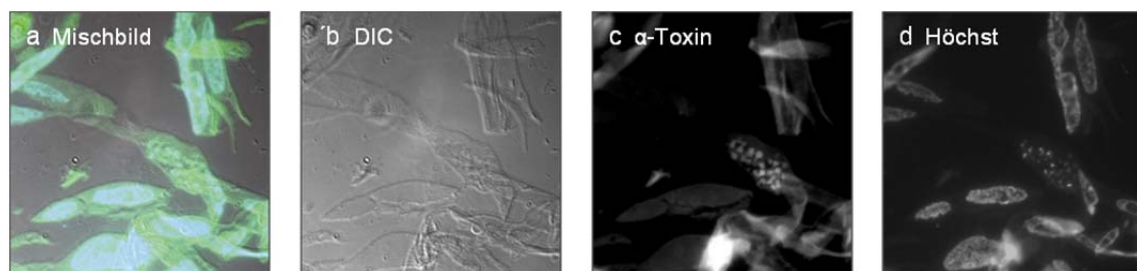


Abb. 3-18: Nachweis von α -Toxin um *Staphylococcus aureus* in Kryoschnittbändern. HaCaT wurden mit den α -Toxin-produzierenden *Staphylococcus aureus* hla(+) 30CFU/ml für 1h bei 37° inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und weitere 3h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Glutaraldehyd fixiert und für die Kryomikrotomie vorbereitet. Die Schnittbänder wurden auf einen Objektträger aufgenommen und eine Immunfluoreszenz mit F(ab')₂-Fragmenten aus Anti-Staphylococcal α -Toxin (2.2.4) und dem sekundären Antikörper Alexa Fluor®488 goat anti-rabbit IgG (H+L) durchgeführt. **a-d:** Trotz der, durch die Glutaraldehydfixierung verursachten, starken Autofluoreszenz, konnte α -Toxin in den Schnittbändern um die Höchst-gefärbten *Staphylococcus aureus* hla(+) detektiert werden.

Das mit 10nm-Goldkugeln-immunmarkierte α -Toxin konnte im Elektronenmikroskop in unmittelbarer Nähe zu den *Staphylococcus aureus* hla(+) detektiert werden. In den Vergrößerungen Abb.3-19 **b** und Abb.3-19 **c** aus Abb.3-19 **a** sind Goldkugeln direkt am Bakterium sowie im Lumen des Bakterien-Kompartiments in Assoziation mit Membranhüllten vesikulären Strukturen zu sehen (Pfeilspitzen). Auch in den Abbildungen 3-19 **d** und **e** sind Goldkugeln direkt am Bakterium sowie im Lumen des Kompartiments sichtbar (Pfeile). Zusätzlich zeigen die Pfeilspitzen in Abb.3-19 **e** und **f**, dass das Bakterienkompartiment teilweise mit einer zweifachen Doppellipidschicht umgeben war.

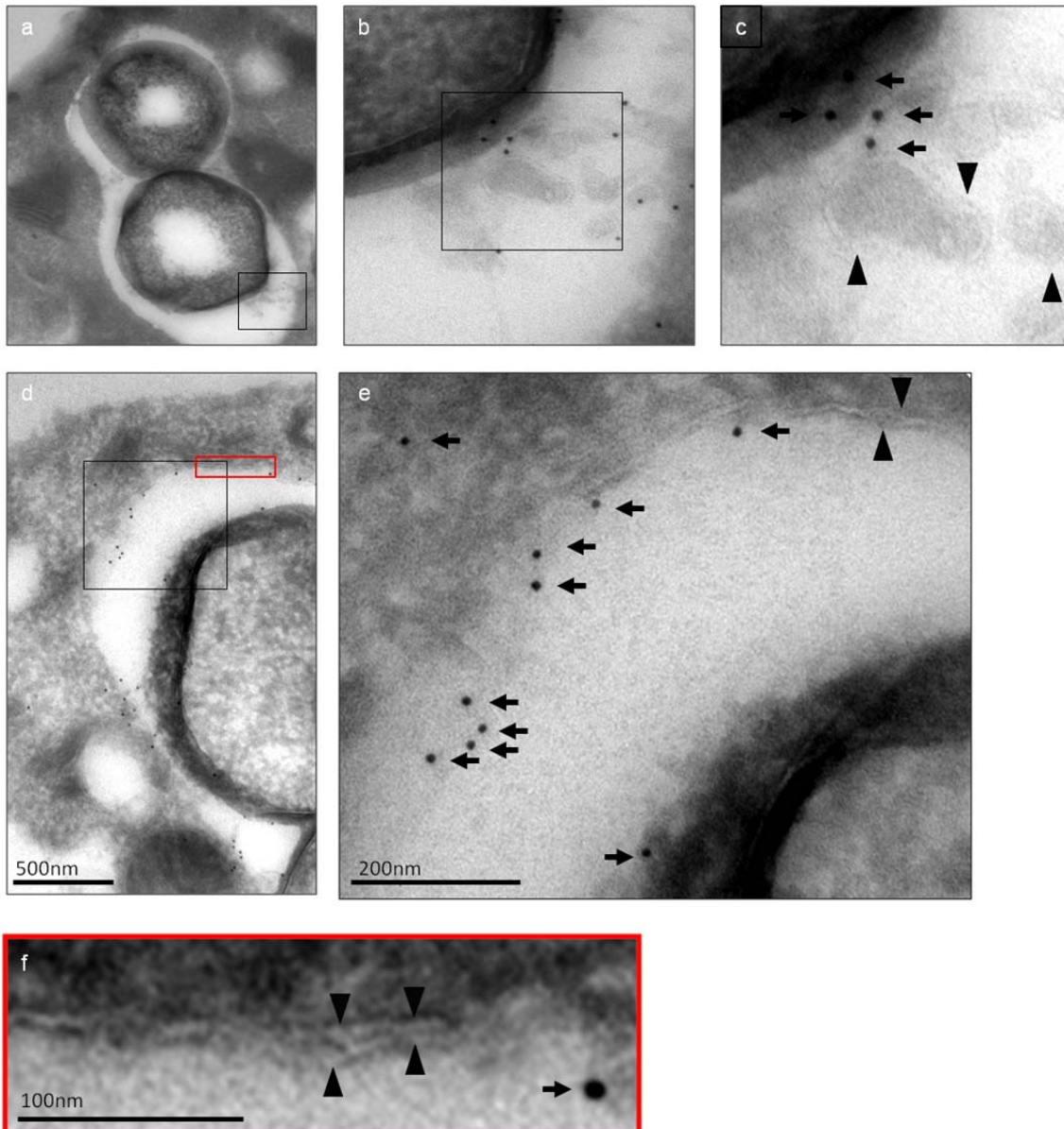


Abb. 3-19: Ultrastrukturelle Lokalisation von α -Toxin im Kontext mit intrazellulären *Staphylococcus aureus*. HaCaT wurden mit den α -Toxin-produzierenden *Staphylococcus aureus* hla(+) 30CFU/ml für 1h bei 37° inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und weitere 3h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und für die Kryomikrotomie vorbereitet. Es wurde ein Immunogoldnachweis an den Kryoschnitten mit F(ab')₂-Fragmenten aus Anti-Staphylococcal α -Toxin (2.2.4) und dem sekundären Antikörper goat anti-Rabbit IgG F(ab')₂ (H+L) (10nm gold conjugate) durchgeführt und anschließend am Elektronenmikroskop ausgewertet. **a-c**: In den Vergrößerungen **b** und **c** aus der Übersichtsaufnahme **a**

konnte α -Toxin (10nm Goldkugeln) in unmittelbarer Nähe zu den Bakterien der *Staphylococcus aureus*-Variante hla(+) detektiert werden. **d-e:** In der Vergrößerung **e** aus der Übersichtsaufnahme **d** konnte α -Toxin (Pfeile) sowohl direkt am Bakterium (*Staphylococcus aureus* hla(+)) als auch auf der Innenseite des Bakterien-Kompartiments detektiert werden. Die Pfeilspitzen in den Abbildungen **e** und **f** markieren die Doppelmembranstruktur des Bakterienkompartiments. Die roten

3.4 *Staphylococcus aureus* α -Toxin

3.4.1 Ultrastrukturelle Analyse von Zellen nach Inkubation mit *Staphylococcus aureus* α -Toxin

Bei den Infektionsversuchen mit *Staphylococcus aureus* wurde deutlich, dass eine Mehrheit der untersuchten Autophagiemarker, unabhängig von der Fähigkeit zur α -Toxin-Produktion, mit den Bakterien interagierten. Die Rekrutierung von EGFP-LC3 und DsRed-p62 erfolgte jedoch nur an *Staphylococcus aureus*-Varianten, die die Fähigkeit zur Produktion von Wildtyp- α -Toxin besaßen und in geringerem Ausmaß auch an die Bakterien, die die nicht-lytische α -Toxin-Variante D152c produzieren konnten. Daher sollte geprüft werden, ob bei einem extrazellulären Angriff durch isoliertes α -Toxin ähnliche zelluläre Reaktionen auftreten wie bei einem intrazellulären α -Toxin-Angriff durch *Staphylococcus aureus*.

Die subzelluläre Organisation verschiedener Zielzellen nach der Inkubation mit isoliertem α -Toxin wurde im Elektronenmikroskop analysiert. Dazu wurden HaCaT-, Huh7- oder ODORA-Zellen mit aufgereinigtem α -Toxin inkubiert. Abbildung 3-20 zeigt Zellen der verschiedenen Zelllinien in unbehandeltem Zustand (Abb.3-20 a-c) und nach der Inkubation mit α -Toxin (Abb.3-20 d-f). Die Zellen reagierten auf die Inkubation mit α -Toxin mit der vermehrten Bildung von Vesikeln und MVBs (multi vesicular bodies).

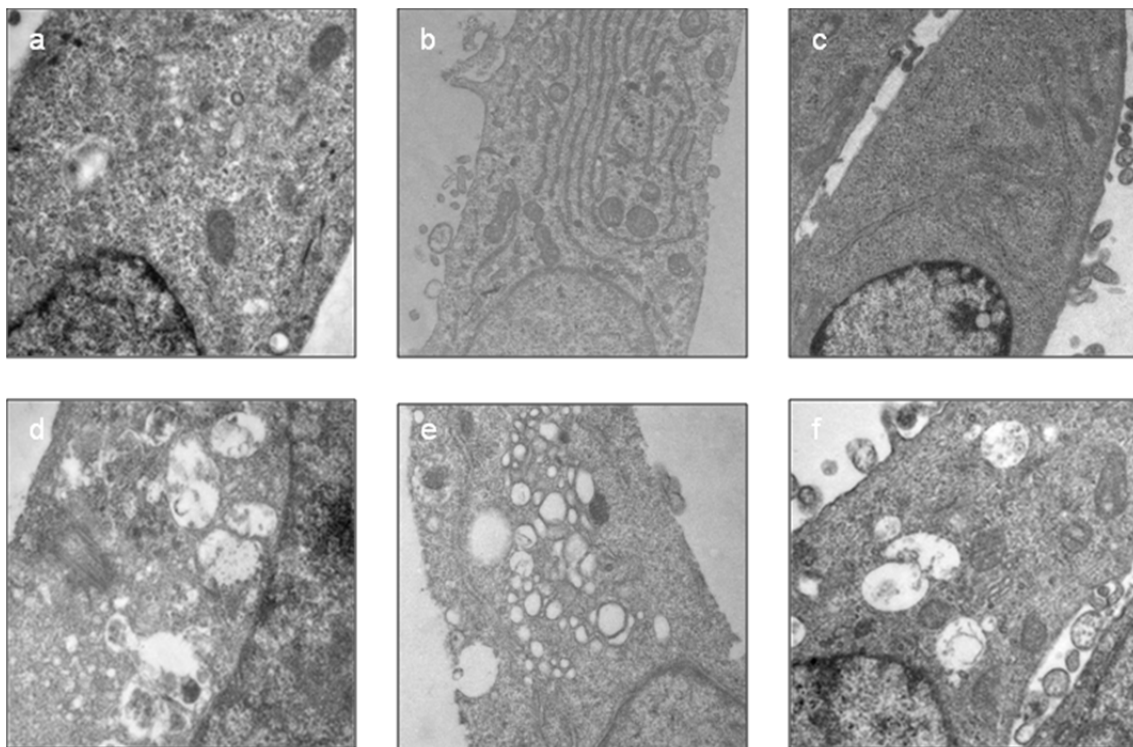


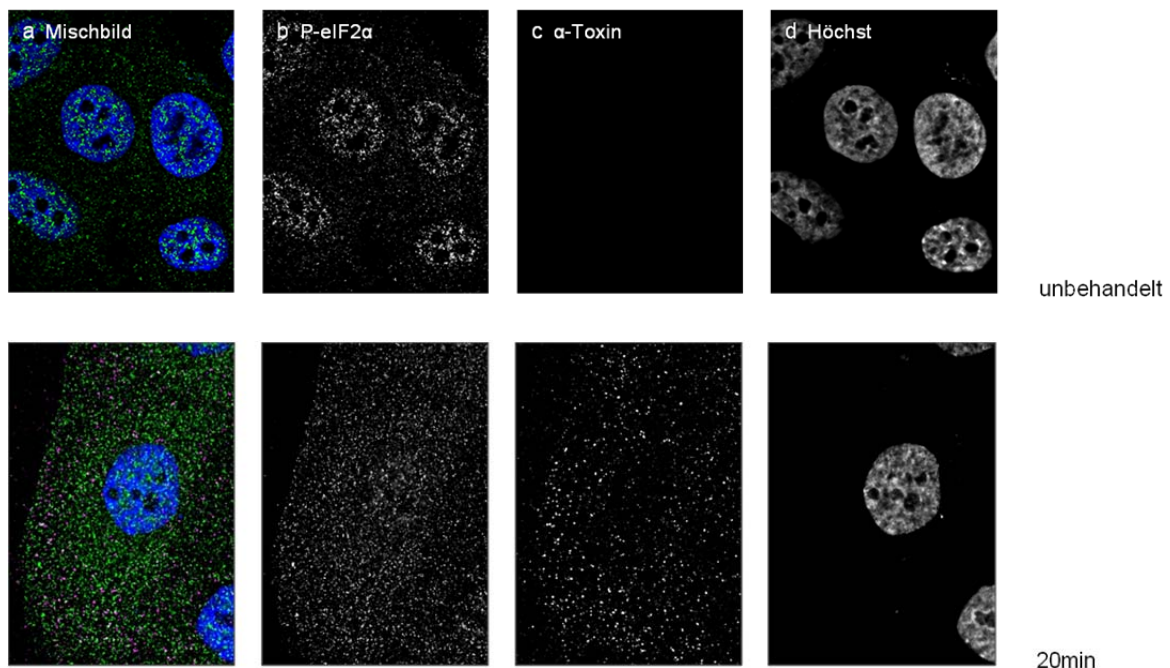
Abb. 3-20: Verstärkte Vesikulierung durch α -Toxin in HaCaT, Huh7 und ODORA. HaCaT, Huh7 oder ODORA Zellen wurden unbehandelt oder nach Inkubation mit $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -Toxin mit Glutaraldehyd fixiert und für die Elektronenmikroskopie weiterverarbeitet. **a-c:** Unbehandelte HaCaT (a), Huh7 (b) und ODORA (c) Zellen: Es waren keine Vesikel sichtbar. **d:** HaCaT wurden vor der Fixierung mit $1\mu\text{g}/\text{ml}$ α -

Toxin für 2h bei 37°C inkubiert: Mehrere Vesikel und MVBs waren sichtbar. **e:** Huh7 wurden vor der Fixierung mit 1µg/ml α -Toxin für 1,5h bei 37°C inkubiert: Eine verstärkte Vesikelbildung war sichtbar. **f:** ODORA wurden vor der Fixierung mit 1µg/ml α -Toxin für 2h bei 37°C inkubiert. Auch hier war eine leicht verstärkte Vesikelbildung sichtbar.

Die Vermutung, dass es sich bei den entstandenen Vesikeln um Autophagosomen handeln könnte liegt im Kontext mit den Ergebnissen aus den Infektionsversuchen mit *Staphylococcus aureus* nahe. Deshalb wurde eine mögliche Interaktion von Autophagiemarkern, wie z.B. P-eIF2 α , LC3 und p62 mit α -Toxin untersucht.

3.4.2 α -Toxin induziert die Phosphorylierung von eIF2 α

Die Phosphorylierung von eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2 α) ist eine wichtige Voraussetzung für die Autophagieinduktion in Antwort auf die mangelnde Verfügbarkeit von Aminosäuren. Abbildung 3-21 **a-d** zeigt die Verteilung von P-eIF2 α in einer unbehandelten HaCaT-Zelle. Das P-eIF2 α -Signal überlappt fast vollständig mit dem Signal der Höchst-gefärbten Zellkerne. Um eine potentielle Aktivierung von P-eIF2 α nach Inkubation mit *Staphylococcus aureus* α -Toxin zu untersuchen, wurde P-eIF2 α mit einem monoklonalen Antikörper nach 20, 40 oder 80min Inkubation mit Alexa-Fluor®546-markiertem α -Toxin nachgewiesen. Bereits eine 20-minütige Inkubation mit α -Toxin führte zu einer Translozierung des P-eIF2 α -Signals vom Zellkern in die Peripherie der Zelle (vgl. Abb.3-21 **a-d** und Abb.3-21 **e-h**), während das α -Toxin-Signal von der Zellmembran in das Zytoplasma der Zelle gelangt ist. Abbildung 3-21 **i-l** und die Vergrößerungen **q** und **r** aus Abbildung 3-21 **i** zeigen Kollokalisierungen von P-eIF2 α und Alexa-Fluor®546-markiertem α -Toxin nach einer Inkubationszeit von 40min. Nach einer Inkubationszeit von 80min kollokalisieren die Signale von P-eIF2 α und α -Toxin nur noch selten (Abb.3-22 **m-p**). Das Alexa-Fluor®546-markierte α -Toxin konzentrierte sich an juxt nukleärer Position, während P-eIF2 α vorwiegend in der Zellperipherie detektiert wurde.



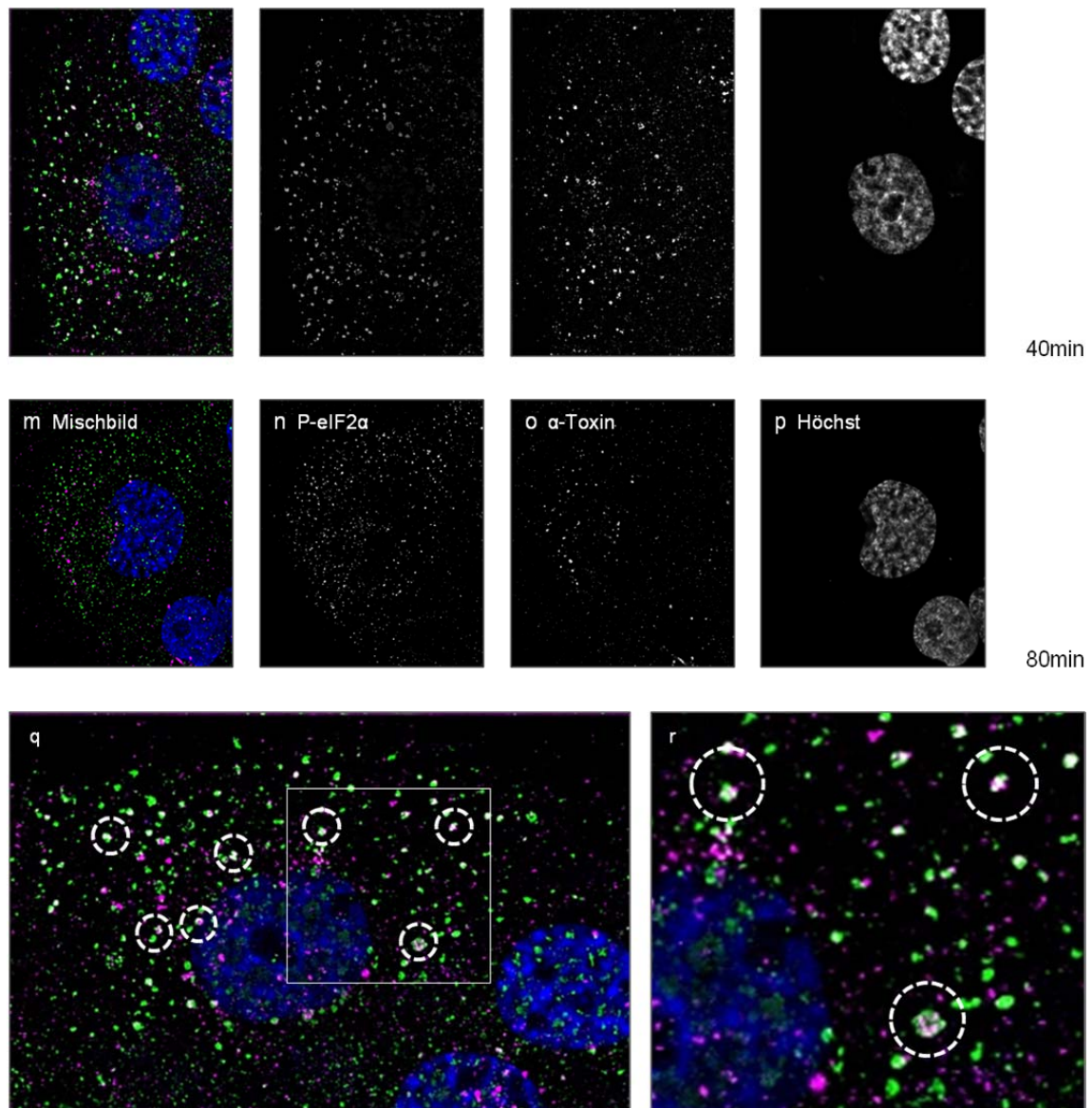


Abb. 3-21: Translokation des P-eIF2 α -Signals nach Inkubation mit α -Toxin in HaCaT. HaCaT wurden unbehandelt oder nach Inkubation mit 2 μ g/ml mit Alexa Fluor®546-markiertem α -Toxin fixiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenz mit dem primären monoklonalen Antikörper Anti-P-eIF2 α (Anti-EIF2S1 (phospho S51) und dem sekundären Antikörper Alexa Fluor®488 goat anti-rabbit IgG (H+L) durchgeführt. **a-d**: Unbehandelte HaCaT: Das P-eIF2 α -Signal ist hauptsächlich in der Kern-Region lokalisiert. **e-f**: Inkubation mit 2 μ g/ml mit Alexa Fluor®546-markiertem α -Toxin für 20min bei 37°C: Die Signale von P-eIF2 α und α -Toxin befinden sich im Zytoplasma. **g-h**: Inkubation mit 2 μ g/ml mit Alexa Fluor®546-markiertem α -Toxin für 40min bei 37°C: Die Signale von P-eIF2 α und α -Toxin akkumulieren im Zytoplasma und kolokalisieren partiell. **i-l**: Inkubation mit 2 μ g/ml mit Alexa Fluor®546-markiertem α -Toxin für 80min bei 37°C: Die α -Toxin-Signale akkumulieren weiter und wandern an juxtannukleäre Position, während das P-eIF2 α -Signal in der Peripherie verbleibt. Die Signale von α -Toxin und P-eIF2 α kolokalisieren nur noch selten. **m-p**: Vergrößerungen aus Abb.3-24 **i**: Kolokalisierende Akkumulationen der P-eIF2 α und α -Toxin-Signale sind weiß eingekreist.

Rab 5 gilt als Markerprotein für frühe Endosomen. In pEGFP-Rab5Q79L-transfizierten HaCaT-Zellen lassen sich große, aufgeblähte, EGFP-Rab5-positive, frühe Endosomen identifizieren (Abb.3-22 a und c). Das Fluoreszenzsignal von P-eIF2 α konnte in unbehandelten HaCaT-Zellen in der Kernregion detektiert werden (Abb.3-22 a und b), während es nach 40-minütiger

Inkubation mit Alexa-Fluor®546-markiertem α -Toxin in die Zellperipherie translozierte und mit dem α -Toxin kolokalisierte. In pEGFP-Rab5Q79L-transfizierten HaCaT Zellen kolokalisierte das Fluoreszenzsignal von P-eIF2 α nach einer Inkubationszeit von 40min mit α -Toxin in den EGFP-Rab5-positiven frühen Endosomen (Abb.3-22 f-j). Ohne Inkubation mit α -Toxin befanden sich die EGFP-Rab5-positiven Endosomen und P-eIF2 α räumlich getrennt in unterschiedlichen Zellarealen (vgl. Abb. 3-22 b und c).

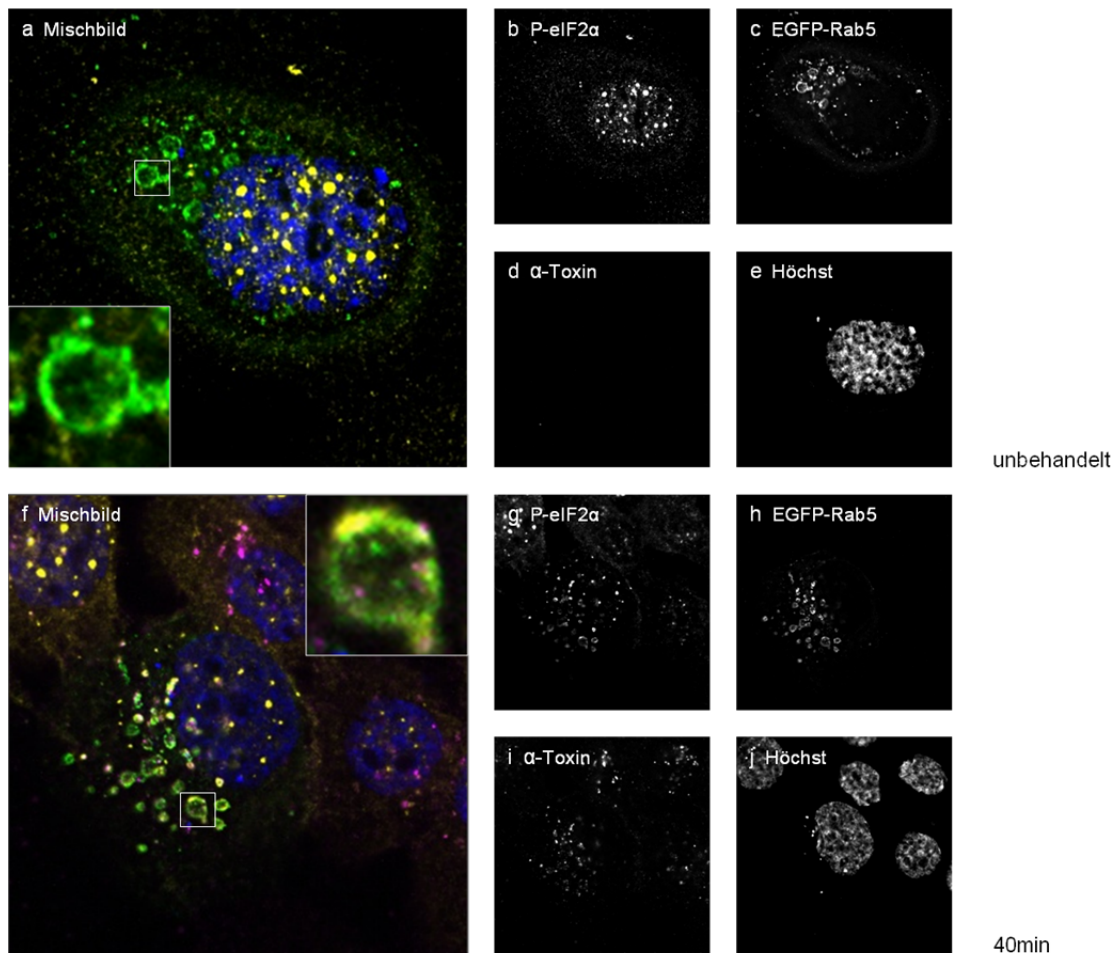


Abb. 3-22: Translozierung von P-eIF2 α nach Inkubation mit α -Toxin in EGFP-Rab5-Q79L-positive Endosomen. HaCaT wurden mit pEGFP-Rab5-Q79L transfiziert und am folgenden Tag 40min mit 2 μ g/ml Alexa Fluor®546-markiertem α -Toxin auf Eis beladen, mit kaltem Medium gewaschen und anschließend für weitere 40min bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden pEGFP-Rab5-Q70L-transfizierte HaCaT ebenfalls für 40min ohne α -Toxin auf Eis inkubiert und danach 40min bei 37°C inkubiert. Mit dem primären monoklonalen Antikörper Anti-P-eIF2 α (Anti-EIF2S1 (phospho S51) und dem sekundären Antikörper Alexa Fluor®488 goat anti-rabbit IgG (H+L) wurde nach der Fixierung eine Immunfluoreszenz durchgeführt. **a-e:** In den unbehandelten HaCaT war das P-eIF2 α -Signal hauptsächlich in der Kernregion lokalisiert, während die EGFP-Rab5-Q79L-positiven Endosomen im Zytoplasma verteilt lagen. **f-j:** Nach Inkubation mit 2 μ g/ml mit Alexa Fluor®546-markiertem α -Toxin für 40min bei 37°C befand sich das P-eIF2 α -Signal zusammen mit dem Signal von α -Toxin in Assoziation mit den EGFP-Rab5-Q79L-positiven Endosomen im Zytoplasma.

Um die Translozierung des P-eIF2 α -Signals in die Zellperipherie genauer zu untersuchen, wurden konfokale Mikrographien von HaCaT-Zellen nach Inkubation mit α -Toxin angefertigt und

analysiert. Die Zellkerne wurden durch eine Höchstfärbung markiert, während die Plasmamembran der Zellen durch den immunologischen Nachweis von Uvomorulin sichtbar gemacht wurde. P-eIF2 α wurde in α -Toxin-beladenen Zellen ohne Inkubation bei 37°C oder nach einer Inkubationszeit von 40min mit einem monoklonalen Antikörper nachgewiesen. Das Histogramm der Line-Scan-Messung durch den Querschnitt einer HaCaT-Zelle, die nicht bei 37°C inkubiert wurde zeigte, dass das Profil der Kernfärbung mit dem Intensitätsprofil des P-eIF2 α -Signals überlappt, während die Maxima des Uvomorulin-Signals abseits davon die Lokalisation der Plasmamembran markierten (Abb.3-23 **a-d**). Im Histogramm der Line-Scan-Messung durch den Querschnitt einer HaCaT-Zelle nach 40-minütiger Inkubation mit α -Toxin, lässt sich die Translokation des P-eIF2 α -Signals eindeutig ablesen (Abb.3-24 **a-d**). Im Gegensatz zu Abbildung 3-23 überlappt das Intensitätsprofil des P-eIF2 α -Signals nicht mehr mit dem Profil der Kernfärbung, sondern mit dem Signalprofil von Uvomorulin und damit mit der Plasmamembran (Abb.3-24 **a-d**).

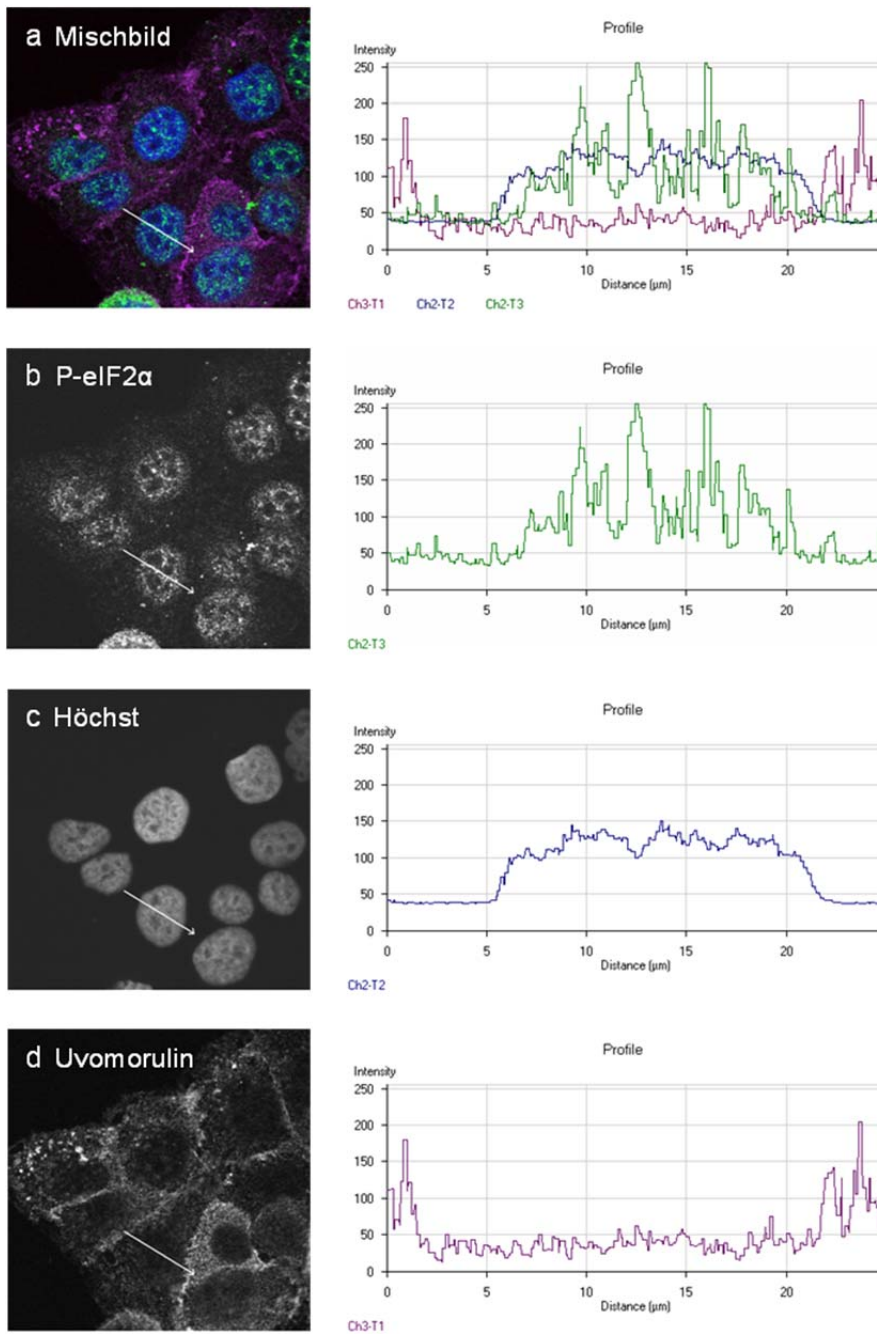


Abb. 3-23: Line Scan-Messungen des P-eIF2 α -Signals nach Beladung mit α -Toxin in HaCaT. HaCaT wurden mit 1 μ g/ml α -Toxin für 40min bei 4°C inkubiert, mit kaltem Medium gewaschen und anschließend fixiert. Danach wurde eine Immunfluoreszenz mit den primären monoklonalen Antikörpern Anti-P-eIF2 α (Anti-EIF2S1 (phospho S51)) und Anti-E-Cadherin (Uvomorulin) und den sekundären Antikörpern Alexa Fluor®488 goat anti-rabbit IgG (H+L) und Alexa Fluor®594 goat anti-mouse IgG (H+L) durchgeführt. **a-d:** Line Scan-Messung durch den Zellquerschnitt: Das P-eIF2 α -Signalintensitäts-Profil überlappt mit dem Profil der Kernfärbung, während die Maxima der Uvomorulin-Signalintensität am Zellrand liegen.

