

Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie  
Ludwig-Maximilians-Universität  
München  
Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

**Dynamik adhäsiver und zytoskelettaler Prozesse bei  
der Interaktion von *Staphylococcus aureus* mit  
lebenden Endothelzellen**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der  
Fakultät für Biologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität  
München

von  
Andreas Sönke Schröder  
aus  
Duisburg

München 2006

**Dynamik adhäsiver und zytoskelettaler Prozesse  
bei der Interaktion von *Staphylococcus aureus* mit  
lebenden Endothelzellen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
an der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von:  
Dipl.-Biol. Andreas Sönke Schröder  
aus Duisburg

Dekan	Prof. Dr. Jürgen Soll
Erstgutachter:	Prof. Dr. H. Leonhardt
Zweitgutachter:	Prof. Dr. M. Schleicher
Sondergutachter:	Prof. Dr. M. Aepfelbacher

Eingereicht am: 31.07.2006

Tag der mündlichen Prüfung: 6.12.2006

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel erarbeitet.

München, den 31.07.06

gez. Andreas S. Schröder

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2002 bis Dezember 2005 am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. M. Aepfelbacher erstellt.

Die Arbeit wurde betreut und vor der biologischen Fakultät vertreten durch Prof. Dr. H. Leonhardt (Institut für Humangenetik, Department II für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München). Die Arbeit wurde teilweise durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Die Zeit ist mein Besitz, mein Acker ist die Zeit.  
(Johann Wolfgang von Goethe)

*Für meine Eltern, die mich meinen Weg haben gehen lassen, und meinen Bruder,  
der mir dabei ein Vorbild war.*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Staphylococcus aureus</b>	<b>1</b>
1.1.1. Klassifizierung	1
1.1.2. Das Genom von <i>S. aureus</i>	2
1.1.3. Kapsel und Zellwand	3
1.1.4. Zellwandassoziierte Oberflächenproteine	3
1.1.4.1. Fibronektin-bindendes Protein A	4
<b>1.2. Extrazelluläre Matrix</b>	<b>4</b>
1.2.1. Fibronektin	5
1.2.1.1. Interaktion von Fibronektin mit dem Fibronektin- bindenden Protein A	6
<b>1.3. Das Endothel</b>	<b>7</b>
<b>1.4. Zell-Matrix-Interaktion</b>	<b>8</b>
1.4.1. Fokale Komplexe und -Adhäsionen	9
1.4.2. Fibrilläre Adhäsionen	9
1.4.2.1. Tensin als Marker für fibrilläre Adhäsionen	10
<b>1.5. Das Aktin-Zytoskelett</b>	<b>11</b>
1.5.1. Arp2/3 Komplex	11
1.5.2. WASP-Familie	12
1.5.3. Rho-GTPasen	12
<b>1.6. Endozytosevorgänge</b>	<b>13</b>
1.6.1. Clathrin-abhängige Endozytose	13
1.6.2. Caveolin-abhängige Endozytose	14
1.6.3. Makropinozytose	15
1.6.4. Phagozytose	15
1.6.4.1. Phagozytose-Rezeptoren	16
1.6.4.2. Phagozytose und das Aktin-Zytoskelett	17

---

1.6.4.3.	Reifung des Phagosoms	17
<b>1.7.</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>19</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
<b>2.1.</b>	<b>Allgemeine Laborausstattung</b>	<b>20</b>
2.1.1.	Videomikroskopische Ausstattung	21
2.1.2.	Epifluoreszenzmikroskop	22
<b>2.2.</b>	<b>Wissenschaftliche Software</b>	<b>22</b>
<b>2.3.</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>23</b>
<b>2.4.</b>	<b>Kitsysteme</b>	<b>23</b>
<b>2.5.</b>	<b>Enzyme</b>	<b>23</b>
<b>2.6.</b>	<b>Primäre Antikörper</b>	<b>23</b>
<b>2.7.</b>	<b>Sekundäre Antikörper</b>	<b>24</b>
<b>2.8.</b>	<b>Vektoren</b>	<b>24</b>
2.8.1.	Kommerziell erworbene Plasmide	24
2.8.2.	Eigene Konstrukte und Konstrukte von Kooperationspartnern	25
<b>2.9.</b>	<b>„Primer“</b>	<b>25</b>
<b>2.10.</b>	<b>Bakterienstämme</b>	<b>26</b>
2.10.1.	Nährmedien und Zusätze	26
<b>2.11.</b>	<b>Zellen</b>	<b>27</b>
2.11.1.	Zellkulturmedien und Zusätze	27
<b>2.12.</b>	<b>Methoden</b>	<b>27</b>
2.12.1.	Arbeiten mit Proteinen	27
2.12.1.1.	Proteinexpression und Aufreinigung von GST- Fusionsproteinen	27
2.12.1.2.	Proteinbestimmung	28

---

2.12.1.3.	Aufkonzentration und Kryokonservierung	29
2.12.1.4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
2.12.1.5.	„Blotten“ und Detektion der Proteine	30
2.12.1.6.	Coomassie-Färbung von Acrylamidgelen	31
2.12.1.7.	Beschichten von Latexkügelchen mit Proteinen	32
2.12.2.	Arbeiten mit Nukleinsäuren	32
2.12.2.1.	DNA-Präparation – Isolierung von Nukleinsäuren	32
2.12.2.2.	Messung von DNA-Konzentrationen	32
2.12.2.3.	Restriktionsverdau	33
2.12.2.4.	Dephosphorylierung	33
2.12.2.5.	Ligation	34
2.12.2.6.	Allgemeiner PCR-Ansatz	34
2.12.2.7.	Bakterien-PCR	35
2.12.2.8.	Gelelektrophorese	35
2.12.2.9.	Sequenzierung	36
2.12.3.	Mikrobiologische Methoden	36
2.12.3.1.	Kultivierung von Bakterien auf festen Medien	36
2.12.3.2.	Kultivierung von Bakterien in flüssigen Medien	36
2.12.3.3.	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i>	37
2.12.3.4.	Hitzeschocktransformation von <i>E. coli</i>	37
2.12.3.5.	Kryokonservierung von Bakterien	37
2.12.4.	Arbeiten in der Zellkultur	38
2.12.4.1.	Beschichtung von Zellkulturgefäßen mit Gelatine	38
2.12.4.2.	Isolierung humaner Nabelschnurvenen Endothelzellen	38
2.12.4.3.	Kultivierung von Zellen	38
2.12.4.4.	Bestimmung der Zellzahl	39
2.12.4.5.	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	39

---

2.12.4.6.	Aussäen von Zellen auf Deckgläschen oder Glasbodenschalen	39
2.12.4.7.	Transfektion	40
2.12.4.8.	Mikroinjektion	40
2.12.4.9.	Infektionsversuche mit Bakterien oder beschichteten Kügelchen	41
2.12.4.10.	Modulierende und inhibierende Substanzen	42
2.12.5.	Mikroskopische Methoden	42
2.12.5.1.	Fixierung und Permeabilisierung von Zellen	42
2.12.5.2.	Färbung mittels spezifischer Antikörper	42
2.12.5.3.	Innen-/Außenfärbung	43
2.12.5.4.	Fluoreszenzmikroskopie	43
2.12.5.5.	Videomikroskopie	43
2.12.5.6.	Bildanalyse und –bearbeitung	44
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1.	<b>Das Modellsystem für die Interaktion von <i>S. aureus</i> mit Endothelzellen</b>	<b>45</b>
3.2.	<b>FnBPA-vermittelte Adhäsion und Internalisierung von Staphylokokken durch primäre humane Endothelzellen</b>	<b>46</b>
3.3.	<b>Abhängigkeit der FnBPA vermittelten <i>S. aureus</i>-Internalisierung von Plasma- oder zellulärem Fibronektin</b>	<b>48</b>
3.4.	<b>Charakterisierung der durch FnBPA induzierten Adhäsionsstrukturen auf der Oberfläche von Endothelzellen</b>	<b>51</b>
3.5.	<b>FnBPA-vermittelte Bewegung von Staphylokokken auf der Oberfläche von Endothelzellen</b>	<b>56</b>

<b>3.6.</b>	<b>Einfluss der Tensin-Modulation auf den Transport FnBPA-beschichteter Polystyrol-Kügelchen auf der Oberfläche von Endothelzellen</b>	<b>57</b>
<b>3.7.</b>	<b>Auswirkung der FnBPA-vermittelten <i>S. aureus</i>-Adhäsion auf die subkortikale Aktindynamik</b>	<b>59</b>
<b>3.8.</b>	<b>Kontrolle der Internalisierung von <i>FnBPA-S. aureus</i> durch Aktin-Regulatoren</b>	<b>63</b>
<b>3.9.</b>	<b>FnBPA-induzierte Aktinschweife</b>	<b>65</b>
<b>3.10.</b>	<b>Dynamik von Aktin und Tensin bei der FnBPA-vermittelten Phagozytose</b>	<b>70</b>
<b>3.11.</b>	<b>Alternierende Rab5- und Aktin-Akkumulation an FnBPA-exprimierenden Bakterien</b>	<b>72</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>74</b>
<b>4.1.</b>	<b>Kinetik der FnBPA-vermittelten Invasion</b>	<b>74</b>
4.1.1.	Abhängigkeit der <i>FnBPA-S. aureus</i> Adhäsion und Internalisierung von Fibronectin	75
4.1.2.	Unterschiede zwischen den von Invasin und FnBPA induzierten Adhäsionsstrukturen	75
<b>4.2.</b>	<b>FnBPA-abhängiger Transport auf der Zelloberfläche</b>	<b>76</b>
<b>4.3.</b>	<b>Modulation FnBPA-abhängiger Adhäsionsstrukturen durch Tensin</b>	<b>78</b>
<b>4.4.</b>	<b>FnBPA-induzierte Aktindynamik</b>	<b>79</b>
4.4.1.	Einfluss der Modulation des Aktinzytoskeletts auf die Internalisierung von <i>FnBPA-S. aureus</i>	79
4.4.2.	Internalisierung von <i>FnBPA-S. aureus</i>	80
<b>4.5.</b>	<b>Ausblick</b>	<b>81</b>

---

<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>82</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>84</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis und Einheiten</b>	<b>101</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>103</b>
8.1. Filme auf der Video-CD	103
<b>9. Danksagung</b>	<b>105</b>
<b>10. Lebenslauf</b>	<b>106</b>
<b>11. Publikationsliste</b>	<b>107</b>

## 1. Einleitung

Infektionskrankheiten stellen weltweit die häufigste Todesursache dar (Hellenbrand, 2003). Die Zunahme multiresistenter Keime in Hospitälern westlicher Industrieländer ist verbunden mit einem erheblichen Anstieg nosokomialer, das heißt im Krankenhaus erworbener Infektionen (Stefani et al., 2003).

Zu den wichtigsten Auslösern nosokomialer Infektionen zählt die Gattung der *Staphylokokken*, die exogen als Folge unzureichender Hygienemaßnahmen vom Personal oder anderen Patienten übertragen werden oder endogenen Reservoirs entstammen. Im letzten Fall werden Keime der patienteneigenen Flora infektiös (Gefferis et al., 2002). Besonders bei immunsupprimierten Patienten, z.B. HIV- oder Transplantationspatienten, stellt die endogene Infektion ein nicht seltenes Ereignis dar (Kluytmans et al., 1997; Nguyen et al., 1999; von Eiff et al., 2001).

Staphylokokken sind kommensale Keime der Hautflora. Circa 30 verschiedene Staphylokokkenarten besiedeln artabhängig bestimmte Hautregionen des menschlichen Körpers. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), dessen ökologische Nische feuchtere Hautpartien, insbesondere der Nasenvorhof (vestibulum nasi), sind, zählt zu den klinisch wichtigen Staphylokokken-Arten. Durch operative Eingriffe oder Katheterisierung hervorgerufene Verletzungen können zur Folge haben, dass virulente Keime in die Blutbahn gelangen und schwere Erkrankungen wie z.B. Bakteriämie, Sepsis oder Endocarditis hervorrufen können (Bearman et al., 2005).

Die Pathogenität von *S. aureus* wird durch die Kombination verschiedener Virulenzfaktoren bestimmt, zu denen Adhäsine, Toxine und verschiedene Enzyme gehören. Bislang sind mehr als 40 verschiedene Oberflächen- und sezernierte Proteine bekannt, die virulenzfördernd wirken (Arvidson et al., 2001; Lowy, 1998). Adhäsine stellen die entscheidenden Virulenzfaktoren für die Etablierung einer Infektion dar, da sie die Matrix-spezifische Verankerung an das Wirtsgewebe ermöglichen. Zu den wichtigsten Liganden gehört das Glykoprotein Fibronectin, ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix, das als Ligand für Adhäsine verschiedener Bakterienarten, u. a. auch Streptokokken und Staphylokokken, fungiert.

Die Adhäsion ist der Schlüsselschritt für die Kolonisierung des Wirtes und Aufrechterhaltung der Infektion.

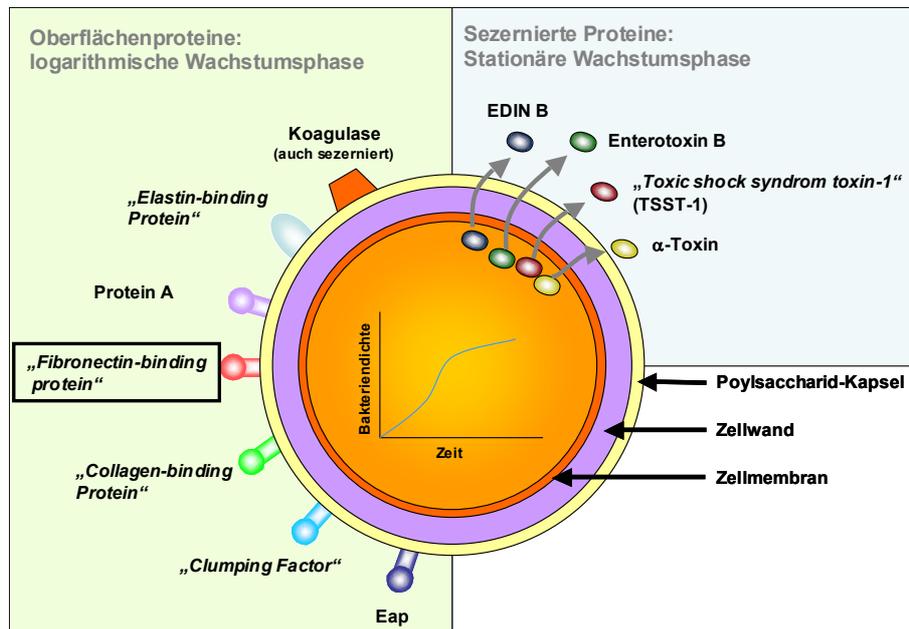
### 1.1. *Staphylococcus aureus*

#### 1.1.1. Klassifizierung

*Staphylococcus aureus* zählt zu den fakultativ anaeroben, Gram-positiven Kokken aus der Familie der *Staphylococcaceae* (früher *Micrococcaceae*). Die ca. 0,5 µm – 1,0 µm großen Bakterien sind unbeweglich und gehören zu den nicht-sporenbildenden Bakterien. Durch Teilungen in unterschiedlichen Zellebenen entstehen traubenähnliche Bakterien-Aggregate, da nach der Teilung die Zellwände der Tochterzellen nicht vollständig voneinander separiert werden.

Die meist gelblich-goldene Färbung, die Kolonien auf festen Nährböden annehmen, ist namensgebend für die Art. Pathogene *S. aureus*-Stämme sind halotolerant, temperaturresistent (Vijaranakul et al., 1997) und zeichnen sich vor allem durch

Sezernierung von Koagulase aus, wodurch sie in der Lage sind, Blut zu verklumpen (schem. Darstellung s Abb. 1.1. A)



**Abb. 1.1.: Struktur und Virulenzfaktoren von *S. aureus***

(A) Dargestellt sind Oberflächen- und sezernierte Proteine. Deren Synthese ist in vielen Fällen abhängig von der Wachstumsphase

Abbildung modifiziert nach Lowy (1998).

### 1.1.2. Das Genom von *S. aureus*

Das Genom bakterieller Spezies setzt sich aus dem sogenannten Kerngenom, und dem akzessorischen Genom zusammen, sowie aus fremden in das Genom integrierten Genen. Als Kerngenom wird der Teil des bakteriellen Erbgutes angesehen, der in mehr als 95% aller Isolate einer Spezies vorkommt. Zum akzessorischen Genom zählen Gene, die in 1-95% der Isolate vorhanden sind, wohingegen fremde in das Genom integrierte Gene in weniger als einem Prozent der Isolate vorkommen (Lan et al., 2000).

Bislang wurde das Genom von sieben *S. aureus*-Stämmen sequenziert, unter denen sich auch fünf klinische Isolate befanden. Sequenzanalysen dieser fünf Stämme haben gezeigt, dass deren Kerngenom 75% der gesamten Erbinformation umfasst und auf Proteinebene eine Sequenzhomologie zwischen 98%-100% aufweist. Es liegt in weiten Teilen kollinear vor, d.h. die Abfolge der Gene ist annähernd identisch. Die Gesamtgröße des Kerngenoms variiert zwischen 2.820 Mb bis 2.903 Mb (Lindsay et al., 2004), wobei die Mehrheit der das Kerngenom umfassenden Gene für Proteine, die essentiell für den zentralen Metabolismus sind, kodiert, zusätzlich aber auch für sogenannte MSCRAMMs (s. u.), Toxine, Exoenzyme und den für die Biosynthese der Kapsel (s. u.) kodierenden Gencluster.

Das akzessorische Genom macht bei *S. aureus* ca. 25% des gesamten Erbgutes aus. Dazu zählen vorwiegend mobile oder „ehemals“ mobile genetische Elemente,

z.B. inserierte Bakteriophagen, Pathogenitätsinseln, chromosomale Kassetten, genomische Inseln, Plasmide und Transposons, von denen einige in hoher Frequenz zwischen unterschiedlichen Stämmen ausgetauscht werden können. Viele dieser Elemente kodieren für Virulenzfaktoren oder Resistenzen. Die hohe Klonalität von *S. aureus* in Populationen, wie man sie z.B. in Isolaten aus Hospitälern vorfindet, wird auf einen Selektionsvorteil zurückgeführt, den diese Stämme durch Aufnahme einer Kombination bestimmter akzessorischer Gene gewinnen (Moore et al., 2001; Peacock et al., 2002).

### 1.1.3. Kapsel und Zellwand

Circa 90% aller klinischen Isolate sind von einer Polysaccharid-Kapsel umgeben, die antiphagozytisch und somit Virulenz-verstärkend wirkt (Karakawa et al., 1985; Thakker et al., 1998). Bei Kultivierung der Stämme in flüssigen Medien geht diese aber meist verloren. Die darunter liegende Zellwand ist ca. 20-40 nm dick und besteht aus Glykansträngen, die sich aus alternierend  $\beta$ -1-4-glykosidisch verknüpften N-Acetylmuraminsäure- und N-Acetylglucosamin-Einheiten zusammensetzt. Dieses Peptidoglykangerüst macht etwa 50% der Zellwandmasse aus (Lowy, 1998). An die Laktylreste der N-Acetylmuraminsäure sind über eine Amidbindung Pentapeptidketten gebunden, die untereinander über eine Pentaglycinkette miteinander verbunden sind und so ein dreidimensionales molekulares Netz entstehen lassen (Navarre et al., 1999). Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Zellwand ist Teichonsäure, die ca. 40% der Zellwandmasse ausmacht (Harris et al., 2002). Die Teichonsäure von *S. aureus* besteht aus einer Verkettung von ca. 40 Ribosephosphat-Untereinheiten, die mit N-Acetylglucosamin und D-Alanin modifiziert sind (Endl et al., 1983). Neue Untersuchungen haben gezeigt, dass die Zellwandteichonsäure für die Adhäsion der Bakterien an die keratinisierten Epithelzellen der menschlichen Nase und somit essentiell für deren Kolonisierung verantwortlich ist (Weidenmaier et al., 2004).

### 1.1.4. Zellwandassoziierte Oberflächenproteine

Die meisten mit der Zellwand von Staphylokokken verankerten Oberflächenproteine besitzen eine ähnliche Primärstruktur. Aminoterminal findet sich eine ca. 40 Aminosäuren lange Signalsequenz, die für die Proteinsekretion essentiell ist. Der Aminoterminal ist extrazellulär exponiert und enthält meist die für die Interaktion mit den Liganden verantwortlichen Domänen. Am Carboxy-Terminus befindet sich eine die Zellwand permeierende Domäne, die entweder einen Prolin- und Glycin-reichen Abschnitt oder eine Serie von Serin-Asparaginsäure-Dipeptid Wiederholungen umfasst.

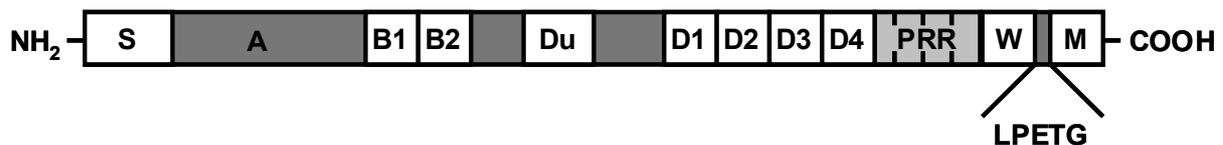
Oberflächenproteine, deren Funktion es ist, die Adhäsion der Staphylokokken an ein Substrat, meistens Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM), zu vermitteln, bezeichnet man als MSCRAMMs, „*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*“ (Patti et al., 1994). Diese Adhäsine sind wichtige Virulenzfaktoren von *S. aureus*, da sie die Kolonisierung des Wirtsgewebes durch die Bakterien ermöglichen. Ein einziges MSCRAMM kann unterschiedliche Liganden der EZM erkennen und gleichzeitig kann ein Matrixmolekül von unterschiedlichen *S. aureus*-Adhäsinen erkannt werden (Harris et al., 2002). Eine vergleichbare

Variabilität in der Rezeptor-Liganden-Interaktion findet man innerhalb der Eukaryonten zum Beispiel zwischen Integrinen und ihren Liganden (Hynes, 2002).

### 1.1.4.1. Fibronektin-bindendes Protein A

Die Fähigkeit von *S. aureus*, an Fibronektin zu adhären, wurde von Kuusela bereits im Jahre 1978 beschrieben (Kuusela, 1978). Als primäre Rezeptoren wurden später die Fibronektin-bindenden Proteine A und B („*fibronectin-binding protein A/B*“; FnBPA/B) identifiziert und charakterisiert (Flock et al., 1987; Fröman et al., 1987; Jonsson et al., 1991; Signas et al., 1989). Mittlerweile wurden bei einer Reihe unterschiedlicher Staphylokokken- und Streptokokken-Arten Fibronektin-bindende Proteine beschrieben, die in ihrem Aufbau und der Domänenorganisation dem FnBPA von *S. aureus* sehr ähneln (siehe Abb. 1.1. B) (Joh et al., 1999).

FnBPA hat ein Molekulargewicht von ca. 100 kDA und seine Domänenstruktur entspricht dem in Kapitel 1.1.4. beschriebenen Schema zellwandassoziiierter Oberflächenproteine. Aminoterminal schließt sich dem Sekretionssignal eine Domänenstruktur mit der Abfolge A, B1/B2, DU, D1-D4 an, worauf die für die Verankerung des Proteins in der Zellwand und –membran notwendigen Domänen folgen. Die Interaktion mit Fibronektin erfolgt primär über die Domänen B1 bis D4 und ist unter Punkt 1.2.1.1. im Detail beschrieben.



**Abb. 1.1.: Domänenstruktur des Fibronektin-bindenden Proteins (FnBPA) von *Staphylococcus aureus*.**

- (B) Ausgehend vom Aminoterminal (NH<sub>2</sub>) finden sich folgende Domänen: S: Signalpeptid; A-D: Domänen/Sequenzwiederholungen (s. 1.2.1.1.); PRR: Prolinreiche Region; W: Zellwand-permeierende Domäne; M: Membran-permeierende Domäne; LPETG: Motiv für die Verankerung des Proteins an der Zellwand; (geschrieben in der „Ein-Buchstaben-Abkürzung“ für Aminosäuren: Leucin, Prolin, Glutamat, Threonin, Glycin)

Abbildung modifiziert nach Schwarz-Linek (2004a).

## 1.2. Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix wird aus großen Glykoproteinen gebildet, die sich zu Fibrillen oder komplexen makromolekularen Netzen zusammensetzen. Diese Matrix dient als Verankerungspunkt für viele verschiedene Zelltypen wie Fibroblasten, Chondrozyten, Osteoblasten und Endothelzellen und wird durch diese permanent neu gebildet und reorganisiert. EZM-Proteine lassen sich unterteilen in strukturgebende Proteine wie Kollagen und Elastin, sowie Proteoglykane, die der

EZM eine gewisse Viskosität verleihen und spezialisierte Proteine wie Laminin, Fibrillin und Fibronectin, die Bestandteil der Basallamina vieler verschiedener Gewebetypen sind (Gumbiner, 1996).

### 1.2.1. Fibronectin

Fibronectin (Fn) ist ein ubiquitär vorkommendes Glykoprotein der extrazellulären Matrix. Es wird als lösliches Fibronectin-Dimer sezerniert und ist sowohl Bestandteil des Plasmas (ca. 300 mg/ml) als auch anderer Körperflüssigkeiten. In unlöslicher Form wird Fn in die EZM eingebaut, ist aber darüber hinaus auch an der Unterseite von Zellen an der Bildung von Adhäsionsstrukturen beteiligt. Über die Interaktion mit Fn werden eine Reihe zellulärer Funktionen wie Adhäsion, Migration, Wachstum und Entwicklung gesteuert (Pankov et al., 2002).

Die beiden nahezu identischen Untereinheiten von Fn sind ca. 250 kDa groß und am Carboxy-Terminus über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden. Jedes Fn-Monomer ist aus Wiederholungen von drei unterschiedlichen Modulen aufgebaut (Abb. 1.2. A), die als Fn I, Fn II und Fn III bezeichnet werden (Pankov et al., 2002). Fibronectin besteht aus 12 Fn I, zwei Fn II und 15 Fn III Modulen, die zusammen ca. 90% des Gesamtproteins ausmachen. Für bestimmte Gruppen dieser Sequenzmodule wurde die Interaktion mit einer Reihe von Proteinen beschrieben wie z.B. Kollagen, Fibrin, Heparin und verschiedenen Integrinen, aber auch homotypische Interaktion und Interaktion mit bakteriellen Adhäsinen wurden dokumentiert.

Durch alternatives Spleißen sind beim Menschen bis zu 20 verschiedene Fn-Varianten möglich, die unterschiedliche Funktionen wahrnehmen können (French-Constant, 1995). Die wichtigsten Varianten, EDA („*extra domain A*“ oder EIIIA, EDI), EDB („*extra domain B*“ oder EIIIB, EDII) und IIICS („*type III containing segment*“ oder V=“*variable in length*“), kommen durch Spleißen im zentralen Bereich der Typ III Module zwischen Fn III<sub>7</sub> und Fn III<sub>15</sub> vor (s. Abb. 1.2. A). In Plasma-Fn, das vorwiegend durch die Hepatozyten in der Leber gebildet wird, fehlen die EDA und EDB enthaltenden Spleiß-Varianten fast vollständig. Spleißvarianten aus zellulärem Fn und Plasma-Fn können synergistisch Funktionen übernehmen, die jedes für sich nicht wahrnehmen könnte.

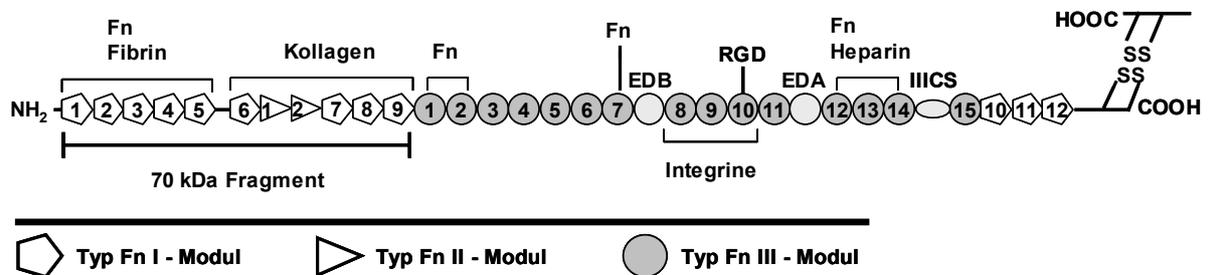
Lösliches Fibronectin liegt in einer inaktivierten, kompakten Form vor, die nicht in Fn-Fibrillen eingebaut werden kann (Erickson et al., 1983; Johnson et al., 1999; Rocco et al., 1983; Williams et al., 1982). Als Schlüsselschritt für den Einbau löslichen Fns in die EZM wird die Aktivierung des Dimers durch Integrinbindung, meist den Hauptliganden, das  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin, angesehen<sup>1</sup>. Die Erkennung der Liganden erfolgt hauptsächlich über die zentral in dem Fn III<sub>10</sub>-Modul gelegene RGD-Sequenz (Hynes, 2002; Ruoslahti et al., 1987), wobei für diese Interaktion Sequenzabschnitte aus dem benachbarten Fn III<sub>9</sub>-Modul notwendig sind (Bowditch et al., 1994; Nagai et al., 1991). Die dabei induzierte Konformationsänderung führt vermutlich dazu, dass das in inaktivierter Form kompakte Molekül in eine ausgestreckte Form überführt wird und so vorher maskierte Domänen für die Fn-Fn-Interaktion frei werden (Bushuev et al., 1985; Erickson et al., 1983; Khan et al., 1990; Ugarova et al., 1996).

---

<sup>1</sup> Spekuliert wir auch über eine Aktivierung durch andere Liganden wie z.B. bakterielle Adhäsine (Schwarz-Linek et al., 2004a)

Für die Fn-Fn-Interaktion und Matrixbildung ist auch die aminoterminal gelegene sogenannte Assemblierungs-Domäne notwendig, das aminoternale 70 kDa Fragment (Sechler et al., 1998; Sottile et al., 1991; Sottile et al., 1997).

**A**



**Abb. 1.2.: Schematische Darstellung der Organisation von Fibronectin.**

(A) Skizzierung der drei verschiedenen Fn-Module (Fn I-Fn III) und der unterschiedlichen Spleißvarianten. Am Carboxy-Terminus ist die homophile Interaktion über Disulfidbrücken schematisch dargestellt.

Fn: Fibronectin; EDA/EDB: Spleißvarianten, „*extra domain A/B*“; IIICS: Spleißvariante, „*type III containing segment*“; RGD: Bindestelle für Integrine, geschrieben in der „Ein-Buchstaben-Abkürzung“ für: Arginin, Glycin, Aspartat.

Abbildung modifiziert nach Schwarz-Linek (2004a).

### 1.2.1.1. Interaktion von Fibronectin mit dem Fibronectin-bindenden Protein A

Es konnte bereits 1978 gezeigt werden, dass die FnBPA-vermittelte Adhäsion von *S. aureus* über eine Interaktion mit den Fn I Modulen von Fn erfolgt (Kuusela, 1978). Ein exakteres Modell für die Fn-Interaktion von FnBPA wurde von Schwarz-Linek in Analogie zu dem Fn-bindenden Protein SfbI von *S. pyogenes* aufgestellt (Schwarz-Linek et al., 2003). Anhand der Analogie zu SfbI wurde die Sequenz von FnBPA im Bereich der Domänen B1 bis D4 in 11-Untereinheiten unterteilt, von denen jedes eine mutmaßliche Fn-Bindestelle für ein Fn I-Modul darstellt.

Jedes Fn I-Modul besteht aus einem doppelsträngigen  $\beta$ -Faltblatt über einem dreisträngigen  $\beta$ -Faltblatt. Durch die Bindung des FnBPA wird ein vierter antiparalleler  $\beta$ -Faltblatt-Strang angelagert. Da die Interaktion der beiden Proteine über zwei hintereinander liegende Fn I-Modulen erfolgt, spricht man von einem „*tandem- $\beta$ -zipper*“-Modell. Die Interaktion der Proteine erfolgt über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen. Nach diesem Modell erfolgt die Bindung von FnBPA an die Typ I-Module des Fn im Bereich Fn I<sub>1-5</sub> (s. Abb. 1.2. B-C).

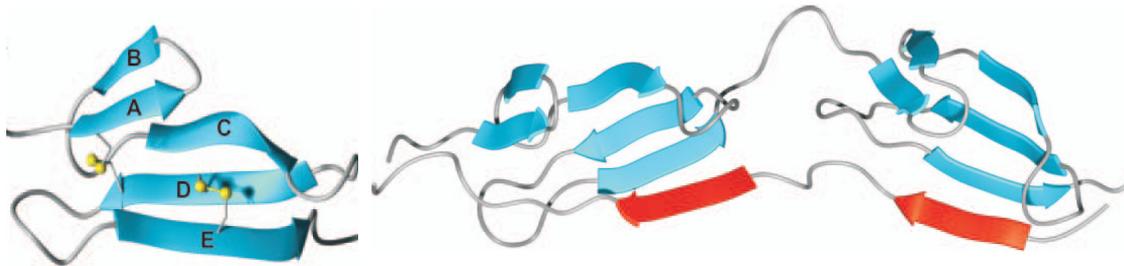
Durch das FnBPA können auch mehrere Fn-Moleküle gebunden werden (Fröman et al., 1987; Huff et al., 1994). Zusätzlich zu den carboxyterminalen D-Domänen sind bei dieser Interaktion noch andere Sequenzabschnitte von FnBPA beteiligt. So konnte für den sequenzaufwärts gelegenen Sequenzabschnitt, der die Domänen Du

und B1-B2 umfasst, ebenfalls eine Interaktion mit dem Aminoterminus nachgewiesen werden (Fowler et al., 2000; Joh et al., 1998; Massey et al., 2001).

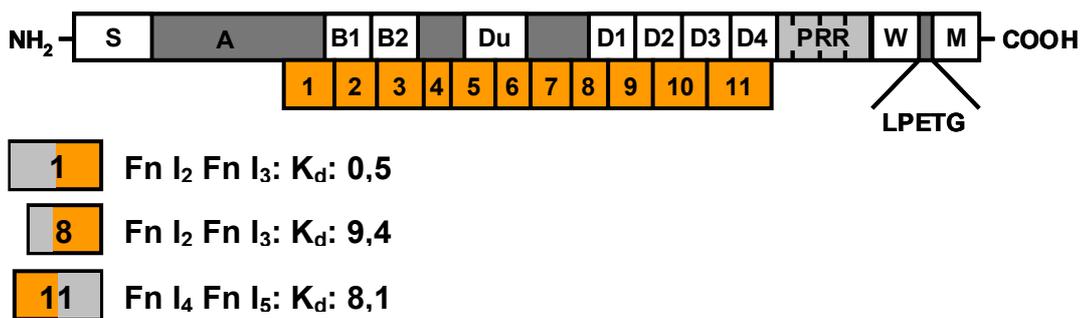
**B**

**Fn I-Modul**

**„tandem- $\beta$ -zipper“**



**C**



**Abb. 1.2.: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen Fn und FnBPA.**

- (B) (**links**) Modell für die Organisation eines Fn I-Modules, A-E zeigen die  $\beta$ -Faltblattstrukturen. (**rechts**) „tandem- $\beta$ -zipper“-Modell: zwei Fn I-Module (blau) liegen über zwei antiparallel verlaufenden FnBPA  $\beta$ -Faltblattstrukturen (rot).
- (C) (**oben**) Schematische Darstellung des FnBPA (wie Abb.1.2. A) mit eingezeichneten putativen Fn-Bindestellen (1-11, orange). (**unten**) In den Kästchen sind die berechneten Fn-Bindestellen dargestellt, in orange die experimentell überprüften Fn-Interaktionsdomänen. Die Dissoziationskonstanten für die mit diesen Sequenzabschnitten getesteten Fn I-Modulen sind rechts daneben angegeben.

Abbildung modifiziert nach Schwarz-Linek (2003).

**1.3. Das Endothel**

Als Grenzgewebe zwischen dem Blutstrom und dem Gewebe kleiden Endothelzellen die Blutgefäße des menschlichen Körper einschichtig aus und erfüllen je nach Lokalisation Organ- oder Gewebe-spezifische Funktionen (Ruoslahti et al., 2000). Die Hauptfunktionen des Endothels sind die Aufrechterhaltung einer semipermeablen Barriere zwischen Blut und angrenzendem Gewebe,

Aufrechterhaltung eines homöostatischen Gleichgewichtes und Regulation des Blutdruckes durch Modulation des vaskulären Tonus. Endothelien sind an Prozessen wie Blut-Koagulation bei Verletzungen, Fibrinolyse und Wundheilungsprozessen beteiligt.

Gewebespezifische Merkmale, die zu der Identifizierung von Endothelien herangezogen werden sind die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM („*intercellular adhesion molecule*“) und VCAM („*vascular cell adhesion molecule*“) auf der Zelloberfläche und E-cadherin an Zell-Zell-Kontakten (Dejana, 1996; Pober et al., 1986). Als weitere Charakteristika gelten das Vorhandensein von Weibel-Palade-Körperchen, kleinen langgestreckten Organellen, die von Willebrand-Faktor (vWF) speichern und diesen nach Zellaktivierung sezernieren (Weibel et al., 1964). Weiterhin die Fähigkeit das *Ulex europaeus* Lektin Agglutinin I zu binden und azetyliertes LDL („*low density lipoprotein*“) aufzunehmen (Holthofer et al., 1982; Voyta et al., 1984), sowie eine hohe Aktivität des Enzymes ACE- („*angiotensin-converting enzyme*“) (Johnson et al., 1977).

Die Permeabilität des Endothels ist in hohem Maße abhängig von dem Abstand der Endothelzellgrenzen zueinander. Kontraktion der Zellen führt zu einer Vergrößerung des interzellulären Spaltes und somit zu einer verstärkten endothelialen Permeabilität (Aepfelbacher et al., 2001). Über spezifische Adhäsionsstrukturen, welche die Zelle an die basale extrazelluläre Matrix koppeln, kann die für die Kontraktion notwendige Zugspannung aufgebaut werden.

#### 1.4. Zell-Matrix-Interaktion

Die Interaktion adhärenter Zellen mit der extrazellulären Matrix erfolgt über verschiedene an der ventralen Plasmamembran gelegene Adhäsionskomplexe. Diese nur einige Quadratmikrometer großen Adhäsions- und Signalorganellen verbinden Zellmembran und EZM bis auf einen ca. 10-15 nm großen Spalt miteinander. Anhand der Form und subzellulären Lokalisation der Strukturen kann man zwischen fokalen Kontakten/fokalen Adhäsionen, fokalen Komplexen und fibrillären Adhäsionen (Katz et al., 2000; Zamir et al., 1999) unterscheiden (s. u.). Eine weitere, allerdings auf Monozyten, Makrophagen und Osteoklasten beschränkte Adhäsionsstruktur stellen die Podosomen dar (Linder et al., 2003). Jede dieser Strukturen wird durch eine spezifische Zusammensetzung aus extrazellulären Liganden und zytoplasmatischen Proteinen definiert. Bisher wurden mehr als 50 verschiedene Proteine beschrieben, die an diese „Submembranplaques“ lokalisieren, wobei die Zusammensetzung der verschiedenen Proteine nicht nur von der Art der Adhäsionsstruktur, sondern auch von dem Zelltyp abhängig ist.

Die an den Adhäsionen lokalisierenden Proteine lassen sich in verschiedene Klassen einteilen: Proteine der EZM und deren Rezeptoren, unter denen die Integrine die Hauptrezeptoren darstellen; zytoskelettale Komponenten, die direkt oder indirekt an der Aktin-Nukleation oder -Bündelung beteiligt sind oder als „*capping*“-Proteine fungieren (Tensin, Vinculin, Paxillin,  $\alpha$ -Actinin, Parvin/Actopaxin und Talin). Weiterhin Tyrosin-Kinasen (Src, FAK, PYK2, Csk und Abl), Serin-Threonin-Kinasen (ILK, PKC and PAK), Modulatoren kleiner GTPasen (ASAP1, Graf und PSGAP), Tyrosin-Phosphatasen (SHP-2 und LAR PTP) und andere Enzyme (PI 3-kinase Calpain II, Proteasen).

### 1.4.1. Fokale Komplexe und -Adhäsionen

Fokale Komplexe sind kleine, punktähnliche Adhäsionen, die ausschließlich an Rändern von Lamellipodien oder am Vorderende migrierender Zellen lokalisieren (Clark et al., 1998; Nobes et al., 1995; Rottner et al., 1999). Es sind kurzlebige Strukturen, deren Bildung durch Rac induziert wird (Clark et al., 1998; Nobes et al., 1995) und die mit  $\beta$ 3-Integrin, Vinculin, Paxillin und  $\alpha$ -Actinin angereichert sind (Laukaitis et al., 2001). Fokale Komplexe und fokale Adhäsionen sind in der molekularen Zusammensetzung sehr ähnlich. Der Hauptunterschied zwischen beiden beruht neben ihrer Form, Größe und Lokalisation auf dem Fehlen der Proteine Tensin und Zyxin in fokalen Komplexen und es scheint, dass fokale Komplexe die Vorläufer von fokalen Adhäsionen darstellen. Die Umstrukturierung fokaler Komplexe in fokale Adhäsionen findet lokal an kontrahierenden Lamellipodien statt (Zaidel-Bar et al., 2003), wobei es zu einer Anreicherung mit Zyxin kommt. Für diesen Vorgang ist die Aktivierung von Rho notwendig (Clark et al., 1998; Rottner et al., 1999).

Fokale Adhäsionen (FA) unterscheiden sich von fokalen Komplexen durch Form und Lokalisation. Es sind ovale, an die Zellperipherie lokalisierende Strukturen. Sie sind Verankerungspunkte für Aktin-Stressfasern und angereichert mit Paxillin, Vinculin und Tyrosin-phosphorylierten Proteinen. Die Adhäsion an die Matrix erfolgt hier hauptsächlich über den Vitronektin-Rezeptor, das  $\alpha$ v $\beta$ 3-Integrin. Da Vitronektin eine relativ starre Matrix darstellt, sind die FA fixiert und über Aktomyosin-Kontraktion kann eine hohe Zugspannung aufgebaut werden. Bei migrierenden Zellen kann man beobachten, dass die Zelle sich nach Bildung der FA an den Zellrändern über die an der Matrix fixierten FA bewegt, welche dann am hinteren Ende der Zelle aufgelöst werden (Palecek et al., 1996; Regen et al., 1992).

### 1.4.2. Fibrilläre Adhäsionen

Fibrilläre Adhäsionen stellen eine weitere, klar definierte Adhäsions-Struktur dar. Sie sind punktförmig oder langgestreckt und befinden sich im Vergleich zu fokalen Komplexen oder Kontakten auch und bevorzugt zentral in der Zelle. Im Gegensatz zu FA enthalten sie als alleinigen Matrixrezeptor den Fibronektin-Rezeptor, das  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Integrin. Spezifisch für fibrilläre Adhäsionen ist eine Anreicherung mit Tensin und Parvin/Actopaxin. und die geringe Konzentration von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen (Katz et al., 2000; Olski et al., 2001; Zamir et al., 1999). Genau wie FA stehen auch fibrilläre Adhäsionen unter Zugspannung, die durch Aktomyosin aufgebaut wird. Da aber die Fibronektin-Matrix, mit der sie assoziiert sind, nicht so rigide ist wie die Vitronektin-Matrix, werden durch die Spannung fibrilläre Adhäsionen von FA am Zellrand separiert und translozieren zentripetal in Richtung des Zellkernes. Durch Aktomyosin-Inhibitoren, wie H-7, ML-7 oder Latrunculin-A kann diese Bewegung vollständig inhibiert werden (Zamir et al., 2000), wobei bereits im Zellinnern vorhandene Adhäsionen durch diese Inhibitoren nicht zerstört werden.

