

Aus dem Bereich  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
Fachrichtung Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Untersuchungen zur Wirkung des extrazellulären  
Adhäsionsproteins (Eap) von *Staphylococcus aureus* auf die  
Wundheilung und Internalisierung in Hautzellen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes  
2014

vorgelegt von  
Dipl.-Biol. Stephanie Bur  
geb. am: 02.05.1982 in Saarbrücken



Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2008 bis November 2012 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Mathias Herrmann im Fachbereich medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität des Saarlandes, Standort Uniklinik Homburg, angefertigt.

*Für meine Familie*

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb	Abbildung
ad	<i>adde</i> (hinzufügen, auffüllen bis)
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> (Bicinchoninsäure)
BI	Bandenintensität
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CFU	<i>colony forming unit</i> (Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten)
cm	Zentimeter
Cm, Cm <sup>R</sup>	Chloramphenicol, Chloramphenicol-resistent
Ct-Wert	<i>cycle threshold</i> (Schwellenwert-Zyklus)
d	Tag (e)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
Eap	<i>extracellular adhesion protein</i> (extrazelluläres Adhärenzprotein)
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> (verbesserte Chemilumineszenz)
ECM	extrazelluläre Matrix
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Erm, Erm <sup>R</sup>	Erythromycin, Erythromycin-resistent
<i>et al.</i>	<i>et al.ii</i> (und andere)
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoreszinoisothiocyanat
Fn	Fibronektin

FnBPAB	<i>fibronectin-binding protein A, B</i> (Fibronektin-bindendes Protein A,B)
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i> (Flüssigchromatographie für Proteine)
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grünes Fluoreszenzprotein)
Gm, Gm <sup>S</sup>	Gentamycin, Gentamycin-sensitiv
h	<i>hour</i> (Stunde)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
K	Kontrolle
KGF	<i>Keratinocyte growth factor</i> (Keratinozyten Wachstumsfaktor)
l	Liter
LAL	<i>Limulus Amebocyte Lysate</i> (Limulus Amöbozyten Lysat)
LB	Luria Bertani-Broth
LD	<i>loading dye</i> (Ladepuffer)
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	<i>lipoteichoic acid</i> (Lipoteichonsäure)
M	Mol pro Liter
mg	Milligramm
MH	Müller-Hinton
min	Minute
mk-IgG	monoklonaler Antikörper des Isotyps IgG
mM	Millimol pro Liter
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	<i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
nptase	neutrale Phosphatase
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol

PFGE	“ <i>pulsed field</i> ” Gelelektrophorese
pk-IgG	polyklonaler Antikörper des Isotyps IgG
PTK	Phosphotyrosinkinasen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S.	<i>Staphylococcus</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
sae	SA exoprotein expression
SCV	<i>small colony variant</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> (Natriumdodecylphosphat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
<i>S. epi</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SERAM	<i>secretable expanded repertoire adhesive molecule</i>
SigB, $\sigma^B$	Sigma factor B (Sigmafaktor B)
<i>S. lug</i>	<i>Staphylococcus lugdenensis</i>
srtA	<i>transpeptidase sortase A</i> (Transpeptidase Sortase A)
T	Tween 20
TA	<i>teichoic acid</i> (Teichonsäure)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i> (Tris gepufferte Kochsalzlösung)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSB	<i>tryptic soy broth</i> (Trypton-Soja-Medium)
U	Unit
u. N.	unterhalb der Nachweisgrenze
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
wt	Wildtyp
WTA	<i>wall teichoic acid</i> (Zellwand-verankerte Teichonsäuren)
YXNX	Tyrosin-X-Asparagin-X Motiv
z.B.	zum Beispiel

# INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung .....	1
Summary .....	2
1. Einleitung	
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	3
1.1.1 Infektionen mit <i>Staphylococcus aureus</i> .....	4
1.1.2 Virulenzfaktoren von <i>Staphylococcus aureus</i> .....	6
1.2 Eap (extrazelluläres Adhärenzprotein) .....	8
1.2.1 Aufbau .....	9
1.2.2 Funktionen .....	10
1.2.2.1 Eap als Adhäsionsprotein .....	10
1.2.2.2 Eap als Virulenzfaktor .....	10
1.3 Internalisierung von Staphylokokken .....	13
1.3.1 Bedeutung der Internalisierung .....	13
1.3.2 Mechanismus der Internalisierung .....	14
1.3.3 Eap und Internalisierung .....	18
1.4 Wundheilung .....	19
1.4.1 Vorkommen von <i>S. aureus</i> und Eap in Wunden .....	19
1.4.2 Ablauf der Wundheilung .....	20
1.4.3 Inhibierung der Wundheilung durch Eap .....	24
2. Zielstellung .....	25
3. Material und Methoden	
3.1 Material .....	27
3.1.1 Bakterien .....	27
3.1.1.1 Verwendete Staphylokokken-Stämme .....	27
3.1.1.2 Verwendete Wundisolate .....	27
3.1.2 Zelllinien .....	28
3.1.3 Nährmedien für Bakterien und Zellkultur .....	28
3.1.3.1 Nährmedien für Bakterien .....	28
3.1.3.2 Nährmedien für eukaryotische Zellen .....	29
3.1.4 Antikörper .....	29
3.1.5 Enzyme, Wachstumsfaktoren, Inhibitoren und Aktivatoren .....	30
3.1.6 Lösungen und Puffer .....	30

3.1.6.1 Lösungen und Puffer für die Molekularbiologie.....	30
3.1.6.2 Lösungen und Puffer für SDS-PAGE und Western-Blot- Analysen .....	31
3.1.6.3 Lösungen und Puffer für eukaryotische Zellen .....	31
3.1.7 Chemikalien.....	32
3.1.8 Kits .....	33
3.1.9 Laborgeräte .....	33
3.1.10 Verbrauchsmaterialien.....	34
3.2 Methoden.....	35
3.2.1 Zellbiologische Methoden.....	35
3.2.1.1 Kultur von Bakterien .....	35
3.2.1.1.1 Stammhaltung .....	35
3.2.1.2 Kultur von eukaryotischen Zellen.....	35
3.2.1.2.1 Subkultivierung .....	35
3.2.1.2.2 Einfrieren und Auftauen.....	36
3.2.1.2.3 Bestimmung der Zellzahl .....	36
3.2.1.2.4 Test auf Mykoplasmen mit PCR .....	37
3.2.2 Herstellung und Überprüfung einer SA113 eap-Mutante.....	37
3.2.2.1 Phagentransduktion.....	37
3.2.2.2 Kontrolle der Eap-Expression durch Oberflächen- protein-Extraktion und Western-Blot-Analyse.....	38
3.2.2.3 "Pulsed field" Gelelektrophorese .....	39
3.2.3 Proteinbiochemische Methoden/Protein-Analytik .....	39
3.2.3.1 Aufreinigung von Eap aus dem <i>S. aureus</i> Stamm Newman....	39
3.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	41
3.2.3.3 Immunoblot-Analyse (Western-Blot).....	41
3.2.3.4 Ernten von Ganzzell-Lysaten.....	42
3.2.3.5 Zellfraktionierung .....	42
3.2.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA- und Bradford-Assay) .....	43
3.2.3.7 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Eap.....	43
3.2.4 Infektionsexperimente .....	44
3.2.4.1 Adhäsionsassay .....	44
3.2.4.2 Internalisierungsassay .....	44

3.2.4.2.1 Analyse der Internalisierung mit Durchflusszytometrie (Facs-Analyse) .....	45
3.2.4.2.2 Langzeitkultivierung .....	45
3.2.4.2.3 Inhibition der Internalisierung.....	45
3.2.5 Untersuchung der Eigenschaften von Keratinozyten mit Zellkultur-Assays .....	45
3.2.5.1 Proliferationsassay mit dem Click-it® Edu Flow Cytometry Assay Kit.....	45
3.2.5.2 Apoptoseassay .....	46
3.2.5.3 Migrationsassay.....	46
3.2.5.4 Untersuchung der Keratinozyten-Differenzierung.....	47
3.2.5.4.1 Untersuchung der Zelldifferenzierung durch den Nachweis von Proteinen .....	48
3.2.5.4.2 Untersuchung der Differenzierung mit quantitativer Real-time PCR .....	48
3.2.5.5 Erk-Phosphorylierung .....	51
3.2.6 Immunfluoreszenz-Färbung.....	52
3.2.6.1 von extrazellulärem Eap .....	52
3.2.6.2 von intrazellulärem Eap .....	52
3.2.6.3 von intrazellulär sekretiertem Eap .....	53
3.2.7 Statistische Auswertung .....	53
<b>4. Ergebnisse</b>	
4.1 Eap ist im Cytosol von Keratinozyten vorhanden.....	55
4.1.1 Aufnahme von extrazellulärem Eap durch Keratinozyten.....	55
4.1.2 <i>S. aureus</i> exprimiert Eap intrazellulär.....	58
4.2 Auswirkungen von Eap auf die Epithelisation während der Wundheilung .....	60
4.2.1 Inhibition der Migration durch Eap.....	60
4.2.2 Inhibition der Proliferation durch Eap .....	62
4.2.3 Förderung der Differenzierung durch Eap.....	65
4.2.4 Beeinflussung von Signalkaskaden durch Eap .....	68
4.3 Invasion von <i>S. aureus</i> in Keratinozyten.....	70
4.3.1 Charakterisierung der Internalisierung von <i>S. aureus</i> in Keratinozyten.....	70

4.3.1.1 Die Internalisierung in Keratinozyten ist abhängig von Zeit und Mol.....	70
4.3.1.2 Internalisierung und Persistenz sind von der Differenzierung der Keratinozyten abhängig.....	72
4.3.1.3 Die Internalisierung in primäre Keratinozyten ist unabhängig von Fibronektin-Bindeproteinen.....	75
4.3.1.4 Mechanismus der Internalisierung.....	77
4.3.2 Eap-Vorinkubation von Keratinozyten erhöht Adhäsion und Internalisierung.....	78
4.3.2.1 Charakterisierung des Eap-Effekts.....	78
4.3.2.2 Eap erhöht die Internalisierung verschiedener <i>S. aureus</i> Isolate und Gamma-Proteobakteria.....	80
4.3.3 Beeinflussung des Eap-Effekts.....	81
4.3.3.1 Beeinflussung des Eap-Effekts durch Mutationen bakterieller Oberflächenproteine.....	82
4.3.3.2 Beeinflussung des Eap-Effekts durch Differenzierung der Keratinozyten.....	83
4.3.3.3 Beeinflussung des Eap-Effekts durch Inhibitoren der Internalisierung.....	84
4.3.3.4 Beeinflussung des Eap-Effekts durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Eap.....	86
5. Diskussion	
5.1 Aufnahme von Eap durch Keratinozyten.....	89
5.2 Beeinflussung der Epithelisation durch Eap.....	91
5.3 Charakterisierung der Internalisierung von <i>S. aureus</i> in Keratinozyten....	96
5.4 Stimulation der bakteriellen Invasion durch Eap-Vorinkubation der Keratinozyten.....	100
5.5 Konklusion und Ausblick.....	105
Literaturverzeichnis.....	109
Publikationen/Kongressbeiträge.....	124
Danksagungen.....	134
Lebenslauf.....	135

## ZUSAMMENFASSUNG

*Staphylococcus aureus* stellt die Hauptursache oberflächlicher und tiefer Wund-Infektionen dar. Dabei scheint der multifunktionelle Virulenzfaktor „Extracellular Adherence Protein“ (Eap), welcher von allen getesteten *S. aureus*-Stämmen in authentischen Wunden vermehrt exprimiert wird, von Bedeutung zu sein. Wir zeigen, dass Eap entweder über einen unbekanntem Mechanismus von Keratinozyten aufgenommen oder direkt von internalisierten Bakterien ins Cytosol abgegeben werden kann, wodurch eine intrazelluläre Interaktion mit Keratinozyten möglich wird. Eap trägt zur Entstehung nicht-heilender, chronischer Wunden bei, indem die Inflammationsphase und Neovaskularisierung inhibiert werden. In dieser Arbeit konnte zusätzlich eine negative Beeinflussung der Epithelisation *in vitro* festgestellt werden: Proliferation und Migration von Keratinozyten wurden durch Eap gehemmt, wohingegen eine Stimulation der Differenzierung stattfand. Diese Eap-Effekte könnten aus einer intrazellulären Wechselwirkung mit der Ras/Raf/MEK/Erk1/2-Signalkaskade resultieren. Dafür spricht die beobachtete Reduktion von aktiviertem Erk1/2 nach Eap-Inkubation von Keratinozyten.

Des Weiteren wurden neue Erkenntnisse zur Aufnahme von *S. aureus* in Keratinozyten gewonnen. Diese konnte unabhängig von Fibronectin-Bindeproteinen (FnBPs) erfolgen und fand bevorzugt in proliferierenden, undifferenzierten Keratinozyten statt. Zusätzlich war die Überlebensfähigkeit in undifferenzierten Zellen höher als in Differenzierten. Aufgrund der benötigten Aktivität des Aktin-Zytoskeletts und der Tyrosinkinase, erfolgte die Invasion – wie auch in anderen eukaryotischen Zellen – vermutlich durch Rezeptor-vermittelte Endozytose.