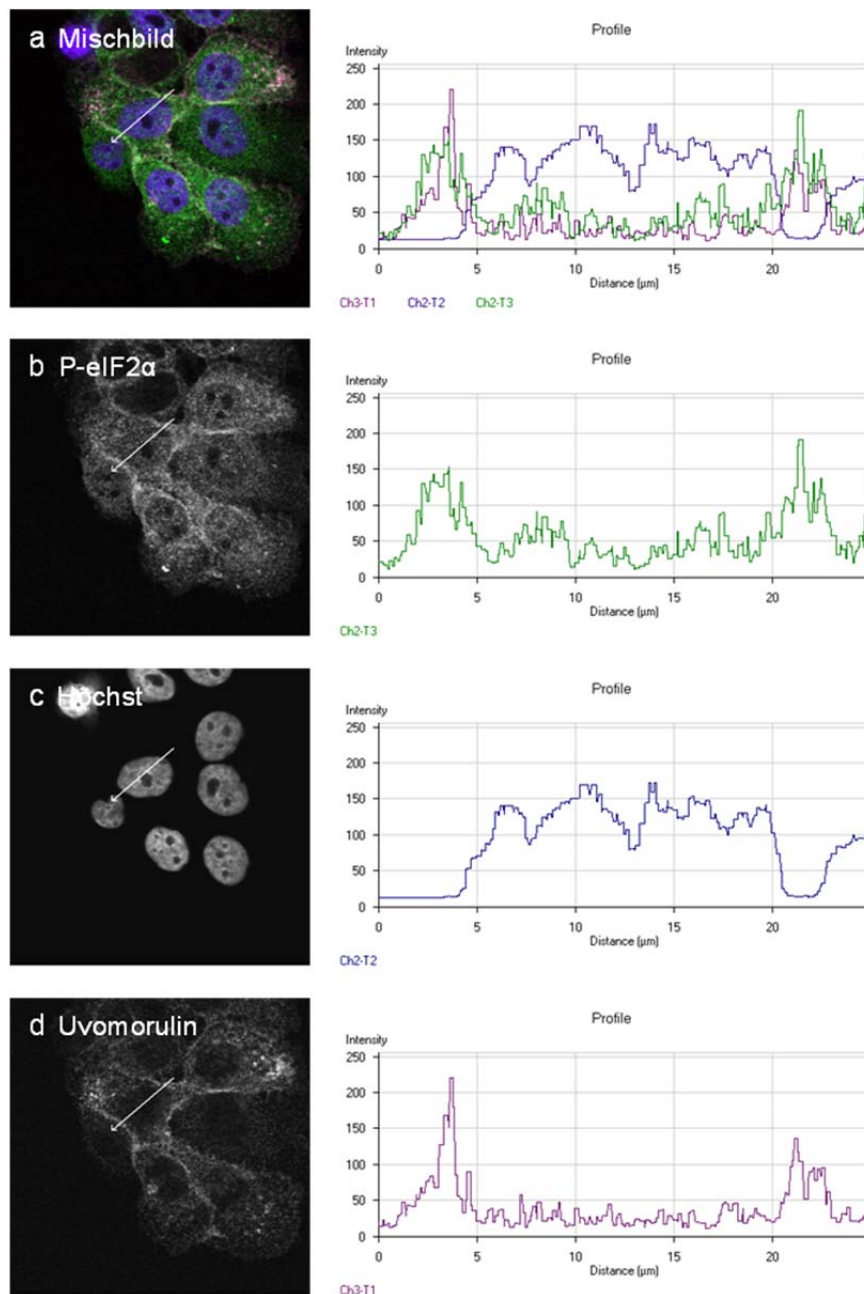


Abb. 3-24: Line Scan-Messungen des P-eIF2 α -Signals nach Beladung und Inkubation mit α -Toxin in HaCaT. HaCaT wurden mit 1 μ g/ml α -Toxin für 40min bei 4°C inkubiert, mit kaltem Medium gewaschen und anschließend 30min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und eine Immunfluoreszenz mit den primären Antikörpern Anti-P-eIF2 α (Anti-EIF2S1 (phospho S51) und Anti-E-Cadherin (Uvomorulin) und den sekundären Antikörpern Alexa Fluor®488 goat anti-rabbit IgG (H+L) und Alexa Fluor®594goat anti-mouse IgG (H+L) durchgeführt. **a-d**: Line Scan-Messung durch den Zellquerschnitt: Die Maxima der P-eIF2 α -Signalintensität überlappen mit den Maxima der Uvomorulin-Signalintensität am Zellrand.

Um die Translokierung von P-eIF2 α in die Peripherie als Reaktion auf die Inkubation mit α -Toxin in einer anderen Zelllinie zu bestätigen, wurde analog zu den HaCaT Zellen in der Abbildung 3-21, P-eIF2 α entweder in unbehandelten Huh7-Zellen (Abb.3-25 **a-d**) oder nach Inkubation mit Alexa Fluor®546-markiertem α -Toxin immunologisch nachgewiesen (Abb.3-25 **e-p**). Auch in den Huh7-Zellen kann die Aktivierung und Translokierung von P-eIF2 α nach einer

Inkubationszeit von 20, 40 oder 80min aus der Kernregion in die Zellperipherie detektiert werden. Das Alexa Fluor®546-markierte α -Toxin bleibt an der Zellmembran und gelangt nicht ins Zytoplasma der Zelle (Abb.3-25 e-p).

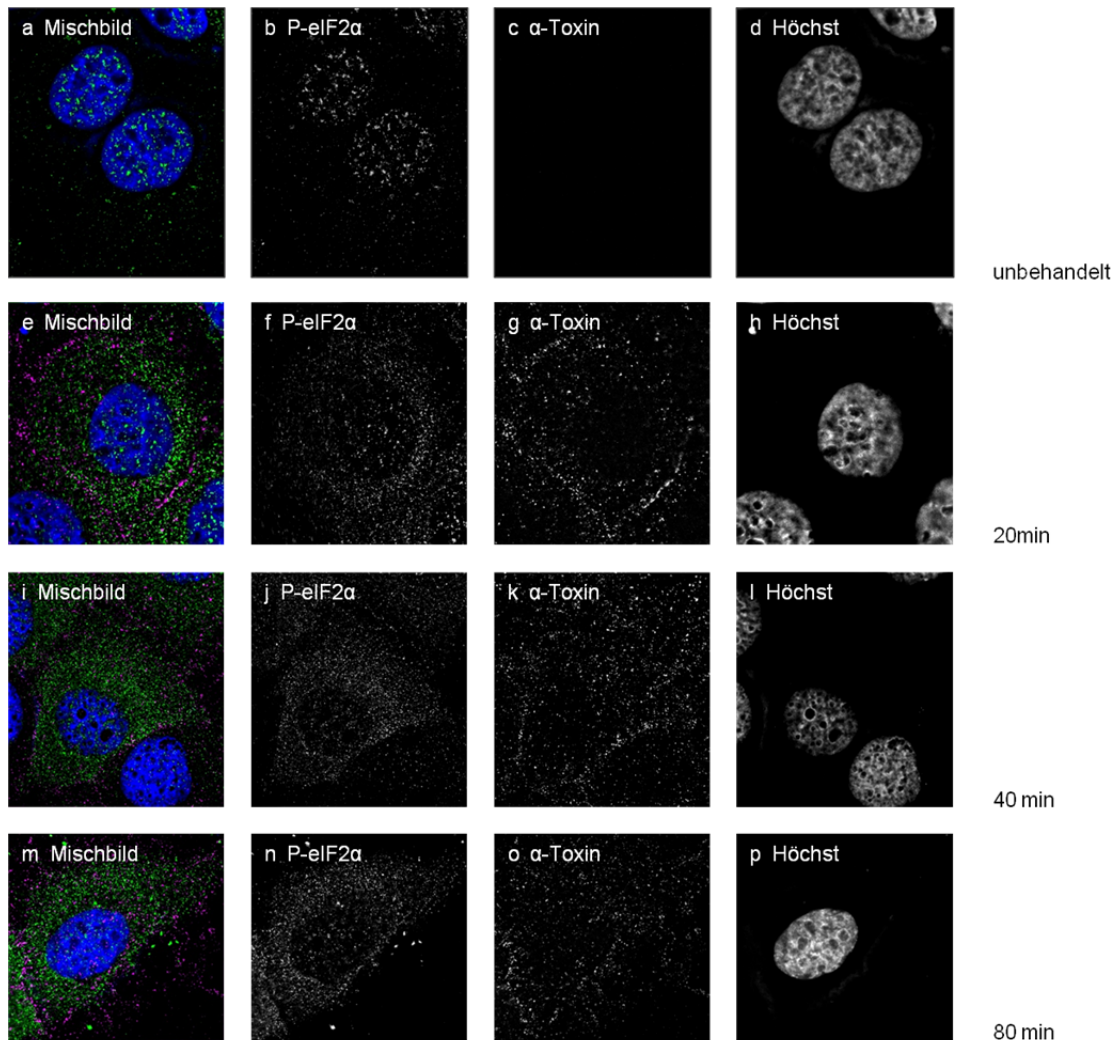
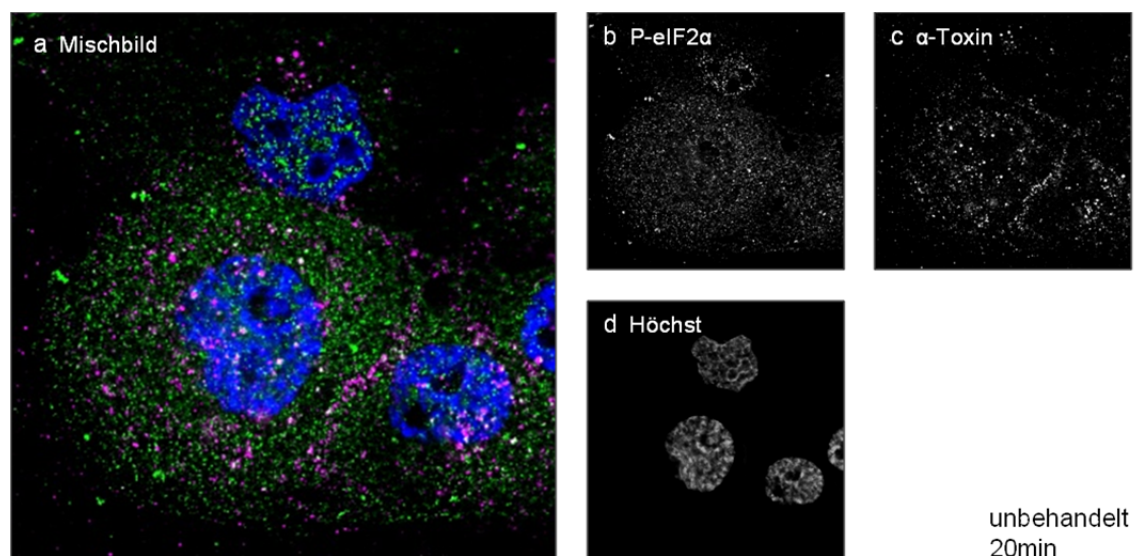


Abb. 3-25: Translozierung des P-eIF2 α -Signals nach Inkubation mit α -Toxin in Huh7. Huh7 wurden unbehandelt oder nach Inkubation mit 2 μ g/ml mit Alexa Fluor®546-markiertem α -Toxin fixiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenz mit dem primären monoklonalen Antikörper Anti P-eIF2 α (Anti-eIF2S1 (phospho S51)) und dem sekundären Antikörper Alexa Fluor®488 goat anti-rabbit IgG (H+L) durchgeführt. **a-d:** Unbehandelte Huh7: P-eIF2 α ist hauptsächlich im Kern lokalisiert. **e-f:** Inkubation mit 2 μ g/ml mit Alexa Fluor®546-markiertem α -Toxin für 20min bei 37°C: P-eIF2 α befindet sich im Zytoplasma, während α -Toxin an der Membranoberfläche verbleibt. **i-l:** Inkubation mit 2 μ g/ml mit Alexa Fluor®546-markiertem α -Toxin für 40min bei 37°C: P-eIF2 α befindet sich weiterhin im Zytoplasma, während α -Toxin an der Membranoberfläche lokalisiert bleibt. **m-p:** Inkubation mit 2 μ g/ml mit Alexa Fluor®546-markiertem α -Toxin für 80min bei 37°C. α -Toxin verbleibt auch nach 80min auf der Membran, während P-eIF2 α im Zytoplasma lokalisiert ist.

Leptomycin B inhibiert spezifisch den nukleären Export durch die Hemmung von CRM1 (chromosomal maintenance/exportin 1), ein Protein, welches für den nukleären Export von Proteinen, die eine NES (nuclear export sequence) enthalten, notwendig ist. Um zu überprüfen, ob

die Translokation des P-eIF2 α -Signals von der Kernregion an die Plasmamembran der Zelle von diesem Mechanismus abhängt, wurden HaCaT-Zellen mit 0,1 ng/ml Leptomycin B behandelt, bevor sie 20 oder 40min mit Alexa-Fluor®546-markiertem α -Toxin inkubiert wurden. Anschließend wurde P-eIF2 α mit einem monoklonalen Antikörper nachgewiesen. Die Vorbehandlung mit Leptomycin B hatte keinen Einfluss auf die Translokation des P-eIF2 α -Signals. Sowohl nach einer Inkubationszeit von 20min (Abb.3-26 e-h), als auch nach 40min (Abb.3-27 e-h) fand die α -Toxin-induzierte Translokation des P-eIF2 α -Signals ohne detektierbaren Einfluss von Leptomycin B statt (vgl. Abb.3-26 a-d und 3-27 a-d). Ob sich der Transport von P-eIF2 α an die Zellmembran ähnlich wie bei Mikrotubuli assoziierten Proteinen entlang der Mikrotubuli ereignet, wurde mit Hilfe des Inhibitors Nocodazol überprüft. Nocodazol stört die Polymerisation der Mikrotubuli, führt sogar zur Depolymerisation der Mikrotubuli und arretiert die Zellen im Zellzyklus, indem es den Aufbau des Spindelapparates verhindert. HaCaT-Zellen wurden mit Nocodazol behandelt, bevor sie 20 oder 40min mit Alexa-Fluor®546-markiertem α -Toxin inkubiert wurden. Anschließend wurde P-eIF2 α immunologisch nachgewiesen. Auch die Inhibierung der Mikrotubuli-Polymerisation hatte keinen Einfluss auf die α -Toxin-induzierte Translokation von P-eIF2 α aus dem Kern an die Zellmembran. Sowohl nach einer Inkubationszeit von 20min (Abb.3-26 i-l), als auch nach 40min (Abb.3-27 i-l) fand der Transport von P-eIF2 α ohne erkennbaren Einfluss von Nocodazol statt (vgl. Abb.3-26 a-d und 3-27 a-d). Der Inhibitor Cytochalasin B verhindert den dynamischen Aufbau der Aktinfilamente, entlang derer Vesikel durch das Motorprotein Myosin über kurze Strecken transportiert werden können. Um zu überprüfen ob der α -Toxin-induzierte Transport von P-eIF2 α entlang der Aktinfilamente stattfindet, wurden HaCaT-Zellen mit 25ng/ml Cytochalasin B inkubiert, bevor die Zellen für 20 oder 40min mit Alexa-Fluor®546-markiertem α -Toxin inkubiert wurden. Anschließend wurde P-eIF2 α immunologisch nachgewiesen. Auch die Inhibierung der Polymerisation der Aktinfilamente hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Translokation des P-eIF2 α -Signals. Sowohl nach einer Inkubationszeit von 20min (Abb.3-26 m-p) als auch nach 40min (Abb.3-27 m-p) fand der Transport von P-eIF2 α aus dem Kern unbeeinflusst von der durch Cytochalasin B inhibierten Polymerisation der Aktinfilamente statt (vgl. Abb.3-26 a-d und 3-27 a-d).



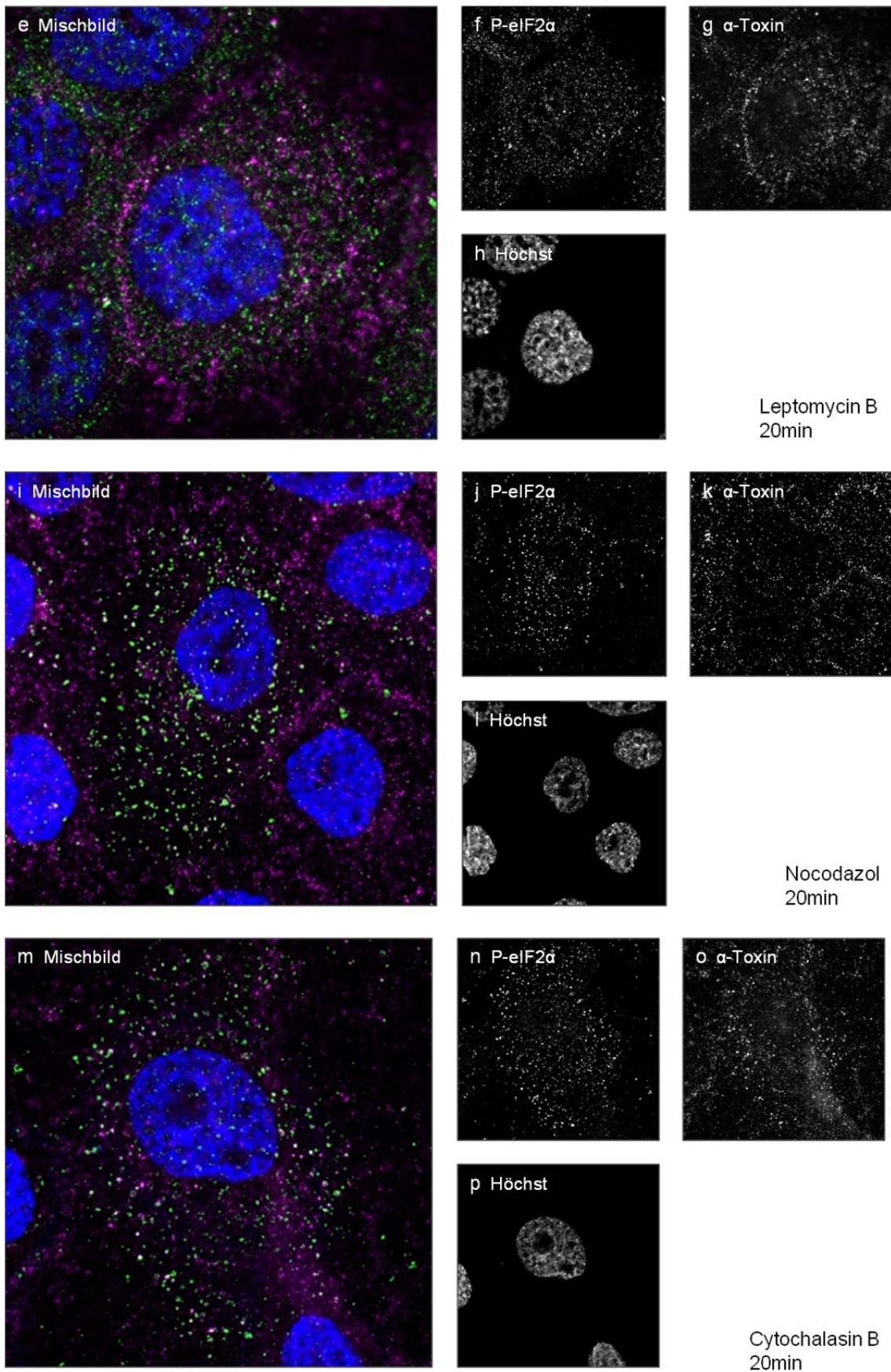
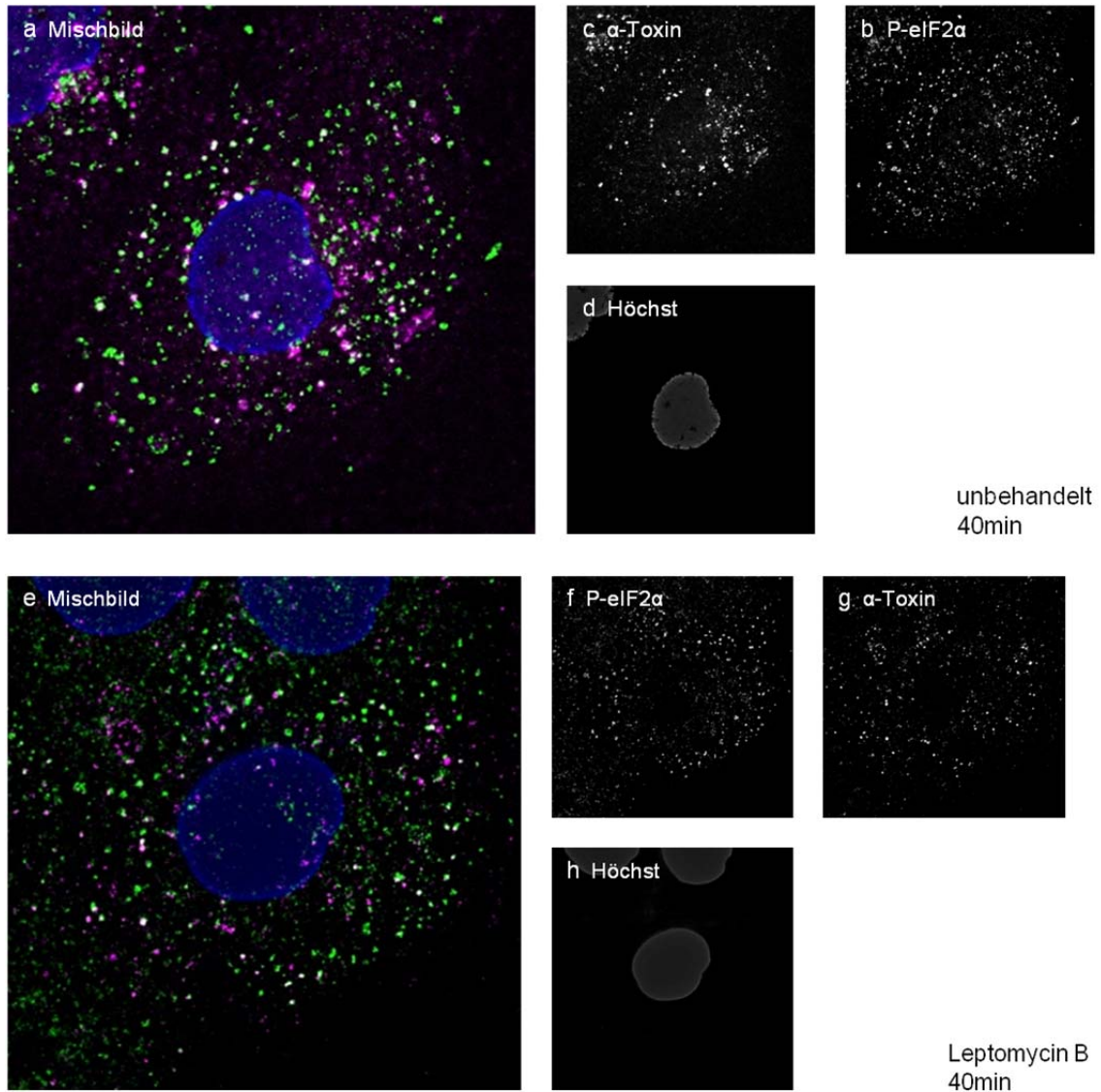


Abb. 3-26: Verschiebung des P-eIF2 α -Signals ist nicht durch Nocodazol, Leptomycin B und Cytochalasin B beeinflussbar. HaCaT Zellen wurden 20min mit 2 μ g/ml Alexa Fluor®546-markiertem α -

Toxin bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenz mit dem primären, monoklonalen Antikörper Anti-P-eIF2 α (Anti-EIF2S1 (phospho S51)) und dem sekundären Antikörper Alexa Fluor®488 goat anti-rabbit IgG (H+L) durchgeführt. **a-d**: Die Signale von α -Toxin und P-eIF2 α befanden sich im Zytoplasma. **e-h**: Vor der Inkubation mit α -Toxin wurden die Zellen 1h zusammen mit 0,1ng/ml Leptomycin B inkubiert: Die Signale von α -Toxin und P-eIF2 α befanden sich unverändert im Zytoplasma. **i-l**: Vor der Inkubation mit α -Toxin wurden die Zellen 1h zusammen mit 10 μ g/ml Nocodazol inkubiert: Die Signale von α -Toxin und P-eIF2 α befanden sich unverändert im Zytoplasma. **m-p**: Vor der Inkubation mit α -Toxin wurden die Zellen 1h zusammen mit 10 μ g/ml Cytochalasin B inkubiert: Die Signale von α -Toxin und P-eIF2 α befanden sich unverändert im Zytoplasma.



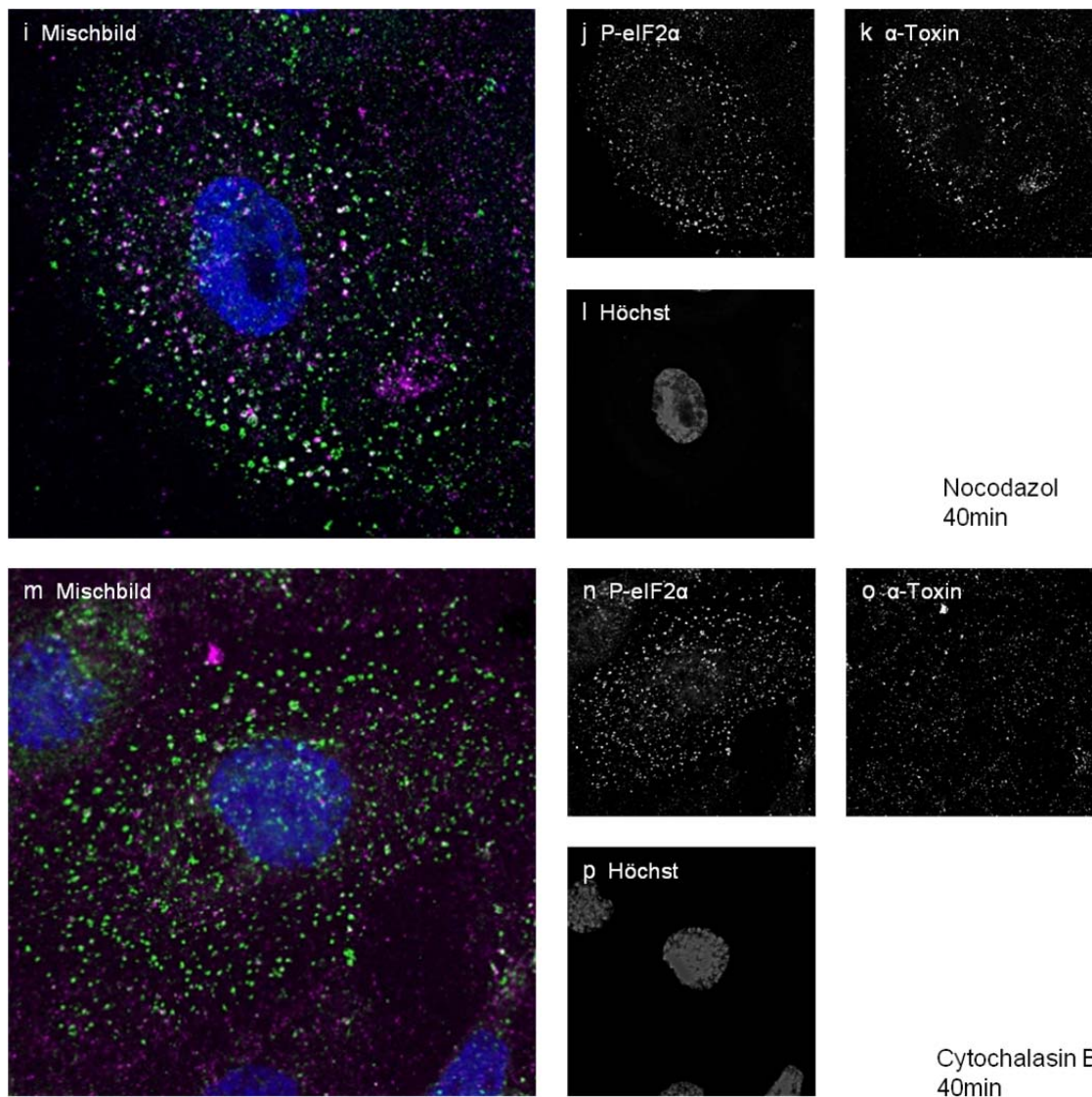


Abb. 3-27: Verschiebung des P-eIF2 α -Signals ist nicht durch Nocodazol, Leptomycin B und Cytochalasin B beeinflussbar. HaCaT Zellen wurden 40min mit 2 μ g/ml Alexa Fluor®546-markiertem α -Toxin bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenz mit dem primären monoklonalen Antikörper Anti-P-eIF2 α (Anti-EIF2S1 (phospho S51)) und dem sekundären Antikörper Alexa Fluor®488 goat anti-rabbit IgG (H+L) durchgeführt. **a-d:** Die Signale von α -Toxin und P-eIF2 α befinden sich im Zytoplasma und kolokalisieren partiell. **e-h:** Vor der Inkubation mit α -Toxin wurden die Zellen 1h zusammen mit 0,1ng/ml Leptomycin B inkubiert: Die Signale von α -Toxin und P-eIF2 α befanden sich unverändert im Zytoplasma und kolokalisieren partiell. **i-l:** Vor der Inkubation mit α -Toxin wurden die Zellen 1h zusammen mit 10 μ g/ml Nocodazol inkubiert: Die Signale von α -Toxin und P-eIF2 α befanden sich unverändert im Zytoplasma und kolokalisieren partiell. **m-p:** Vor der Inkubation mit α -Toxin wurden die Zellen 1h zusammen mit 10 μ g/ μ l Cytochalasin B inkubiert: Die Signale von α -Toxin und P-eIF2 α befanden sich unverändert im Zytoplasma und kolokalisierten partiell.

Die Aktivierung von P-eIF2 α äußert sich nicht nur in der Translokierung des P-eIF2 α -Signals, sondern auch in der Zunahme der Signalintensität. P-eIF2 α wurde entweder in unbehandelten HaCaT-Zellen oder nach einer Inkubationszeit von 30min mit α -Toxin immunologisch nachgewiesen. Anschließend wurden je 10 konfokale Bilder am Laser-Scan-Mikroskop von behandelten und unbehandelten Zellen angefertigt. Nach Möglichkeit wurden für je 1-3 Zellen pro Aufnahme Intensitätsmessungen des P-eIF2 α -Signals erstellt. Die Intensität des p-eIF2 α -Signals

nimmt nach einer 30-minütigen Inkubationszeit mit α -Toxin signifikant ($p = 0,0014$) zu (Abb.3-28).