Für die Ausbildung und Motilität fibrillärer Adhäsionen sind mehrere Faktoren notwendig. Einerseits ist der Umbau der assoziierten Fn-Matrix Voraussetzung. Werden Zellen auf immobilisiertes Fn ausgesät, können sich keine fibrillären Adhäsionen mehr ausbilden und es kommt zu einer Akkumulation der Markerproteine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Integrin und Tensin in peripheren fokalen Adhäsionen (Katz et al., 2000). Andererseits scheint auch Tyrosinphosphorylierung eine zentrale Rolle zu spielen. Zellen, denen die Tyrosin-Kinase Src fehlt, weisen geringere Mengen

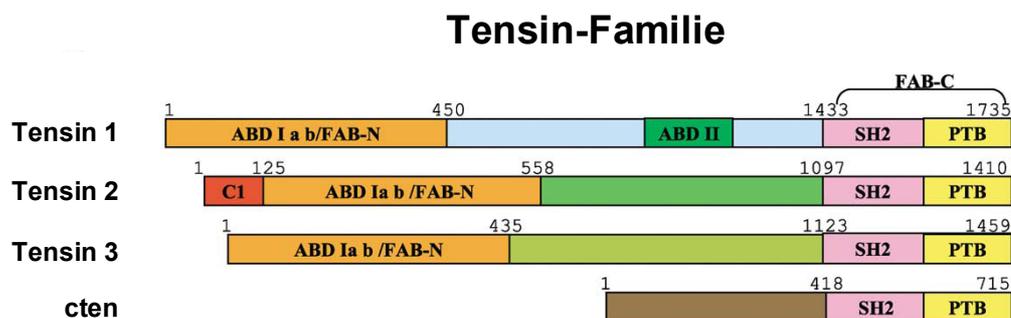
Phosphotyrosin an den Zell-Matrix-Kontakten auf und konzentrieren gleichzeitig Tensin in der Zellperipherie (Volberg et al., 2001).

### 1.4.2.1. Tensin als Marker für fibrilläre Adhäsionen

Tensin ist sehr spezifisch mit fibrillären Adhäsionen in zentralen Bereichen in der Zelle assoziiert. Es ist ein wichtiges Bindeglied für die Signaltransduktion zwischen der EZM und dem Aktin-Zytoskelett. Einerseits kann es über ein „*phosphotyrosine-binding motif*“ (PTB-Domäne) an das NPXY-Motiv (Ein-Buchstaben-Abkürzung für die Aminosäuren Asparagin, Prolin, „beliebige Aminosäure“, Tyrosin) des zytosplamatischen Teiles von Integrin- $\beta$ -Ketten binden (Calderwood et al., 2003), andererseits kann es über unterschiedliche Motive mit Aktin interagieren und als „capping-“ oder „*actin bundling protein*“ fungieren.

Tensin ist ein Multi-Domänen-Protein und daher in der Lage mit einer Reihe weiterer Proteine zu interagieren. Über seine „*src homology 2 domain*“ (SH2-Domäne) bindet es an Tyrosin-phosphorylierte Proteine wie PI3-Kinase, p130CAS und FAK (Auger et al., 1996; Davis et al., 1991). Über seine FAB-Bindestellen („*focal adhesion binding sites*“) wird seine Rekrutierung an fibrilläre Adhäsionen/fokale Kontakte gesteuert (Chen et al., 2003). Die Lokalisation Tensins an fokalen/fibrillären Adhäsionen und die Phosphotyrosin-Bindungsfähigkeit der SH2-Domäne sind essentiell für die Tensin-abhängige Migration von Zellen (Chen et al., 2003).

Von Tensin wurden bislang 3 Isoformen beschrieben (Tensin1-3) und ein Molekül mit hoher Homologie zu dem Carboxy-Terminus von Tensin (cten; s. auch Abb. 1.4.). Abgesehen von cten, das nur C-terminale Homologie aufweist, sind Tensin 1-3 im Carboxy- und im Aminoterminus hochkonserviert, im zentralen Bereich jedoch sehr divergent. Das lässt darauf schließen, dass die Proteine keine redundanten Funktionen haben, sondern jedes für sich eine spezielle Aufgabe erfüllt (Lo, 2004).



**Abb. 1.4.: Vergleichende Darstellung der Tensin-Isoformen und cten**

Ausgehend vom N-Terminus zeigen die Mitglieder der Tensin-Familie folgende Domänenstruktur:

ABD: „*actin-binding domain*“; Ia und Ib interagieren mit F-Aktin, C1: „*protein kinase C conserved region 1*“, FAB: „*focal adhesion binding domain*“, SH2: „*src-homology 2 domain*“, PTB: „*phosphotyrosine-binding domain*“, interagiert mit den Integrin  $\beta$ -Ketten, 1, 3, 5, 7.

Abbildung modifiziert nach Lo (2004).

## 1.5. Das Aktin-Zytoskelett

Aktin ist eines der am häufigsten vorkommenden zytosolischen Proteine und wird ausschließlich in Eukaryonten exprimiert. Es wurden bislang sechs unterschiedliche Isoformen beschrieben, zwei in Skelettmuskelzellen, zwei in Herzmuskel- und zwei in Nicht-Muskelzellen.

Filamentöses Aktin (F-Aktin) bildet die Hauptkomponente des Aktin-Zytoskeletts und liegt in dynamischem Gleichgewicht mit der monomeren Form (G-Aktin, globuläres Aktin) vor. Die Polymerisation von Aktin zu Filamenten oder einer netzartigen Struktur ist ein reversibler Prozess, dessen Dynamik nicht nur die Zellarchitektur und Motilität, sondern auch die Interaktion mit dem extrazellulären Raum und endozytotische Vorgänge ermöglicht.

Aktin ist ein ATP-bindendes Protein, bei dessen Assemblierung zu polaren Filamenten ATP hydrolysiert wird. Durch endständige Polymerisation bzw. Depolymerisation wird eine doppelsträngige, helikale Struktur mit einem Durchmesser von ca. 5-9 nm gebildet (Cooper et al., 2000). Das schneller wachsende Ende, an dem vorwiegend die Polymerisation stattfindet, wird als (+)- oder „*barbed end*“ bezeichnet und das langsamer wachsende als (-)- oder „*pointed end*“.

Über eine Vielzahl G- oder F-Aktin bindender Proteine wird die Filamentbildung und -organisation zu einem Aktin-Netz oder zu parallelen Aktin-Bündeln gesteuert (Pollard et al., 2000). Diese Reorganisation ist ein sehr schneller Prozess, der subkortikal auf die Plasmamembran eine hohe Kraft ausübt und sie mit einer Geschwindigkeit von bis zu 1  $\mu\text{m/s}$  wegschieben kann (Svitkina et al., 1997). Abhängig davon, welche Aktin-Regulatoren beteiligt sind, kommt es zur Ausbildung unterschiedlicher Membranausstülpungen mit spezifischen Funktionen: Planare Zellausläufer wie Lamellipodien oder „*ruffles*“, die kurz nach der Zelladhäsion ausgebildet werden und deren Polarität die Richtung bei Zellmigration bestimmt (Adams, 2001; Pollard et al., 2003; Ridley et al., 2003) oder fadenförmige Zellausläufer (Filopodien), die als Chemosensoren gelten und deren Form durch parallele Bündel von Aktin-Filamenten aufrecht erhalten wird (Jacinto et al., 2001; Mallavarapu et al., 1999).

Die bei phagozytotischen Prozessen auftretende subkortikale Aktin-Reorganisation und Membrandynamik wird unter Punkt 1.6.4.2. im Detail beschrieben.

### 1.5.1. Arp2/3 Komplex

Die *in vitro* energetisch sehr ungünstige Nukleation von Aktin wird *in vivo* durch den Protein-Komplex Arp2/3 reguliert. Dieser stabile Komplex besteht aus den namensgebenden Untereinheiten Arp2 und Arp3 („*actin related protein 2 and 3*“) und fünf weiteren Proteinen: ARPC1, ARPC2, ARPC3, ARPC4, und ARPC5, die auch nach ihrem Molekulargewicht als p41, p34, p21, p20 und p16 bezeichnet werden (May, 2001).

Die Addition von Aktin-Monomeren an das (+)-Ende eines Nukleationskeimes durch den Arp2/3-Komplex führt einerseits zu der Bildung von Aktinfilamenten, andererseits kann der Komplex auch seitlich an ein Aktinfilament binden und so die Bildung Y-förmiger Verzweigungen induzieren, die charakteristischerweise in einem Winkel von ca. 70 Grad zueinander stehen (Mullins et al., 1998). Durch die Koordination von endständiger und seitlicher Verlängerung der Aktinfilamente wird

die Ausbildung orthogonaler Aktinnetze, wie man sie z.B. in subkortikalen Aktinreichen Strukturen wie Lamellipodien findet, gefördert. Arp2/3-Komplex unabhängige Aktin-Nukleation scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen und wurde in Säugerzellen bislang nur für das Protein Zyxin nachgewiesen (Fradelizi et al., 2001).

Der Arp2/3 Komplex hat intrinsisch nur eine sehr geringe Fähigkeit, Aktin zu polymerisieren, die aber durch eine Reihe endogener und exogener Faktoren potenziert werden kann. Zu den endogenen zellulären Faktoren zählen die Proteine der „*Wiskott-Aldrich syndrome protein*“-Familie (WASP-Familie, s. auch Punkt 1.5.2) und Cortactin, sowie Abp1p und Typ I Myosine in Hefen (Evangelista et al., 2000; Goode et al., 2001; Machesky et al., 1998; Rohatgi et al., 1999; Weaver et al., 2001). Zu den exogenen Aktivatoren gehört u.a. das ActA, das polar auf der Oberfläche von Listerien exprimiert wird (Welch et al., 1998). Die durch ActA induzierte massive Aktin-Polymerisation wird in Form eines Aktinschweifes sichtbar, mit dessen Hilfe sich das Bakterium „aktiv“ durch das Zytosol der Zelle bewegen kann.

### 1.5.2. WASP-Familie

Für die zeitlich und subzellulär präzise Aktivierung des Arp2/3 Komplexes gibt es ein Repertoire verschiedener Aktivatoren. Bedingt durch die Unterschiede in Funktion und Art der Signalkaskaden, durch welche diese gesteuert werden, sind die jeweiligen Aktivatoren strukturell sehr unterschiedlich organisiert. Allen gemeinsam ist aber die sogenannte CA-Domäne, eine kurze Sequenz aus basischen („*connector region*“ oder C) und sauren Aminosäuren („*acidic region*“ oder A), welche für die Interaktion mit dem Arp2/3-Komplex notwendig ist und eine Aktin-bindende Domäne. Die Klassifizierung in Klasse I oder II Aktivatoren besagt, dass diese Proteine monomeres oder filamentöses Aktin binden (Welch et al., 2002).

Zu den Klasse I Aktivatoren gehört auch die Familie der humanen WAS-Proteine, zu denen WASP, N-WASP sowie WAVE/Scar-1, -2 und -3 gehören. Während WASP ausschließlich hämatopoetisch exprimiert wird, werden die anderen Homologe weitgehend ubiquitär exprimiert. WAS-Proteine sind durch intramolekulare Faltung autoinhibiert und werden erst durch die Bindung von CDC42 (s. u.) und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) aktiviert. Nach deren Aktivierung sind sie zu der sequentiellen Bindung von Arp2/3 und Aktin befähigt, die zusammen einen sogenannten ternären Komplex ausbilden. Durch dessen Bindung an filamentöses Aktin wird Arp2/3 innerhalb des Komplexes aktiviert und so die Aktin-Polymerisation initiiert (Welch et al., 2002).

### 1.5.3. Rho-GTPasen

Aus der Rho-Familie der kleinen GTPasen sind bislang ca. 22 Proteine bekannt. Sie sind an der Regulation zahlreicher Prozesse, wie Transkription, Mitose, Zytokinese und Kontrolle des Zytoskeletts beteiligt. Es handelt sich dabei um kleine GTP-bindende Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 20 kDA. Zu dieser Familie gehören auch RhoA/B/C, Rac1/2 und CDC42, die speziell bei der Aktin-Regulation eine übergeordnete Rolle spielen. Sie haben eine Schlüsselstellung bei der Transduktion extrazellulärer Stimuli in subzellulär spezifische Polymerisations- und Depolymerisations-Prozesse. „Klassische Funktionen“ sind die durch Aktivierung von Rho induzierte Bildung von Aktin-Stressfasern (Ridley et al., 1992a), Rac-induzierte Aktin-abhängige Membranausstülpungen (Ridley et al., 1992b) und Regulation der

Zellmotilität in Makrophagen. Für aktiviertes CDC42 konnte die Induktion von Filopodien auf der Zelloberfläche (Kozma et al., 1995) gezeigt werden, sowie dessen Bedeutung für chemotaktische Prozesse in Makrophagen (Allen et al., 1998).

GTPasen liegen entweder in einem aktivierten Zustand vor, der durch die Bindung von Guanosin-Triphosphat (GTP) hervorgerufen wird oder in einem inaktivierten Zustand nach Hydrolyse des gebundenen GTPs zu Guanosin-Diphosphat (GDP). Das „An- und Ausschalten“ zwischen beiden Zuständen wird durch GTPase-spezifische akzessorische Proteine gesteuert. Als GEFs („*guanine nucleotide exchange factor*“, bislang 85 bekannt) werden Proteine bezeichnet, die an den GTPasen den Austausch von GDP zu GTP katalysieren und so die GTPasen aktivieren, GAPs („*GTPase activating protein*“, bislang 80 bekannt) beschleunigen die intrinsische GTPase-Aktivität und inaktivieren so die GTPase, wohingegen GDIs („*guanine nucleotide dissociation inhibitor*“, bislang 3 bekannt) die spontane Aktivierung der GTPasen blockieren (Jaffe et al., 2005).

Spezifische Punktmutationen können durch Ausschaltung der GTPase-Aktivität eine konstitutive Aktivierung bewirken (z.B. Rho<sup>V14</sup>, Rac<sup>V12</sup>, CDC42<sup>V12</sup>) oder aber eine permanente Inaktivierung durch Verringerung der Nukleotid-Affinität (z.B. Rac<sup>N17</sup>, CDC42<sup>N17</sup>). Durch Überexpression solcher Mutanten lassen sich GTPase-abhängige Signalkaskaden gezielt modulieren. Auch bakterielle Toxine können spezifische Modulatoren von Rho-GTPasen sein. C3-Transferase von *Clostridium botulinum* und EDIN-B, ein von *S. aureus* sezerniertes Toxin, zum Beispiel modifizieren und inaktivieren RhoA, B und C durch ADP-Ribosylierung eines spezifischen Asparaginrestes (Aktories et al., 2005; Czech et al., 2001).

## 1.6. Endozytosevorgänge

Während kleinere Moleküle wie Zucker oder Aminosäuren die Plasmamembran über Kanäle oder Pumpen passieren können, wird die Aufnahme von Makromolekülen, Flüssigkeit oder festen Partikeln in die Zelle über Transport-Vesikel ermöglicht, die durch Abschnürung von der Plasmamembran entstehen. Dieser Vorgang wird allgemein als Endozytose bezeichnet. Je nach Art des aufgenommenen Stoffes spricht man von Pinozytose, wenn es sich um die Aufnahme von Flüssigkeiten und gelösten Molekülen handelt oder von Phagozytose, wenn größere Partikel wie z.B. Zelltrümmer oder auch Mikroorganismen aufgenommen werden.

Für endozytotische Vorgänge wurden unterschiedliche Aufnahmemechanismen beschrieben, die einerseits von der Größe des aufzunehmenden Stoffes abhängen, andererseits von dem Rezeptor an den sie binden. So unterscheidet man zwischen Makropinozytose, Clathrin- und Caveolin-abhängiger Endozytose, sowie Clathrin- und Caveolin-unabhängiger Endozytose.

### 1.6.1. Clathrin-abhängige Endozytose

Die Clathrin-abhängige Endozytose (CaE) ist der am besten charakterisierte endozytotische Vorgang. CaE ist ein in allen Säugerzellen vorkommender Prozess, der die Aufnahme von Nährstoffen, Pathogenen und Rezeptoren in die Zelle ermöglicht.

Da CaE maßgeblich die Rezeptordichte auf der Zellmembran beeinflusst, ist sie nicht nur entscheidend für die Signaltransduktion, sondern auch die Regulation

rezeptorgesteuerter Vorgänge. Die Internalisierung von Rezeptoren beeinflusst Vorgänge wie Gewebe- oder Organentwicklung, Regulation von Zell- und Serum-Homöostase durch Internalisierung von Membranpumpen oder die Intensität der Signalübertragung, z.B. bei spannungsabhängigen Calcium-Kanälen.

Eine Reihe unterschiedlicher Rezeptor-Liganden-Komplexe wird über CaE aufgenommen. Zu den am besten untersuchten gehören der LDL-Rezeptor, über den mit Cholesterol beladenes LDL in die Zelle aufgenommen wird und der klassische Marker für CaE, das Transferrin, das mit Eisen beladen über den Transferrin-Rezeptor aufgenommen wird (Brodsky et al., 2001; Schmid, 1997). Die CaE ist ein exakt regulierter Vorgang, bei dem sich die Transmembran-Rezeptoren und deren gebundene Liganden in hoher Konzentration in sogenannten „coated pits“ auf der Plasmamembran ansammeln. Auf der zytosolischen Seite sind diese Membraninvaginationen mit Clathrin beschichtet, das sich dort netzartig als polygonale Hülle anlagert.

Für die Anlagerung an die Membran und die Ausbildung des Clathrin-Netzes sind Adapterproteine notwendig, die eine Schlüsselstellung bei der CaE haben, da sie einerseits die Bildung des Clathrin-Netzes initiieren, andererseits aber auch mit regulativ wirkenden Enzymen und mit dem Liganden interagieren und dessen Aufnahme in die Zelle vermitteln. Über das an der Plasmamembran lokalisierte Adapterprotein AP-2 werden Proteine, die ein Tyrosin- oder Di-Leucin-basierendes Sequenzmotiv enthalten (wie z.B. Transferrin), aufgenommen (Nesterov et al., 1999).

Die Abschnürung der Vesikel von der Plasmamembran wird über die GTPase Dynamin gesteuert (s. Punkt 1.6.4.3) (Hinshaw, 2000; Sever et al., 2000) und ist vermutlich eine Art mechanochemischer Vorgang, bei dem Dynamin-Aggregate, bestehend aus ring- oder spiralförmig assemblierten Dynamin-Molekülen, durch GTP-Hydrolyse eine Konformationsänderung durchlaufen und so mechanisch die entstehenden Vesikel in das Zytosol abschnüren. Der Durchmesser der abgeschnürten Vesikel beträgt typischerweise ca. 120 nm. Die Anordnung, nicht aber die Bildung dieser Vesikel, ist abhängig vom Aktin-Zytoskelett, das über verschiedene Gerüstproteine mit der Endozytose-Maschinerie verbunden ist (Fujimoto et al., 2000).

## 1.6.2. Caveolin-abhängige Endozytose

Caveolae treten an der Plasmamembran vieler verschiedener Zelltypen wie Adipozyten, glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen auf, bei denen sie auch zuerst beschrieben wurden (Palade et al., 1968). Es sind kleine, omega-förmige Membraninvaginationen mit einem Durchmesser von ca. 60 nm, die Mikrodomänen mit einer spezifischen Zusammensetzung von Lipiden und Signalmolekülen darstellen. Die Struktur und Form der Organellen wird durch das Protein Caveolin aufrechterhalten, das spezifisch in Caveolae zu finden ist und ein Unterscheidungsmerkmal zu anderen Cholesterol- und Glykosphingolipid-reichen Membrankompartimenten darstellt. Dimerisiertes Caveolin transloziert an die Plasmamembran und bindet Cholesterol. An der Innenseite der Caveolae bildet es eine charakteristische Streifung aus. Isoformen von Caveolin werden zelltypspezifisch exprimiert, Caveolin-1 in nicht-Muskelzellen und Caveolin-3 in Muskelzellen (Galbiati et al., 2001). Durch Depletion von Cholesterol oder durch „knock-out“ von Caveolin können Caveolae zerstört werden (Drab et al., 2001;

Razani et al., 2002). In Zellen, die physiologisch keine Caveolae ausbilden, können Caveolae durch Caveolin-Transfektion induziert werden (Fra et al., 1995).

Die Bedeutung von Caveolae bei konstitutiven endozytotischen Prozessen ist umstritten (Hommelgaard et al., 2005). Da Caveolae eher statische Strukturen sind, die durch das Aktin-Zytoskelett und auch Caveolin selber stabilisiert werden (Pelkmans et al., 2002; Thomsen et al., 2002), ist deren Internalisierung physiologisch ein eher seltenes Ereignis. Lediglich in Endothelzellen, in denen Caveolae 10-20% der Zelloberfläche ausmachen, könnten diese quantitativ an Internalisierungsprozessen beteiligt sein (Oh et al., 1998; Schnitzer, 2001).

Als gesichert gilt die Beteiligung von Caveolae bei Cholesteroll-Transport und -Homöostase (Fielding et al., 1997), sowie ihre Rolle bei der negativen Regulation der endothelialen Stickstoffmonooxid-Synthase (eNOS), die die Vasodilatation steuert (Anderson, 1998; Razani et al., 2002). Desweiteren wurde in neuen Untersuchungen die Bedeutung von Caveolin-1 für die Reorganisation und den Umsatz der extrazellulären Fibronectin-Matrix gezeigt. Fibroblasten, in denen Caveolin-1 mittels RNAi herabreguliert wurde, zeigten eine stark verminderte Aufnahme von Fibronectin (Sottile et al., 2005).

### 1.6.3. Makropinozytose

Makropinozytose und Membrandynamik sind „integrierte Prozesse“. Klappen bei der Ausbildung von Membran-Ausstülpungen („*ruffling*“) diese auf die Zelloberfläche zurück, kann es zu Membranfusionen kommen, wobei signifikante Flüssigkeitsmengen aus dem extrazellulären Raum in Vesikel heterogener Größe (> 1 µm) eingeschlossen und in das Zellinnere abgeschnürt werden.

Die Bildung dieser Vesikel, der sogenannten Makropinosomen, findet sowohl konstitutiv als auch nach Induktion durch Wachstumsfaktoren oder mitogenen Substanzen statt. Beide Prozesse scheinen sich auf der Ebene der Aktinregulation voneinander zu unterscheiden, da sich Makropinozytose durch Cytochalasin D nur in unstimulierten Zellen inhibieren lässt, nicht aber in Zellen, die mit dem Wachstumsfaktor PDGF oder PMA (Haigler et al., 1979; Sandvig et al., 1990) behandelt wurden.

Makropinozytischen Prozessen werden unterschiedliche Funktionen zugeschrieben. So kann die Aufnahme von Flüssigkeit aus dem Extrazellulär-Raum einerseits der Herabregulierung aktivierter Signalmoleküle dienen (z.B. nach PDGF-Stimulation), andererseits trägt sie in professionellen Antigen-präsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen, zur Antigen-Aufnahme bei. Antigene werden dann in den Makropinosomen den Signalwegen für die Antigenpräsentation der MHC Klasse I und II zugeführt (Mellman et al., 2001; Watts, 1997).

Auch Pathogene nutzen Makropinozytose, um in das Zellinnere zu gelangen. So wurde z.B. für Legionellen und den HI-Virus die Lokalisation in Makropinosomen direkt nach deren Aufnahme in die Zelle beschrieben (Marechal et al., 2001; Steele-Mortimer et al., 2000; Watarai et al., 2001).

### 1.6.4. Phagozytose

Phagozytose beschreibt die Aufnahme partikulären Materials (> 0,5 µm) in intrazelluläre Vesikel. Es ist ein rezeptorvermittelter, Aktin-abhängiger und Clathrin-

unabhängiger Prozess. Phagozytose hat eine große Bedeutung bei der Ernährung (z.B. bei einzelligen Organismen), der Beseitigung von Zelltrümmern oder gealterten Zellen und besonders auch bei der Immunabwehr. Die Fähigkeit zur Phagozytose ist nicht bei allen Zelltypen gleichermaßen ausgeprägt. Spezialisierte Zellen, wie polymorphkernige Granulozyten, dendritische Zellen oder Monozyten/Makrophagen, werden deshalb als professionelle Phagozyten bezeichnet. Sie verfügen über ein Repertoire an spezifischen Rezeptoren, mit der ihre Umgebung erfasst wird und durch die dann nach Interaktion mit einem Liganden entweder inflammatorische oder anti-inflammatorische Signalkaskaden in Gang gesetzt werden. Als nicht-professionelle Phagozyten werden Zellen bezeichnet, die ebenfalls zur Phagozytose befähigt, aber kein Bestandteil der zellulären Immunantwort sind und deren Rezeptor-Repertoire und intrazelluläre vesikuläre Prozessierung sich von den professionellen Phagozyten unterscheidet (Rabinovitch, 1995). Zu ihnen zählen u. a. Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen.

#### 1.6.4.1. Phagozytose-Rezeptoren

Entscheidend für die Immunantwort ist die Differenzierung zwischen körperfremden und körpereigenen Liganden. Rezeptoren für die direkte Erkennung körperfremder bakterieller Bestandteile werden als PRR's („*pattern recognition receptors*“) bezeichnet, das erkannte Muster als PAMP („*pathogen-associated molecular pattern*“) (Janeway, Jr., 1992). Durch die Erkennung von Strukturen, die in höheren Eukaryonten nicht vorkommen, wird das Problem gelöst, eine Vielzahl verschiedener Keime mit nur einigen wenigen Rezeptoren zu erfassen. In Säugerzellen, sowohl in hämatopoetischen als auch nicht-hämatopoetischen, fungieren die sogenannten Toll-ähnlichen Rezeptoren als PRRs, wobei die von ihnen erkannten PAMPs oft bakterielle Oberflächenbestandteile wie z.B. das Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer oder die Lipoteichonsäure (LTS) grampositiver Bakterien darstellen (Sieling et al., 2002).

Eine indirekte Erkennung körperfremder Bestandteile funktioniert über Opsonierung. Dabei kommt es entweder zu der Markierung körperfremder Partikel durch Immunglobuline oder durch Komponenten des Komplementsystems. Das wichtigste Opsonin der Immunglobulinfamilie ist das IgG, dessen Fc-Teil durch eine Reihe verschiedener Fc-Rezeptoren (FcγR) erkannt wird, die isoformspezifisch phagozytisch (Indik et al., 1992; Tuijnman et al., 1992) oder antiphagozytisch wirksam sind (Hunter et al., 1998). Die Komplementrezeptoren CR1, CR3 und CR4 erkennen Partikel, die mit Spaltprodukten der Komplementkaskade markiert sind, das Integrin  $\alpha M\beta 3$  (auch CR3 oder Mac-1 genannt), erkennt hierbei das Opsonin iC3b.

Andere phagozytische Rezeptoren sind u. a. Lektine, wie der Mannose-Rezeptor (Stahl et al., 1998), der Lipopolysaccharidrezeptor CD14 (Devitt et al., 1998) und die Integrine  $\alpha 5\beta 1$  und  $\alpha v\beta 3$ , die die Aufnahme von Fibronectin-beschichteten Partikeln in die Zelle vermitteln (Blystone et al., 1994).

Körpereigene Liganden, die Phagozytose induzieren, sind z.B. Phosphatidylserin, das nur auf der Oberfläche apoptotischer Zellen exprimiert wird.

#### 1.6.4.2. Phagozytose und das Aktin-Zytoskelett

Bei phagozytotischen Prozessen spielt die durch subkortikale Aktin-Reorganisation induzierte Membrandynamik eine wesentliche Rolle. Nach Ligandenbindung und Rezeptor-Aktivierung bildet die Plasmamembran um das aufzunehmende Partikel eine stark mit Aktin angereicherte Ausstülpung, das sogenannte „*phagocytic*“- oder „*actin-cup*“. Die genaue Funktion von Aktin bei der Ausbildung dieser Strukturen ist noch umstritten. Aktin könnte nicht nur zu der Ausbildung und räumlichen Organisation der Aufnahmestruktur beitragen, sondern auch an der Abschnürung des phagosomalen Vesikels beteiligt sein (Qualmann et al., 2000). Neuere Ergebnisse mit präziser räumlicher und zeitlicher Auflösung zeigen allerdings, dass Aktin schon vor der Abschnürung des Vesikels depolymerisiert und nicht mehr an dem sich abschnürenden Phagosom lokalisiert ist (Scott et al., 2005). Das könnte dafür sprechen, dass die Aktindynamik zu einer Destabilisierung des subkortikalen Aktin-Netzwerkes führt, das ansonsten als dichte Barriere die Bildung und Abschnürung des Phagosomes verhindern würde (Scott et al., 2005).

Die Aktinpolymerisation an dem entstehenden Phagosom wird durch die kleinen GTPasen Rac und CDC42 (Caron et al., 1998) kontrolliert. Während CDC42 eher an dem vorderen, sich um das Partikel schließenden Rand lokalisiert, findet sich Rac an dem gesamten Phagosom und reichert sich in den späten Phasen der Phagosombildung an (Hoppe et al., 2004). Obwohl die Aktinpolymerisation durch die GTPasen gesteuert wird, scheint sie von der Inaktivierung der GTPasen unabhängig zu sein, da Aktin depolymerisiert, bevor Rac inaktiviert wird (Scott et al., 2005).

#### 1.6.4.3. Reifung des Phagosoms

Für die Abschnürung des Phagosomes in das Zytosol ist die GTPase Dynamin verantwortlich, die sich ringförmig an die Verjüngung der sich bildenden Vesikel anlagert und diese „mechanisch“ in das Zellinnere drückt (Hinshaw, 2000; Sever, 2002). Durch anschließende sequentielle Interaktion mit Komponenten des phago-lysosomalen Signalweges wird die luminalen und membranöse Zusammensetzung der Vesikel kontinuierlich modifiziert, wobei diese gleichzeitig aus der Zellperipherie in den perinukleären Raum transportiert werden. Die entstehenden sogenannten Phagolysosomen besitzen lytische und degradative Eigenschaften und sind durch einen sehr niedrigen pH-Wert und Anreicherung mit hydrolytischen Enzymen, Defensinen und anderen bakteriziden Peptiden gekennzeichnet (Hampton et al., 1998; Tapper, 1996; Tjelle et al., 2000).

Vesikelfusion und -transport während des Reifungsprozesses werden einerseits in hohem Maße durch die kleinen GTPasen aus der Rab-Familie gesteuert, die so Markerproteine für die unterschiedlichen Reifungsstadien darstellen (Jordens et al., 2005) und andererseits durch SNAREs („*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptor*“). SNAREs werden aufgrund eines Sequenzunterschiedes innerhalb einer hochkonservierten Region in Q-SNAREs (Q= Abkürzung f. d. Aminosäure Glutamin, auch t-SNAREs genannt) und R-SNAREs (R= Abkürzung f. d. Aminosäure Arginin, auch v-SNAREs genannt) unterteilt (Fasshauer et al., 1998). Sie sind membrangebunden und können selektiv mit anderen SNAREs an „Ziellmembranen“ interagieren und einen stabilen Komplex bilden, so dass durch die räumliche Annäherung die Fusion beider Membrankompartimente ermöglicht wird.

Die initiale Interaktion des entstandenen Phagosoms findet mit den frühen Endosomen oder „*sorting endosomes*“ statt, die charakteristischerweise einen leicht sauren pH-Wert (pH ~ 6,0) haben und durch die Proteine EEA1 („*early endosome antigen 1*“) und Rab5 gekennzeichnet sind. Deren molekulare Zusammensetzung ermöglicht eine „Klassifizierung“ und Sortierung der intravesikulären Fracht (Gorvel et al., 1991; Jordens et al., 2005). Einige Moleküle werden über das perinukleär lokalisierte „*recycling-endosome*“ Rab11-abhängig exozytiert oder, wie z.B. Rezeptoren der Integrin-Familie, wieder an die Plasmamembran transloziert (Caswell et al., 2006). Alternativ werden die für die Degradation bestimmten Stoffe über ein multivesikuläres Zwischenstadium („*multivesicular bodies*“, *MVBs*) in die stärker sauren (pH = 5,5-6,0) späten Endosomen geleitet, die durch die GTPasen Rab7 und Rab9, sowie LAMPs („*lysosomal-associated membrane proteins*“) und eine hohe Konzentration von hydrolytischen Enzymen charakterisiert sind. Als letzte Stufe der endozytotischen Kaskade gelten die Lysosomen, die ebenfalls durch LAMPs, insbesondere aber durch Cathepsin D und einen sauren pH-Wert von ca. pH ~4,5-5,5 charakterisiert sind (Vieira et al., 2002).

Für den Mechanismus der Reifung bzw. die Interaktion der unterschiedlichen Reifungsstadien von den frühen Endosomen zu den Lysosomen gibt es zwei konkurrierende Modelle. Das „*vesicle-shuttle*“-Modell besagt, dass frühe Endosomen stabile Organellen sind, aus denen sich multivesikuläre Kompartimente entwickeln, die zu den späten Endosomen transportiert werden. Das Reifungsmodell besagt dagegen, dass die frühen Endosomen nur transiente Stadien sind, die über Fusion- bzw. Spaltungsereignisse zu *MVBs* reifen und schließlich zu späten Endosomen und Lysosomen (Gruenberg, 2001; Thilo et al., 1995).

Da Fusionsereignisse bislang nicht klar gezeigt werden konnten, geht man daher davon aus, dass bei der Reifung nur transiente oder partielle Fusion endosomaler und phagosomaler Vesikel stattfindet, die einen Austausch des Organellen-Inhaltes ermöglicht. Man spricht daher auch von einem so genannten „*kiss-and-run*“-Modell (Desjardins et al., 1994; Desjardins, 1995).

## 1.7. Fragestellung

Obwohl die Interaktion zwischen Fibronectin (Fn) und Fn-bindendem Protein A (FnBPA) auf molekularer Ebene bereits sehr gut charakterisiert ist, liegen bislang nur wenige Erkenntnisse darüber vor, welche Auswirkungen diese Interaktion auf zellulärer Ebene hat. Insbesondere die Kinetik der durch die Fn-FnBPA-Interaktion vermittelten Invasion von *S. aureus* in Endothelien ist weitgehend unklar.

Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit die durch FnBPA induzierten Prozesse in Endothelzellen charakterisiert werden, da Endothelien als innerste Gefäßschicht zu den am häufigsten durch *S. aureus* besiedelten Gewebetypen zählen.

Folgende Fragestellungen sollten dabei untersucht werden:

1. Ist die Invasionskinetik FnBPA-exprimierender Bakterien mit der anderer Adhäsine/Invasine vergleichbar?
2. Was sind die Charakteristika der FnBPA-vermittelten Adhäsion und wie lassen sie sich in lebenden Zellen analysieren?
3. Welche Proteine sind an der FnBPA-vermittelten Adhäsion beteiligt?
4. Beeinflussen sich FnBPA und seine Interaktionspartner gegenseitig und hat das Auswirkungen auf die Invasionskinetik von *S. aureus*?
5. Welche Rolle spielt des Aktin-Zytoskelett bei der Internalisierung FnBPA-exprimierender Bakterien?
6. Wie wirkt sich eine Modulation des Aktinzytoskeletts auf die *S. aureus*-Invasion aus?

Die Beantwortung dieser Fragen soll zu einem besseren Verständnis der *S. aureus*-Infektion beitragen und könnte somit auch einen Ansatzpunkt für eine bessere Bekämpfung/Behandlung von *S. aureus*-induzierten Krankheiten bieten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Allgemeine Laborausstattung

Autoklav	Typ SM SL 669-1ED; Sterimaquet, Rastatt - Deutschland
Eismaschine/Flockeneisbereiter	Scotsman AF30; Frimont, Mailand - Italien
Gelapparaturen	Acrylamid-Gele: Mini-Protean II; Bio-Rad, München - Deutschland Agarose-Gele: Agagel, Biometra GmbH i. L., Göttingen - Deutschland
Inkubatoren	BBD 6220 und Function Line B20; Kendro, Langenselbold - Deutschland
Mikroinjektionsanlage:	Transjector 5246; Eppendorf, Hamburg - Deutschland; Mikromanipulator 5171; Cell Biology Trading, Hamburg - Deutschland
Magnetrührer	RCT Basic; IKA Labortechnik, Staufen - Deutschland
Mikrowellengerät	Micromat 135; AEG, Nürnberg - Deutschland
Netzgeräte	Powerpac 200 und 1000; Bio-Rad, München - Deutschland
pH-Meter	MT 320; Mettler Toledo, Giessen - Deutschland
Pipetten	Pipetman 2, 10, 20, 100, 200, 1000; Gilson International B.V.; Bad Camberg - Deutschland
Pipettierhilfen	AccuJet; Brand, Wertheim - Deutschland
Schüttelinkubatoren	Certomat BS-1; Braun-Biotech Int./Sartorius, Göttingen - Deutschland
Spektrophotometer	Ultrospec 3000; Amersham-Pharmacia, GE Healthcare Europe GmbH, München - Deutschland
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen - Deutschland
Waagen	BP61 S und BL1500 S; Sartorius, Göttingen - Deutschland
Zentrifugen	Tischzentrifuge 5417C/5417R; Eppendorf, Hamburg – Deutschland Megafuge 3.0 R; Kendro, Langenselbold - Deutschland

	Super T21; Kendro, Langensfeld - Deutschland
	K18; Sigma, Osterode - Deutschland
Transilluminator/Geldokumentation	Chemidoc XRS; Bio-Rad, München - Deutschland
Thermocycler	GeneAmp 2400; Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim - Deutschland
Ultraschall-Desintegrator	Branson Sonifier 150; bezogen von G. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd - Deutschland
Vortexer	MS2; IKA Labortechnik, Staufen - Deutschland

### 2.1.1. Videomikroskopische Ausstattung

Für videomikroskopische Aufnahmen wurde das konfokale „*spinning disc*“-System *UltraView LCI* der Firma Perkin Elmer (Rodgau-Jügesheim, Deutschland) verwendet. Es war mit folgenden Einzelkomponenten ausgestattet:

Mikroskop	Eclipse TE300; Nikon, Düsseldorf - Deutschland
Objektive	Plan Apo 60x/1,4 Öl, Ph3 DM, ∞/0,17 WD 0,21; Nikon, Düsseldorf - Deutschland Plan Apo 100x/1,4 Öl, DIC H, ∞/0,17 WD 0,13; Nikon, Düsseldorf - Deutschland Plan Fluor 100x/1,3 Öl, Ph3 DLL, ∞/0,17 WD 0,21; Nikon, Düsseldorf - Deutschland
Konfokale Einheit	CSU10; Yokogawa Electric Corporation, Tokio - Japan
Laser	Argon Laser Serie 43; optimiert für die Linien: 488 nm/514 nm; Argon/Krypton Mischgas-Laser Serie 43; optimiert für die Linien: 568 nm/674 nm; Melles-Griot, Carlsbad - USA
„ <i>Laser Combiner</i> “	Prairie Technologies, Middleton - USA
Quecksilber-Kurzbogen-Lampe	HBO; Osram, München - Deutschland
Kamera	Orca ER, „ <i>scan interline</i> “ CCD-Kamera (1344x1024, 12-bit); Hamamatsu, Herrsching am Ammersee - Deutschland
„ <i>Piezo-Stepper</i> “ („ <i>Z-Stepper</i> “)	Servo Position Controller PZ73E; Physik Instrumente, Waldbronn - Deutschland
Inkubationskammer	EMBL, Heidelberg - Deutschland
CO <sub>2</sub> -Regelung	GP 168; EMBL, Heidelberg - Deutschland
Steuerung für die Inkubationsbox	EMBL, Heidelberg - Deutschland

Emissionsfilterfilter	525/50 nm Bandpass; 607/45 nm; Chroma, Rockingham - USA
Filterrad für Emissionsfilter und	Sutter Instruments, Navato Steuerung - USA
Akkusto-optischer Filter (AOTF)	Tri-Launch-Dual-End; Prairie Technologies, Middleton - USA
Steuerung für AOTF	Neos, Melbourne - USA
Hellfeld-Verschluss und Steuerung	Uniblitz Shutter, Modell VMM-D1; Vincent Associates, Rochester NY- USA

### 2.1.2. Epifluoreszenzmikroskop

Verschluss und Steuerung	Uniblitz Shutter, Modell VMM-D1; Vincent Associates, Rochester NY - USA
Kamera	RT Slider Model 2.3.1; Progressive scan interline CCD (1600x1200, 16 Bit schwarz-weiß, 48Bit RGB); Diagnostic Instruments, Sterling Heights - USA
Mikroskop	Leica DMRD; Bensheim - Deutschland
Objektive	Plan Apo 63x/1,32 Öl, Ph3, ∞/0,17; Leica, Bensheim - Deutschland Plan Apo 100x/1,4 Öl, Ph3, ∞/0,17; Leica, Bensheim - Deutschland

### 2.2. Wissenschaftliche Software

Chromas	Version 1.4.5; Connor Mc Carthy, Griffith University, Queensland - Australien ( <a href="http://www.technelysium.com.au/chromas.html">http://www.technelysium.com.au/chromas.html</a> ; Freeware)
UltraView Software	Version 5.5.0.2.; Steuerung <i>Ultra View LCI</i> ; Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim - Deutschland
DNAMAN	Version 5.2.9; Lynnon Biosoft, Quebec - Kanada
ImageJ	Version 1.36b; Wayne Rasband, National Institutes of Health, Washington - USA ( <a href="http://rsb.info.nih.gov/ij/">http://rsb.info.nih.gov/ij/</a> ; Public Domain)
Metamorph	Version 6.2r6, Epifluoreszenzmikroskop-Steuerung und Auswertung; Molecular Devices, Downingtown - USA
Volocity	Version 2.6.2 Build 1, Improvision, Tübingen - Deutschland

### 2.3. Chemikalien

Lösungen und Medien für die Bakterienkulturen wurden mit Reinstwasser (Ampuwa; Fresenius Kabi, Homburg - Deutschland) hergestellt.

Alle aufgeführten Chemikalien hatten p.a. Qualität und wurden, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen:

Roth (Karlsruhe - Deutschland), Merck (Darmstadt - Deutschland), Sigma-Aldrich (Taufkirchen - Deutschland), Serva (Heidelberg - Deutschland), MP Biomedicals (Eschwege - Deutschland), Becton Dickinson (Heidelberg - Deutschland).

### 2.4. Kitsysteme

QIAquick™ Gel-Extraction Kit	Qiagen GmbH; Hilden - Deutschland
QIA® Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden - Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH; Hilden - Deutschland
Endofree® Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH; Hilden - Deutschland
HUVEC Nucleofector Kit	VPB-1002; Amaxa; Köln - Deutschland
Bio-Rad-Proteinbestimmung	Bio-Rad; München - Deutschland

### 2.5. Enzyme

<i>Bam</i> HI	Gibco/Invitrogen; Karlsruhe - Deutschland
<i>Eco</i> RI	Gibco/Invitrogen; Karlsruhe - Deutschland
<i>Taq</i> Polymerase PCR Kit	New England Biolabs GmbH; Frankfurt - Deutschland
Deep Vent DNA-Polymerase	New England Biolabs; Frankfurt - Deutschland
T4-DNA-Ligase	Gibco/Invitrogen; Karlsruhe - Deutschland
„ <i>shrimp alkaline phosphatase</i> “ (SAP)	MBI Fermentas. St. Leon-Rot - Deutschland

### 2.6. Primäre Antikörper

Antigen	Spezies	Firma
Vinculin VIN-11-5	Maus	Sigma-Aldrich
Paxillin „clone 349“	Maus	BD - Transduction Lab
pFAK	Kaninchen	BioSource International
<i>S. aureus</i>	Kaninchen	Biodesign International
GST	Kaninchen	Invitrogen

Rhodamin Phalloidin zum Anfärben des F-Aktin wurde von Molecular Probes/Invitrogen (Karlsruhe - Deutschland) bezogen.