Außerdem wurden einige neue Beobachtungen zur Rolle von Eap als Invasin gemacht: während in Keratinozyten zellwandgebundenes Eap keinen Einfluss hatte, erhöhte gelöstes Eap die Invasionsrate von *S. aureus* und anderen an polymikrobiellen Haut-Infektionen beteiligten Bakterien signifikant. Dabei scheint nicht die verstärkte bakterielle Bindung an die eukaryotische Zelloberfläche die Ursache für diesen Effekt zu sein, sondern die intrazelluläre Beeinflussung der an der Aufnahme beteiligten Prozesse, welche möglicherweise durch Phosphorylierung von Eap erfolgte. Folglich spielt sekretiertes Eap vermutlich eine bedeutende Rolle bei der Invasion von Keratinozyten und damit bei der Etablierung einer persistierend-rezidivierenden Infektion.

## SUMMARY

*Staphylococcus aureus* is the major reason for superficial and deep skin infections. Here the multifunctional virulence factor extracellular adherence protein (Eap) seems to be of importance and was found to be upregulated by all tested *S. aureus* strains in authentic wounds. We show that an intracellular interaction with keratinocytes becomes possible after either assimilation of Eap by keratinocytes via a yet unknown mechanism or via direct secretion into the cytosol by internalized bacteria.

Eap contributes to the development of non-healing, chronic wounds by inhibition of the inflammatory phase and neovascularization. In this work, an additional negative effect on the epithelialization was observed *in vitro*: proliferation and migration of keratinocytes were inhibited by Eap, whereas stimulation of differentiation by Eap took place. These Eap effects could result from an intracellular interaction with Ras/Raf/MEK/Erk1/2-signaling which was supported by the observed reduction of activated Erk1/2 after incubation of keratinocytes with Eap.

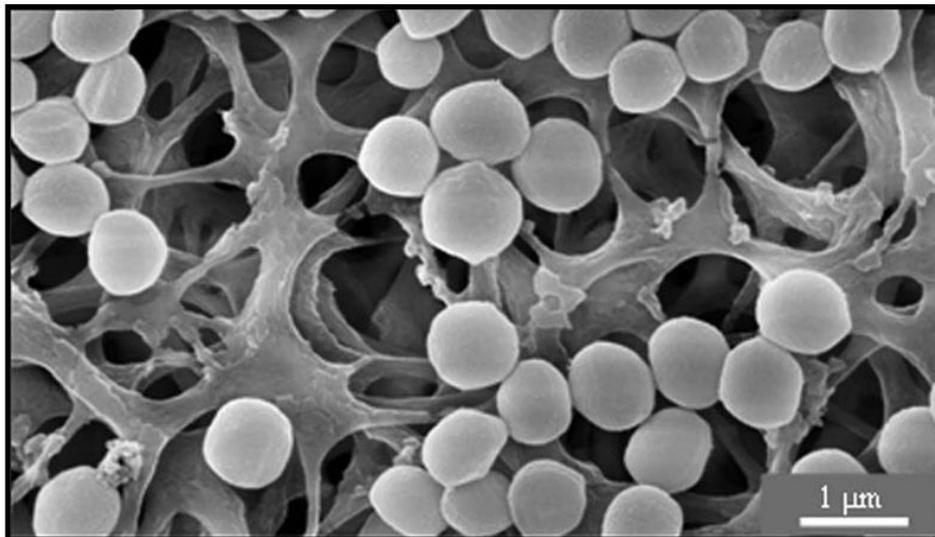
Furthermore, new insights in the invasion-mechanism of *S. aureus* into keratinocytes were provided. Uptake was independent of fibronectin-binding proteins (FnBPs) and took place preferably in proliferating, undifferentiated keratinocytes. In addition, the survival in undifferentiated keratinocytes was higher than in differentiated cells. Due to the required activity of actin cytoskeleton and tyrosine kinases, the invasion was probably conveyed by receptor-mediated endocytosis in keratinocytes. This mechanism was already shown to mediate uptake of *S. aureus* in other eukaryotic cells.

In addition, some new observations on the role of Eap as an invasin were made: while cell wall-bound Eap had no effect on keratinocytes, dissolved Eap significantly increased the invasion of *S. aureus* and other bacteria frequently found in polymicrobial skin-infections. The increased bacterial binding to the eukaryotic cell surface seemed not to be the cause of this effect, whereas intracellular uptake-processes appeared to be involved. This was possibly mediated by phosphorylation of Eap. Therefore, secreted Eap appears to be of importance for the invasion of keratinocytes and thus might contribute to the establishment of a persistent-recurrent infection.

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 *Staphylococcus aureus*

Als Rosenbach 1884 *Staphylococcus aureus* (SA) erstmals unter seinem wissenschaftlichen Namen beschrieb, war nicht abzusehen, dass dieser Mikroorganismus heute die Hauptursache oberflächlicher und tiefer Wund-Infektionen darstellen würde (Bunikowski *et al.*, 2000, Grimble *et al.*, 2001, Kalmeijer *et al.*, 2000, Madsen *et al.*, 1996). Um diese Infektionen besser behandeln zu können, ist es notwendig die beteiligten Prozesse zu verstehen. Ein Überblick über den momentanen Wissensstand wird in der Einleitung gegeben, bevor im Ergebnis- und Diskussionsteil die Rolle des extrazellulären Adhärenzproteins (Eap) näher untersucht wird.



**Abb. 1-1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *S. aureus* auf einem Membranfilter (Nachdruck aus Hartmann *et al.*, 2010).**

Das gram-positive Bakterium *S. aureus* wird nach aktuellen chemo- und molekulartaxonomischen Untersuchungen zusammen mit 38 anderen Staphylokokken-Arten der neugegründeten Familie der *Staphylococcaceae* zugeordnet. Die fakultativ anaerob wachsenden, ca. 1 µm großen, kugelförmigen Bakterien sind unbeweglich und nicht sporulierend (Abb. 1-1). Die Teilung findet in mehreren Ebenen statt, daraus resultiert die charakteristische Anordnung in

weintraubenähnlichen Haufen, neben denen auch Tetraeder, Paare oder einzelne Bakterien auftreten können. Aufgrund dieser Eigenschaft und der goldgelben Pigmentierung ihrer Kolonien, ergab sich der wissenschaftliche Name (staphyle [griech.]: Traube; kokkos [griech.]: Korn; aureus [lat.]: golden) (Brenner *et al.*, 2005, Vos *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu Streptokokken bilden Staphylokokken Katalase, welche zu deren Nachweis genutzt werden kann. Anhand der Koagulase-Reaktion, bei der getestet wird, ob die Gerinnung von Fibrinogen induziert wird, kann des Weiteren zwischen Koagulase-positiven und Koagulase-negativen Staphylokokken unterschieden werden. *Staphylococcus aureus* ist mit seiner großen pathogenetischen Vielseitigkeit der einzige klinisch relevante Vertreter der ersten Gruppe, wohingegen Vertreter der zweiten Gruppe – wie *S. epidermidis* und *S. lugdenensis* – weniger virulent sind (Lowy, 1998).

### 1.1.1 Infektionen mit *S. aureus*

*S. aureus* ist eine der Hauptursachen für nosokomiale (HA, hospital-acquired) Infektionen und in der Bevölkerung erworbene (CA, community-acquired) Bakteriämien (Diekema *et al.*, 2001). Dabei reicht das breite Spektrum der Krankheitsbilder von lokalen Wundinfektionen, Furunkeln, Pyodermien, tiefen, oft abszedierenden Weichteilprozessen bis hin zu lebensbedrohlichen Infektionen wie Osteomyelitis, Pneumonien, Endokarditis oder Sepsis (Lowy, 1998). Neben solchen pyogenen Infektionen können toxinvermittelte Syndrome wie beispielsweise das Toxic-Shock-Syndrom (Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1) oder das Staphylococcal Scalded Skin Syndrom (Exfoliativtoxine) (Lowy, 1998) auftreten. Aber auch Staphylokokken-Lebensmittelintoxikationen, die weltweit eine der häufigsten Ursachen lebensmittelbedingter Erkrankungen darstellen, können durch mit Enterotoxinen kontaminierte Nahrung verursacht werden (Le Loir *et al.*, 2003).

Trotzdem ist die Haut bzw. Schleimhaut von 27 Prozent der gesunden Bevölkerung ständig und von 20 Prozent vorübergehend mit *S. aureus* kolonisiert, was in der Regel unbemerkt bleibt (Wertheim *et al.*, 2005). Dabei wird – bis auf wenige Ausnahmen – der Nasenvorhof besiedelt (Kluytmans *et al.*, 1997). Daneben kann das Bakterium vor allem im Pharynx, in der Vagina und auf der Haut von Achseln, Perineum, Händen und Unterarmen nachgewiesen werden (Lowy, 1998, Wertheim *et al.*, 2005).

Eine Reihe von Studien zeigt, dass die nasale Besiedlung mit *S. aureus* ein erhöhtes Risiko für eine nachfolgende Staphylokokken-Infektion darstellt (Desai *et al.*, 2003, Kalmeijer *et al.*, 2000, Kluytmans *et al.*, 1995, Safdar und Bradley, 2008, Wertheim *et al.*, 2005). 2001 wiesen von Eiff *et al.* (von Eiff *et al.*, 2001) in einer multizentrischen Studie erstmals systematisch und mit modernen molekularen Methoden nach, dass mindestens 50 Prozent aller Patienten mit einer *S. aureus*-Bakteriämie zuvor mit einem klonal identischen Stamm im Nasenvorhof besiedelt waren. Neben diesen endogenen Infektionen, spielen – vor allem beim nichtkolonisierten Teil der Bevölkerung – exogene Infektionswege eine Rolle. Keime können durch Pflegepersonal oder Ärzte von einer Person auf andere übertragen werden. Patienten in Krankenhäusern besitzen zudem ein erhöhtes Risiko für beide Infektionswege, da ihr Immunsystem meist geschwächt ist und Einschränkungen der Immunabwehr die Invasion und Ausbreitung des Erregers begünstigen. Zudem wird das Eindringen von *S. aureus* in den Wirt durch geschädigte Haut, welche z.B. bei einer postoperativen Wunde vorhanden ist, oder durch Fremdkörperinfektionen erleichtert (Luzar *et al.*, 1990). Anschließend kann *S. aureus* im Wirt eine lokal-oberflächliche, eine tief-invasive oder eine systemische Infektion hervorrufen (Lowy, 1998).

Ein immer größer werdendes Problem stellt das kontinuierliche und zunehmende Auftreten von Antibiotika-Resistenzen dar. In den letzten Dekaden entwickelte *S. aureus* vermehrt resistente Stämme, wie die erstmals Mitte der 1940er Jahre beschriebenen Penicillin-resistenten Stämme (Barber und Rozwadowska-Dowzenko, 1948) oder die ab 1961 beschriebenen Methicillin- bzw. Oxacillin-resistenten Stämme (MRSA bzw. ORSA) (Jevons *et al.*, 1963). Das Ausmaß dieser Problematik wird daran deutlich, dass in den USA MRSA-Stämme für 59 % (MSSA 16 %) aller Haut- und Weichgewebsinfektionen verantwortlich sind (Talan *et al.*, 2011), und, dass invasive MRSA-Infektionen eine hohe Mortalitätsrate aufweisen (Klevens *et al.*, 2007).

Folglich bleibt *S. aureus* mit seiner pathogenetischen Vielseitigkeit trotz einer Reihe sehr wirksamer Medikamente einer der wichtigsten und vielseitigsten Erreger in der klinischen Medizin (Lowy, 1998).

### 1.1.2 Virulenzfaktoren von *S. aureus*

Die Pathogenität von *S. aureus* wird durch die Expression eines großen Arsenal verschiedenster Virulenzfaktoren hervorgerufen. Diese sind entweder an die Bakterienoberfläche gebunden oder werden sekretiert. Zu den vielfältigen Funktionen dieser Proteine zählen beispielsweise Schutz vor dem Immunsystem, Adhäsion an Wirtsgewebe, Invasion in Wirtszellen, oder Akquirierung bestimmter Wirtsfaktoren als Nahrungsquelle (Hecker *et al.*, 2010). Die Polysaccharid-Kapsel wirkt beispielsweise anti-phagozytotisch. Zytolytische Toxine und Gewebe auflösende Enzyme werden sekretiert, wodurch unter anderem Nährstoffe freigesetzt werden. Interaktionen mit Wirtszellen und der extrazellulären Matrix werden von zahlreichen Adhäsionsproteinen vermittelt, wobei an Peptidoglykan der bakteriellen Oberfläche gebundene Adhäsionsproteine (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules, MSCRAMMs) von den sekretierten Adhäsionsproteinen (secretable expanded repertoire adhesive molecules, SERAMs) unterschieden werden. Eap gehört zur Gruppe der Letzteren und wird im Kapitel 1.2 ausführlich beschrieben. Mehrere Virulenzfaktoren beeinflussen des Weiteren die Immunantwort. Beispielsweise werden sowohl antimikrobielle Peptide, als auch das Komplementsystem und die Rekrutierung bzw. Aktivierung von Phagozyten inhibiert, wohingegen Superantigene die Freisetzung von pro-inflammatorischen Cytokinen verursachen können (Chavakis *et al.*, 2007). Die einzelnen Virulenzfaktoren wurden von Chavakis und Kollegen ausführlich beschrieben (Chavakis *et al.*, 2007). Eine Übersicht der verschiedenen Gruppen mit einzelnen Vertretern ist in Tabelle 1-1 dargestellt.