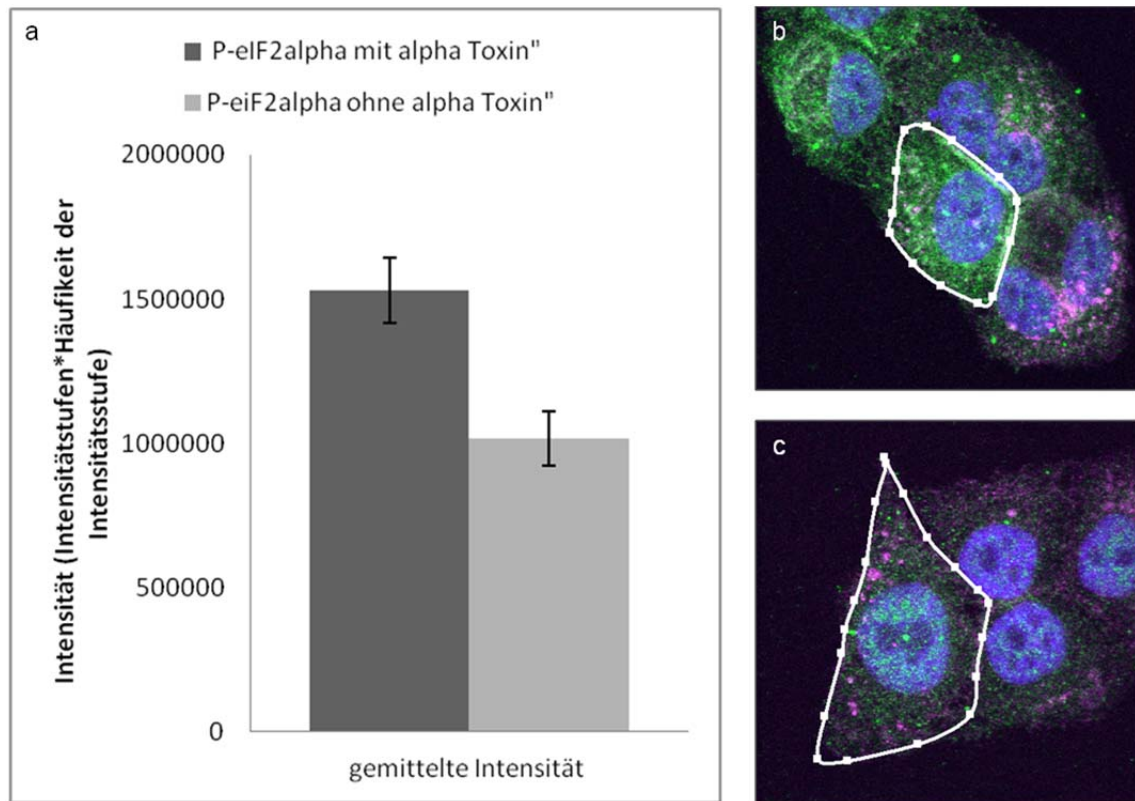
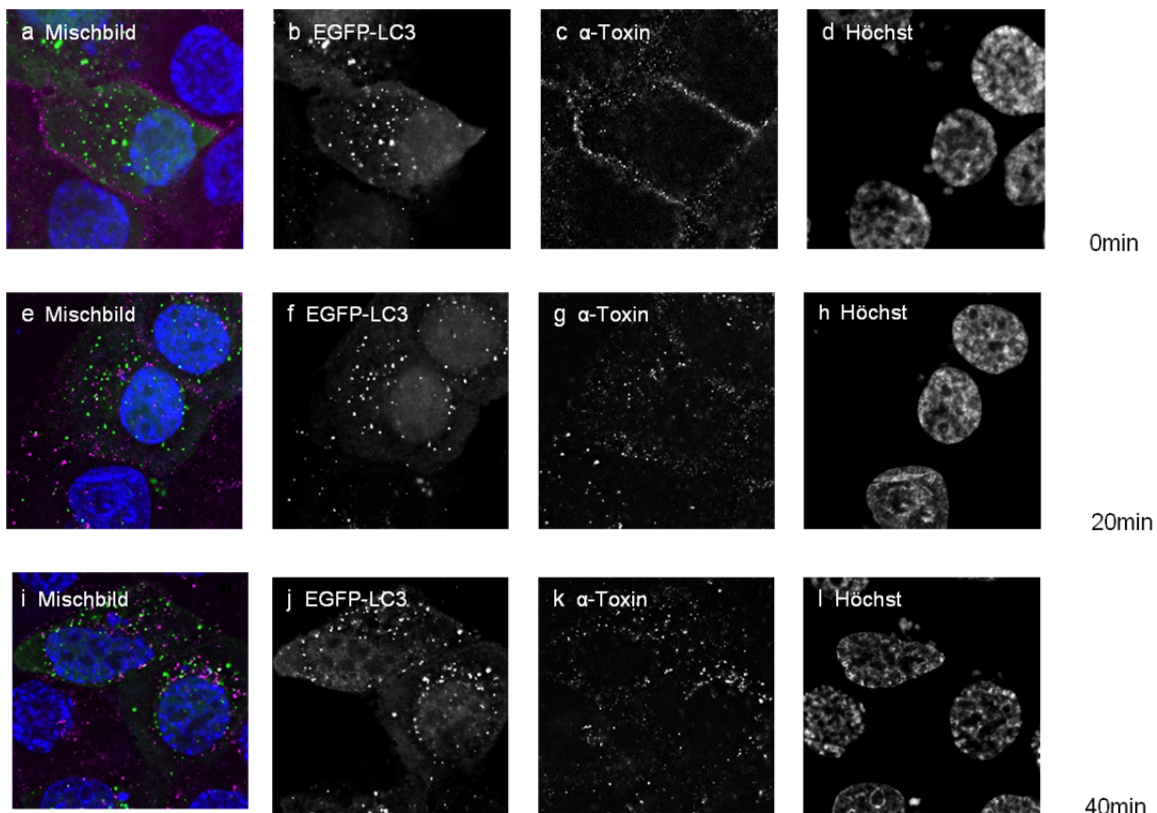


Abb. 3-28: Signifikante Intensitätszunahme des P-eIF2 α -Signals in konfokalen Mikrografien durch α -Toxin. HaCaT wurden mit 1 μ g/ml α -Toxin für 40min auf Eis beladen, mit kaltem Medium gewaschen und anschließend für weitere 30min bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden HaCaT ebenfalls für 40min ohne α -Toxin auf Eis inkubiert und danach 30min bei 37°C inkubiert. Mit dem primären monoklonalen Antikörper Anti-P-eIF2 α (Anti-EIF2S1 (phospho S51)) und dem sekundären Antikörper Alexa Fluor®488 goat anti-rabbit IgG (H+L) wurde nach der Fixierung eine Immunfluoreszenz durchgeführt. **a:** Aus 10 konfokalen Aufnahmen wurde jeweils für 1-3 Zellen ein Intensitätshistogramm für das P-eIF2 α -Signal erstellt. Die Intensität (Intensitätsstufe * Häufigkeit der Intensitätsstufen) ist nach einer Inkubationszeit von 30min mit α -Toxin im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht ($p = 0,0014$). Für die Prüfung der statistischen Signifikanz der Unterschiede zwischen den Mittelwerten wurde ein ungepaarter, zweiseitiger studentischer TTest durchgeführt; Signifikanz wurde bei $p \leq 0,05$ angenommen. **b:** für eine Intensitätsmessung umrandete HaCaT-Zelle nach Inkubation mit α -Toxin. **c:** für eine Intensitätsmessung umrandete, unbehandelte HaCaT-Zelle.

3.4.3 α -Toxin induziert LC3-positive Vesikel

MAP1-LC3 (Microtubule-associated protein 1/light chain 3) ist für die klassische Autophagosomenbiogenese notwendig und wurde in der Vergangenheit als wichtiger Indikator für Autophagie benutzt. In seiner lipidierten Form LC3-II dekoriert das Protein die Innen- und Außenseite von klassischen Autophagosomen. Eine mögliche Interaktion zwischen LC3 und α -Toxin wurde überprüft, indem HaCaT-Zellen mit dem Plasmid pEGFP-LC3 transfiziert wurden und am Folgetag mit Alexa-Fluor®546-markiertem α -Toxin inkubiert wurden. Während sich das Alexa-Fluor®546-markierte α -Toxin direkt nach der Beladung noch an der Zellmembran befand (Abb.3-29 **a-d**), gelangte es schon nach einer Inkubationszeit von 20min bei 37°C in das Zytoplasma der Zelle (Abb.3-29 **e-h**). Kleine EGFP-LC3-positive Vesikel waren direkt nach der Beladung zu erkennen. Nach einer Inkubationszeit von 40min kolokalisierte das Alexa-Fluor®546-markierte α -Toxin bereits partiell mit EGFP-LC3-positiven Vesikeln (Abb.3-29 **i-l**). Auch nach 80 und 120min waren partielle Kolokalisationen von Alexa-Fluor®546-markiertem α -Toxin und EGFP-LC3 zu erkennen (Abb.3-29 **m-p** und Abb.3-29 **q-v**). Das Signal des Alexa-Fluor®546-markierten α -Toxins bewegte sich mit zunehmender Inkubationszeit von der Zellmembran in das Zytoplasma und konzentrierte sich schließlich nach 120min als Cluster an juxtannukleärer Position.



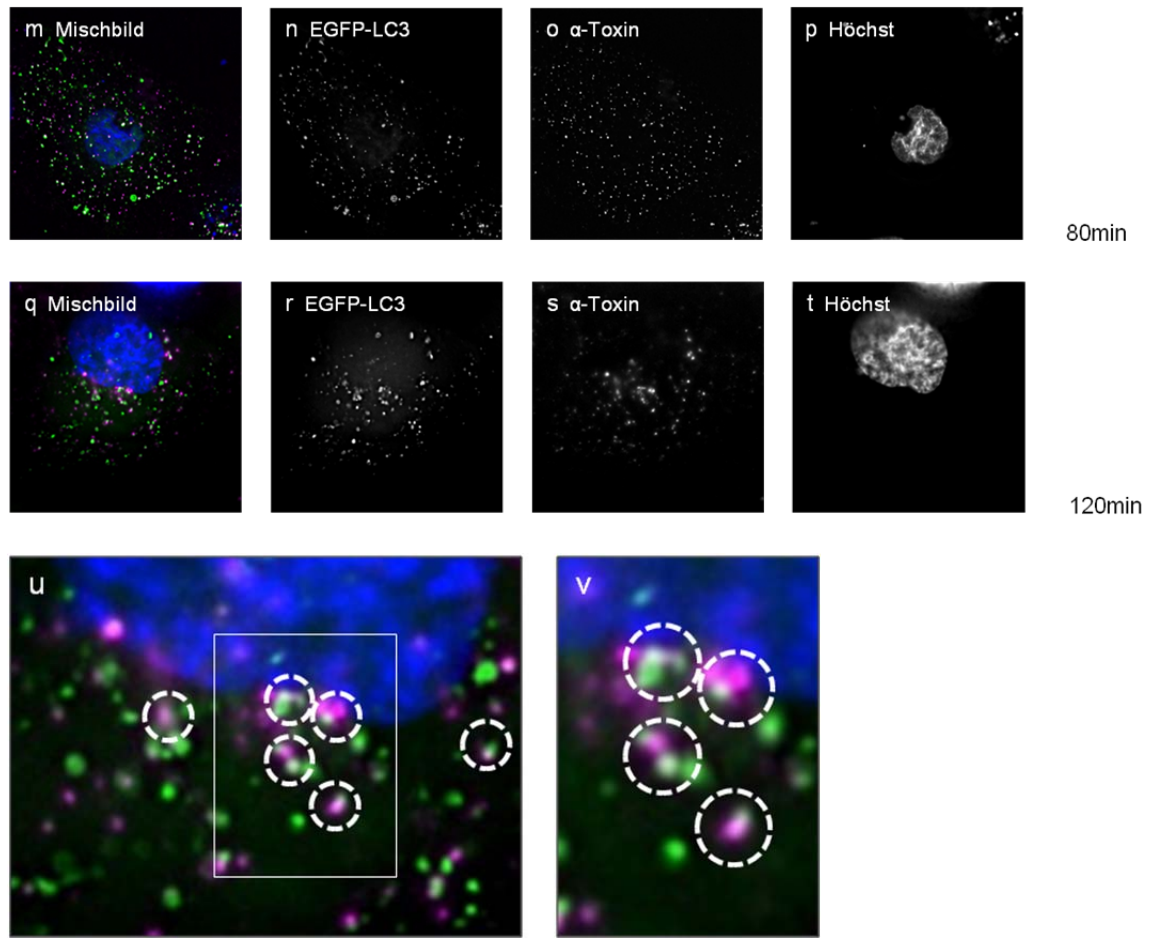


Abb. 3-29: Kolokalisierungen von α -Toxin und EGFP-LC3. HaCaT-Zellen wurden mit pEGFP-LC3 transfiziert und am Folgetag 40min mit $2\mu\text{g/ml}$ Alexa Fluor®546-markiertem α -Toxin bei 4°C beladen und anschließend mit kaltem PBS gewaschen und sofort fixiert oder mit kaltem Medium gewaschen und weitere 20min, 40min, 80min oder 120min bei 37°C inkubiert. **a-d:** Die Zellen wurden sofort nach der Beladung fixiert. Das Alexa Fluor®546-markierte α -Toxin befindet sich an der Zellmembran. Kleine EGFP-LC3-positive Vesikel sind im Zytoplasma verteilt. **e-h:** Nach einer Inkubationszeit von 20min bei 37°C lagen α -Toxin und kleine EGFP-LC3-positive Vesikel im Zytoplasma verteilt. **i-l:** Nach einer Inkubationszeit von 40min bei 37°C kolokalisierte α -Toxin bereits partiell mit EGFP-LC3. **m-p:** Nach einer Inkubationszeit von 80min bei 37°C waren größere EGFP-LC3-positive Vesikel sichtbar und α -Toxin kolokalisierte mit EGFP-LC3. **q-v:** Nach einer Inkubationszeit von 120min bei 37°C befanden sich α -Toxin Akkumulationen in der Nähe des Zellkerns. EGFP-LC3 kolokalisierte partiell mit α -Toxin. **u** und **v** sind Vergrößerungen aus **q**. Kolokalisierungen von EGFP-LC3 und Alexa Fluor®546-markiertem α -Toxin sind weiß eingekreist.

3.4.4 α -Toxin induziert die Rekrutierung von p62/SQSTM1

Das Adapterprotein p62/SQSTM1 (sequestosome-1) ist ein Marker für selektive Autophagie. p62 kann direkt mit LC3 interagieren und ist sowohl an der Signalübermittlung innerhalb der Zelle als auch an der Rezeptorinternalisierung sowie dem Gesamtumsatz von Proteinen beteiligt. Auch bei der zellautonomen Abwehr gegen invasive Bakterien nimmt p62 eine wichtige Rolle als Autophagierezeptor ein. HaCaT-Zellen wurden mit Alexa-Fluor®546-markiertem α -Toxin inkubiert und p62 immunologisch nachgewiesen. Das α -Toxin konzentrierte sich nach einer Inkubationszeit von 120min und kolokalisierte teilweise mit großen Akkumulationen von p62 (Abb.3-30 e-j). p62 kann Proteine, die nicht durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut werden können, binden und durch Homooligomersierung einschlossartige Proteinaggregate bilden, die dann durch Autophagie abgebaut werden können. Möglicherweise handelte es sich bei den beobachteten großen p62-Akkumulationen um solche Proteinaggregate, die Aggresomen genannt werden. Direkt nach der Beladung mit Alexa-Fluor®546-markiertem α -Toxin der HaCaT-Zellen befand sich das Toxin auf der Zellmembran, während p62 leicht granulär im Zytoplasma verteilt lag (Abb.3-30 a-d).

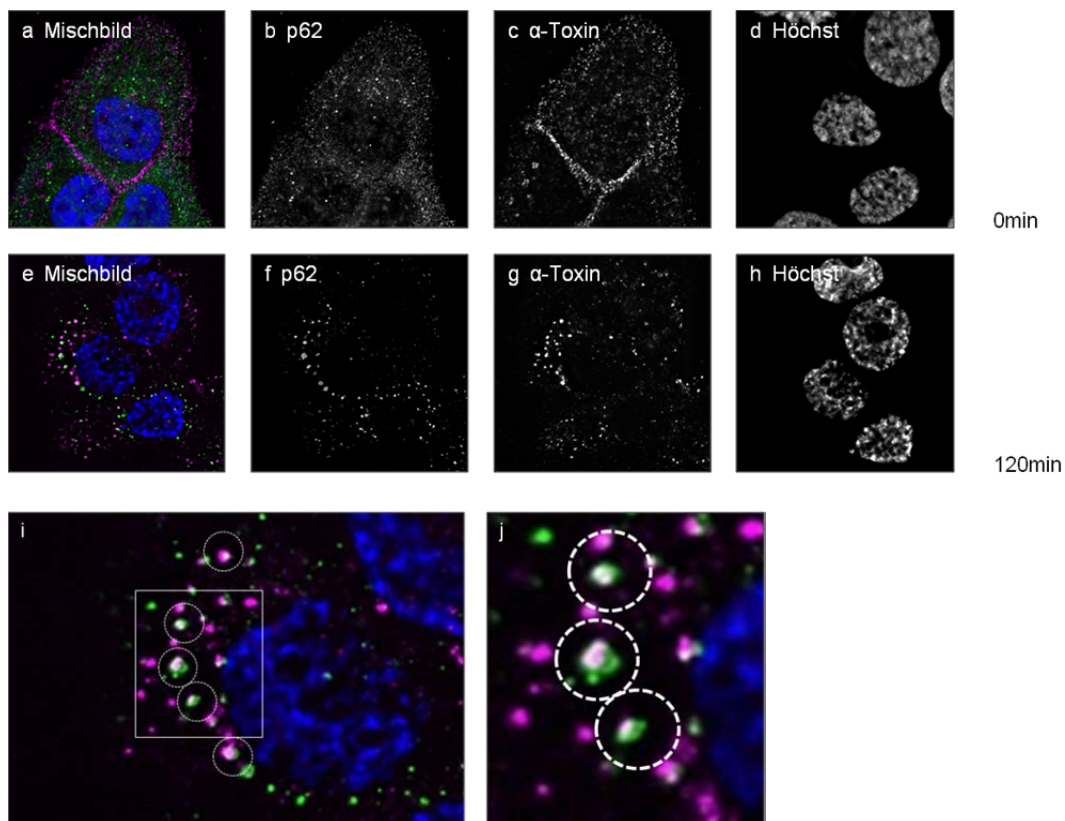


Abb. 3-30: Kolokalisation von α -Toxin und p62. HaCaT Zellen wurden entweder 40min mit 2 μ g/ml Alexa Fluor®546-markiertem α -Toxin bei 4°C beladen und anschließend mit kaltem PBS gewaschen und sofort fixiert oder mit kaltem Medium gewaschen und weitere 2h bei 37°C inkubiert und anschließend fixiert. p62 wurde mit dem primären Antikörper Anti-SQSTM1/p62 und dem sekundären Antikörper Alexa Fluor®488 goat anti-rabbit IgG (H+L) nachgewiesen. **a-d:** Die Zellen wurden sofort nach der Beladung fixiert. Das Alexa Fluor®546-markierte α -Toxin befand sich an der Zellmembran. p62 lag leicht granulär im Zytoplasma verteilt. **e-j:** Die Zellen wurden nach der Beladung 2h bei 37°C inkubiert. Das Alexa Fluor®546-markierte α -Toxin befand sich in kleinen Akkumulaten in der Nähe des Zellkerns und

kolokalisierte partiell mit p62. **i** und **j** sind Vergrößerungen aus **e**. Kolokalisierende Akkumulationen von α -Toxin und p62 wurden weiß eingekreist.

3.4.5 Ubiquitinierung von α -Toxin oder α -Toxin-assoziierten Proteinen als Signal für p62

p62 enthält eine UBA (ubiquitin associated domain)-Domäne über die K48- und K63-verbundene Ubiquitinketten gebunden werden können (Long et al, 2008; Tan et al, 2008; Wooten et al, 2008). Für die Rekrutierung des Autophagierezeptors p62 über seine UBA-Domäne ist die Ubiquitinierung der Abbausubstrate eine notwendige Voraussetzung. Um zu prüfen, ob α -Toxin oder ein α -Toxin-assoziiertes Protein ubiquitiniert wird, wurde eine Immunopräzipitation durchgeführt. Bei der Immunopräzipitation mit einem Antikörper gegen Multiubiquitin konnte [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin (co)präzipitiert und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht werden (Abb.3-31). Dazu wurden HaCaT-Zellen mit [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin für 30, 60, 120 oder 240min bei 37°C inkubiert. Danach wurde eine Immunopräzipitation mit den Zelllysaten mit Antikörpern gegen α -Toxin (Anti-Staphylococcal α -Toxin) (Positiv-Kontrolle), bovine IgG (Anti-IgG light chain) (Negativ-Kontrolle) und gegen Multiubiquitin (Anti-Ubiquitin (multi ubiquitin chains)) durchgeführt. Anschließend wurden die Präzipitate in einer SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.10) und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht (2.2.12 Autoradiographie). Mit einem Antikörper gegen Multiubiquitin konnten in Korrelation mit der Inkubationsdauer zunehmend mehr [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin Monomere und Oligomere (co)präzipitiert werden. Dieses Ergebnis suggeriert eine direkte oder indirekte Assoziation von α -Toxin-Monomeren und -Oligomeren an Multiubiquitin.

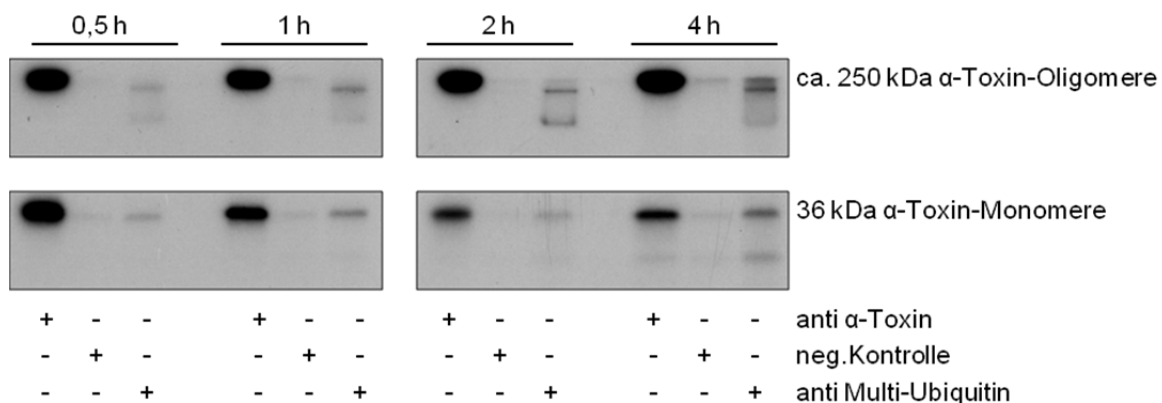


Abb. 3-31: Immunopräzipitation von α -Toxin mit Multi-Ubiquitin. HaCaT-Zellen wurden 0,5h, 1h, 2h oder 4h bei 37°C mit 200ng/ml [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin inkubiert. Anschließend wurde eine Immunopräzipitation mit Protein A/G plus Agarose Beads und den Antikörpern Anti-Staphylococcal α -Toxin und Anti-Ubiquitin (multi-ubiquitin chains) oder Anti-IgG light chain als Negativ-Kontrolle durchgeführt. Die Proben wurden in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin mit einer Autoradiographie detektiert. In der Präzipitation mit dem Antikörper Anti-Staphylococcal α -Toxin konnte [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin detektiert werden (Positiv-Kontrolle). [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin wurde in der Präzipitation mit dem Antikörper Anti-Ubiquitin (multi ubiquitin chains) (co)präzipitiert und im Gel detektiert. In der Negativ-Kontrolle mit Anti IgG light chain konnte kein [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin detektiert werden.

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob andere Proteine, wie beispielsweise das Adapterprotein p62 oder auch LC3 an dieser direkten oder indirekten Assoziation beteiligt sind, wurden Immunopräzipitationen mit Antikörpern gegen α -Toxin (Positiv-Kontrolle), LC3 (Anti-LC3), p62 (Anti-SQSTM1/p62), Ubiquitin (Anti Ubiquitin (P4D1)), Multiubiquitin und bovine IgG (Negativ-Kontrolle) durchgeführt. Dazu wurden HaCaT-Zellen 4h mit [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin inkubiert, lysiert und mit den verschiedenen Antikörpern präzipitiert. Nach dem Auftrennen der Präzipitate über eine SDS-PAGE wurden die [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin-Banden mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin-Oligomere konnten mit den Antikörpern gegen α -Toxin (Positiv-Kontrolle) und gegen Multiubiquitin gut präzipitiert werden (Abb.3-32). [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin-Monomere konnten mit Ausnahme des bovine IgG-Antikörpers (Negativ-Kontrolle) mit allen eingesetzten Antikörpern präzipitiert werden (Abb.3-32).

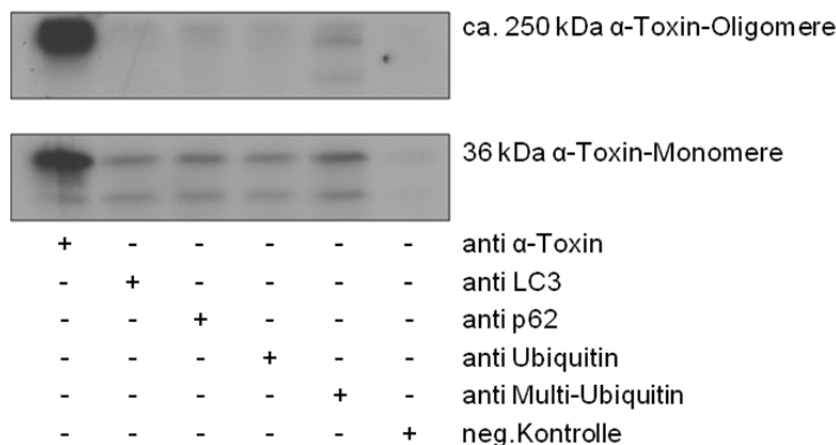


Abb. 3-32: Immunopräzipitation von α -Toxin, LC3, p62, Ubiquitin und Multi-Ubiquitin. HaCaT-Zellen wurden 4h bei 37°C mit 200ng/ml [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin inkubiert. Anschließend wurde eine Immunopräzipitation mit Protein A/G plus Agarose Beads und den Antikörpern Anti-Staphylococcal α -Toxin, Anti-LC3, Anti-SQSTM1/p62, Anti Ubiquitin (P4D1), Anti-Ubiquitin (multi ubiquitin chains) oder Anti-IgG light chain (Negativ-Kontrolle) durchgeführt. Die Proben wurden in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin mittels Autoradiographie detektiert. [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin-Oligomere konnten mit dem Antikörper Anti- α -Staphylococcal α -Toxin (Positiv-Kontrolle) und mit dem Antikörper Anti-Ubiquitin (multi ubiquitin chains) gut präzipitiert werden. [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin-Monomere konnten mit Ausnahme des Anti-IgG light chain Antikörpers (Negativ-Kontrolle) von den Antikörpern Anti-Staphylococcal α -Toxin, Anti-LC3, Anti-SQSTM1/p62, Anti Ubiquitin (P4D1) und Anti-Ubiquitin (multi ubiquitin chains) präzipitiert werden.

Nach den verfügbaren Strukturdaten ist zu erwarten, dass die α -Toxin-Transmembranpore kaum zugänglich für die Ubiquitinierungsmaschinerie ist. Auch nach der Internalisierung der Pore ändert sich die Topologie der α -Toxin-Poren in den Endosomen in Bezug auf das Zytosol nicht. α -Toxin besitzt ein Bindungsmotiv für Caveolin-1 und es existieren Hinweise dafür, dass dieses Caveolin-1-Bindungsmotiv notwendig sein könnte, um die Konformationsänderungen, welche zur Oligomerisierung der α -Toxin-Monomere in Cholesterol-/Sphingolipid-/Caveolin-reichen Mikrodomänen (Lipid-Rafts) nötig sind, auszulösen (Vijayvargia et al, 2004a). Es wäre denkbar, dass α -Toxin-gebundenes Caveolin polyubiquitiniert wird (bzw. bereits ubiquitiniertes Caveolin gebunden wird) und die (Co)-präzipitation von [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin mit dem Multiubiquitinantikörper ermöglicht. Um eine mögliche Assoziation der α -Toxin-Oligomere mit

Caveolin-1 in den Mikrodomänen zu überprüfen, wurden HaCaT-Zellen mit [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin inkubiert und eine Lipid-Raft-Präparation mit Hilfe einer Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt (2.2.9). Monomere und Oligomere des [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxins wurden nach Auftrennung der Gradientenfractionen im SDS-Gel mittels Autoradiographie vorwiegend in den Fraktionen 5 und 6 (Abb.3-33 rote Rahmen) detektiert. Im Western Blot wurde Caveolin-1 immunologisch nachgewiesen (2.2.11). Die stärksten Caveolin-1-Banden wurden in den Fraktionen 5 und 6 detektiert (Abb.3-33 rote Rahmen). Caveoline haben eine Molekülmasse zwischen 22 und 24 kDa. Während Caveolin-2 hauptsächlich als Monomer oder Dimer vorliegt, bildet Caveolin-1 oft Homooligomere mit einer großen Molekülmasse (Li et al, 1998). In den Fraktionen 5 und 6 wurden neben Banden mit 24kDa, zusätzlich Banden mit genau der Größe der α -Toxin-Oligomere (ca. 250kDa) detektiert. Dieser Befund zeigt nicht nur, dass sich die [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin-Oligomere zusammen mit Caveolin-1 in bestimmten Lipid-Raft-Fractionen befinden, sondern suggerieren, dass Caveolin-1 im Komplex mit den [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin-Oligomeren vorliegt und deshalb mit der gleichen scheinbaren Molekülmasse (app. MW) und in den gleichen Fraktionen detektiert werden konnte.

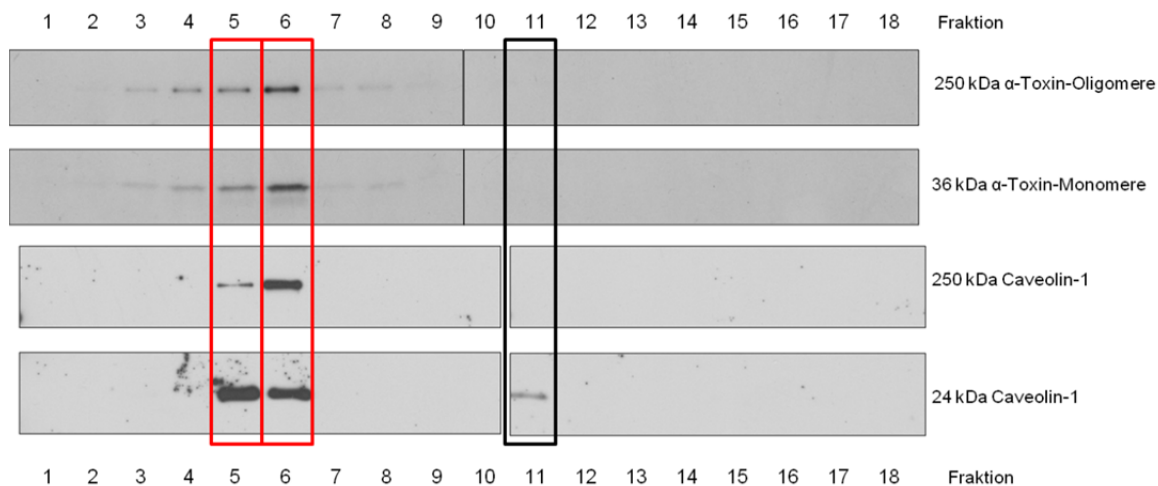


Abb. 3-33: Komplex aus [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin und Caveolin-1. HaCaT Zellen wurden mit 200ng/ml [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin auf Eis beladen und danach für 2h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden Lipid-Rafts präpariert und der Gradient fraktioniert. Die 18 Fraktionen wurden in 10%igen SDS-Gelen für eine Autoradiographie und einen Western Blot aufgetrennt. [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin-Monomere und -Oligomere konnten mittels Autoradiographie in den Fraktionen 3-8 detektiert werden. Die stärksten Banden in Fraktion 5 und 6 sind rot umrahmt. Caveolin-1 konnte im Western Blot mit den Antikörpern Anti-Caveolin-1 (N20), und Anti-Rabbit IgG HRP-linked Antibody (7074) in den Fraktionen 5, 6 und 11 nachgewiesen werden. Die rot umrahmten, stärksten Banden mit den Größen von 24 und 250 kDa wurden in den Fraktionen 5 und 6 detektiert. Die Molekülmasse von Caveolinen liegt zwischen 22 und 24kDa. Die hochmolekularen [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin- und Caveolinbanden haben exakt die gleichen scheinbaren Molekülmassen (app. MW).

Um eine mögliche Beteiligung des α -Toxin-assoziierten Proteins Caveolin-1 an der Copräzipitation von Multiubiquitin und [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin zu überprüfen, wurden MEF_{wt}-Zellen und Caveolin-defiziente MEF_{cav-/-}-Zellen 40min mit [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin inkubiert. Mit einem Antikörper gegen Multiubiquitin und einem Antikörper gegen bovines IgG (Negativ-Kontrolle) wurde eine Präzipitation an den Zelllysaten durchgeführt. Die Präzipitate wurden wiederum über eine SDS-PAGE aufgetrennt und [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin wurde

mittels Autoradiographie sichtbar gemacht (Abb.3-34). Für die MEF_{wt}-Zelllinie konnte die Copräzipitation von Multiubiquitin und [³⁵S]-Methionin-K21c- α -Toxin bestätigt werden. In Abbildung 3-34 waren [³⁵S]-Methionin-K21c- α -Toxin-Banden in den Multiubiquitin-Präzipitaten zu erkennen. Aus den Zelllysaten der MEF_{cav^{-/-}}-Zelllinie konnte [³⁵S]-Methionin-K21c- α -Toxin sowohl mit dem Antikörper gegen Multiubiquitin als auch mit dem Kontrollantikörper gegen bovine IgG überraschenderweise (co)-präzipitiert werden (Abb.3-34). Das Fehlen von Caveolin reduziert die Spezifität der Immunpräzipitation möglicherweise durch die Freigabe unspezifischer Bindungsstellen unspezifische Antikörper oder Agarose-Beads an den α -Toxin-Oligomeren. Im Kontrast zu *Vijayvargia et al. 2004*, zeigt dieser Befund, dass die Anwesenheit von Caveolin keine notwendige Voraussetzung für die Oligomerisierung von [³⁵S]-Methionin-K21c- α -Toxin ist (Vijayvargia et al, 2004b).

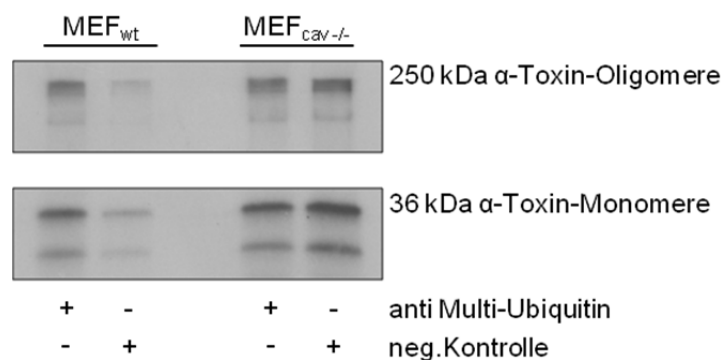


Abb. 3-34: Caveolin erhöht die Spezifität der Immunpräzipitation von α -Toxin mit Multi-Ubiquitin.