Der anti-Invasin Antikörper (Kaninchen) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Ingo Autenrieth (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Tübingen) zur Verfügung gestellt.

## 2.7. Sekundäre Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen und Western Blot-Analyse sind nachfolgend aufgeführt:

Bezeichnung	Firma
Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L)	Invitrogen/Molecular Probes
Alexa Fluor® 568 goat anti-mouse IgG (H+L)	Invitrogen/Molecular Probes
Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Invitrogen/Molecular Probes
Alexa Fluor® 568 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Invitrogen/Molecular Probes
Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase-linked whole antibody (from sheep)	Amersham/GE Healthcare
Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-linked F(ab') <sub>2</sub> fragment (from donkey)	Amersham/GE Healthcare

## 2.8. Vektoren

### 2.8.1. Kommerziell erworbene Plasmide

#### Prokaryontische Expressionsvektoren:

pGEX-4T-2: Expressionsvektor für GST-Fusionsproteine (tac-Promotor, Amp<sup>R</sup>; Amersham-Pharmacia, GE Healthcare Europe GmbH, München - Deutschland)

#### Eukaryontische Expressionsvektoren:

pEGFP-C1: Expressionsvektor für GFP-Fusionsproteine (CMV-Promotor, Kan<sup>R</sup>; BD - Clontech, Freiburg - Deutschland)

pEGFP-Aktin: Expressionsvektor für  $\beta$ -Aktin mit N-terminal fusioniertem GFP (CMV-Promotor, Kan<sup>R</sup>; BD Dickinson Clontech, Freiburg - Deutschland)

## 2.8.2. Eigene Konstrukte und Konstrukte von Kooperationspartnern

### Prokaryontische Expressionsvektoren:

pFNBA3: Expressionsvektor für das Vollängen FnBPA. Das *fnbA*-Gen wurde in den Vektor pGEM-7Zf(+) kloniert (Greene et al., 1995).

pGEX-*fnbpa*-DuD4: Expressionsvektor für die Domänen Du-D4 (Aminosäuren 605-881) von FnBPA aus *S. aureus* 8325-4 als GST-Fusionsprotein mit N-terminal fusioniertem GST (diese Arbeit).

pINV397: Expressionsvektor für die C-terminalen 397 Aminosäurenreste des Invasin aus *Y. enterocolitica* Serotyp O:8 in den Vektor pGEX-4T-3 zur Expression eines GST-Fusionsproteines ((Wiedemann et al., 2001).

GST-C3-Transferase von Dr. L. Feig, Department of Microbiology and Molecular Biology, Tufts University School of Medicine, Boston – USA

GTPase-Konstrukte (GST-CDC42<sup>N17</sup> und GST-Rac1<sup>N17</sup>) von Dr. A. Hall, Institute of Cancer Research, London - England

### Eukaryontische Expressionsvektoren:

pEGFP-Arp3 von Dr. Dorothy Schafer, Department of Biology, University of Virginia, Charlottesville - USA

pEGFP-Tensin und pEGFP-Tensin-AH2 (kloniert aus einer "Hühner"-Herzmuskel cDNA-Bibliothek (Chuang et al., 1995)) von Dr. Shin Lin, University of California, Irvine - USA (Pankov et al., 2000). GFP-Tensin-AH2 umfasst die Aminosäurereste 659-762 von Tensin, in welchen die AH2-Domäne (Aminosäurereste 674-706) enthalten ist.

pEGFP-N-WASP: Dr. Silvia Lommel Institut für Zellbiologie, Deutsches Forschungszentrum für Biotechnologie, Braunschweig - Deutschland

pEGFP-RhoA, GFP-Rac1 und GFP-CDC42 von Dr. P. Gierschik und Dr. K. Giehl, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Ulm - Deutschland

pEGFP-Rab5wt von Dr. C. Roy, Yale University, New Haven - USA

Der Expressions-Vektor für mRFP-Aktin wurde von Gerhardt Zenner (Max von Pettenkofer-Institut, LMU München) im Rahmen seiner Dissertation kloniert.

## 2.9. „Primer“

„Primer“ für die Klonierung des Konstruktes pGEX-*fnbpa*-DuD4 aus dem Vektor pFNBA3 in den Vektor pGEX-4T-2 (s. auch 2.8.2).

5-DuD4-*fnbA*: cgc gga tcc gag gaa tca aat cca att gac

3-DuD4-*fnbA*: cgg gaa ttc atc atg gcg ttg gtg gca cga ttg g

## 2.10. Bakterienstämme

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (E. coli DH5 $\alpha$ ) Genotyp: F<sup>-</sup>  $\Phi$ 80d*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR* *recA1* *endA1* *hsdR17*(r<sub>K</sub><sup>-</sup>,m<sub>K</sub><sup>+</sup>) *phoA* *supE44*  $\lambda$ -*thi-1* *gyrA96* *relA1* (GibcoBRL/Invitrogen, Karlsruhe - Deutschland)

*E. coli* HB101 Genotyp: F- *mcrB* *mrr* *hsdS20* (rB-, mB-) *recA13* *supE44* *ara14* *galk2* *lacY1* *proA2* *rpsL20*(Smr) *xy15* $\lambda$ -*leu* *mtl1* (Max-EfficiencyTM HB101Kompetente Zellen; GibcoBRL/Invitrogen, Karlsruhe - Deutschland)

*FnBPA-S. aureus* DU5883 (pFnBA4): Ausgangsstamm *S. aureus* DU5883 (FnBPA; FnBPB), rekomplementiert mit dem Plasmid pFnBA4), exprimiert Voll-Längen FnBPA aus dem Stamm 8325-4; Resistenzen: Tc<sup>R</sup>, Cm<sup>R</sup> und Em<sup>R</sup> (Greene et al., 1995)

*FnBPA-S. carnosus* TM300(pFnBA4): Ausgangsstamm *S. carnosus* TM300, transformiert mit pOri23-FnBPA, exprimiert Voll-Längen FnBPA aus dem Stamm 8325-4, Resistenz: Tc<sup>R</sup>. (Sinha et al., 2000)

*Invasin-E.coli* E. coli HB101, mit dem Plasmid pInV1914 enthalten, welches für Invasin aus *Y. enterocolitica* kodiert. Resistenz: Amp<sup>R</sup> (Schulte et al., 1998)

### 2.10.1. Nährmedien und Zusätze

Alle aufgeführten Bakterienstämme wurden in sterilem, autoklaviertem LB-Medium (Mobio, Solana Beach - USA) unter Verwendung der für die Selektion notwendigen Antibiotika kultiviert. Die Antibiotika wurden wie unten angegeben gelöst und mit einem 0,2  $\mu$ m Filter sterilfiltriert.

Antibiotika	Lösungsmittel	Stammkonzentration	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	Wasser	100 mg/ml	100 $\mu$ g/ml
Chloramphenicol (Cm)	70 % Ethanol	20 mg/ml	20 $\mu$ g/ml
Erythromycin (Em)	70 % Ethanol	5 mg/ml	5 $\mu$ g/ml
Kanamycin (Kan)	Wasser	50 mg/ml	50 $\mu$ g/ml
Tetracyclin (Tet)	70 % Ethanol	20 mg/ml	20 $\mu$ g/ml

## 2.11. Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde mit nachfolgend genannten Zelltypen gearbeitet:

HUVEC: primäre humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen, die wöchentlich frisch isoliert wurden (s. auch Punkt 2.12.4.2)

FN -/- Fibroblasten: Fibronectin-defiziente Maus-Fibroblasten, die freundlicherweise von Dr. Reinhard Fässler zur Verfügung gestellt wurden. Die detaillierte Generierung dieser Zellen wurde von Nyberg und Kollegen im Jahre 2004 beschrieben (Nyberg et al., 2004).

### 2.11.1. Zellkulturmedien und Zusätze

Medium	Inhaltsstoffe/Zusätze	Hersteller
HUVEC Vollmedium (ECGM)	ECGS/H (0,4%), FKS (2%), EGF (0,1 ng/ml), Hydrocortison (1 µg/ml), BFF (1 ng/ml)	PromoCell, Heidelberg - Deutschland
HUVEC Basalmedium (ECBM)	FKS (2%) bei Bedarf in Infektionsversuchen	PromoCell, Heidelberg - Deutschland
HUVEC Phenolrotfreies Medium (ECGM/prf)	FKS (2%), bei Bedarf dem Medium zugegeben	PromoCell, Heidelberg - Deutschland
AIM-V	L-Glutamin, Streptomycin-Sulfat (50 µg/ml) Gentamycin-Sulfat (10 µg/ml)	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe – Deutschland)

## 2.12. Methoden

### 2.12.1. Arbeiten mit Proteinen

#### 2.12.1.1. Proteinexpression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Zur Expression eines Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteins wurde eine Kolonie der Bakterien, die das zu exprimierende Plasmid enthielten, in 100 ml LB-Medium mit selektivem Antibiotikum angeimpft und bei 37°C über Nacht schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 ml der Übernachtskultur zu 1l LB-Medium mit selektivem Antibiotikum gegeben und bis zu einer  $OD_{600} = 0,4$  bei 37°C schüttelnd inkubiert. Danach wurde 1 mM IPTG (Endkonzentration) zugesetzt und weitere 2,5 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch fünfminütige Zentrifugation mit 6000 rpm (3743 g; Sigma K18) bei 4°C sedimentiert, die Sedimente in vorgekühltem PBS resuspendiert und in einem 50 ml Reaktionsgefäß vereinigt. Die Suspension wurde mit kaltem PBS auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt und erneut für 20 min mit 6000 rpm bei 4°C zentrifugiert (3743 g; Sigma

K18). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 10-20 ml Lysepuffer resuspendiert.

Für den Zellaufschluss wurde die Bakteriensuspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren, auf Eis aufgetaut und anschließend auf höchster Stufe sechsmal für 10 sec mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Zellreste wurden für 50 min bei 10000 rpm (110397 g; Sigma K18) abzentrifugiert. Währenddessen wurden 1-2 ml GST-Sepharose-Kügelchen zweimal in Lysepuffer gewaschen, anschließend der Überstand der vorangegangenen Zentrifugation mit den GST-Kügelchen vereinigt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die GST-Kügelchen wurden danach fünfmal mit Lysepuffer ohne DTT und einmal mit Resuspensionspuffer gewaschen und das Protein anschließend von den Kügelchen eluiert.

Zur Elution des GST-Fusionsproteines wurden die Kügelchen achtmal mit je 1 ml Resuspensionspuffer plus 30 mM Glutathion behandelt. Bei jedem Schritt wurde die Suspension vier- bis sechsmal mit der Puffer/Glutathion-Lösung gevortext und anschließend 5 min bei 5000 rpm (2655g; Eppendorf 5417 R) abzentrifugiert. Die aus den Elutions-/Zentrifugationsschritten resultierenden Überstände wurden vereinigt und gegen Dialysepuffer dialysiert. Die Dialyse war immer dann notwendig, wenn die Proteine für Mikroinjektionsexperimente (s. Punkt 2.12.4.8) verwendet werden sollten. Nach der Dialyse wurde die Proteinmenge, wie unter Punkt 2.12.1.2 beschrieben, bestimmt.

<b>Puffer</b>	<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
<b>Lysepuffer</b>	Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
	NaCl	50 mM
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM
	DTT	1 mM
<b>Resuspensionspuffer</b>	Tris/HCl, pH 8	50 mM
	NaCl	150 mM
	MgCl	5 mM
	NaCl <sub>2</sub>	2,5 mM
	DTT	1 mM
<b>Dialysepuffer</b>	Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
	MgCl <sub>2</sub>	2 mM
	DTT	0,1 mM

### 2.12.1.2. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit dem auf der Bradford-Methode (Bradford, 1976) beruhenden Bio-Rad Protein Test durchgeführt. Als Proteinstandard diente BSA in den Konzentrationen 250 µg/ml, 125 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml und 5 µg/ml.

Die Bestimmung der Proteinmenge wurde wie folgt durchgeführt: Zu 800 µl Probe (Proteinstandard in der oben angegebenen Konzentration bzw. verdünnte Proteinlösung) wurden 200 µl der Bradford-Lösung gegeben. Die Proben wurden

gegen 800 µl Puffer plus 200 µl Wasser als Kontrollwert gemessen. Die so entstandenen Lösungen wurden durch kurzes Vortexen gemischt, ca. 15 min bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Werte der BSA-Proben wurden gegen die eingesetzte Proteinmenge aufgetragen und dienten als Standard-Eichkurve. Daraus wurden dann die Proteinkonzentrationen der Proben abgelesen.

### 2.12.1.3. Aufkonzentration und Kryokonservierung

Um die für die Kryokonservierung notwendige Konzentration der aufgereinigten Proteine zu erhalten, wurden die dialysierten Proteine mittels Ultrafiltration in Zentrifugations-Konzentratoren (Vivaspin; Vivascience/Sartorius, Göttingen – Deutschland) aufkonzentriert. Die Konzentratoren wurden so ausgewählt, dass der „cut-off“ für das Molekulargewicht unter dem Molekulargewicht des aufgereinigten Proteins lag, so dass dieses die Membran nicht passieren konnte. Die Konzentratoren wurden nach Herstellerangaben verwendet. Die Konzentration der Proteine nach der Zentrifugation betrug mindestens 1 mg/ml.

Für die Kryokonservierung wurden die Proteine aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

### 2.12.1.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Diese Gele dienen der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Die Auftrennung der zu untersuchenden Proteine erfolgt bei dieser Form der Elektrophorese aufgrund der Proteingröße. Durch die Anlagerung von SDS an die Proteine werden diese negativ geladen und im Gel durch das Anlegen einer elektrischen Spannung entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Die Protein-Proben wurden 1:1 mit 2xSDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Von den so behandelten Proben wurden 15 µl pro Spur geladen. Auf jedes Gel wurde zusätzlich eine Spur eines Größenstandards (10 µl, *peqGOLD Prestained Protein-Marker III*; peqLab, Erlangen - Deutschland) aufgetragen, um die Größe der aufgetrennten Proteine abschätzen zu können. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 100 V. Anschließend wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel zum Transfer in Transfer-Puffer äquilibriert.

Puffer	Substanz	Volumen/Konzentration
<b>2xSDS-Probenpuffer nach Laemmli (Laemmli, 1970)</b>	Tris/HCl pH 6,8	0,5 M
	Glycerol	20%
	SDS	8% [w/v]
	Bromphenolblau	0,01% [v/v]
	DTT	50 mM
<b>Trenngelpuffer</b>	Tris/HCl	1,5 M
	SDS	1 g

Puffer	Substanz	Volumen/Konzentration
	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 250ml, pH 8,8
Sammelgelpuffer	Tris/HCl	0,5 M
	SDS	1 g
	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 250ml, pH 6,8
Laufpuffer	Tris/HCl	25 mM
	SDS	0,1%
	Glycin	192 mM

Die gelösten Bestandteile des 2xLaemmli-Puffers wurden filtriert und auf das gewünschte Endvolumen zusammen verdünnt.

Gelzusammensetzung		
Substanz	Trenngel	
	10%	12,5%
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	2,09 ml	1,6 ml
Trenngelpuffer	1,25 ml	1,25 ml
Acrylamid	1,67 ml	2,08 ml
APS (100 ng/ml)	25 µl	25 µl
TEMED	2,5 µl	2,5 µl
Sammelgel		
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	1,55 ml	
Sammelgelpuffer	625 µl	
Acrylamid	325 µl	
APS (100 ng/ml)	12,5 µl	
TEMED	2,5 µl	

### 2.12.1.5. „Blotten“ und Detektion der Proteine

Die Proteine wurden im Tankblotting-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Während der Gelelektrophorese wurden die benötigte PVDF-Membran und das Filterpapier (Whatman, bezogen von Hartenstein, Würzburg - Deutschland) passend zum jeweiligen Gel zurechtgeschnitten. Die PVDF-Membran wurde in Rechtecke von ca. 9x5 cm geschnitten, das Filterpapier in Rechtecke von 10x6 cm. Zum Äquilibrieren wurde die Membran für einige Sekunden in 100% Methanol gelegt und anschließend für 10 min bei RT in Transfer-Puffer mit 20% Methanol inkubiert und bis zum Gebrauch in Transfer-Puffer feucht gehalten. Der Transfer erfolgte für 1 h unter Kühlung mit konstant 100 V.

Für die Anfärbung der Proteine mittels Coomassie-Blau wurde mit dem Gel verfahren wie unter Punkt 2.12.1.6 beschrieben.

Die Detektion von Proteinen mittels spezifischer Antikörper wurde durchgeführt, um in *E. coli* exprimierte Proteine spezifisch nachweisen zu können. Dabei wurde wie folgt verfahren: Um unspezifische Bindungen abzusättigen, wurde die Membran nach Beendigung des Proteintransfers in TBS-T mit 5% Milchpulver für 1 h bei RT (oder über Nacht bei 4°C) inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal je 5 min in TBS-T gewaschen und mit einem gegen das Zielprotein gerichteten primären Antikörper für 1 h bei RT (oder über Nacht bei 4°C) inkubiert. Nach der Inkubation wurde nicht gebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen in TBS-T mit einer Gesamtdauer von ca. 45 min entfernt.

Zur Detektion des ersten Antikörpers wurde die Membran dann für 45 min mit einem gegen den ersten Antikörper gerichteten sekundären HRP-gekoppelten Antikörper versehen. Nach erneutem Waschen, wurde die Membran mit Detektions-Reagens 1 und Detektions-Reagens 2 (gemischt im Verhältnis 1:1; ECL-Kit; Amersham/GE-Healthcare, München - Deutschland) für ca. 5 min bei RT versetzt. Anschließend wurde die Membran in handelsübliche Haushaltsfolie eingewickelt und in einer Autoradiographie-Kassette fixiert. Für die Belichtung wurden mehrere Autoradiographie-Filme (XAR; Kodak, Stuttgart - Deutschland) je nach Stärke des Lumineszenzsignals unterschiedlich lang belichtet. Die Entwicklung der belichteten Filme erfolgte automatisch in einem Entwicklungsgerät (FPM-100A; Fuji, Düsseldorf - Deutschland).

Puffer	Substanz	Konzentration
Transfer-Puffer	Tris	25 mM
	Glycin	96 mM
TBS (TBS-T)	Tris (pH 7,4)	20 mM
	NaCl	150 mM
	Tween 20 (für TBS-T)	0,3%

### 2.12.1.6. Coomassie-Färbung von Acrylamidgelen

Um Proteine in einem Acrylamidgel ohne aufwändige Antikörperdetektion sichtbar machen zu können, wurden diese mittels „Coomassie-Blau angefärbt.

Dazu wurde das Gel für ca. 30 min in einer Coomassie-Lösung inkubiert. Mit einer Entfärbelösung wurde das Gel solange gewaschen, bis der überschüssige Farbstoff vollständig aus dem Gel entfernt war, so dass nur die Proteine als blaue Banden in dem Gel sichtbar waren.

Puffer	Substanz	Konzentration
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Blau	0,1%
	Methanol	40%
	Essigsäure	10%
	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 1 l

Puffer	Substanz	Konzentration
Entfärbe-Lösung	Methanol	50%
	Essigsäure	7,5%

### 2.12.1.7. Beschichten von Latexkügelchen mit Proteinen

Als Modellsystem für die Invasin- bzw. FnBPA-vermittelte Invasion wurden u.a. Latexkügelchen verwendet, die mit diesen Adhäsinen beschichtet wurden.

Dafür wurden ca.  $1 \times 10^9$  Latexkügelchen mit einem Durchmesser von  $1 \mu\text{m}$  („sulphate microspheres“; Invitrogen/Molecular Probes, Karlsruhe - Deutschland) abzentrifugiert und in PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml GST-, Inv-397- oder FnBPA-DuD4- Proteinlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml resuspendiert und die Suspension für 3 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Kügelchen abzentrifugiert und in 500  $\mu\text{l}$  einer sterilen PBS/BSA-Lösung (20 mg/ml BSA) für eine Stunde bei RT inkubiert, um freie Bindungsstellen der Kügelchen mit Protein abzusättigen. Die Kügelchen wurden ein weiteres Mal in PBS/BSA gewaschen (1 mg/ml BSA) und bis zum Versuch in einer 0,2%igen PBS/BSA-Lösung bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Die Effizienz der Anbindung wurde bestimmt, indem die Konzentration der Proteinlösungen vor und nach der Kopplung an die Kügelchen photometrisch bestimmt wurde.

## 2.12.2. Arbeiten mit Nukleinsäuren

### 2.12.2.1. DNA-Präparation – Isolierung von Nukleinsäuren

Plasmidisolierungen wurden in kleinem Maßstab mit dem „QIA<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit“ oder dem „Endofree<sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit“ (beide Qiagen, Hilden - Deutschland) für die Isolierung größerer Plasmidmengen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Für die Transfektion der Endothelzellen wurden ausschließlich Endotoxin-frei präparierte Plasmide verwendet.

Mit Hilfe des „QIAquick<sup>™</sup> Gel-Extraction Kit“ der Firma Qiagen wurden DNA-Fragmente nach Anleitung des Herstellers aus Agarosegelen eluiert.

### 2.12.2.2. Messung von DNA-Konzentrationen

DNA-Konzentrationen wurden photometrisch bestimmt. Dazu wurden die isolierte DNA in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  verdünnt und in Quarzküvetten (Hellma, Müllheim - Deutschland) gegen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  als Referenzwert bei 260 nm gemessen, wobei für die Berechnung nur Extinktionswerte zwischen 0,1 und 1,0 eingesetzt wurden. Die Konzentration der DNA wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz errechnet, die Reinheit durch die Bildung des Quotienten aus den Extinktionswerten der Wellenlängen 260 nm und 280 nm.

Berechnung der DNA-Konzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$c \text{ (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = 0,05 \times V \times E$$

c = zu errechnende Konzentration

0,05 = Absorptionskoeffizient für DNA

V = Verdünnung der DNA

E = gemessene Extinktion

### 2.12.2.3. Restriktionsverdau

Zur Kontrolle von Vektoren oder eines DNA-Fragments in einem bestimmten Vektor wurde ein analytischer Restriktionsverdau angesetzt.

Die eingesetzte DNA-Menge betrug 100-200 ng in einem Gesamtvolumen von 30  $\mu\text{l}$ . Das notwendige Ionen- und pH-Milieu für das (die) verwendete(n) Enzym(e) wurde durch einen für das (die) Enzym(e) optimierten Restriktionspuffer sichergestellt. Der entsprechende Reaktionsansatz wurde mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  aufgefüllt, um das Endvolumen von 20  $\mu\text{l}$  zu erreichen. Bei Inkompatibilität der Puffer für eines der Enzyme wurden der Verdau sequenziell durchgeführt und die DNA nach jedem Verdau mittels „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden - Deutschland) aufgereinigt. Restriktionsverdau wurden für 2 h bei der für das jeweilige RE vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur durchgeführt.

Sollte ein geschnittenes DNA-Stück per Gelelektion aufgereinigt werden, war es notwendig, größere DNA-Mengen einzusetzen (präparativer Restriktionsverdau). Dementsprechend erhöhte sich das Gesamtvolumen im Vergleich zum analytischen Verdau auf 40-100  $\mu\text{l}$ .

#### Allgemeiner Reaktionsansatz

Substanz	Menge
DNA	100-200 ng
10 x Puffer	2 $\mu\text{l}$
RE 1	1 $\mu\text{l}$
(RE 2	1 $\mu\text{l}$ )
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	ad 20 $\mu\text{l}$

### 2.12.2.4. Dephosphorylierung

Um die Religation eines für eine Klonierung geschnittenen Vektors zu minimieren, wurde der Vektoren vor der Ligation einer Dephosphorylierung unterzogen. Dazu wurde 1  $\mu\text{l}$  einer alkalischen Phosphatase (SAP, MBI Fermentas, St. Leon-Rot - Deutschland) direkt in den Reaktionsansatz des vorangegangenen Restriktionsverdau gegeben und bei 37°C für 30 min weiterinkubiert. Anschließend wurde die DNA, wie unter Punkt 2.12.2.3 beschrieben, aufgereinigt.

### 2.12.2.5. Ligation

Für die Ligation eines DNA-Fragmentes in einen bestimmten Vektor wurde der Zielvektor mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten wie das zu ligierende Fragment und per Gelelektion (s. Punkt 2.12.2.1) aufgereinigt. Zur Ligation wurden 50 ng des geschnittenen Vektors und 250–500 ng des präparierten DNA-Fragments eingesetzt. Die Ansätze wurden über Nacht in einem Thermocycler bei 16°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit T4-Ligase und dem für dieses Enzym optimierten Puffer durchgeführt (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe - Deutschland).

#### Reaktionsansatz

Substanz	Menge
Vektor	50 ng
DNA Fragment	250 (500) ng
5 x Ligasepuffer	2 µl
T4-Ligase	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 20 µl

### 2.12.2.6. Allgemeiner PCR-Ansatz

Im Allgemeinen benötigt man zur PCR eine DNA-Matrize, eine DNA-Polymerase, die diese Matrize abliest und die notwendigen Nukleotide einfügen kann, einen Mix der vier Nukleotide und einen für die eingesetzte Polymerase optimierten Puffer. Eine Standard-PCR erfolgte wie nachfolgend beschrieben. Je nach „*Primer*“-Paar und Länge der zu amplifizierenden DNA konnten die *Annealing*-Temperaturen von 50°C bis 65°C und die *Extension*-Zeit von 30 sec bis 1,5 min variieren. Die Reaktion wurde mit der Taq-Polymerase oder der Deep Vent Polymerase (beide New England Biolabs, Frankfurt – Deutschland) durchgeführt.

#### Reaktionsansatz

Substanz	Menge
10x Puffer	5 µl
Nukleotid-Mix	1 µl (200 µM)
Vorwärts (5'-) „ <i>Primer</i> “	0,5 µl (100 pmol)
Rückwärts (3'-) „ <i>Primer</i> “	0,5 µl (100 pmol)
DNA	50 ng
Taq/Deep Vent-Polymerase	1 µl (2 U)
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 50 µl

Die PCR-Produkte wurden anschließend per Gelelektion mit dem „QIAquick™ Gel-Extraction Kit“ der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt.

### 2.12.2.7. Bakterien-PCR

Diese Methode erlaubt es, selektionierte positive Klone direkt mittels PCR ohne Isolierung der Plasmid-DNA zu identifizieren.

Dazu wurden pro Platte ca. 10-15 Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 15 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> resuspendiert. Diese Suspension wurde dann wie folgt aufgeteilt: 5 µl wurden in 5 ml LB-Medium mit selektivem Antibiotikum überführt und bei 37°C schüttelnd inkubiert, der Rest zum Aufschluss der Bakterien für 5 min bei 95°C gekocht. Dies führte zur Freisetzung der Plasmid-DNA, die direkt in die PCR eingesetzt werden konnte. Die Bakterien-PCR wurde mit *Taq* Polymerase (New England Biolabs) durchgeführt.

Die für die Bakterien-PCR eingesetzten „*Primer*“ wurden je nach Konstrukt individuell gewählt.

#### Allgemeiner Ansatz für die Bakterien-PCR (50µl)

Substanz	Menge
10 x Puffer	5 µl
Nukleotid-Mix	1 µl (200 µM)
Vorwärts (5'-) „ <i>Primer</i> “	0,5 µl
Rückwärts (3'-) „ <i>Primer</i> “	0,5 µl (100 pmol)
Bakterienlysat	5 µl (100 pmol)
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl (1 U)
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	37,5 µl

### 2.12.2.8. Gelelektrophorese

Die Gel-elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte in Agarosegelen. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 0,7-1,5 %ige Gele durch Aufkochen von Agarose in 1xTAE-Puffer hergestellt. Die Proben wurden mit 2x Probenpuffer 1:1 gemischt, auf das Gel aufgetragen und für 1,5-2,5 h bei 100 V aufgetrennt. Als Größenstandard wurde die „Smart-Ladder“ (Eurogentec, Köln - Deutschland) verwendet. Für die Elektrophorese diente 1x TAE-Puffer als Laufpuffer. Nach beendeter Auftrennung wurde das Agarosegel für ca. 15 min in einem Ethidiumbromid-Bad (1 µg/ml in H<sub>2</sub>O) inkubiert, das überschüssige Ethidiumbromid durch Waschen in H<sub>2</sub>O entfernt und das Gel unter UV-Licht (320 nm) photographiert bzw. die DNA für die Elution mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten.

Puffer	Substanz	Menge/Konzentration
<b>50x TAE-Puffer</b> (Für 1x TAE 1:50 in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> )	Tris-Base	242 g
	Na <sub>2</sub> EDTA	18,6 g
	Eisessig	57,1 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 1 l

Puffer	Substanz	Menge/Konzentration
<b>10x Probenpuffer</b> (Für 1x Puffer 1:10 in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> )	Bromphenol Blau	0,21%
	Xylen Cyanol FF	0,21%
	EDTA, pH 8.0	0,2 M
	Glycerin	50%
	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 10 ml

### 2.12.2.9. Sequenzierung

Die Sequenz und das Leseraster klonierter PCR-Fragmente wurde mittels Sequenzierung überprüft. Sequenzier-Reaktionen wurden von der Fa. Agowa (Berlin - Deutschland) durchgeführt. Mit der Software DNAMAN (Lynnon Biosoft, Quebec - Kanada) wurde die gelieferte Sequenz mit der Referenz-Sequenz verglichen. Abweichungen von der Referenz-Sequenz wurden noch einmal mit dem mitgelieferten

Elektropherogramm mittels der Software Chromas (Connor Mc Carthy, Griffith University, Queensland - Australien) verglichen.

### 2.12.3. Mikrobiologische Methoden

#### 2.12.3.1. Kultivierung von Bakterien auf festen Medien

LB-Agarplatten, die unter Verwendung der geeigneten Antibiotika gegossen wurden, wurden entweder mit einer einzelnen Kolonie oder mit einer Bakteriensuspension mittels einer Impföse oder einem sterilen Drigalski-Spatel auf den Agarplatten ausplattiert. Die Ausplattierung erfolgte so, dass Einzelkolonie-Wachstum auf den Platten zu erwarten war. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert.

#### 2.12.3.2. Kultivierung von Bakterien in flüssigen Medien

Kleine Flüssigkulturen wurden für die Isolierung von Plasmiden (*E. coli*) in kleinem Maßstab (s. Punkt 2.12.2.1) oder als Starterkulturen für große Flüssigkulturen verwendet. Dazu wurden Bakterien in 5-10 ml LB-Medium mit einer einzelnen Kolonie oder durch Animpfen aus einer Kryokultur inokuliert und schüttelnd über Nacht bei 37°C und 170 rpm kultiviert.

Große Flüssigkulturen dienten der Isolierung von Plasmiden in großem Maßstab (s. Punkt 2.12.2.1) oder der Proteinexpression (s. Punkt 2.12.1.1). Für die Kultivierung großer Flüssigkulturen (100 - 1000 ml) wurden Starterkulturen in LB-Medium mit den geeigneten Antibiotika 1:500 - 1:1000 verdünnt und bei 37°C und 170 rpm schüttelnd über Nacht inkubiert.

### 2.12.3.3. Herstellung chemokompetenter *E. coli*

Für die Präparation chemokompetenter Zellen wurde eine Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstammes (*E. coli* DH5 $\alpha$  o. *E. coli* HB101, s. auch 2.10) in 5 ml Antibiotika-freiem LB-Medium angesetzt. Am nächsten Tag wurde die Kultur in 200 ml Antibiotika-freies LB-Medium überführt und für ca. 3 h bei 37°C und 170 rpm schüttelnd inkubiert bis eine optische Dichte von OD<sub>600</sub>=0,6-0,8 erreicht war. Die optische Dichte wurde photometrisch bei 600 nm gegen LB-Medium als Referenzwert gemessen. Anschließend wurden die Bakterien für 15 min bei 4°C und 3000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 100 ml eiskalter MgCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut für 15 min bei 4°C und 3000 g bei abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet für 30 min in 100 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert (15 min, 4°C, 3000 g) und das Pellet in 4 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Diese Lösung wurde im Kühlraum auf Eis über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden 1 ml steriles Glycerin und 5 ml eiskalte CaCl<sub>2</sub>-Lösung dazugegeben, vorsichtig gemischt und die Bakterien in Aliquots von 100  $\mu$ l bei –70°C gelagert.

#### Verwendete Lösungen:

MgCl<sub>2</sub> 100mM

CaCl<sub>2</sub> 100mM

Glycerin (durch Autoklavieren sterilisiert)

### 2.12.3.4. Hitzeschocktransformation von *E. coli*

Die Behandlung chemokompetenter Zellen mit einem kurzen Hitzeschock ermöglicht die Transformation von DNA in Bakterien. Dazu wurden tiefgekühlte (-70°C) kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Aufgereinigte Plasmid-DNA (100 ng) oder DNA aus einem Ligationsansatz (3-10  $\mu$ l) wurde zu den Bakterien gegeben und mit diesen für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 90 s einer Temperatur von 42°C ausgesetzt und sofort danach wieder für 5 min auf Eis inkubiert. Zu den Bakterien wurde 1 ml steriles, Antibiotika-freies LB-Medium gegeben und die Suspension für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert.

Von dieser Lösung wurde ein Aliquot von 50-100  $\mu$ l auf eine LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert, um die transformierten Bakterien zu selektionieren. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### 2.12.3.5. Kryokonservierung von Bakterien

Für die Langzeitkonservierung von Bakterien wurden Kryokulturen hergestellt. Dazu wurden Bakterien bei einer OD<sub>600</sub>= 0,6-0,8 mit sterilem Glycerin (final 10%) gemischt und zunächst für 24 h bei –20°C eingefroren und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei –70°C eingefroren.

## 2.12.4. Arbeiten in der Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Alle Lösungen wurden mit sterilen Einmalpipetten aufgezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in sterile Einmal-Zellkulturkolben.

### 2.12.4.1. Beschichtung von Zellkulturgefäßen mit Gelatine

Um den Endothelzellen eine Matrix für die Anheftung an die Zellkulturkolben, Glasbodenschalen oder Deckgläschen zu geben, wurden diese zuvor mit Gelatine beschichtet. Dazu wurde eine sterile 0,2%ige Gelatinelösung (2% Gelatin; Sigma, Taufkirchen – Deutschland) hergestellt und die jeweiligen Gefäße damit über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und die Gefäße wurden unter der Sterilbank getrocknet. Die getrockneten Gefäße wurden im Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

### 2.12.4.2. Isolierung humaner Nabelschnurvenen Endothelzellen

Humane Endothelzellen aus Nabelschnüren („*human umbilical vein endothelial cells*“, HUVEC) wurden nach dem Protokoll von Jaffe (Jaffe et al., 1973) wöchentlich frisch isoliert. Dazu wurde zunächst ca. 1 cm von beiden Enden der Nabelschnur abgeschnitten. Anschließend wurde die Nabelschnur mittels Arterienklemmen an einer sterilen Standapparatur befestigt, außen haftende Blutreste wurden entfernt und die Nabelschnur äußerlich desinfiziert. Danach wurde in die Vene der Nabelschnur eine Knopfkanüle eingeführt, mit Arterienklemmen abgedichtet und fixiert. In der Vene verbliebenes Blut wurde mit 37°C warmem, Gentamycin-haltigem PBS (50 µg/ml) ausgewaschen. Die Vene wurde danach mit einer  $\alpha$ -Chymotrypsin-Lösung (100 mg/ml  $\alpha$ -Chymotrypsin in PBS) gespült, um das restliche Gentamycin-haltige PBS zu entfernen. Das untere Ende der Nabelschnur wurde nun mit zwei Arterienklemmen abgedichtet, die Nabelschnur vollständig (leichtes Aufblähen) mit der Chymotrypsin-Lösung gefüllt und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die trypsinisierten Endothelzellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit FKS eluiert, das die katalytische Wirkung des Chymotrypsins inhibiert. Die eluierten Zellen wurden durch Zentrifugieren für 10 min mit 1200 rpm (294 g; Megafuge 3.0R) zentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde in Kulturmedium (ECGM) resuspendiert und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 2 h Inkubationszeit waren die HUVEC so weit adhärirt, dass das Medium erneut gewechselt werden konnte, um Verunreinigungen aus der Präparation zu entfernen. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Die frisch isolierten Zellen wurden als Passage 1 (P-1) bezeichnet, nach jeder Trypsinierung wurden die nachfolgenden Passagen weiter gezählt.

### 2.12.4.3. Kultivierung von Zellen

Die Endothelzellen wurden bis zur vollständigen Konfluenz unter Standard-Bedingungen in ECGM inkubiert (s. auch Punkt 2.12.4.2). Um die Zellen in größere Kolben umzusetzen wurde das ECGM abgesaugt und die Zellen einmal mit 2 ml Trypsin-EDTA (Gibco/Invitrogen) gewaschen, um ECGM-Reste aus dem Kolben zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen solange in Trypsin-EDTA inkubiert, bis sie vollständig von dem Boden des Zellkulturkolbens abgelöst waren. Zu der

Zellsuspension wurden 10 ml ECGM gegeben, um die Aktivität des Trypsins zu inhibieren. Anschließend wurden sie in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 800 rpm (130 g; Megafuge 3.0) bei RT für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml ECGM resuspendiert und die Zellen dann in einer Verdünnung von maximal 1:4 auf neue Kolben verteilt. Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurden Zellen der Passagen 2-5 verwendet.

Die Fibronectin-defizienten Zellen wurden unter Serum-freien Bedingungen kultiviert (s. auch Punkt 2.11.1). Trypsiniert wurden die Zellen bei ca. 80%iger Konfluenz wie für die HUVEC beschrieben. Nach dem vollständigen Ablösen der Zellen von dem Zellkulturkolben wurden 10 ml (Serum-freies) AIM-V-Medium zu den Zellen gegeben, die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 800 rpm (130 g; Megafuge 3.0) bei RT für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml AIM-V-Medium resuspendiert und die Zellen in einer Verdünnung von maximal 1:3 auf neue Kolben verteilt. Das Medium wurde alle vier Tage gewechselt.

#### **2.12.4.4. Bestimmung der Zellzahl**

Um genau definierte Zellzahlen für die Versuche aussäen zu können, wurden die Zellen im Anschluss an die Trypsinierung gezählt. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung gemischt, um tote Zellen blau anzufärben und sie dadurch von lebenden unterscheiden zu können. Einige Mikroliter der Lösung wurden in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellzahl in vier 0,1 mm<sup>3</sup> großen Abschnitten wurde unter einem Mikroskop ausgezählt.

#### **2.12.4.5. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen**

Die zur Konservierung vorgesehenen Zellen wurden in 2 ml Kryoröhrchen in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  Zellen/ml in flüssigem Stickstoff konserviert. Dazu wurden trypsinierte und gezählte Zellen in eiskaltem Einfriermedium (Zellspezifisches Medium, versetzt mit 10% Dimethylsulfoxid =DMSO) resuspendiert und auf Kryoröhrchen verteilt. Anschließend wurden die Zellen für 24 h bei -20°C eingefroren, danach in flüssigem Stickstoff für die Langzeitkonservierung aufbewahrt.

Um Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden kryokonservierte Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 5 ml vorgewärmten Medium überführt und bei 800 rpm (130 g; Megafuge 3.0) abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 5 ml Medium resuspendiert und in einen kleinen Zellkulturkolben (25 cm<sup>2</sup>) überführt. Die weitere Kultivierung erfolgte wie unter 2.12.4.3 beschrieben.

#### **2.12.4.6. Aussäen von Zellen auf Deckgläschen oder Glasbodenschalen**

Für Immunfluoreszenzfärbungen und Infektionsversuche wurden die Zellen auf Gelatine-beschichtete 12 mm Deckgläschen in „8-well“-Platten (Nunc, bezogen von Schubert & Weiss, München - Deutschland) ausgesät, für videomikroskopische

Versuche wurden die Zellen auf Gelatine-beschichtete 35 mm Glasbodenschalen (Mattek, Ashland - USA) ausgesät.

Dazu wurden die Zellen, wie unter Punkt 2.12.4.3 beschrieben, trypsinisiert. Nach der Trypsinierung wurde die Zellzahl durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurde ein Volumen, das einer Zellzahl von  $2 \times 10^4$ - $3 \times 10^4$  Zellen entsprach, auf die Deckgläschen tropfenförmig aufgebracht. Wenn die Zellen nach 45 min Inkubation unter Standard-Kulturbedingungen im Brutschrank vollständig an die Deckgläschen oder Glasbodenschalen adhäriert waren, wurde in jede Vertiefung der 8-well-Platten (oder Glasbodenschalen) 2 ml des jeweiligen Zellkulturmediums gegeben. Die Zellen wurden am darauf folgenden Tag für die jeweiligen Versuche eingesetzt.

#### **2.12.4.7. Transfektion**

Die Transfektion der HUVEC wurde nach Herstellerangaben mittels Nukleofektion (Amaxa, Köln - Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst, wie unter Punkt 2.12.4.3 beschrieben, trypsinisiert und gezählt. Für die Transfektion wurden pro Ansatz  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt und diese mit  $2 \mu\text{g}$  der jeweiligen Plasmid-DNA transfiziert. Auf die Deckgläschen oder Glasbodenschalen wurden nach der Transfektion jeweils  $2 \times 10^4$ - $3 \times 10^4$  Zellen ausgesät (s. Punkt 2.12.4.6). Nach Inkubation der Zellen über Nacht unter Standard-Kulturbedingungen wurden diese am nächsten Tag für die jeweiligen Versuche eingesetzt.

#### **2.12.4.8. Mikroinjektion**

Das zu injizierende Protein wurde mit Mikroinjektionspuffer auf die gewünschte Endkonzentration eingestellt. Es wurde dabei darauf geachtet, eine Maximalkonzentration von  $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  nicht zu überschreiten, da die Lösung ansonsten zu viskos wurde.

Der Proteinlösung wurde eine Markersubstanz zugesetzt, die das Auffinden der injizierten Zellen ermöglichte. Hierzu wurde Ratten-IgG in einer Endkonzentration von  $200 \text{ ng/ml}$  eingesetzt. Die Injektionslösung wurde bei  $4^\circ \text{C}$ ,  $13000 \text{ rpm}$  (Biofuge *fresco*)  $30 \text{ min}$  lang zentrifugiert, um Aggregate zu entfernen und so das Verstopfen der Injektionskanüle zu verhindern.

Die Mikroinjektion erfolgte mittels eines Computer-gesteuerten Systems, welches sich aus einem Mikroskop mit angebautem Mikroinjektionsarm und einem Transjektor zur Druckerzeugung zusammensetzt.