Virulenz-faktor	Abk.	Funktion	Auswirkungen	Referenz
<i>extrazelluläre Enzyme</i>				
Katalase	CatA	inaktiviert freies Wasserstoffperoxid	an Survival, Persistenz und nasaler Kolonisation beteiligt	(Cosgrove <i>et al.</i> , 2007)
Thioredoxin	--	inaktiviert ROS	ermöglicht intrazelluläres Überleben nach Phagozytose	(Roos <i>et al.</i> , 2007)
O-Acetyl-transferase	OatA	O-Acetylierung von Peptidoglykan	Resistenz gegen Lysozym	(Bera <i>et al.</i> , 2005)
Staphylokinase	Sak	aktiviert Plasminogen	anti-Defensin, spaltet Komplement-Faktoren	(Jin <i>et al.</i> , 2004)

Virulenz-faktor	Abk.	Funktion	Auswirkungen	Referenz
<i>Toxine</i>				
$\alpha$ -Toxin	Hla	bildet Poren in Erythrozyten und Monozyten	cytotoxisch für Erythrozyten und Monozyten	(Fournier und Philpott, 2005)
$\beta$ -Hämolyysin	Hlb	lysiert Leukozyten durch Porenbildung	cytotoxisch für Leukozyten	(Dinges <i>et al.</i> , 2000)
Panton-Valentin-Leukozidin	PVL	lysiert Leukozyten durch Porenbildung bzw. induziert deren Apoptose, verursacht Expressionsänderung von bakteriellen Proteinen	cytotoxisch für Leukozyten, an der Entstehung nekrotisierender Haut- und Lungenentzündungen beteiligt	(Labandeira-Rey <i>et al.</i> , 2007)
Superantigene (z.B. Toxic-Schock-Syndrom-Toxin1)	SE (TSS T-1)	bindet an den MHCII und den T-Zellrezeptor und aktiviert dadurch T-Zellen	Zytokin-Ausschüttung, Toxic-Schock-Syndrom	(Thomas <i>et al.</i> , 2007)
<i>an Peptidoglykan gebundene Adhäsionsproteine (MSCRAMMs)</i>				
Fibronectin-Bindeprotein A und B	FnBP A und B	bindet Fibronectin, Fibrinogen und andere ECM Proteine	Aufnahme von <i>S. aureus</i> durch nicht-professionelle Phagozyten; aktiviert Endothelzellen	(Clarke und Foster, 2006)
Clumping factor A	ClfA	bindet Fibrinogen und Fibrin	anti-phagozytotisch	(Clarke und Foster, 2006)
Clumping factor B	ClfB	bindet Fibrinogen	Interaktion mit epithelialen Zellen; Kolonisation von Gewebe	(Clarke und Foster, 2006)
Protein A	--	bindet an den Fc-Teil von IgGs, von Willebrand Faktor und TNFR1	verhindert Opsonisierung; anti-phagozytotisch; beeinflusst TNF signaling	(Fournier und Philpott, 2005)
<i>sekretierte Adhäsionsproteine (SERAMs)</i>				
Extrazelluläres Adhärenz-protein	Eap	bindet an Komponenten der ECM und an ICAM-1	Anti-inflammatorische und anti-angiogene Effekte; Adhäsion an und Aufnahme in nicht-professionelle Phagozyten	(Athanasopoulos <i>et al.</i> , 2006, Haggart <i>et al.</i> , 2004, Harraghy <i>et al.</i> , 2003)
Coagulase	Coa	aktiviert Prothrombin	bildet mit Prothrombin einen Komplex, der Fibrinogen zu Fibrin umwandelt	(Panizzi <i>et al.</i> , 2006)
ECM bindendes Protein	Emp	bindet an Komponenten der ECM	unbekannt	(Hussain <i>et al.</i> , 2001b)
Extrazelluläres Fibrinogen bindendes Protein	Efb	bindet Fibrinogen und Komplement-Faktoren C3b und C3d	inhibiert Komplementsystem, blockiert Opsonophagozytose, bindet an Blutplättchen und inhibiert Fibrinogen-abhängige Aggregation	(Rooijackers und van Strijp, 2007, Shannon <i>et al.</i> , 2005)
<i>anti-inflammatorische Peptide</i>				
Chemotaxis inhibitory protein of SA	CHIP S	bindet an C5aR	blockiert Chemotaxis	(de Haas <i>et al.</i> , 2004)
Staphylococcal complement inhibitor	SCIN	stabilisiert C2a-C4b und Bb-C3b Konvertase	inhibiert das Komplementsystem	(Rooijackers <i>et al.</i> , 2005)
<i>bakterielle Oberfläche</i>				
Capsular polysaccharide type 1	CPS 1	inhibiert Bindung von C3b an SA und Funktionen von C3b	anti-phagozytotischer Effekt	(Cunnion <i>et al.</i> , 2003)
Teichonsäuren der Zellwand	LTA, WTA	binden TLR2, an Adhäsion und Internalisierung beteiligt	Sekretion von Zytokinen, an Kolonisation beteiligt	(Fournier und Philpott, 2005)

**Tabelle 1-1: Übersicht über die verschiedenen Gruppen der Virulenzfaktoren von *Staphylococcus aureus*.** Repräsentative Vertreter jeder Gruppe sind genannt (erstellt nach Chavakis *et al.*, 2007).

## 1.2. Eap (extrazelluläres Adhärenzprotein)

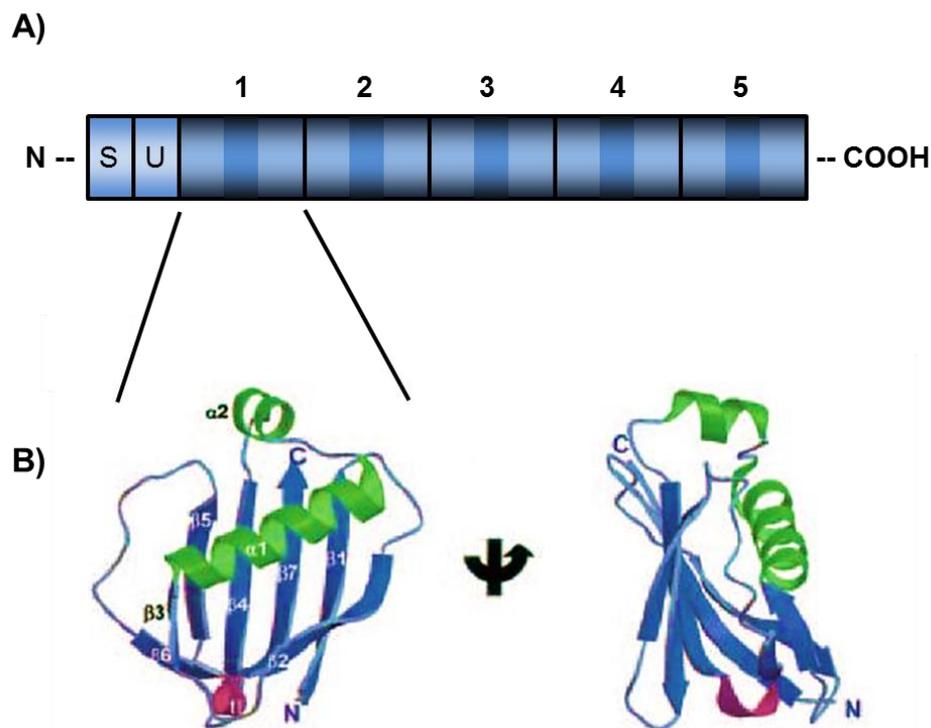
Eap gehört zur Gruppe der sekretierten Adhäsionsproteine (SERAM) und wurde Anfang der 90er Jahre von mehreren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander beschrieben. Youssif *et al.* fanden 1991 ein kationisches Protein, das eine hohe Affinität zur glomerulären Basalmembran von Ratten aufwies, und nannten es aufgrund seiner Größe von 70 kDa p70 (Youssif *et al.*, 1991). 1992 beschrieben Bodén und Flock ein Fibrinogen-bindendes Protein (Boden und Flock, 1992) und 1993 McGavin *et al.* ein 60 bzw. 72 kDa großes Oberflächenprotein, welches an verschiedene Glykoproteine der extrazellulären Matrix (ECM) band (McGavin *et al.*, 1993). Dieses 72 kDa Protein wurde später von Jonsson *et al.* charakterisiert und aufgrund der hohen Ähnlichkeit einer Subdomäne mit der N-terminalen  $\beta$ -Kette von MHC II Molekülen „MHC class II analogous protein“ (Map) genannt (Jonsson *et al.*, 1995). Palma *et al.* studierten 1999 das von Bodén und McGavin beschriebene Protein, bestätigten die vielfältigen Bindungseigenschaften an Komponenten der ECM und nannten es dementsprechend Eap (extracellular adherence protein) (Palma *et al.*, 1999). Schließlich zeigten Hussain und Kollegen, dass p70, Map und Eap Analoge des gleichen Proteins sind, welches den Namen Eap behielt (Hussain *et al.*, 2001a). Die beobachteten Größenunterschiede resultierten aus der unterschiedlichen Anzahl an Eap-Domänen und im Fall von Map aus einer Mutation, die den frühzeitigen Abbruch der Translation zur Folge hatte. 97,9 % aller getesteten *S. aureus* Isolate produzieren Eap, aber keine der untersuchten anderen Staphylokokken-Spezies (Hussain *et al.*, 2001a).

Die Expression von Eap wird vom *sae* 2-Komponenten-System reguliert und ist *in vitro* je nach Kultivierungsbedingung in der spät-exponentiellen (Harraghy *et al.*, 2005) oder stationären Phase (Joost *et al.*, 2009) maximal. Obwohl Eap kein LPXTG-Motiv enthält, werden 30 % des sekretierten Proteins an die bakterielle Oberfläche zurückgebunden (Mazmanian *et al.*, 1999, Palma *et al.*, 1999). Als mögliche Bindungspartner wurden die Neutrale Phosphatase (Flock und Flock, 2001) und zwei weitere *S. aureus* Oberflächenproteine (Kreikemeyer *et al.*, 2002) identifiziert. Des Weiteren ist Eap in der Lage an sich selbst zu binden, diese Eigenschaft hat die Bildung von multimeren Aggregaten, die Agglutination der Bakterien und Eap-Eap Interaktionen zwischen oberflächengebundenem und an die ECM gebundenem Eap

zur Folge (Palma *et al.*, 1999). Diese Interaktionen sind auch in *eap* defizienten Stämmen vorhanden, da die Bindung von Eap an die bakterielle Oberfläche unabhängig von der endogenen Eap-Produktion stattfindet (Hussain *et al.*, 2002). Ob Eap indirekt über Komponenten der ECM an eukaryotische Zellen bindet, oder, ob ein spezieller Eap-Rezeptor existiert, ist zurzeit noch unbekannt (Fraunholz und Sinha, 2012), es wurde jedoch eine Interaktion mit ICAM-1 beschrieben, welche die Leukozyten-Adhäsion an Endothelzellen und damit die Leukodiapedese inhibiert (genauer in 1.2.2.2) (Chavakis *et al.*, 2002).

### 1.2.1 Aufbau

Eap besitzt einen modularen Aufbau aus einzelnen Eap-Domänen, woraus die Größe von 60-72 kDa resultiert. Jede Eap-Domäne besteht aus ca. 110 Aminosäuren (AS) und enthält eine Subdomäne von 31 AS, welche homolog zur N-terminalen  $\beta$ -Kette von MHC II ist (Jonsson *et al.*, 1995, McGavin *et al.*, 1993).



**Abb. 1-3: Aufbau von Eap.** In (A) ist die schematische Darstellung des modularen Aufbaus von Eap aus einzelnen Eap-Domänen dargestellt. Eap enthält eine Signalsequenz (S) aus 30 Aminosäuren (AS), auf welche eine 19 AS-Sequenz (U) folgt. Daran schließen sich 4-6 Wiederholungen der Eap-Domäne an. Jede Eap-Domäne besteht aus ca. 110 AS und enthält eine Subdomäne von 31 AS (dunkelblau), welche homolog zur N-terminalen  $\beta$ -Kette von MHC II ist (nach Jonsson *et al.* (1995) erstellt). **B:** Dreidimensionale Kristallstruktur einer einzelnen Eap-Domäne des Mu50-Eap (Nachdruck aus Geisbrecht *et al.*, 2005). Eine alternative Ansicht der Struktur ist nach Drehung um 90° gegen den Uhrzeigersinn auf der rechten Seite abgebildet. Charakteristisch ist die vierfach gedrehte  $\alpha$ -Helix (grün), welche diagonal über einem fünfsträngigen, gemischten  $\beta$ -Faltblatt liegt (blau).

Eap enthält außerdem eine 30 AS lange Signalsequenz (S), auf die eine Sequenz von 19 AS (U) folgt. Daran schließen sich stammabhängig drei bis sechs Wiederholungen der Eap-Domäne an (Abb. 1-3 A). Die Analyse der dreidimensionalen Kristallstruktur einzelner Eap-Domänen zeigt eine vierfach gedrehte  $\alpha$ -Helix, welche diagonal über einem fünfsträngigen, gemischten  $\beta$ -Faltblatt liegt (Geisbrecht *et al.*, 2005) (Abb. 1-3 B).