MEF_{wt} und MEF_{cav^{-/-}}-Zellen wurden 40min bei 37°C mit 2,5 μ g/ml [³⁵S]-Methionin-K21c- α -Toxin und 22,5 μ g/ml α -Toxin inkubiert. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation mit Protein A/G plus Agarose Beads und den monoklonalen Antikörpern Anti-Ubiquitin (multi ubiquitin chains) oder Anti-IgG light chain als Negativ-Kontrolle durchgeführt. Die Proben wurden in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und [³⁵S]-Methionin-K21c- α -Toxin mit einer Autoradiographie detektiert. **MEF_{wt}**: [³⁵S]-Methionin-K21c- α -Toxin wurde in der Präzipitation mit dem Antikörper Anti-Ubiquitin (multi ubiquitin chains) (co)-präzipitiert und im Gel detektiert. In der Negativ-Kontrolle mit Anti-IgG light chain konnte wesentlich weniger [³⁵S]-Methionin-K21c- α -Toxin detektiert werden. **MEF_{cav^{-/-}}**: [³⁵S]-Methionin-K21c- α -Toxin konnte im gleichen Maße mit Anti-Ubiquitin (multi ubiquitin chains) und auch mit dem Anti-IgG light chain Antikörper co-präzipitiert und in der Autoradiographie detektiert werden.

K21c α -Toxin ist eine Mutante, bei der das Lysin an Position 21 durch ein Cystein ausgetauscht wurde. Dieser Aminosäureaustausch verhält sich neutral bezüglich der Porenbildung und der Hämolyseaktivität. Bei den α -Toxin-Mutanten K131c und D152c wurden ebenfalls Lysine gegen Cysteine ausgetauscht. Der Phänotyp dieser Mutanten unterscheidet sich vom Wildtyp α -Toxin durch eine geringere Hämolyseaktivität. HaCaT-Zellen wurden mit [³⁵S]-Methionin-K21c- α -Toxin, [³⁵S]-Methionin-K131c- α -Toxin oder [³⁵S]-Methionin-D152c- α -Toxin für 4h inkubiert. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation an den Zelllysaten mit Antikörpern gegen α -Toxin (Positiv-Kontrolle), gegen Multiubiquitin und gegen bovine IgG (Negativ-Kontrolle) durchgeführt. Es zeigte sich, dass alle verwendeten α -Toxin-Varianten, wie schon bei *Walker et al. 1995* beschrieben, oligomerisieren können (Walker & Bayley, 1995). Nur [³⁵S]-Methionin-K21c- α -Toxin bildet ubiquitinierte Oligomere, die mit dem Multiubiquitin-Antikörper präzipitiert werden konnten und nach Auftrennung der Präzipitate in einer SDS-PAGE mittels

Autoradiographie sichtbar gemacht werden konnten. Von [S^{35}]-Methionin-K131c- α -Toxin und [S^{35}]-Methionin-D152c- α -Toxin konnten mit dem Multiubiquitin-Antikörper Monomere aber keine Oligomere (co)-präzipitiert werden. Zusätzlich konnten [S^{35}]-Methionin-K131c- α -Toxin-Produkte in einer Größe von ca. 100kDa detektiert werden (Abb.3-35).

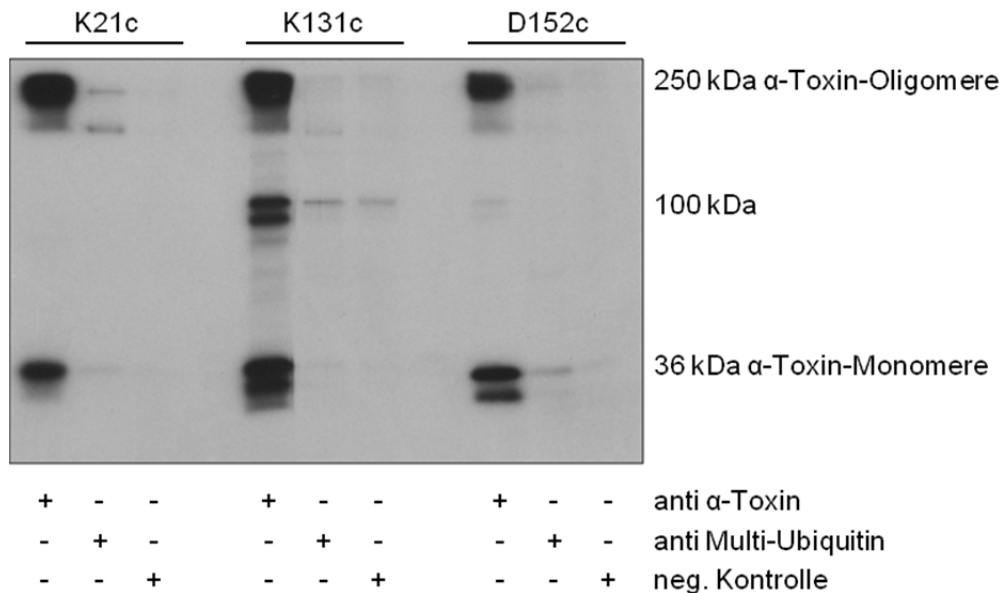


Abb. 3-35: Keine Immunopräzipitation von [S^{35}]-Methionin-K131c- α -Toxin- und [S^{35}]-Methionin-D152c- α -Toxin-Oligomeren mit Multiubiquitin. HaCaT Zellen wurden 4h bei 37°C mit 200ng/ml [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin, [S^{35}]-Methionin-K131c- α -Toxin oder [S^{35}]-Methionin-D152c- α -Toxin inkubiert. Anschließend wurde eine Immunopräzipitation mit Protein A/G plus Agarose Beads und den Antikörpern Anti-Staphylococcal α -Toxin, Anti-Ubiquitin (multi ubiquitin chains) oder Anti-IgG light chain als Negativ-Kontrolle durchgeführt. Die Proben wurden in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und [S^{35}]-Methionin mit einer Autoradiographie detektiert. In der Präzipitation mit dem Antikörper Anti-Staphylococcal α -Toxin konnten Monomere und Oligomere aller [S^{35}]-Methionin-markierten α -Toxin-Varianten detektiert werden. Ausschließlich [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin-Oligomere konnten mit dem Antikörper Anti-Ubiquitin (multi ubiquitin chains) präzipitiert werden. Zusätzlich konnten [S^{35}]-Methionin-K131c- α -Toxin-Produkte mit der Größe von 100kDa (evtl. Trimere oder Addukte) mit dem Antikörper Anti-Ubiquitin (multi ubiquitin chains) präzipitiert werden. Ubiquitiniertes [S^{35}]-Methionin-D152c- α -Toxin konnte nur in monomerischer Form detektiert werden. In der Negativ-Kontrolle mit Anti-IgG light chain konnten keine [S^{35}]-Methionin-markierten α -Toxin-Monomere oder -Oligomere detektiert werden.

Wie zuvor bereits erwähnt, ist die Transmembran-Pore, den verfügbaren Strukturdaten zur Folge, kaum zugänglich für die Ubiquitinierungsmaschinerie. Allenfalls der Lysin-Rest an Position K131, der an der Kanalinnenseite der Stammbasis lokalisiert ist, könnte einen relativ Zytosol-nahen Angriffspunkt bieten. Es wäre deshalb denkbar, dass der Aminosäureaustausch an Position K131 der [S^{35}]-Methionin-K131c- α -Toxin-Mutante, die Ubiquitinierung der α -Toxin-Transmembranpore gänzlich unmöglich macht, während die Ubiquitinierung in den 100kDa K131c- α -Toxin-Produkten (evtl. Trimere oder Addukte) weiterhin stattfinden kann. Diese Erklärung kann auf Grund der Position von D152 in der sogenannten Dreiecks-Region oberhalb der Stamm-Region nicht für [S^{35}]-Methionin-D152c- α -Toxin gelten. Allerdings bildet [S^{35}]-Methionin-D152c- α -Toxin instabile Oligomere, die nicht vollständig in die Plasmamembran

inseriert werden können. Möglicherweise konnten auf Grund dieser Instabilität, keine ubiquitinierten Oligomere, sondern stattdessen vermehrt ubiquitinierte [S^{35}]-Methionin-D152c- α -Toxin-Monomere detektiert werden.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Aufnahme, intrazelluläre Lokalisation und Induktion von Pro-Autophagie-Signalen durch *Staphylococcus aureus*

4.1.1 Aufnahme von *Staphylococcus aureus* in nicht-professionelle Phagozyten

Staphylococcus aureus wurde lange als rein extrazellulär lokalisiertes Bakterium angesehen, das Zellen und Gewebe durch die Sekretion von Enzymen und Toxinen schädigen kann. Inzwischen gibt es jedoch starke Indizien, dass *Staphylococcus aureus* auch durch nicht-professionelle Phagozyten aufgenommen werden kann. Die Aufnahme von *Staphylococcus aureus* durch die Zellen geschieht durch die Adhäsine FnBPA und FnBPB (fibronectin-binding protein A und B), die an die $\alpha_5\beta_1$ -Intergrine der Wirtszelle binden können (Sinha et al, 1999). Seit der ersten *in-vitro*-Beobachtung von intrazellulären *Staphylococcus aureus* durch Hamill et al. 1986 in nicht-professionellen Phagozyten konnten intrazellulär lokalisierte Staphylokokken in einer Reihe von etablierten Zelllinien nachgewiesen werden (Garzoni & Kelley, 2009; Hamill et al, 1986; von Eiff et al, 2001). Um die wichtigste Voraussetzung für die folgenden Experimente zu klären, wurde zunächst überprüft, ob die *Staphylococcus aureus*-Variante hla(+) von nicht-professionellen Phagozyten aufgenommen wird. Dazu wurden drei sehr unterschiedliche Zelllinien mit pEGFP-LC3 transfiziert und zusammen mit *Staphylococcus aureus* inkubiert. Von Eiff et al. konnten 2001 nach Infektion mit klinischen *Staphylococcus aureus*-Isolaten, die Aufnahme der Bakterien in die humane Keratinozytenzelllinie HaCaT zeigen (von Eiff et al, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte die Aufnahme der *Staphylococcus aureus*-Variante hla(+) durch HaCaT sowie und durch murine embryonale Fibroblasten der MEF_{cav-/-}-Zelllinie gezeigt werden. Die Rekrutierung von LC3 diente in diesem Zusammenhang als Kriterium für die intrazelluläre Lokalisation der Bakterien und kann zusätzlich als starkes Indiz für die Induktion von Pro-Autophagie-Signalen gewertet werden. Die Aufnahme von Staphylokokken durch die Zellen der ODORA-Zelllinie, einer aus Vorläuferzellen von Riechsinneszellen abgeleiteten Zelllinie, konnte meines Wissens hier erstmals nachgewiesen werden. Die Aufnahme von *Staphylococcus aureus* konnte somit in allen untersuchten Zelllinien detektiert werden.

4.1.2 Intrazelluläre *Staphylococcus aureus*

Identifizierung verschiedener Bakterien-tragender Kompartimente

Die post-invasiven Ereignisse nach der Internalisierung von *Staphylococcus aureus* werden kontrovers in der Fachliteratur diskutiert, und selbst innerhalb eines Zellsystems existieren gegensätzliche Berichte über das Schicksal der intrazellulären Bakterien. So wurde beispielsweise sowohl von der Persistenz (Hess et al, 2003) intrazellulärer *Staphylococcus aureus*, als auch von der erfolgreichen Zerstörung (Deitch et al, 1995) der Bakterien in Zellen der Caco-2-Darmzelllinie berichtet (Sinha & Fraunholz, 2010). Die Analyse der ultrastrukturellen Lokalisation der Bakterien sollte Aufschluss über die intrazellulären Ereignisse geben. Dazu wurden mit *Staphylococcus aureus* hla(-) und hla(+) infizierte HaCaT-Zellen am Elektronenmikroskop analysiert. Unabhängig davon, mit welchem Stamm infiziert wurde oder welche Inkubationszeit gewählt wurde, konnten die Bakterien in insgesamt drei morphologisch unterschiedlichen Zellkompartimenten beobachtet werden:

Kompartiment 1: Einzelne Staphylokokken konnten nach einer Inkubationszeit von insgesamt sechs Stunden frei im Zytoplasma der Zellen ohne sichtbare, limitierende Membranen beobachtet werden. Manche Bakterien zeigten Septen, die für Teilung und die damit assoziierte Replikation im Zytoplasma der Zelle sprechen (Touhami et al, 2004); und häufig fielen Phagophoren-ähnliche Membranstücke im Zytoplasma der Zellen in unmittelbarer Nähe zu den Bakterien auf.

Kompartiment 2: Unter identischen Infektionsbedingungen konnte eine Akkumulation von Bakterien im Zentrum eines voluminösen, vesikulären Kompartiments beobachtet werden. Die Bakterien in diesem Kompartiment waren mehrfach mit Septen durchzogen, was für die Zellteilung und Replikation innerhalb dieses Kompartiments spricht (Touhami et al, 2004). Die Ränder des Kompartiments erschienen klar abgrenzt vom Zytoplasma, jedoch waren nur vereinzelt dunkle Strukturen zu erkennen, die als Lipide einer Membran gedeutet werden könnten.

Kompartiment 3: Neben den zuvor beschriebenen Lokalisationen, konnten Bakterien-Akkumulationen innerhalb des gleichen Präparats in einem dritten Kompartiment beobachtet werden. Dieses bakterientragende Kompartiment unterschied sich vor allem durch eine klar erkennbare Membran, die das Kompartiment als dunkelkontrastierte Struktur vom Zytoplasma abgrenzte. Die Bakterien lagen nicht ausschließlich im Zentrum des Kompartiments, sondern zum Teil in engen Ausbuchtungen. Außerdem wiesen sie keine Anzeichen für Zellteilung oder Replikation auf und sahen deformiert aus. Die Deformation der Bakterien könnte möglicherweise ein Artefakt sein, das partiell durch das Kontrastierungsmittel entstand oder aber die Integrität des bakterientragenden Kompartiments steht in direktem Zusammenhang mit der Vitalität der Bakterien. Möglicherweise führt eine intakte, vollständige Phagosomen-/Endosomen-Membran zu schädlichen Bedingungen innerhalb des bakterientragenden Kompartiments, während eine Perforierung oder der Abbau der Membran Bedingungen entstehen lässt, unter denen sich die Bakterien replizieren können.

In der Publikation von Gresham et al. 2000 konnten *Staphylococcus aureus* (sar^+ und sar^-) in PMN (polymorphonuclear neutrophils)-Zellen ebenfalls sowohl frei im Zytoplasma, als auch in großen, voluminösen Kompartimenten mit intakter oder teilweise abgebauter Membran beobachtet werden. Während lediglich eine Minderheit von sar^+ -Staphylokokken in engen Kompartimenten oder frei im Zytoplasma detektiert wurden, konnten sar^- -Staphylokokken, die

einige Virulenzfaktoren nicht produzieren können, hauptsächlich (97.2%) in sehr engen, kleinen Kompartimenten detektiert werden (Gresham et al, 2000). Eine andere Arbeitsgruppe beschrieb die unterschiedliche Lokalisation von *Staphylococcus aureus*-Stämmen in nicht-professionellen Phagozyten, in Abhängigkeit der Hämolyseaktivität der *Staphylococcus aureus*-Stämme (6850 und Cowan I) (Sinha & Fraunholz, 2010).

Im Kontrast zu *Gresham et al.* oder *Sinha et al.*, die das Auftreten unterschiedlicher bakterientragender Kompartimente an der Hämolyseaktivität des Staphylokokken-Stammes oder der Produktion von Virulenzfaktoren festmachten, konnte die Lokalisation der Staphylokokken in der vorliegenden Arbeit unabhängig von der Produktion von α -Toxin beobachtet werden. Daher kann für die Existenz der morphologisch verschiedenen Bakterienkompartimente, die unter einheitlichen Infektionsbedingungen in einem einheitlichen Zellsystem beobachtet werden konnten, die α -Toxin-Produktion nicht als ausschlaggebender Faktor herangezogen werden. Möglicherweise spiegeln die unterschiedlichen Kompartimente verschiedene Stadien der Bakterieninvasion wieder. Oder aber beiden in dieser Arbeit untersuchten *Staphylococcus aureus*-Varianten ist es möglich, unterschiedliche Überlebensstrategien zu verfolgen, indem sie morphologisch verschiedene Kompartimente nutzen, um vorübergehend zu persistieren.

Überblick über bekannte Strategien und Kompartimente von intrazellulären Bakterien

Die vorübergehende Persistenz in nicht-professionellen Phagozyten könnte *Staphylococcus aureus* die Gelegenheit geben, professionellen Phagozyten und extrazellulär wirkenden Antibiotika zu entkommen oder Kompartimente der Wirtszelle als Replikationsnische zu missbrauchen (Garzoni & Kelley, 2009). Im Folgenden werden einige bekannte Überlebensstrategien und Mechanismen intrazellulärer Bakterien erläutert, die Erklärungen für die verschiedenen bakterientragenden Kompartimente, in denen *Staphylococcus aureus* in der vorliegenden Arbeit identifiziert werden konnten, geben könnten:

Ausbruch aus dem Phagosom

Klassisch fakultative Bakterien wie *Listeria monocytogenes*, *Shigella* und *Rickettsia* haben Mechanismen entwickelt, um aus dem Endosom/Phagosom in das nährstoffreiche Zytosol der Zelle auszubrechen, bevor das Endosom mit einem Lysosom verschmelzen kann. Für die Zerstörung der Endosomen/Phagosomen-Membran nutzen die Bakterien PFTs (pore forming toxins) oder Phospholipasen (Hybiske & Stephens, 2008). Möglicherweise erklären sich die, in der vorliegenden Arbeit beobachteten, morphologisch unterschiedlichen Kompartimente oder Stadien, durch den Abbau der endosomalen/phagosomalen Membran und dem Ausbruch in das Zytosol der Wirtszelle. Ob *Staphylococcus aureus*, ähnlich wie *Listeria monocytogenes* (LLO), ihr PFT, das α -Toxin nutzen können, um das Endosom/Phagosom zu durchlöchern und in das Zytoplasma zu gelangen, ist nicht klar. In CFT-1 Zellen konnte eine *agr* (accessory gene regulator)-abhängige Flucht von *Staphylococcus aureus*-Stamm RN6911 aus dem Endosom/Phagosom gezeigt werden. Die *agr*-defiziente Mutante von Stamm RN6911 konnte nicht aus dem Endosom/Phagosom ausbrechen. Als Indikator für den Ausbruch aus dem Endosom/Phagosom diente u.a. die ausbleibende bzw. reduzierte Assoziation zu LAMP1 (lysosome associated-membrane protein 1) und LysoTracker® (akkumuliert in zellulären Kompartimenten mit niedrigem pH). Durch Überexpression von α -Toxin über einen induzierbaren Promotor konnte die Fähigkeit zum Ausbruch aus dem Endosom/Phagosom der

agr-defizienten Mutante wiederhergestellt werden. (Jarry et al, 2008). Während die Befunde in CFT-1-Zellen von Jarry et al. 2008 den Ausbruch der Staphylokokken aus dem Endosom/Phagosom in Abhängigkeit der α -Toxin-Expression klar befürworten, existiert eine Publikation von Giese et al. 2009, die Argumente gegen einen α -Toxin-vermittelten Ausbruch von *Staphylococcus aureus* aus dem Endosom/Phagosom liefert. Giese et al. 2009 konnte in Epithelzellen der oberen Atemwege zeigen, dass sich die Staphylokokken unabhängig von der α -Toxin-Produktion, ausschließlich in LAMP-1-positiven Vesikeln befanden und diese Vesikel ebenfalls unabhängig von der α -Toxin-Expression angesäuert wurden. Dagegen konnten Staphylokokken, die das Toxin LLO exprimierten, nicht in Assoziation zu LAMP-1 oder einem niedrigen pH detektiert werden (Giese et al, 2009). Allerdings lassen sich die Befunde von Jarry et al. 2008 und Giese et al. 2009 nur bedingt vergleichen, da nicht auszuschließen ist, dass die gegensätzlichen Ergebnisse aus den spezifischen Eigenschaften der gewählten Bakterienstämme, der Infektionsbedingungen sowie des Zellsystems und dessen Zustand (Alter, Stress) resultieren. *Listeria monocytogenes* kann durch LLO-Sekretion erfolgreich aus dem Endosom/Phagosom ausbrechen und schützt sich nach dem Ausbruch vor der Erkennung durch die Autophagiemaschinerie im Zytosol, indem es die biomimetischen Fähigkeiten des ActA-Proteins nutzt und sich mit den Wirtsproteinen Ena/VASP und dem Arp 2/3-Komplex maskiert (Abb.4-1). Mutationen des ActA-Proteins, das die Wirtsproteine Ena/VASP und den Arp 2/3-Komplex nicht binden können, kolokalisieren mit Ubiquitin und dem Autophagie-Adapterprotein p62 (Ogawa et al, 2011). Für *Staphylococcus aureus* ist kein vergleichbarer Mechanismus bekannt, mit dem sich das Bakterium tarnen kann. Einen erfolgreichen Ausbruch vorausgesetzt, wäre *Staphylococcus aureus* durch die Flucht in das Zytoplasma dem phagolysosomalen Abbauweg und letztendlich dem schädlichen Milieu im Lysosom entkommen, nun aber der zellautonomen Abwehr und dem Abbau durch selektive Autophagie, der sogenannten Xenophagie, ausgesetzt. Ein möglicher Ausbruch von *Staphylococcus aureus* in das Zytoplasma der Zelle könnte sich daher negativ für die Bakterien auswirken. Dennoch konnten, wie bereits beschrieben, stets einige Bakterien der untersuchten *Staphylococcus aureus*-Varianten unabhängig von der α -Toxin-Produktion frei im Zytoplasma beobachtet werden.

Manipulation des bakterientragenden Kompartiments

Eine Vielzahl klassisch intrazellulärer Bakterien, wie *Brucella abortus*, *Poryphromonas ginigvalis*, *Legionella pneumophila* oder *Coxiella burnetii*, brechen nicht aus dem Endosom/Phagosom aus, sondern nutzen dieses Kompartiment als Replikationsnische, indem sie die Fusion des Phagosoms mit dem Lysosom verhindern oder trotz des niedrigen pHs und den Hydrolasen im Phagolysosom gedeihen können (Finlay & Falkow, 1997; Ogawa et al, 2011) (Abb.4-1). Während einige Staphylokokken möglicherweise aus dem Endosom/Phagosom in das Zytoplasma ausbrechen, könnten *Staphylococcus aureus* alternativ ähnliche Strategien wie *Legionella* oder *Brucella* verfolgen. Schnaith et al. 2007 berichten, dass *Staphylococcus aureus* in HeLa-Zellen schon kurz nach ihrer Aufnahme in Autophagosomen übersiedeln und die rasche Autophagieinduktion essentiell für die erfolgreiche Replikation der intrazellulären Bakterien und die Induktion des Zelltods (TypII) sei. Diese Befunde waren abhängig von *agr*-regulierten Faktoren und trafen nicht auf *agr*-defiziente *Staphylococcus aureus*-Stämme zu (Schnaith et al, 2007). Der *agr*-Regulator kontrolliert neben mehreren anderen Virulenzgenen auch das Gen *hla*, das für α -Toxin kodiert. Im Gegensatz zu GAS (Group A *Streptococcus*) *Streptococcus pyogenes*, die erfolgreich durch selektive Autophagie (Xenophagie) zerstört werden (Nakagawa et al, 2004), gibt es also Hinweise darauf, dass *Staphylococcus aureus* in Abhängigkeit von ihrer Fähigkeit zur α -Toxin-Sekretion Autophagosomen als Replikationsnische nutzen können und die Reifung zu einem

(Auto)phagolysosom verhindern können (Mestre et al, 2010). Jedoch existieren auch gegenteilige Befunde. *Lâm et al. 2010* konnten für drei Zellsysteme und mehrere stark β -hämolytische *Staphylococcus aureus*-Stämme zeigen, dass das bakterientragende Kompartiment mit LAMP-1-positiven Strukturen kolokalisiert und angesäuert wird. Die Arbeitsgruppe betrachtete diesen Befund als Hinweis darauf, dass die Sekretion von α - und β -Toxin nicht ausreichen kann, um die Reifung des Phagosoms/Autophagosom zu verhindern oder einen Ausbruch der Bakterien in das Zytoplasma der Wirtszelle zu ermöglichen. Auch in diesem Fall kann nicht ausgeschlossen werden, dass die gegensätzlichen Befunde aus den spezifischen Eigenschaften der Bakterienstämme, des Zellsystems und dessen Zustand resultieren. Ob *Staphylococcus aureus* durch die Sekretion von α -Toxin die Entstehung von Autophagosomen tatsächlich induzieren und deren Reifung zum (Auto)phagolysosom verhindern kann, ist offen.

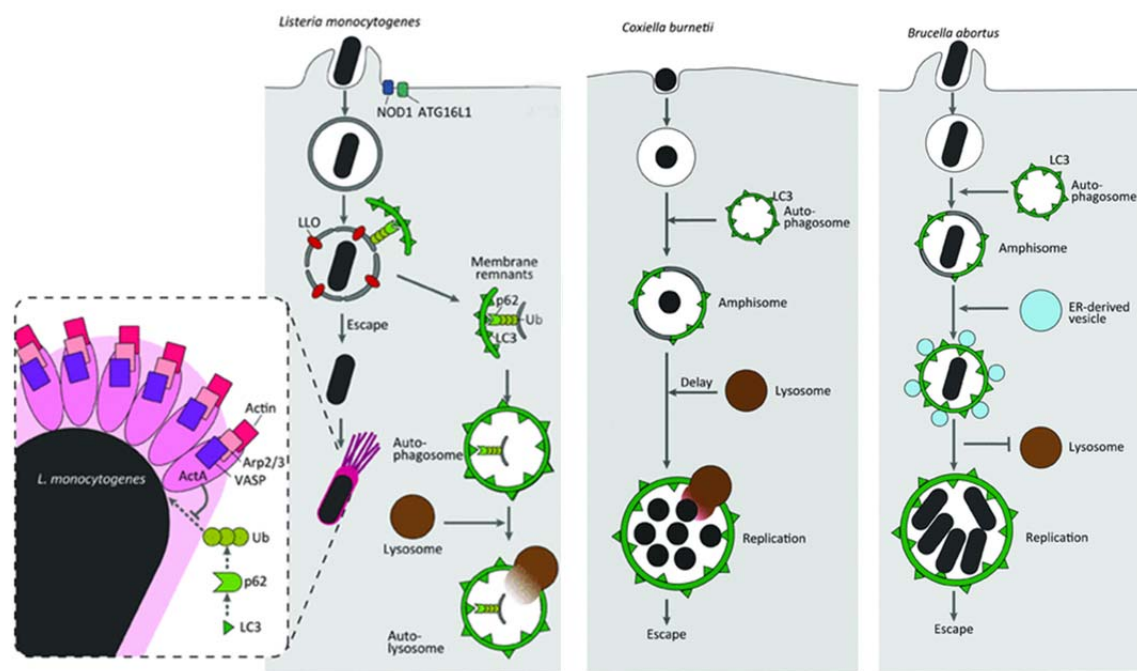


Abb. 4-1: Überlebensstrategien intrazellulärer Bakterien. Ausbruch aus dem Phagosom: *Listeria monocytogenes* kann durch die Sekretion von LLO in das Zytoplasma ausbrechen. Die Membranreste des Phagosoms werden durch die Autophagiemaschinerie erkannt und durch den Ubiquitin-p62-LC3-Signalweg abgebaut. *Listeria monocytogenes* kann durch die Autophagiemaschinerie nicht erkannt werden, weil es Actin auf der Oberfläche exprimiert und sich mit den Wirtspoteinen Ena/VASP maskiert. **Manipulation des bakterientragenden Kompartiments:** *Coxiella burnetii* brechen nicht aus dem Phagosom aus. Sie können die Reifung der Autophagosomen/Amphisomen verzögern und sich in den angesäuerten Vakuolen replizieren. *Brucella abortus* hemmen die Fusion der Autophagosomen-ähnlichen Vesikel mit dem Lysosom und replizieren in den LC3-positiven endosomalen Vakuolen (Ogawa et al, 2011).

Auch ob die untersuchten *Staphylococcus aureus*-Varianten tatsächlich eine der zuvor genannten intrazellulären Strategien verfolgen, bleibt ungeklärt. Jedoch können die in der vorliegenden Arbeit entstandenen Ergebnisse keine α -Toxin-abhängige Präferenz der Bakterien für ein bestimmtes Kompartiment bestätigen. Denn alle untersuchten *Staphylococcus aureus*-Varianten in infizierten HaCaT-Zellen konnten trotz identischer Infektionsbedingungen in morphologisch verschiedenen Kompartimenten beobachtet werden. Während einige einzelne Staphylokokken frei im Zytoplasma der Zelle zu finden waren, befanden sich replizierende, vitale Staphylokokken in

großen, Membran-umgebenen Vakuolen. Die Rekrutierung von LC3 an die bakterientragenden Vakuolen von *Staphylococcus aureus*-Variante hla(+), die in pEGFP-LC3-transfizierten HaCaT, MEF-, und ODORA-Zellen beobachtet werden konnte, ist ein starker Hinweis auf eine mögliche Autophagieinduktion durch die *Staphylococcus aureus* hla(+). Das LC3/Atg8-Protein ist verantwortlich für die Entstehung und Ausdehnung der Phagophore und dekoriert die Innen- und Außenseite des Autophagosoms. Die Rekrutierung von LC3 an die Bakterien bzw. das bakterientragende Kompartiment spricht für die mögliche Entstehung eines Amphisoms durch die Fusion der Bakterienvakuole mit einem Autophagosom oder der Umhüllung durch eine Phagophoren-Doppelmembran. Um Hinweise auf mögliche Induktionsmechanismen von Pro-Autophagie-Signalen durch *Staphylococcus aureus* zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit *Staphylococcus aureus*-infizierte HaCaT in Hinblick auf Aktivierung oder Kollokalisierung mit einer Auswahl von möglichen Interaktionspartnern überprüft.

4.1.3 Induktion von Pro-Autophagie-Signalen durch *Staphylococcus aureus*

Rekrutierung der Autophagie-Core-Maschinerie

Für die kanonische und nicht-kanonische Entstehung von Autophagosomen werden in der Regel Proteine der Autophagie-Core-Maschinerie rekrutiert. Um die Frage nach einer möglichen Autophagieinduktion durch intrazelluläre Staphylokokken zu klären, wurde die Rekrutierung einiger Autophagie-Proteine untersucht. Die Rekrutierung des Klasse III Phosphatidylinositol 3-OH Kinase (PtdIn3K)-Komplexes an ein Omegasom ist notwendig, um das Lipid Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PIP₃) in der Membran anzureichern, um weitere Atg-Proteine rekrutieren zu können (Yang & Klionsky, 2010). Der Klasse III PtdIn3K-Komplex besteht entweder aus hVps34, Beclin1, p150 und Atg14L/Barkor oder hVps34, Beclin1, p150 und UVRAG oder aber aus hVps34, Beclin1, p150, UVRAG und Rubicon (Itakura et al, 2008; Liang et al, 2006). Es wird vermutet, dass die Funktionen der PtdIn3K-Komplexe in zwei verschiedenen Phasen der Autophagie wirken, indem die Untereinheiten des Komplexes ausgetauscht werden. Der PtdIn3K-Atg14L-Komplex ist hauptsächlich an der entstehenden Phagophore und dem ER lokalisiert und wirkt demnach bei dem Aufbau der Autophagiemaschinerie, während der PtdIn3K-Komplex in der zweiten Phase die Untereinheit UVRAG für die Reifung der Autophagosomen und die Fusion mit dem Lysosom bindet. Die Bindung von Rubicon an den PtdIn3K-UVRAG-Komplex wirkt sich negativ auf die Aktivität der hVps34 und auf die Reifung der Autophagosomen aus (Matsunaga et al, 2009; Zhong et al, 2009). Ob Proteine des Klasse III PtdIn3K-Komplexes an das bakterientragende Kompartiment rekrutiert werden und welche der möglichen Komplexe vorliegen, wurde anhand der Rekrutierung der variablen Bestandteile der Klasse III PtdIn3K-Komplexe, Atg14L/Barkor, UVRAG und Rubicon, überprüft. pEGFP-Atg14L-transfizierte HaCaT-Zellen und pEGFP-C1-hUVRAG-transfizierte Zellen sind durch eine diffuse, grüne Färbung gekennzeichnet, die die Beurteilung der Bilder erschwert. Trotz der Hintergrundfärbung ließ sich nach Infektion mit den *Staphylococcus aureus*-Varianten hla(+) oder hla(-), eine Rekrutierung von EGFP-Atg14L und EGFP-hUVRAG an die Bakterienvakuolen beider Staphylokokken-Varianten detektieren. Eine Akkumulation von EGFP-Rubicon um die Höchst-gefärbten Bakterien ließ sich in den pEGFP-Rubicon-transfizierten HaCaT-Zellen eindeutig ausmachen. Das EGFP-Rubicon-Signal ist, im Gegensatz zu den Signalen von EGFP-Atg14L und EGFP-hUVRAG, scharf abgrenzt und dekoriert die bakterientragenden Vakuolen beider Staphylokokken-Varianten. Schnaith et al. 2007 publizierten, dass eine schnelle Induktion der Autophagie durch die Bakterien für das Überleben und die Replikation von *Staphylococcus aureus* in der Wirtszelle essentiell sei. Mestre et al. 2010 erweiterten dieses Modell später, indem sie Daten generieren konnten, die dafür sprechen, dass die bakterientragenden Vakuolen nicht zu funktionellen Autolysosomen reifen und eine Ansäuerung des pHs unterbleibt. Gegenargumente lieferten Lam et al. 2010, die Befunde publizierten, die für eine Ansäuerung der bakterientragenden Kompartimente/Phagosomen sprechen (Lam et al, 2010). Die Rekrutierung der Klasse III PtdIn3K-Komplexe mit gebundenem Atg14L/Barkor oder UVRAG wäre ein Hinweis für die Autophagieinduktion und Reifung der Autophagosomen durch die *Staphylococcus aureus*-Varianten hla(-) und hla(+). Auch die Rekrutierung von Rubicon an die Bakterienvakuolen, das die Reifung von Autophagosomen durch die Bindung an den Klasse III PtdIn3K-UVRAG-Komplex negativ beeinflusst, passt teilweise zu den von Schnaith et al. 2007 und Mestre et al. 2010 publizierten Modellen. Die Rekrutierung des Rubicon-Proteins an die Bakterien lässt aber eine zusätzliche Interpretation zu. Denn neben der Funktion als Negativregulator des PtdIn3K-UVRAG-Komplexes, die die Fusion der Endo-/Autophagosomen

mit dem Lysosom hemmt, wurde in Makrophagen kürzlich eine weitere wichtige Funktion als Adapterprotein entdeckt. Rubicon kann nach der Erkennung von PAMPs (pathogen associated molecular patterns) durch PRRs (pattern recognition receptors) mehrere verschiedene „Immun“-Komplexe bilden, um Pathogen-spezifische Reaktionen der Makrophagen zu organisieren (Bradfield et al, 2012). Es wäre durchaus denkbar, dass die Rekrutierung von Rubicon an das bakterientragende Kompartiment (auch in den nicht-professionellen Phagozyten HaCaT) nicht in der Funktion als Autophagie-Protein geschieht, sondern als eine Art Adapterprotein für PAMPs.