Eine Kulturschale mit ca.  $2\text{-}4 \text{ ml}$  Kulturmedium wurde im Heizring des Mikroskops eingesetzt, das Deckgläschen mit den darauf haftenden Zellen im Strahlengang positioniert und leicht angedrückt. Der Heizring gewährleistete, dass die Zellen konstant bei  $37^\circ \text{C}$  gehalten wurden. Zum Injizieren der Zellen wurden  $3 \mu\text{l}$  der Injektionslösung in eine spezielle Injektionskanüle (Eppendorf, Hamburg - Deutschland) gefüllt und in das Gewinde des Mikroinjektionsarms eingeschraubt. Die Spitze der Injektionskanüle wurde am Bildschirm auf die Zellebene eingestellt, die Zellen mit der Maus angesteuert und ca.  $80\text{-}100$  Zellen injiziert. Die Injektion selbst erfolgt durch einen Druckpuls, der vom Transjektor an die Kanüle weitergegeben wird

Die Deckgläschen wurden nach der Injektion in Kulturmedium für 1 h bei 37°C nach-inkubiert, um eventuelle, durch zu heftiges Injizieren hervorgerufene Schockeffekte zu umgehen und um den injizierten Proteinen Zeit zu geben, ihre Effekte zu induzieren. Anschließend wurden die injizierten Zellen in Infektionsversuchen mit *FnBPA-S aureus* weiterverwendet (s. auch Punkt 2.12.4.9). Nach den Infektionsversuchen wurden die Zellen fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz angefärbt, um die Auswirkungen der injizierten Substanz auf die Invasion der Bakterien zu analysieren.

Injizierte Zellen konnten durch das koinjizierte Ratten-IgG identifiziert werden, das in der Immunfluoreszenzfärbung mit einem fluoreszenzmarkierten anti-Ratten-Antikörper sichtbar gemacht wurde.

**Mikroinjektionspuffer:**

NaCl	150 mM
Tris pH 7,4	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

#### **2.12.4.9. Infektionsversuche mit Bakterien oder beschichteten Kügelchen**

Die Infektion von HUVEC und Fn-defizienten Fibroblasten wurde wie nachfolgend beschrieben durchgeführt. Alle Infektionsversuche in Endothelzellen wurden in ECBM + 2% FKS durchgeführt, mit Ausnahme der Versuche, die unter Fn-freien Bedingungen durchgeführt werden mussten. Bei diesen wurde FKS-freies ECBM verwendet. Für die videomikroskopischen Versuche wurde ECBM/prf + 2% FKS verwendet.

Für die Versuche mit den Fn-defizienten Fibroblasten wurden ausnahmslos AIM-V verwendet. Alle Medien sind unter 2.11.1 beschrieben.

**Infektion mit Bakterien:** Übernachtskulturen von *Invasin-E. coli*, *FnBPA-S. aureus* oder *FnBPA-S. carnosus* wurden am Versuchstag 1:50 in LB-Medium mit den benötigten Antibiotika verdünnt und bis zu einer  $OD_{600} = 0,8$  schüttelnd weiterinkubiert. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert, in sterilem PBS einmal gewaschen und resuspendiert.

Für die Infektion der Zellen wurde die Menge der Bakterien in die Zellkulturschalen gegeben, die dem jeweils gewünschten Verhältnis von Bakterien zu Zellen entsprach. Um bei den Versuchen zur Ermittlung der Invasionskinetiken einen simultanen Start der Internalisierung der Bakterien durch die Zellen zu gewährleisten, wurden diese bei 500 rpm (51 g; Megafuge 3.0 R) auf die Zellen abzentrifugiert. Die Zeit für die Internalisierung wurde direkt nach der Zentrifugation gestartet. Nach Ablauf der Infektionszeit wurden die Zellen in 4% Paraformaldehyd fixiert und der Immunfluoreszenzfärbung zugeführt (s. auch Punkt 2.12.5.3).

Für die videomikroskopischen Versuche wurden die Bakterien in die Glasbodenschalen pipettiert. Eine Zentrifugation der Bakterien auf die Zellen wurde hier nicht durchgeführt, da die Adhäsion an die Zellen beobachtet werden sollte.

**Infektion mit beschichteten Kügelchen:** Für die Infektionsversuche wurden beschichtete Latex-Kügelchen verwendet, die nicht älter als eine Woche waren. Vor

den Invasionsversuchen wurden die Kügelchen vorsichtig resuspendiert, um eine homogene Suspension zu erhalten. Anschließend wurden diese analog zu den Infektionsversuchen mit den Bakterien verwendet.

#### **2.12.4.10. Modulierende und inhibierende Substanzen**

Um die Einfluss von N-WASP auf die Internalisierung von *FNBP*A-S. *aureus* in die Endothelzellen untersuchen zu können, wurde der spezifische N-WASP Inhibitor Wiskostatin (Merck Biosciences, Bad Soden - Deutschland) verwendet. Die Zellen wurden mit dem Inhibitor in einer Konzentration von 2,5  $\mu$ M 15 min vor Versuchsbeginn in ECBM + 2% FKS vorinkubiert. Anschließend wurden Invasionsversuche, wie unter 2.12.4.9 beschrieben, in Gegenwart des Inhibitors durchgeführt.

### **2.12.5. Mikroskopische Methoden**

#### **2.12.5.1. Fixierung und Permeabilisierung von Zellen**

Die auf Deckgläschen adhätierenden Zellen wurden in 4% Paraformaldehyd in PBS für ca. 10 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen in eiskaltem Aceton bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 5 min permeabilisiert. Zur Entfernung des restlichen Acetons wurden die Deckgläschen danach in PBS + 1% BSA gewaschen. Die sich anschließenden Immunfluoreszenzfärbungen wurden, wie unter 2.12.5.2 und 2.12.5.3 beschrieben, durchgeführt.

#### **2.12.5.2. Färbung mittels spezifischer Antikörper**

Um die benötigte Antikörpermenge so gering wie möglich zu halten und eine Verdunstung der Antikörper-Lösung zu verhindern, erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung in einer feuchten Kammer. Auf ein nasses Tuch in der Kammer wurde Parafilm (Alcan Packaging, Neenah - USA) gelegt und auf diesen 30  $\mu$ l der Färbelösung pipettiert. Die Deckgläschen wurden stets mit der Zellseite nach unten auf die vorpipettierte Lösung gelegt.

Die Färbung erfolgte in drei Stufen. Zunächst wurden durch Inkubation mit PBS plus 1% BSA unspezifische Bindungen abgesättigt. Nach einmaligem Waschen in PBS + 1% BSA für 3 min wurden die Zellen mit dem primären Antikörper für 45 min bei RT inkubiert. Sollten mehrere Zielproteine durch Färbung detektiert werden, wurden die ersten Antikörper sukzessive auf die Zellen gegeben. Zur Entfernung nicht-gebundener primärer Antikörpermoleküle wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS + 1% BSA gewaschen und anschließend mit dem (den) sekundären Antikörper(n) für 30 min bei RT gefärbt. Fluoreszenzmarkiertes Phalloidin zur Darstellung von F-Aktin wurde wie ein sekundärer Antikörper eingesetzt und zusammen mit diesem(n) appliziert. Anschließend wurden die Deckgläschen zweimal in PBS + 1% BSA und einmal in PBS gewaschen, wonach sie auf einem Objektträger in Mowiol eingebettet wurden.

Mowiol, welches *p*-Phenylendiamin als Antibleichmittel enthält, wurde bei  $37^{\circ}\text{C}$  vorgewärmt und auf einen Objektträger pipettiert (3  $\mu$ l Mowiol pro Deckgläschen).

Die Deckgläschen wurden mit der Zellseite nach unten auf den Mowioltropfen gelegt und mit Nagellack versiegelt.

### **2.12.5.3. Innen-/Außenfärbung**

Für die Unterscheidung und Quantifizierung von internalisierten und extrazellulären Bakterien wurde eine Innen-/Außenfärbung durchgeführt.

Die Färbung erfolgte in zwei Schritten. Nach der Fixierung mit 4% Paraformaldehyd wurden zunächst die extrazellulären Bakterien, wie unter 2.12.5.2 beschrieben, rot angefärbt. Die Färbung erfolgte unter Verwendung eines gegen *S. aureus* oder gegen Invasin gerichteten Antikörpers und nachfolgender Färbung mit einem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem Aceton permeabilisiert. In dem zweiten Schritt wurden dann extra- und intrazelluläre Bakterien wie unter 2.12.5.2 grün angefärbt. In der Überlagerung roter und grüner Fluoreszenzen erscheinen extrazelluläre Bakterien in gelb/orange, da sie sowohl mit dem roten als auch dem grünen Farbstoff angefärbt sind, die intrazellulären Bakterien dagegen erscheinen nur in grün.

Die Quantifizierung für die Invasionskinetiken erfolgte durch Auszählen der Bakterien (Gesamtheit der assoziierten Bakterien und internalisierte Bakterien) unter dem Epifluoreszenzmikroskop.

### **2.12.5.4. Fluoreszenzmikroskopie**

Die Analyse Fluoreszenz-markierter Präparate erfolgte mit Hilfe eines Epi-Fluoreszenzmikroskops, welches mit einer digitalen CCD-Kamera (Details s. Punkt 2.1.2) ausgestattet war. Die Akquirierung der Bilder erfolgte mit dem Programm Metamorph (Molecular Devices, Downingtown - USA).

### **2.12.5.5. Videomikroskopie**

*In vivo*-Aufnahmen wurden mit Hilfe des konfokalen „spinning disc“-Systems UltraView LCI der Firma Perkin Elmer (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim - Deutschland) durchgeführt. Als Mikroskop diente das inverse Mikroskop Eclipse TE300 der Firma Nikon (Düsseldorf - Deutschland). Die Aufnahme und Erstellung der Filme erfolgte mit der UltraView Software Version 5.5.0.2 von Perkin Elmer.

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf Glasbodenschalen der Firma Mattek (Ashland - USA) mit einer Dichte von  $2 \times 10^4$ - $3 \times 10^4$  Zellen pro Schälchen ausgesät, die mit den dem(n) gewünschten DNA-Konstrukt(en) wie unter Punkt 2.12.4.7 beschrieben transfiziert wurden. Die *in vivo*-Aufnahmen wurden je nach Experiment in einem Zeitrahmen von ca. 10 min bis 1,5 h gemacht. Die Details zu der Akquirierung der Bilder finden sich im Anhang (s. Punkt 8.1).

### 2.12.5.6. Bildanalyse und –bearbeitung

#### **Erstellung von 3D-Bildern:**

Für die Erstellung von 3D-Darstellungen wurden Z-Stapel von fixierten Immunfluoreszenzpräparaten mit Hilfe des *UltraView LCI*-Systems konfokal aufgenommen. Die Bilder wurden mit der Software Volocity (Improvision, Tübingen – Deutschland) zu einem 3D-Bild zusammengesetzt. Die Werte für die Eichung von X, Y und Z- wurden aus der *Ultra View* Software übertragen.

#### **Auswertung der Bewegungen beschichteter Kügelchen auf der Zelloberfläche:**

Mit Hilfe der Software Metamorph (Molecular Devices, Downingtown – USA) wurden die mit dem *Ultra View LCI* aufgenommenen Filme zu der Bewegung FnBPA-beschichteter Kügelchen auf der Endothelzelloberfläche ausgewertet. Dazu wurde die Bewegung einzelner Kügelchen manuell nachverfolgt. Die zwischen den einzelnen Bildern zurückgelegte Distanz der Kügelchen, sowie die Geschwindigkeit wurden von der Software automatisch anhand der eingegeben Werte für die Größeneichung und der Pause zwischen den Bildern errechnet.

#### **Auswertung von Fluoreszenzintensitäten:**

Für die Auswertung von Fluoreszenzintensitäten der videomikroskopischen Daten wurde die *UltraView LCI* Software herangezogen. Die Fluoreszenzintensitäten wurden aus frei definierbaren sogenannten „*regions of interest*“ (ROI) von der Software automatisch angegeben. Die ROIs wurden eng um die zu untersuchenden Strukturen definiert, so dass Signale spezifisch erfasst wurden. Signale, die durch Hintergrundfluoreszenz auftraten wurden durch die Software automatisch abgezogen.

### 3. Ergebnisse

Unter geeigneten Voraussetzungen besitzen einige *Staphylococcus aureus*-Stämme die Fähigkeit, beim Menschen schwerwiegende Infektionen hervorzurufen (s. Einleitung). Für die Etablierung der Infektion sowie Kolonisierung des Wirtsgewebes ist die Adhäsion der Bakterien an die Wirtszelle von zentraler Bedeutung. Bakterielle Adhäsine bestimmen hierbei spezifisch, in welchen Geweben sich die Bakterien verankern können. Die über das „*fibronectin-binding protein A*“ (FnBPA) vermittelte Adhäsion an Fibronectin ermöglicht Staphylokokken u. a. die Anheftung und Invasion in Endothelzellen, auf deren Oberfläche Fibronectin insbesondere nach Gefäßverletzungen exprimiert wird. Während auf molekularer Ebene der Mechanismus der Fibronectin-FnBPA-Interaktion gut charakterisiert ist (s. Einleitung u. (Schwarz-Linek et al., 2004a)), sind bislang die dynamischen Vorgänge von Adhäsion und Invasion weitgehend unbeschrieben.

#### 3.1. Das Modellsystem für die Interaktion von *S. aureus* mit Endothelzellen

Um die dynamischen Prozesse der FnBPA-vermittelten Staphylokokken-Endothelzell-Interaktion zu charakterisieren, wurden verschiedene Infektions-Modelle verwendet.

Als bakterielle Modelle wurde zum einen der Staphylokokken-Stamm *S. aureus* DU 5883(pFnBA4) (*FnBPA-S. aureus*; (Greene et al., 1995)) eingesetzt, der als einziges Adhäsin das FnBPA auf der Zelloberfläche exprimiert. Dieser Stamm wurde in allen Versuchen eingesetzt, die einen Nachweis der Bakterien mittels Antikörper notwendig machten. In den videomikroskopischen Versuchen wurde ein *S. carnosus* Stamm eingesetzt, der das FnBPA auf seiner Oberfläche heterolog exprimiert (*FnBPA-S. carnosus* (Sinha et al., 2000)). Gegen diesen Stamm sowie das FnBPA waren keine Antikörper verfügbar, deshalb konnten die Färbungen für den Nachweis der intra- oder extrazellulären Lokalisation mit diesem Stamm nicht durchgeführt werden. Die adhäsiven Eigenschaften beider Stämme werden ausschließlich durch das FnBPA induziert.

Als nicht-bakterielles Modellsystem wurden Polystyrol-Kügelchen benutzt, die mit einem GST-Fusionsprotein der Fn-Interaktionsdomänen des FnBPA beschichtet wurden (Massey et al., 2001). Der Durchmesser der Kügelchen betrug 1  $\mu\text{m}$  und entspricht somit dem Durchmesser der Staphylokokken. Da die Kügelchen im Gegensatz zu den Bakterien kaum aneinander adhäreren, wurden diese für die unter Punkt 3.6. beschriebenen Versuche eingesetzt.

Als Vergleichsgröße zu Geschwindigkeit und Dynamik der FnBPA-vermittelten Invasion wurde die *Yersinia enterocolitica* Invasin-vermittelte Invasion herangezogen (Wiedemann et al., 2001). Invasin bindet ebenfalls an das  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin. Es handelt sich hier um eine direkte Interaktion mit der  $\beta$ -Kette des Integrins, die die Internalisierung der Bakterien in die Zellen induziert (Dersch et al., 1999; Isberg et al., 2000). Im Gegensatz dazu bindet FnBPA indirekt über das Fn an das  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin. Als Modellsysteme für die Invasin-abhängige Invasion dienten *Escherichia coli* HB101, die Invasin heterolog exprimierten (*Invasin-E. coli*), sowie Polystyrol-Kügelchen, die mit dem Fragment Inv397 beschichtet waren (s. Material und Methoden und (Wiedemann et al., 2001)).

Als Zellkulturmodell wurden Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen verwendet.

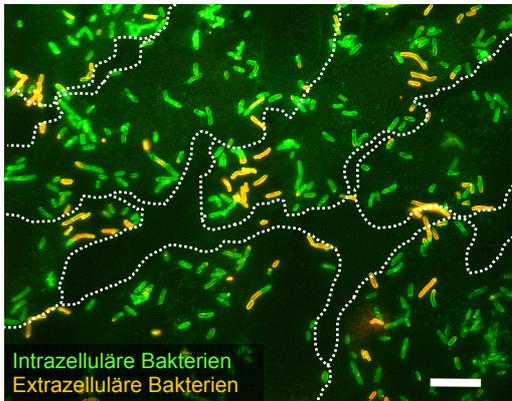
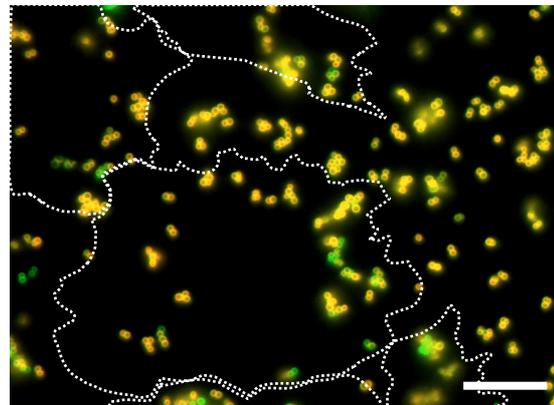
### **3.2. FnBPA-vermittelte Adhäsion und Internalisierung von Staphylokokken durch primäre humane Endothelzellen**

In murinen Fibroblasten konnte bereits gezeigt werden, dass Fn eine Verbindung zwischen FnBPA und dem Integrin  $\alpha 5\beta 1$  herstellt und die Aufnahme von *FnBPA-S. aureus* in die Zellen selektiv durch diese drei Proteine vermittelt wird (Fowler et al., 2000; Sinha et al., 2000).

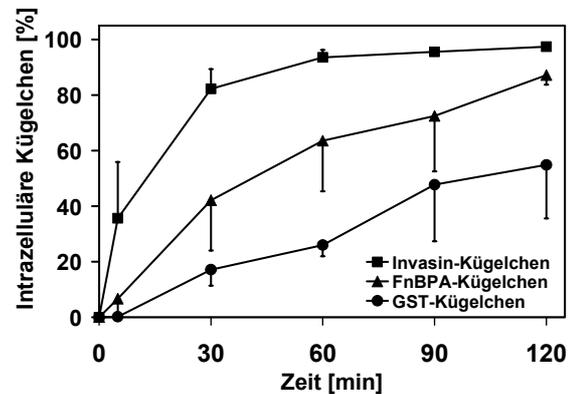
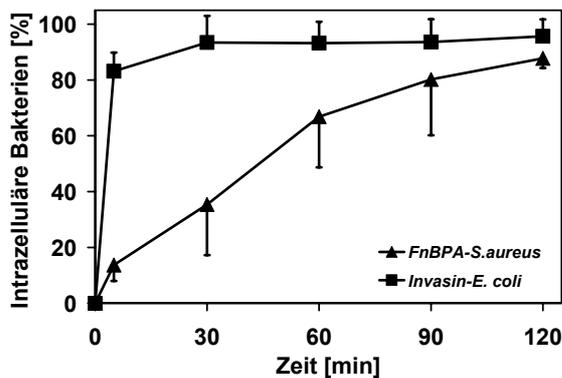
Um die Dynamik der FnBPA-abhängigen Aufnahme in primäre humane Endothelzellen (HUVEC) zu charakterisieren, wurde zunächst die Invasionskinetik von *FnBPA-S. aureus* im Vergleich zur Invasionskinetik von *Invasin-E. coli* untersucht. Dazu wurden Bakterien oder Polystyrolkugeln in einem definierten Bakterien/Kugeln zu Endothelzell-Verhältnis (s. Legende) auf die Zellen zentrifugiert. Nach definierten Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert, die Bakterien/Kugeln mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung, die zwischen extra- und intrazellulären Partikeln unterscheidet, sichtbar gemacht und mikroskopisch ausgezählt (Abb. 3.2. A). Aufgrund der angewendeten Färbetechnik erscheinen extrazelluläre Partikel gelb/orange, internalisierte dagegen in grün.

Es stellte sich in diesem Experiment heraus, dass unter gleichen Bedingungen die Invasion von *Invasin-E. coli* in HUVEC Zellen um ein Vielfaches schneller ist als die Invasion von *FnBPA-S. aureus* (vgl. Abb. 3.2 A, B). Nach 10 min waren bereits mehr als 80% der *Invasin*-exprimierenden Bakterien internalisiert, während in dem gleichen Zeitraum nur ca. 20% der *FnBPA*-exprimierenden Bakterien aufgenommen wurden. Die Aufnahme von *FnBPA-S. aureus* verlief annähernd linear, erst nach 120 min waren ca. 80% der Bakterien internalisiert (Abb. 3.2. B). Auch bei den beschichteten Kugeln zeigte sich ein ähnlicher Verlauf. Die *FnBPA*-Kugeln wiesen eine dem *FnBPA-S. aureus* vergleichbare Kinetik auf, während die mit *Invasin* beschichteten geringfügig langsamer internalisiert wurden als die *Invasin* exprimierenden Bakterien (nach 30 min ca. 80% Internalisierung). Von den mit GST-beschichteten Kontrollkugeln wurde ein Kontrollwert nach 60 min genommen, der eine basale Internalisierung von ca. 25% der adhärenzenden Bakterien durch die HUVEC ergab.

A

*Invasin-E. coli**FnBPA-S. aureus*

B



**Abb. 3.2.: Vergleich zwischen Invasin- und FnBPA-vermittelter Invasion in primäre humane Endothelzellen (HUVEC).**

- (A) Fluoreszenzaufnahmen von HUVEC, infiziert mit *Invasin-E. coli* (links) und *FnBPA-S. aureus* (rechts) in einem Verhältnis von 30:1 Bakterien/Zelle. Die Bakterien wurden auf die Zellen zentrifugiert und nach 10 min mit Formaldehyd fixiert. Durch die Innen-/Außenfärbung erscheinen extrazelluläre Bakterien in gelb/orange und internalisierte in grün. Die gestrichelten Linien markieren die Zellgrenzen. Weißer Balken: 10  $\mu$ m.
- (B) Graphische Darstellung der Invasionskinetiken von *FnBPA-S. aureus* und *Invasin-E. coli* (linkes Diagramm) und Invasin- bzw. FnBPA-Kügelchen sowie GST beschichteter Kontrollkügelchen in HUVEC (rechtes Diagramm). Die Bakterien bzw. Kügelchen wurden in einem Verhältnis von 50-100:1 pro Zelle auf die Zellen zentrifugiert, nach den angegebenen Zeitpunkten fixiert und einer Innen-/Außenfärbung unterzogen. Mikroskopisch wurde die Gesamtzahl der Zell-assoziierten Bakterien, sowie die Anzahl der internalisierten Bakterien gezählt und daraus der Anteil der internalisierten Bakterien errechnet. Die Werte stellen die Mittelwerte aus drei verschiedenen Experimenten +/- Standardabweichung dar. Es wurden für jeden Zeitpunkt mindestens 100 Zellen ausgezählt.

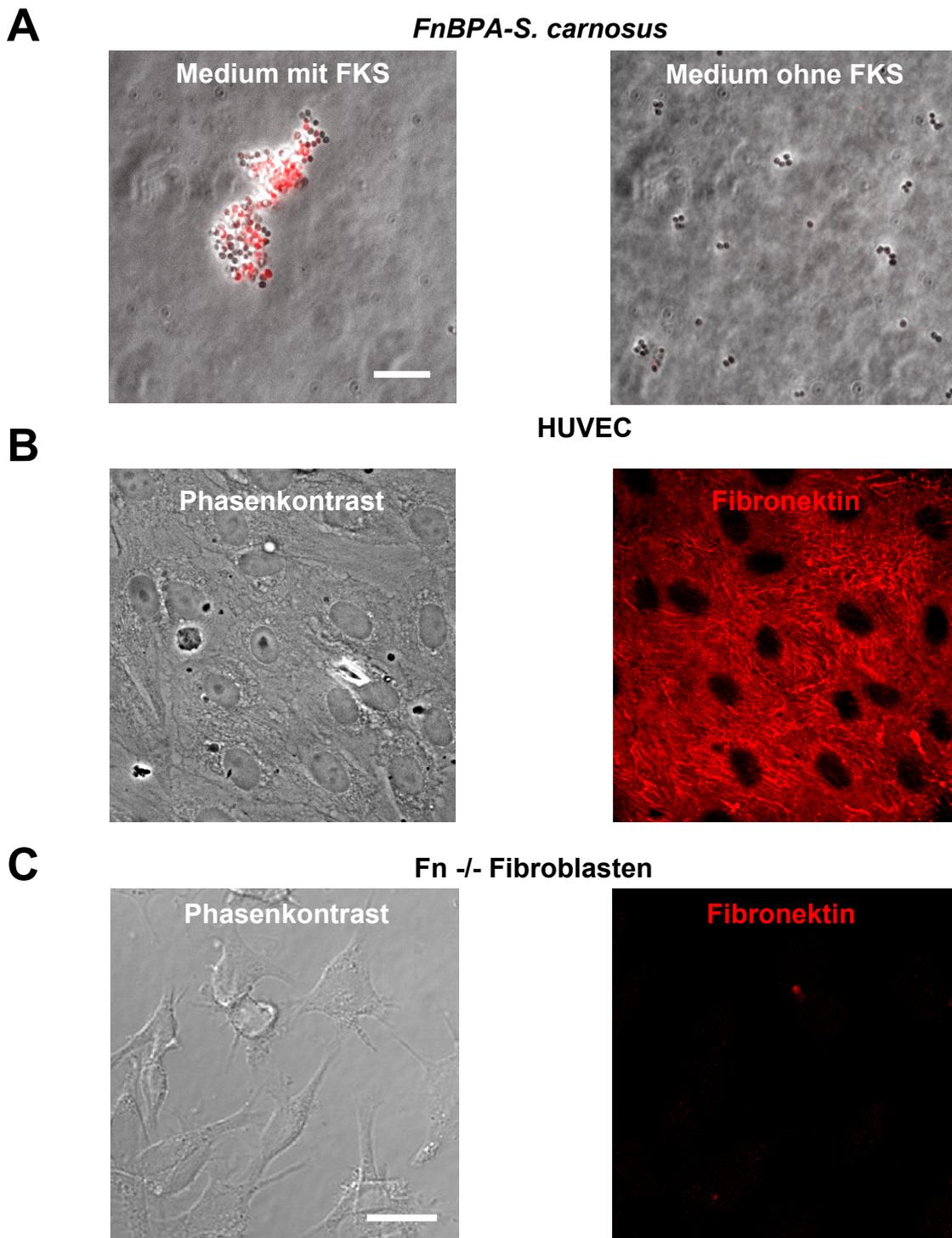
### 3.3. Abhängigkeit der FnBPA vermittelten *S. aureus*-Internalisierung von Plasma- oder zellulärem Fibronectin

Gelangen Staphylokokken bei einer Infektion in den Blutkreislauf, binden sie über das FnBPA lösliches Fibronectin (Fn) aus dem Blut oder sie binden direkt an das auf der Endothelzelloberfläche exprimierte Fn. Ähnlich verhält es sich bei den Infektionsmodellen im Versuch, da sowohl die Zellen Fn produzieren als auch das Zellkulturmedium Fn aus dem fötalen Kälberserum enthält. Es sollte nun die Frage geklärt werden, ob das im Zellkulturmedium enthaltene Fn notwendig ist oder ausreicht, um die Bakterien zu beschichten und dadurch die Internalisierung in die Zellen zu vermitteln. Gleichfalls wurde untersucht, ob das auf den Zellen gebundene Fn für Adhäsion und Invasion notwendig oder ausreichend ist.

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob das Fn aus dem Medium an das FnBPA der Staphylokokken binden kann. Dazu wurde eine Bakterien-Kultur für 30 min in Endothelzellmedium gehalten und das gebundene Fn mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. Für diesen Versuch wurde der Stamm *FnBPA-S. carnosus* verwendet, der auf seiner Oberfläche das Staphylokokken FnBPA heterolog exprimiert. Der *FnBPA-S. aureus* Stamm war für den Fn-Nachweis nicht geeignet, da er auf seiner Oberfläche Protein A exprimiert, welches den Antikörper unspezifisch gebunden hätte.

Abb. 3.3. A zeigt exemplarisch eine solche Immunfluoreszenzfärbung, in der das Bakterien-gebundene Fn deutlich zu erkennen ist. In der Kontrollfärbung, für die die Bakterien ohne Medium vorinkubiert wurden, ist keine spezifische Färbung durch den anti-Fn Antikörper erkennbar. Eine weitere Kontrolle, in welcher der *S. carnosus* Ausgangs-Stamm, der kein FnBPA exprimiert, in Endothelzellmedium vorinkubiert und gegen Fn gefärbt wurde, zeigte ebenfalls kein spezifisches Signal (Daten nicht dargestellt). Dies zeigt, dass lösliches Fn aus dem Medium durch FnBPA spezifisch gebunden werden kann.

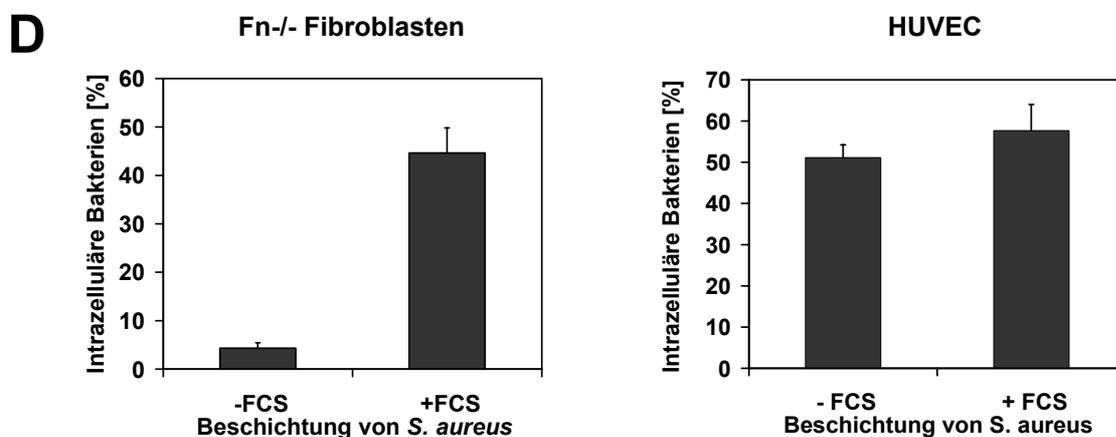
Um der Fragestellung nachzugehen, ob für die Internalisierung der Bakterien in Endothelzellen auch das zellgebundene Fn ausreicht, wurde die Effizienz der Invasion von Fn-beschichteten Bakterien mit der von unbeschichteten verglichen. Die Bakterien wurden dazu, wie oben beschrieben, in Endothelzellmedium vorinkubiert und in PBS gewaschen. Vor dem Invasionsversuch wurden die Zellen mit serumfreiem Endothelzellmedium mehrfach gewaschen und darin während des Versuches kultiviert, um eine Bindung von Fn-Rückständen aus dem Serum-enthaltenden Medium an die Bakterien auszuschließen. Abb. 3.3. D zeigt, dass die Invasion von *FnBPA-S. aureus* in die Endothelzellen auch unabhängig von dem Serum-Fn erfolgen kann, da sowohl Fn-beschichtete als auch unbeschichtete Bakterien gleichermaßen in die Zellen invadieren.



**Abb. 3.3.: Nachweis von Fibronektin (Fn) bei *FnBPA-S. carnosus*, HUVEC und Fn<sup>-/-</sup> Fibroblasten mittels Immunfluoreszenzfärbung.**

- (A) Phasenkontrastaufnahme von *FnBPA-S. carnosus* überlagert mit der korrespondierenden Immunfluoreszenzfärbung gegen Fn (rot). *FnBPA-S. carnosus* wurde aus LB-Medium in Standard-Endothelzellmedium (mit 2% FKS, **links**) oder Basalmedium (ohne FKS, **rechts**) überführt, für 30 min schüttelnd inkubiert und Fn mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen.
- (B) Phasenkontrastaufnahme von HUVEC, kultiviert in Standard-Endothelzellmedium (mit 2% FKS, **links**) und korrespondierende Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung des endogen exprimierten Fn (rot, **rechts**).
- (C) Phasenkontrastaufnahme von Fn<sup>-/-</sup> Fibroblasten (**links**), kultiviert unter serumfreien Bedingungen und korrespondierende Immunfluoreszenzfärbung gegen Fn. (**rechts**)  
Weiße Balken: 10 µm

Aus den oben dargestellten Versuchen leitete sich die Frage ab, ob die Fn-Beschichtung auf der Bakterienoberfläche für eine Invasion in die Endothelzellen ausreicht. Da das Fn auf der Oberfläche von Endothelzellen nicht vollständig entfernt werden kann, wurde eine Fibroblasten-Zelllinie mit deletiertem Fibronektin-Gen eingesetzt, die unter Serum- und Fn-freien Bedingungen kultiviert wurde (Nyberg et al., 2004). Das Fehlen von Fn in dieser Zelllinie wurde mittels einer Immunfluoreszenzfärbung bestätigt (Abb. 3.3. C). Diese Zelllinie wurde sowohl mit Fn-beschichteten als auch unbeschichteten *FnBPA-S. aureus* infiziert und die Invasionsrate mikroskopisch ausgewertet, indem die Anzahl der zellassoziierten und invadierten Bakterien ausgezählt und daraus die Aufnahmezeit berechnet wurde. Aus Abb. 3.3. D (linkes Diagramm) wird ersichtlich, dass es unter Fn-freien Bedingungen nur eine basale Internalisierung der Bakterien gibt. Beschichtete Bakterien weisen dagegen unter gleichen Bedingungen eine Invasionsrate von mehr als 40% auf.



**Abb. 3.3.: Abhängigkeit der FnBPA-vermittelten *S.aureus*-Invasion von Fibronektin in Fn-/- Fibroblasten und HUVEC.**

- (D) *FnBPA-S.-aureus* aus der logarithmischen Wachstumsphase wurde entweder in Standard-Endothelzellmedium (mit 2% FKS) inkubiert, um die Bakterien mit Fn mit aus dem Serum zu beschichten, oder in FKS-freiem Basalmedium (siehe C). **(links)** In serumfreiem Medium kultivierte Fn-/- Fibroblasten und in Standard-Endothelzellmedium kultivierte HUVEC **(rechts)** wurden mit dem jeweiligen FKS-freiem Basalmedium gewaschen und für 60 min darin weiterinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den Fn-beschichteten oder -unbeschichteten Bakterien in einem Verhältnis von ca. 100:1 Bakterien pro Zelle für 60 min infiziert. Nach einer Innen-/Außenfärbung wurde der Anteil der in die Zellen invadierten Bakterien mikroskopisch bestimmt, indem die Anzahl der extrazellulären von der Gesamtzahl der Bakterien subtrahiert wurde. Jeder Wert stellt den Mittelwert +/- Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten dar. Es wurden mindestens 100 Zellen für jeden Datenpunkt ausgezählt.

Zusammenfassend zeigen die Versuche deutlich, dass sowohl zelluläres als auch Bakterien-gebundenes Fn aus dem Medium für eine Aufnahme von *S. aureus* in Zellen ausreichen. Weiterhin wird deutlich, dass sich die Mechanismen der FnBPA- und Invasin-abhängigen Invasion grundsätzlich voneinander unterscheiden, obwohl

beide durch den  $\alpha 5\beta 1$  Rezeptor vermittelt werden. Während durch Invasin eine Internalisierung innerhalb weniger Minuten bewirkt wird, verweilen FnBPA-exprimierende Staphylokokken im Mittel ca. 45 min auf der Zelloberfläche, bevor sie aufgenommen werden.

### **3.4. Charakterisierung der durch FnBPA induzierten Adhäsionsstrukturen auf der Oberfläche von Endothelzellen**

Die basale Verankerung von Zellen mit der extrazellulären Matrix erfolgt über komplexe Adhäsionsstrukturen, deren Hauptrezeptoren, die Integrine, an unterschiedliche Matrixproteine binden (Danen et al., 2002). Durch Multimerisierung der Integrine nach Ligandenbindung kommt es zur Ausbildung unterschiedlicher Strukturen, die jeweils durch ein spezifisches Matrixprotein, dessen Rezeptor und zytosolisch assoziierte Proteine klassifiziert werden können (Zamir et al., 1999). Zu diesen Adhäsionsstrukturen zählen fokale Kontakte/Adhäsionen und fibrilläre Adhäsionen (s. Einleitung).

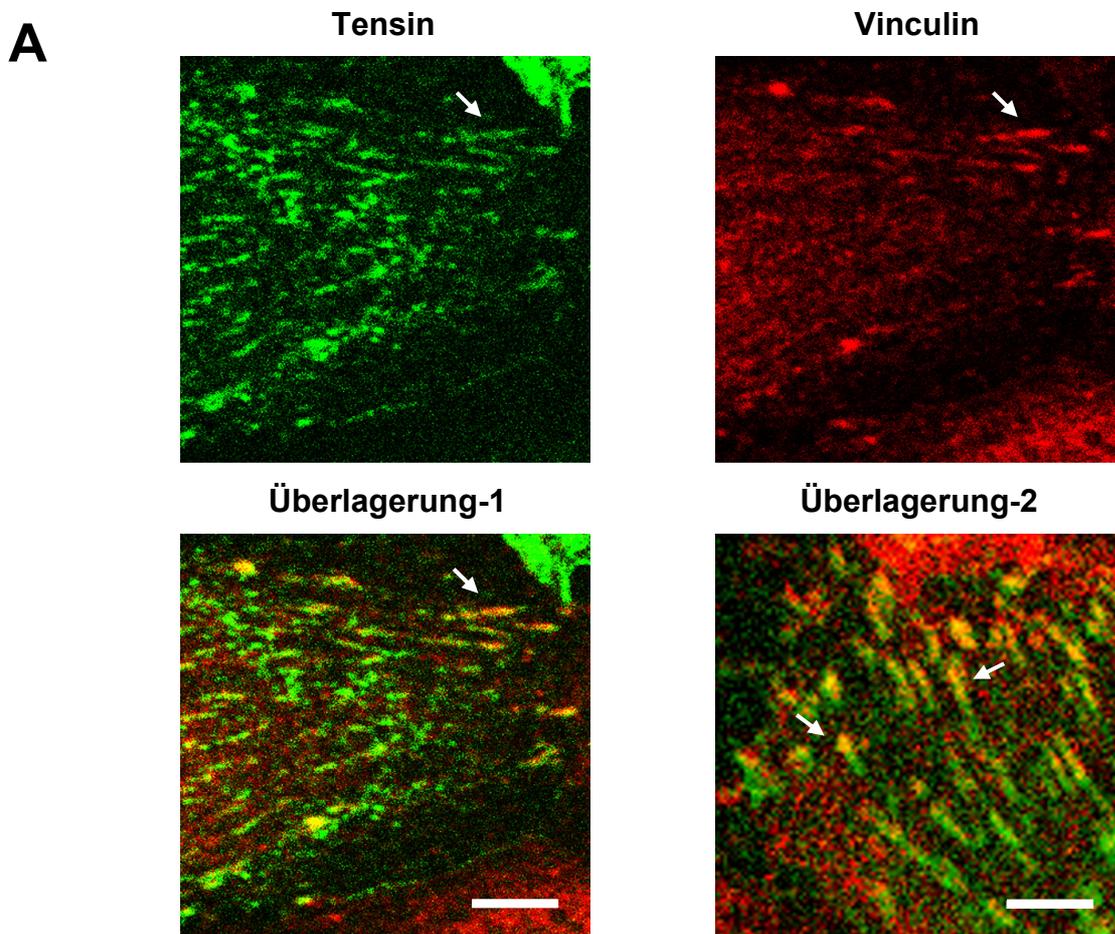
Fokale Kontakte/Adhäsionen verankern die Zelle über das Integrin  $\alpha v\beta 3$  an Vitronektin und sind u.a. mit Paxillin, Vinculin, phosphorylierter „*focal adhesion kinase*“ (pFAK), sowie Talin angereichert. Diese Adhäsionen sind an der Zellperipherie fest mit der rigiden Vitronektin-Matrix verbunden. Fibrilläre Adhäsionen dagegen sind motile Strukturen, die sich vom Zellrand in Richtung Nukleus aus fokalen Kontakten heraus entwickeln. Sie sind über das  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin an Fibronektin verankert und mit Tensin, einem Aktin-bindenden Protein angereichert. Dennoch ist Tensin auch in FA zu finden, jedoch ist der Grad der Anreicherung relativ gering im Vergleich zu fibrillären Adhäsionen (Katz et al., 2000; Zamir et al., 1999), so dass Tensin als Markerprotein besonders für fibrilläre Adhäsionen herangezogen wird.

Obwohl die FnBPA-vermittelte Adhäsion von *S. aureus* an die Endothelzellen apikal erfolgt, ist sie aufgrund der Beteiligung von Fn und dem  $\alpha 5\beta 1$ -Rezeptor vermutlich ähnlich wie die basale Zell-Matrix-Adhäsion organisiert. Um eine genauere Charakterisierung der durch die Staphylokokken induzierten Adhäsionen zu ermöglichen, wurde eine Methode zur Unterscheidung zwischen fokalen Kontakten und fibrillären Adhäsionen etabliert. Dazu wurde ein GFP-Fusionsprotein von Tensin (s. Material und Methoden) als Marker für fibrilläre Adhäsionen in HUVEC exprimiert und die Zellen gleichzeitig mit einem der Marker für fokale Adhäsionen, Vinculin, Paxillin oder pFAK gefärbt.

Als fokale Adhäsionen konnten streifenförmige Anreicherung der genannten Proteine, die vornehmlich in der Zellperipherie mit dem GFP-Tensin kolokalisierten, identifiziert werden. Im Gegensatz erscheinen fibrilläre Adhäsionen als streifen- oder punktförmige Adhäsionen in der Zellmitte, die nur mit Tensin angereichert sind (Abb. 3.4. A). Ähnlich, wie für andere Zelltypen bereits gezeigt wurde, konnten Paxillin oder pFAK in fibrillären Adhäsionen nicht nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis zeigt, dass es mit Hilfe der o.g. Markerproteine nun auch in nachfolgenden Experimenten möglich sein würde, fokale Kontakte und fibrilläre Adhäsionen deutlich voneinander zu unterscheiden. Somit konnte in nachfolgenden Versuchen einerseits der Frage nachgegangen werden, ob die Marker auch auf der Zelloberseite an den durch FnBPA induzierten Kontaktstellen zwischen Bakterien/Kügelchen und Zellen nachweisbar sind. Andererseits konnte untersucht

werden, ob und wie die Invasin- vermittelte Adhäsion sich von der FnBPA- induzierten unterscheidet.