## 1.2.2 Funktionen

### 1.2.2.1 Eap als Adhäsionsprotein

Eap besitzt die Funktion als Adhäsionsprotein entsprechend ein breites Bindungsspektrum. Neben der bereits erläuterten Bindung an verschiedene Oberflächenproteine von *S. aureus* und der Bindung an sich selbst, konnte eine Bindung an sieben Plasmaproteine und Komponenten der extrazellulären Matrix festgestellt werden (Palma *et al.*, 1999). Dazu zählen Fibronectin, die  $\alpha$ -Kette von Fibrinogen, Prothrombin, Kollagen und Vitronectin. Bei der Bindung an Vitronectin ist eine spezifische Protein-Protein Interaktion beteiligt (Jonsson *et al.*, 1995). Unterschiede bestehen hinsichtlich der Bindung an die verschiedenen Kollagen-Typen. Eap bindet an die monomolekulare Form von Kollagen I, nicht aber an die von Kollagen II oder an Kollagen I - Fibrillen. Im Gegensatz dazu bindet es an in Mikrofibrillen enthaltenes Kollagen VI und an mit der Basalmembran assoziiertes Kollagen IV (Hansen *et al.*, 2006).

Da *S. aureus* eine Reihe von Adhäsinen mit überlappenden Bindungseigenschaften produziert, weisen *eap*-Mutanten keine verminderte Bindung an Fibronectin, Fibrinogen (Chavakis *et al.*, 2002, Hussain *et al.*, 2002) oder Vitronectin auf (Kreikemeyer *et al.*, 2002).

Die Rolle von Eap bei der Adhäsion an eukaryotische Zellen wird im Kapitel 1.3.3 erläutert.

### 1.2.2.2 Eap als Virulenzfaktor

Im Folgenden wird erläutert wie Eap mit einigen seiner zahlreichen Eigenschaften zur Pathogenität von *S. aureus* beiträgt.

Aufgrund der Fähigkeit sowohl an die bakterielle Oberfläche, als auch an Komponenten der extrazellulären Matrix zu binden, wird die Adhäsion von *S. aureus* an eukaryotische Zellen erhöht (Hagggar *et al.*, 2003). Durch die daran anschließende

Internalisierung werden die Bakterien vor dem Immunsystem geschützt. Dieser Vorgang wird im Kapitel 1.3. näher erläutert.

Chavakis und Kollegen beobachteten *in vitro* eine Interaktion zwischen Eap und ICAM-1. Durch die Bindung von Eap an ICAM-1 wird die Adhäsion von Leukozyten an endotheliale Zellen und folglich die Leukodiapedese aus dem Blutstrom ins entzündete Gewebe verhindert (Chavakis *et al.*, 2002, Hagggar *et al.*, 2004). Die Hemmung der ICAM-1 abhängigen transendothelialen Migration von Neutrophilen hat eine Reduzierung der pro-inflammatorischen NF $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) Antwort zur Folge, was wiederum die Expression von TF (tissue factor) erniedrigt und damit anti-inflammatorisch wirkt (Athanasopoulos *et al.*, 2006).

Die immunomodulatorischen Eigenschaften von Eap werden des Weiteren daran deutlich, dass geringe Mengen von Eap (bis zu 9  $\mu$ g/ml) die Proliferation von T-Zellen anregen, wohingegen größere Mengen die Proliferation nicht nur inhibieren, sondern auch zur Apoptose von B- und T-Zellen führen, was in chronischen Krankheiten wie Arthritis, Osteomyelitis und Abszessbildung resultieren kann (Hagggar *et al.*, 2005, Lee *et al.*, 2002). Außerdem wird die Zell-vermittelte Th1-Immunantwort, die bei der Eliminierung von *S. aureus* von größerer Bedeutung als die humorale Th2-Immunantwort ist (Guillen *et al.*, 2002), durch Eap gehemmt (Lee *et al.*, 2002). Da Interleukin-4 die Differenzierung von T-Zellen in Th2-Zellen induziert, wird die Immunantwort zusätzlich aufgrund einer erhöhten Interleukin-4 Synthese in PBMCs in Richtung einer Th2-Antwort moduliert (Jahreis *et al.*, 2000). Eine reduzierte Th1-Immunantwort hat eine geringere phagozytotische Aktivität zur Folge, was in einer unvollständigen Elimination von *S. aureus* resultieren kann. Das Ausmaß der anti-inflammatorischen Eigenschaften von Eap wurde *in vivo* anhand der Inhibition der experimentellen Autoimmun-Encephalomyelitis (EAE) in Mäusen demonstriert. EAE stellt das Tiermodell für multiple Sklerose dar und ist dementsprechend durch Demyelinisierung des zentralen Nervensystems aufgrund von autoreaktiven T-Zellen gekennzeichnet. Die Infiltration dieser T-Zellen wurde durch Eap soweit reduziert, dass EAE unterdrückt werden konnte (Xie *et al.*, 2006). Des Weiteren konnte Eap Schuppenflechte (Psoriasis) *in vivo* durch Inhibition der T-Zell-Extravasation in die entzündete Haut verhindern (Wang *et al.*, 2010).

Eap wirkt nicht nur anti-inflammatorisch, sondern auch pro-inflammatorisch. Die Sekretion der pro-inflammatorischen Cytokine Interleukin 6 und TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) wird in CD14-positiven Leukozyten (Monozyten und Makrophagen)

von Eap induziert (Scriba *et al.*, 2008). Des Weiteren konnte *in vitro* eine Zeit- und Konzentrations-abhängige Zunahme der IgM, IgG und Interleukin 2 Synthese in PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) beobachtet werden. Jedoch scheint Eap B-Zellen nicht direkt zu aktivieren, da angereicherte B-Zellen nach Eap-Stimulation keine Antikörper bildeten (Jahreis *et al.*, 1995). Die Bildung von Antikörpern gegen Eap, konnte *in vivo* bestätigt werden, indem die Antikörper-Titer von gesunden Personen mit denen von *S. aureus*-infizierten Personen verglichen wurden. Alle Proben enthielten Antikörper gegen Eap, aber ein signifikant höherer Titer war sowohl bei infizierten Personen im Vergleich zu Gesunden, als auch bei Personen mit schweren bzw. tiefen Infektionen im Vergleich zu Personen mit leichten bzw. oberflächlichen Infektionen vorhanden (Joost *et al.*, 2011). Das deutet darauf hin, dass Eap bei schweren und tiefen Infektionen eine größere Rolle spielt als bei leichten oder oberflächlichen Infektionen.

Untersuchungen zur Abszessbildung bestätigen *in vivo* den Einfluss von Eap auf die Pathogenität von *S. aureus*, obwohl die Beobachtungen dazu in verschiedenen Arbeitsgruppen variierten, was vermutlich aus der unterschiedlich langen Inkubationszeit und aus Stamm-Unterschieden resultierte. Mäuse, die mit einem Eap-positiven (Eap<sup>+</sup>) oder einem Eap-negativen (Eap<sup>-</sup>) Stamm infiziert wurden, zeigten in den ersten Stadien der Infektion ähnliche Gewichtsverluste und Keimbelastung. Drei Wochen nach Beginn der Infektion besaßen nur mit Eap<sup>-</sup> infizierte Mäuse wieder das ursprüngliche Gewicht. Nach acht Wochen war die Abszess-Bildung in den Nieren dieser Mäuse 25-fach reduziert und das Herz frei von Abszessen. Im Gegensatz dazu wiesen 57 % der mit Eap<sup>+</sup> infizierten Mäuse Abszesse im Herzen auf (Lee *et al.*, 2002). Chavakis und Kollegen konnten 5 Tage nach der Infektion in einem anderen experimentellen Modell weder einen Unterschied bei der Abszess-Größe, noch bei der Keimbelastung der Niere feststellen (Chavakis *et al.*, 2002). Die Arbeitsgruppe von Cheng konnte 5 und 15 Tage nach der Infektion mit Eap<sup>+</sup> und Eap<sup>-</sup> Stämmen ebenfalls keinen Unterschied in der Abszess-Bildung feststellen, aber sie beobachteten eine höhere Keimbelastung in mit Eap<sup>+</sup> infizierten Mäusen. Passive Immunisierung der Mäuse mit anti-Eap-Antikörpern resultierte außerdem in einer reduzierten Abszess-Bildung und geringeren Keimbelastung (Cheng *et al.*, 2009). Zusammengefasst scheinen Eap<sup>-</sup> Stämme nicht in der Lage zu sein erfolgreich zu persistieren, was bedeutet, dass Eap

bei der Abszess-Bildung einen Einfluss auf die Langzeit, nicht aber auf die Kurzzeit-Infektion besitzt (Cheng *et al.*, 2011).

## 1.3. Internalisierung von Staphylokokken

### 1.3.1 Bedeutung der Internalisierung

Eine Internalisierung durch Wirtszellen beeinflusst die Pathogenese von Staphylokokken-Infektionen auf mehrfache Art und Weise. So wird angenommen, dass die Bakterien einerseits durch die intrazelluläre Lokalisation vor Antibiotika-Behandlung und körpereigener Immunabwehr geschützt sind, was in persistierenden und rezidivierenden Infektionen resultieren kann. Andererseits stellt die Internalisierung den ersten Schritt einer Transzytose dar, welche - neben parazellulärer Translokation oder Zellschädigung - die Passage von epithelialen bzw. endothelialen Barrieren und damit die Infektion von tiefergelegenen Gewebe ermöglicht. Anschließend ist eine Ausbreitung des Erregers im Wirt möglich. (Clement *et al.*, 2005, Garzoni und Kelley, 2009, Plouin-Gaudon *et al.*, 2006, Sendi und Proctor, 2009, Wesson *et al.*, 1998, Zautner *et al.*, 2010).

Dementsprechend konnte die Invasion und Persistenz von *S. aureus* in einer Reihe von nichtprofessionellen Phagozyten wie Fibroblasten, Osteoblasten und verschiedenen endothelialen und epithelialen Zellen *in vitro* nachgewiesen werden (Almeida *et al.*, 1996, Bayles *et al.*, 1998, Bost *et al.*, 1999, Ellington *et al.*, 1999, Deitch *et al.*, 1995, Jevon *et al.*, 1999). Des Weiteren wurde die intrazelluläre Lokalisation als Reservoir für persistierende Infektionen in von Patienten stammenden Geweben *in vivo* bestätigt (Clement *et al.*, 2005, Garzoni und Kelley, 2009, Plouin-Gaudon *et al.*, 2006, Zautner *et al.*, 2010).

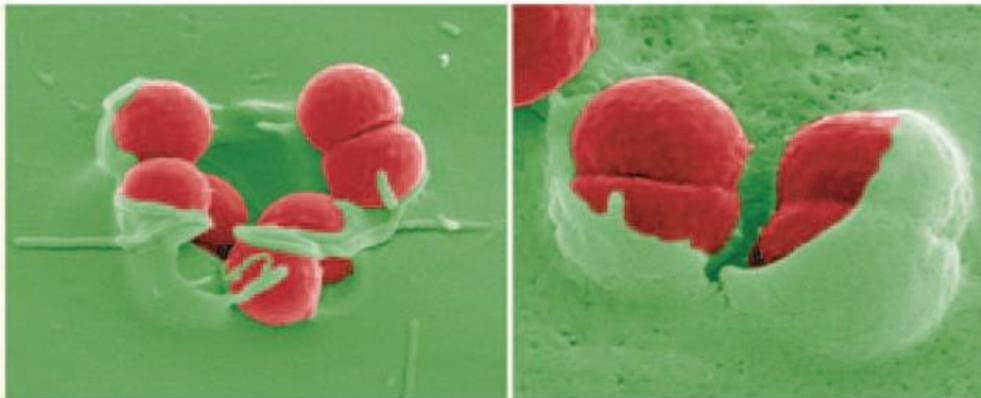
In diesem Zusammenhang ist eine phänotypische Variante von *S. aureus*, die wegen ihres reduzierten Wachstums auf festen Nährmedien „Small Colony Variants“ (SCV) genannt wird, von besonderer Bedeutung. Persistierende und rezidivierende Infektionen werden häufig auf diesen durch reduzierten Metabolismus gekennzeichneten, langsam wachsenden, in der Regel nicht-pigmentierten und nicht-hämolytischen Phänotyp zurückgeführt. Die Ursache für diesen SCV-Morphotyp sind aus Mutationen resultierende einfache oder multiple Auxotrophismen (Melter und Radojevic, 2010, Sendi und Proctor, 2009). Die intrazelluläre Persistenz wird durch

eine niedrige Expression von  $\alpha$ -Toxinen und Proteinasen, welche normalerweise zu Entzündungsreaktionen und Gewebszerstörung beitragen, begünstigt (Tuchscherer *et al.*, 2010). Der SCV-Phänotyp ist nicht stabil, folglich kann der virulente Wildtyp aus den intrazellulär persistierenden Bakterien entstehen und eine Infektion auslösen. Damit scheint der bakterielle Phänotyp-Wechsel ein integraler Bestandteil des Infektionsprozesses zu sein, der es *S. aureus* erlaubt in Wirtszellen ein Reservoir für persistierend rezidivierende Infektionen zu bilden (Tuchscherer *et al.*, 2011).