Schnaith et al. 2007 beschrieben die Induktion der Autophagie, die Replikation der Bakterien und auch den Autophagie-induzierten Zelltod als *agr*-abhängige Ereignisse. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich jedoch keine Unterschiede bei der Rekrutierung der Autophagie-assoziierten Proteine EGFP-Atg14L, EGFP-hUVRAG und EGFP-Rubicon an die bakterientragenden Vakuolen der *Staphylococcus aureus*-Varianten *hla*(-) und *hla*(+), obwohl *Staphylococcus aureus hla*(-) kein α -Toxin produzieren kann. Vielmehr scheint *Staphylococcus aureus*, unabhängig von α -Toxin, die Fähigkeit zu besitzen, eventuell durch die massive Vervielfachung der Bakterien und die, daraus resultierende, Verknappung der zellulären Ressourcen Autophagie-Signalwege zu aktivieren und Autophagie-assoziierte-Proteine zu rekrutieren.

α -Toxin-abhängige Rekrutierung von LC3

Nach der Initiation der Phagophore durch die Produktion von PIP₃ und der Rekrutierung weiterer Atg-Proteine wird das Ubl-Protein-System für die Ausdehnung und Verlängerung der Phagophore benötigt. Das Ubl-Protein-System besteht aus Atg12 und den Atg8/MAP1-LC3-Proteinen und deren Konjugationssystemen. Die PE-konjugierte Form-II der Atg8/MAP1-LC3-Proteine bindet an den äußeren und inneren Membranen klassischer Autophagosomen und dissoziiert erst bei der Fusion mit dem Lysosom von der äußeren Membran des Autophagosoms. Diese Eigenschaft prädestiniert LC3 als Autophagiemarker. In den Publikationen von *Schnaith et al. 2007* und *Mestre et al. 2010* wurde LC3 als Marker für Autophagosomen benutzt. Beide Arbeitsgruppen zeigten eine Rekrutierung von LC3 an intrazelluläre *Staphylococcus aureus*, jedoch konnten *agr*- bzw. *hla*-defiziente *Staphylococcus aureus* kein LC3 rekrutieren (Mestre et al, 2010; Schnaith et al, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden pEGFP-LC3-transfizierte Zellen der HaCaT- oder der ODORA-Zelllinie mit den *Staphylococcus aureus*-Varianten *hla*(-), *hla*(+) und *hla*(mut) infiziert. In beiden Zelllinien wurde EGFP-LC3 an die Bakterienvakuolen der α -Toxin-produzierenden *Staphylococcus aureus hla*(+), aber nicht an die Vakuole der *Staphylococcus aureus*-Variante *hla*(-) rekrutiert. Überraschenderweise konnte die selektive Rekrutierung von EGFP-LC3 an die Bakterienvakuole auch in *Staphylococcus aureus hla*(-) auf Grund einer Aktivierung der Zelle durch die gleichzeitige Inkubation mit aufgereinigtem Alexa Fluor®546-markiertem α -Toxin erreicht werden. Das Ausmaß der EGFP-LC3-Rekrutierung an *Staphylococcus aureus hla*(-) durch die zusätzliche Inkubation mit α -Toxin entsprach dem Phänotyp der α -Toxin-produzierenden *Staphylococcus aureus*-Variante *hla*(+) ohne zusätzliche Inkubation mit α -Toxin. Ebenfalls erstaunlich war, dass sich das Alexa Fluor®546-markierte α -Toxin zum Teil in den LC3-dekorierten Bakterienphagosomen befand. Dieses Ergebnis spiegelt vielleicht die rege Fusionsaktivität von endosomalen, phagosomalen und autophagosomalen Vesikeln wieder.

Obwohl keine Unterschiede bei der Rekrutierung von EGFP-Atg14L, EGFP-hUVRAG und EGFP-Rubicon zu detektieren waren, ist die Rekrutierung von EGFP-LC3 α -Toxin-abhängig. Die

Rekrutierung der Core-Autophagie-Maschinerie erfolgt unabhängig von der LC3-Rekrutierung und führt nicht zwangsläufig zur Autophagosomenbiogenese. Ebenso scheint es unter bestimmten Voraussetzungen möglich zu sein, dass die Rekrutierung der Atg-Proteine (z.B LC3), die für die Verlängerung und die Schließung der klassischen Autophagosomen verantwortlich sind, bei der Autophagosomenbiogenese umgangen werden können (Codogno et al, 2012).

Die α -Toxin-abhängige Rekrutierung von EGFP-LC3 wirft dennoch die Frage nach dem Signal für die Rekrutierung von LC3 auf. Die *Staphylococcus aureus*-Variante hla(-) unterscheidet sich von der *Staphylococcus aureus*-Variante hla(+) nur in der Fähigkeit zur Produktion von α -Toxin. Möglicherweise führen die Sekretion von α -Toxin in der Bakterienvakuole und die anschließende Bildung von α -Toxin-Poren in der Membran des Endosoms/Phagosoms zur Rekrutierung von LC3. Aber auch an die Bakterienvakuolen der *Staphylococcus aureus*-Variante hla(mut) wurde LC3 rekrutiert. Die *Staphylococcus aureus*-Variante hla(mut) produziert eine Variante des α -Toxins, die binden und oligomerisieren kann, jedoch nur eine geringe Hämolyseaktivität besitzt (Jursch et al, 1994; Walker & Bayley, 1995). Sollte die Porenbildung und Verletzung der Vakuole der Auslöser für die LC3-Rekrutierung sein, würde dies eine sehr starke Freisetzung von D152c- α -Toxin durch die hla(mut)-Staphylokokken in der Vakuole voraussetzen. Eine Verletzung der Membran des bakterientragenden Kompartiments durch α -Toxin-Poren würde die Ansäuerung des Kompartiments durch den Kontakt mit dem Zytosol neutralisieren. Giese et al. 2009 und Lãm et al. 2010 publizierten Befunde, die gegen eine Verletzung und Neutralisierung des pHs in der Bakterienvakuole sprechen (Giese et al, 2009; Lam et al, 2010). Giese et al. 2009 konnten in Epithelzellen der oberen Atemwege eine α -Toxin-unabhängige Assoziation der Bakterienvakuole mit LAMP-1 und die Ansäuerung der Vakuole zeigen. Auch Lãm et al. 2010 konnten für drei Zelllinien (HeLa (humane Epithelzellen/Zervixkarzinom), HEK-293 (human embryonic kidney cells), EA hy 926 (primäre Endothelzellen aus der humanen Nabelschnurvene)) und verschiedene stark β -hämolytische *Staphylococcus aureus*-Stämme zeigen, dass die Membran der Vakuole intakt bleibt und der pH in den Vakuolen gesenkt wird. Der Stamm 6850 zeigte allerdings eine reduzierte Senkung des pHs in der Bakterienvakuole und befand sich nicht immer im Kontext mit LAMP-1-positiven Vakuolen (Lam et al, 2010). Im Kontrast zu den genannten Arbeiten von Giese et al. 2009 und Lãm et al. 2010 konnte in der vorliegenden Arbeit ein Argument für die Verletzung der Vakuolenmembran durch den immunologischen Nachweis des Proteins Galektin-3 in HaCaT-Zellen, die zuvor mit der *Staphylococcus aureus*-Variante hla(+) infiziert wurden, erarbeitet werden. Sehr oft waren starke Akkumulationen um die Bakterienvakuolen von *Staphylococcus aureus* hla(+) zu sehen und nur selten konnten kleinere Galektin-3-Akkumulationen um einzelne Bakterien der *Staphylococcus aureus*-Varianten hla(-) und hla(mut) detektiert werden. Für die intrazellulären Bakterien *Shigella* und *Listeria* wurde gezeigt, dass das zytosolische Protein Galektin-3 rasch an die Reste der Phagosomenmembran, die die Bakterien nach ihrem Ausbruch in das Zytosol der Wirtszelle zurücklassen, rekrutiert wird. Varianten von *Shigella* und *Listeria*, die das Phagosom nicht lysieren können, lösen keine Rekrutierung von Galektin-3 an das Phagosom aus. Die Rekrutierung von Galektin-3 wird daher als Marker für die Lyse der Phagosomenmembran propagiert (Dupont et al, 2009; Paz et al, 2010). Die deutlich sichtbare Rekrutierung von Galektin-3 an die Vakuole der *Staphylococcus aureus*-Variante hla(+) ist ein Indiz für eine ähnliche Zerstörung oder Verletzung der Phagosomenmembran durch *Staphylococcus aureus* und spricht für einen möglichen Ausbruch der Staphylokokken in das Zytosol der Wirtszelle. Dupont et al. 2009 berichten, dass Proteine, die mit den Galektin-3-dekorierten Membranresten der *Shigella*-Vakuolen assoziiert sind, polyubiquitiniert werden und anschließend das Adapterprotein p62 und LC3 an die Vakuolenreste rekrutiert werden. Welche Merkmale die Membranreste für die Ubiquitinierung auszeichnen und ob es sich um bakterielle

oder wirtseigene Substrate handelt, ist derzeit aber nicht bekannt. Galektin-3 selbst scheint aber nicht der Auslöser für die LC3-Rekrutierung zu sein. Dagegen spricht der Befund, dass EGFP-LC3 an die *Staphylococcus aureus*-Variante hla(mut) rekrutiert wird, jedoch nur selten kleinere Galektin-3-Akkumulationen detektierbar waren. EGFP-LC3 wurde selektiv und abhängig von der Produktion von α -Toxin oder der mutierten α -Toxin-Variante D152c an die Bakterienvakuole rekrutiert, jedoch unabhängig von einer Galektin-3-indizierten Verletzung oder Lyse der Phagosomenmembran. Offenbar ist nicht die Toxinwirkung (eventuelle Schädigung der Phagosomenmembran durch die Bildung von Transmembranporen), sondern das α -Toxin selbst der entscheidende Auslöser für die EGFP-LC3-Rekrutierung an die Bakterienvakuole.

α -Toxin-abhängige Rekrutierung von p62 - Selektive Autophagie

Autophagie kann intrazelluläre Pathogene und deren Replikation als zellautonomer Bestandteil der angeborenen Immunität im Zytosol bekämpfen. Die Autophagie von intrazellulären Bakterien ist selektiv und bedarf einer vorherigen Markierung oder Modifizierung, beispielsweise durch Polyubiquitinierung. Durch die Induktion der selektiven Autophagie können zytosolische Bakterien, in verschiedenen Phasen der Invasion bekämpft werden. Mehrere Signalwege können die antibakterielle, selektive Autophagie auslösen. Bakterielle PAMPs, Modifikationen der Bakterienvakuolen durch die Wirtszelle oder ubiquitinylierte, zytosolische Bakterien dienen als auslösende Signale. Ubiquitin-bedeckte Bakterien werden durch Autophagierezeptoren, u.a. dem Adapterprotein p62, erkannt. p62 ist ein ubiquitär exprimiertes, zytosolisches Protein, das derzeit als der Haupt-Autophagierezeptor für die selektive Autophagie gilt. p62 besitzt eine C-terminale UBA-Domäne, mit der p62 nicht-kovalent an K48- und K63-polyubiquitinierte Proteine binden kann. p62 kann große einschlossartige Aggregate (Sequestosomen oder p62-Bodies) bilden, die aus p62-Proteinen und K63-polyubiquitinierten Proteinen bestehen (Wooten et al, 2008). Es wird angenommen, dass die Entstehung dieser Aggregate durch Homooligomerisierung von p62 und der Bindung von Polyubiquitin-Ketten über die UBA-Domäne geschieht. p62 kann dann direkt über sein LIR-Motiv mit Atg8/LC3-MAP1-Proteinen interagieren. Mehrere funktionell verschiedene Protein-Protein-Interaktionsdomänen machen p62, neben seiner Funktion als Autophagierezeptor, zu einem Knotenpunkt für Signalwege, die Überleben und Zelltod einer Zelle regulieren (Moscat & Diaz-Meco, 2009). Unter anderem kann p62 mit Raptor interagieren und über den mTORC1-Komplex S6K1 und 4EBP1 aktivieren (Duran et al, 2011). Für *Shigella* konnte gezeigt werden, dass die Galektin-3-positiven Proteine an den Membranresten der Bakterienvakuolen polyubiquitiniert werden und p62 und LC3 rekrutiert wird (Dupont et al, 2009). Daher stellt sich die Frage, ob *Staphylococcus aureus* selbst oder Teile der Galektin-3-positiven Bakterienvakuolenreste durch selektive Autophagie erfasst werden können. Tatsächlich konnten Akkumulationen von DsRed1-p62 selektiv um die *Staphylococcus aureus*-Variante hla(+) in pDsRed-p62-transfizierten HaCaT detektiert werden. Während bei einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* hla(-) keine Rekrutierung von DsRed1-p62 an die Bakterien beobachtet werden konnte. Die Kotransfektion mit pEGFP-LC3 verstärkte die Rekrutierung von DsRed-p62. In MEF_{cav-/-}-Zellen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass auch die *Staphylococcus aureus*-Variante hla(mut) eine Rekrutierung von p62 induzieren kann. Das DsRed1-p62-Signal überlappte in beiden Zelllinien immer mit einem EGFP-LC3-Signal. Jedoch konnten auch Bakterienvakuolen, die ausschließlich mit EGFP-LC3-dekoriert waren, beobachtet werden. Eine Erklärung für die p62-unabhängige Rekrutierung von EGFP-LC3 an die Bakterien ist die Existenz weiterer Adapterproteine, wie z.B. NDP52 (nuclear dot protein 52 kDa), welches als

Autophagierezeptor bei der *Salmonella typhimurium*-Infektion fungiert und ebenfalls LC3 rekrutieren kann (Kraft et al, 2010).

Die strikte Abhängigkeit der Assoziation von *Staphylococcus aureus* mit p62 oder LC3 von der Fähigkeit α -Toxin zu produzieren, suggeriert die Beteiligung eines α -Toxin-assoziierten ubiquitinierten Bindungspartners. p62 kann LC3 über sein LIR-Motiv direkt binden. K63-polyubiquitinierte Proteine können über die UBA-Domäne gebunden werden.

Für die Polyubiquitin-vermittelte Rekrutierung von p62 an die Bakterienvakuolen durch die Bindung an Polyubiquitinketten über die UBA-Domäne, kommen mehrere Strukturen in Frage. Sowohl die Polyubiquitinierung der Bakterien selbst als auch der beschädigten Bakterienvakuole oder der Membranreste einer zerstörten Bakterienvakuole, wären denkbar (Fujita & Yoshimori, 2011). Eine direkte Polyubiquitinierung würde bedeuten, dass die Bakterien der *Staphylococcus aureus*-Variante hla(-) in einer intakten Bakterienvakuole verbleiben und nicht mit dem Zytosol in Kontakt kommen, denn p62 wird nicht an *Staphylococcus aureus* hla(-) rekrutiert. Möglicherweise zerstören *Staphylococcus aureus* hla(+) durch die Akkumulation von α -Toxin die Membran des Endosoms/Phagosoms vollständig (vgl. *Listeria monocytogenes* mit LLO), und der Ausbruch in das Zytoplasma induziert Autophagie. Aber auch eine Induktion durch eine Verletzung der Vakuolenmembran durch die Bildung von α -Toxin-Poren, könnte zu einer Fusion mit einem Autophagosom und der Entstehung eines Amphisoms führen (vgl. Schnaith et al.). Es wäre möglich, dass die Membranschädigung durch die Akkumulation des α -Toxins zur Exposition endosomaler Wirtsproteine im Zytoplasma führt, die daraufhin polyubiquitiniert werden. Auch wenn die Polyubiquitinierung von Galektin-3 wegen der selektiven Rekrutierung an die *Staphylococcus aureus*-Variante hla(+) unwahrscheinlich ist, so könnten andere Galektine als Signal dienen. Erst kürzlich wurde berichtet, dass Galektin-8 als Signal für die Rekrutierung des Autophagieadapterproteins NDP52 und der Induktion antibakterieller Autophagie dienen kann (Thurston et al, 2012b). Es könnte aber auch sein, dass α -Toxin-assoziierte Proteine oder α -Toxin selbst, das Substrat der Polyubiquitinierung sind und zur selektiven Rekrutierung von p62 und LC3 führen.

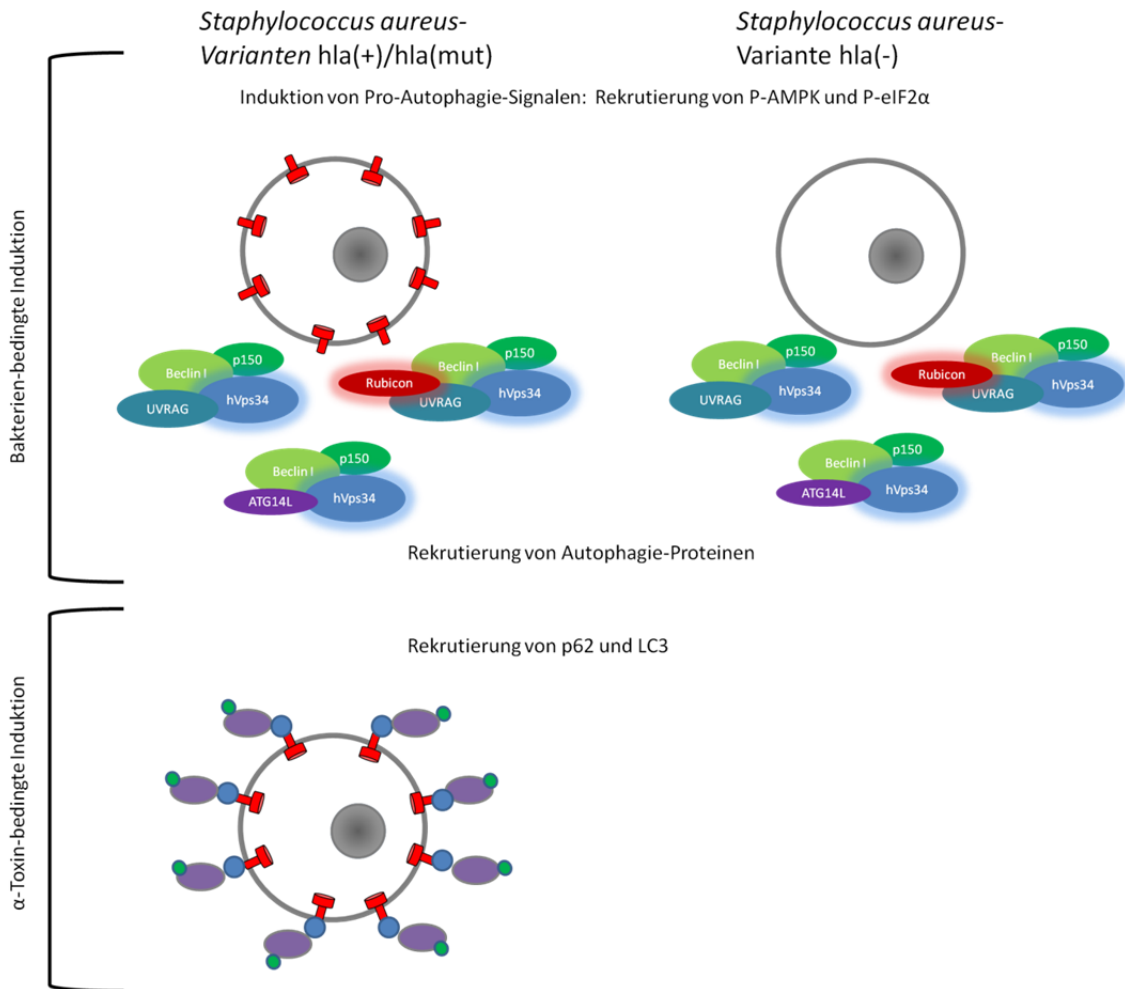


Abb. 4-2: Induktion von Pro-Autophagie-Signalen. Die Infektion mit den *Staphylococcus aureus*-Varianten hla(-), hla(+), oder hla(mut) induziert die Rekrutierung der Autophagie-Proteine Atg14L, UVRAG und Rubicon. An die bakterientragenden Kompartimente der *Staphylococcus aureus*-Varianten hla(+), hla(mut) wird unabhängig von der Rekrutierung von Galektin-3 zusätzlich p62 (violett) und LC3 (grün) rekrutiert. Für eine UBA-vermittelte Rekrutierung von p62 ist die Polyubiquitinierung des Abbausubstrats eine notwendige Voraussetzung (blau).

Phosphorylierung von AMPK

Es existieren einige Publikationen, die über die Autophagieinduktion durch diverse bakterielle Pathogene berichten. Dabei beschränkt sich die Literatur vorwiegend auf die sogenannte Xenophagie, der protektiven, selektiven Autophagie von intrazellulären Bakterien durch Autophagosomen. Hunger-induzierte Autophagie, die der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase dient, scheint keine Rolle zu spielen, obwohl eine Verknappung der zellulären Ressourcen durch die Replikation und massive Vervielfachung der Bakterien, außerhalb wie innerhalb der Zellen, durchaus zu einer metabolischen Stresssituation führen könnte. Parallel zu den Untersuchungen der α -Toxin-abhängigen Induktion von Pro-Autophagie-Signalen durch intrazelluläre *Staphylococcus aureus* wurde die Wirkung von exogenem, isoliertem α -Toxin in Hinblick auf die Induktion von Pro-Autophagie-Signalen untersucht. Im Rahmen der Publikation von Kloft *et al.* 2010 konnten wir die transiente Phosphorylierung von AMPK, eine wahrscheinliche Folge des drastischen, α -Toxin-induzierten ATP-Verlustes, darstellen. Die

AMPK (5'AMP-activated protein kinase) kann in Reaktion auf eine metabolische Stresssituation Autophagie induzieren. Bei einem sinkenden Verhältnis von ATP zu ADP wird AMPK durch die LKB1 (liver kinase B1) phosphoryliert. P-AMPK reduziert die Kinaseaktivität von mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) (Inoki et al, 2003). In Folge dessen wird der ULK1-Komplex aktiviert und induziert Autophagie. Neben der LKB1 kann die CaMKK β (Kalzium/calmodulin-dependent kinase kinase β) bei einer ansteigenden Kalziumkonzentration im Zytosol AMPK phosphorylieren (Hoyer-Hansen et al, 2007).

Geleitet von den Befunden, die mit isoliertem α -Toxin erarbeitet werden konnten, wurde überprüft, ob die Aktivierung von AMPK auch bei der Infektion von α -Toxin-produzierenden *Staphylococcus aureus* eine Rolle spielt. Dazu wurde die aktivierte Form des Energiesensors (P-AMPK) in HaCaT-Zellen, nach zweistündiger Inkubation mit *Staphylococcus aureus* hla(+) oder hla(-) immunologisch nachgewiesen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit extrazellulär appliziertem, aufgereinigtem α -Toxin konnte keine Akkumulation, Aktivierung oder Interaktion von P-AMPK mit den Staphylokokken nachgewiesen werden. Lediglich das, während der Mitose an den Zentriolen des Zentrosoms lokalisierte, P-AMPK konnte durch den Antikörper detektiert werden (Vazquez-Martin et al, 2009). Nach fünfständiger Infektion konnte P-AMPK um beide Staphylokokken-Stämme nachgewiesen werden. Möglicherweise führt erst die dramatische Vervielfachung der Staphylokokken zu einer nennenswerten, metabolischen Stresssituation in der Zelle. Sowohl eine Aktivierung von AMPK durch die LKB1 auf Grund von Energiemangel als auch eine Aktivierung durch CaMKK β , verursacht durch ausströmendes Kalzium aus dem ER, ist denkbar. Die Verarbeitung und korrekte Faltung neu synthetisierter Proteine im ER ist ATP-abhängig. Eine Energiekrise würde zur Akkumulation von ungefalteten Proteinen und damit zum Kalzium-Ausstrom ins Zytosol oder zur Aktivierung der UPR führen. Nicht das von den Bakterien produzierte α -Toxin scheint der ausschlaggebende Faktor für die späte Aktivierung von AMPK zu sein, sondern die massive Replikationsaktivität der Staphylokokken, während die Verletzung der Plasmamembran durch extrazellulär appliziertes α -Toxin zur Phosphorylierung von AMPK führt (Kloft et al, 2010).

Phosphorylierung von eIF2 α

Drei UPR-Sensoren übermitteln die Akkumulation oder Aggregation von ungefalteten oder missgefalteten Proteinen. Die PERK (RNA-dependent PKR-like ER-kinase) wird als Teil der UPR durch ER-Stress aktiviert und kann durch die verstärkte Phosphorylierung von eIF2 α einen Translationstopp bewirken. GCN2 ist eine weitere eIF2 α -Kinase, die eIF2 α phosphoryliert, wenn Aminosäuren für die Biosynthese nicht verfügbar sind. Die Phosphorylierung von eIF2 α an Serin 51 durch die konservierte eIF2 α -Proteinkinasen-Familie ist ein zentraler Mechanismus, der die globale Translationsinitiation hemmt und gleichzeitig die zytoprotektive Genexpression der ISR (integrated stress response) begünstigt. Die Phosphorylierung von eIF2 α ist aber auch eine essentielle Voraussetzung für die Autophagieinduktion während einer Hungerperiode oder einer viralen Infektion (Talloczy et al, 2002). Auch die α -Toxin-induzierte Phosphorylierung von eIF2 α an Serin 51 konnte von unserer Arbeitsgruppe im Rahmen der Publikation Kloft et al. 2010 mittels Western Blot-Analyse dargestellt werden. Deshalb wurde eine mögliche Phosphorylierung von eIF2 α in Folge einer bakteriellen Infektion durch *Staphylococcus aureus* überprüft. Zu Beginn der Infektion von HaCaT-Zellen mit den *Staphylococcus aureus*-Varianten hla(-) oder hla(+) konnte eine Interaktion von P-eIF2 α mit den Staphylokokken nicht detektiert werden. Erst nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden wurden vereinzelte, ringförmige P-eIF2 α -

Akkumulationen um die Bakterien beobachtet. Nach einer Inkubationszeit von insgesamt 3h konnten die ringförmigen Akkumulationen von P-eIF2 α regelmäßig und in großer Anzahl detektiert werden. Möglicherweise führt auch in diesem Fall, erst die Replikation und die Vervielfachung der Bakterienanzahl in der Zelle zur Aktivierung einer eIF2 α -Kinase und schließlich zur Rekrutierung von P-eIF2 α an die Bakterien-Vakuole. Die hohe Anzahl der Bakterien könnte, ähnlich wie bei der Aktivierung von AMPK, zu einer Verknappung der zellulären Ressourcen führen und über die Phosphorylierung von eIF2 α Autophagie induzieren.

Neben der generellen Kontrolle der Proteinsynthese induziert die Phosphorylierung von eIF2 α die Translation von ATF4 (activating transcription factor 4) und damit auch von ATF3 (activating transcription factor 3) und CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein). CHOP und ATF3 steigern die Expression von GADD34 (growth arrest and DNA-damage-inducible protein 34/PPP1R15A protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A), welche für die rückgekoppelte Regelung der eIF2 α -Phosphorylierung notwendig ist (Wek et al, 2006). Die Genexpression in Folge der eIF2 α -Phosphorylierung wurde durch die Transfektion des Reporter-Plasmids EGFP-CHOP in HaCaT-Zellen überprüft. Obwohl nach einer Inkubationszeit von insgesamt drei Stunden regelmäßig Akkumulationen von P-eIF2 α detektiert wurden, konnte bei einer Infektion mit den *Staphylococcus aureus*-Varianten hla(-) und hla(+) in pEGFP-CHOP-transfizierten Zellen nach drei Stunden keine starke P-eIF2 α -abhängige Expression anhand des Reporterplasmids detektiert werden. Die diffuse Färbung der transfizierten Zellen erschwert die Beurteilung der Bilder. Eine schwache Aktivierung ist deshalb nicht auszuschließen. Die Überexpression zweier verwandter Gene, PPP1R15A und PPP1R15B, die das bereits erwähnte Protein GADD34 und das Protein CReP (constitutive repressor of eIF2 α phosphorylation) kodieren, führt zur Dephosphorylierung von eIF2 α . Beide Proteine können die katalytische Untereinheit der Proteinphosphatase 1 (PP1) rekrutieren, um den Holophosphatase-Komplex zu bilden und P-eIF2 α zu dephosphorylieren. Im Gegensatz zu GADD34 wird CReP konstitutiv exprimiert und ist nicht vom Phosphorylierungsstatus von eIF2 α abhängig. Eine Aktivierung oder Rekrutierung von CReP an die intrazellulären Staphylokokken wurde durch die Transfektion mit pEGFP-CReP in HaCaT überprüft. Es konnte keine Aktivierung oder Kolo-kalisation mit den intrazellulären Bakterien detektiert werden. Im Gegensatz zu der diffusen Färbung der pEGFP-CHOP-transfizierten Zellen ist die EGFP-CReP-Färbung deutlich und klar abgegrenzt. Trotz der starken Akkumulation von phosphoryliertem eIF2 α um die intrazellulären *Staphylococcus aureus*-Varianten, gibt es weder eine eindeutig identifizierbare Aktivierung des CHOP-Promotors, der eine Expression von GADD34 folgen würde, noch wird EGFP-CReP an die Bakterien rekrutiert.

Während isoliertes, exogenes α -Toxin vermutlich durch die Verletzung der Plasmamembran und der daraus resultierenden Energiekrise die Aktivierung des Energie-Sensors AMPK oder die Kalium-abhängige Phosphorylierung von GCN2 und eIF2 α durch Aminosäurenmangel induziert, scheint die Induktion dieser Pro-Autophagie-Signale bei einem intrazellulären Angriff durch α -Toxin keine primäre Rolle zu spielen. Auch wenn sich die Orientierung der α -Toxin-Poren am bakterientragenden Kompartiment oder in der Endosomenmembran/Plasmamembran nicht unterscheidet, lässt sich ein wichtiger Unterschied feststellen. Die Verletzung der Plasmamembran führt zu osmotischem Stress und Kalium-Efflux, dem entscheidenden Auslöser für die Aktivierung des MAPK p38-Signalwegs und der Phosphorylierung von GCN2 durch α -Toxin. Dagegen ist bei der Porenbildung und Verletzung der Bakterienvakuole auf Grund der kleinen Volumina kein nennenswerter Kalium-Ausstrom/-Verlust zu erwarten. Erst eine lange Inkubationszeit und vermutlich die massive Vervielfältigung der intrazellulären *Staphylococcus aureus* führt schließlich zu einer späten α -Toxin-unabhängigen Phosphorylierung von AMPK

oder eIF2 α . Im Kontrast dazu stehen die kürzlich für *Salmonella* und *Shigella* publizierten Daten von Tattoli et al. 2012. Die Arbeitsgruppe folgte unserem Konzept der Induktion eines Aminosäurenmangels durch die Verletzung der Plasmamembran und propagiert diesen Aminosäurenmangel als das auslösende Ereignis für die Aktivierung antimikrobieller Autophagie, über die Inhibierung des mTORC1 und/oder der Phosphorylierung von eIF2 α . *Shigella* und *Salmonella* besitzen beide ein SER- bzw. SPI-1-codiertes TTSS (type three secretion system), mit dem sie die Plasmamembran der Wirtszelle durchdringen können (ähnlich den PFTs) um Effektor-Proteine zu injizieren (Paetzold et al, 2007). Die resultierenden Verletzungen der Wirtsmembranen wurden von Tattoli et al. 2012 an der Rekrutierung des Autophagieadapterproteins NDP52, welches über die Bindung an Galektin-8 vermutlich an verletzte Wirtsmembranen rekrutiert wird, festgemacht (Tattoli et al, 2012; Thurston et al, 2012a). Aber auch eine Rekrutierung von NDP52 über Ubiquitin ist nicht auszuschließen. In der vorliegenden Arbeit konnte nur eine späte Rekrutierung von P-AMPK oder P-eIF2 α die intrazellulären *Staphylococcus aureus*-Varianten unabhängig von einer Galektin-3-indizierten Membranverletzung (Galektin-3 wurde nur an *Staphylococcus aureus* hla(+)) rekrutiert) an die Bakterien-Vakuole detektiert werden. Die Phosphorylierung der Stresskinase GCN2 und ihres Substrats eIF2 α in Folge des Aminosäurenmangels durch die Permeabilisierung der Plasmamembran nach Inkubation mit extrazellulär appliziertem α -Toxin erwies sich, wie oben bereits erwähnt, abhängig vom Kalium-Efflux, der bei einer Verletzung eines Bakterienphagosoms nur in minimalen Ausmaßen zu erwarten ist. Für die untersuchten intrazellulären *Staphylococcus aureus*-Varianten konnten, jedenfalls keine Hinweise für eine Autophagieinduktion gefunden werden, die ausgelöst durch die Verletzung einer Wirtsmembran, über die Inhibierung von mTORC1 und/oder der Phosphorylierung von eIF2 α abläuft.