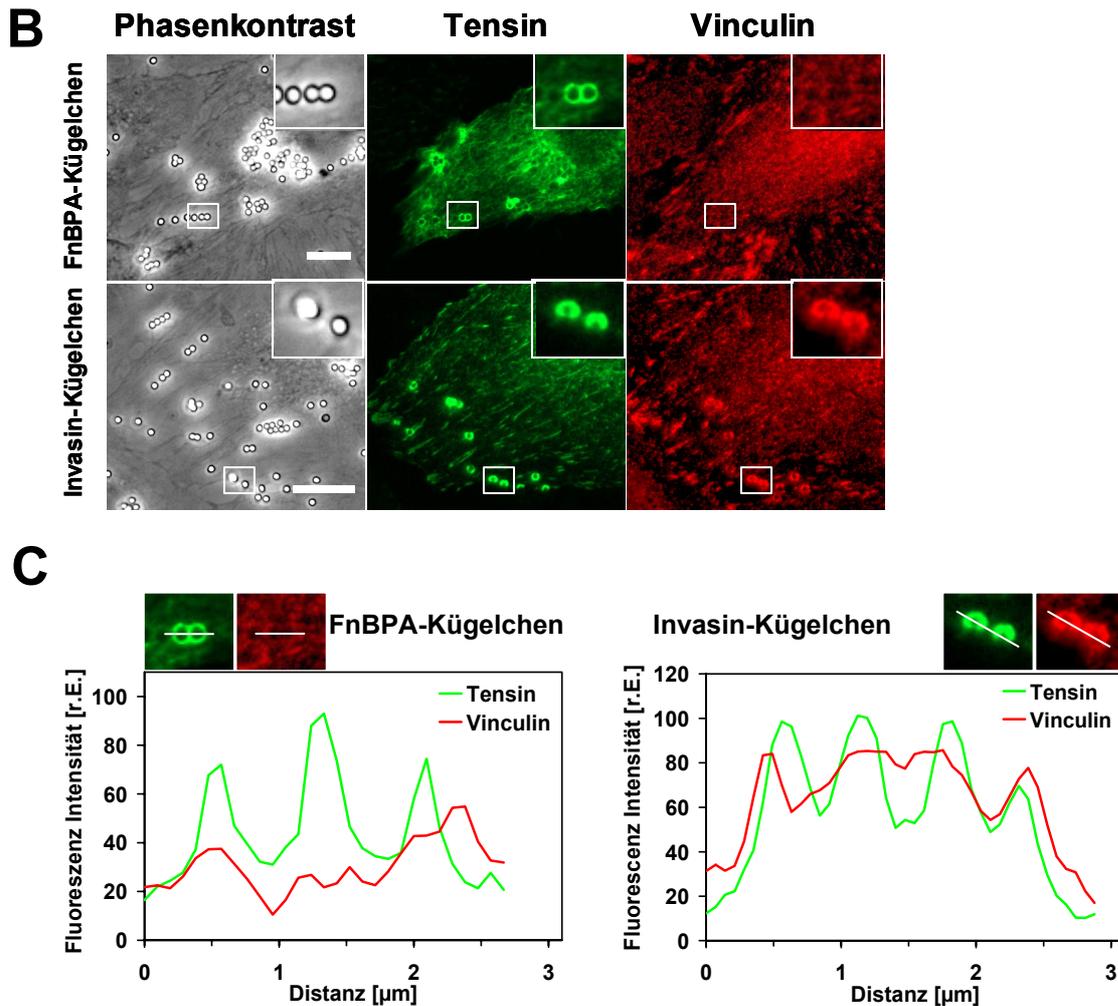


**Abb. 3.4.: Unterscheidung zwischen fibrillären Adhäsionen und fokalen Kontakten in HUVEC.**

- (A) Konfokale Immunofluoreszenz-Aufnahmen von HUVEC, transfiziert mit GFP-Tensin (grün) und gefärbt gegen Vinculin (rot). Der Pfeil in der Überlagerung-1 markiert die Kolokalisation von Tensin und Vinculin in peripheren fokalen Adhäsionen (orange). Die Pfeile in der Überlagerung-2 verweisen auf streifenförmige Adhäsionen mit partieller Überlagerung von Tensin und Vinculin am Zellrand (orange) und Tensin alleine an dem in Richtung der Zellmitte weisenden Abschnitt. Weißer Balken Überlagerung-1: 6µm  
Weißer Balken Überlagerung-2: 5,5 µm

Die Unterschiede zwischen FnBPA- und Invasin-induzierten Adhäsionsstellen sollten mittels Immunfluoreszenzfärbungen der o.g. Marker gezeigt werden. In Abb. 3.4. B, C ist die Lokalisation von Tensin und Vinculin an FnBPA- und Invasin-vermittelten Adhäsionsstellen dargestellt. Latex-Kügelchen, die mit FnBPA oder Invasin beschichtet waren, wurden auf GFP-Tensin-exprimierende HUVEC gegeben, diese nach einer Stunde fixiert und gegen Vinculin als Marker für fokale Adhäsionen gefärbt.

Wie in Abb. 3.4. B deutlich zu erkennen ist, wird GFP-Tensin sowohl an die FnBPA- als auch an die Invasin-Kügelchen rekrutiert, während Vinculin nur an den Invasin-Kügelchen akkumuliert. Eine quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensitäten der in Abb. 3.4. B gezeigten Ausschnittsvergrößerungen findet sich in Abb. 3.4. C. Die Verteilung der Intensitätsmaxima entlang der eingezeichneten Linie durch die adhärierenden Kügelchen zeigt, dass eine Kolokalisation von Tensin und Vinculin nur an den Invasin-, nicht aber an den FnBPA-Kügelchen vorliegt. Dies lässt vermuten, dass es sich bei den von *S.aureus*-FnBPA hervorgerufenen Adhäsionen um Strukturen handelt, die den normalerweise ventral vorkommenden fibrillären Adhäsionen gleichen.



**Abb. 3.4.:** Die durch FnBPA von *S. aureus* auf HUVEC induzierten Adhäsionen gleichen fibrillären Adhäsionen.

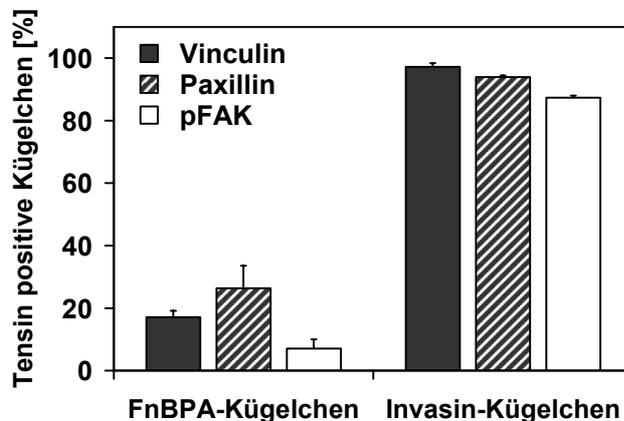
- (B) Immunofluoreszenz-Aufnahmen von HUVEC, transfiziert mit pEGFP-Tensin (grün) und gefärbt gegen Vinculin (rot). Die Endothelzellen wurden mit FnBPA-Kügelchen (**obere Zeile**) oder Invasin-Kügelchen (**untere Zeile**) für 1 h infiziert. Das Verhältnis von Kügelchen zu Zellen betrug 50-100:1. Weiße Balken: 10 $\mu\text{m}$ .
- (C) Verteilung der Intensitätsmaxima von Vinculin und Tensin in HUVEC, infiziert mit FnBPA- bzw. Invasin-Kügelchen. Die Fluoreszenzaufnahmen über den Diagrammen entsprechen den Ausschnittvergrößerungen in (B). Die Messung der Fluoreszenzintensität (r.E. = rel. Einheiten) erfolgte entlang der eingezeichneten weißen Linie für Tensin und Vinculin an den FnBPA-Kügelchen (**links**) bzw. Invasin-Kügelchen (**rechts**).

In Abb. 3.4. B wird anhand von Vinculin als Marker für fokale Adhäsionen der Unterschied zwischen den durch FnBPA-induzierten Anheftungsstellen und den durch Invasin-induzierten Adhäsionsstellen dargestellt.

Um die Daten mit anderen, für fokale Kontakte spezifischen Marker abzusichern, sollte der in Abb. 3.4. B gezeigte Versuch mit Paxillin und pFAK wiederholt und zusätzlich quantitativ ausgewertet werden. Dazu wurden Zellen mit dem für GFP-Tensin kodierenden Konstrukt transfiziert, mit Invasin- oder FnBPA-beschichteten Kügelchen infiziert und gegen die Proteine Vinculin, Paxillin und pFAK gefärbt. Anschließend wurden alle mit Tensin assoziierten Kügelchen mikroskopisch ausgezählt und deren Kolokalisation mit einem der genannten Marker überprüft (Abb. 3.4. D).

Es zeigte sich, dass eine Kolokalisation der o.g. Proteine mit GFP-Tensin an den FnBPA-Kügelchen nur sehr selten auftritt, während fast alle mit GFP-Tensin assoziierten Invasin-Kügelchen gleichzeitig auch mit Vinculin, Paxillin oder pFAK assoziiert waren. So sind z.B. nur 17% der GFP-Tensin-positiven FnBPA-Kügelchen auch positiv für Vinculin, während an 97% der Invasin-Kügelchen beide Proteine lokalisieren.

## D



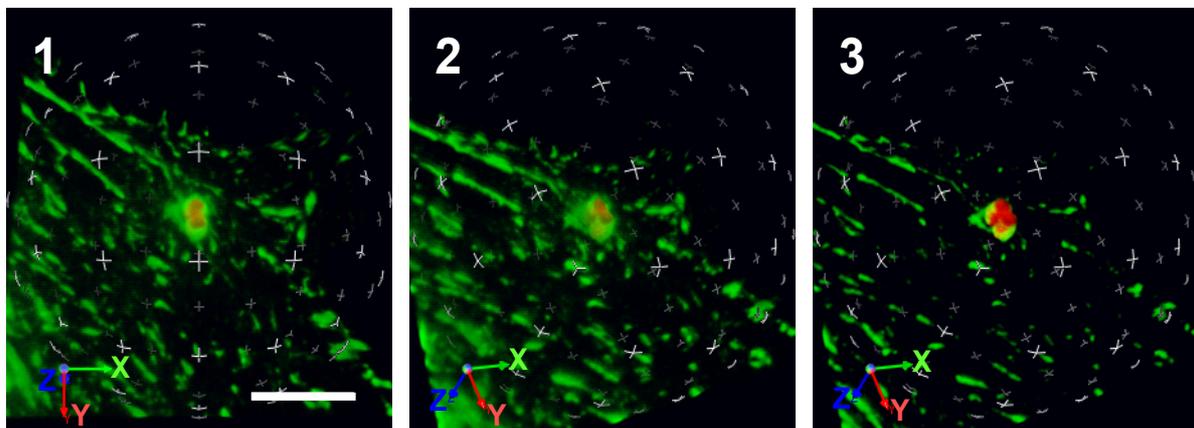
**Abb. 3.4.: FnBPA und Invasin induzieren unterschiedliche Adhäsionsstrukturen auf HUVEC.**

- (D) Quantitative Auswertung der Korekrutierung von Adhäsionsproteinen, die spezifisch für fokale Adhäsionen sind, an GFP-Tensin-positiven FnBPA- bzw. Invasin-beschichteten Kügelchen. HUVEC wurden mit pEGFP-Tensin transfiziert und mit Invasin- oder FnBPA-Kügelchen für 1 h infiziert. Das Verhältnis von Kügelchen zu Zellen betrug 50-100:1. Die Marker für fokale Adhäsionen Vinculin, Paxillin oder pFAK wurden anschließend mittels Immunofluoreszenzfärbung nachgewiesen. Die Anzahl der Kügelchen, die für GFP-Tensin alleine oder für GFP-Tensin und einem der genannten Adhäsionsproteine positiv waren, wurde mikroskopisch ausgezählt. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unterschiedlichen Experimenten. Pro Wert wurden 100 GFP-Tensin positive Adhäsionen ausgezählt.

Diese Daten zeigen, dass die durch Invasin induzierten Adhäsionsstrukturen auf den Endothelzellen klassischen fokalen Adhäsionen vergleichbar sind. Im Gegensatz dazu ähneln die durch FnBPA induzierten Anheftungsstellen fibrillären Adhäsionen.

Fibrilläre Adhäsionen und fokale Kontakte sind Zell-Matrix-Kontakte, die für die Unterseite von Zellen beschrieben wurden. Da die Bakterien/Kügelchen auf der Zelloberseite adhären, sollte eindeutig gezeigt werden, dass deren Kolokalisation mit Tensin apikal erfolgt. In Abb. 3.4. E ist ein 3D-Modell einer GFP-Tensin exprimierenden Zelle dargestellt, auf deren Oberseite eine Bakteriendublette adhäriert. In der „gekippten Ansicht“ in Bild 2 und 3 wird deutlich, dass die Bakterien auf der Oberseite lokalisieren und von Tensin becherförmig umschlossen sind.

## E



**Abb. 3.4. E: 3D-Rekonstruktion einer FnBPA-*S. aureus* induzierten Tensin-assoziierten Adhäsions-Struktur.**

GFP-Tensin exprimierende Endothelzellen wurden mit *FnBPA-S. aureus* infiziert und die Bakterien mittels einer Außenfärbung gegen *FnBPA-S. aureus* sichtbar gemacht. Es wurde ein Z-Stapel der gezeigten Zelle aufgenommen und zu einem 3D-Bild rekonstruiert.

- (1) Aufsicht auf eine Zelle (Ausschnitt). Eine Bakteriendublette (rot) wird von Tensin (grün) becherförmig umschlossen.
- (2) Gleiche Zelle wie (1), gedreht und nach hinten gekippt. Die Lokalisation der Bakterien auf der Zelle und der „Tensin-Becher“ sind deutlich zu erkennen.
- (3) Wie (2) mit stark abgeschwächter Intensität der Tensin-Fluoreszenz, so daß die Bakteriendublette sichtbar wird.

Das farbige Achsenkreuz deutet die räumliche Orientierung des Bildes an. Die kugelförmig über der Abbildung verteilten kreuzförmigen Markierungen vermitteln den räumlichen Eindruck.

Weißer Balken: 5µm

### 3.5. FnBPA-vermittelte Bewegung von Staphylokokken auf der Oberfläche von Endothelzellen

Nach dem momentan gängigen Modell zur Entwicklung und Organisation von Adhäsionsstrukturen entwickeln sich fibrilläre Adhäsionen aus reifen fokalen Adhäsionen (Zaidel-Bar et al., 2004). In videomikroskopischen Aufnahmen von GFP-Tensin-exprimierenden humanen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass es eine zentripetale Bewegung von Tensin aus fokalen Adhäsionen gibt, die mit Aktomyosin-Inhibitoren wie H-7 oder ML-7 hemmbar ist (Zamir et al., 2000).

Vor diesem Hintergrund stellte sich nun die Frage, ob die auf der Zelloberfläche adhätierenden Bakterien durch die FnBPA-induzierten Adhäsionsstrukturen auf der Zelloberfläche ebenfalls transportiert werden. Zur Beantwortung dieser Frage wurden HUVEC mit *FnBPA-S. carnosus* infiziert und videomikroskopisch im Phasenkontrast beobachtet. Dem Film-1 (s. Anhang) entnommene Einzelaufnahmen sind in Abb. 3.5. dargestellt. In diesen wird exemplarisch gezeigt, dass Bakterien, die auf die Zellen sedimentieren, am Zellrand adhätieren und von dort zentripetal in Richtung des Nukleus transportiert werden. Die Geschwindigkeit der transportierten Kügelchen auf der Zelloberfläche betrug im Mittel 50  $\mu\text{m}/\text{h}$ . Dieser Wert ist vergleichsweise hoch, da für die ventralen fibrillären Adhäsionen in der Literatur ein Wert von ca. 18  $\mu\text{m}/\text{h}$  angegeben wird (Zamir et al., 2000).

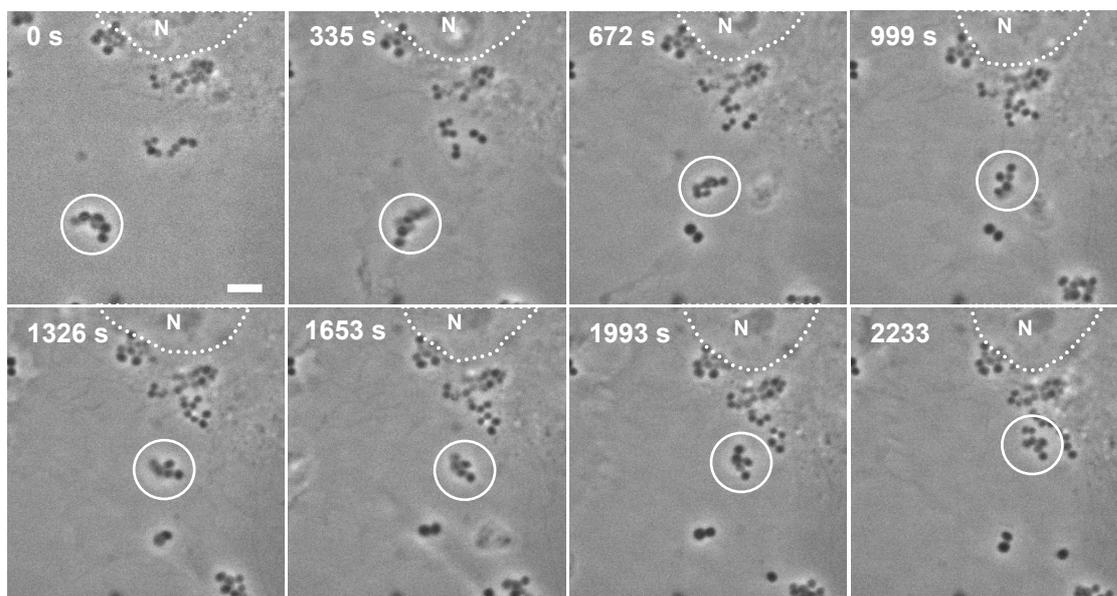


Abb. 3.5.: Zentripetaler Transport von *FnBPA-S. carnosus* auf der Oberfläche von HUVEC.

HUVEC wurden mit *FnBPA-S. carnosus* infiziert und die Bewegung der Bakterien videomikroskopisch im Phasenkontrast dokumentiert. Die dargestellten Einzelbilder wurden dem im Anhang angeführten Film-1 entnommen. Dem ersten Bild wurde der Zeitpunkt Null zugeordnet, den nachfolgenden Bildern die den Originalabständen entsprechenden Zeiten. Der eingezeichnete Kreis zeigt eine Bakterientraube, die vom Zellrand in Richtung des Zellkernes transportiert wird. Die gestrichelte Linie markiert die Position des Nukleus (N).

Weißer Balken: 5  $\mu\text{m}$

Obwohl es nicht möglich ist, für die im Phasenkontrast aufgenommenen Staphylokokken eine intra- oder extrazelluläre Lokalisation zu bestimmen, kann man aufgrund der unter Punkt 3.2. beschriebenen Invasionskinetik davon ausgehen, dass die Bakterien während des Transportes noch extrazellulär sind. Diese Schlussfolgerung ergibt sich aus der Tatsache, dass die FnBPA-vermittelte Invasion sehr langsam vonstatten geht und die Bakterien demzufolge meist sehr lange auf der Zelloberfläche adhären, bevor sie in die Zelle aufgenommen werden.

Insgesamt untermauern die unter Punkt 3.5. erhaltenen Daten das Resultat, dass es sich bei den von *S. aureus* FnBPA-induzierten Adhäsionsstrukturen um fibrilläre Adhäsionen handelt.

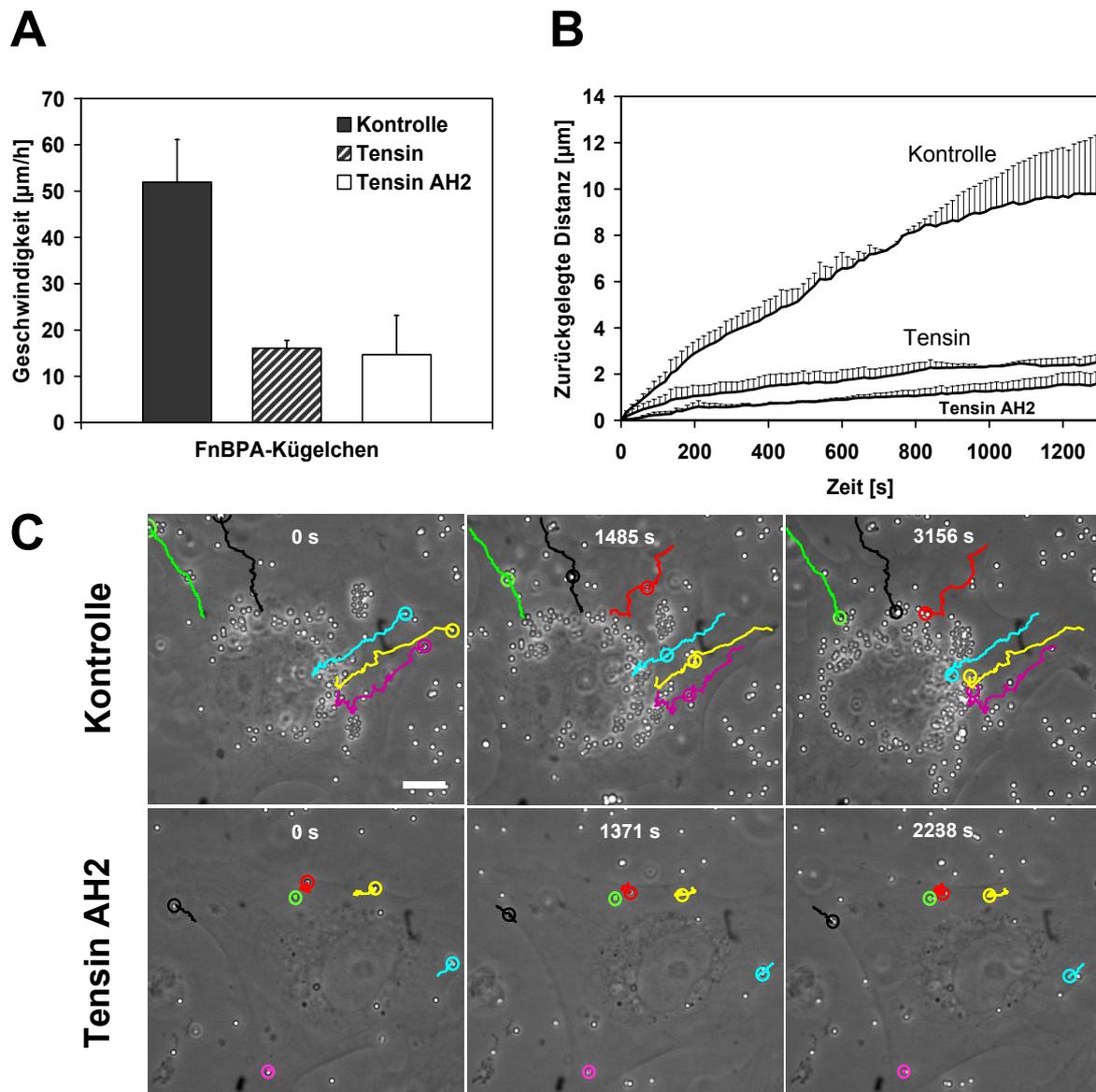
### **3.6. Einfluss der Tensin-Modulation auf den Transport FnBPA-beschichteter Polystyrol-Kügelchen auf der Oberfläche von Endothelzellen**

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei den von *S. aureus* FnBPA-induzierten Strukturen um Tensin-positive fibrilläre Adhäsionen handelt, stellte sich die Frage, ob der auf der Zelloberfläche beobachtete Transport durch Modulation dieser Adhäsionsstrukturen beeinflussbar ist.

In humanen Fibroblasten konnte bereits gezeigt werden, dass Überexpression der „*actin homology-2 domain*“ von Tensin (Tensin-AH2) die Kontakte zur EZM, die Dynamik der  $\alpha 5\beta 1$ -Translokation und Fn-Fibrillogenese inhibiert (Pankov et al., 2000). Daher sollte durch Überexpression von Tensin bzw. dessen negativ regulierender AH2-Domäne der Einfluss von Tensin auf den Transport von FnBPA-beschichteten Kügelchen untersucht werden. Dazu wurden HUVEC mit den für GFP-Tensin bzw. GFP-Tensin-AH2 kodierenden Konstrukten transfiziert und mit FnBPA-beschichteten Kügelchen infiziert. In videomikroskopischen Versuchen wurde dann zum einen die Distanz, welche die Kügelchen auf der Oberfläche Tensin- bzw. Tensin-AH2 transfizierter Zellen zurückgelegt haben, gemessen und zum anderen die Geschwindigkeit der FnBPA-Kügelchen bestimmt. Die zurückgelegte Distanz wurde dabei als die Strecke definiert, die von dem Ausgangspunkt der Messung bis zu dem Endpunkt der Bewegung (des Filmes) zurückgelegt wurde. Die Geschwindigkeit wurde aus der zwischen einzelnen Aufnahmen zurückgelegten Strecke und dem Abstand der aufeinanderfolgenden Aufnahmen zueinander errechnet.

Wie in Abb. 3.6. A dargestellt, vermindert sich die Geschwindigkeit der FnBPA-Kügelchen in Tensin oder Tensin-AH2 exprimierenden Zellen um ca. 70% im Vergleich zu den nicht-transfizierten Kontrollzellen. Auch die zurückgelegte Distanz reduzierte sich in den transfizierten Zellen um 80-90% (Abb. 3.6. B, C und Film-2 im Anhang) und beschränkte auf hauptsächlich auf kurze ungerichtete Bewegungen an den Zellrändern (Film-3 im Anhang).

Diese Daten sind ein deutlicher Hinweis darauf, dass die zentripetale Bewegung der FnBPA-beschichteten Kügelchen auf den Endothelzellen durch Tensin moduliert wird.



**Abb. 3.6.: Beeinflussung des zentripetalen Transportes FnBPA-beschichteter Kügelchen durch Inhibierung von Tensin.**

HUVEC, transfiziert mit pEGFP-Tensin oder pEGFP-Tensin AH2 bzw. untransfizierte Kontrollzellen wurden mit FnBPA-beschichteten Kügelchen infiziert und im Phasenkontrast videomikroskopiert. Die Bewegung der Kügelchen auf der Zelloberfläche wurde aufgezeichnet und ausgewertet (s. auch Anhang Film-2 + 3).

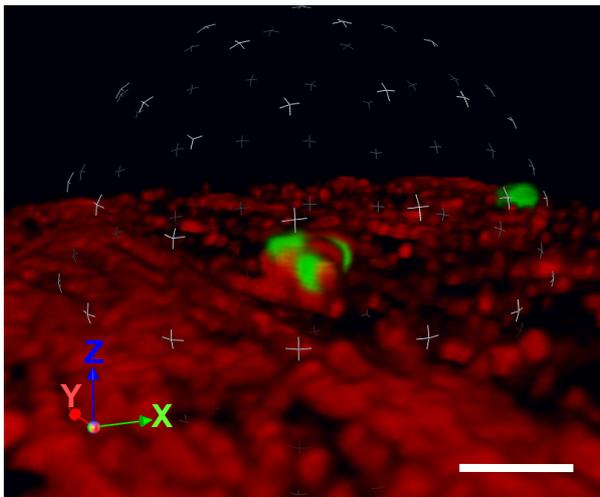
- (A) Geschwindigkeit der Kügelchen auf der Oberfläche von HUVEC. Jeder Balken zeigt den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 9 (GFP-Tensin), 21 (GFP-Tensin-AH2) oder 19 (Kontrolle) gemessenen Geschwindigkeiten aus 2-4 unterschiedlichen Experimenten.
- (B) Zurückgelegte Distanz von FnBPA-Kügelchen auf der Oberfläche von Endothelzellen. Gemessen wurde die Distanz, welche die Kügelchen ausgehend von ihrem jeweiligen Startpunkt (= 0 s) auf der Zelle zurückgelegt haben.
- (C) Bewegung von FnBPA-Kügelchen auf der Oberfläche GFP-Tensin-AH2-exprimierender oder untransfizierter Kontrollzellen. Die dargestellten Einzelbilder wurden den Filmen 2 + 3 (s. Anhang) entnommen. Dem ersten Bild wurde der Zeitpunkt Null zugeordnet, den nachfolgenden Bildern die den Originalabständen entsprechenden Zeiten. Die Bewegungen ausgewählter Kügelchen wurden als farbige Linien nachgezeichnet. Die Kreise markieren die aktuelle Position der Kügelchen zu dem angegebenen Zeitpunkt.  
Weißer Balken:  $10\mu\text{m}$

### 3.7. Auswirkung der FnBPA-vermittelten *S. aureus*-Adhäsion auf die subkortikale Aktindynamik

Bei phagozytotischen Prozessen kommt es initial zur Ausbildung einer stark mit Aktin angereicherten Membranausstülpung, die sich um das aufzunehmende Partikel schließt. Auch für die FnBPA-vermittelte Aufnahme von Staphylokokken durch nicht-professionelle Phagozyten wurde diese Struktur beschrieben (Agerer et al., 2005).

Da Endothelzellen ebenfalls zu den nicht-professionellen Phagozyten zählen, sollte diese spezifische Aktinanreicherung zum einen auch in Endothelzellen nachgewiesen werden, zum anderen stellte sich die Frage, ob Aktin sich an das entstehende Phagosom der noch partiell extrazellulären Bakterien anlagert oder ob die Bakterien bei der Aktinanreicherung bereits vollständig internalisiert sind.

Diese Fragen wurden mittels einer selektiven Färbung für extrazelluläre Bakterien beantwortet, bei der gleichzeitig endogenes Aktin durch Rhodamin-Phalloidin sichtbar gemacht wurde. In Abb. 3.7. A ist exemplarisch eine solche Färbung dargestellt. Es ist eine Bakterientraube auf einer Zelloberfläche zu erkennen, die partiell von Aktin umschlossen ist, ein großer Teil aber noch mit dem Extrazellulärraum in Kontakt steht.

**A**

**Abb. 3.7.: 3D-Rekonstruktion von Aktin und FnBPA-*S. aureus* an einer phagozytotischen Aktinakkumulation.**

- (A) HUVEC wurden mit FnBPA-*S. aureus* infiziert, nach einer einstündigen Infektionszeit fixiert und einer Außenfärbung für *S. aureus* (**grün**) unterzogen. Das Aktin-Zytoskelett (**rot**) wurde mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt.

Das farbige Achsenkreuz deutet die räumliche Orientierung des Bildes an. Die kugelförmig über der Abbildung verteilten kreuzförmigen Markierungen vermitteln einen räumlichen Eindruck. Weißer Balken: 5µm.

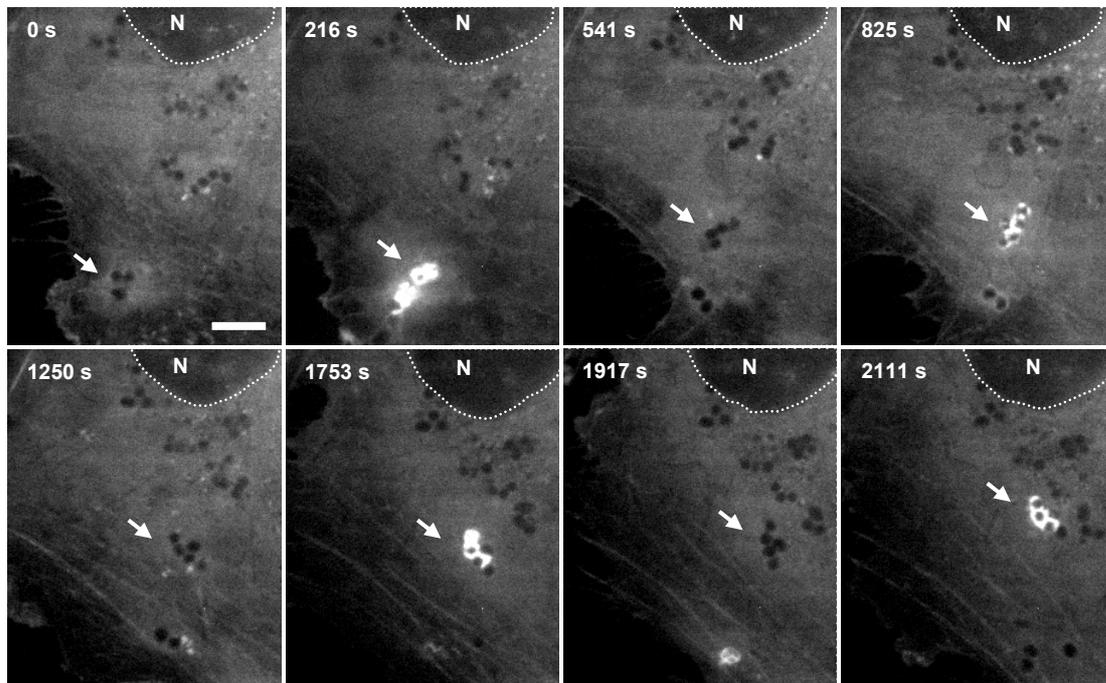
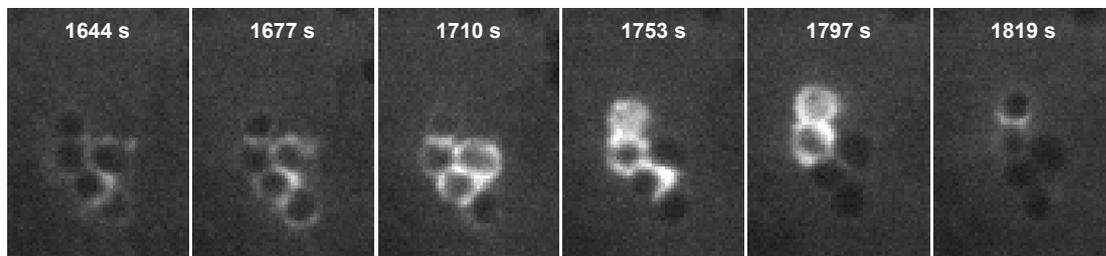
Da offensichtlich die Ausbildung der aktinreichen Membranausstülpung der vollständigen Internalisierung eines Partikels oder Bakteriums vorausgeht, sollte die Aktindynamik während des Transportprozesses *FnBPA*-exprimierender Bakterien auf der Zelloberfläche visualisiert werden. Das sollte einerseits einen weiteren Hinweis über den Zeitpunkt der Internalisierung geben, andererseits eine Vorstellung über die Aktin-Regulation während des Transportprozesses vermitteln.

Dazu wurden GFP-Aktin exprimierende HUVEC mit *FnBPA-S. carnosus* infiziert und sowohl im Phasenkontrast als auch konfokal im GFP-Kanal videomikroskopiert. In den in Abb. 3.7. B (s. auch Film-4) gezeigten Einzelbildern ist der Ausschnitt einer GFP-Aktin exprimierenden Zelle zu sehen, auf deren Oberfläche eine *FnBPA-S. carnosus*-Traube zentripetal transportiert wird. Es ist deutlich zu erkennen, dass an dieser Aktintraube während des Transportes vier Aktinakkumulationen auftreten. In einer höheren zeitlichen und räumlichen Auflösung dieses Vorganges an wird deutlich, dass Aktin wellenförmig von einem zum anderen Ende der Bakterientraube akkumuliert und dabei jedes einzelne Bakterium einmal vollständig umhüllt (Abb. 3.7. C und Film-5). Das gleiche Phänomen mehrfacher Aktinakkumulationen konnte auch an *FnBPA*-beschichteten Kügelchen beobachtet werden.

Nach dem allgemeinen Verständnis über die Aktindynamik bei Internalisierungsprozessen, geht die Aktinanreicherung an den Adhäsionsstellen der Internalisierung eines Partikels voraus. Mehrere Akkumulationen erscheinen deshalb ungewöhnlich. Um zu überprüfen, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten mehrerer Akkumulationen und der Art der Adhäsionsstruktur gibt, sollte dieses Phänomen quantitativ untersucht werden. Aufgrund der Unterschiede in der Art der induzierten Adhäsionsstruktur wurde Invasin wieder als Vergleichsmodell zu der *FnBPA*-induzierten Adhäsion herangezogen. Invasin- oder *FnBPA*-beschichtete Kügelchen wurden auf GFP-Aktin exprimierende Zellen gegeben und die Aktindynamik an den adhärierenden Kügelchen über einen längeren Zeitraum verfolgt.

Eine statistische Auswertung über die Anzahl der Aktinakkumulationen an einzelnen oder Trauben von *FnBPA*-beschichteten Kügelchen im Vergleich zu Invasin-beschichteten Kügelchen ist in Abb. 3.7. D dargestellt. Bis zu 10 separate Aktinpolymerisationen wurden an einem *FnBPA*-Kügelchen gezählt, während durch die mit Invasin beschichteten nie mehr als zwei induziert wurden.

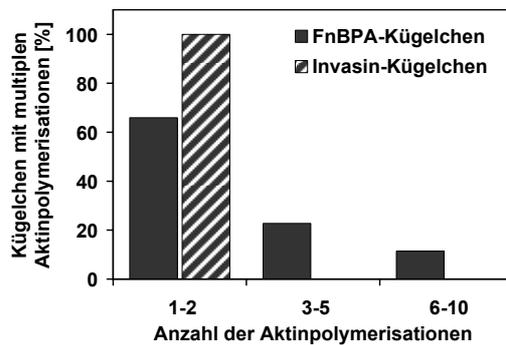
Das steht im Einklang mit der Tatsache, dass Invasin-Kügelchen schneller aufgenommen werden als *FnBPA*-Kügelchen und unterstützt die Beobachtung, dass *Staphylococcus aureus* wesentlich länger auf der Zelloberfläche verweilt. Die unterschiedliche Aktindynamik ist eine weitere Bestätigung der These, dass sich die *FnBPA*-beschichteten Partikel während des zentripetalen Transportes auf der Zelloberfläche befinden und noch nicht internalisiert wurden.

**B****C**

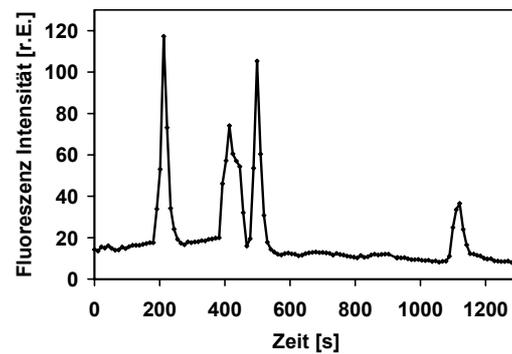
**Abb.3.7.: *FnBPA*-vermittelte Adhäsion induziert multiple Aktinpolymerisationen in HUVEC.**

- (B) PEGFP-Aktin transfizierte HUVEC wurden mit *FnBPA-S. carnosus* infiziert und konfokal im GFP-Kanal videomikroskopiert (vgl. Abb 3.5. und Film-1: gleiche Zelle im Phasenkontrast). Die dargestellten Einzelbilder wurden einem Film entnommen (s. Anhang Film-4) und die angegebenen Zeiten entsprechend eingetragen. Dem ersten Bild wurde jeweils der Zeitpunkt Null zugeordnet. Die eingezeichneten Pfeile verweisen auf die transportierte Bakterientraube; die gestrichelte Linie markiert den Nukleus (N). Weißer Balken: 5µm
- (C) Aktindynamik einer einzelnen Aktinpolymerisation an der Bakterientraube in stärkerer Vergrößerung und höherer zeitlicher Auflösung (s. auch Film-5). Die angegebenen Zeiten entsprechen dem zeitlichen Ausschnitt aus (B).

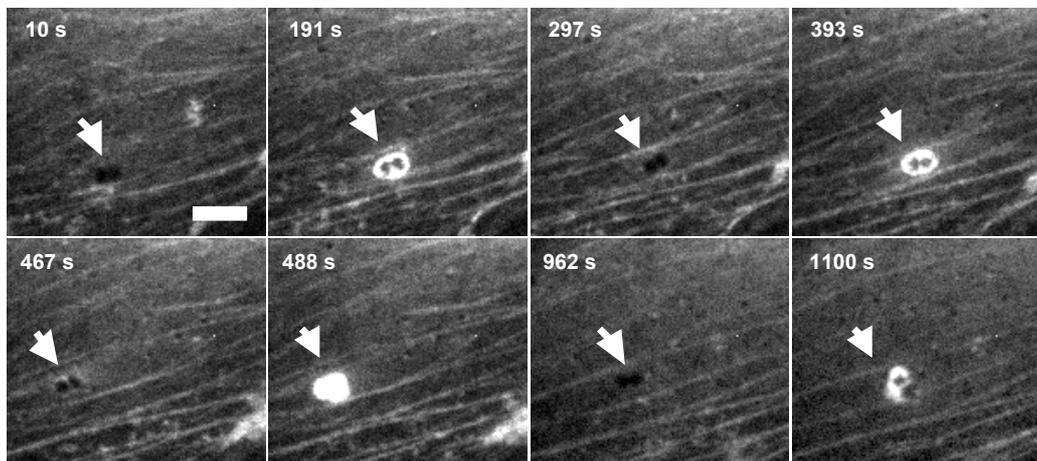
D



E



F



**Abb. 3.7.: Auswertung der *FnBPA*-induzierten periodischen Aktinakkumulationen in HUVEC.**

- (D) Anzahl der aufeinanderfolgenden Aktinpolymerisationen induziert durch ein einzelnes FnBPA- oder Invasin-Kügelchen. GFP-Aktin-exprimierende HUVEC wurden mit FnBPA- oder Invasin-Kügelchen infiziert und einzelne Zellen im GFP-Kanal konfokal videomikroskopiert. Die Anzahl der induzierten Aktinpolymerisationen individueller Kügelchen wurde ausgezählt. Für FnBPA wurden 44 Kügelchen aus 7 unterschiedlichen Filmen und für Invasin 61 Kügelchen aus 7 Filmen ausgezählt.
- (E) Verteilung der Fluoreszenzintensität von GFP-Aktin-Polymerisationen an transportierten FnBPA-Kügelchen auf HUVEC in Abhängigkeit von der Zeit. Die Fluoreszenzintensität wurde innerhalb einer eng um die Kügelchen definierten Region gemessen und gegen die Zeit aufgetragen. Es sind im Verlauf der Zeit 4 deutliche Fluoreszenzanstiege zu erkennen, die mit den auftretenden Aktinakkumulationen korrelieren.
- (F) Einzelaufnahmen aus dem zur Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten herangezogenen Film. Die Zeitangaben entsprechen denen im Diagramm. Die weißen Pfeile markieren die zum jeweiligen Zeitpunkt aktuelle Position der Kügelchen. Weißer Balken: 2,5µm.

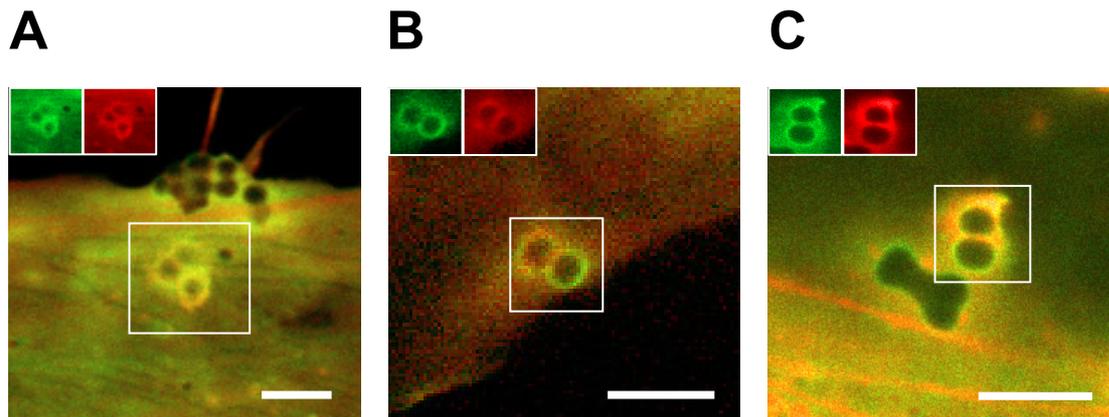
Um herauszufinden, ob die Dauer der Aktinakkumulationen und die dazwischen liegenden Pausen einer regelmäßigen Periodik unterliegen, wurden die vorliegenden Filme daraufhin ausgewertet. Es zeigte sich, dass Dauer einzelner Aktinpolymerisationen an Partikeln vergleichbarer Größe (z.B. einzelne Kügelchen oder Bakterien) mit einem Wert von  $80 \pm 33$  s ( $n=44$ ) relativ konstant ist, wohingegen die Zeit zwischen den Polymerisationen sehr stark schwankt (beobachtet wurden Pausen von 21 s bis 1200 s). In Abbildung 3.7. E, F wird dies exemplarisch verdeutlicht. Die Verteilung der Fluoreszenzintensität von wiederholt an einer Dublette FnBPA-beschichteter Kügelchen polymerisierendem GFP-Aktin zeigt einerseits die relativ gleichmäßige Dauer der Polymerisation, andererseits die unregelmäßigen Abstände dazwischen.