### 1.3.2 Mechanismus der Internalisierung

Voraussetzung dafür, dass sich eine Infektion etablieren kann, ist die Adhäsion der Bakterien an das Wirtsgewebe. Diese erfolgt mit Hilfe spezieller Oberflächenmoleküle, den sogenannten Adhäsinen, bei denen an Peptidoglykan der bakteriellen Oberfläche gebundene Adhäsionsproteine (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules, MSCRAMMs) (Nitsche-Schmitz *et al.*, 2007) von den sekretierten Adhäsionsproteinen (secretable expanded repertoire adhesive molecules, SERAMs) (Chavakis *et al.*, 2005) unterschieden werden. In Tabelle 1-1 wurden bereits einige Vertreter beider Klassen vorgestellt. Neben diesen Proteinen sind auch Wandteichonsäuren (WTA) für eine erfolgreiche Kolonisation von Bedeutung (Weidenmaier *et al.*, 2004, Weidenmaier *et al.*, 2005), wobei ein Scavenger-Rezeptor als Bindungspartner in Frage kommt (Weidenmaier *et al.*, 2008). Trotz der großen Anzahl verschiedener Adhäsine zeigen die Untersuchungen der letzten Jahre, dass die Fibronektin-Bindeproteine A und B (FnBPA, FnBPB) die bedeutendsten Adhäsionsfaktoren von *S. aureus* darstellen (Edwards *et al.*, 2011, Dziwanowska *et al.*, 1999, Fowler *et al.*, 2000, Jevon *et al.*, 1999, Lammers *et al.*, 1999, Sinha *et al.*, 1999, Sinha und Fraunholz, 2010). FnBPs binden Fibronektin am N-Terminus in einiger Entfernung vom Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Motiv (RGD-Motiv), welches wiederum von  $\alpha 5\beta 1$ -Integrinen gebunden wird. Aufgrund dieser beidseitigen Bindung fungiert Fibronektin als Brücke zwischen Bakterium und Wirtszelle (Dziwanowska *et al.*, 1999, Fowler *et al.*, 2000, Sinha *et al.*, 1999). Es wurde gezeigt, dass FnBPs alleine ausreichend sind, um die Aufnahme von Bakterien zu induzieren (Sinha *et al.*, 2000). Des Weiteren können FnBPs direkt über das humane Hitzeschockprotein 60 (Hsp60) an die Oberfläche von epithelialen Zellen binden (Dziwanowska *et al.*, 2000). Sind die FnBPs wie im Stamm Newman nicht funktionsfähig (Grundmeier *et al.*, 2004), kann die

Internalisierung ersatzweise von Eap vermittelt werden (Haggart *et al.*, 2003, Harraghy *et al.*, 2003, Hussain *et al.*, 2002). Hierbei ist ebenfalls eine Bindung über Fibronectin an  $\alpha 5\beta 1$  Integrine möglich, aber nicht notwendig. Der direkte zelluläre Rezeptor ist zurzeit noch unbekannt (Fraunholz und Sinha, 2012). Genauer zur Rolle von Eap bei Adhäsion und Internalisierung wird im Kapitel 1.3.3 erläutert. Obwohl FnBPs generell als die bedeutendsten Adhäsine gelten (Fraunholz und Sinha, 2012), wurden für primäre Keratinozyten stammabhängig auch FnBP unabhängige Invasionsmechanismen beobachtet (Cho *et al.*, 2001, Kintarak *et al.*, 2004b). Autolysin (Atl) bindet direkt an das Hitzeschockprotein-ähnliche Hsc70 und fungiert so als Adhäsion und Invasin (Hirschhausen *et al.*, 2010). Protein A interagiert ebenfalls direkt mit der Oberfläche der Wirtszelle über den „tumor necrosis factor  $\alpha$ “-Rezeptor 1 (TNFR1) (Claro *et al.*, 2011). Des Weiteren ist eine indirekte Bindung von „clumping factor B“ (ClfB) an Cytokeratine der ECM möglich (Haim *et al.*, 2010, Wertheim *et al.*, 2008), wobei noch unklar ist, inwieweit die Invasion davon beeinflusst wird.

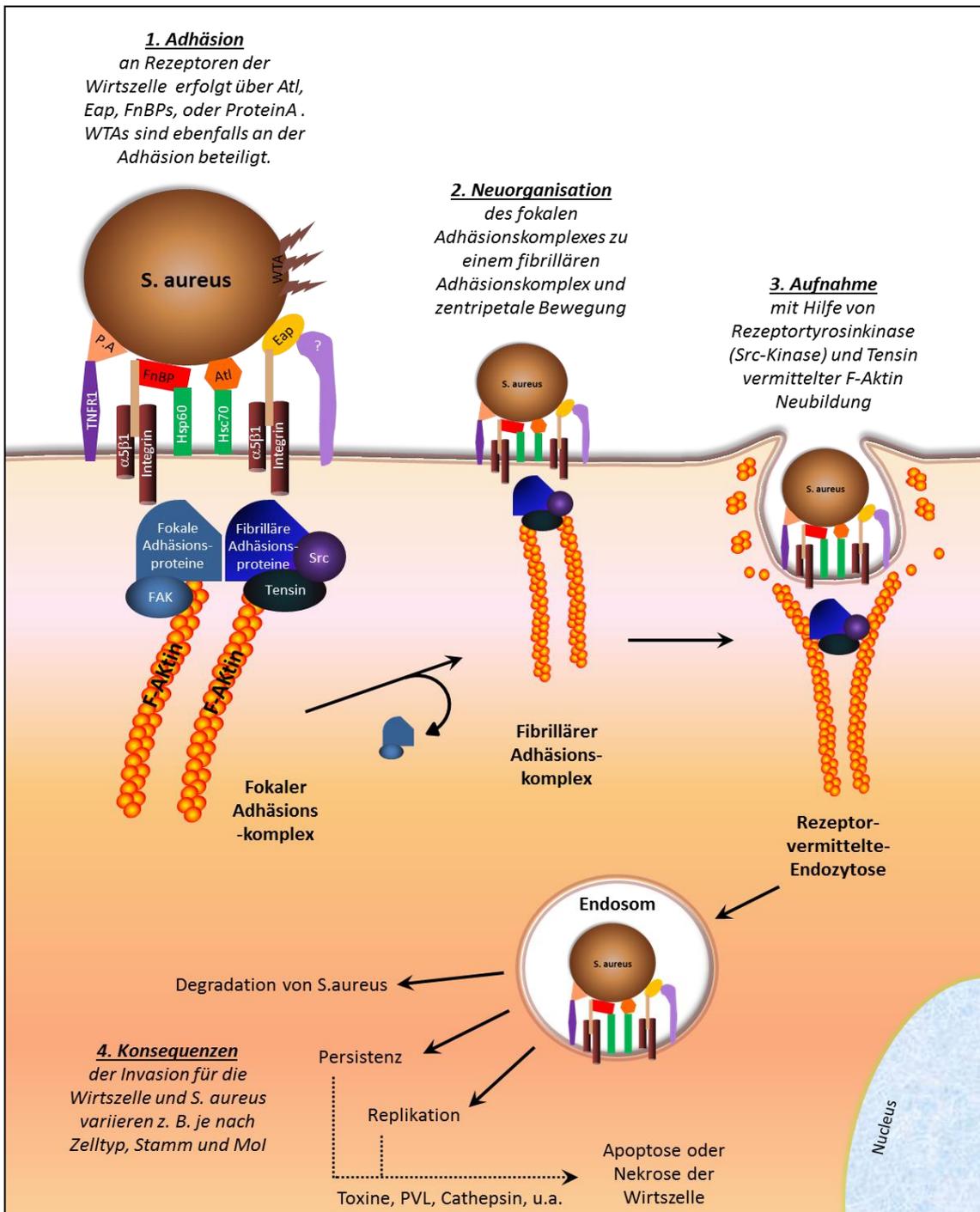


**Abb. 1-4: Internalisierung von *S. aureus* über Rezeptor-vermittelte Endozytose (Nachdruck aus Agerer *et al.*, 2005 mit freundlicher Genehmigung des Journal of Cell Science).** Maus-Fibroblasten wurden mit *S. aureus* infiziert und anschließend rasterelektronen-mikroskopisch analysiert. Auf den pseudokolorierten Bildern sind die Bakterien in rot und die Plasmamembran der Fibroblasten in grün dargestellt. Unter adhärenierten Bakterien entsteht eine Einstülpung, während sich darum herum Membranausstülpungen bilden. Diese schließt sich über den Bakterien (Reißverschlussmodell).

Nach der Adhäsion kann unter bestimmten Voraussetzungen eine Invasion stattfinden, muss aber nicht. Die Aufnahme erfolgt mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose nach einem Reißverschlussmodell. Bei diesem entsteht eine mit Clathrin ummantelte Grube indem sich Membranausstülpungen um das an Rezeptoren gebundene Bakterium bilden, während sich gleichzeitig die Plasmamembran im Zentrum nach innen stülpt (vgl. Abb. 1-4). Schließlich verschmelzen die

Ausstülpungen über dem Bakterium und das so entstandene Endosom wird ins Cytoplasma abgeschnürt (Agerer *et al.*, 2005, Fraunholz und Sinha, 2012). Dieser Prozess beginnt mit einer vom FnBP/Fn-Komplex hervorgerufenen  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Clusterbildung am Adhäsionsort, da  $\alpha 5\beta 1$ -Integrine bei zahlreichen Zelltypen als Fibronectin-Rezeptoren fungieren. Während die extrazelluläre Domäne dabei an die RGD-Sequenz von Fibronectin bindet, ist die intrazelluläre Domäne über Adaptorproteine an Aktinfilamente gekoppelt. Zu den mehr als fünfzig bekannten Adaptorproteinen zählen beispielsweise die fokale Adhäsions-Kinase (FAK), Vinculin, Paxillin, Talin, Tensin oder Rezeptortyrosinkinasen wie die src-Kinase. Der gesamte Komplex wird als fokaler Adhäsionskomplex bezeichnet (Zamir und Geiger, 2001). Nach der Adhäsion erfolgt ein Umbau des Aktinzytoskeletts, welcher zu einer zentripetalen Bewegung des FnBP/Fn/Integrin/Aktin-Komplexes aus dem fokalen Adhäsionskomplex heraus führt. Der so entstandene fibrilläre Adhäsionskomplex enthält nur noch wenige der im fokalen Adhäsionskomplex vorhandenen Adaptorproteine. Für die anschließende Entstehung von Membranaus- bzw. Einstülpungen und der dazu erforderlichen Aktinfilamentneubildung sind Tensin und die Src-Kinase erforderlich (Agerer *et al.*, 2003, Agerer *et al.*, 2005, Dziwanowska *et al.*, 1999, Ellington *et al.*, 1999, Fowler *et al.*, 2003, Jevon *et al.*, 1999, Schroder *et al.*, 2006b). Außerdem waren bei der Invasion von Osteoblasten ERK (extracellular signal-regulated kinase) und JNK (c-Jun N-terminale Kinase), nicht aber p38 an der Signaltransduktion beteiligt (Ellington *et al.*, 2001). Wohingegen in HEp-2 Zellen sowohl ERK als auch p38 aktiviert wurden (Li *et al.*, 2009). In bovinen, endothelialen Zellen wurde außerdem gezeigt, dass der Phosphoinositid-3-kinase-Akt-Signalweg aktiv war (Oviedo-Boyso *et al.*, 2011). Des Weiteren wurde der Transkriptionsfaktor c-Jun in Osteoblasten phosphoryliert, nicht aber Elk-1 oder ATF-2 (Ellington *et al.*, 2001).

Das intrazelluläre Schicksal des aufgenommenen *S. aureus* und der infizierten Wirtszelle sind von zahlreichen Faktoren abhängig und wurde von Fraunholz und Sinha zusammengefasst (Fraunholz und Sinha, 2012, Sinha und Fraunholz, 2010). Sowohl der Genotyp des Isolats, dessen Wachstumsphase, die Anzahl der infizierenden Partikel, als auch die Empfindlichkeit der Wirtszelle gegenüber bakterieller Virulenzfaktoren tragen beispielsweise zu den Folgen der bakteriellen Internalisierung bei (Fraunholz und Sinha, 2012, Krut *et al.*, 2003, Schwartz *et al.*, 2009). Ein großer Teil der aufgenommenen Bakterien wird degradiert nachdem das



**Abb. 1-5: Mechanismus der Internalisierung von *S. aureus*.** Die Adhäsion an Rezeptoren der Wirtszelle ( $\alpha 5 \beta 1$ -Integrine; Hitzeschockprotein 60 = Hsp60; Hitzeschockprotein ähnliches Protein 70 = Hsc70, „Tumor necrosis factor  $\alpha$ “ -Rezeptor 1 = TNFR1 oder unbekannter Rezeptor) erfolgt über Fibronectin-Bindeproteine (FnBP), Autolysin (AtI), Protein A (P.A.) oder extrazelluläres Adhärenzprotein (Eap). Wand-Teichonsäuren (WTA) sind ebenfalls an der Adhäsion beteiligt. Der fokale Adhäsionskomplex, der sich am Adhäsionsort bildet, wird durch zentripetale Bewegung und Verlust der fokalen Adhäsionskomplex-Proteine in einen fibrillären Adhäsionskomplex umgewandelt. Anschließend findet die eigentliche Invasion durch Rezeptor-vermittelte Endozytose statt. Daran ist von Tensin und src-Kinase abhängige Aktinpolymerisation beteiligt. Abhängig von Zelltyp, Stamm, Mol u.a. kommt es entweder zur Degradation des aufgenommenen *S. aureus*, oder er kann in der Wirtszelle persistieren bzw. replizieren. Werden in letzteren Fällen bestimmte Virulenzfaktoren produziert, resultiert das in der Apoptose oder Nekrose der Wirtszelle. Zusammengefasst nach: Agerer *et al.*, 2005; Fraunholz und Sinha, 2012; Schroder *et al.*, 2006b.