4.1.4 Analyse der Lokalisation des sekretierten α -Toxins im Kontext mit intrazellulären *Staphylococcus aureus*

Ein wichtiger Aspekt bei der Autophagieinduktion durch eine Bakterieninfektion ist die Produktion von α -Toxin durch internalisierte *Staphylococcus aureus*. Postinvasive Ereignisse, wie ein möglicher Ausbruch in das Zytosol, die Induktion der selektiven Autophagie oder der Autophagie-induzierte Zelltod scheinen in hohem Maße von der Sekretion des PFT α -Toxin durch die Bakterien abzuhängen. Allein die Fähigkeit zur α -Toxin-Produktion korreliert nicht zwangsläufig mit der Zytotoxizität (Garzoni & Kelley, 2009), denn *Staphylococcus aureus* können ihre Genexpression nach der Aufnahme in die Zelle modulieren (Garzoni et al, 2007). Um zu überprüfen, ob die intrazellulären Staphylokokken tatsächlich α -Toxin produzieren, wurde ein immunologischer Nachweis von α -Toxin in infizierten Zellen durchgeführt. Die Analyse der intrazellulären Lokalisation von *Staphylococcus aureus* und dem α -Toxin in Gegenwart seines Produzenten stellte eine Herausforderung dar, denn durch die Expression des Oberflächenmoleküls Protein A wurde der Nachweis von α -Toxin sehr erschwert. Protein A wird durch *SpA* kodiert und ist ein konserviertes Oberflächenmolekül auf allen *Staphylococcus aureus*-Stämmen. Es kann mit verschiedenen Effektoren des Immunsystems interagieren, indem es TNFR1 (TNF receptor1), EGFR (epidermal growth factor receptor), den von Willebrand Faktor und den F_c-Anteil von Immunglobulinen bindet (Soong et al, 2011). Die unspezifische Bindung des F_c-Anteils durch Protein A macht einen spezifischen immunologischen Nachweis in Anwesenheit der Bakterien mit einer Vielzahl von Antikörpern unmöglich. *SpA* wird durch den *agr* (accessory gene regulator) negativ-reguliert. Das führt in *agr*-defizienten Staphylokokken-Stämmen zusätzlich dazu, dass besonders große Mengen Protein A produziert werden (Novick et al, 1993). Ob Protein A an Antikörpern binden kann, hängt sowohl von der Immunglobinklasse als auch der Spezies ab, in der die Antikörper produziert wurden. Da Protein A ein wichtiger Faktor für die bakterielle Infektion von *Staphylococcus aureus* ist, wurde auf die Verwendung *SpA*-defizienter Staphylokokken-Stämme bewusst verzichtet. Die Darstellung des α -Toxins im Kontext mit seinem Produzenten gelang erst durch die aufwendige Herstellung von F(ab)₂-Fragmenten, mit denen das α -Toxin ohne die unspezifische Bindung an Protein A in infizierten HaCaT-Zellen nachgewiesen werden konnte. Als Kontrolle diente die *Staphylococcus aureus*-Variante hla(-), die kein α -Toxin produziert. In unmittelbarer Nähe zu den *Staphylococcus aureus* hla(+) konnte α -Toxin mit den F(ab)₂-Fragmenten mittels Immunfluoreszenz dargestellt werden, während um *Staphylococcus aureus* hla(-) erwartungsgemäß kein α -Toxin detektiert werden konnte. Für die ultrastrukturelle Analyse der Lokalisation des α -Toxins in Bezug zu den Staphylokokken und dem bakterientragenden Kompartiment, wurden HaCaT-Zellen mit den *Staphylococcus aureus*-Varianten hla(-) oder hla(+) infiziert. Nachdem sich das α -Toxin mittels Immunfluoreszenz an den Kryoschnittbändern erfolgreich nachweisen ließ, wurden Kryoschnitte für den Immunogoldnachweis angefertigt. Die Kryoschnitte wurden mit den F(ab)₂-Fragmenten gegen α -Toxin inkubiert und in einem zweiten Schritt mit den Gold-konjugierten F(ab)₂-Fragmenten inkubiert. Auf diese Weise konnte α -Toxin erstmals in unmittelbarer Nähe zu den Staphylokokken im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden. Die Bakterien befanden sich nach einer Inkubationszeit von insgesamt vier Stunden zusammen mit kleinen Membranhüllten Vesikeln in einem großen, klar vom Zytosol abgetrennten und mit einer zweifachen Doppellipidschicht-umgebenen Kompartiment. Die zweifache Doppelmembran des bakterientragenden Kompartiments erfüllt das Kriterium für die Morphologie eines Autophagosoms oder Amphisoms. Das von *Staphylococcus aureus* hla(+) sekretierte α -Toxin war

entweder in Assoziation mit kleineren, Membran-umhüllten, intraluminalen Vesikeln lokalisiert oder befand sich an oder in der Nähe von der zweifachen Doppellipidschicht, die das bakterientragende Kompartiment von Zytosol der Zelle abgrenzte. Nur wenige Goldkugeln befanden sich direkt an den Bakterien. Einige Goldkugeln konnten außerhalb des Kompartiments detektiert werden. Dieser Befund belegt, dass sich *Staphylococcus aureus* hla(+) zumindest transient in Autophagosom-ähnlichen Kompartimenten der Zelle aufhalten und tatsächlich α -Toxin produzieren. Er belegt auch, dass das sekretierte α -Toxin hauptsächlich mit der Doppellipidschicht des bakterientragenden Kompartiments assoziiert ist.

Amphisomen entstehen u.a. durch die Fusion eines Autophagosoms mit MVBs (multivesicular bodies) (Fader & Colombo, 2009). Die intraluminalen Membran-umgebenen Vesikel, die in Assoziation mit α -Toxin beobachtet werden konnten, ähneln den intraluminalen Vesikeln eines MVBs und deuten auf die Entstehung eines Hybridorganells aus MVB und Autophagosom hin.

4.1.5 Modell für die intrazelluläre Lebensweise der untersuchten *Staphylococcus aureus*-Varianten

Gegensätzliche und widersprüchliche Befunde wurden über die intrazelluläre Lebensweise des *Staphylococcus aureus* in den vergangenen Jahren publiziert. Jedoch können diese Publikationen nur begrenzt miteinander verglichen werden, da unterschiedliche Zellsysteme und verschiedene *Staphylococcus aureus*-Stämme verwendet wurden. Möglicherweise entstand die Gegensätzlichkeit der Ergebnisse zusätzlich auf Grund von Unterschieden bei der Zellkultur und den Infektionsbedingungen. In der vorliegenden Arbeit konnten für die *Staphylococcus aureus*-Variante hla(-) und die α -Toxin produzierenden Varianten hla(+) und hla(mut) Daten in einem einheitlichen Zellsystem erarbeitet werden. Zusätzlich wurden Ergebnisse in weiteren Zelllinien auf ihre allgemeine Bedeutung überprüft.

Kurz zusammen gefasst: *Staphylococcus aureus* hla(+) und hla(-) werden von HaCaT-, ODORA- und MEF_{cav-/-}-Zellen aufgenommen. Die *Staphylococcus aureus*-Varianten konnten, unabhängig von der α -Toxin-Produktion, unter einheitlichen Infektionsbedingungen in morphologisch unterschiedlichen Kompartimenten detektiert werden. Das von *Staphylococcus aureus* hla(+) sekretierte α -Toxin konnte in und nahe an der zweifachen Doppellipidschicht, mit der das bakterientragende Kompartiment umgeben war, sowie in Assoziation mit kleineren intraluminalen Vesikeln detektiert werden. Unabhängig von der α -Toxin-Produktion wurde der Energiesensor AMPK phosphoryliert. Ebenfalls unabhängig von der α -Toxin-Produktion geschah die Phosphorylierung von eIF2 α . Die Rekrutierung der Klasse III PtdIn3K-Komplexe mit ATG14L, UVRAG oder UVRAG-Rubicon erfolgte auch unabhängig von der Fähigkeit zur α -Toxin-Produktion. Die Rekrutierung von LC3 und dem Adapterprotein p62 erfolgte exklusiv an die α -Toxin-Produzenten. Erstaunlicherweise konnte durch die zusätzliche Inkubation mit extrazellulär appliziertem α -Toxin eine Rekrutierung von LC3 an die *Staphylococcus aureus*-Variante hla(-) ausgelöst werden. Starke Akkumulationen des Lysemarkers Galektin-3 erfolgte in Abhängigkeit von der Produktion von wt- α -Toxin, aber korrelierte nicht zwangsläufig mit der Rekrutierung von LC3 und p62.

Vor diesem Hintergrund lässt sich ein Modell für die intrazelluläre Lebensweise der untersuchten *Staphylococcus aureus*-Varianten ableiten: Grundsätzlich besitzen alle hier untersuchten *Staphylococcus aureus*-Varianten die Fähigkeit zur Induktion von Pro-Autophagie-Signalen und der Rekrutierung von Autophagie-assoziierten-Proteinen, obwohl die Phosphorylierung von AMPK und eIF2 α vermutlich durch die massive Replikation und die Verknappung der zellulären Ressourcen erst sehr spät ausgelöst wird. Die α -Toxin-unabhängige Rekrutierung von EGFP-Atg14L, EGFP-hUVRAG und EGFP-Rubicon und die Lokalisation in verschiedenen Autophagosom-ähnlichen Vakuolen, unterstützen diese These.

Hingegen erfolgte die Rekrutierung von p62, die ein Indiz für selektive Autophagie sein könnte, ausschließlich an die Produzenten von α -Toxin. Als Signal für die Rekrutierung von p62 kommt zum einen die Ubiquitinierung von intraluminalen Proteinen des Endosoms/Phagosoms, die durch die Toxin-abhängige Zerstörung oder Verletzung der endosomalen/phagosomalen Membran exponiert werden, oder aber die Ubiquitinierung von α -Toxin oder α -Toxin-assoziierten Proteinen in Frage. Durch die Ubiquitinierung einer dieser Strukturen könnte p62 über seine UBA-Domäne binden, LC3 rekrutieren. Möglicherweise können die Staphylokokken die entstehenden Autophagosomen als Replikationsnische nutzen.

4.2 *Staphylococcus aureus* α -Toxin

4.2.1 Ultrastrukturelle Analyse der Zellstruktur nach extrazellulärem α -Toxin-Angriff

Bei Infektionsversuchen mit den *Staphylococcus aureus*-Varianten hla(-) und hla(+) konnte die Rekrutierung mehrerer Autophagie-assoziiierter Proteine unabhängig von der α -Toxin-Produktion an alle untersuchten *Staphylococcus aureus*-Varianten detektiert werden. Die Infektion mit den α -Toxin-produzierenden *Staphylococcus aureus*-Varianten hatte jedoch auch die exklusive Rekrutierung von p62 oder LC3 zur Folge.

Die Inkubation mit isoliertem α -Toxin führt bei Erythrozyten zur kolloidosmotischen Lyse. Zellen, die einen Zellkern besitzen, reagieren mit Nekrose oder Apoptose. Viele kernhaltige Zellen können aber eine begrenzte Anzahl von Läsionen durch Internalisierung der α -Toxin-Poren reparieren und den dramatischen ATP-Verlust ausgleichen. Die Aufnahme der α -Toxin-Poren ist eine essentielle Voraussetzung für das Überleben der Zellen (Husmann et al, 2009). Um zu überprüfen, ob aufgereinigtes α -Toxin ohne die Anwesenheit seines Produzenten ähnliche Reaktionen wie bei einer Infektion auslösen kann, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Ultrastruktur von HaCaT-, Huh7- und ODORA-Zellen nach Inkubation mit α -Toxin analysiert. Die mit α -Toxin behandelten Zellen wiesen eine Vielzahl von heterogenen Vesikeln und MVBs (multi vesicular bodies) auf. Huh7-Zellen reagierten besonders sensibel auf das α -Toxin. Bereits nach 1,5 Stunden Inkubation wiesen die Zellen weitaus mehr Vesikel auf als Zellen der HaCaT- oder ODORA-Zelllinie. Die Zellen der ODORA-Zelllinie zeigten sich vergleichsweise unempfindlich und reagierten nur mit einer leicht vermehrten Vesikelbildung. Die hohe Sensibilität der Huh7-Zellen gegenüber dem α -Toxin lässt sich durch die Unfähigkeit die α -Toxin-Poren aufzunehmen, erklären. Im Gegensatz zu HaCaT-Zellen können Huh7-Zellen die α -Toxin-Poren nicht durch Endozytose von ihrer Plasmamembran entfernen und sich folglich auch nicht von dem ATP-Verlust erholen (Husmann et al, 2009). Die Inkubation mit dem Porenbildenden Toxin VCC (*Vibrio cholerae* cytolysin) kann eine sehr starke Vesikelbildung in verschiedenen Zelllinien und die protektive Induktion von Autophagie auslösen. VCC konnte keine Vesikulierung in Atg5-defizienten Zellen auslösen (Gutierrez et al, 2007). Vor diesem Hintergrund ist es möglich, dass es sich bei den Vesikeln, die sich auf Grund des α -Toxins in den untersuchten Zelllinien gebildet haben, ebenfalls um Autophagosomen handelt. Autophagie wird unter verschiedenen zellulären Stressbedingungen aktiviert und könnte in diesem Fall durch das Recycling von Nährstoffen dazu beitragen, dass die zelluläre Homöostase wiederhergestellt werden kann und die Zelle den Angriff überlebt.

4.2.2 Induktion von Pro-Autophagie-Signalen durch Inkubation mit α -Toxin

Gutierrez et al. 2007 publizierten, dass Autophagie wichtig für die zelluläre Abwehr gegen VCC sein könnte. Der Hauptregulator der Autophagie ist der mTORC1. mTORC1 ist aktiviert, wenn Wachstumsfaktoren, ATP und Nährstoffe vorhanden sind. Hunger, Energieverlust und einige andere Faktoren führen zur Inhibierung von mTORC1 und zur Autophagieinduktion. Hungerassozierte Autophagie kann durch zwei Signalwege induziert werden. Der erste Signaltransduktionsweg wird über AMPK aktiviert. AMPK fungiert als wichtiger Sensor für den zellulären Energiestatus. AMPK wird als Reaktion auf ein verschlechtertes ATP/AMP-Verhältnis phosphoryliert. Phospho-AMPK kann dann via TSC und Rheb die Kinaseaktivität von mTORC1 hemmen und gleichzeitig ULK1 phosphorylieren und damit Autophagie induzieren (Kim et al, 2011). Die Inhibierung der mTORC1 Kinaseaktivität hat zusätzlich die Dephosphorylierung der p70S6K oder S6K (ribosomal protein S6 Kinase) und des 4E-BP (eIF2 α 4E-binding protein) zur Folge und unterstützt eine reduzierte Translationsaktivität und verstärkt die Autophagieinduktion (Zinzalla & Hall, 2008).

Die Aktivierung des AMPK-Signalwegs korreliert zeitlich mit dem Verlauf des α -Toxin-induzierten ATP-Verlusts und der Dephosphorylierung der p70S6K. Hinweise auf die Aktivierung eines zweiten hungerassozierten Signalweges lieferten die Ergebnisse einer vorangegangenen Dissertation aus unserer Arbeitsgruppe, die die Phosphorylierung von GCN2 und eIF2 α in Reaktion auf die Inkubation mit α -Toxin zeigen konnte. Die Phosphorylierung von eIF2 α an Serin 51 durch die konservierte eIF2 α -Kinase GCN2 (general control, non-derepressible 2/eIF2 α -kinase 4/eIF2AK4) ist eine konservierte zelluläre Stressantwort, die sowohl die Reduzierung der globalen Translation als auch die Überexpression von Genen, die für die ISR wichtig sind, zur Folge hat (Harding et al, 2000; Wek et al, 2006). Autophagieinduktion durch Hunger oder einer viralen Infektion ist von der Aktivierung der eIF2 α -Kinasen GCN2 und PKR abhängig (Talloczy et al, 2002).

α -Toxin induziert die Rekrutierung von Phospho-eIF2 α an die Plasmamembran

In der vorliegenden Arbeit konnte die Rekrutierung von P-eIF2 α nach Inkubation mit AlexaFluor®546-markiertem α -Toxin an die Plasmamembran der Zellen beobachtet werden, während in unbehandelten HaCaT-Zellen ein P-eIF2 α -Signal im Kernareal lokalisiert werden konnte. Bereits nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten verschwand das P-eIF2 α -Signal aus der Kernregion und konnte im Zytoplasma detektiert werden. Nach 40 Minuten kolokalisierten Akkumulationen von P-eIF2 α mit dem AlexaFluor®546-markiertem- α -Toxin in HaCaT-Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 80 Minuten konnten Kolokalisationen von P-eIF2 α und α -Toxin nicht mehr beobachtet werden. Die Aktivierung und Verschiebung von P-eIF2 α aus dem Zellkern in periphere Bereiche und die transiente Kolokalisation des Toxins mit P-eIF2 α führte zu dem Schluss, dass P-eIF2 α an den Angriffsort des α -Toxins rekrutiert wird und/oder dort gebildet werden könnte.

HaCaT-Zellen können α -Toxin-Poren durch Endozytose aufnehmen und so die Verletzungen an der Plasmamembran schließen (Husmann et al, 2009). Ein etablierter Marker für die Membran eines frühen Endosoms ist die kleine GTPase Rab5, die entweder auf frühen Endosomen oder auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran lokalisiert ist. Um zu überprüfen, ob P-eIF2 α mit den

Rab5-positiven α -Toxin-Endosomen interagiert, wurden pEGFP-Rab5-Q79L transfizierte HaCaT-Zellen mit Alexa-Fluor®546-markiertem α -Toxin inkubiert. Die Transfektion mit diesem Plasmid führt zu großen, aufgeblähten Endosomen, die sich leichter mikroskopisch analysieren lassen (Stenmark et al, 1994). Nach einer Inkubationszeit von 40 Minuten befand sich das markierte α -Toxin in Rab5 und P-eIF2 α -positiven Endosomen. Dieser Befund unterstützt die Annahme, dass P-eIF2 α bereits zu Beginn der endozytotischen Aufnahme der α -Toxin-Poren rekrutiert wird und möglicherweise in diesem Mechanismus involviert ist.

Um die α -Toxin-induzierte Verschiebung des P-eIF2 α -Signals aus dem Kern in die Peripherie der Zelle besser analysieren zu können, wurden konfokale Mikrographien von unbehandelten und α -Toxin-behandelten HaCaT-Zellen angefertigt. Tatsächlich bestätigte die Analyse der Histogramme aus den Line-Scan-Messungen durch den Querschnitt der Zellen, dass P-eIF2 α direkt an die Plasmamembran rekrutiert wird oder eIF2 α dort vermehrt phosphoryliert wird. Die Verschiebung des p-eIF2 α -Signals vom Zellkern an die Plasmamembran könnte durch den aktiven Transport von phosphoryliertem eIF2 α durch die Kernporen in das Zytoplasma entstehen. Aber auch eine Dephosphorylierung im Kern und eine massive Phosphorylierung von eIF2 α an der Plasmamembran durch eine aktivierte eIF2 α -Kinase wären denkbar. Deshalb wurden Versuche mit spezifischen Inhibitoren durchgeführt. Für den Proteinexport aus dem Zellkern in das Zytosol ist hauptsächlich das CRM1 (chromosomal maintenance/exportin 1) verantwortlich. Es vermittelt den Export von Cargoproteinen über den NPC (nuclear pore complex) und kann durch Leptomycin B selektiv inhibiert werden. Die Inhibierung von CRM1 durch Leptomycin B bewirkte allerdings keine Auswirkung auf die Verschiebung des P-eIF2 α -Signals. Der mögliche Transport von P-eIF2 α im Zytosol könnte, ähnlich wie bei Mikrotubuli assoziierten Proteinen, entlang der Mikrotubuli oder aber entlang der Aktinfilamente durch Motorproteine stattfinden. Aber weder die Inkubation mit dem Inhibitor Nocodazol, der die Polymerisation der Mikrotubuli stört, noch die Inkubation mit Cytochalasin B, das den dynamischen Aufbau der Aktinfilamente hemmt, konnte die α -Toxin-induzierte Verschiebung des P-eIF2 α -Signals an die Plasmamembran beeinträchtigen.

Die Aktivierung von P-eIF2 α äußerte sich aber nicht nur in der Verschiebung des P-eIF2 α -Signals, sondern auch in der Zunahme der Signalintensität. Das ergab die Analyse von Intensitätsmessungen des gesamten P-eIF2 α -Signals einer Zelle, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit, an konfokalen Bildern von behandelten und unbehandelten HaCaT-Zellen, durchgeführt wurden. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten mit α -Toxin war die Intensität des P-eIF2 α -Signals im Vergleich zu den unbehandelten Zellen signifikant erhöht ($p = 0,0014$). Zusätzlich zu einem möglichen Transport von P-eIF2 α aus der Kernregion an die Plasmamembran müssen eine oder mehrere eIF2 α -Kinasen durch den α -Toxin-Angriff aktiviert werden, die für die massive Phosphorylierung von eIF2 α verantwortlich sind. In Säugetieren gibt es mindestens vier eIF2 α -Kinasen, die auf Grund von unterschiedlichen Stressfaktoren aktiviert werden können. GCN2 ist die einzige bekannte, von der Hefe bis zum Menschen konservierte, Hunger-assoziierte eIF2 α -Kinase, die durch die Phosphorylierung von eIF2 α einen Translationsstopp und Hunger-induzierte Autophagie auslösen kann (Talloczy et al, 2002).

Die α -Toxin-Läsionen an der Plasmamembran führen zu einer Energiekrise in der Zelle und die die Reparatur der Plasmamembran durch die Aufnahme der α -Toxin-Poren ist essentiell für das Überleben der Zelle. Zellen der Huh7-Zelllinie sind nicht in der Lage, α -Toxin-Poren von der Plasmamembran zu entfernen (Husmann et al, 2009). Der immunologische Nachweis von P-eIF2 α in Huh7-Zellen nach Inkubation mit Alexa-Fluor®546-markiertem α -Toxin zeigte, dass P-eIF2 α auch in Huh7-Zellen an die α -Toxin-Läsionen rekrutiert wird. Da das α -Toxin jedoch nicht

aufgenommen werden kann, kommt es in Huh7-Zellen nach der Inkubationszeit von 40 Minuten nicht zur Kolokalisation und Interaktion mit dem α -Toxin. Die Verteilung und die Intensität der P-eIF2 α -Signale bleiben nach der Verschiebung in die Peripherie der Zellen auch nach 40 und 80 Minuten unverändert. Möglicherweise führt die andauernde Belastung durch die α -Toxin-Läsionen zu einer verlängerten Aktivierung von P-eIF2 α . Autophagie kann durch den Verdau von Zytoplasma und das Recycling von Nährstoffen entscheidend dazu beitragen, dass Zellen eine Hungerperiode überdauern können. Jedoch führt die anhaltende Phosphorylierung von eIF2 α vermutlich auf Grund übermäßiger Autophagie und dauerhaftem Translationsstopp in Folge des fortwährenden Energieverlustes und des Nährstoffmangels schließlich zum Zelltod. Anhaltende Repression der Translation durch P-eIF2 α wurde auch in Zusammenhang mit dem fortschreitenden Krankheitsbild bei Prionenerkrankungen gebracht (Moreno et al, 2012). Die massive Phosphorylierung von eIF2 α bei HaCaT und Huh7-Zellen erfolgte lokal und direkt an der Plasmamembran. Bei den Infektionsversuchen wurde P-eIF2 α ebenfalls lokal und direkt an den Bakterien detektiert. Die schnelle und gleichzeitige Induktion proautophagischer Signale und Adaptierung der Translation durch die Phosphorylierung von eIF2 α geschieht offensichtlich bereits am Ausgangspunkt für die zelluläre Stresssituation.

α -Toxin induzierte Rekrutierung von LC3 und p62

Die Inkubation mit α -Toxin führt in den Zielzellen zur Aktivierung der Hunger-assoziierten Signalwege, die Autophagie auslösen können. Die Stresskinase GCN2, die bei mangelnder Verfügbarkeit von Aminosäuren (Akkumulation von unbeladenen tRNAs) durch die Phosphorylierung von eIF2 α Autophagie induzieren kann, kann auch durch die Inhibierung des mTORC1 (durch Rapamycin) aktiviert werden (Cherkasova & Hinnebusch, 2003). Kürzlich wurde p62 mit der m-TORC1-Regulation in Abhängigkeit der Aminosäurenverfügbarkeit in Zusammenhang gebracht (Moscat & Diaz-Meco, 2011). Die Regulatoren der mTORC1-Aktivierung durch Aminosäuren sind die Rag-GTPasen. In Anwesenheit von Nährstoffen und Aminosäuren interagieren Rag-Heterodimere (beinhalten GTP-gebundenes RagA/B) mit der Raptoruntereinheit von mTORC1 und vermitteln den Transport von mTORC1 an das Lysosom, an dem der mTORC1-Aktivatoren Rheb (Ras homolog enriched in brain) lokalisiert ist (Sancak et al, 2010; Sancak et al, 2008). p62 (SQSTM1) ist durch die Bindung an Raptor Teil des mTORC1 und essentiell für die Aktivierung von mTORC1, die auf Grund der Anwesenheit von Aminosäuren geschieht. p62 kann sowohl an den Rag-Proteinen als auch an Raptor binden und fördert die Entstehung der aktiven Rag-Heterodimere, die wiederum von Raptor stabilisiert werden (Duran et al, 2011). Der aktive mTORC1 hemmt die Autophagie sowohl über den ULK-Komplex als auch über die Phosphorylierung von TAP42 (Two A-associated protein 42 kDa), das wiederum die autophagie-inhibitorisch wirkende, katalytische Untereinheit von PP2A (serine/threonine protein phosphatase 2A) aktiviert (Yorimitsu et al, 2009). Das Protein p62 wird konstitutiv durch Autophagie abgebaut. Eine Inhibierung der Autophagie durch die mTORC1-Aktivierung über p62 führt zu einer erhöhten p62-Konzentration und der Entstehung von p62-Aggregaten und damit zu einer weiteren Verstärkung der mTORC1-Aktivierung (feed forward loop). Andersherum wird durch verstärkte Autophagie p62 vermehrt abgebaut, die p62-Konzentration sinkt und der mTORC1 kann nicht länger aktiviert werden (Moscat & Diaz-Meco, 2011). Die Inkubation mit AlexaFluor®546-markiertem α -Toxin führte in HaCaT-Zellen zur Entstehung von lokalen p62-Akkumulationen, die mittels Immunfluoreszenz detektiert wurden. Eine mögliche Aktivierung des mTORC1 durch lokale Akkumulationen von p62 und die damit verbundene Hemmung der Autophagie ist jedoch nicht zu erwarten und würde der α -Toxin-

abhängigen P-eIF2 α -vermittelten Autophagieinduktion widersprechen. Viele der großen p62-Akkumulationen kolokalisierten mit den kleineren AlexaFluor®546-markierten α -Toxin-Akkumulationen nahe dem Zellkern. Ähnlich der α -Toxin-induzierten Rekrutierung von p62 an die α -Toxin-produzierenden *Staphylococcus aureus*-Varianten hla(+) und hla(mut) könnte die Funktion von p62, als Autophagieadapterprotein, der Schlüssel zu diesem Phänomen sein. Wie zuvor bereits erwähnt, besitzt das Adapterprotein p62 neben einer Reihe von Protein-Protein-Interaktionsdomänen eine UBA-Domäne, über die es polyubiquitinierte Proteine direkt binden kann. Des Weiteren besitzt p62 ein LIR-Motiv, mit dem es LC3 ebenfalls direkt binden und rekrutieren kann. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden konnten Kolokalisationen von LC3 und AlexaFluor®546-markiertem α -Toxin in pEGFP-LC3-transfizierten HaCaT-Zellen in der Nähe des Zellkerns detektiert werden. Die Rekrutierung von LC3 an die α -Toxin-Akkumulationen unterstützt die Vermutung, dass p62 in der Funktion als Autophagieadapterprotein an das α -Toxin rekrutiert werden könnte.

Substrat der Ubiquitinierung

Die Bindung von p62 an die α -Toxin-Akkumulationen über seine UBA-Domäne setzt vermutlich die Ubiquitinierung des α -Toxins oder eines α -Toxin-assoziierten Proteins voraus. Um zu überprüfen, ob α -Toxin oder ein assoziiertes Protein ubiquitiniert wird, wurden HaCaT-Zellen mit radioaktivem [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin inkubiert und anschließend eine Immunopräzipitation mit einem Antikörper gegen Multiubiquitin durchgeführt. Mittels Autoradiographie konnten (co)präzipitierte [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin-Oligomere und Monomere detektiert werden. Die (Co)präzipitation von [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin setzt eine hochaffine Wechselwirkung von Multiubiquitin direkt mit dem Toxin oder einem α -Toxin-assoziierten Protein voraus. Mit Antikörpern gegen die Proteine LC3, p62 und Ubiquitin konnte [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin dagegen nicht präzipitiert werden.

Daher stellt sich die Frage, ob Teile der α -Toxin-Poren ubiquitiniert werden können. Die α -Toxin-Poren in der Plasmamembran entstehen durch die Oligomerisierung von vermutlich sieben α -Toxin-Monomeren, die zunächst eine ringförmige, wasserlösliche Präpore bilden. Eine zweite Konformationsänderung führt schließlich zur Membran-Penetration durch einen sehr kleinen Teil jedes Protomers und der Entstehung der wassergefüllten Transmembranpore. Die α -Toxin-Pore ist den verfügbaren Strukturdaten zur Folge von zytosolischer Seite kaum zugänglich und bietet kaum einen Ansatzpunkt für eine mögliche Ubiquitinierung (Song et al, 1996). Die Ubiquitinierung über ein zytosolisches, α -Toxin-assoziiertes Protein wäre deshalb eine mögliche Alternative. Ein möglicher Kandidat für die Ubiquitinierung könnte das zytosolische Protein Caveolin-1 sein: α -Toxin besitzt nach Pany et al. 2004 ein neun-Aminosäuren-langes Caveolin-1 Erkennungsmotiv, mit dem es Caveolin-1 binden kann (Pany et al, 2004). Eine Beteiligung von Caveolin-1 bei der Oligomerisierung der α -Toxin-Monomere nach der lokalen Konzentrierung in Cholesterol/Sphingolipid/Caveolin-1-reichen Mikrodomänen (Lipid-Rafts) wurde postuliert (Vijayvargia et al, 2004b). Auch die Tatsache, dass für den Abbau von Caveolin-1 die Ubiquitinierung eine notwendige Voraussetzung ist, unterstützt die Hypothese, dass α -Toxin-gebundenes Caveolin-1 Substrat der Ubiquitinierung sein könnte und möglicherweise zur Copräzipitation von [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin durch den Multiubiquitin-Antikörper führt (Hayer et al, 2010). In der vorliegenden Arbeit konnten [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin-Monomere und Oligomere und Caveolin-1 in den gleichen Fraktionen einer Lipid-Raft-Präparation detektiert werden. Zusätzlich zu den erwarteten Caveolin-1-Banden mit der

Molekülmasse von 24kDa konnten in den gleichen Fraktionen im Western Blot Caveolin-1-Banden mit exakt der gleichen Molekülmasse der [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin-Oligomere (ca.250kDa) nachgewiesen werden. Dieser Befund ist ein starker Hinweis dafür, dass Caveolin-1 im Komplex mit der α -Toxin-Pore in den Lipid-Rafts vorliegen kann und prädestinierte Caveolin-1 als α -Toxin-assoziiertes zytosolisches Substrat für eine Polyubiquitinierung.

Die Beteiligung von Caveolin-1 an der Copräzipitation von [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin wurde überprüft, indem MEF_{wt}- und Caveolin-1 defiziente MEF-Zellen (MEF_{cav-/-}) mit [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin inkubiert wurden. Während [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin in Zellen der MEF_{wt}-Zelllinie wiederum ausschließlich mit dem Multiubiquitin-Antikörper copräzipitiert werden konnte, zeigte sich in MEF_{cav-/-}-Zellen ein anderes Bild. Überraschenderweise konnte [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin sowohl mit dem Multiubiquitin-Antikörper als auch mit dem Kontrollantikörper gegen bovine IgG copräzipitiert werden. Möglicherweise erhöht die Präsenz von Caveolin-1 die Spezifität der Immunopräzipitation von [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin, indem es die hydrophoben Domänen der α -Toxin-Pore kaschiert und so die unspezifische Bindung von der Beads oder unspezifischer Antikörper verhindert. Auf Grund der unspezifischen Bindung von [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin in den MEF_{cav-/-}- Zellen konnte die Notwendigkeit für die Präsenz von Caveolin-1 für die Ubiquitinierung und (Co)-präzipitation von [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin mit dem Multiubiquitin-Antikörper weder ausgeschlossen noch bestätigt werden. Trotz der schlechten Zugänglichkeit der α -Toxin-Oligomere und starken Argumenten für die Ubiquitinierung der α -Toxin-Pore über Caveolin-1, ließ sich die direkte Ubiquitinierung des α -Toxins nicht ausschließen.