Es lässt sich zusammenfassend festhalten, dass an den durch FnBPA-vermittelten Adhäsionsstrukturen die subkortikale Aktindynamik humaner Endothelzellen massiv beeinflusst wird. An FnBPA-vermittelten Adhäsionskontakten konnten multiple Aktinakkumulationen beobachtet werden, im Gegensatz dazu an Invasin-induzierten Adhäsionskontakten maximal zwei. Die mehrfachen Aktinpolymerisationen an den Bakterien/Kügelchen erfolgten in unregelmäßigen Abständen, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass es sich bei diesen nicht um einen regulierten Prozess handelt, sondern eher eine unregulierte Abfolge von Einzel-Ereignissen.

### **3.8. Kontrolle der Internalisierung von *FnBPA-S. aureus* durch Aktin-Regulatoren**

Wenn Aktin für die Aufnahme FnBPA-exprimierender Bakterien eine Rolle spielt, dann sollte die Internalisierung durch Regulatoren der Aktinpolymerisation beeinflussbar sein. Zu den wichtigsten Regulatoren der Aktinpolymerisation gehören die GTPasen der Rho-Familie wie RhoA, Rac1, CDC42 und das neurale Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (N-WASP) und der Arp2/3-Komplex. Rho-GTPasen regulieren die Aktin-Dynamik unterschiedlicher zellulärer Prozesse (Jaffe et al., 2005), u. a. wurde für Rac und CDC42 eine Beteiligung an der Integrin-vermittelten Aktin-Akkumulation an den Phagozytose-Strukturen nachgewiesen wurde (May et al., 2001; Wiedemann et al., 2001).

Zunächst wurde videomikroskopisch in lebenden Zellen die Lokalisation der GTPasen RhoA, Rac1 und CDC42, von N-WASP und des Arp2/3-Komplexes bei der Bildung der Aktin-angereicherter Aufnahmestrukturen überprüft. Hierzu wurden HUVEC mit Konstrukten, die für GFP-Fusionsproteine der genannten Proteine kodieren, transfiziert und mit *FnBPA-S. carnosus* infiziert. Wie in Abb. 3.8. A-C (s. auch Abb. 3.9. F für N-WASP und Arp3) dargestellt, sind alle untersuchten Proteine zusammen mit Aktin an der initialen Membranausstülpung nachweisbar. Das bedeutet, dass wie erwartet, auch Aktin-Regulatoren eine Rolle bei der Initiation phagozytotischen Strukturen zu spielen scheinen.



**Abb. 3.8.: Kolokalisation der Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und CDC42 mit Aktin an *FnBPA-S. carnosus* induzierten Aufnahmestrukturen in HUVEC.**

HUVEC wurden mit mRFP-Aktin und GFP-RhoA (A), GFP-Rac1 (B) oder GFP-CDC42 (C) exprimierenden Vektoren kotransfiziert, mit *FnBPA-S. carnosus* infiziert und konfokal videomikroskopiert.

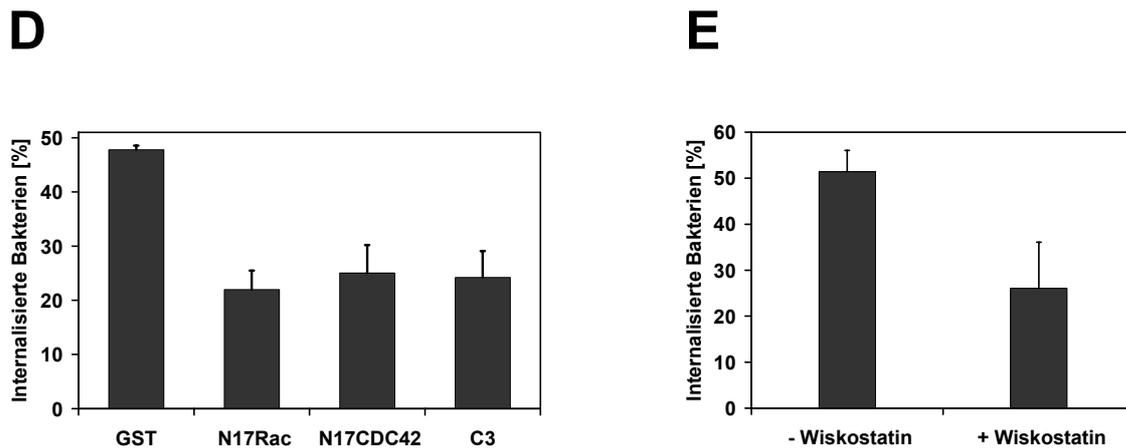
Die großen Fluoreszenzaufnahmen stellen Überlagerungsbilder der Einzelfluoreszenzen von mRFP-Aktin mit den jeweiligen GFP-fusionierten GTPasen dar. Die Umrandung markiert Bakterien, an denen Aktin mit einer der GTPasen kolokalisiert. Die Vergrößerungen in der linken oberen Ecke zeigen die Einzelfluoreszenzen von mRFP-Aktin (rot) oder den GFP-fusionierten GTPasen (grün).

Weißer Balken: 3  $\mu$ m.

Nachdem nun die Lokalisation aktinregulierender Proteine an phagozytotischen Aufnahmestrukturen auch in HUVEC bestätigt werden konnten, sollte nun überprüft werden, ob die Modulation der genannten Proteine und die damit verbundene Veränderung des Aktinzytoskeletts einen Einfluss auf die FnBPA-vermittelte Internalisierung von *S. aureus* hat.

Dazu wurden die endogenen Rho-GTPasen Rac1 und CDC42 mittels Mikroinjektion dominant-negativer Formen (Rac<sup>N17</sup> bzw. CDC42<sup>N17</sup>) inhibiert. Die Inhibition des endogenen Rho erfolgte durch Mikroinjektion des Rho Inhibitors C3-Transferase aus *Clostridium botulinum*, der RhoA/B/C spezifisch durch ADP-Ribosylierung inhibiert. Alternativ wurde N-WASP mit dem spezifischen N-WASP-Inhibitor Wiskostatin inaktiviert. In allen Fällen konnte eine Inhibition der FnBPA-*S. carnosus*-Internalisierung beobachtet werden. Es zeigte sich, dass eine Inhibition der oben genannten Proteine die Internalisierung von *FnBPA-S. carnosus* in die HUVEC um 50-60% reduzierte (Abb. 3.8. D, E).

Diese Versuche bestätigen, dass Aktin entscheidend an der FnBPA-induzierten Internalisierung der Bakterien beteiligt ist und seinerseits durch die Kooperation der getesteten GTPasen bzw. N-WASP reguliert wird.



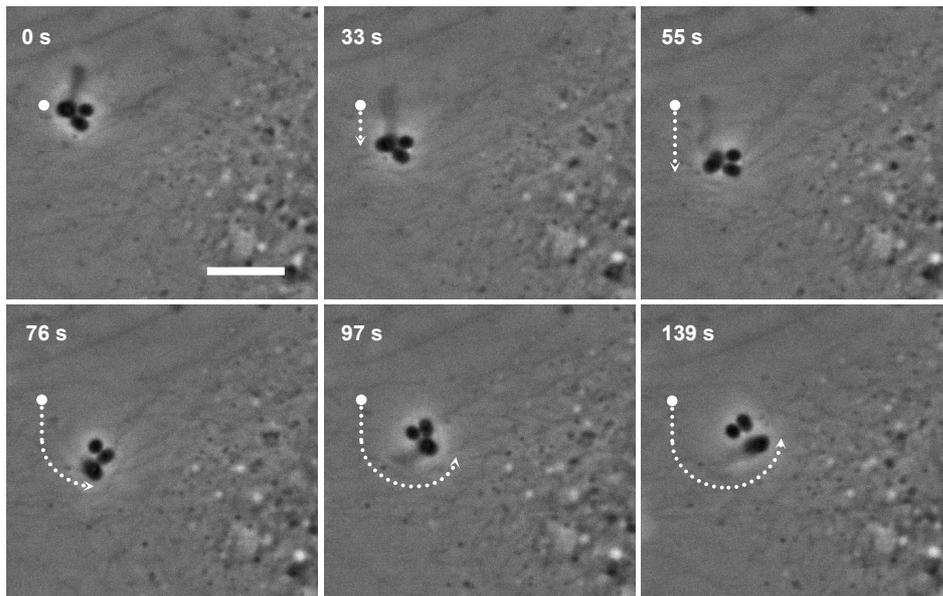
**Abb. 3.8.: Effekt der Inhibition von Rho-GTPasen oder N-WASP auf die Internalisierung von *FnBPA-S. aureus* in HUVEC.**

- (D) GST oder GST-Fusionsproteine von Rac<sup>N17</sup>, CDC42<sup>N17</sup>, sowie C3-Transferase wurden in HUVEC mikroinjiziert und diese für 45min nachinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit *FnBPA-S. aureus* für 1h infiziert. Das Verhältnis Bakterien zu Zellen betrug 100:1. Nach einer Innen-/Außenfärbung wurde der Anteil der in die Zellen invadierten Bakterien mikroskopisch bestimmt, indem die Anzahl der extrazellulären von der Gesamtzahl der Bakterien subtrahiert wurde. Jeder Wert stellt den Mittelwert +/- Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten dar. Es wurden mindestens 100 Zellen für jeden Datenpunkt ausgezählt.
- (E) HUVEC wurden mit dem N-WASP Inhibitor Wiskostatin 30 min vor der Infektion mit *FnBPA-S. aureus* inkubiert. Das Verhältnis Bakterien zu Zellen betrug 100:1. Der Internalisierungs-Versuch wurde wie in (D) beschrieben durchgeführt. Jeder Wert stellt den Mittelwert +/- Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten dar. Es wurden mindestens 100 Zellen für jeden Datenpunkt ausgezählt

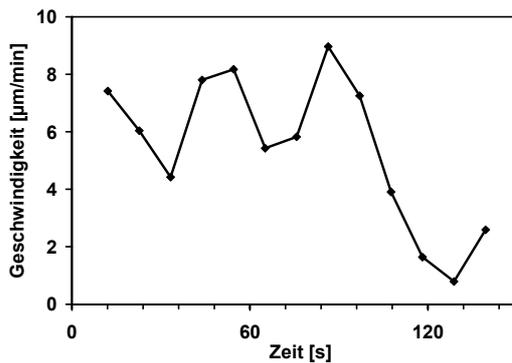
### 3.9. FnBPA-induzierte Aktinschweife

Neben dem langsamen und gerichteten Transport auf der Zelloberfläche wurden auch sehr schnelle Bewegungen von FnBPA-beschichteten Kügelchen oder -exprimierenden Bakterien beobachtet (Abb. 3.9. A). Diese Bewegungen waren ungerichtet oder durch kurze Pausen unterbrochen und wurden im Schnitt innerhalb von 10 min ca. einmal pro gefilmter Zelle beobachtet (Mittelwert aus 13 Einzelzell-Aufnahmen). Während für den langsamen Transport Geschwindigkeiten von ca. 50  $\mu\text{m}/\text{h}$  gemessen wurden, konnten bei der schnellen Bewegung Maximalgeschwindigkeiten von bis zu 1000  $\mu\text{m}/\text{h}$  erreicht werden. Der Geschwindigkeitsverlauf einer *FnBPA-S. carnosus* Traube ist in Abb. 3.9. A (s. auch Film-6 + 7 im Anhang) dargestellt.

## A



## B



**Abb. 3.9.: FnBPA-induzierte schnelle Bewegung von *FnBPA-S. carnosus* auf HUVEC.**

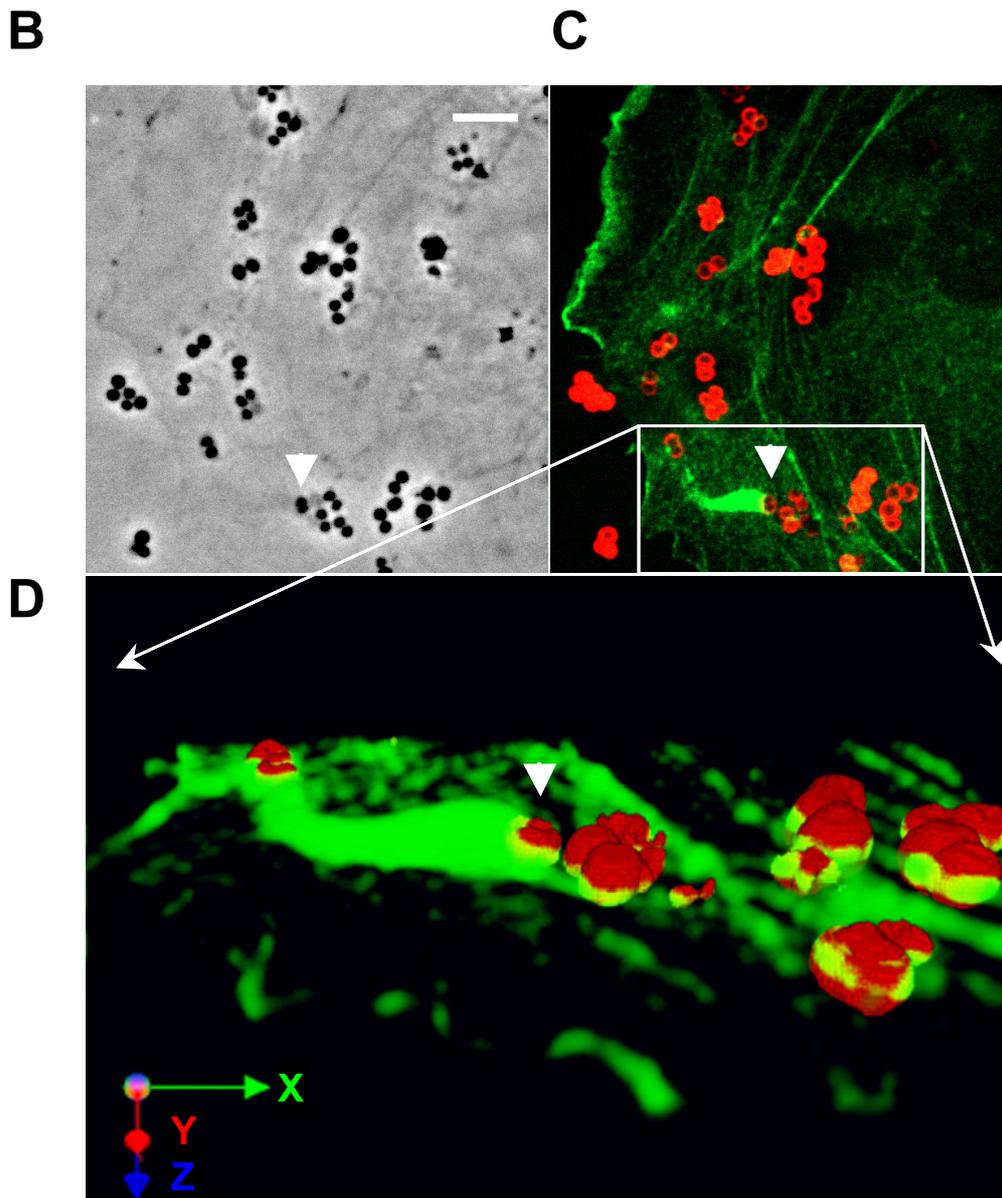
- (A) HUVEC wurden mit *FnBPA-S. carnosus* infiziert und im Phasenkontrast videomikroskopiert. Die dargestellten Einzelbilder wurden einem Film entnommen (s. Anhang Film-6) und die angegebenen Zeiten entsprechend eingetragen. Dem ersten Bild wurde der Zeitpunkt Null zugeordnet. Der weiße Punkt markiert den Ausgangspunkt der Bewegung eines Bakteriums, die gestrichelte Linie die zurückgelegte Distanz. Weißer Balken: 5µm
- (B) Geschwindigkeitsverlauf der *FnBPA-S. carnosus*-Traube zu verschiedenen Zeitpunkten. Aus der Zeit zwischen den Einzelbildern und der zwischen den Bildern zurückgelegten Distanz (Messung s. Material und Methoden) wurde die Geschwindigkeit errechnet.

Intrazelluläre bakterielle Bewegungen mit Geschwindigkeiten von 180  $\mu\text{m}/\text{h}$  (*Shigella flexneri*) bis zu 5200  $\mu\text{m}/\text{h}$  (*Listeria monocytogenes*) wurden bereits in der Literatur beschrieben (Stevens et al., 2006). Durch spezielle am Bakterienpol exprimierte Proteine wird der Arp2/3-Komplex direkt (Imitierung der WASP-Funktion) oder indirekt (z.B. Aktivierung von WASP) aktiviert und dadurch Aktin polymerisiert. Durch den entstehenden Aktinschweif werden dann die Bakterien durch das Zytosol der Zellen geschoben.

Auch für die schnelle FnBPA-induzierte Bewegung konnte bestätigt werden, dass sie durch Aktinschweifbildung hervorgerufen wird. Zellen, die mit dem für GFP-Aktin kodierenden Konstrukt transfiziert und mit FnBPA-exprimierenden Bakterien oder -beschichteten Kügelchen infiziert wurden, zeigten regelmäßig (s.o.) massive Aktinschweife an einzelnen oder Trauben von Bakterien, die zu schneller Bewegung oder aber Abtrennung einzelner Bakterien aus der Traube führten. Durch Färbungen fixierter Präparate mit Rhodamin-Phalloidin konnte gezeigt werden, dass diese Schweife auch mit endogenem Aktin produziert werden, sodass ausgeschlossen werden kann, dass es sich bei dem beobachteten Aktinschweif um ein durch GFP-Aktin erzeugtes Artefakt handelt (s. auch Abb. 3.9. C-E).

Wie bereits unter Punkt 3.7., Abb.3.7.A in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, treten massive Aktinakkumulationen in Form der phagozytotischen Aufnahmestrukturen an noch nicht vollständig internalisierten Bakterien auf. Da es sich bei Staphylokokken primär um extrazelluläre Keime handelt, sollte nun der Frage nachgegangen werden, ob die Schweifbildung an bereits internalisierten Bakterien oder an solchen, die sich noch auf der Oberfläche befinden, erfolgt.

Dazu wurden pEGFP-Aktin transfizierte HUVEC mit *FnBPA-S aureus* infiziert und nach einer einstündigen Infektionszeit fixiert. Mit Hilfe selektiver Immunfluoreszenzfärbung (Innen-/Außenfärbung) wurden ausschließlich extrazelluläre Bakterien angefärbt und die Präparate anschließend nach Bakterien durchsucht, an denen schweifartige Aktinakkumulationen sichtbar waren. Durch 3D-Rekonstruktion von Z-Stapeln konnte gezeigt werden, dass Bakterien, die mit Aktinschweif assoziiert waren, noch nicht vollständig internalisiert worden sind. Abbildung 3.9. B (s. auch Film-8 im Anhang) zeigt exemplarisch eine an einen Aktinschweif lokalisierende Bakteriendublette, die partiell angefärbt werden konnte, also noch nicht vollständig internalisiert ist.



**Abb. 3.9.: *FNBPA-S. aureus* induziert Aktinschweife auf der Zelloberfläche von HUVEC.**

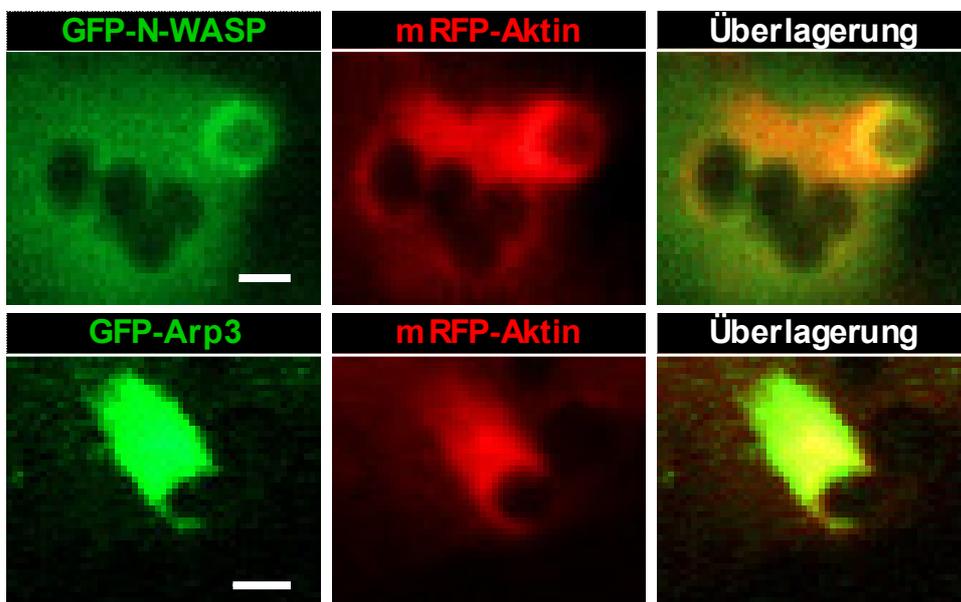
GFP-Aktin exprimierende HUVEC wurden mit *FNBPA-S. aureus* für 1 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die extrazellulären Bakterien mit rot fluoreszierendem sekundärem Antikörper gefärbt

- (C) Phasenkontrastaufnahme einer infizierten Endothelzelle; der weiße Pfeil markiert eine Bakteriendublette. Weißer Balken: 5  $\mu$ m
- (D) Fluoreszenzaufnahme, korrespondierend zu dem in (C) gezeigten Phasenkontrast. Die extrazellulären Bakterien sind in rot dargestellt, das Aktin-Zytoskelett in grün. Die mit dem weißen Pfeil markierte Bakteriendublette (Pfeil) ist mit einem Aktinschweif assoziiert.
- (E) 3D-Rekonstruktion des von (B) aufgenommenen Z-Stapels. Der Pfeil markiert die gleiche Bakteriendublette wie in (B) und weist auf die Oberseite der Bakterien, die z.T. noch aus in den Extrazellulärraum hineinragt. Das Koordinatensystem symbolisiert die räumliche Ausrichtung des Bildes.

Da N-WASP oder Arp2/3-Komplex-Aktivierung durch unterschiedliche Pathogene ein bekanntes Phänomen ist (Stevens et al., 2006), sollte die Lokalisation dieser Proteine an den durch die Staphylokokken induzierten Aktinschweifen untersucht werden.

HUVEC wurden dafür mit Konstrukten, kodierend für mRFP-Aktin und GFP-N-WASP oder mRFP-Aktin und GFP-Arp3, einer Untereinheit des Arp2/3-Komplexes, kotransfiziert und lebend videomikroskopiert. In Abb. 3.9. F sind Fluoreszenzaufnahmen von durch *FnBPA-S. aureus*-induzierten Aktinschweifen dargestellt, auf denen die Lokalisation von N-WASP und Arp3 an den Schweifen zu erkennen ist. N-WASP wird direkt an das Bakterium rekrutiert und kolokalisiert auch nur dort mit Aktin, während Arp3 über den ganzen Schweif verteilt mit Aktin kolokalisiert.

**F**

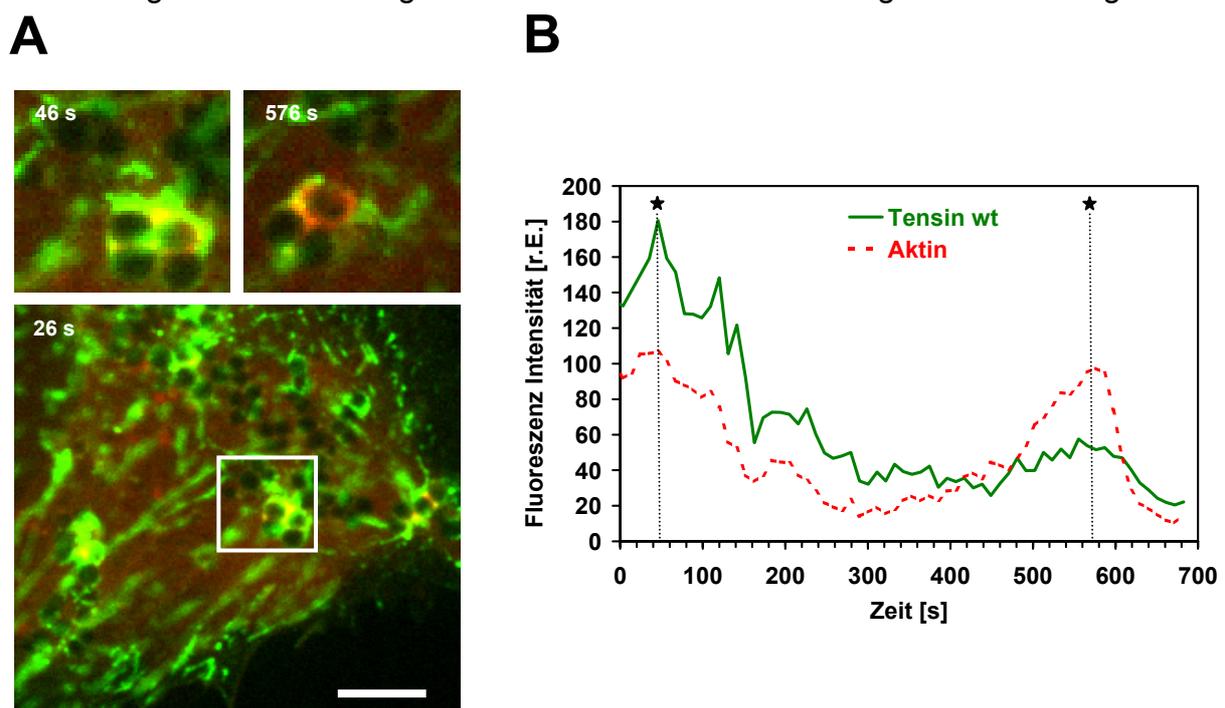


**Abb. 3.9.: *FnBPA-S. aureus* induzierte Aktinschweife enthalten Aktin-regulierende Proteine.**

- (F) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HUVEC, transfiziert mit pmRFP-Aktin und pEGFP-N-WASP (**obere Zeile**) oder pEGFP-Arp3 (**untere Zeile**). Die Zellen wurden mit *FnBPA-S. carnosus* infiziert und videomikroskopiert. Die dargestellten Einzelbilder entstammen den aufgezeichneten Filmen (s. auch für GFP-Arp3 repräsentativen Film-9 im Anhang).  
Weißer Balken: 1 µm.

### 3.10. Dynamik von Aktin und Tensin bei der FnBPA-vermittelten Phagozytose

Die bisher vorliegenden Daten über Tensin und Aktin bei der FnBPA-vermittelten Aufnahme suggerieren eine Interaktion der beiden Proteine bei der initialen Entstehung der phagozytotischen Aufnahmestruktur. Mittels Videomikroskopie lebender Zellen sollte daher die Dynamik des Zusammenspiels von Tensin und Aktin an den *FnBPA-S. aureus*-infizierten HUVEC visualisiert werden. Es zeigte sich in der Tat, dass Aktin und Tensin an den FnBPA-induzierten Adhäsionen kolokalisieren. Abbildung 3.10. A (s. auch Film-10 im Anhang) zeigt einem Film entnommene Einzelbilder einer mRFP-Aktin und GFP-Tensin koexprimierenden Endothelzelle. Vergrößert dargestellt ist eine Bakterientetrade zu verschiedenen Zeitpunkten des Filmes, an der Aktin und Tensin lokalisiert. Das Diagramm daneben (Abb. 3.10. B) zeigt die Veränderung der Fluoreszenzintensitäten beider Proteine an der Tetrade über den Verlauf des Filmes. Es wird deutlich, dass die Fluoreszenzintensitäten von Tensin und Aktin parallel ansteigen oder abfallen, wobei GFP-Tensin, nicht aber mRFP-Aktin, permanent an der Tetrade lokalisiert (s. Film-10). Da Tensin als spezifisches Markerprotein für fibrilläre Adhäsionen gilt, ist dessen permanente Assoziation an der Tetrade dadurch erklärbar, dass FnBPA Adhäsionsstrukturen induziert, die fibrillären Adhäsionen ähneln. Die Akkumulation von Aktin parallel zu dem Anstieg der Tensin-Menge ist daher konform zu der Annahme, dass Tensin an der Bildung der mit Aktin-angereicherten Aufnahmestruktur regulierend beteiligt ist.

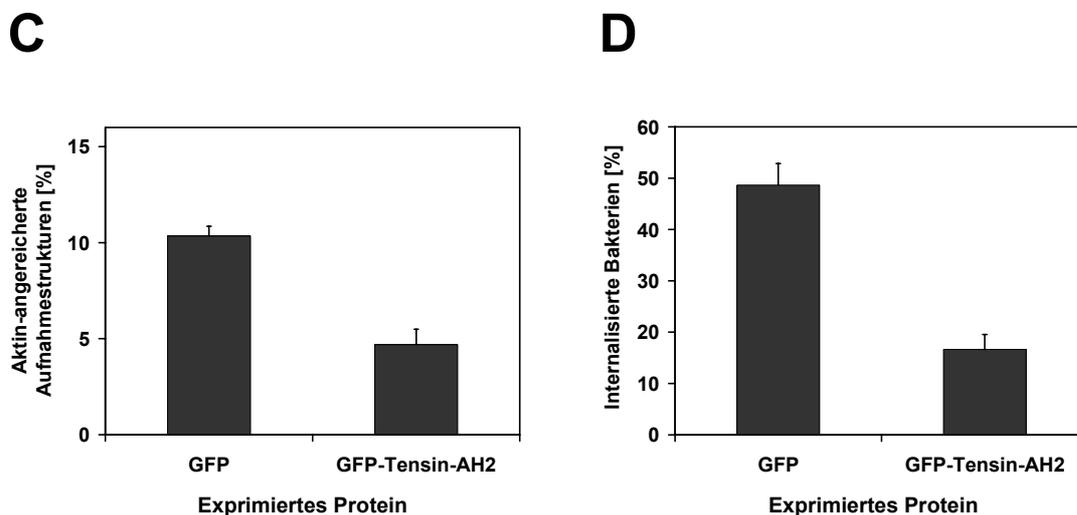


**Abb. 3.10.: Aktin und Tensin lokalisieren zeitgleich an FnBPA-induzierten Adhäsionen.**

- (A) Einzelbilder aus einem Film von GFP-Tensin und mRFP-Aktin koexprimierenden HUVEC, die mit *FnBPA-S. carnosus* infiziert und videomikroskopiert wurden. Wegen der Beeinflussung der Motilität durch Tensin (s. Abb. 3.6.) wurde eine schwach Tensin exprimierende Zelle ausgewählt. Die dargestellten Einzelbilder entstammen dem aufgezeichneten Film (s. auch Film-10 im Anhang) und zeigen die Überlagerung beider Fluoreszenzen. Der umrandete Bereich im unteren Bild zeigt eine Bakterien-Tetrade, an der Aktin und Tensin in hohem Maße kolokalisieren (gelbe Bereiche). Oben wird diese Tetrade zu späteren Zeitpunkten vergrößert dargestellt. Weißer Balken: 5  $\mu\text{m}$
- (B) Quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität von Tensin und Aktin an der Tetrade in rel. Einheiten in Abhängigkeit von der Zeit. Die gepunktete Linie und die Sternchen markieren die Zeitpunkte der beiden vergrößerten Fluoreszenzbilder aus (A).

Um die These weiter zu stützen, dass Tensin die Aktinakkumulation an den phagozytotischen Aufnahmestrukturen reguliert, wurde versucht, diese durch das inhibitorische Tensin-AH2-Fragment zu modulieren. Dazu wurden HUVEC mit dem für GFP-Tensin-AH2 bzw. als Kontrolle mit dem für GFP-kodierenden Konstrukt transfiziert und mit *FnBPA-S. aureus* für 1 h infiziert. Ein Rückschluss auf die Modulation der Aktinpolymerisation durch Tensin wurde einerseits durch Auszählen der induzierten Aktinakkumulationen an FnBPA-vermittelten Adhäsionsstellen gezogen, andererseits durch Quantifizierung der internalisierten Bakterien.

Es zeigte sich, dass die Anzahl der *FnBPA-S. aureus*-induzierten phagozytotischen Aufnahmestrukturen in den Tensin-AH2-exprimierenden Zellen um ca. 60% im Vergleich zu der Kontrolle reduziert war (Abb. 3.10. C). Auch die Aufnahme wurde durch das inhibitorische Tensin-Fragment beeinflusst. Hier zeigte sich eine Inhibition der Aufnahme um ca. 70% im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 3.10. D).



**Abb. 3.10.: Inhibition von Tensin vermindert die Internalisierung von *FnBPA-S. aureus* in HUVEC.**

Endothelzellen wurden mit den für GFP-Tensin-AH2 oder GFP kodierenden Konstrukten transfiziert und mit *FnBPA-S. aureus* in einem Verhältnis von ca. 100 Bakterien pro Zelle für 1 h infiziert.

- (C) Quantifizierung der phagozytotischen Aktinakkumulationen an FnBPA-induzierten Adhäsionsstellen. Jeder Wert stellt den Mittelwert +/- Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten dar. Es wurden mindestens 100 Zellen für jeden Datenpunkt ausgezählt.
- (D) Quantifizierung der Invasionsrate der Bakterien in GFP-Tensin-AH2 bzw. GFP exprimierenden HUVEC. Nach einer Innen-/Außenfärbung von *FnBPA-S. aureus* wurde der Anteil der in die Zellen invadierten Bakterien mikroskopisch bestimmt, indem die Anzahl der extrazellulären von der Gesamtzahl der Bakterien subtrahiert wurde. Jeder Wert stellt den Mittelwert +/- Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten dar. Es wurden mindestens 100 Zellen für jeden Datenpunkt ausgezählt.

Zusammen mit den Ergebnissen aus den Punkten 3.6 und 3.10 wird deutlich, dass Aktin durch Tensin an den durch FnBPA-induzierten Adhäsionsstrukturen stark beeinflusst wird. Zum einen wird die Aktomyosin-abhängige Kontraktion durch das inhibitorische Tensin-AH2 Fragment negativ reguliert, zum anderen wird der Aufnahmeprozess beeinflusst. Letzteres spiegelt sich in der Verminderung der Anzahl der Aktinakkumulationen und konsequenterweise auch in der Verminderung der Internalisierungsrate wieder.

### **3.11. Alternierende Rab5- und Aktin-Akkumulation an FnBPA-exprimierenden Bakterien**

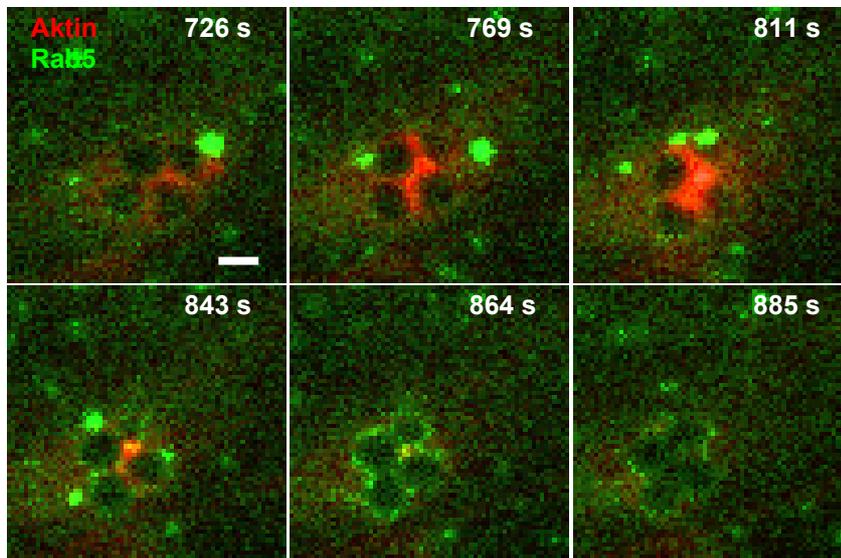
Massive Aktinpolymerisation ist das initiale Ereignis bei der Phagozytose, das der Internalisierung adhärerender Partikel vorausgeht. Die beobachteten multiplen Aktinakkumulationen an einzelnen oder Trauben FnBPA-beschichteter Kügelchen oder FnBPA-exprimierender Bakterien könnten einen vergeblichen Internalisierungsversuch durch die Endothelzellen darstellen.

Es stellte sich daher die Frage, ob Proteine, die an der Regulation früher Ereignisse der Phagozytose beteiligt sind, an den Adhäsionsstrukturen lokalisieren und wie deren Dynamik im Zusammenspiel mit der Aktinpolymerisation aussieht. Ein Markerprotein früher phagozytotischer Ereignisse ist die GTPase Rab5, die an der Fusion früher endosomaler Vesikel beteiligt ist und zu den ersten an dem entstehenden Phagosom lokalisierenden Proteinen gehört (Miaczynska et al., 2002; Somsel et al., 2000).

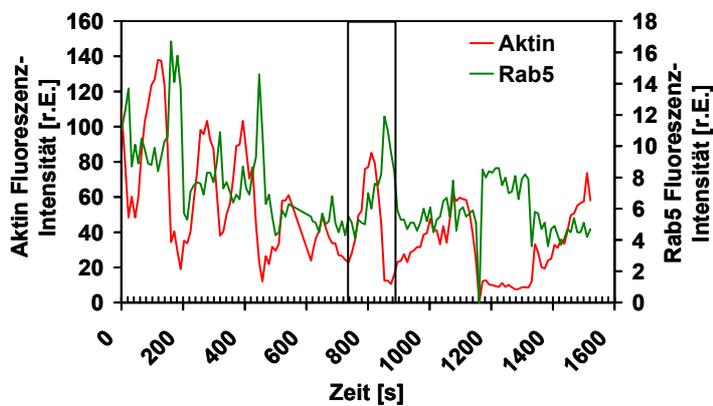
Das dynamische Zusammenspiel zwischen Aktin und Rab5, mittels videomikroskopischer Versuche mit GFP-Rab5 und mRFP-Aktin koexprimierenden Zellen aufgezeichnet, ist in Abb. 3.11. A, B dargestellt (s. auch Film-11 im Anhang). Die Fluoreszenzbilder zeigen Einzelaufnahmen aus einem Film, in dem an einer Bakterientetrade sequenziell Aktin (rot) und Rab5 (grün) akkumulieren, ohne miteinander zu kolokalisieren. Die Dynamik der Fluoreszenzintensitäten beider Proteine an der Tetrade wurde aufgezeichnet und ist in dem Diagramm in Abb. 3.11. B dargestellt. Es wird ersichtlich, dass Aktin an der Tetrade mehrfach polymerisiert (vgl. auch Film-11) und eine Rab5-Akkumulation in sehr regelmäßigen Abständen von ca. 40-50 s dieser Polymerisation folgt. Die Daten für die zeitliche Koordination beider Proteine werden durch die Beobachtung gestützt, dass eine Aktin-Akkumulation bei der Phagozytose der Internalisierung eines Partikels zwar vorausgeht, aber dieses bei der Bildung des Phagosoms depolymerisiert (Scott et al., 2005). Dieses Resultat untermauert die These, dass die FnBPA-induzierten zyklischen Aktinakkumulationen vergebliche Aufnahmeversuche durch die Zellen darstellen könnten.

Die mehrfache Rab5-Akkumulation an den Adhäsionsstellen ist - genau wie die multiple Polymerisation von Aktin - ein Indiz dafür, dass die adhärerenden Bakterien sich noch auf der Zelloberseite befinden und noch nicht internalisiert wurden.

A



B



**Abb. 3.11.: Alternierende Akkumulation von Aktin und Rab5 an adhärierenden *FnBPA-S. carnosus*.**

HUVEC wurden mit GFP-Rab5 und mRFP-Aktin transfiziert, mit *FnBPA-S. carnosus* infiziert und konfokal videomikroskopiert.

- (A) Die dargestellten Einzelbilder entstammen dem aufgezeichneten Film zu den angezeigten Zeitpunkten (s. auch Film-11 im Anhang) und zeigen die Überlagerung von Aktin (rot) und Rab5 (grün) an einer Bakterientetrade. Weißer Balken: 1  $\mu$ m.
- (B) Quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensitäten von GFP-Rab5 und mRFP-Aktin an der Bakterientetrade in Abhängigkeit von der Zeit. Der durch Linien markierte Bereich zeigt das Zeitintervall an, aus dem die in (A) abgebildeten Fluoreszenzbilder stammen.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die „*fibronectin-binding protein A*“ (FnBPA) vermittelte Interaktion zwischen *Staphylococcus aureus* und primären humanen Endothelzellen (HUVEC) untersucht. Mittels Videomikroskopie lebender Zellen wurden insbesondere die Adhäsion an die Zellen, der Transport auf der Zelloberfläche und die Internalisierung der Bakterien visualisiert und vergleichend der *Yersinia enterocolitica*-Invasin-abhängigen Adhäsion und Invasion gegenübergestellt.

### 4.1. Kinetik der FnBPA-vermittelten Invasion

Gelangen Keime bei Verletzungen in die Blutbahn, kommen sie in direkten Kontakt mit dem Endothel, der innersten Schicht der Blutgefäße. Für die Etablierung einer Infektion ist die Adhäsion an die Endothelzellen der initiale Schritt, um entweder das Endothel extrazellulär zu kolonisieren oder um in die Zellen zu invadieren und in tiefere Gewebsschichten einzudringen. Daher fungieren bakterielle Adhäsine oftmals auch als Invasine, die über Rezeptoren der Wirtszelle Signalkaskaden auslösen, um eine schnelle Aufnahme in die Zelle zu induzieren (Oelschlaeger, 2001).

Für das Staphylokokken-Adhäsine FnBPA wurden Adhäsion und Invasion bereits beschrieben (Agerer et al., 2003; Dziwanowska et al., 2000; Sinha et al., 1999; Sinha et al., 2000). Die dynamischen Aspekte dieser Prozesse blieben jedoch weitgehend uncharakterisiert. Um einen Bezugspunkt zu bereits bekannten Aspekten bakterieller Adhäsion/Invasion zu haben, wurden die in dieser Arbeit gewonnenen kinetischen Daten der FnBPA-abhängigen Invasion der Invasin-abhängigen gegenübergestellt. Invasin gilt als professionelles Invasin, das Yersinien die Translokation durch die sogenannten M-Zellen zu den tiefer im Gewebe gelegenen Peyerschen Plaques ermöglicht. Beide Adhäsine interagieren mit dem wichtigsten Fn-Rezeptor, dem  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin, wobei Invasin direkt an die Integrin- $\beta$ -Kette (Isberg et al., 2000) bindet, während im Fall des FnBPA die Verbindung zu dem Rezeptor über das Fn hergestellt wird (Fowler et al., 2000; Massey et al., 2001).