Endosom mit einem Lysosom zum Phagolysosom verschmolzen ist. Wie in Kapitel 1.3.1 bereits beschrieben wurde, konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt werden, dass *S. aureus* dennoch in Wirtszellen persistieren kann. Dies geschieht oft in Verbindung mit dem SCV-Morphotyp (Sendi und Proctor, 2009). Des Weiteren wurde Replikation in Endosomen und – nach bakterieller Auflösung des Endosoms – im Cytosol nachgewiesen (Bayles *et al.*, 1998, Koziel *et al.*, 2009, Kubica *et al.*, 2008, Schroder *et al.*, 2006a). Diese Vorgänge sind u.a. bei SCVs möglich ohne den Tod der Wirtszelle zu induzieren, werden aber beispielsweise große Mengen bakterieller Exotoxine gebildet, erfolgt die Apoptose, oder, in selteneren Fällen, Nekrose der Wirtszelle (Fraunholz und Sinha, 2012).

### 1.3.3 Eap und Internalisierung

Eap kann die Adhäsion von *S. aureus* an eukaryotische Zellen vermitteln, was nach aktuellem Wissensstand aber nur von Bedeutung ist, um das Fehlen funktionsfähiger FnBPs zu kompensieren (Fraunholz und Sinha, 2012). Dazu wurden mehrere Untersuchungen mit dem *S. aureus* Stamm Newman durchgeführt, welcher aufgrund einer C-terminalen Verkürzung keine funktionsfähigen FnBPs besitzt (Grundmeier *et al.*, 2004). Dessen isogene Eap-Mutante mAH12 zeichnete sich durch eine verminderte Adhäsion und Internalisierung bei Fibroblasten und epithelialen Zellen aus (Hagggar *et al.*, 2003, Hussain *et al.*, 2002), was darauf hinweist, dass Eap in diesem Stamm an einer erfolgreichen Adhäsion beteiligt ist. Eine Vorinkubation der Bakterien mit Eap erhöhte die Adhäsion und Internalisierung von Newman und mAH12 zusätzlich, folglich ist eine endogene Eap-Expression für die Bindung von Eap an die bakterielle Oberfläche nicht erforderlich (Hagggar *et al.*, 2003, Hussain *et al.*, 2002). Die Rolle von Eap wurde dadurch weiter bestätigt, dass Eap-Antikörper sowohl die Internalisierung von Newman reduzierten, als auch den Effekt des exogenen Eaps inhibierten. Des Weiteren zeigten auch klinische Isolate nach Präinkubation mit Eap eine erhöhte Invasion in Fibroblasten (Hagggar *et al.*, 2003). Außerdem wurde die Aufnahme des nicht invasiven *Staphylococcus carnosus* Stammes TM300 durch Eap-Vorinkubation signifikant erhöht; exprimierte dieser Stamm jedoch FnBPs, so konnte keine zusätzliche, signifikante Steigerung der Invasion durch Eap mehr beobachtet werden (Hagggar *et al.*, 2003).

Der erhöhende Effekt von Eap auf die Adhäsion wird durch die Fähigkeit sowohl an die bakterielle Oberfläche als auch an Komponenten der extrazellulären Matrix zu

binden hervorgerufen (Hagggar *et al.*, 2003, Hussain *et al.*, 2002, Palma *et al.*, 1999). Da die rezeptorvermittelte Endozytose von der Wirtszelle abhängig ist (vgl. Kapitel 1.3.2) und in den oben beschriebenen Experimenten nur die Bakterien mit exogenem Eap vorinkubiert wurden, ist die erhöhte Internalisierung hier wahrscheinlich eine Folge der erhöhten Adhäsion. Ob Eap die Internalisierung zusätzlich durch eine Interaktion mit der Wirtszelle beeinflusst, ist zurzeit noch nicht bekannt.

Im Gegensatz zu den vorherigen Untersuchungen fanden Edwards und Kollegen in einer kürzlich veröffentlichten Studie, dass die Adhäsion von Newman und mAH12 an EA. hy926 Endothelzellen vergleichbar war (Edwards *et al.*, 2012). Diese widersprüchlichen Beobachtungen können durch die verschiedenen, verwendeten Wirtszellen verursacht worden sein, zeigen aber gleichzeitig, dass die Rolle von Eap bei Adhäsion und Internalisierung noch nicht vollständig geklärt ist.

## 1.4. Wundheilung

### 1.4.1 Vorkommen von *S. aureus* und Eap in Wunden

*S. aureus* stellt die Hauptursache oberflächlicher und tiefer Wundinfektionen dar, welche sich häufig zu schlecht heilenden, chronischen Wunden entwickeln (Bunikowski *et al.*, 2000, Grimble *et al.*, 2001, Kalmeijer *et al.*, 2000, Madsen *et al.*, 1996, Talan *et al.*, 2011). *S. aureus* verursacht beispielsweise in den USA 75 % aller in Notaufnahmen vorgestellten Haut- und Weichgewebsinfektionen; für 59 % dieser Infektionen sind MRSA-Stämme und für 16 % MSSA-Stämme verantwortlich (Talan *et al.*, 2011). Bei an atopischer Dermatitis (AD) erkrankten Kindern sind 81% mit *S. aureus* kolonisiert (Bunikowski *et al.*, 2000). Dabei wird die Schwere der Krankheit durch Infektion mit toxischen *S. aureus* deutlich erhöht. Die Beteiligung von *S. aureus* an der Entstehung von chronischen Wunden wird daran deutlich, dass nach einer Amputation in 21 % der mit MRSA infizierten Patienten die Heilung aufgrund einer chronischen Infektion verzögert wurde, während die Heilung in den nicht infizierten Patienten normal verlief (Grimble *et al.*, 2001). Des Weiteren fand bei venösen Beinulzera nach 180 Tagen in 62,5 % der nicht infizierten Patienten eine komplette Abheilung statt, wohingegen dies bei Patienten mit *S. aureus*-infizierten Ulzera nur in 21,6 % der Fall war (Madsen *et al.*, 1996).

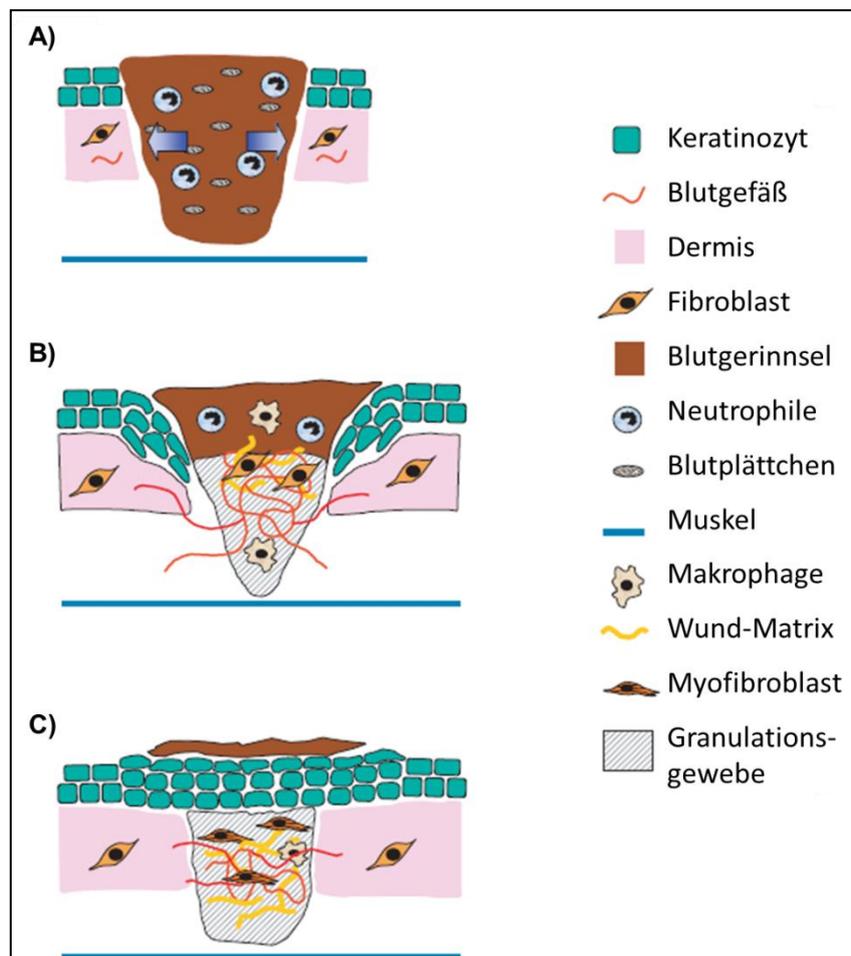
Sowohl in akuten als auch in chronischen Wunden bildet *S. aureus* Biofilme, welche bei bis zu 80 % aller Infektionen involviert sind (Percival und Cutting, 2009). Bei Biofilmen handelt es sich um synergistische Konsortien von Mikroorganismen, welche meist von einer Matrix aus extrazellulären Polysacchariden (EPS) umgeben und an biotischen oder abiotischen Oberflächen fest angehaftet sind. Die Fähigkeit von *S. aureus* einen Biofilm auszubilden führt aufgrund der schützenden Polymermatrix zu einer erhöhten Resistenz sowohl gegen Antibiotika als auch gegen die Immunantwort (Percival *et al.*, 2012, Thomson, 2011). Die Organisation als Biofilm bringt weitere Vorteile mit sich, wie z.B. den erleichterten Austausch von Genen oder die Akkumulierung von Nährstoffen in der Polymermatrix. Obwohl sicher ist, dass Biofilme generell bei Wundinfektionen involviert und an einer verschlechterten Heilung beteiligt sind, sind die zugrundeliegenden Mechanismen zum Teil unbekannt und effiziente Behandlungsstrategien fehlen (Percival *et al.*, 2012, Thomson, 2011).

Des Weiteren scheint Eap bei Wundinfektionsprozessen eine besondere Rolle zu spielen, da *S. aureus*-Stämme aus authentischen Wunden *in vivo* eine bis zu 100-fach höhere *eap* Transkription aufweisen als bei *in vitro* Kultur. Außerdem ist die *eap* Transkription in tiefen Wunden signifikant höher als in oberflächlichen Wunden (Joost *et al.*, 2009). Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass große Eap-Mengen in Wunden vorhanden sind. Tatsächlich konnte das Protein *in vivo* in *S. aureus*-infizierten Wunden nachgewiesen werden (Athanasopoulos *et al.*, 2006). Im Kapitel 1.4.3 wird die Rolle von Eap bei der Wundheilung näher erläutert.

## 1.4.2 Ablauf der Wundheilung

Die Haut ist nicht nur das Größte, sondern auch das vielseitigste Organ des menschlichen Körpers. Zu ihren zahlreichen Funktionen, die für den Organismus lebensnotwendig sind, zählt unter anderem der Schutz vor Umwelteinflüssen und Mikroorganismen. Dementsprechend ist bei einer Verletzung der Haut der schnelle Verschluss dieser offenen Stellen entscheidend. Die äußere Haut gliedert sich in drei wesentliche Schichten: Die Oberhaut (Epidermis), die mit der darunterliegenden Lederhaut (Dermis oder Corium) zusammen die Cutis bildet, und die Unterhaut (Subcutis). Die Epidermis besteht zu 90% aus Keratinozyten, welche ein mehrschichtiges (stratifiziertes), verhorntes Plattenepithel bilden, in welchem die Keratinozyten differenzieren, während sie von der Basalmembran aus nach oben zur

Hautoberfläche geschoben werden. Die auf der Basalmembran aufliegenden, undifferenzierten Keratinozyten (epidermale Stammzellen) proliferieren ständig. Von ihnen gebildete Tochterzellen sind vorübergehend ebenfalls proliferativ. Während diese Zellen durch die darunterliegende Neubildung von Keratinozyten weiter nach oben geschoben werden, differenzieren sie zunehmend, womit morphologische und physiologische Veränderungen – wie der Verlust der Proliferationsfähigkeit – einhergehen. Mit der terminalen Differenzierung (Verhornung) erfolgt schließlich der Zelltod, woraufhin die verhornten, abgestorbenen Keratinozyten von der Oberfläche der Epidermis abgeschilfert werden.



**Abb. 1-6: Phasen der Wundheilung (Nachdruck aus Werner und Grose; 2003).** Nachdem die Wunde durch ein Blutgerinnsel geschlossen wurde, wandern während der Inflammationsphase (A) Neutrophile ein. Diese werden in der Granulationsphase (B) von Makrophagen ersetzt. Endothelzellen bilden neue Blutgefäße und Fibroblasten eine neue extrazelluläre Matrix. Das so entstandene Gewebe wird als Granulationsgewebe bezeichnet. Außerdem wandern Keratinozyten vom Wundrand über das Granulationsgewebe und bilden eine neue Epidermis (Epithelisation). Kontraktion durch Myofibroblasten und Umorganisation des Kollagens schließen die Wundheilung in der Reifungsphase (C) ab.

Jede Verletzung der Haut löst eine Kaskade von sequenziell ablaufenden Prozessen aus, welche zum Verschluss der Wunde führen. Diese Prozesse überlappen und sind nicht voneinander trennbar, dennoch erfolgt aus didaktischen Gründen eine phasenweise Beschreibung der Wundheilung (zusammengefasst nach: Martin, 1997; Singer und Clark, 1999; Werner und Grose, 2003).