Die Ubiquitinierung ist eine komplexe Reaktion und erfordert E1, E2 und E3 Enzyme und führt zu einer Isopeptid-Bindung zwischen dem C-terminalen Glycinrest von Ubiquitin und der ϵ -Aminogruppe eines Lysin-Restes des Substratproteins (Dikic et al, 2009). Eine weitere Immunopräzipitation mit dem Multiubiquitin-Antikörper nach Inkubation mit zwei weiteren radioaktiv-markierten α -Toxin-Varianten gab Aufschluss darüber, ob die (Co)-präzipitation von radioaktiv-markierten α -Toxin-Oligomeren trotz der eingeschränkten Zugänglichkeit von der Verfügbarkeit bestimmter Lysinreste in der α -Toxin-Pore beeinflusst wird. K21c- α -Toxin ist eine Variante des α -Toxins, bei der das Lysin an Position 21 durch ein Cystein ausgetauscht wurde. Dieser Aminosäureaustausch hat weder einen Einfluss auf die Oligomerisierung zur Pore noch auf die Hämolyseaktivität des Toxins. Bei den α -Toxin-Varianten K131c und D152c wurde ebenfalls ein Lysin gegen ein Cystein ausgetauscht. Der Phänotyp der D152c- α -Toxin-Variante unterscheidet sich vom Wildtyp α -Toxin durch eine geringere Hämolyseaktivität (Walker & Bayley, 1995). D152 befindet sich in der sogenannten Dreiecksregion oberhalb der Stammregion, während der Lysinrest an Position 131 an der Kanalinnenseite der Stammbasis der pilzförmigen α -Toxin-Pore lokalisiert ist (Song et al, 1996) (Abb.4-3). Ein Struktur-basierter Sequenzabgleich von VCC und α -Toxin ergab außerdem, dass K131 an dieser Position bei beiden Toxinen konserviert ist (Olson & Gouaux, 2005). Oligomere des [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxins konnten mit dem Multiubiquitin-Antikörper wiederholt copräzipitiert werden, jedoch keine [S^{35}]-Methionin-D152c- α -Toxin-Oligomere. [S^{35}]-Methionin-K131c- α -Toxin konnte lediglich in schwachen Banden von Zerfallsprodukten in der Größe von 100kDa detektiert werden. Der Austausch des Lysins an Position 21 ist offenbar unproblematisch für die Polyubiquitinierung des α -Toxin-Komplexes. Der Lysinrest an Position 131 scheint dagegen erwartungsgemäß essentiell für die Präzipitation mit dem Multiubiquitin-Antikörper zu sein. Dieser Befund führt zu der Vermutung, dass es von zytosolischer Seite einen begrenzten Zugang für die

Ubiquitylierungsmaschinerie zu den α -Toxin-Oligomeren gibt. Die parallele und/oder alternative Ubiquitinierung von α -Toxin-Pore und Caveolin-1 ist denkbar.

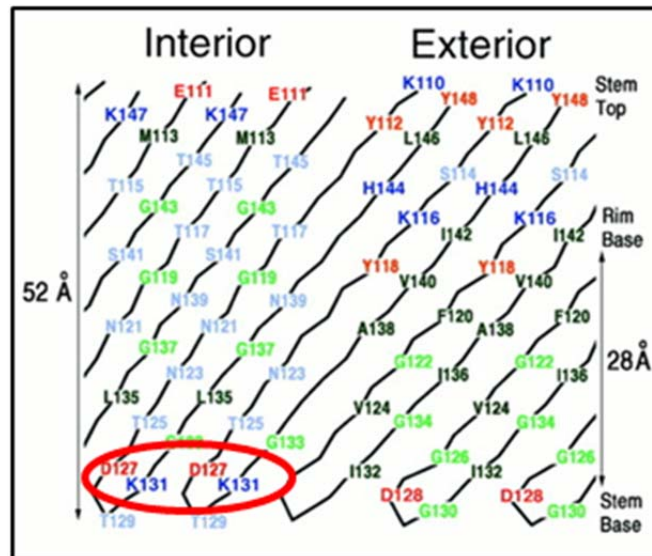


Abb. 4-3: Schematische Darstellung der Aminosäurereste, die die innere und äußere Membran der Stamm-Domäne abgrenzen. Lysin- Arginin und Histidin-Reste sind dunkelblau eingezeichnet. Der Lysinrest K131 befindet sich an der Basis der Stamm-Domäne und scheint am ehesten zugänglich von zytosolischer Seite zu sein. D152c befindet sich oberhalb der Stamm-Domäne in der hier nicht dargestellten Dreiecks-Region (Song et al. 1996).

Nach der endozytotischen Internalisierung des α -Toxins durch die Wirtszelle befinden sich die α -Toxin-Poren in der Membran der Endosomen. Die Orientierung des pilzförmigen Toxins dürfte sich im Bezug zu dem vom Zytosol wenig zugänglichen Anteil der Stammregion in der Endosomenmembran nicht geändert haben. Während die Kappe der α -Toxin-Poren in das Lumen des Endosoms ragt, blieben polyubiquitinierte Lysinseitenketten des α -Toxins, des Caveolin-1 oder eines unbekanntes α -Toxin-assoziierten Proteins, weiterhin zugänglich für die Bindung an die UBA-Domäne des Autophagieadapterproteins p62. Die Vesikulierung und Bildung von MVBs, die im Rahmen dieser Arbeit nach Inkubation mit α -Toxin in allen untersuchten Zelllinien festgestellt werden konnte, könnten sowohl durch Hunger-assoziierte Autophagie als auch durch die p62-vermittelte Autophagie entstanden sein. Für Caveolin-1 wurde publiziert, dass es unter der Beteiligung der ESCRT (endosomal sorting complex required for transport)-Komplexe in intraluminalen Vesikeln von MVBs sortiert werden muss, um letztendlich im Lysosom abgebaut zu werden (Hayer et al, 2010). In der Publikation von *Husmann et al. 2009* wird ähnliches für α -Toxin-Oligomere berichtet, die durch Endozytose aufgenommen und von der Plasmamembran entfernt werden, aber nicht von den Zellen abgebaut, sondern vermutlich über die Sortierung in späte Endosomen/MVBs durch Exozytose in sogenannten Toxosomen aus der Zelle ausgeschleust werden (Husmann et al, 2009). Nach Inkubation mit α -Toxin reagierten die Zellen der untersuchten Zelllinien mit verstärkter Vesikulierung und der Entstehung von MVBs. MVBs sind häufige Fusionspartner von Autophagosomen, mit denen sie Amphisomen bilden können. Die rege Fusion von endosomalen, phagosomalen und autophagosomalen Vesikeln ließ sich auch nach der gleichzeitigen Inkubation von exogenem α -Toxin und *Staphylococcus aureus* hla(-) erkennen, da sowohl markiertes α -Toxin als auch die aufgenommenen Bakterien in der gleichen LC3-positiven Struktur detektiert werden konnten. Proteine, wie z.B. LDL (low-density

lipoprotein)- oder Transferrinrezeptoren, können durch MVBs in sogenannten Recyclingvesikeln sortiert werden und zurück an die Plasmamembran gelangen (Fader & Colombo, 2009). Erst seit kurzem wird auch der Autophagie eine neue Funktion bei der Sekretion von Proteinen zugeschrieben. Autophagie-basierte unkonventionelle Sekretion (Autosekretion) ermöglicht die Sekretion von Proteinen unabhängig vom ER-Golgi-Sekretionsweg. Proteine (z.B. IL-1 β , IL-18, HMGB1), die unkonventionell über Autosekretion abgebaut werden, nutzen zumindest unter bestimmten Umständen Autophagosomen oder deren Intermediate als Vehikel für den extrazellulären Transport (Deretic et al, 2012). Die α -Toxin-induzierte Autophagie könnte daher nicht nur zur Wiederherstellung der zellulären Homöostase nach dem drastischen ATP-Verlust durch die Verletzung der Plasmamembran beitragen, sondern ist möglicherweise durch die Bildung von Amphisomen und MVBs sogar an der Ausschleusung der unlöslichen α -Toxin-Heptamere durch die Entstehung eines spezialisierten Hybridorganells beteiligt.

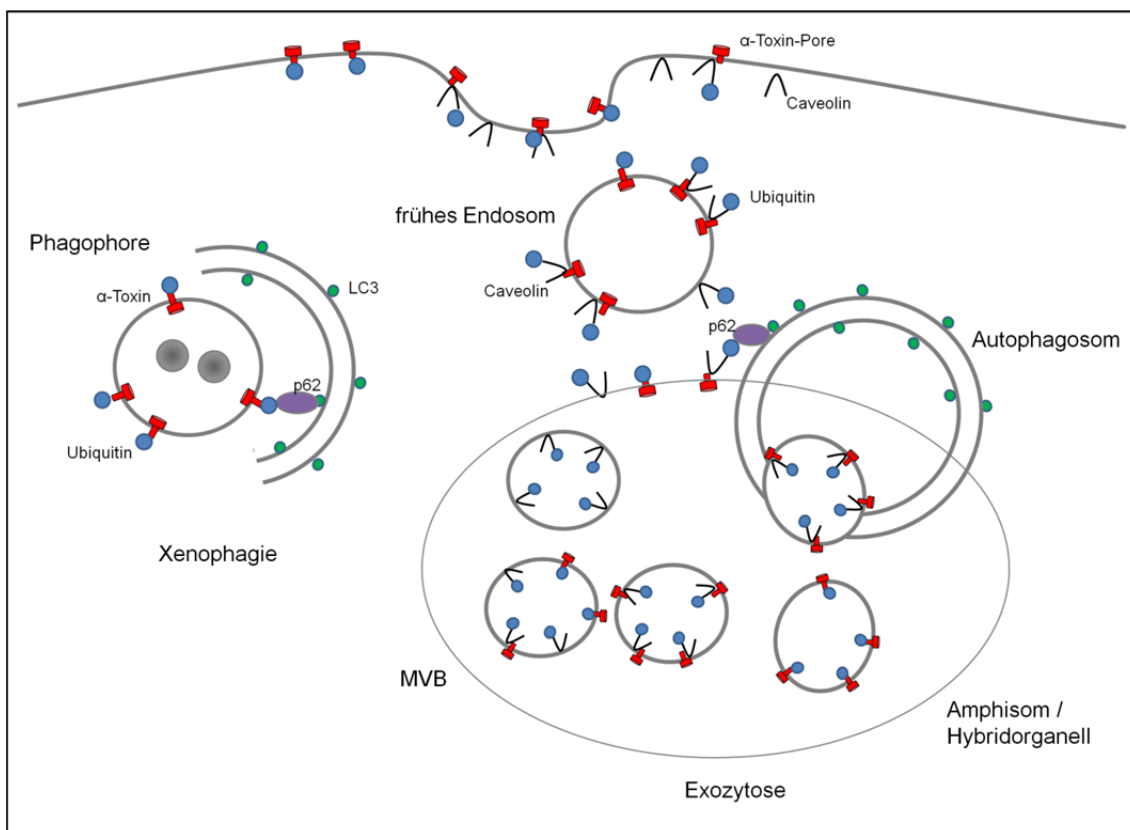


Abb. 4-4: Modell für die potenzielle Ubiquitinierung von Caveolin-1 und der α -Toxin-Pore. Die α -Toxin-Pore (rot) kann vermutlich direkt und unabhängig von Caveolin-1 (schwarz) oder einer Verletzung des Endosoms/Phagosom ubiquitiniert (blau) werden und LC3 (grün) über das Autophagieadapterprotein p62 (violett) binden. Die Topologie der α -Toxin-Poren unterscheidet sich bei einem extra- oder intrazellulären α -Toxin-Angriff nicht (*Staphylococcus aureus* in grau). Für den Abbau von Caveolin-1 sind die Polyubiquitinierung und die ESCRT-Maschinerie und die Sortierung in den MVBs notwendig. Aufgenommene α -Toxin-Poren werden nicht abgebaut, sondern eventuell über MVBs durch Exozytose wieder in den extrazellulären Raum abgegeben. Möglicherweise beschreitet die α -Toxin-Pore nach der Ubiquitinierung einen ähnlichen Weg wie das Toxin-assoziierte zytosolische Protein Caveolin-1 und wird über ein Hybridorganell aus MVBs und Autophagosom ausgeschleust.

4.3 Zusammenspiel aus Hunger-assoziiertes Autophagie und selektiver Autophagie

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten sowohl Hinweise für die Induktion von Pro-Autophagie-Signalen durch intrazelluläre *Staphylococcus aureus* als auch durch isoliertes, extrazellulär appliziertes α -Toxin gezeigt werden. *Staphylococcus aureus* als klassisch extrazelluläres Bakterium kann schon vor der Internalisierung durch die Ziel-/Wirtszelle α -Toxin produzieren und die Zellen durch α -Toxin-Poren schädigen. Hinweise für eine Verbindung zwischen der Hunger-assoziierten Autophagie und einer gesteigerten und erweiterten antimikrobiellen Aktivität von Lysosomen wurden von Yoon *et al.* 2010 publiziert. Erst kürzlich wurde Aminosäuremangel als möglicher Auslöser für zelluläre Abwehrprogramme gegen intrazelluläre Bakterien (*Shigella* und *Salmonella*) auch von Tattoli *et al.* 2012 aufgegriffen. Die Porenbildung und Verletzung der Plasmamembran durch extrazellulär sekretiertes α -Toxin stört die zelluläre Ionenhomöostase, führt zu einem massiven Verlust der zellulären ATP-Konzentration und hat einen Mangel an Aminosäuren zur Folge. Die Permeabilisierung der Plasmamembran induziert über die Phosphorylierung von eIF2 α und die Deaktivierung von mTORC1 Hunger-assoziierte Pro-autophagie-Signale, die die Bewältigung der metabolischen Stresssituation ermöglichen. Die Aktivierung dieser Signale bei einem Angriff durch *Staphylococcus aureus* α -Toxin aus dem Phagosom erfolgt dagegen verzögert und vermutlich nicht in Folge der Porenbildung, sondern auf Grund der massiven Vervielfältigung der Bakterien, die dann zu einer Verknappung der intrazellulären Ressourcen führt. Die Induktion der Hunger-assoziierten Autophagie kann aber nicht nur zur Bewältigung von metabolischen Stresssituationen, sondern auch zu einer Art Aktivierung der zellulären Abwehr beitragen, indem lysosomale Enzyme aktiviert werden und durch die generelle Steigerung der autophagischen Aktivität die Anzahl der Autophagosomen erhöht wird. Damit steigt die Anzahl möglicher Fusionspartner für MVBs für die Bildung von Amphisomen, die wiederum mit der selektiven Autophagie konvergieren könnte.

Sowohl Hunger-assoziierte Pro-Autophagie-Signale als auch die Autophagie-assoziierte Rekrutierung von p62 konnten durch intrazelluläre α -Toxin-produzierende Staphylokokken oder extrazellulär appliziertes α -Toxin induziert werden. Zugang zu der freiliegenden α -Toxin-Kappendomäne, die aus der Plasmamembran bzw. in das Lumen der Endosomen ragt, ist für die Ubiquitinierung der α -Toxin-Poren vermutlich nicht notwendig. Stattdessen erwies sich die Ubiquitinierung des K131-Lysinrests an der Stammbasis als notwendig für die (Co)-präzipitation von α -Toxin-Oligomeren mit dem Multiubiquitin-Antikörper. Die gleichzeitige Ubiquitinierung von α -Toxin und Caveolin-1, die wahrscheinlich im Komplex vorliegen, ist möglich und könnte die selektive Rekrutierung von p62 und LC3 an die *Staphylococcus aureus*-Varianten hla(+) und hla(mut) erklären. Da eine Rekrutierung von p62 und LC3 an intrazelluläre *Staphylococcus aureus* auch in Caveolin-1-defizienten-Zellen (MEF_{cav-/-}) erfolgte und diese Rekrutierung von der Fähigkeit der Bakterien zur α -Toxin-Produktion abhing, ist davon auszugehen, dass eine Polyubiquitinierung von Caveolin-1 nicht essentiell für die Rekrutierung von p62 und LC3 ist, und dass α -Toxin selbst polyubiquitiniert werden kann. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass Caveolin-1, sofern es in den Zielzellen vorhanden ist, mit α -Toxin assoziiert, ubiquitiniert wird und damit zur UBA-vermittelten Rekrutierung von p62 und LC3 und zur selektiven Autophagie beiträgt. Schließlich können auch Lysin-Reste der α -Toxin-Poren direkt ubiquitiniert werden. Die Ubiquitinierung der Kappe der α -Toxin-Pore, die in das Lumen des Endosoms ragt, scheint bei

einer Zerstörung der Endosomenmembran, wie sie für die *Staphylococcus aureus*-Variante hla(+) durch die Rekrutierung des Lysemarkers Galektin-3 indiziert ist, nicht ausgeschlossen, aber keine notwendige Voraussetzung zu sein.

Die selektive Rekrutierung von p62 und LC3 an ubiquitinierte Lysin-Seitenketten der α -Toxin-Poren in der Membran der Bakterien-Vakuolen (intrazellulär sekretiertes α -Toxin) oder in der Plasmamembran/Endosomenmembran (extrazellulär appliziertes/sekretiertes α -Toxin) könnte zur Xenophagie der intrazellulärer Staphylokokken führen. Möglicherweise trägt die p62-LC3-Rekrutierung auch zur Ausschleusung der internalisierten, unlöslichen α -Toxin-Poren, über die MVB-Sortierung und die anschließende Exozytose sogenannter Toxosomen bei. Die parallele Induktion der Hunger-assoziierten Autophagie trägt entscheidend dazu bei, die metabolische Stresssituation zu überbrücken und führt möglicherweise durch eine allgemeine Steigerung der autophagischen Aktivität zusätzlich zu einer Aktivierung der Zellen.

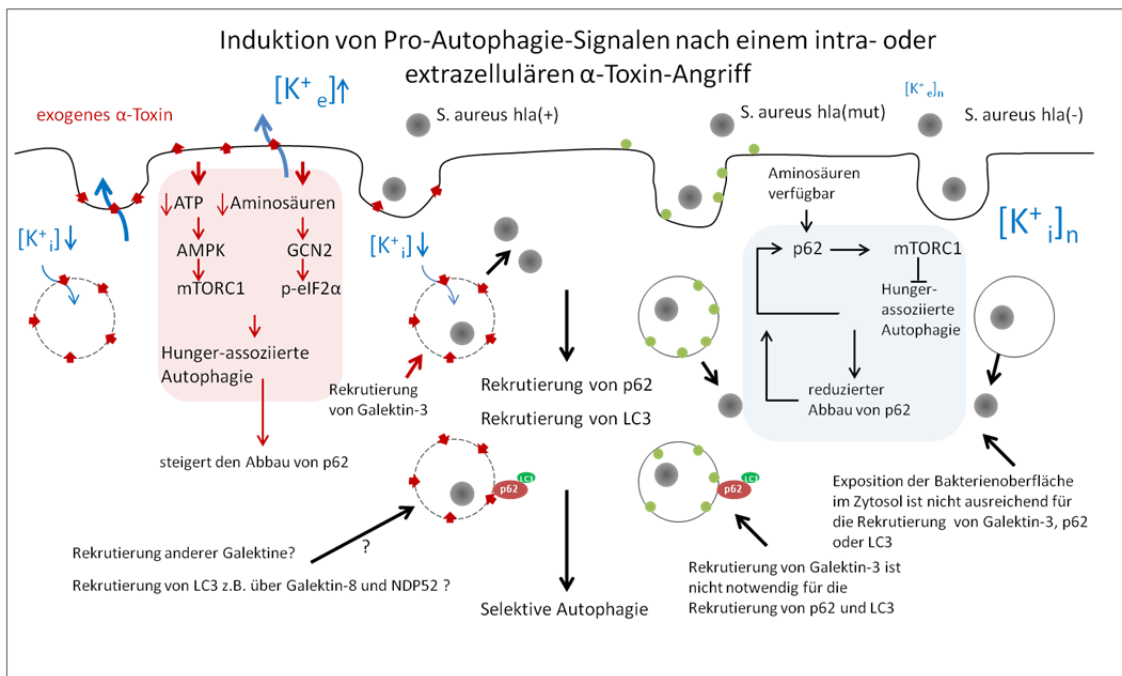


Abb. 4-5: Induktion von Hunger-assoziierten „nicht-selektiven“ und selektiven Pro-Autophagie-Signalen nach intra- oder extrazellulärem α -Toxin-Angriff. extrazelluläres α -Toxin: Isoliertes exogenes α -Toxin bildet Transmembranporen in der Plasmamembran der Zielzelle und verursacht durch die Permeabilisierung der Membran einen Kalium-Ausstrom, der vermutlich zum Mangel an Aminosäuren und ATP-Verlust führt. Der Energiesensor AMPK wird auf Grund des sinkenden Verhältnisses von ADP zu ATP phosphoryliert und induziert über die Inaktivierung des Tyrosinkinase-Komplex mTORC1 Autophagie. Die mangelnde Verfügbarkeit von Aminosäuren kann parallel dazu von der konservierten Stresskinase GCN2 erfasst werden, die eIF2 α phosphoryliert und einen generellen Translationsstopp und Autophagieinduktion bewirken kann. p62 wird konstitutiv durch Autophagie abgebaut, die Steigerung der autophagischen Aktivität bewirkt den erhöhten Abbau von p62. intrazelluläres α -Toxin: α -Toxin, das durch intrazelluläre *Staphylococcus aureus* hla(+) im Phagosom sekretiert wird, führt auf Grund des geringen Volumen des Phagosoms vermutlich nicht zu einem nennenswerten Kalium-Ausstrom/Verlust und der Induktion von Hunger-assoziierten Pro-Autophagie-Signalen, sondern zur Rekrutierung des Adapterproteins p62, von LC3 und Galektin-3. Galektin-3 indiziert eine Art Verletzung oder Lyse der Phagophorenmembran, in dem es vermutlich an bakterielle Bestandteile oder intraluminale Wirtsproteine binden kann. intrazelluläres D152c- α -Toxin: D152c- α -Toxin, welches durch intrazelluläre *Staphylococcus aureus* hla(mut) sekretiert wird führt ebenfalls zur Rekrutierung von p62 und LC3, aber nicht zur Rekrutierung von Galektin-3. Galektin-3-Rekrutierung scheint nicht notwendig für die

Rekrutierung von p62 und LC3 zu sein. Jedoch ist nicht ausgeschlossen, dass andere Galektine und Adapterproteine involviert sind. ***Staphylococcus aureus hla(-)***: intrazelluläre *Staphylococcus aureus* hla(-), die kein α -Toxin sekretieren, führen nicht zur Rekrutierung von p62 und LC3 oder Galektin-3. *Staphylococcus aureus* konnten unabhängig von der α -Toxin-Produktion nicht nur in Phagosomen sondern auch frei im Zytoplasma beobachtet werden. Die Exposition der Bakterien im Zytosol scheint daher nicht für die Rekrutierung von p62, LC3 oder Galektin-3 auszureichen.

Zusammenfassung

Autophagie ist ein konservierter, kataboler Mechanismus in allen eukaryoten Zellen. Unter anderem wird ihm eine wichtige Rolle als zellautonomer Abwehrmechanismus gegen Mikroorganismen zugeschrieben; von manchen Infektionserregern wird er jedoch unterlaufen oder sogar genutzt. Der stärkste Auslöser der Autophagie ist ein Mangel an Nährstoffen, insbesondere Aminosäuren. Über die Deaktivierung der Kinase mTORC1 und die Phosphorylierung des eukaryoten Translationsinitiationsfaktors eIF2 α hemmt die Nährstoffknappheit die Proteinbiosynthese und aktiviert gleichzeitig Autophagie. Wie Mikroorganismen, insbesondere Bakterien, Autophagie auslösen oder manipulieren, ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Modifikationen an Mikroben oder Phagosomen und Adapterproteine, die diese Veränderungen und Komponenten des Autophagieapparates erkennen, scheinen jedenfalls bei der selektiven Erkennung durch die Autophagie-Maschinerie wichtig zu sein.

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wird die Rolle des membranporenbildenden α -Toxins von *Staphylococcus aureus* für die Induktion von Autophagie beleuchtet. Zum einen erwies sich die Akkumulation von (EGFP)-LC3(II), einem Marker der Autophagosomen, um intrazelluläre *S. aureus* als abhängig von α -Toxin. Zweitens, genügt extrazellulär appliziertes α -Toxin um (EGFP)-LC3(II)-positive Endosomen zu induzieren. Während der Angriff aus dem extrazellulären Raum jedoch binnen kurzer Zeit eine fokale Kumulation von phosphoryliertem eIF2 α an der Plasmamembran induziert, die an der Internalisierung des Toxins beteiligt ist, findet sich am phagosomalen Kompartiment keine Toxin-abhängige Anhäufung von p-eIF2 α oder proximalen Autophagieregulatoren. Dies impliziert, dass Toxin-Angriff auf die Plasmamembran, nicht aber auf das Phagosom, zu einer Reaktion führt, wie sie bei massivem Nährstoffmangel zu beobachten ist. Obwohl keine α -Toxin-abhängige Kumulation von p-eIF2 α bei einem Angriff aus dem Phagosom erfolgt, findet sich um α -Toxin-produzierende Bakterien eine massive Kumulation von LC3 und Adapterprotein p62/Sequestosome1. Dies deutet daraufhin, dass der Ort des Angriffs - Plasmamembran oder Phagosom - für den Autophagie-induzierenden Mechanismus wichtig sein könnte. Der unterschiedliche Effekt auf die zellulären Ionenkonzentrationen, den ein Angriff auf die Plasmamembran oder auf ein Phagosom auslösen würde, bietet hierfür eine mögliche Erklärung. Die Aktivierung der Autophagie über Adapterproteine könnte dann als *back-up* Mechanismus fungieren, der auch dann greift, wenn eine Invasion ohne Schädigung der Plasmamembran erfolgt. Ein *cross-talk* der beiden Induktionswege ist angesichts der Bedeutung von p62 für die selektive und die Hunger-assoziierte Autophagie gut möglich; sezerniertes Toxin könnte durch die Aktivierung der basalen Autophagie Adapter-basierte Mechanismen verstärken.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: PtdIns3K-Komplexe.....	19
Abb. 1-2: Entstehung von klassischen Autophagosomen.....	21
Abb. 1-3: Target of Rapamycin-vermittelte Signaltransduktionswege.....	25
Abb. 1-4: p62-Domäne.....	28
Abb. 1-5: Struktur der α -Toxin-Pore.....	33
Abb. 2-1: Plasmidkarte pEGFP-C1-CReP.....	59
Abb. 3-1: <i>Staphylococcus aureus</i> in HaCaT, MEF _{cav-/-} und ODORA.....	78
Abb. 3-2: Ultrastrukturelle Lokalisation von <i>Staphylococcus aureus</i> in HaCaT.....	79
Abb. 3-3: Galektin-3 Rekrutierung an <i>Staphylococcus aureus</i> hla(+).	81
Abb. 3-4: P-AMPK wird α -Toxin-unabhängig an <i>Staphylococcus aureus</i> rekrutiert.....	83
Abb. 3-5: P-eIF2 α wird α -Toxin-unabhängig an <i>Staphylococcus aureus</i> rekrutiert.....	84
Abb. 3-6: Keine detektierbare Aktivierung des CHOP-Promotors durch intrazelluläre <i>Staphylococcus aureus</i>	85
Abb. 3-7: Keine Rekrutierung von EGFP-CReP an intrazelluläre <i>Staphylococcus aureus</i>	86
Abb. 3-8: Schwache Aktivierung von EGFP-Atg14L durch <i>Staphylococcus aureus</i>	87
Abb. 3-9: Schwache Aktivierung von EGFP-hUVRAG durch <i>Staphylococcus aureus</i>	88
Abb. 3-10: EGFP-Rubicon Akkumulationen um intrazelluläre <i>Staphylococcus aureus</i>	89
Abb. 3-11: α -Toxin-abhängige Akkumulationen von EGFP-LC3 um <i>Staphylococcus aureus</i> in HaCaT.....	90
Abb. 3-12: α -Toxin-abhängige Akkumulationen von EGFP-LC3 um <i>Staphylococcus aureus</i> in ODORA.....	91
Abb. 3-13: Exogenes α -Toxin führt zur EGFP-LC3-Rekrutierung an <i>Staphylococcus aureus</i> hla(-) und lokalisiert partiell in den LC3-positiven Kompartimenten.....	92
Abb. 3-14: α -Toxin-abhängige Akkumulationen von DsRed-p62 um <i>Staphylococcus aureus</i> hla(+) in HaCaT.....	93
Abb. 3-15: α -Toxin-abhängige Rekrutierung von EGFP-LC3 und DsRed-p62 an intrazelluläre <i>Staphylococcus aureus</i> hla(+) in HaCaT.....	95
Abb. 3-16: α -Toxin-abhängige Rekrutierung von EGFP-LC3 und DsRed-p62 an intrazelluläre <i>Staphylococcus aureus</i> in MEF _{cav-/-}	97
Abb. 3-17: Nachweis von α -Toxin im Kontext intrazellulärer <i>Staphylococcus aureus</i>	99
Abb. 3-18: Nachweis von α -Toxin um <i>Staphylococcus aureus</i> in Kryoschnittbändern.....	99
Abb. 3-19: Ultrastrukturelle Lokalisation von α -Toxin im Kontext mit intrazellulären <i>Staphylococcus aureus</i>	100
Abb. 3-20: Verstärkte Vesikulierung durch α -Toxin in HaCaT, Huh7 und ODORA.....	102
Abb. 3-21: Translozierung des P-eIF2 α -Signals nach Inkubation mit α -Toxin in HaCaT.....	105
Abb. 3-22: Translozierung von P-eIF2 α nach Inkubation mit α -Toxin in EGFP-Rab5-Q79L-positive Endosomen.....	106
Abb. 3-23: Line Scan-Messungen des P-eIF2 α -Signals nach Beladung mit α -Toxin in HaCaT.....	108
Abb. 3-24: Line Scan-Messungen des P-eIF2 α -Signals nach Beladung und Inkubation mit α -Toxin in HaCaT.....	109

Abb. 3-25: Translokierung des P-eIF2 α -Signals nach Inkubation mit α -Toxin in Huh7.....	110
Abb. 3-26: Verschiebung des P-eIF2 α -Signals ist nicht durch Nocodazol, Leptomycin B und Cytochalasin B beeinflussbar.....	112
Abb. 3-27: Verschiebung des P-eIF2 α -Signals ist nicht durch Nocodazol, Leptomycin B und Cytochalasin B beeinflussbar.....	114
Abb. 3-28: Signifikante Intensitätszunahme des P-eIF2 α -Signals in konfokalen Mikrografien durch α -Toxin.	115
Abb. 3-29: Kolokalisationen von α -Toxin und EGFP-LC3.....	117
Abb. 3-30: Kolokalisation von α -Toxin und p62.....	118
Abb. 3-31: Immunopräzipitation von α -Toxin mit Multi-Ubiquitin.....	120
Abb. 3-32: Immunopräzipitation von α -Toxin, LC3, p62, Ubiquitin und Multi-Ubiquitin.....	121
Abb. 3-33: Komplex aus [S^{35}]-Methionin-K21c- α -Toxin und Caveolin-1.....	122
Abb. 3-34: Caveolin erhöht die Spezifität der Immunopräzipitation von α -Toxin mit Multi-Ubiquitin.....	123
Abb. 3-35: Keine Immunopräzipitation von [S^{35}]-Methionin-K131c- α -Toxin- und [S^{35}]-Methionin-D152c- α -Toxin-Oligomeren mit Multiubiquitin.....	124
Abb. 4-1: Überlebensstrategien intrazellulärer Bakterien.....	131
Abb. 4-2: Induktion von Pro-Autophagie-Signalen.....	138
Abb. 4-3: Schematische Darstellung der Aminosäurenreste, die die innere und äußere Membran der Stamm-Domäne abgrenzen.....	151
Abb. 4-4: Modell für die potentielle Ubiquitinierung von Caveolin-1 und der α -Toxin-Pore.....	152
Abb. 4-5: Induktion von Hunger-assoziierten „nicht-selektiven“ und selektiven Pro-Autophagie-Signalen nach intra- oder extrazellulärem α -Toxin-Angriff.....	154

Literaturverzeichnis

Abrami L, Fivaz M, Glauser PE, Parton RG, van der Goot FG (1998) A pore-forming toxin interacts with a GPI-anchored protein and causes vacuolation of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **140**: 525-540

Ahlberg J, Glaumann H (1985) Uptake--microautophagy--and degradation of exogenous proteins by isolated rat liver lysosomes. Effects of pH, ATP, and inhibitors of proteolysis. *Exp Mol Pathol* **42**: 78-88

Alberts B. JA, Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008) *Molecular Biology of the cell*, 5 edn. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group.