Die in Abb. 3.2. A-B dargestellten Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modelle - Invasin-beschichtete Kügelchen oder Invasin heterolog exprimierende Bakterien im Vergleich zu FnBPA-beschichteten Kügelchen oder FnBPA-*S. aureus* - zeigen, dass durch Invasin eine fast vollständige Aufnahme der adhären Bakterien oder Kügelchen in die Endothelzellen induziert wird, während der Internalisierung der FnBPA Kügelchen/Bakterien eine vergleichsweise lange Adhäsionszeit von ca. 45 min vorausgeht. Die längere Verweildauer auf der Zelloberfläche könnte für die in die Blutbahn gelangten Bakterien ein Selektionsvorteil darstellen, da *Staphylococcus aureus* klassischerweise nicht zu den intrazellulären Pathogenen, sondern zu den kommensal auf der Haut lebenden Keimen gezählt wird. Das Fehlen von Mechanismen für eine Adaption an das intrazelluläre Milieu verhindert das Persistieren der Staphylokokken innerhalb von Zellen. Infektionen, die durch *S. aureus* hervorgerufen werden (s. Einleitung), beruhen auf der Fähigkeit des Bakteriums, an Gewebe zu adhären, dieses extrazellulär zu kolonisieren, die Immunabwehr zu umgehen und die Zellen durch unterschiedlichste Toxine zu schädigen (Lowy, 2000). Werden die Bakterien aber dennoch von der Zelle internalisiert, gelangen sie in den phagolysosomalen Stoffwechselweg und werden schließlich degradiert (Krut et al., 2003; Laschke et al., 2005; Schroder et al., 2006). Demnach erhöht die Fähigkeit von *S. aureus*, eine

möglichst lange Zeit an Zellen zu adhären, ohne internalisiert zu werden dessen Überlebenswahrscheinlichkeit. Eine lange Adhäsionszeit auf der Zelloberfläche erlaubt die Sezernierung von toxischen Virulenzfaktoren, welche die Wirtszelle massiv schädigen und somit die Internalisierung und Degradation so verhindern.

#### **4.1.1. Abhängigkeit der *FnBPA-S. aureus* Adhäsion und Internalisierung von Fibronektin**

Im Gegensatz zu Invasin erfolgt bei FnBPA die Anbindung an den Liganden indirekt über das Fn. *In vivo* kommen in die Blutbahn gelangte Erreger vermutlich zunächst in Kontakt mit dem löslichen Serum-Fn, bevor sie dann an die Endothelzellen binden können, die auf ihrer Oberfläche ebenfalls Fn exprimieren.

Da lösliches und fibrilläres Fn grundsätzlich unterschiedlich sind, stellte sich die Frage, welche der beiden Fn-Formen an das FnBPA binden können. In Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass das Fn aus dem Serum an FnBPA-exprimierende Bakterien spezifisch bindet (Abb. 3.3. A). Abb. 3.3. D zeigt, dass so beschichtete Bakterien sowohl von den HUVEC als auch von Fn-defizienten Fibroblasten in signifikanten Mengen internalisiert werden konnten. Dagegen wurden unbeschichtete Bakterien nur von den HUVEC internalisiert, da sie Fn auf ihrer Oberfläche in fibrillärer Form binden. Das zeigt zum einen, dass Fn für die Aufnahme in die Zellen notwendig ist und zum anderen, dass die Aufnahme sowohl über lösliches als auch durch fibrilläres Fn vermittelt werden kann. Dieses Ergebnis ist insofern erstaunlich, da das Serum-Fn in einer inaktiven, kompakten Konformation vorliegt, dessen Streckung/Aktivierung *in vitro* von dem pH-Wert und der Ionenstärke abhängt oder nach Adhäsion an chemisch definierte Oberflächen erfolgt (Baugh et al., 2004; Erickson, 2002; Johnson et al., 1999). Nach dem bislang gängigen Modell erfolgt diese Streckung des Fns *in vivo* nach Bindung an den Integrin-Rezeptor (Hynes, 2002). Es liegt daher die Vermutung nahe, dass das Fn auch durch das FnBPA aktiviert werden kann, ähnlich wie es von Schwarz-Linek postuliert wurde (Schwarz-Linek et al., 2004a).

#### **4.1.2. Unterschiede zwischen den von Invasin und FnBPA induzierten Adhäsionsstrukturen**

Obwohl sowohl Invasin- als auch FnBPA-abhängige Invasion über einen Fn-Rezeptor, das  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin, vermittelt werden, unterscheiden sich beide doch deutlich voneinander. Einerseits bindet Invasin im Gegensatz zu FnBPA direkt an den Integrin-Rezeptor, andererseits ist die Invasin-abhängige Internalisierung ein wesentlich schnellerer Prozess. Internalisierung bzw. Phagozytose und Adhäsion sind einander sehr ähnlich, da beide Prozesse Rezeptor-abhängig sind und sich in der Zusammensetzung der beteiligten Signaltransduktionsmoleküle sehr ähneln (Cougoule et al., 2004). Unterschiedliche Invasionskinetiken geben demnach auch Hinweise auf potenzielle Unterschiede in der Art der Adhäsion. Aus diesem Grund wurden die von FnBPA und Invasin induzierten Adhäsionsstrukturen auf der Endothelzelloberfläche genauer untersucht.

Die verschiedenen charakterisierten Adhäsionsstrukturen lassen sich anhand bekannter Markerproteine genau voneinander unterscheiden (s. Punkt 1.4 und (Zaidel-Bar et al., 2004). Abb. 3.4. B-D zeigt, dass in GFP-Tensin exprimierenden Endothelzellen die durch Invasin induzierten Adhäsionen zusätzlich zu Tensin mit

Paxillin, Vinculin und pFAK angereichert sind und an den Zellrändern lokalisieren. Diese Proteinzusammensetzung und die beschriebene Lokalisation sind charakteristisch für fokale Kontakte/fokale Adhäsionen. Im Gegensatz dazu findet sich bei den FnBPA-induzierten Adhäsionen ausschließlich Tensin. Desweiteren gleichen diese Strukturen durch ihre Assoziation mit Fn und ihrer mehr zentral in der Zelle gelegenen Position eher fibrillären Adhäsionen. Das verdeutlicht zum einen, dass ein Zusammenhang zwischen der Invasionskinetik und der Art der durch die beiden unterschiedlichen Adhäsine ausgebildeten Adhäsionsstrukturen besteht, andererseits deutet es auf wahrscheinliche Funktionsunterschiede von Invasin und FnBPA hin. Während das Invasin die Funktion zu haben scheint, eine mögliche schnelle Aufnahme der Bakterien in die Zelle zu initiieren, scheint FnBPA eher die Funktion zu haben, den Bakterien eine bewegliche Anheftungsstelle zu bieten, ohne phagozytotische Signalkaskaden auszulösen.

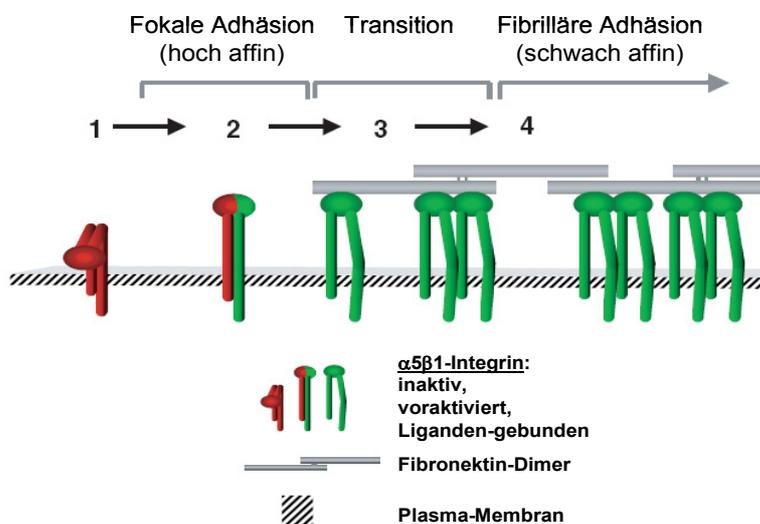
In einem offensichtlichen Widerspruch dazu stehen Daten, die zeigen, dass die Aufnahme von *FnBPA-S. aureus* in Fibroblasten durch Inhibition von FAK unterbunden werden kann (Agerer et al., 2005). FAK lokalisiert an fokalen Adhäsionen und reguliert u.a die Reifung fokaler Kontakte und ist an der Regulation der Zellmigration beteiligt (Ren et al., 2000; Sieg et al., 1999). Das könnte bedeuten, dass die Internalisierung von *FnBPA-S. aureus* durch FAK bzw. durch fokale Adhäsionen und nicht durch fibrilläre Adhäsionen reguliert wird. Pankov und Kollegen konnten jedoch zeigen, dass fokale Komplexe, fokale Adhäsionen und fibrilläre Adhäsionen unterschiedliche Reifungsstadien zellulärer Matrixkontakte darstellen, die fließend ineinander übergehen (s. Abb. 4.1. A) (Pankov et al., 2000; Zamir et al., 2000). Durch die Aktomyosin Inhibitoren H-7 oder ML-7 (Blockierung der „*myosin-light-chain kinase*“) wurden in deren Versuchen nicht nur fokale Adhäsionen zerstört, sondern auch die Segregation fibrillärer Adhäsionen aus den fokalen Kontakten inhibiert. Daher ist davon auszugehen, dass die Zerstörung fokaler Adhäsionen durch FAK-Inhibition auch die Reifung der FA zu fibrillären Adhäsionen verhindert und so die Assoziation der Bakterien an fibrilläre Adhäsionen unterbindet, was letztendlich zu einer Störung des Internalisierungsprozesses führt.

## 4.2. FnBPA-abhängiger Transport auf der Zelloberfläche

In Übereinstimmung zu den Daten, welche FnBPA-induzierte Adhäsionen als fibrillären Adhäsionen ähnliche Strukturen spezifizieren, konnte beobachtet werden, dass FnBPA-beschichtete Kügelchen auf der Zelloberfläche zentripetal transportiert werden (Abb. 3.6. C). Die zentripetale Translokation aus fokalen Kontakten ist ein zentrales Merkmal fibrillärer Adhäsionen (Zamir et al., 2000).

Weiterhin konnte für das  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin in neuen Studien gezeigt werden, dass die Reifung und Translokation von der Exposition verschiedener durch Konformationsänderung demaskierter Integrin-Epitope assoziiert ist (Clark et al., 2005; Mould et al., 2004). Demnach liegt die  $\beta$ -Kette des Integrins in fokalen Adhäsionen als voraktiviertes Integrin vor. Am distalen, der Zellmitte zugewandten Ende der fokalen Adhäsionen kommt es durch Bündelung der Integrine („*clustering*“) nach Ligandenbindung zu einer weiteren Konformationsänderung, welche die Translokation in die fibrillären Adhäsionen entlang der Aktinfasern ermöglicht (s. Abb. 4.2.). Für ein anderes Integrin ( $\alpha L\beta 2$ ) konnte weiterhin gezeigt werden, dass unterschiedliche Affinitäts-Zustände auch unterschiedliche Liganden-induzierte Signalisierungs-Zustände des Integrins ermöglichen (Salas et al., 2004).

Die Bindung an unterschiedliche Epitope bzw. Aktivierungs-Zustände ist auch für Invasin und FnBPA denkbar. Invasin bindet direkt an die  $\beta$ -Kette des  $\alpha 5\beta 1$ -Integrins und lokalisiert an fokalen Adhäsionen, in denen das Integrin in einem schwach aktivierten Zustand vorliegt. Durch Bindung des Invasins wird der Rezeptor vollständig aktiviert und es kommt zu der massiven Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden. Dagegen werden Staphylokokken über das Fn indirekt an den Fibronectin-Rezeptor rekrutiert. Der Rezeptor liegt zwar in einem aktivierten, aber durch die Bindung an die flexible Fn-Matrix wenig affinen Zustand vor. Es ist daher vorstellbar, dass einerseits Liganden-spezifisch und andererseits Affinitäts-abhängig verschiedene Signalkaskaden initiiert werden können, die zeitlich und räumlich unterschiedlich reguliert sind. Dieses Modell würde erklären, dass lediglich bei FnBPA-vermittelter Adhäsion ein zentripetaler Transport beobachtet werden kann, wohingegen durch Invasin eine unmittelbare Internalisierung induziert wird.



**Abb. 4.2.: Modell für die schrittweise Aktivierung des  $\alpha 5\beta 1$ -Integrins.**

- (1) Das inaktive  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin lokalisiert diffus auf der Zelloberfläche.
- (2) Das in fokalen Adhäsionen lokalisierte Integrin exprimiert Epitope, die für eine voraktivierte  $\beta 1$ -Konformation charakteristisch sind. In diesem Zustand liegen die Integrine nicht vollständig in einem Liganden-gebundenen Zustand vor.
- (3) Integrine am distalen (der Zellmitte zugewandten) Ende exprimieren zusätzliche Epitope. Das „clustering“ der Integrine induziert die Akto-Myosin-abhängige Translokation der Komplexe.
- (4) Die ligierten und „geclusterten“ Integrine translozieren aus den fokalen Adhäsionen entlang subkortikaler Aktinfasern.

Abbildung nach Clark, 2005

Zentripetaler Transport von Fn-beschichteten Kügelchen auf der Oberfläche von Zellen wurde schon früher beschrieben (Choquet et al., 1997). Für Fibroblasten konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass sich Fn-beschichtete

Kügelchen nach dem Transport in die Zellmitte aufgrund schwacher Bindung an die Zelle wieder von dieser ablösen (Nishizaka et al., 2000). In dem in dieser Arbeit vorgestellten Modell der FnBPA-vermittelten Adhäsion wurde zwar keine Ablösung der Kügelchen von den Zellen beobachtet, wohl aber eine durch Tensin-modulierte Aktinreorganisation (3.6), die für die Fn-vermittelte Adhäsion bislang noch nicht beschrieben wurde. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass FnBPA vermutlich eine Konformationsänderung des Fn hervorruft oder zumindest die Interaktion zwischen Fn und dem Integrin-Rezeptor verändert (Schwarz-Linek et al., 2004b; Schwarz-Linek et al., 2004a).

Es ist vorstellbar, dass die Anzahl der an einem FnBPA-Molekül gebundenen Fn-Moleküle einen Einfluss auf die Bündelung der Integrine hat und somit auch auf die Aktinreorganisation. Für synthetische Konstrukte von Fn, in denen die Fn III<sub>7-10</sub> Domäne mit dem Integrin-Bindemotiv RGD als Monomer, Dimer, Trimer oder Pentamer fusioniert vorlag, konnte gezeigt werden, dass nur das Tri- und Pentamer eine schnelle Bündelung des  $\alpha 5\beta 1$ -Integrins induzierte und mit Aktinfasern kolokalisierten, während sich monomeres oder dimeres Fn diffus auf der Zelle verteilte (Coussen et al., 2002). Da ein FnBPA-Molekül mehrere Interaktionsdomänen für Fn aufweist und somit auch mehr als Molekül binden könnte, ist eine massive Bündelung der Integrine denkbar, die zu der beobachteten Aktin-Reorganisation führt.

### 4.3. Modulation FnBPA-abhängiger Adhäsionsstrukturen durch Tensin

Tensin ist in den basalen fibrillären Adhäsionen ein zentrales Bindeglied zwischen dem Fn-Rezeptor und den zytosolischen Signaltransduktionskomponenten (Pankov et al., 2000). Auch bei den apikalen Adhäsionsstrukturen lokalisiert es an den extrazellulären FnBPA-exprimierenden Kügelchen oder Bakterien (Abb. 3.4. E). Daher wurde getestet, ob durch Modulation von Tensin auch der zentripetale Transport und die Internalisierung von *FnBPA-S. aureus* beeinflusst werden können.

Es zeigte sich in der Tat, dass durch Überexpression eines dominant-negativen Tensin-Konstruktes - GFP-Tensin-AH2 - beide Prozesse beeinflusst werden (Abb. 3.6. A-C und Abb. 3.10. D). Die Inhibierung von Tensin führt im Vergleich zu der Kontrolle zu einer Reduktion der Internalisierung um ca. 70% und einer Reduktion der zurückgelegten Distanz um bis zu 90%, sowie einer Geschwindigkeitsreduktion um ca. 70%.

Dieser drastische Effekt lässt sich durch die Domänenstruktur von Tensin erklären, denn das Protein besitzt sowohl eine Integrin-Interaktionsdomäne als auch mehrere Aktin-Interaktionsdomänen (Lo, 2004). Durch das Wegfallen der Verbindung des Rezeptors zum Zytoskelett wird die Signalweiterleitung in Richtung Aktinpolymerisation gestört. Der Effekt dominant negativen Tensins wird zusätzlich dadurch verdeutlicht, dass sich die Anzahl der Aktinakkumulationen an den FnBPA-induzierten Aufnahmestrukturen in GFP-Tensin-AH2 überexprimierenden Zellen im Vergleich zu der Kontrolle um ca. 60% reduziert (Abb. 3.10. C und Punkt 4.4). Eine komplette Inhibierung von Transport und Internalisierung war durch das dominant negative Konstrukt nicht zu erzielen. Das ist aufgrund der Tatsache, dass mehrere Isoformen von Tensin existieren, die auch in Endothelzellen exprimiert werden, nicht zu erwarten gewesen.

#### 4.4. FnBPA-induzierte Aktindynamik

Da die Abhängigkeit des zentripetalen Transportes fibrillärer Adhäsionen von der Aktomyosin-Kontraktion bereits beschrieben wurde (Pankov et al., 2000; Zamir et al., 2000), war es sinnvoll, sich die apikale Aktindynamik FnBPA-induzierter Adhäsionen videomikroskopisch in lebenden Zellen zu untersuchen.

Es stellte sich heraus, dass während des zentripetalen Transportes von FnBPA-beschichteten Kügelchen oder *FnBPA-S. aureus* auf den Endothelzellen periodische Aktinakkumulationen auftraten, die sich wellenförmig über die Adhäsionskontakte ausbreiteten (Abb. 3.7.). Im Vergleich dazu konnte bei der Invasin-abhängigen Invasion maximal zwei Akkumulationen beobachtet werden. Analog zu dem hier beschriebenen FnBPA-abhängigen Prozess wurden ähnliche Prozesse für Fn-beschichtete Kügelchen auf der Oberfläche embryonaler Maus-Fibroblasten beschrieben (Giannone et al., 2004). In den Fibroblasten wurden Fn-beschichtete Kügelchen durch periodisch auftretende, subkortikale Aktinwellen zentripetal transportiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass zusammen mit dem Aktin auch Proteine zentripetal transportiert wurden, welche die Aktin-Regulation bzw. die Aktomyosin-abhängige Kontraktion beeinflussen, wie z.B.  $\alpha$ -actinin und MLCK („*myosin light chain kinase*“). Ähnliches ist auch für die FnBPA-vermittelten Adhäsion vorstellbar. Zum einen werden die über das FnBPA-adhärenzierenden Bakterien oder Kügelchen über die zentripetalen Aktinwellen transportiert, zum anderen kommt es dabei über den aktivierten Fn-Rezeptor (s. Punkt 4.2.) zu weiteren Signalen, welche die Aktinpolymerisation auslösen können.

Zusätzlich zu diesem langsamen Transport mit den begleitenden Aktinwellen konnte ein schneller Transport von FnBPA-beschichteten Kügelchen oder *FnBPA-S. aureus* beobachtet werden, der durch die Bildung von Aktinschweiften zustande kam. Das Auftreten von Aktinschweiften, die polar an intrazellulären Bakterien und Endosomen gebildet werden und eine aktive Bewegung der Bakterien oder Vesikel innerhalb der Zelle ermöglichen, ist ein bekanntes Phänomen (Fehrenbacher et al., 2003; Taunton, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch anhand einer 3D-Rekonstruktion gezeigt werden, dass die beobachteten Aktinschweiften an adhärenzierenden, also extrazellulären Bakterien auftraten (Abb. 3.9. C-E). Demnach muss die Aktivierung der Aktinpolymerisation (s. auch 4.4.1.) durch die Plasmamembran hindurch über den Fn-Rezeptor erfolgen. In diesem Zusammenhang ist eine Beteiligung von Tensin an der Bildung/Regulation der Aktinschweiften relativ wahrscheinlich, da einerseits die Aktinakkumulationen an den FnBPA-induzierten Adhäsionen durch das dominant negative Tensin-AH2 inhibiert werden (Abb. 3.10. C) und andererseits Tensin und Aktin koreguliert zu sein scheinen (Abb. 3.10. A, B). Da Tensin-AH2 allerdings in keinem der Versuche eine vollständige Inhibition erzielen konnte, ist die Beteiligung anderer Signalkaskaden bzw. Aktin-regulierender Proteine sehr wahrscheinlich.

##### 4.4.1. Einfluss der Modulation des Aktinzytoskeletts auf die Internalisierung von *FnBPA-S. aureus*

Die Aktinpolymerisation wird über eine Vielzahl verschiedenster Regulatoren und akzessorischer Proteine moduliert und kontrolliert. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss prominenter Aktin-Regulatoren wie N-WASP, sowie der Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und CDC42 auf die FnBPA-induzierte Internalisierung von *S. aureus* untersucht. Durch Inhibition von N-WASP mittels

Wiskostatin bzw. durch Mikroinjektion dominant-negativer Formen von RhoA, Rac1 oder CDC42 konnte die Aufnahme von *FnBPA-S. aureus* in HUVEC um ca. 50-60% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen erzielt werden. Ein vergleichbarer Einfluss aller drei GTPasen auf die Internalisierung ist dadurch zu erklären, dass unterschiedliche Reifungsstadien spezifisch durch die einzelnen GTPasen reguliert werden. Während Rac1 und CDC42 initial bei der Ausbildung von Membranausstülpungen und Filopodien beteiligt sind (Katsumi et al., 2004), ist die Reifung zu fokalen Adhäsionen durch Rho reguliert (Rottner et al., 1999). Demzufolge führt eine Inhibition von frühen Stadien der Ausbildung der Adhäsion in gleichem Maße zu der Hemmung der Internalisierung wie die späteren Stadien.

#### 4.4.2. Internalisierung von *FnBPA-S. aureus*

Die FnBPA-abhängige Internalisierung ist im Vergleich zu der Invasin-abhängigen ein eher langsamer Prozess (Abb. 3.2. B). Die von *FnBPA-S. aureus* induzierten Adhäsionsstrukturen, die fibrillären Adhäsionen ähneln, also an Fn als Matrix gekoppelt sind, verhindern eine schnelle Internalisierung durch die HUVEC und Degradation der Bakterien im phagolysosomalen Stoffwechselweg. Fn ist eine sehr flexible Matrix, die es der Zelle unmöglich macht, eine hohe Zugspannung aufzubauen (Giannone et al., 2004). Im Gegensatz dazu ähneln die Adhäsionsstrukturen der sehr schnell internalisierten Invasin-beschichteten Partikel fokalen Kontakten und sind gekennzeichnet durch Proteine wie Vinculin, pFAK und Paxillin. Insbesondere Paxillin wird erst dann an Adhäsionsstrukturen angereichert, wenn an der Adhäsionsstelle eine hohe Zugspannung anliegt (Galbraith et al., 2002), die vermutlich für die Internalisierung partikulären Materials benötigt wird und nur an der Invasin- nicht aber an der FnBPA-induzierten Adhäsionsstelle anliegt. Es ist zudem vorstellbar, dass die Internalisierung FnBPA-beschichteter Partikel erst durch eine Reorganisation des FnBPA-gebundenen Fns möglich wird, die während der Dauer der Adhäsion stattfindet (Sottile et al., 2005).

Der Internalisierung eines Partikels geht meist eine massive Aktinakkumulation an der Adhäsionsstelle voraus. Diese subkortikale Aktinpolymerisation ist ein exakt reguliertes Ereignis, das die Aufnahme eines Partikels in die Zelle vorbereitet (May et al., 2001). Für Pinosomes wurde außerdem – ähnlich wie es auch bei FnBPA-beschichteten Partikeln auftritt - die Ausbildung von Aktinschweifchen beschrieben, die das Durchdringen des subkortikalen Aktin-Netzwerkes bei der Abschnürung der Vesikel in das Zellinnere ermöglicht (Merrifield et al., 1999).

Multiple Aktinakkumulationen oder auch die Aktinschweifbildung an FnBPA-vermittelten Adhäsionen könnten also wiederholte vergebliche Aufnahmeversuche der Zelle darstellen. Dafür sprechen verschiedene Ergebnisse. Zum einen konnten bei Invasin-vermittelten Aufnahme nie mehr als zwei Aktinpolymerisationen beobachtet werden, im Gegensatz dazu multiple Polymerisationen (bis zu 10 pro Bakterientraube) bei der FnBPA-abhängigen Invasion. Desweiteren sind die Bakterien bei der Bildung des Aktinschweifchens zwar schon sehr tief in die Zelle eingesunken, aber dennoch extrazellulär (Abb. 3.9. C-E), so dass es vorstellbar ist, dass Aktin eine weitere Zugspannung an dem Adhäsionskontakt aufbaut. Ein weiterer Hinweis dafür ist die alternierende Akkumulation von Aktin und Rab5 (Abb. 3.11. A, B). Rab5 ist ein Marker für frühe Endosomen, der ersten Reifungsstufe der in die Zelle abgeschnürten Vesikel, so dass die wechselseitige Akkumulation an den Bakterien die These der frustrierten/vergeblichen Aufnahmeversuche durch die Zelle weiter untermauert.

#### 4.5. Ausblick

Die genauen Abläufe bei der FnBPA-vermittelten Adhäsion und Internalisierung sind bislang nicht im Detail charakterisiert und es bleiben noch einige Fragen offen.

Insbesondere die Interaktion zwischen Fn und FnBPA ist noch weitgehend uncharakterisiert. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang die Fragen, wie viele Fn-Moleküle *in vivo* durch ein FnBPA gebunden werden und ob die Anzahl der gebundenen Fn-Moleküle die Adhäsion an den Fn-Rezeptor, das  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin, beeinflusst. Desweiteren stellt sich die Frage, ob das Fn durch die Bindung an das FnBPA eine Konformationsänderung erfährt, die einen Einfluss auf die weitere Interaktion mit dem Fn-Rezeptor hat.

Die basale Fn-Matrix ist einer permanenten Reorganisation durch die Zelle unterworfen (Midwood et al., 2004). Wenn ähnliche Prozesse auch auf der apikalen Seite stattfinden, interferieren diese höchstwahrscheinlich auch mit der Fn-FnBPA-Interaktion. Inhibiert man also die Matrix-Reorganisation könnte das die Internalisierung der Bakterien möglicherweise verhindern.

In diesem Zusammenhang sind auch Daten aus der Arbeitsgruppe von Sottile sehr interessant (Sottile et al., 2005), die beschreiben, dass die Fn-Matrix über einen Caveolin-1 abhängigen Prozess umgesetzt wird. Da die Expression von Caveolin in Endothelzellen deutlich höher ist als in anderen Zelltypen, könnte dieses Protein eine sehr wichtige Rolle im Rahmen der FnBPA-vermittelten *S. aureus* Internalisierung spielen. Deshalb wären Invasionsversuche mit Caveolin-„knock-out“-Zellen bzw. mit siRNA gegen Caveolin sehr wichtig, um den Einfluss von Caveolin auf die FnBPA-abhängige Aufnahme der Bakterien in die Zellen zu beschreiben.

Desweiteren ist noch unklar, welchen Einfluss die FnBPA-induzierten Adhäsionen auf den Fn-Rezeptor, das  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin haben. Mit Antikörpern, die spezifisch bestimmte Aktivierungszustände erkennen, kann man beschreiben, ob und wann das Integrin durch das FnBPA beeinflusst wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte der Einfluss von Tensin auf die FnBPA-abhängige Aufnahme gezeigt werden. Die Tensin-Familie besteht aus drei bislang bekannten Isoformen und einem stark trunkierten Protein mit hoher Homologie im C-Terminus dem sogenannten cten. In präliminären Versuchen konnte für Tensin1-3 gezeigt werden, dass mRNA der drei Isoformen in Endothelzellen exprimiert wird. Inwiefern alle drei oder nur einzelne Tensin-Isoformen eine Rolle bei der FnBPA-abhängigen Aufnahme spielen, soll in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

## 5. Zusammenfassung

*Staphylococcus aureus* ist ein transienter Keim der Hautflora, der, wenn er in den Blutstrom gelangt, eine Reihe schwerwiegender Erkrankungen wie z.B. Sepsis oder Endokarditis auslösen kann. Die Etablierung einer Infektion wird durch eine Reihe von Virulenzfaktoren ermöglicht, welche die Umgehung der Immunantwort, die Adhäsion an das Gewebe und dessen Zerstörung durch Sezernierung verschiedenster Toxine bewirken. Einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *S. aureus* ist das Adhäsın „*fibronectin binding protein A*“ (FnBPA), das die Adhäsion des Bakteriums an Fibronektin (Fn) und darüber indirekt über den Haupt-Fn-Rezeptor, das  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin, die Anheftung an Endothelzellen ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden insbesondere mittels videomikroskopischer Methoden die FnBPA-vermittelte Adhäsion, der Transport auf der Zelloberfläche und die Internalisierung von FnBPA-exprimierenden Staphylokokken (*FnBPA-S. aureus*) in lebenden primären humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) untersucht. Als vergleichendes Modellsystem wurde die *Yersinia enterocolitica* Invasin-abhängige Adhäsion/Invasion herangezogen, da dieses Adhäsın ebenfalls an das  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin bindet, die Interaktion in diesem Fall aber indirekt erfolgt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Invasin-exprimierende Bakterien innerhalb weniger Minuten in die HUVEC invadierten und die Aufnahme an den Zellrändern stattfand, wohingegen nur ca. 60% des *FnBPA-S. aureus* nach 1 h Adhäsion internalisiert worden sind. Dabei scheinen die Unterschiede in der Art der ausgebildeten Adhäsionsstrukturen eine essentielle Rolle zu spielen. Mittels Immunfluoreszenzfärbungen konnte nachgewiesen werden, dass durch Invasin Adhäsionen, die fokalen Adhäsionen ähneln, gebildet werden, während durch das FnBPA fibrillären Adhäsionen vergleichbare Strukturen gebildet werden.

In Analogie zu dem Modell zur zentripetalen Translokation fibrillärer Adhäsionen aus randständigen fokalen Kontakten konnten in videomikroskopischen Versuchen ein zentripetaler Transport von *FnBPA-S. aureus* vom Zellrand in Richtung der Zellmitte gezeigt werden. Während des Transportes wurden an einzelnen Adhäsionskontakten multiple Aktinakkumulationen beobachtet, die sich wellenförmig an den Adhäsionen ausbreiteten.

Weiterhin zeigte sich, dass FnBPA-abhängiger Transport und Internalisierung durch Tensin, einem Markerprotein für fibrilläre Adhäsionen beeinflusst wird. Durch Überexpression eines dominant-negativen Tensin-Konstruktes - Tensin-AH2 - konnten sowohl die Geschwindigkeit und die zurückgelegte Distanz um ca. 70% bzw. 90% als auch die Internalisierung um ca. 70% reduziert werden.

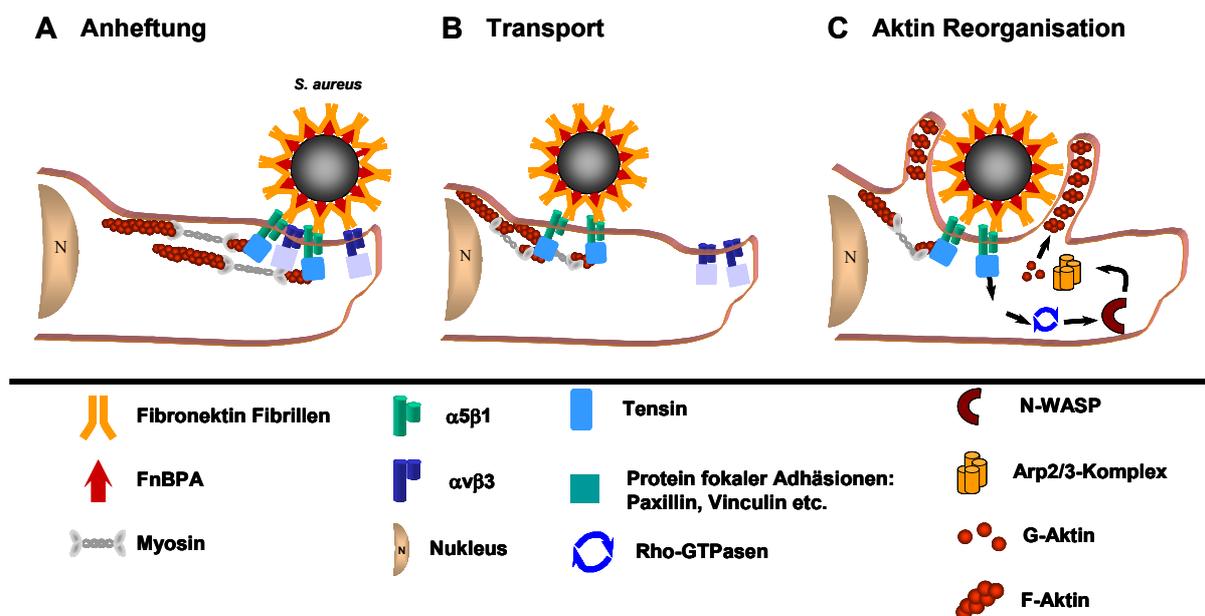
Die Bedeutung der Aktinakkumulation an den FnBPA-induzierten Adhäsionskontakten hinsichtlich der *FnBPA-S. aureus* Internalisierung konnte durch Modulation von Aktinregulatoren untermauert werden. Es zeigte sich, dass durch Überexpression dominant-negativer Formen der klassischen Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und CDC42, sowie der Verwendung von Wiskostatin, eines spezifischen N-WASP-Inhibitors, die Internalisierung FnBPA-exprimierender Bakterien drastisch reduziert wurde.

Aufgrund seiner Domänenstruktur kann Tensin als wichtiges Bindeglied zwischen aktivierten Integrinen und der Aktinreorganisation gesehen werden. In den videomikroskopischen Analysen wurde deutlich, dass Tensin und Aktin an den FnBPA-induzierten Adhäsionskontakten koreguliert sind und sich synchron

anreichern. Gleichzeitig konnte auch nachgewiesen werden, dass sich die Bildung der Aktinakkumulationen an den Adhäsionskontakten durch Überexpression von Tensin-AH2 um ca. 60% reduzieren lassen.

Die multiplen Aktinpolymerisationen an *FnBPA-S. aureus* können als vergebliche Internalisierungsversuche der Endothelzellen interpretiert werden. Diese These wird dadurch gestützt, dass zum einen die Bildung von Aktinschweifchen an extrazellulär adhären den Bakterien beobachtet wurde, die als Analogon zu den Aktinschweifchen verstanden werden können, die bei der Abschnürung von Pinosomen in das Zellinnere auftreten. Zum anderen zeigte sich, dass Rab5, ein Markerprotein für frühe Endosomen, und Aktin mehrfach alternierend an den Adhäsionskontakten akkumulieren, was auf eine noch nicht vollständig abgeschlossene Internalisierung hinweist.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass Tensin ein wichtiger Regulator sowohl des Transportes als auch der Internalisierung von *FnBPA-S. aureus* darstellt. Wie die Rolle von Tensin im Hinblick auf die Adhäsion und Internalisierung von *FnBPA-S. aureus* in primären humanen Endothelzellen aussehen könnte, wurde in dem Modell in Abb. 5. zusammengefasst.



**Abb. 5.:** Modell für die Adhäsion und Internalisierung von *FnBPA-S. aureus* in Endothelzellen.

- Die Anheftung der Bakterien erfolgt über Bakterien- oder zellgebundenes Fn an die Fn-Rezeptoren  $\alpha 5\beta 1$  und  $\alpha v\beta 3$ .
- Anschließend werden die Staphylokokken zusammen mit fibrillären Adhäsionen zentripetal in Richtung der Zellmitte transportiert.
- Daraufhin kommt es zu einer Tensin-vermittelten Aktin Reorganisation, die einerseits zu der Bildung von Aktinakkumulationen an den Adhäsionskontakten und vermutlich auch zu der Internalisierung der Bakterien führen.

Abbildung modifiziert nach Pankov et al., 2000; Zamir et al., 2001.

## 6. Literatur

- Adams, JC. (2001):** Cell-matrix contact structures.  
*Cell. Mol. Life Sci.* 58, S. 371-392
- Aepfelbacher, M und Essler, M. (2001):** Disturbance of endothelial barrier function by bacterial toxins and atherogenic mediators: a role for Rho/Rho kinase.  
*Cell. Microbiol.* 3, S. 649-658
- Agerer, F; Lux, S; Michel, A; Rohde, M; Ohlsen, K und Hauck, CR. (2005):** Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalisation.  
*J. Cell Sci.* 118, S. 2189-2200
- Agerer, F; Michel, A; Ohlsen, K und Hauck, CR. (2003):** Integrin-mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src family protein-tyrosine kinases.  
*J. Biol. Chem.* 278, S. 42524-42531
- Aktories, K und Barbieri, JT. (2005):** Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches.  
*Nat. Rev. Microbiol.* 3, S. 397-410
- Allen, WE; Zicha, D; Ridley, AJ und Jones, GE. (1998):** A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis.  
*J. Cell Biol.* 141, S. 1147-1157
- Anderson, RG. (1998):** The caveolae membrane system.  
*Annu. Rev. Biochem.* 67, S. 199-225
- Arvidson, S und Tegmark, K. (2001):** Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*.  
*Int. J. Med. Microbiol.* 291, S. 159-170
- Auger, KR; Songyang, Z; Lo, SH; Roberts, TM und Chen, LB. (1996):** Platelet-derived growth factor-induced formation of tensin and phosphoinositide 3-kinase complexes.  
*J. Biol. Chem.* 271, S. 23452-23457
- Baugh, L und Vogel, V. (2004):** Structural changes of fibronectin adsorbed to model surfaces probed by fluorescence resonance energy transfer.  
*J. Biomed. Mater. Res. A* 69, S. 525-534
- Bearman, GM und Wenzel, RP. (2005):** Bacteremias: a leading cause of death.  
*Arch. Med. Res.* 36, S. 646-659
- Blystone, SD; Graham, IL; Lindberg, FP und Brown, EJ. (1994):** Integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 differentially regulates adhesive and phagocytic functions of the fibronectin receptor  $\alpha$ 5 $\beta$ 1.  
*J. Cell Biol.* 127, S. 1129-1137

- Bowditch, RD; Hariharan, M; Tominna, EF; Smith, JW; Yamada, KM; Getzoff, ED und Ginsberg, MH. (1994):** Identification of a novel integrin binding site in fibronectin. Differential utilization by beta 3 integrins.  
*J. Biol. Chem.* 269, S. 10856-10863
- Brodsky, FM; Chen, CY; Knuehl, C; Towler, MC und Wakeham, DE. (2001):** Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles.  
*Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, S. 517-568
- Bushuev, VN; Metsis, ML; Morozkin, AD; Ruuge, EK; Sepetov, NF und Koteliansky, VE. (1985):** A comparative study of structural properties of fibronectin and its 180 kDa fragment.  
*FEBS Lett.* 189, S. 276-280
- Calderwood, DA; Fujioka, Y; de Pereda, JM; Garcia-Alvarez, B; Nakamoto, T; Margolis, B; McGlade, CJ; Liddington, RC und Ginsberg, MH. (2003):** Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, S. 2272-2277
- Caron, E und Hall, A. (1998):** Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases.  
*Science* 282, S. 1717-1721
- Caswell, PT und Norman, JC. (2006):** Integrin trafficking and the control of cell migration.  
*Traffic* 7, S. 14-21
- Chen, H und Lo, SH. (2003):** Regulation of tensin-promoted cell migration by its focal adhesion binding and Src homology domain 2.  
*Biochem. J.* 370, S. 1039-1045
- Choquet, D; Felsenfeld, DP und Sheetz, MP. (1997):** Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages.  
*Cell* 88, S. 39-48
- Chuang, JZ; Lin, DC und Lin, S. (1995):** Molecular cloning, expression, and mapping of the high affinity actin-capping domain of chicken cardiac tensin.  
*J. Cell Biol.* 128, S. 1095-1109
- Clark, EA; King, WG; Brugge, JS; Symons, M und Hynes, RO. (1998):** Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases.  
*J. Cell Biol.* 142, S. 573-586
- Clark, K; Pankov, R; Travis, MA; Askari, JA; Mould, AP; Craig, SE; Newham, P; Yamada, KM und Humphries, MJ. (2005):** A specific alpha5beta1-integrin conformation promotes directional integrin translocation and fibronectin matrix formation.  
*J. Cell Sci.* 118, S. 291-300
- Cooper, JA und Schafer, DA. (2000):** Control of actin assembly and disassembly at filament ends.  
*Curr. Opin. Cell Biol.* 12, S. 97-103

- Cougoule, C; Wiedemann, A; Lim, J und Caron, E. (2004):** Phagocytosis, an alternative model system for the study of cell adhesion.  
*Semin. Cell Dev. Biol.* 15, S. 679-689
- Coussen, F; Choquet, D; Sheetz, MP und Erickson, HP. (2002):** Trimers of the fibronectin cell adhesion domain localize to actin filament bundles and undergo rearward translocation.  
*J. Cell Sci.* 115, S. 2581-2590
- Czech, A; Yamaguchi, T; Bader, L; Linder, S; Kaminski, K; Sugai, M und Aepfelbacher, M. (2001):** Prevalence of Rho-inactivating epidermal cell differentiation inhibitor toxins in clinical *Staphylococcus aureus* isolates.  
*J. Infect. Dis.* 184, S. 785-788
- Danen, EH; Sonneveld, P; Brakebusch, C; Fassler, R und Sonnenberg, A. (2002):** The fibronectin-binding integrins alpha5beta1 and alphavbeta3 differentially modulate RhoA-GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis.  
*J. Cell Biol.* 159, S. 1071-1086
- Davis, S; Lu, ML; Lo, SH; Lin, S; Butler, JA; Druker, BJ; Roberts, TM; An, Q und Chen, LB. (1991):** Presence of an SH2 domain in the actin-binding protein tensin.  
*Science* 252, S. 712-715
- Dejana, E. (1996):** Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis.  
*J. Clin. Invest.* 98, S. 1949-1953
- Dersch, P und Isberg, RR. (1999):** A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association.  
*EMBO J.* 18, S. 1199-1213
- Desjardins, M. (1995):** Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis.  
*Trends Cell Biol.* 5, S. 183-186
- Desjardins, M; Huber, LA; Parton, RG und Griffiths, G. (1994):** Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus.  
*J. Cell Biol.* 124, S. 677-688
- Devitt, A; Moffatt, OD; Raykundalia, C; Capra, JD; Simmons, DL und Gregory, CD. (1998):** Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells.  
*Nature* 392, S. 505-509
- Drab, M; Verkade, P; Elger, M; Kasper, M; Lohn, M; Lauterbach, B; Menne, J; Lindschau, C; Mende, F; Luft, FC; Schedl, A; Haller, H und Kurzchalia, TV. (2001):** Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice.  
*Science* 293, S. 2449-2452