Während der Inflammationsphase (Entzündungsreaktion) wird zunächst der Blutverlust durch Hämostase gestoppt. Dabei verengen sich die Blutgefäße und ein Blutgerinnsel aus mit Fibrin vernetzten Blutplättchen bildet einen ersten Wundverschluss. Die komplexe Steuerung der Abläufe und der zellulären Interaktionen erfolgt durch Zytokine, die von den verschiedenen Zelltypen produziert werden. Von den Blutplättchen freigesetzte Chemokine lösen unter anderem die transendotheliale Migration von Leukozyten (Leukodiapedese) aus, welche Bakterien und Viren beseitigen. Des Weiteren trägt die Phagozytose durch Makrophagen, die aus Monozyten differenziert und in die Wunde migriert sind, zur Reinigung bei. Durch die Bildung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren initiieren Makrophagen die Bildung des Granulationsgewebes, welches aus Immunzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und einer vorläufigen extrazellulären Matrix (ECM) besteht und für die Proliferations- oder Granulationsphase kennzeichnend ist. In dieser Phase infiltrieren Fibroblasten und Endothelzellen die Wunde, welche nach und nach aufgefüllt wird. Während die Fibroblasten eine vorläufige ECM – die hauptsächlich aus Fibronectin und Hyaluronsäure besteht – produzieren, bilden die Endothelzellen neue Blutgefäße (Neovaskularisierung). Parallel dazu wird die Oberfläche der Wunde vom Wundrand aus durch Migration der Keratinozyten über das Granulationsgewebe (Epithelisation) geschlossen. Dieser Vorgang, welcher bereits zur regenerativen Phase der Wundheilung zählt, wird im Anschluss noch ausführlicher beschrieben. Die provisorische ECM wird von Makrophagen und Fibroblasten nach und nach durch eine dauerhafte Matrix ersetzt, die hauptsächlich aus Kollagen III und Fibronectin besteht. Die Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten führt zur Kontraktion der Wunde. Während der abschließenden Reifungsphase wird Kollagen III durch Kollagen I ersetzt und die noch unorganisierten Kollagen-Fibrillen werden aneinandergereiht und vernetzt. Als Ergebnis all dieser Prozesse entsteht Narbengewebe, welches im Gegensatz zur normalen Haut keine Haarfollikel, Schweißdrüsen und Melanozyten enthält und aufgrund des Fehlens von elastischen Fasern eine geringe Elastizität besitzt.

Die Epithelisation (zusammengefasst nach: Kirfel und Herzog, 2004; Morasso und Tomic-Canic, 2005) beginnt mit der Migration von Keratinozyten. Dazu müssen die desmosomalen und hemidesmosomalen Verbindungen, welche die Zellen über das Zytoskelett aneinander bzw. an der Basalmembran verankern, aufgelöst und in der Peripherie – ebenso wie die Intermediär- und Mikrofilamente – neu organisiert werden. Anschließend sind die Zellen in der Lage sich aus dem Zellverbund zu lösen und lateral zu migrieren. Damit geht eine morphologische Veränderung einher: die Keratinozyten werden sowohl länger als auch flacher, Ausstülpungen und Lamellopodien bilden sich in Migrationsrichtung. Während der Migration binden an den Lamellopodien vorhandene Integrine an Bestandteile der ECM, worauf die Zelle von den Aktinfilamenten weiter gezogen wird. Keratinozyten können nur über lebendes Gewebe migrieren, weswegen der Migrationsprozess bei tieferen Wunden erst nach Bildung des Granulationsgewebes beginnen und damit zeitlich stark schwanken kann. Die Migration basaler und vorübergehend amplifizierender Keratinozyten erfolgt vom Wundrand oder von in der Dermis gelegenen Haarfollikeln und Schweißdrüsen aus. Ist die Wunde so tief, dass die Dermis ebenfalls zerstört wurde, kann die Migration nur vom Wundrand ausgehen. In der migrierenden Keratinozyten-Zellschicht bewegen sich die Zellen nicht nur entlang der vorläufigen ECM, sondern gleiten auch übereinander. Da sich die Keratinozyten zwischen Schorf und Granulationsgewebe fortbewegen, muss an der Front der migrierenden Schicht Schorf aufgelöst werden. Dazu wird Plasminogen-Aktivator sezerniert. Daneben werden auch Zelldebris oder nicht intakte Teile der ECM mit Hilfe von Kollagenasen und Proteasen aufgelöst. Bis die Wundoberfläche geschlossen ist, findet bei einer tiefen Wunde nur in den Wundrändern Proliferation statt. Diese gewährleistet, dass neue Zellen für die Migration bereitgestellt werden. Wenn sich Keratinozyten von gegenüberliegenden Wundrändern in der Mitte der Wunde treffen, wird die Migration durch Kontakt-Inhibition gestoppt. Anschließend entsteht die neue Basalmembran aus von Keratinozyten sekretierten Proteinen. Schließlich werden die morphologischen Veränderungen, welche zum Migrieren notwendig waren, rückgängig gemacht; es werden neue desmosomale und hemidesmosomale Kontakte ausgebildet, welche die Zellen untereinander und an der Basalmembran verankern. Proliferation und Differenzierung beginnen wie in normaler Haut und resultieren in einem stratifizierten Epithel.

Kurz zusammengefasst sind sowohl Migration, als auch Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten notwendig, damit eine vollständige Epithelisation der Wunde stattfinden kann.

### 1.4.3 Inhibierung der Wundheilung durch Eap

Schlecht heilende, chronische Wunden werden bei Infektionen mit *S. aureus* häufig beobachtet (Grimble *et al.*, 2001, Madsen *et al.*, 1996) (vgl. Kapitel 1.4.1). Dass Eap an der Entstehung dieses Phänomens beteiligt ist, wurde von Athanasopoulos und Kollegen gezeigt: Die Wundheilung wurde in Mäusen durch Infektion mit einem *eap* defizienten Stamm weniger verzögert als durch Infektion mit dem entsprechenden, Eap-positiven Wildtyp. Der Einfluss von Eap wurde weiter bestätigt, indem aufgereinigtes Eap alleine zugegeben wurde. Dieses inhibierte die Wundheilung ähnlich wie eine Infektion mit Eap-positivem *S. aureus*, wobei der Effekt durch anti-Eap-Antikörper blockierbar war (Athanasopoulos *et al.*, 2006). Die anti-inflammatorischen Eigenschaften von Eap wurden im Kapitel 1.2.2.2 bereits ausführlich besprochen. Die erläuterte Inhibition der Leukodiapedese konnte *in vivo* in mit Eap behandelten Wunden beobachtet werden. Aufgrund dessen und wegen der daraus resultierenden, fehlenden Freisetzung von proinflammatorischen Cytokinen wird die inflammatorische Phase der Wundheilung negativ von Eap beeinflusst (Athanasopoulos *et al.*, 2006, Chavakis *et al.*, 2002, Hagggar *et al.*, 2004). Außerdem inhibiert Eap die Neovaskularisierung, welche für die Bildung des Granulationsgewebes während der proliferativen Phase der Wundheilung unverzichtbar ist (vgl. Kapitel 1.4.1). So waren in Eap-behandelten Wunden weniger Blutgefäße vorhanden und der Blutfluss um 45 % reduziert, da das Einsprießen der Haargefäße *in vitro* und *in vivo* durch Eap reduziert wurde (Athanasopoulos *et al.*, 2006, Sobke *et al.*, 2006). Die Inhibition der VEGF und bFGF stimulierten Proliferation und Aktivierung von Endothelzellen stellt eine mögliche Ursache hierfür dar (Sobke *et al.*, 2006). Diese Beeinflussung der endothelialen Zellfunktionen konnte wiederum auf die Eap-vermittelte Blockade der Ras/Raf/MEK/Erk-Signalkaskade zurückgeführt werden (Sobke *et al.*, 2006).

Nach momentanem Wissensstand ist Eap aufgrund seiner anti-inflammatorischen und anti-angiogenen Eigenschaften eine wesentliche Ursache für die mit *S. aureus* assoziierte, schlechte Wundheilung. Der Einfluss von Eap auf die darauffolgenden Phasen der Wundheilung wurde bisher jedoch noch nicht untersucht.

## 2. ZIELSTELLUNG

*S. aureus* ist die Hauptursache oberflächlicher und tiefer Wund-Infektionen, welche sich häufig zu schlecht heilenden, chronischen Wunden entwickeln. Bei diesen Wundinfektionsprozessen scheint der multifunktionelle Virulenzfaktor Eap von Bedeutung zu sein, da *S. aureus*-Stämme aus authentischen Wunden *in vivo* eine bis zu 100-fach höhere *eap* Transkription aufweisen als bei *in vitro* Kultur.

Es ist bereits bekannt, dass Eap während der normalen Wundheilung die Inflammationsphase und Neovaskularisierung aufgrund seiner anti-inflammatorischen und anti-angiogenen Eigenschaften inhibiert und dadurch an der Entstehung von nicht-heilenden, chronischen Wunden beteiligt ist (Athanasopoulos *et al.*, 2006). Ob Eap auch Keratinozyten und damit die Phase der Epithelisation beeinflusst, ist zurzeit unbekannt. Dementsprechend war es Gegenstand dieser Dissertation zu untersuchen, ob bzw. wie Eap mit Keratinozyten interagiert. Voraussetzung für solch eine Wechselwirkung ist die Adhäsion an bzw. Aufnahme durch Keratinozyten, weswegen als erstes eine entsprechende Überprüfung vorgenommen werden musste. Damit eine vollständige Epithelisation der Wunde stattfinden kann, sind sowohl Migration, als auch Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten notwendig. Darum sollte als nächstes der Einfluss von Eap auf diese Prozesse mit Hilfe entsprechender Assays untersucht werden.

Der bereits bekannte Einfluss von Eap auf Adhäsion und Internalisierung war dahingehend zu untersuchen, ob spezifische Interaktionen mit Aufnahme-mechanismen der Wirtszelle beteiligt sind. Dazu musste die Aufnahme von *S. aureus* durch Keratinozyten zunächst charakterisiert werden. Anschließend sollte die Eap-vermittelte Aufnahme in Keratinozyten genauer bestimmt werden. Dazu waren deren Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren wie Eap-Konzentration, Proliferations- oder Differenzierungsstatus der Keratinozyten und Expression verschiedener Adhäsine zu testen. Angesichts der Häufigkeit polymikrobieller Hautinfektionen, sollte der Einfluss von Eap des Weiteren nicht nur für verschiedene *S. aureus* Stämme, sondern auch für andere Mikroorganismen bestätigt werden. Im nächsten Schritt sollte der Mechanismus der Eap-vermittelten Internalisierung durch Verwendung von Inhibitoren der an der Aufnahme beteiligten Prozesse bestimmt werden. Bei der Invasion werden Signalkaskaden durch Phosphorylierung aktiviert. Da Eap eine mögliche Phosphorylierungsstelle besitzt und folglich eine Wechselwirkung mit der

Signaltransduktion denkbar ist, sollte zusätzlich geprüft werden, ob Phosphorylierung den Effekt von Eap beeinflusst.

Die Untersuchungen zum Einfluss von Eap auf die Epithelisation können zur verbesserten Behandlung von mit *S. aureus* infizierten Wunden beitragen, was aufgrund der mit *S. aureus*-assoziierten schlechten Wundheilung von großem Nutzen wäre. Da *S. aureus* durch die Invasion in Wirtszellen vor dem Immunsystem und Antibiotika weitestgehend geschützt wird, bietet das Verständnis dieses Vorgangs vielleicht einen neuen Angriffspunkt für die Behandlung persistierender Hautinfektionen. Neue Erkenntnisse über Details dieser Vorgänge können des Weiteren die Entwicklung neuer antimikrobieller Therapeutika unterstützen.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Bakterien

##### 3.1.1.1 Verwendete Staphylokokken-Stämme

Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Staphylokokken-Stämme (außer Wundisolate) und bakteriellen Plasmide wird in der Tabelle 3-1 gegeben.

Stamm	Beschreibung	Referenz oder Quelle
8325-4	NCTC8325 Derivat ohne Prophagen, <i>rsbU</i> <sup>-</sup>	(Novick, 1967)
Cowan 1	exprimiert Protein A, <i>agr</i> <sup>-</sup>	ATCC 12598
DU5883 (8325-4 $\Delta$ <i>fnbAB</i> )	8325-4 <i>fnbA::Tc<sup>R</sup> fnbB::Em<sup>R</sup></i> , Em <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	(Greene <i>et al.</i> , 1995)
HOM70 (SA113 GFP)	Konstitutiv Gfp-exprimierendes SA113-Derivat mit dem Plasmid pCN57, Em <sup>R</sup>	(Bischoff, unveröffentlicht)
LS1	Murines Arthritis-Isolat	(Bremell <i>et al.</i> , 1992)
mAH12	Newman <i>eap</i> <sup>-</sup> , Em <sup>R</sup>	(Hussain <i>et al.</i> , 2002)
MSSA1112	Klinisches Isolat, <i>bla</i> <sup>+</sup>	(Entenza <i>et al.</i> , 1997)
SA113	Derivat von NCTC 8325, <i>rsbU</i> <sup>-</sup> , Biofilm-Bildung in Abhängigkeit von PIA	ATCC35556 (Iordanescu und Surdeanu, 1976)
SA113 $\Delta$ <i>eap</i>	SA113 <i>eap</i> <sup>-</sup> , Em <sup>R</sup>	diese Arbeit
SA113 $\Delta$ <i>nptase</i>	SA113 <i>nptase</i> <sup>-</sup> , Cm <sup>R</sup>	(Thompson <i>et al.</i> , 2010)
SA113 $\Delta$ <i>srtA</i>	SA113 <i>srtA</i> <sup>-</sup> , Em <sup>R</sup>	(Weidenmaier <i>et al.</i> , 2008)
ST239	Hoch invasives MRSA-Isolat	(Grundmeier <i>et al.</i> , 2010)
<b>Plasmide</b>		
pCN57	<i>E. coli</i> - <i>S. aureus</i> shuttle Vektor mit konstitutiver Gfpmut2 Expression unter der Kontrolle des <i>blaZ</i> Promoters, Em <sup>R</sup>	(Charpentier <i>et al.</i> , 2004)

Tab. 3-1 In dieser Arbeit verwendete Staphylokokken-Stämme (Cm<sup>R</sup>, Chloramphenicol resistant; Em<sup>R</sup>, Erythromycin resistant; Gm<sup>S</sup>, Gentamycin sensitiv) und Plasmide.