Aroian R, van der Goot FG (2007) Pore-forming toxins and cellular non-immune defenses (CNIDs). *Curr Opin Microbiol* **10**: 57-61

Aspuria PJ, Tamanoi F (2004) The Rheb family of GTP-binding proteins. *Cell Signal* **16**: 1105-1112

Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G, Ktistakis NT (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **182**: 685-701

Barrows BD, Haslam SM, Bischof LJ, Morris HR, Dell A, Aroian RV (2007) Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin in *Caenorhabditis elegans* from loss of fucose. *J Biol Chem* **282**: 3302-3311

Bernales S, McDonald KL, Walter P (2006) Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol* **4**: e423

Bernheimer AW, Avigad LS (1976) Properties of a toxin from the sea anemone *Stoichacis helianthus*, including specific binding to sphingomyelin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 467-471

Bischof LJ, Kao CY, Los FC, Gonzalez MR, Shen Z, Briggs SP, van der Goot FG, Aroian RV (2008) Activation of the unfolded protein response is required for defenses against bacterial pore-forming toxin in vivo. *PLoS Pathog* **4**: e1000176

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* **106**: 761-771

Bradfield CJ, Kim BH, Macmicking JD (2012) Crossing the rubicon: new roads lead to host defense. *Cell Host Microbe* **11**: 221-223

Bravo A, Gill SS, Soberon M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **49**: 423-435

Chambers HF, Deleo FR (2009) Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* **7**: 629-641

Cherkasova VA, Hinnebusch AG (2003) Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2alpha kinase GCN2. *Genes Dev* **17**: 859-872

Chopra AK, Xu X, Ribardo D, Gonzalez M, Kuhl K, Peterson JW, Houston CW (2000) The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. *Infect Immun* **68**: 2808-2818

Ciechanover A (2006) Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 1-12, 505-506

Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T (2012) Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 7-12

Collier RJ (2001) Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon* **39**: 1793-1803

Cossart P, Boquet P, Normark S, Rappuoli R (1996) Cellular microbiology emerging. *Science* **271**: 315-316

Cossart P, Sansonetti PJ (2004) Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**: 242-248

Cuervo AM (2008) Autophagy and aging: keeping that old broom working. *Trends Genet* **24**: 604-612

- de Sousa MV, Morhy L (1989) Enterolobin, a hemolytic protein from *Enterolobium contortisiliquum* seeds (Leguminosae--Mimosoideae). Purification and characterization. *An Acad Bras Cienc* **61**: 405-412
- Deitch EA, Haskel Y, Cruz N, Xu D, Kvietys PR (1995) Caco-2 and IEC-18 intestinal epithelial cells exert bactericidal activity through an oxidant-dependent pathway. *Shock* **4**: 345-350
- Delgado MA, Elmaoued RA, Davis AS, Kyei G, Deretic V (2008) Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J* **27**: 1110-1121
- Deretic V (2009) Links between autophagy, innate immunity, inflammation and Crohn's disease. *Dig Dis* **27**: 246-251
- Deretic V (2011) Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. *Immunol Rev* **240**: 92-104
- Deretic V, Jiang S, Dupont N (2012) Autophagy intersections with conventional and unconventional secretion in tissue development, remodeling and inflammation. *Trends Cell Biol*
- Dikic I, Wakatsuki S, Walters KJ (2009) Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 659-671
- Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV (2001) Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* **293**: 2449-2452
- Dragneva Y, Anuradha CD, Valeva A, Hoffmann A, Bhakdi S, Husmann M (2001) Subcytotoxic attack by staphylococcal alpha-toxin activates NF-kappaB and induces interleukin-8 production. *Infect Immun* **69**: 2630-2635
- Dunn WA, Jr., Cregg JM, Kiel JA, van der Klei IJ, Oku M, Sakai Y, Sibirny AA, Stasyk OV, Veenhuis M (2005) Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes. *Autophagy* **1**: 75-83
- Dupont N, Lacas-Gervais S, Bertout J, Paz I, Freche B, Van Nhieu GT, van der Goot FG, Sansonetti PJ, Lafont F (2009) *Shigella* phagocytic vacuolar membrane remnants participate in the cellular response to pathogen invasion and are regulated by autophagy. *Cell Host Microbe* **6**: 137-149

Duran A, Amanchy R, Linares JF, Joshi J, Abu-Baker S, Porollo A, Hansen M, Moscat J, Diaz-Meco MT (2011) p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Mol Cell* **44**: 134-146

Fader CM, Colombo MI (2009) Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death Differ* **16**: 70-78

Fairweather N, Kennedy S, Foster TJ, Kehoe M, Dougan G (1983) Expression of a cloned *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin determinant in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **41**: 1112-1117

Fan W, Tang Z, Chen D, Moughon D, Ding X, Chen S, Zhu M, Zhong Q (2010) Keap1 facilitates p62-mediated ubiquitin aggregate clearance via autophagy. *Autophagy* **6**

Fey PD, Said-Salim B, Rupp ME, Hinrichs SH, Boxrud DJ, Davis CC, Kreiswirth BN, Schlievert PM (2003) Comparative molecular analysis of community- or hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 196-203

Finlay BB, Falkow S (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 136-169

Fujita N, Yoshimori T (2011) Ubiquitination-mediated autophagy against invading bacteria. *Curr Opin Cell Biol*

Furuta S, Hidaka E, Ogata A, Yokota S, Kamata T (2004) Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase. *Oncogene* **23**: 3898-3904

Garzoni C, Francois P, Huyghe A, Couzinet S, Tapparel C, Charbonnier Y, Renzoni A, Lucchini S, Lew DP, Vaudaux P, Kelley WL, Schrenzel J (2007) A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells. *BMC Genomics* **8**: 171

Garzoni C, Kelley WL (2009) *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol* **17**: 59-65

Giese B, Dittmann S, Paprotka K, Levin K, Weltrowski A, Biehler D, Lam TT, Sinha B, Fraunholz MJ (2009) Staphylococcal alpha-toxin is not sufficient to mediate escape from phagolysosomes in upper-airway epithelial cells. *Infect Immun* **77**: 3611-3625

Goldberg AL (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**: 895-899

- Gonzalez MR, Bischofberger M, Freche B, Ho S, Parton RG, van der Goot FG (2011) Pore-forming toxins induce multiple cellular responses promoting survival. *Cell Microbiol*
- Gonzalez MR, Bischofberger M, Pernot L, van der Goot FG, Freche B (2008) Bacterial pore-forming toxins: the (w)hole story? *Cell Mol Life Sci* **65**: 493-507
- Gordon RJ, Lowy FD (2008) Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* **46 Suppl 5**: S350-359
- Gresham HD, Lowrance JH, Caver TE, Wilson BS, Cheung AL, Lindberg FP (2000) Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol* **164**: 3713-3722
- Grochulski P, Masson L, Borisova S, Pusztai-Carey M, Schwartz JL, Brousseau R, Cygler M (1995) *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J Mol Biol* **254**: 447-464
- Gutierrez MG, Saka HA, Chinen I, Zoppino FC, Yoshimori T, Bocco JL, Colombo MI (2007) Protective role of autophagy against *Vibrio cholerae* cytolysin, a pore-forming toxin from *V. cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 1829-1834
- Hamill RJ, Vann JM, Proctor RA (1986) Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect Immun* **54**: 833-836
- Hamon MA, Batsche E, Regnault B, Tham TN, Seveau S, Muchardt C, Cossart P (2007) Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 13467-13472
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* **6**: 1099-1108
- Haugwitz U, Bobkiewicz W, Han SR, Beckmann E, Veerachato G, Shaid S, Biehl S, Dersch K, Bhakdi S, Husmann M (2006) Pore-forming *Staphylococcus aureus* alpha-toxin triggers epidermal growth factor receptor-dependent proliferation. *Cell Microbiol* **8**: 1591-1600
- Hayer A, Stoeber M, Ritz D, Engel S, Meyer HH, Helenius A (2010) Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *J Cell Biol* **191**: 615-629

He C, Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* **43**: 67-93

Hess DJ, Henry-Stanley MJ, Erickson EA, Wells CL (2003) Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* within cultured enterocytes. *J Surg Res* **114**: 42-49

Hoffmann C, Berking A, Agerer F, Buntru A, Neske F, Chhatwal GS, Ohlsen K, Hauck CR (2010) Caveolin limits membrane microdomain mobility and integrin-mediated uptake of fibronectin-binding pathogens. *J Cell Sci* **123**: 4280-4291

Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, Mizushima N (2009) Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* **20**: 1981-1991

Howard SP, Buckley JT (1985) Activation of the hole-forming toxin aerolysin by extracellular processing. *J Bacteriol* **163**: 336-340

Hoyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, Campanella M, Szabadkai G, Farkas T, Bianchi K, Fehrenbacher N, Elling F, Rizzuto R, Mathiasen IS, Jaattela M (2007) Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell* **25**: 193-205

Huffman DL, Abrami L, Sasik R, Corbeil J, van der Goot FG, Aroian RV (2004) Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10995-11000

Husmann M, Beckmann E, Boller K, Kloft N, Tenzer S, Bobkiewicz W, Neukirch C, Bayley H, Bhakdi S (2009) Elimination of a bacterial pore-forming toxin by sequential endocytosis and exocytosis. *FEBS Lett* **583**: 337-344

Hybiske K, Stephens RS (2008) Exit strategies of intracellular pathogens. *Nat Rev Microbiol* **6**: 99-110

Iacovache I, van der Goot FG, Pernot L (2008) Pore formation: an ancient yet complex form of attack. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 1611-1623

Ichimura Y, Kumanomidou T, Sou YS, Mizushima T, Ezaki J, Ueno T, Kominami E, Yamane T, Tanaka K, Komatsu M (2008) Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *J Biol Chem* **283**: 22847-22857

- Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL (2002) TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* **4**: 648-657
- Inoki K, Zhu T, Guan KL (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**: 577-590
- Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N (2008) Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell* **19**: 5360-5372
- Jarry TM, Memmi G, Cheung AL (2008) The expression of alpha-haemolysin is required for Staphylococcus aureus phagosomal escape after internalization in CFT-1 cells. *Cell Microbiol* **10**: 1801-1814
- Johansen T, Lamark T (2011) Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* **7**: 279-296
- Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH (2009) ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* **20**: 1992-2003
- Jursch R, Hildebrand A, Hobom G, Trantum-Jensen J, Ward R, Kehoe M, Bhakdi S (1994) Histidine residues near the N terminus of staphylococcal alpha-toxin as reporters of regions that are critical for oligomerization and pore formation. *Infect Immun* **62**: 2249-2256
- Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ (2007) Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* **462**: 245-253
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* **13**: 132-141
- Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I (2009) A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell* **34**: 259-269
- Klionsky DJ (2005) The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci* **118**: 7-18
- Klionsky DJ (2007) Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 931-937

- Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Jr., Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, Ohsumi Y (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* **5**: 539-545
- Klionsky DJ, Cuervo AM, Dunn WA, Jr., Levine B, van der Klei I, Seglen PO (2007) How shall I eat thee? *Autophagy* **3**: 413-416
- Kloft N, Busch T, Neukirch C, Weis S, Boukhallouk F, Bobkiewicz W, Cibis I, Bhakdi S, Husmann M (2009) Pore-forming toxins activate MAPK p38 by causing loss of cellular potassium. *Biochem Biophys Res Commun* **385**: 503-506
- Kloft N, Neukirch C, Bobkiewicz W, Veerachato G, Busch T, von Hoven G, Boller K, Husmann M (2010) Pro-autophagic signal induction by bacterial pore-forming toxins. *Med Microbiol Immunol* **199**: 299-309
- Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2007) Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* **131**: 1149-1163
- Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H, Ogawa S, Kaufman RJ, Kominami E, Momoi T (2007) ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ* **14**: 230-239
- Kraft C, Deplazes A, Sohrmann M, Peter M (2008) Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nat Cell Biol* **10**: 602-610
- Kraft C, Peter M, Hofmann K (2010) Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat Cell Biol* **12**: 836-841
- Kristan K, Podlesek Z, Hojnik V, Gutierrez-Aguirre I, Guncar G, Turk D, Gonzalez-Manas JM, Lakey JH, Macek P, Anderluh G (2004) Pore formation by equinatoxin, a eukaryotic pore-forming toxin, requires a flexible N-terminal region and a stable beta-sandwich. *J Biol Chem* **279**: 46509-46517
- Kuma A, Mizushima N, Ishihara N, Ohsumi Y (2002) Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem* **277**: 18619-18625

Kundu M, Lindsten T, Yang CY, Wu J, Zhao F, Zhang J, Selak MA, Ney PA, Thompson CB (2008) Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood* **112**: 1493-1502

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lakey JH, Slatin SL (2001) Pore-forming colicins and their relatives. *Curr Top Microbiol Immunol* **257**: 131-161

Lam TT, Giese B, Chikkaballi D, Kuhn A, Wolber W, Pane-Farre J, Schafer D, Engelmann S, Fraunholz M, Sinha B (2010) Phagolysosomal integrity is generally maintained after *Staphylococcus aureus* invasion of nonprofessional phagocytes but is modulated by strain 6850. *Infect Immun* **78**: 3392-3403

Lamark T, Perander M, Outzen H, Kristiansen K, Overvatn A, Michaelsen E, Bjorkoy G, Johansen T (2003) Interaction codes within the family of mammalian Phox and Bem1p domain-containing proteins. *J Biol Chem* **278**: 34568-34581

Laplante M, Sabatini DM (2009) mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* **122**: 3589-3594

Levine B (2005) Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* **120**: 159-162

Li S, Galbiati F, Volonte D, Sargiacomo M, Engelman JA, Das K, Scherer PE, Lisanti MP (1998) Mutational analysis of caveolin-induced vesicle formation. Expression of caveolin-1 recruits caveolin-2 to caveolae membranes. *FEBS Lett* **434**: 127-134

Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH, Jung JU (2006) Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol* **8**: 688-699

Liang J, Shao SH, Xu ZX, Hennessy B, Ding Z, Larrea M, Kondo S, Dumont DJ, Gutterman JU, Walker CL, Slingerland JM, Mills GB (2007) The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol* **9**: 218-224

Long J, Gallagher TR, Cavey JR, Sheppard PW, Ralston SH, Layfield R, Searle MS (2008) Ubiquitin recognition by the ubiquitin-associated domain of p62 involves a novel conformational switch. *J Biol Chem* **283**: 5427-5440

Lowy FD (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* **339**: 520-532

Macdonald JL, Pike LJ (2005) A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *Journal of Lipid Research* **46**: 1061-1067

Mancheno JM, Tateno H, Goldstein IJ, Martinez-Ripoll M, Hermoso JA (2005) Structural analysis of the *Laetiporus sulphureus* hemolytic pore-forming lectin in complex with sugars. *J Biol Chem* **280**: 17251-17259

Massey AC, Zhang C, Cuervo AM (2006) Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr Top Dev Biol* **73**: 205-235

Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, Omori H, Satoh T, Kurotori N, Maejima I, Shirahama-Noda K, Ichimura T, Isobe T, Akira S, Noda T, Yoshimori T (2009) Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol* **11**: 385-396

Menestrina G, Dalla Serra M, Comai M, Coraiola M, Viero G, Werner S, Colin DA, Monteil H, Prevost G (2003) Ion channels and bacterial infection: the case of beta-barrel pore-forming protein toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett* **552**: 54-60

Mestre MB, Fader CM, Sola C, Colombo MI (2010) Alpha-hemolysin is required for the activation of the autophagic pathway in *Staphylococcus aureus*-infected cells. *Autophagy* **6**: 110-125

Meyer-Morse N, Robbins JR, Rae CS, Mochegova SN, Swanson MS, Zhao Z, Virgin HW, Portnoy D (2010) Listeriolysin O is necessary and sufficient to induce autophagy during *Listeria monocytogenes* infection. *PLoS One* **5**: e8610

Mizushima N (2010) The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 132-139

Mizushima N, Komatsu M (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**: 728-741

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**: 1069-1075

Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, Klionsky DJ, Ohsumi M, Ohsumi Y (1998) A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395**: 395-398

- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y (2011) The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**: 107-132
- Montoya M, Gouaux E (2003) Beta-barrel membrane protein folding and structure viewed through the lens of alpha-hemolysin. *Biochim Biophys Acta* **1609**: 19-27
- Moreno JA, Radford H, Peretti D, Steinert JR, Verity N, Martin MG, Halliday M, Morgan J, Dinsdale D, Ortore CA, Barrett DA, Tsaytler P, Bertolotti A, Willis AE, Bushell M, Mallucci GR (2012) Sustained translational repression by eIF2alpha-P mediates prion neurodegeneration. *Nature* **485**: 507-511
- Moscat J, Diaz-Meco MT (2009) p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell* **137**: 1001-1004
- Moscat J, Diaz-Meco MT (2011) Feedback on fat: p62-mTORC1-autophagy connections. *Cell* **147**: 724-727
- Murrell JR, Hunter DD (1999) An olfactory sensory neuron line, odora, properly targets olfactory proteins and responds to odorants. *J Neurosci* **19**: 8260-8270
- Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J (1982) Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* **42**: 3858-3863
- Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, Nara A, Funao J, Nakata M, Tsuda K, Hamada S, Yoshimori T (2004) Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science* **306**: 1037-1040
- Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T, Komatsu M, Otsu K, Tsujimoto Y, Shimizu S (2009) Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* **461**: 654-658
- Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Dann SG, Kim SY, Gulati P, Byfield MP, Backer JM, Natt F, Bos JL, Zwartkuis FJ, Thomas G (2005) Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 14238-14243
- Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S (1993) Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J* **12**: 3967-3975

Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D (2001) Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol* **153**: 1011-1022

Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T, Taniguchi M, Tanii I, Yoshinaga K, Shiosaka S, Hammarback JA, Urano F, Imaizumi K (2006) Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* **26**: 9220-9231

Ogawa M, Mimuro H, Yoshikawa Y, Ashida H, Sasakawa C (2011) Manipulation of autophagy by bacteria for their own benefit. *Microbiol Immunol* **55**: 459-471

Olson R, Gouaux E (2005) Crystal structure of the Vibrio cholerae cytolysin (VCC) protoxin and its assembly into a heptameric transmembrane pore. *J Mol Biol* **350**: 997-1016

Orenstein SJ, Cuervo AM (2010) Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Semin Cell Dev Biol* **21**: 719-726

Paetzold S, Lourido S, Raupach B, Zychlinsky A (2007) Shigella flexneri phagosomal escape is independent of invasion. *Infect Immun* **75**: 4826-4830

Pankiv S, Lamark T, Bruun JA, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T (2010) Nucleocytoplasmic shuttling of p62/SQSTM1 and its role in recruitment of nuclear polyubiquitinated proteins to promyelocytic leukemia bodies. *J Biol Chem* **285**: 5941-5953

Pany S, Vijayvargia R, Krishnasastri MV (2004) Caveolin-1 binding motif of alpha-hemolysin: its role in stability and pore formation. *Biochem Biophys Res Commun* **322**: 29-36

Parker MW, Feil SC (2005) Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol* **88**: 91-142

Pattingre S, Bauvy C, Codogno P (2003) Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells. *J Biol Chem* **278**: 16667-16674

Paz I, Sachse M, Dupont N, Mounier J, Cederfur C, Enninga J, Leffler H, Poirier F, Prevost MC, Lafont F, Sansonetti P (2010) Galectin-3, a marker for vacuole lysis by invasive pathogens. *Cell Microbiol* **12**: 530-544

Paz Y, Elazar Z, Fass D (2000) Structure of GATE-16, membrane transport modulator and mammalian ortholog of autophagocytosis factor Aut7p. *J Biol Chem* **275**: 25445-25450

Pingoud A. UC (1997) *Arbeitsmethoden der Biochemie*, Berlin, New York: Walter de Gruyter.

Pipkin ME, Lieberman J (2007) Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol* **19**: 301-308

Ponpuak M, Davis AS, Roberts EA, Delgado MA, Dinkins C, Zhao Z, Virgin HWt, Kyei GB, Johansen T, Vergne I, Deretic V (2010) Delivery of cytosolic components by autophagic adaptor protein p62 endows autophagosomes with unique antimicrobial properties. *Immunity* **32**: 329-341

Ponpuak M, Deretic V (2011) Autophagy and p62/sequestosome 1 generate neo-antimicrobial peptides (cryptides) from cytosolic proteins. *Autophagy* **7**: 336-337

Porta H, Cancino-Rodezno A, Soberon M, Bravo A (2011) Role of MAPK p38 in the cellular responses to pore-forming toxins. *Peptides* **32**: 601-606

Proikas-Cezanne T, Robenek H (2011) Freeze-fracture replica immunolabelling reveals human WIPI-1 and WIPI-2 as membrane proteins of autophagosomes. *J Cell Mol Med* **15**: 2007-2010

Ribet D, Hamon M, Gouin E, Nahori MA, Impens F, Neyret-Kahn H, Gevaert K, Vandekerckhove J, Dejean A, Cossart P (2010) *Listeria monocytogenes* impairs SUMOylation for efficient infection. *Nature* **464**: 1192-1195

Ropolo A, Grasso D, Pardo R, Sacchetti ML, Archange C, Lo Re A, Seux M, Nowak J, Gonzalez CD, Iovanna JL, Vaccaro MI (2007) The pancreatitis-induced vacuole membrane protein 1 triggers autophagy in mammalian cells. *J Biol Chem* **282**: 37124-37133

Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM (2010) Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* **141**: 290-303

Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM (2008) The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* **320**: 1496-1501

Scheu S, Stetson DB, Reinhardt RL, Leber JH, Mohrs M, Locksley RM (2006) Activation of the integrated stress response during T helper cell differentiation. *Nat Immunol* **7**: 644-651

Schmid D, Munz C (2007) Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity* **27**: 11-21

Schnaith A, Kashkar H, Leggio SA, Addicks K, Kronke M, Krut O (2007) Staphylococcus aureus subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death. *J Biol Chem* **282**: 2695-2706

Sendi P, Proctor RA (2009) Staphylococcus aureus as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol* **17**: 54-58

Sher D, Fishman Y, Zhang M, Lebendiker M, Gaathon A, Mancheno JM, Zlotkin E (2005) Hydralysins, a new category of beta-pore-forming toxins in cnidaria. *J Biol Chem* **280**: 22847-22855

Shintani T, Klionsky DJ (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306**: 990-995

Shogomori H, Kobayashi T (2008) Lysenin: a sphingomyelin specific pore-forming toxin. *Biochim Biophys Acta* **1780**: 612-618

Singh SB, Davis AS, Taylor GA, Deretic V (2006) Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* **313**: 1438-1441

Sinha B, Francois PP, Nusse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Herrmann M, Krause KH (1999) Fibronectin-binding protein acts as Staphylococcus aureus invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cell Microbiol* **1**: 101-117

Sinha B, Fraunholz M (2010) Staphylococcus aureus host cell invasion and post-invasion events. *Int J Med Microbiol* **300**: 170-175

Sinha B, Herrmann M (2005) Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by Staphylococcus aureus. *Thromb Haemost* **94**: 266-277

Song L, Hobaugh MR, Shustak C, Cheley S, Bayley H, Gouaux JE (1996) Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* **274**: 1859-1866

Soong G, Martin FJ, Chun J, Cohen TS, Ahn DS, Prince A (2011) Staphylococcus aureus protein A mediates invasion across airway epithelial cells through activation of RhoA GTPase signaling and proteolytic activity. *J Biol Chem* **286**: 35891-35898

Stenmark H, Parton RG, Steele-Mortimer O, Lutcke A, Gruenberg J, Zerial M (1994) Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J* **13**: 1287-1296

Suzuki NN, Yoshimoto K, Fujioka Y, Ohsumi Y, Inagaki F (2005) The crystal structure of plant ATG12 and its biological implication in autophagy. *Autophagy* **1**: 119-126

Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cuaing HD, Sun M, Sato Y, Liang C, Jung JU, Cheng JQ, Mule JJ, Pledger WJ, Wang HG (2007) Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol* **9**: 1142-1151

Takahashi Y, Meyerkord CL, Wang HG (2009) Bif-1/endophilin B1: a candidate for crescent driving force in autophagy. *Cell Death Differ* **16**: 947-955

Taloczy Z, Jiang W, Virgin HWt, Leib DA, Scheuner D, Kaufman RJ, Eskelinen EL, Levine B (2002) Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 190-195

Tan JM, Wong ES, Kirkpatrick DS, Pletnikova O, Ko HS, Tay SP, Ho MW, Troncoso J, Gygi SP, Lee MK, Dawson VL, Dawson TM, Lim KL (2008) Lysine 63-linked ubiquitination promotes the formation and autophagic clearance of protein inclusions associated with neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* **17**: 431-439

Tattoli I, Sorbara MT, Vuckovic D, Ling A, Soares F, Carneiro LA, Yang C, Emili A, Philpott DJ, Girardin SE (2012) Amino Acid starvation induced by invasive bacterial pathogens triggers an innate host defense program. *Cell Host Microbe* **11**: 563-575

Thelestam M, Mollby R (1983) Survival of cultured cells after functional and structural disorganization of plasma membrane by bacterial haemolysins and phospholipases. *Toxicon* **21**: 805-815

Thurston TL, Wandel MP, von Muhlinen N, Foeglein A, Randow F (2012a) Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature*

Thurston TL, Wandel MP, von Muhlinen N, Foeglein A, Randow F (2012b) Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* **482**: 414-418

Tomita T, Kamio Y (1997) Molecular biology of the pore-forming cytolysins from *Staphylococcus aureus*, alpha- and gamma-hemolysins and leukocidin. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**: 565-572

Tooze SA, Yoshimori T (2010) The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol* **12**: 831-835

Touhami A, Jericho MH, Beveridge TJ (2004) Atomic force microscopy of cell growth and division in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **186**: 3286-3295

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354

Tweten RK, Parker MW, Johnson AE (2001) The cholesterol-dependent cytolysins. *Curr Top Microbiol Immunol* **257**: 15-33

Vadlamudi RK, Joung I, Strominger JL, Shin J (1996) p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* **271**: 20235-20237

Valeva A, Hellmann N, Walev I, Strand D, Plate M, Boukhallouk F, Brack A, Hanada K, Decker H, Bhakdi S (2006) Evidence that clustered phosphocholine head groups serve as sites for binding and assembly of an oligomeric protein pore. *J Biol Chem* **281**: 26014-26021

Valeva A, Palmer M, Bhakdi S (1997) Staphylococcal alpha-toxin: formation of the heptameric pore is partially cooperative and proceeds through multiple intermediate stages. *Biochemistry* **36**: 13298-13304

Valeva A, Weisser A, Walker B, Kehoe M, Bayley H, Bhakdi S, Palmer M (1996) Molecular architecture of a toxin pore: a 15-residue sequence lines the transmembrane channel of staphylococcal alpha-toxin. *EMBO J* **15**: 1857-1864

Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Menendez JA (2009) The active form of the metabolic sensor: AMP-activated protein kinase (AMPK) directly binds the mitotic apparatus and travels from centrosomes to the spindle midzone during mitosis and cytokinesis. *Cell Cycle* **8**: 2385-2398

Vijayvargia R, Kaur S, Sangha N, Sahasrabudhe AA, Surolia I, Shouche Y, Krishnasastri MV (2004a) Assembly of alpha-hemolysin on A431 cells leads to clustering of Caveolin-1. *Biochem Biophys Res Commun* **324**: 1124-1129

- Vijayvargia R, Suresh CG, Krishnasastry MV (2004b) Functional form of Caveolin-1 is necessary for the assembly of alpha-hemolysin. *Biochem Biophys Res Commun* **324**: 1130-1136
- von Eiff C, Becker K, Metze D, Lubritz G, Hockmann J, Schwarz T, Peters G (2001) Intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants within keratinocytes: a cause for antibiotic treatment failure in a patient with darier's disease. *Clin Infect Dis* **32**: 1643-1647
- Walev I, Bhakdi SC, Hofmann F, Djonder N, Valeva A, Aktories K, Bhakdi S (2001) Delivery of proteins into living cells by reversible membrane permeabilization with streptolysin-O. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 3185-3190
- Walev I, Hombach M, Bobkiewicz W, Fenske D, Bhakdi S, Husmann M (2002) Resealing of large transmembrane pores produced by streptolysin O in nucleated cells is accompanied by NF-kappaB activation and downstream events. *FASEB J* **16**: 237-239
- Walker B, Bayley H (1995) Key residues for membrane binding, oligomerization, and pore forming activity of staphylococcal alpha-hemolysin identified by cysteine scanning mutagenesis and targeted chemical modification. *J Biol Chem* **270**: 23065-23071
- Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B (2008) JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell* **30**: 678-688
- Wek RC, Jiang HY, Anthony TG (2006) Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* **34**: 7-11
- Wilke GA, Bubeck Wardenburg J (2010) Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 13473-13478
- Wilson MI, Gill DJ, Perisic O, Quinn MT, Williams RL (2003) PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62. *Mol Cell* **12**: 39-50
- Wooten MW, Geetha T, Babu JR, Seibenhener ML, Peng J, Cox N, Diaz-Meco MT, Moscat J (2008) Essential role of sequestosome 1/p62 in regulating accumulation of Lys63-ubiquitinated proteins. *J Biol Chem* **283**: 6783-6789
- Xie Z, Klionsky DJ (2007) Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* **9**: 1102-1109

Yang CS, Lee JS, Rodgers M, Min CK, Lee JY, Kim HJ, Lee KH, Kim CJ, Oh B, Zandi E, Yue Z, Kramnik I, Liang C, Jung JU (2012) Autophagy Protein Rubicon Mediates Phagocytic NADPH Oxidase Activation in Response to Microbial Infection or TLR Stimulation. *Cell Host Microbe* **11**: 264-276

Yang Z, Klionsky DJ (2009) An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* **335**: 1-32

Yang Z, Klionsky DJ (2010) Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 124-131

Yarovinsky TO, Monick MM, Husmann M, Hunninghake GW (2008) Interferons increase cell resistance to Staphylococcal alpha-toxin. *Infect Immun* **76**: 571-577

Yorimitsu T, He C, Wang K, Klionsky DJ (2009) Tap42-associated protein phosphatase type 2A negatively regulates induction of autophagy. *Autophagy* **5**: 616-624

Young JA, Collier RJ (2007) Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. *Annu Rev Biochem* **76**: 243-265

Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, Mohan PS, Mercken M, Farmery MR, Tjernberg LO, Jiang Y, Duff K, Uchiyama Y, Naslund J, Mathews PM, Cataldo AM, Nixon RA (2005) Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* **171**: 87-98

Zakharov SD, Cramer WA (2002) Colicin crystal structures: pathways and mechanisms for colicin insertion into membranes. *Biochim Biophys Acta* **1565**: 333-346

Zheng YT, Shahnazari S, Brech A, Lamark T, Johansen T, Brumell JH (2009) The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *J Immunol* **183**: 5909-5916

Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, Heintz N, Yue Z (2009) Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat Cell Biol* **11**: 468-476

Zinzalla V, Hall MN (2008) Signal transduction: Linking nutrients to growth. *Nature* **454**: 287-288

Anhang A: Bisherige Publikationen

Originalarbeiten

- Kloft N., Neukirch C., Bobkiewicz W., Veerachato G., Busch T., **von Hoven G.**, Boller K., Husmann M. (2010). "Pro-autophagic signal induction by bacterial pore-forming toxins." Med Microbiol Immunol **199**(4): 299-309.
- Kloft N., Neukirch C., **von Hoven G.**, Bobkiewicz W., Weis. S., Boller K., Husmann M. (2012). "A subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 alpha-Phosphatase (CreP/PPP1R15B), regulates membrane traffic." J Biol Chem.
- **von Hoven G.**, Kloft N., Neukirch C., Bobkiewicz W., Weis. S., Boller K., Husmann M. (2012). "Modulation of translation and induction of autophagy by bacterial exoproducts." Med Microbiol Immunol.

Poster und Vorträge

- ETOX 14 European Workshop on Bacterial Protein Toxins, Obernay, France
Juni 2009
Poster
"Elimination of a bacterial protein toxin by sequential endocytosis and exocytosis."
Beckmann E., Kloft N., Tenzer S., **von Hoven G.**, Bobkiewicz W., Neukirch C., Bayley H., Bhakdi S., Husmann M.
- 34th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, University Bonn
März. 2011
Poster
"Bacterial pore forming toxins cause cellular starvation."
Kloft N., Neukirch C., Bobkiewicz, Veerachato G., Busch T., **von Hoven G.**, Boller K., Husmann M.
- Keystone symposia: Autophagy, Whistler, BC, Canada
April 2011
Poster
„Pro-autophagic signal induction by bacterial pore forming toxins“
Kloft N., Neukirch C., Bobkiewicz W., Veerachato G., Busch T., **von Hoven G.**, Boller K., Husmann M.

- ETOX 15 European Workshop on Bacterial Protein Toxins, Oslo, Norway
Juni 2011
Vortrag
“Pro-autophagic signal induction by pore forming toxins.”
Kloft N., Neukirch C., Bobkiewicz W., **von Hoven G.**, Weis S., Boller K., Husmann M.
- DGHM 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e. V., Essen
September 2011
Poster
“Sustained eIF2 α -phosphorylation antagonizes cell autonomous defense against *S.aureus* α -toxin.”
von Hoven G., Kloft N., Neukirch C., Bobkiewicz W., Weis S., Boller K., Husmann M.
Abstract publiziert in Elsevier Science 2011, IJMM International Journal of Medical Microbiology: Volume 301 Supplement 47 Pages 65-65 Published Sept 2011
- Closing Symposium of the SFB 490 – Invasion and Persistence of Infectious Agents; University Medical Center Mainz
März 2012
Vortrag
“Cellular response to attack by *S.aureus* α -toxin”
Kloft N., Neukirch C., Bobkiewicz W., **von Hoven G.**, Weis S., Boller K., Husmann M.
- DGHM 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e. V., Hamburg
September 2012
Poster
„Evidence for a role of ADAM10 for *S.aureus* α -toxin action”
von Hoven G., Neukirch C., Meyenburg M., Meurer N., Husmann M.
Abstract publiziert in Elsevier Science 2012, IJMM International Journal of Medical Microbiology: Volume 302 S1 Pages 71-72 Published Sept 2012

Anhang B: Bildrechte

Die Erlaubnis zur Verwendung der Abbildung 1-2 in der vorliegenden Dissertation wurde von Elsevier Limited durch die Copyright-Lizenz Nr. 2941310127732 des Copyright Clearance Center, Boston, MA, USA erteilt. Originalpublikation: Mizushima, N. and M. Komatsu (2011). "Autophagy: renovation of cells and tissues." Cell **147**(4): 728-741.

Die Erlaubnis zur Verwendung der Abbildung 1-4 in der vorliegenden Dissertation wurde von Elsevier Limited durch die Copyright-Lizenz Nr. 2941801292387 des Copyright Clearance Center, Boston, MA, USA erteilt. Originalpublikation: Moscat, J. and M. T. Diaz-Meco (2011). "Feedback on fat: p62-mTORC1-autophagy connections." Cell **147**(4): 724-727.

Die Erlaubnis zur Verwendung der Abbildung 1-5 in der vorliegenden Dissertation wurde von der American Association for the Advancement of Science durch die Copyright-Lizenz Nr. 2941310659586 des Copyright Clearance Center, Boston, MA, USA erteilt. Originalpublikation: Song, L., M. R. Hobaugh, et al. (1996). "Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore." Science **274**(5294): 1859-1866.

Die Erlaubnis zur Verwendung der Abbildung 4-1 in der vorliegenden Dissertation wurde von John Wiley and Sons durch die Copyright-Lizenz Nr.2941300987750 des Copyright Clearance Center, Boston, MA, USA erteilt. Originalpublikation: Ogawa, M., H. Mimuro, et al. (2011). "Manipulation of autophagy by bacteria for their own benefit." Microbiol Immunol **55**(7): 459-471.

Die Erlaubnis zur Verwendung der Abbildung 4-3 in der vorliegenden Dissertation wurde von der American Association for the Advancement of Science durch die Copyright-Lizenz Nr. 2941310659586 des Copyright Clearance Center, Boston, MA, USA erteilt. Originalpublikation: Song, L., M. R. Hobaugh, et al. (1996). "Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore." Science **274**(5294): 1859-1866.

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle weiteren Abbildungen von mir selbst für die vorliegende Dissertation erstellt und dürfen ohne meine Erlaubnis und die Erlaubnis des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, der Universitätsklinken der Johannes Gutenberg-Universität Mainz nicht anderweitig verwendet oder nachgedruckt werden.