- Dziewanowska, K; Carson, AR; Patti, JM; Deobald, CF; Bayles, KW und Bohach, GA. (2000):** *Staphylococcal* fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: role in internalization by epithelial cells.  
*Infect. Immun.* 68, S. 6321-6328
- Endl, J; Seidl, HP; Fiedler, F und Schleifer, KH. (1983):** Chemical composition and structure of cell wall teichoic acids of *staphylococci*.  
*Arch. Microbiol.* 135, S. 215-223
- Erickson, HP. (2002):** Stretching fibronectin.  
*J. Muscle Res. Cell Motil.* 23, S. 575-580
- Erickson, HP und Carrell, NA. (1983):** Fibronectin in extended and compact conformations. Electron microscopy and sedimentation analysis.  
*J. Biol. Chem.* 258, S. 14539-14544
- Evangelista, M; Klebl, BM; Tong, AH; Webb, BA; Leeuw, T; Leberer, E; Whitway, M; Thomas, DY und Boone, C. (2000):** A role for myosin-I in actin assembly through interactions with Vrp1p, Bee1p, and the Arp2/3 complex.  
*J. Cell Biol.* 148, S. 353-362
- Fasshauer, D; Sutton, RB; Brunger, AT und Jahn, R. (1998):** Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, S. 15781-15786
- Fehrenbacher, K; Huckaba, T; Yang, HC; Boldogh, I und Pon, L. (2003):** Actin comet tails, endosomes and endosymbionts.  
*J. Exp. Biol.* 206, S. 1977-1984
- ffrench-Constant, C. (1995):** Alternative splicing of fibronectin--many different proteins but few different functions.  
*Exp. Cell Res.* 221, S. 261-271
- Fielding, CJ und Fielding, PE. (1997):** Intracellular cholesterol transport.  
*J Lipid Res* 38, S. 1503-1521
- Flock, JI; Fröman, G; Jonsson, K; Guss, B; Signas, C; Nilsson, B; Raucci, G; Höök, M; Wadstrom, T und Lindberg, M. (1987):** Cloning and expression of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*.  
*EMBO J.* 6, S. 2351-2357
- Fowler, T; Wann, ER; Joh, D; Johansson, S; Foster, TJ und Höök, M. (2000):** Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins.  
*Eur. J. Cell Biol.* 79, S. 672-679
- Fra, AM; Williamson, E; Simons, K und Parton, RG. (1995):** De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, S. 8655-8659

- Fradelizi, J; Noireaux, V; Plastino, J; Menichi, B; Louvard, D; Sykes, C; Golsteyn, RM und Friederich, E. (2001):** ActA and human zyxin harbour Arp2/3-independent actin-polymerization activity.  
*Nat. Cell Biol.* 3, S. 699-707
- Fröman, G; Switalski, LM; Speziale, P und Höök, M. (1987):** Isolation and characterization of a fibronectin receptor from *Staphylococcus aureus*.  
*J. Biol. Chem.* 262, S. 6564-6571
- Fujimoto, LM; Roth, R; Heuser, JE und Schmid, SL. (2000):** Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells.  
*Traffic* 1, S. 161-171
- Galbiati, F; Engelman, JA; Volonte, D; Zhang, XL; Minetti, C; Li, M; Hou, H, Jr.; Kneitz, B; Edelmann, W und Lisanti, MP. (2001):** Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities.  
*J Biol. Chem.* 276, S. 21425-21433
- Galbraith, CG; Yamada, KM und Sheetz, MP. (2002):** The relationship between force and focal complex development.  
*J. Cell Biol.* 159, S. 695-705
- Geffers, C; Gastmeier, P und Rüdén, H. (2002):** Nosokomiale Infektionen.  
*Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Robert Koch-Institut und Statistisches Bundesamt (Heft 8)*
- Giannone, G; Dubin-Thaler, BJ; Dobereiner, HG; Kieffer, N; Bresnick, AR und Sheetz, MP. (2004):** Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves.  
*Cell* 116, S. 431-443
- Goode, BL; Rodal, AA; Barnes, G und Drubin, DG. (2001):** Activation of the Arp2/3 complex by the actin filament binding protein Abp1p.  
*J. Cell Biol.* 153, S. 627-634
- Gorvel, JP; Chavrier, P; Zerial, M und Gruenberg, J. (1991):** Rab5 controls early endosome fusion in vitro.  
*Cell* 64, S. 915-925
- Greene, C; McDevitt, D; Francois, P; Vaudaux, PE; Lew, DP und Foster, TJ. (1995):** Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes.  
*Mol. Microbiol.* 17, S. 1143-1152
- Gruenberg, J. (2001):** The endocytic pathway: a mosaic of domains.  
*Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, S. 721-730
- Gumbiner, BM. (1996):** Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis.  
*Cell* 84, S. 345-357

- Haigler, HT; McKanna, JA und Cohen, S. (1979):** Rapid stimulation of pinocytosis in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factor.  
*J. Cell Biol.* 83, S. 82-90
- Hampton, MB; Kettle, AJ und Winterbourn, CC. (1998):** Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing.  
*Blood* 92, S. 3007-3017
- Harris, LG; Foster, SJ und Richards, RG. (2002):** An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review.  
*Eur. Cell Mater.* 4, S. 39-60
- Hellenbrand, W. (2003):** Neu und vermehrt auftretende Infektionskrankheiten.  
*Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Robert Koch-Institut und Statistisches Bundesamt (Heft 18)*
- Hinshaw, JE. (2000):** Dynamamin and its role in membrane fission.  
*Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, S. 483-519
- Holthofer, H; Virtanen, I; Kariniemi, AL; Hormia, M; Linder, E und Miettinen, A. (1982):** Ulex europaeus I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues.  
*Lab. Invest.* 47, S. 60-66
- Hommelgaard, AM; Roepstorff, K; Vilhardt, F; Torgersen, ML; Sandvig, K und van Deurs, B. (2005):** Caveolae: stable membrane domains with a potential for internalization.  
*Traffic* 6, S. 720-724
- Hoppe, AD und Swanson, JA. (2004):** Cdc42, Rac1, and Rac2 display distinct patterns of activation during phagocytosis.  
*Mol. Biol. Cell* 15, S. 3509-3519
- Huff, S; Matsuka, YV; McGavin, MJ und Ingham, KC. (1994):** Interaction of N-terminal fragments of fibronectin with synthetic and recombinant D motifs from its binding protein on *Staphylococcus aureus* studied using fluorescence anisotropy.  
*J. Biol. Chem.* 269, S. 15563-15570
- Hunter, S; Indik, ZK; Kim, MK; Cauley, MD; Park, JG und Schreiber, AD. (1998):** Inhibition of Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis by a nonphagocytic Fc $\gamma$  receptor.  
*Blood* 91, S. 1762-1768
- Hynes, RO. (2002):** Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.  
*Cell* 110, S. 673-687
- Indik, ZK; Salehuddin, M; McKenzie, SE; Kelly, C; Levinson, AI und Schreiber, AD. (1992):** Human Fc $\gamma$  RII: the structure of the Fc $\gamma$  RII cytosolic domain governs phagocytic function.  
*Trans. Assoc. Am. Physicians* 105, S. 214-221

- Isberg, RR; Hamburger, Z und Dersch, P. (2000):** Signaling and invasion-promoted uptake via integrin receptors.  
*Microbes Infect.* 2, S. 793-801
- Jacinto, A und Wolpert, L. (2001):** Filopodia.  
*Curr. Biol.* 11, S. R634-
- Jaffe, AB und Hall, A. (2005):** RHO GTPases: Biochemistry and Biology.  
*Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, S. 247-269
- Jaffe, EA; Nachman, RL; Becker, CG und Minick, CR. (1973):** Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria.  
*J. Clin. Invest.* 52, S. 2745-2756
- Janeway, CA, Jr. (1992):** The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self.  
*Immunol. Today* 13, S. 11-16
- Joh, D; Speziale, P; Gurusiddappa, S; Manor, J und Höök, M. (1998):** Multiple specificities of the staphylococcal and streptococcal fibronectin-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules.  
*Eur. J. Biochem.* 258, S. 897-905
- Joh, D; Wann, ER; Kreikemeyer, B; Speziale, P und Hook, M. (1999):** Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells.  
*Matrix Biol.* 18, S. 211-223
- Johnson, AR und Erdos, EG. (1977):** Metabolism of vasoactive peptides by human endothelial cells in culture. Angiotensin I converting enzyme (kininase II) and angiotensinase.  
*J. Clin. Invest.* 59, S. 684-695
- Johnson, KJ; Sage, H; Briscoe, G und Erickson, HP. (1999):** The compact conformation of fibronectin is determined by intramolecular ionic interactions.  
*J. Biol. Chem.* 274, S. 15473-15479
- Jonsson, K; Signas, C; Muller, HP und Lindberg, M. (1991):** Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene.  
*Eur. J. Biochem.* 202, S. 1041-1048
- Jordens, I; Marsman, M; Kuijl, C und Neefjes, J. (2005):** Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion.  
*Traffic* 6, S. 1070-1077
- Karakawa, WW; Fournier, JM; Vann, WF; Arbeit, R; Schneerson, RS und Robbins, JB. (1985):** Method for the serological typing of the capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*.  
*J. Clin. Microbiol.* 22, S. 445-447

- Katsumi, A; Orr, AW; Tzima, E und Schwartz, MA. (2004):** Integrins in mechanotransduction.  
*J. Biol. Chem.* 279, S. 12001-12004
- Katz, BZ; Zamir, E; Bershadsky, A; Kam, Z; Yamada, KM und Geiger, B. (2000):** Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions.  
*Mol. Biol. Cell* 11, S. 1047-1060
- Khan, MY; Medow, MS und Newman, SA. (1990):** Unfolding transitions of fibronectin and its domains. Stabilization and structural alteration of the N-terminal domain by heparin.  
*Biochem. J.* 270, S. 33-38
- Kluytmans, J; Van Belkum, A und Verbrugh, H. (1997):** Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks.  
*Clin. Microbiol. Rev.* 10, S. 505-520
- Kozma, R; Ahmed, S; Best, A und Lim, L. (1995):** The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts.  
*Mol. Cell. Biol.* 15, S. 1942-1952
- Krut, O; Utermohlen, O; Schlossherr, X und Kronke, M. (2003):** Strain-specific association of cytotoxic activity and virulence of clinical *Staphylococcus aureus* isolates.  
*Infect. Immun.* 71, S. 2716-2723
- Kuusela, P. (1978):** Fibronectin binds to *Staphylococcus aureus*.  
*Nature* 276, S. 718-720
- Laemmli, UK. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
*Nature* 227, S. 680-685
- Lan, R und Reeves, PR. (2000):** Intraspecies variation in bacterial genomes: the need for a species genome concept.  
*Trends Microbiol.* 8, S. 396-401
- Laschke, MW; Kerdudou, S; Herrmann, M und Menger, MD. (2005):** Intravital fluorescence microscopy: a novel tool for the study of the interaction of *Staphylococcus aureus* with the microvascular endothelium in vivo.  
*J. Infect. Dis* 191, S. 435-443
- Laukaitis, CM; Webb, DJ; Donais, K und Horwitz, AF. (2001):** Differential dynamics of alpha5 integrin, paxillin, and alpha-actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells.  
*J. Cell Biol.* 153, S. 1427-1440
- Linder, S und Aepfelbacher, M. (2003):** Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells.  
*Trends Cell Biol.* 13, S. 376-385

- Lindsay, JA und Holden, MT. (2004):** *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome?  
*Trends Microbiol.* 12, S. 378-385
- Lo, SH. (2004):** Tensin.  
*Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, S. 31-34
- Lowy, FD. (1998):** *Staphylococcus aureus* infections.  
*N. Engl. J. Med.* 339, S. 520-532
- Lowy, FD. (2000):** Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen?  
*Trends Microbiol.* 8, S. 341-343
- Machesky, LM und Insall, RH. (1998):** Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex.  
*Curr. Biol.* 8, S. 1347-1356
- Mallavarapu, A und Mitchison, T. (1999):** Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction.  
*J. Cell Biol.* 146, S. 1097-1106
- Marechal, V; Prevost, MC; Petit, C; Perret, E; Heard, JM und Schwartz, O. (2001):** Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis.  
*J. Virol.* 75, S. 11166-11177
- Massey, RC; Kantzanou, MN; Fowler, T; Day, NP; Schofield, K; Wann, ER; Berendt, AR; Höök, M und Peacock, SJ. (2001):** Fibronectin-binding protein A of *Staphylococcus aureus* has multiple, substituting, binding regions that mediate adherence to fibronectin and invasion of endothelial cells.  
*Cell. Microbiol.* 3, S. 839-851
- May, RC. (2001):** The Arp2/3 complex: a central regulator of the actin cytoskeleton.  
*Cell. Mol. Life Sci.* 58, S. 1607-1626
- May, RC und Machesky, LM. (2001):** Phagocytosis and the actin cytoskeleton.  
*J. Cell Sci.* 114, S. 1061-1077
- Mellman, I und Steinman, RM. (2001):** Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines.  
*Cell* 106, S. 255-258
- Merrifield, CJ; Moss, SE; Ballestrem, C; Imhof, BA; Giese, G; Wunderlich, I und Almers, W. (1999):** Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells.  
*Nat. Cell Biol.* 1, S. 72-74
- Miaczynska, M und Zerial, M. (2002):** Mosaic organization of the endocytic pathway.  
*Exp. Cell Res.* 272, S. 8-14

- Midwood, KS; Williams, LV und Schwarzbauer, JE. (2004):** Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix.  
*Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, S. 1031-1037
- Moore, PC und Lindsay, JA. (2001):** Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes.  
*J. Clin. Microbiol.* 39, S. 2760-2767
- Mould, AP und Humphries, MJ. (2004):** Regulation of integrin function through conformational complexity: not simply a knee-jerk reaction?  
*Curr. Opin. Cell Biol.* 16, S. 544-551
- Mullins, RD; Heuser, JA und Pollard, TD. (1998):** The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, S. 6181-6186
- Nagai, T; Yamakawa, N; Aota, S; Yamada, SS; Akiyama, SK; Olden, K und Yamada, KM. (1991):** Monoclonal antibody characterization of two distant sites required for function of the central cell-binding domain of fibronectin in cell adhesion, cell migration, and matrix assembly.  
*J. Cell Biol.* 114, S. 1295-1305
- Navarre, WW und Schneewind, O. (1999):** Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope.  
*Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, S. 174-229
- Nesterov, A; Carter, RE; Sorkina, T; Gill, GN und Sorkin, A. (1999):** Inhibition of the receptor-binding function of clathrin adaptor protein AP-2 by dominant-negative mutant mu2 subunit and its effects on endocytosis.  
*EMBO J.* 18, S. 2489-2499
- Nguyen, MH; Kauffman, CA; Goodman, RP; Squier, C; Arbeit, RD; Singh, N; Wagener, MM und Yu, VL. (1999):** Nasal carriage of and infection with *Staphylococcus aureus* in HIV-infected patients.  
*Ann. Intern. Med.* 130, S. 221-225
- Nishizaka, T; Shi, Q und Sheetz, MP. (2000):** Position-dependent linkages of fibronectin- integrin-cytoskeleton.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, S. 692-697
- Nobes, CD und Hall, A. (1995):** Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia.  
*Cell* 81, S. 53-62
- Nyberg, P; Sakai, T; Cho, KH; Caparon, MG; Fassler, R und Bjorck, L. (2004):** Interactions with fibronectin attenuate the virulence of *Streptococcus pyogenes*.  
*EMBO J.* 23, S. 2166-2174
- Oelschlaeger, TA. (2001):** Adhesins as invasins.  
*Int. J. Med. Microbiol.* 291, S. 7-14

- Oh, P; McIntosh, DP und Schnitzer, JE. (1998):** Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium.  
*J. Cell Biol.* 141, S. 101-114
- Oliski, TM; Noegel, AA und Korenbaum, E. (2001):** Parvin, a 42 kDa focal adhesion protein, related to the alpha-actinin superfamily.  
*J. Cell Sci.* 114, S. 525-538
- Palade, GE und Bruns, RR. (1968):** Structural modulations of plasmalemmal vesicles.  
*J. Cell Biol.* 37, S. 633-649
- Palecek, SP; Schmidt, CE; Lauffenburger, DA und Horwitz, AF. (1996):** Integrin dynamics on the tail region of migrating fibroblasts.  
*J. Cell Sci.* 109, S. 941-952
- Pankov, R; Cukierman, E; Katz, BZ; Matsumoto, K; Lin, DC; Lin, S; Hahn, C und Yamada, KM. (2000):** Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of alpha5beta1 integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis.  
*J. Cell Biol.* 148, S. 1075-1090
- Pankov, R und Yamada, KM. (2002):** Fibronectin at a glance.  
*J. Cell Sci.* 115, S. 3861-3863
- Patti, JM; Allen, BL; McGavin, MJ und Hook, M. (1994):** MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues.  
*Annu. Rev. Microbiol.* 48, S. 585-617
- Peacock, SJ; Moore, CE; Justice, A; Kantzanou, M; Story, L; Mackie, K; O'Neill, G und Day, NP. (2002):** Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*.  
*Infect. Immun.* 70, S. 4987-4996
- Pelkmans, L; Puntener, D und Helenius, A. (2002):** Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae.  
*Science* 296, S. 535-539
- Pober, JS; Gimbrone, MA, Jr.; Lapierre, LA; Mendrick, DL; Fiers, W; Rothlein, R und Springer, TA. (1986):** Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon.  
*J. Immunol.* 137, S. 1893-1896
- Pollard, TD; Blanchoin, L und Mullins, RD. (2000):** Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells.  
*Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, S. 545-576
- Pollard, TD und Borisy, GG. (2003):** Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments.  
*Cell* 112, S. 453-465

- Qualmann, B; Kessels, MM und Kelly, RB. (2000):** Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton.  
*J. Cell Biol. 150, S. F111-F116*
- Rabinovitch, M. (1995):** Professional and non-professional phagocytes: an introduction.  
*Trends Cell Biol. 5, S. 85-87*
- Razani, B; Woodman, SE und Lisanti, MP. (2002):** Caveolae: from cell biology to animal physiology.  
*Pharmacol. Rev. 54, S. 431-467*
- Regen, CM und Horwitz, AF. (1992):** Dynamics of beta1 integrin-mediated adhesive contacts in motile fibroblasts.  
*J. Cell Biol. 119, S. 1347-1359*
- Ren, XD; Kiosses, WB; Sieg, DJ; Otey, CA; Schlaepfer, DD und Schwartz, MA. (2000):** Focal adhesion kinase suppresses Rho activity to promote focal adhesion turnover.  
*J. Cell Sci. 113, S. 3673-3678*
- Ridley, AJ und Hall, A. (1992a):** The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors.  
*Cell 70, S. 389-399*
- Ridley, AJ; Paterson, HF; Johnston, CL; Diekmann, D und Hall, A. (1992b):** The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling.  
*Cell 70, S. 401-410*
- Ridley, AJ; Schwartz, MA; Burridge, K; Firtel, RA; Ginsberg, MH; Borisy, G; Parsons, JT und Horwitz, AR. (2003):** Cell migration: integrating signals from front to back.  
*Science 302, S. 1704-1709*
- Rocco, M; Carson, M; Hantgan, R; McDonagh, J und Hermans, J. (1983):** Dependence of the shape of the plasma fibronectin molecule on solvent composition. Ionic strength and glycerol content.  
*J. Biol. Chem. 258, S. 14545-14549*
- Rohatgi, R; Ma, L; Miki, H; Lopez, M; Kirchhausen, T; Takenawa, T und Kirschner, MW. (1999):** The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly.  
*Cell 97, S. 221-231*
- Rottner, K; Hall, A und Small, JV. (1999):** Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics.  
*Curr. Biol. 9, S. 640-648*
- Ruoslahti, E und Pierschbacher, MD. (1987):** New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins.  
*Science 238, S. 491-497*

- Ruoslahti, E und Rajotte, D. (2000):** An address system in the vasculature of normal tissues and tumors.  
*Annu. Rev. Immunol.* 18, S. 813-827
- Salas, A; Shimaoka, M; Kogan, AN; Harwood, C; von Andrian, UH und Springer, TA. (2004):** Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alphaLbeta2 and relation to alpha I and beta I-like domain interaction.  
*Immunity* 20, S. 393-406
- Sandvig, K und van Deurs, B. (1990):** Selective modulation of the endocytic uptake of ricin and fluid phase markers without alteration in transferrin endocytosis.  
*J. Biol. Chem.* 265, S. 6382-6388
- Schmid, SL. (1997):** Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process.  
*Annu. Rev. Biochem.* 66, S. 511-548
- Schnitzer, JE. (2001):** Caveolae: from basic trafficking mechanisms to targeting transcytosis for tissue-specific drug and gene delivery in vivo.  
*Adv. Drug Deliv. Rev.* 49, S. 265-280
- Schroder, A; Kland, R; Peschel, A; von Eiff, C und Aepfelbacher, M. (2006):** Live cell imaging of phagosome maturation in *Staphylococcus aureus* infected human endothelial cells: small colony variants are able to survive in lysosomes.  
*Med Microbiol Immunol. (Berl)*
- Schulte, R; Zumbihl, R; Kampik, D; Fauconnier, A und Autenrieth, IB. (1998):** Wortmannin blocks *Yersinia* invasin-triggered internalization, but not interleukin-8 production by epithelial cells.  
*Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* 187, S. 53-60
- Schwarz-Linek, U; Hook, M und Potts, JR. (2004a):** The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells.  
*Mol. Microbiol.* 52, S. 631-641
- Schwarz-Linek, U; Pilka, ES; Pickford, AR; Kim, JH; Hook, M; Campbell, ID und Potts, JR. (2004b):** High affinity streptococcal binding to human fibronectin requires specific recognition of sequential F1 modules.  
*J. Biol. Chem.* 279, S. 39017-39025
- Schwarz-Linek, U; Werner, JM; Pickford, AR; Gurusiddappa, S; Kim, JH; Pilka, ES; Briggs, JA; Gough, TS; Hook, M; Campbell, ID und Potts, JR. (2003):** Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem beta-zipper.  
*Nature* 423, S. 177-181
- Scott, CC; Dobson, W; Botelho, RJ; Coady-Osberg, N; Chavrier, P; Knecht, DA; Heath, C; Stahl, P und Grinstein, S. (2005):** Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis directs actin remodeling during phagocytosis.  
*J. Cell Biol.* 169, S. 139-149

- Sechler, JL und Schwarzbauer, JE. (1998):** Control of cell cycle progression by fibronectin matrix architecture.  
*J. Biol. Chem.* 273, S. 25533-25536
- Sever, S. (2002):** Dynamin and endocytosis.  
*Curr. Opin. Cell Biol.* 14, S. 463-467
- Sever, S; Damke, H und Schmid, SL. (2000):** Garrotes, springs, ratchets, and whips: putting dynamin models to the test.  
*Traffic.* 1, S. 385-392
- Sieg, DJ; Hauck, CR und Schlaepfer, DD. (1999):** Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration.  
*J. Cell Sci.* 112, S. 2677-2691
- Sieling, PA und Modlin, RL. (2002):** Toll-like receptors: mammalian "taste receptors" for a smorgasbord of microbial invaders.  
*Curr. Opin. Microbiol.* 5, S. 70-75
- Signas, C; Raucci, G; Jonsson, K; Lindgren, PE; Anantharamaiah, GM; Höök, M und Lindberg, M. (1989):** Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*: use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, S. 699-703
- Sinha, B; Francois, P; Que, YA; Hussain, M; Heilmann, C; Moreillon, P; Lew, D; Krause, KH; Peters, G und Herrmann, M. (2000):** Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells.  
*Infect. Immun.* 68, S. 6871-6878
- Sinha, B; Francois, PP; Nusse, O; Foti, M; Hartford, OM; Vaudaux, P; Foster, TJ; Lew, DP; Herrmann, M und Krause, KH. (1999):** Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1.  
*Cell. Microbiol.* 1, S. 101-117
- Somsel, RJ und Wandinger-Ness, A. (2000):** Rab GTPases coordinate endocytosis.  
*J. Cell Sci.* 113, S. 183-192
- Sottile, J und Chandler, J. (2005):** Fibronectin matrix turnover occurs through a caveolin-1-dependent process.  
*Mol. Biol. Cell* 16, S. 757-768
- Sottile, J und Mosher, DF. (1997):** N-terminal type I modules required for fibronectin binding to fibroblasts and to fibronectin's III1 module.  
*Biochem. J.* 323 ( Pt 1), S. 51-60
- Sottile, J; Schwarzbauer, J; Selegue, J und Mosher, DF. (1991):** Five type I modules of fibronectin form a functional unit that binds to fibroblasts and *Staphylococcus aureus*.  
*J. Biol. Chem.* 266, S. 12840-12843

- Stahl, PD und Ezekowitz, RA. (1998):** The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense.  
*Curr. Opin. Immunol. 10, S. 50-55*
- Steele-Mortimer, O; Knodler, LA und Finlay, BB. (2000):** Poisons, ruffles and rockets: bacterial pathogens and the host cell cytoskeleton.  
*Traffic 1, S. 107-118*
- Stefani, S und Varaldo, PE. (2003):** Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe.  
*Clin. Microbiol. Infect. 9, S. 1179-1186*
- Stevens, JM; Galyov, EE und Stevens, MP. (2006):** Actin-dependent movement of bacterial pathogens.  
*Nat. Rev. Microbiol. 4, S. 91-101*
- Svitkina, TM; Verkhovsky, AB; McQuade, KM und Borisy, GG. (1997):** Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation.  
*J. Cell Biol. 139, S. 397-415*
- Tapper, H. (1996):** The secretion of preformed granules by macrophages and neutrophils.  
*J. Leukoc. Biol. 59, S. 613-622*
- Taunton, J. (2001):** Actin filament nucleation by endosomes, lysosomes and secretory vesicles.  
*Curr. Opin. Cell Biol. 13, S. 85-91*
- Thakker, M; Park, JS; Carey, V und Lee, JC. (1998):** *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model.  
*Infect. Immun. 66, S. 5183-5189*
- Thilo, L; Stroud, E und Haylett, T. (1995):** Maturation of early endosomes and vesicular traffic to lysosomes in relation to membrane recycling.  
*J. Cell Sci. 108 ( Pt 4), S. 1791-1803*
- Thomsen, P; Roepstorff, K; Stahlhut, M und van Deurs, B. (2002):** Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking.  
*Mol. Biol. Cell 13, S. 238-250*
- Tjelle, TE; Lovdal, T und Berg, T. (2000):** Phagosome dynamics and function.  
*Bioessays 22, S. 255-263*
- Tuijnman, WB; Capel, PJ und van de Winkel, JG. (1992):** Human low-affinity IgG receptor Fc gamma RIIa (CD32) introduced into mouse fibroblasts mediates phagocytosis of sensitized erythrocytes.  
*Blood 79, S. 1651-1656*

- Ugarova, TP; Ljubimov, AV; Deng, L und Plow, EF. (1996):** Proteolysis regulates exposure of the IIICS-1 adhesive sequence in plasma fibronectin.  
*Biochemistry* 35, S. 10913-10921
- Vieira, OV; Botelho, RJ und Grinstein, S. (2002):** Phagosome maturation: aging gracefully.  
*Biochem. J.* 366, S. 689-704
- Vijaranakul, U; Nadakavukaren, MJ; Bayles, DO; Wilkinson, BJ und Jayaswal, RK. (1997):** Characterization of an NaCl-sensitive *Staphylococcus aureus* mutant and rescue of the NaCl-sensitive phenotype by glycine betaine but not by other compatible solutes.  
*Appl. Environ. Microbiol.* 63, S. 1889-1897
- Volberg, T; Romer, L; Zamir, E und Geiger, B. (2001):** pp60(c-src) and related tyrosine kinases: a role in the assembly and reorganization of matrix adhesions.  
*J. Cell Sci.* 114, S. 2279-2289
- von Eiff, C; Becker, K; Machka, K; Stammer, H und Peters, G. (2001):** Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group.  
*N. Engl. J. Med.* 344, S. 11-16
- Voyta, JC; Via, DP; Butterfield, CE und Zetter, BR. (1984):** Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein.  
*J. Cell Biol.* 99, S. 2034-2040
- Watarai, M; Derre, I; Kirby, J; Growney, JD; Dietrich, WF und Isberg, RR. (2001):** Legionella pneumophila is internalized by a macropinocytotic uptake pathway controlled by the Dot/Icm system and the mouse Lgn1 locus.  
*J. Exp. Med.* 194, S. 1081-1096
- Watts, C. (1997):** Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules.  
*Annu. Rev. Immunol.* 15, S. 821-850
- Weaver, AM; Karginov, AV; Kinley, AW; Weed, SA; Li, Y; Parsons, JT und Cooper, JA. (2001):** Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation.  
*Curr. Biol.* 11, S. 370-374
- Weibel, ER und Palade, GE. (1964):** New cytoplasmic components in arterial endothelia.  
*J. Cell Biol.* 23, S. 101-112
- Weidenmaier, C; Kokai-Kun, JF; Kristian, SA; Chanturiya, T; Kalbacher, H; Gross, M; Nicholson, G; Neumeister, B; Mond, JJ und Peschel, A. (2004):** Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections.  
*Nat. Med.* 10, S. 243-245
- Welch, MD und Mullins, RD. (2002):** Cellular control of actin nucleation.  
*Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, S. 247-288

- Welch, MD; Rosenblatt, J; Skoble, J; Portnoy, DA und Mitchison, TJ. (1998):** Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation.  
*Science* 281, S. 105-108
- Wiedemann, A; Linder, S; Grassl, G; Albert, M; Autenrieth, I und Aepfelbacher, M. (2001):** *Yersinia enterocolitica* invasin triggers phagocytosis via beta1 integrins, CDC42Hs and WASp in macrophages.  
*Cell. Microbiol.* 3, S. 693-702
- Williams, EC; Janmey, PA; Ferry, JD und Mosher, DF. (1982):** Conformational states of fibronectin. Effects of pH, ionic strength, and collagen binding.  
*J. Biol. Chem.* 257, S. 14973-14978
- Zaidel-Bar, R; Ballestrem, C; Kam, Z und Geiger, B. (2003):** Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells.  
*J. Cell Sci.* 116, S. 4605-4613
- Zaidel-Bar, R; Cohen, M; Addadi, L und Geiger, B. (2004):** Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes.  
*Biochem. Soc. Trans.* 32, S. 416-420
- Zamir, E; Katz, BZ; Aota, S; Yamada, KM; Geiger, B und Kam, Z. (1999):** Molecular diversity of cell-matrix adhesions.  
*J. Cell Sci.* 112 ( Pt 11), S. 1655-1669
- Zamir, E; Katz, M; Posen, Y; Erez, N; Yamada, KM; Katz, BZ; Lin, S; Lin, DC; Bershadsky, A; Kam, Z und Geiger, B. (2000):** Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts.  
*Nat. Cell Biol.* 2, S. 191-196

## 7. Abkürzungsverzeichnis und Einheiten

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
BFF	„ <i>basic fibroblast factor</i> “
BSA	Bovines Serum-Albumin
CaE	Clathrin-abhängige Endozytose
CCV	„ <i>clathrin coated vesicle</i> “
Cm	Chloramphenicol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECGS/H	„ <i>endothelial cell growth supplement</i> “/Heparin
EGF	„ <i>epidermal growth factor</i> “
Em	Erythromycin
EZM	Extrazelluläre Matrix
FA	Fokale Adhäsionen
FAK	„ <i>focal adhesion kinase</i> “
FnBPA/B	„ <i>fibronectin-binding protein A and B</i> “
FKS	fötales Kälberserum
Fn	Fibronektin
GFP	„ <i>green fluorescent protein</i> “
GTP	Guanosin-Triphosphat
GDP	Guanosin-Diphosphat
HRP	„ <i>horseradish peroxidase</i> “
HUVEC	„ <i>human umbilical vein endothelial cells</i> “
Kan	Kanamycin
Kb	Kilobasen
kDa	kilo Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
LTS	Lipoteichonsäure
Mb	Megabasen
MLCK	„ <i>myosin light chain kinase</i> “
MSCRAMM	„ <i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i> “
mRFP	„ <i>monomeric red fluorescent protein</i> “
PAMP	„ <i>pathogen-associated molecular pattern</i> “

---

PBS	„ <i>phosphate buffered saline</i> “
pFAK	phosphorylierte „ <i>focal adhesion kinase</i> “
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PRR	„ <i>pattern recognition receptor</i> “
PVDF	Polyvinylidendifluorid
r.E.	relative Einheiten
RE	Restriktionsenzym
ROI	„ <i>region of interest</i> “
RT	Raumtemperatur
SAP	„ <i>shrimp alkaline phosphatase</i> “
SDS	Natriumdodecylsulfat („ <i>sodiumdodecylsulfat</i> “)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH2	„ <i>src homologie 2</i> “ (Domäne)
TBS	„ <i>tris-buffered saline</i> “
TEMED	N, N, N', N' –Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
vWF	von Willebrand-Faktor

## 8. Anhang

### 8.1. Filme auf der Video-CD

Die Filme wurden in im „.mov-Format“ gespeichert und können mit dem Quicktime Player (<http://www.apple.com/de/quicktime/download/win.html>) angeschaut werden.

**Film-1:** Zentripetaler Transport einer *FnBPA-S. carnosus*-Traube auf der Oberfläche einer Endothelzelle. Der Zellausschnitt wurde im Phasenkontrast aufgenommen.

Belichtungszeit: 300 ms

Bildfrequenz: 15 Bilder/s

Sequenzlänge: 2232 s

**Film-2:** Zentripetaler Transport *FnBPA*-beschichteten Kügelchen auf einer Endothelzelle. Die farbigen Linien markieren den zurückgelegten Weg ausgewählter Kügelchen. Die Zelle wurde im Phasenkontrast aufgenommen.

Belichtungszeit: 400 ms

Bildfrequenz: 6 Bilder/s

Sequenzlänge: 3156 s

**Film-3:** Blockierung des zentripetalen Transportes *FnBPA*-beschichteter Kügelchen auf der Oberfläche einer GFP-Tensin-AH2 exprimierenden Zelle. Die farbigen Linien markieren den zurückgelegten Weg ausgewählter Kügelchen. Die Zelle wurde im Phasenkontrast aufgenommen.

Belichtungszeit: 400 ms

Bildfrequenz: 6 Bilder/s

Sequenzlänge: 2223 s

**Film-4:** Multiple Aktinakkumulationen an einer *FnBPA-S. carnosus*-Traube während des zentripetalen Transportes auf der Zelloberfläche. Es ist die gleiche Zelle und Ausschnitt wie in Film-1. Der Film zeigt konfokale Fluoreszenzaufnahmen der GFP-Aktin exprimierenden Zelle. Die Bakterien sind als „Ausparungen“ zu erkennen.

Belichtungszeit (488 nm): 1000 ms

Bildfrequenz: 15 Bilder/s

Sequenzlänge: 2341 s

**Film-5:** Vergrößerter Ausschnitt aus Film-4. Zu erkennen ist eine im GFP-Kanal aufgenommene Aktinakkumulation, die sich wellenförmig über eine *FnBPA-S. carnosus*-Traube bewegt.

Belichtungszeit (488 nm): 1000 ms

Bildfrequenz: 3 Bilder/s

Sequenzlänge: 218 s

**Film-6:** Schnelle Bewegung einer *FnBPA-S. carnosus*-Traube auf einer Endothelzelle. Der Phasenkontrast-Film zeigt einen Zellausschnitt.

Belichtungszeit: 500 ms

Bildfrequenz: 10 Bilder/s

Sequenzlänge: 362 s

**Film-7:** Es wird die gleiche Zelle und der gleiche Ausschnitt wie in Film-6 gezeigt. Der Film zeigt konfokale Aufnahmen der GFP-Aktin exprimierenden Zelle, auf denen zu erkennen ist, dass die *FnBPA-S. carnosus*-Traube (erkennbar durch die schwarzen Aussparungen) durch einen Aktinschweif bewegt wird.

Belichtungszeit (488 nm): 1000 ms

Bildfrequenz: 10 Bilder/s

Sequenzlänge: 362 s

**Film-8:** 3D-Rekonstruktion eines Z-Stapels, aufgenommen von einem fixierten Endothelzellpräparat, in dem die Zellen mit einem für GFP-Aktin kodierenden Konstrukt (grün) transfiziert und mit *FnBPA-S. aureus* infiziert wurden. Die extrazellulären Bakterien wurden selektiv angefärbt (rot). Der Film zeigt verschiedene Perspektiven des Präparates, sowie eine selektive Ausblendung des roten Fluoreszenzkanals, um die Lokalisation/Assoziation von Aktin und den Bakterien zu verdeutlichen.

**Film-9:** Rekrutierung des Aktin-regulierenden Arp2/3-Komplexes an einen Bakterien-assoziierten Aktinschweif. Zu sehen ist ein einzelnes *FnBPA-S. carnosus*-Bakterium, das durch einen GFP-Arp3 induzierten mRFP-Aktinschweif in Richtung des Zellrandes geschoben wird. Die Zellen wurden mit einem für GFP-Arp3 (grün) und einem für mRFP-Aktin kodierenden Konstrukt (rot) ko-transfiziert und konfokal videomikroskopiert. Der Film zeigt die Überlagerung beider Fluoreszenzen.

Belichtungszeit (488 nm): 1000 ms

(568 nm): 1000 ms

Bildfrequenz: 5 Bilder/s

Sequenzlänge: 395 s

**Film-10:** GFP-Tensin und mRFP-Aktin kolokalisieren an einer auf einer Endothelzelle adhätierenden *FnBPA-S. carnosus*-Tetrade. Der Film zeigt konfokale Fluoreszenzaufnahmen beider Fluoreszenzen als Überlagerung.

Belichtungszeit (488 nm): 1000 ms

(568 nm): 1000 ms

Bildfrequenz: 15 Bilder/s

Sequenzlänge: 698 s

**Film-11:** GFP-Rab5 und mRFP-Aktin akkumulieren wechselseitig an einer auf einer Endothelzelle adhätierenden *FnBPA-S. carnosus* Tetrade. Der Film zeigt konfokale Fluoreszenzaufnahmen beider Fluoreszenzen als Überlagerung.

Belichtungszeit (488 nm): 1000 ms

(568 nm): 2000 ms

Bildfrequenz: 12 Bilder/s

Sequenzlänge: 1522 s

## 9. Danksagung

Bei allen, die mich auf verschiedenste Weise unterstützt haben und zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich sehr herzlich bedanken, insbesondere bei nachfolgend genannten Personen:

Ich möchte Herrn Professor Dr. Dr. Jürgen Heesemann für die Aufnahme in sein Institut danken und für die Bereitstellung des hervorragend ausgestatteten Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. Heinrich Leonhardt danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit vor der Fakultät zu vertreten und für die damit verbundene Zeit und Mühe, die er freundlicherweise zu investieren bereit war.

Für die Erstellung des Zweitgutachtens möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Schleicher bedanken.

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. Stefan Linder bedanke ich mich für die sehr gute Kooperation und die wertvollen Anregungen, die mir stets eine sehr große Hilfe waren.

Den „Gartenpavilloniern“ Vanessa van Vliet, Barbara Böhlig, Herrn Dr. Christian Johannes und Frau Dr. Petra Kopp danke ich sehr für die permanente Unterstützung in geburtenarmen Perioden, Eiskaffee im Sommer, neuen und interessanten Erkenntnissen über die Porifera und die Erweiterung meines musikalischen Repertoires – ich bin jazzed viel entspannter. Frau Dr. Petra Kopp danke ich besonders für die sehr guten Korrekturen an dieser Arbeit.

Besonders angenehmes und lehrreiches Arbeiten im Büro wurde durch die Dres. Lorenz Leitritz und Volker Fingerle ermöglicht, die mir *en passant* die Bedeutung der DRGs bewusst gemacht haben und – in zahllosen Telefonaten, deren Zeuge ich sein durfte – die Unterschiede zwischen der allgemein benigne verlaufenden Borrelien-Infektion und der meist letal endenden Internet-Borreliose verdeutlicht haben.

Herrn Gerhardt Zenner danke ich herzlich für das außerordentlich gute Arbeitsklima und den freundschaftlichen Kontakt, den er auch noch zwischen Hamburg und München aufrecht erhalten hat.

Meinen Laborkollegen aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Klaus Ruckdeschel, Frau Gudrun Pfaffinger, Frau Dr. Kathleen Richter und Herrn Dr. Rudi Haase, sowie Herrn Dr. Andreas Andor, Herrn Raphael Kland und Frau Sabrina Schubert danke ich sehr für die gute Zusammenarbeit und das freundschaftliche Verhältnis im Labor. Herrn Dr. Rudi Haase danke ich darüber hinaus für viele wertvolle Diskussionen und für die Freundschaft, die sich im Laufe der Zeit entwickelt hat.

Frau Claudia Trasak danke ich für die perfekte Organisation des Labors und ein offenes Ohr in schwierigen Lebenslagen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn Prof. Dr. Martin Aepfelbacher für motivierende Diskussionen und die von ihm dabei gezeigte Geduld, für die Anleitung zu wissenschaftlichem Arbeiten und nicht zuletzt auch dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, zu promovieren.

Ohne meine Frau Barbara, ihrer bedingungslosen Liebe, ihrem unendlichen Vertrauen und der moralischen Unterstützung hätte ich all das nicht geschafft.

## 10. Lebenslauf

<b>Name</b>	Andreas Sönke Schröder
<b>Geburtsdatum</b>	6. September 1971
<b>Geburtsort</b>	Duisburg
<b>Familienstand</b>	verheiratet
<b>Schulbildung</b>	
1978 - 1982	Grundschule Hochfelder Markt, Duisburg
1982 - 1991	Steinbart-Gymnasium, Duisburg Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
<b>Zivildienst</b>	
1991 - 1992	Mobiler sozialer Hilfsdienst (MSHD) Bürgerhilfe e.V., Duisburg
<b>Studium</b>	
1992 - 1998	Studium der Biologie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Hauptfach Zoologie, Nebenfächer Biochemie und Physik. Gesamtnote: Sehr gut  Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H. G. Bender am Molekulargenetischen Institut der Frauenklinik, Heinrich Heine Universität Düsseldorf. Thema: Molekulargenetische Analyse der Tumorsuppressorgene BRCA1 und ATM in Mamma- und Ovarialkarzinomen. Gesamtnote: Sehr gut
<b>Wissenschaftliche Mitarbeit</b>	
1999-2002	Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten
<b>Promotion</b>	
2002 - 2006	Doktorarbeit am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. M. Aepfelbacher und Betreuung durch Prof. Dr. rer. nat. H. Leonhardt mit dem Thema: „Dynamik adhäsiver und zytoskelettaler Prozesse bei der Interaktion von <i>Staphylococcus aureus</i> mit lebenden Endothelzellen“

## 11. Publikationsliste

- Neuzil, J; Schroder, A; von Hundelshausen, P; Zerneck, A; Weber, T; Gellert, N und Weber, C. (2001):** Inhibition of inflammatory endothelial responses by a pathway involving caspase activation and p65 cleavage.  
*Biochemistry* 40, S. 4686-4692
- Neuzil, J; Weber, T; Schroder, A; Lu, M; Ostermann, G; Gellert, N; Mayne, GC; Olejnicka, B; Negre-Salvayre, A; Sticha, M; Coffey, RJ und Weber, C. (2001):** Induction of cancer cell apoptosis by alpha-tocopheryl succinate: molecular pathways and structural requirements.  
*FASEB J.* 15, S. 403-415
- Ostermann, G; Weber, KS; Zerneck, A; Schroder, A und Weber, C. (2002):** JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes.  
*Nat. Immunol.* 3, S. 151-158
- Schroder, A; Kland, R; Peschel, A; von Eiff, C und Aepfelbacher, M. (2006):** Live cell imaging of phagosome maturation in *Staphylococcus aureus* infected human endothelial cells: small colony variants are able to survive in lysosomes.  
*Med Microbiol Immunol. (Berl)*
- Weber, KS; Ostermann, G; Zerneck, A; Schroder, A; Klickstein, LB und Weber, C. (2001):** Dual role of H-Ras in regulation of lymphocyte function antigen-1 activity by stromal cell-derived factor-1alpha: implications for leukocyte transmigration.  
*Mol. Biol. Cell* 12, S. 3074-3086
- Weber, T; Lu, M; Andera, L; Lahm, H; Gellert, N; Fariss, MW; Korinek, V; Sattler, W; Ucker, DS; Terman, A; Schroder, A; Erl, W; Brunk, UT; Coffey, RJ; Weber, C und Neuzil, J. (2002):** Vitamin E succinate is a potent novel antineoplastic agent with high selectivity and cooperativity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Apo2 ligand) in vivo.  
*Clin. Cancer Res.* 8, S. 863-869