##### 3.1.1.2 Verwendete Wundisolate

Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Wundisolate ist in Tabelle 3-2 dargestellt. Alle Stämme waren den EUCAST Richtlinien entsprechend sensitiv gegen Gentamycin ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)).

Stamm	Beschreibung	Referenz oder Quelle
HOM 254	<i>Escherichia coli</i> Wundisolat, Gm <sup>S</sup>	diese Arbeit
HOM 255	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Wundisolat, Gm <sup>S</sup>	diese Arbeit
HOM 256	<i>Staphylococcus lugdenensis</i> Wundisolat, Gm <sup>S</sup>	diese Arbeit
Isolat #30	<i>Staphylococcus aureus</i> Wundisolat, Gm <sup>S</sup>	(Joost <i>et al.</i> , 2011)

**Tab. 3-2 In dieser Arbeit verwendete Wundisolate (Gm<sup>S</sup>, Gentamycin sensitiv).**

### 3.1.2 Zelllinien

Die spontan immortalisierte, humane Keratinozyten-Zelllinie HaCaT (Boukamp *et al.*, 1988) wurde freundlicherweise vom deutschen Krebsforschungszentrum (Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK) wurden aus neonataler Vorhaut isoliert und entweder bei Lonza käuflich erworben (gepoolte Spender), oder vom Institut für Virologie (Uniklinik Homburg, AG Smola) (ein Spender) zur Verfügung gestellt. Die Internalisierungs-, Migrations- und Proliferationsversuche wurden in NHEK von gepoolten Spendern (Lonza) durchgeführt, während der Einfluss von Eap auf die Differenzierung in NHEK eines Spenders (Virologie) untersucht wurde.

### 3.1.3 Nährmedien für Bakterien und Zellkultur

#### 3.1.3.1 Nährmedien und Antibiotika für Bakterien

Blutplatten:	5% Schafsblut in TSA (Becton Dickinson)
LB-Medium:	20g LB-Broth Lennox (Difco), pH 7,0, ad 1l H <sub>2</sub> O
LB-Agar:	20g LB-Broth Lennox (Difco), 12g Agar-Agar, pH 7,0, ad 1l H <sub>2</sub> O
LB-Softy:	20g LB-Broth Lennox (Difco), 12g Agar-Agar, pH 7,0, ad 1l H <sub>2</sub> O
TSB-Medium:	30,0 g Bacto Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco), ad 1 l H <sub>2</sub> O

Ampicillin:	5 µg/ml (Roth)
Chloramphenicol:	10 µg/ml (Roth)
Erythromycin:	5 µg/ml (Fluka)
Gentamycin:	100 µg/ml (Merck)
Tetracyclin:	5 µg/ml (Roth)

### 3.1.3.2 Nährmedien für eukaryotische Zellen

DMEM <sup>+</sup> (für Ea.hy):	DMEM (Biochrom) mit 10% FCS, 1% nichtessentiellen Aminosäuren, 1% Penicillin/Streptomycin
DMEM <sup>-</sup> (für Ea.hy):	DMEM (Biochrom) mit 1% nichtessentiellen Aminosäuren
KBM <sup>+</sup> (für NHEK):	KBM-2 (Lonza) supplementiert mit Single Quot Kit (Lonza) für serumfreie Kultur
KBM <sup>-</sup> (für NHEK):	KBM-2 (Lonza)
MCDB <sup>+</sup> (für HaCaT):	MCDB 153 (Biochrom) mit 10% FCS, 1% nichtessentiellen Aminosäuren, 1% Penicillin/Streptomycin
MCDB <sup>-</sup> (für HaCaT):	MCDB 153 (Biochrom) mit 1% nichtessentiellen Aminosäuren

### 3.1.4 Antikörper

Ein Überblick über die verwendeten primären Antikörper ist in Tabelle 3-3 dargestellt, während die sekundären Antikörper in Tabelle 3-4 zu finden sind.

Antigen	Typ	Wirt	Verdünnung	Quelle
β-actin	mk-IgG	Maus	1:5000	Sigma
Cadherin	pk-IgG	Kaninchen	1:1000	Abcam
Eap	mk-IgG	Maus	1:1000	Patti, Baltimore
Eap	pk-IgG	Kaninchen	1:100-1:30.000	Schubert, Gießen
GAPDH	pk-IgG	Kaninchen	1:1000	Abcam
Involucrin	mk-IgG	Maus	1:1000	Sigma
Isotypkontrolle	pk-IgG	Kaninchen	Entsprechend spezifischer AK	Abcam
Isotypkontrolle	pk-IgG	Maus	entsprechend spezifischer AK	Invitrogen
Keratin 10	mk-IgG	Maus	1:1000	Acris
Phospho-Erk1/2	mk-IgG	Maus	1:1000	Cell signaling

**Tab. 3-3: Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper.**

Antigen	Verwendung	Verdünnung	Konjugat	Quelle
Kaninchen-IgG	Immunfluoreszenz	1:500	AlexaFluor® 488	Invitrogen
Kaninchen-IgG	Immunfluoreszenz	1:500	AlexaFluor® 647	Invitrogen
Kaninchen-IgG	Western-Blot	1:3000	HRP	Bio-Rad
Maus-IgG	Immunfluoreszenz	1:500	AlexaFluor® 488	Invitrogen
Maus-IgG	Immunfluoreszenz	1:500	AlexaFluor® 647	Invitrogen
Maus-IgG	Western-Blot	1:3000	HRP	Bio-Rad

**Tab. 3-4: Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper.**

### 3.1.5 Enzyme, Wachstumsfaktoren, Inhibitoren und Aktivatoren

Acetylphosphat	(Fluka)
Alkalische Phosphatase: Fast AP	(Fermentas)
Aphidicolin	(Calbiochem)
Aprotenin	(Fluka)
CytochalasinD	(Sigma)
EGF (epidermal growth factor)	(Peprotech)
Genistein	(Applichem)
KGF (keratinocyte growth factor)	(Peprotech)
Leupeptin	(Serva)
Manumycin A	(Calbiochem)
Pepstatin A	(Serva)
PMA	(Applichem)
PMSF	(Fluka)
Proteinase K	(Qiagen)
Src-Kinase-Inhibitor1	(Sigma)

### 3.1.6 Lösungen und Puffer

#### 3.1.6.1 Lösungen und Puffer für die Molekularbiologie

TAE-Puffer (1 x):	4,84 g Tris-Base, 0,4 g EDTA, 1,14 ml Eisessig, ad 1 l mit H <sub>2</sub> O
dNTPs	(Roche)
Ethidiumbromid:	0,0015% (Roth)
6 x LD	(PeqLab/Fermentas)
Größenstandard:	DNA Ladder (Fermentas)

### 3.1.6.2 Lösungen und Puffer für SDS-PAGE und Western-Blot-Analysen

Acrylamid:	30% Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid (Roth)
APS:	10% Ammoniumperoxodisulphat (Roth)
Blocklösung:	3% Magermilchpulver in TBS/T
ECL:	ECL <sup>TM</sup> Western Blotting Reagent (GE Healthcare)
Größenstandard:	Prestained Protein ladder (Fermentas life science)
LD (4 x):	5 ml 1 M Tris/HCl pH 6,8; 4 ml 87% Glyzin; 10 mg Bromphenol-Blau Na-Salz; 0,5 g SDS; 800 µl 0,5 M DTT; ad 10 ml H <sub>2</sub> O
Lösung A:	118,2 g Tris/HCl; 2 g SDS; pH 8,8; ad 500 ml H <sub>2</sub> O
Lösung B:	39,40 g Tris/HCl; 2 g SDS; pH 6,8; ad 500 ml H <sub>2</sub> O
SDS-Laufpuffer:	14,4 g Glyzin; 1 g SDS; 3 g Tris-Base; ad 1 l H <sub>2</sub> O
TBS (10 x):	30 g Tris; 80 g NaCl; 2 g KCl; pH 7,4, ad 1 l H <sub>2</sub> O
TBS/T (1 x):	1:10 10 x TBS in H <sub>2</sub> O; 0,1% Tween-20
TEMED:	0,1% N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (Sigma)
Transferpuffer:	4,85 g Tris-Base; 22,5 g Glyzin; 400 ml Methanol; ad 2 l H <sub>2</sub> O

#### Herstellung von Trenn- und Sammelgelen:

10% Trenngel:	1,65 ml Acrylamid; 1,25 ml Lösung A; 2,1 ml H <sub>2</sub> O; 50 µl APS; 4,15 µl TEMED
5% Sammelgel:	0,6 ml Acrylamid; 0,8 ml Lösung B; 1,9 ml H <sub>2</sub> O; 33,3 µl APS; 2,7 µl TEMED

### 3.1.6.3 Lösungen und Puffer für eukaryotische Zellen

Acetylphosphat-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 7,4
Alkalische-Phosphatase-Puffer:	1:10 (Fermentas)
AnnexinV-AlexaFluor®647	(BD Pharmingen)
Annexin-Bindungspuffer:	140 mM NaCl; 10 mM HEPES; 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> ; pH 7,4
Dapi:	1:2000 (Sigma)
FCS:	FCS Gold (PAA)
Formaldehyd:	3,7% in 1 x PBS (Fluka)
Homogenisierungspuffer:	1 mM EDTA; 10 mM HEPES; 10 mM β-Glycerol-Phosphat; 0,5 mM NaOrthovanadat; 1 mM NaF

Mounting Medium:	MobiGlow (MobiTec)
Nicht essentielle Aminosäuren:	1:100 (Gibco)
PBS (10 x):	81,8 g NaCl; 2 g KCl; 16 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O; 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4; ad 1 l H <sub>2</sub> O
Penicillin/Streptomycin:	1:100 (Biochrom)
Phalloidin-TRITC:	1:500 (Sigma)
Propidiumiodid (1 mg/ml):	1 µl pro Ansatz (Sigma)
Radio-Immunoprecipitation assay (RIPA) –Puffer:	50 mM Tris-HCl (pH 7,4); 1% w/v Igepal™; 0,25% w/v Desoxycholate; 150 mM NaCl; 1 mM EGTA; 1 mM NaF; 0,5 mM Na-Orthovanadat; 1 mM Na-Pyrophosphat; 2 mg/ml Aprotinin; 5 mg/ml Leupeptin; 10 mg/ml Pepstatin A; 0,2 mg/ml PMSF
Trypanblau	(Invitrogen)
Trypsin-EDTA:	1:10 (PAA)
Tryp-LE Express	(Gibco)
Trypsin-Neutralisierungs- Lösung	(Promo Cell)

### 3.1.7 Chemikalien

Hier nicht aufgelistete Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Merck oder Applichem bezogen.

Agarose	(Biozym)
BSA	(Sigma)
DEPC	(Applichem)
DMSO	(Applichem)
SDS	(Serva)
Triton-X-100	(Sigma)
Tween-20	(Roth)

### 3.1.8 Kits

BCA™-Proteindetektionskit	(Thermo Scientific)
Bradford-Assay	(Bio-Rad)
Click-it® Edu 647 Kit	(Invitrogen)
ECL™ Western Blotting Detection Reagent	(GE Healthcare)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	(Applied Biosystems)
Limulus Amoebocyte Lysate-Kit	(Lonza)
NucleoSpin RNA II-Kit	(Macherey-Nagel)
qRT-PCR: Universal Probe Library System	(Roche)
Turbo-DNA-free™ Kit	(Ambion)
VenorGeM Mykoplasmandetektionskit	(Minerva-Biolabs)

### 3.1.9 Laborgeräte

Autoklav: Varioklav	(Thermo Electron Corporation)
CellCounter: Countess™	(Invitrogen)
Dokumentation von Agarosegelen und Western-Blots: Molecular Imager ChemiDoc XRS System	(Bio-Rad)
Elektrophorese-Kammer für Agarosegele	(von Keutz)
Elektrophorese-Kammer für SDS-Page	(von Keutz)
Facs Calibur	(Becton Dickinson)
FPLC (Flüssigchromatographie)	(Bio-Rad)
Elektroblot-Apparatur: Trans-Blot SD	(Bio-Rad)
Heizblock: Thermomixer comfort	(Eppendorf)
Inkubator (Bakterien)	(Heraeus)
Inkubator (eukaryotische Zellen): HeraCell150i	(Thermo Scientific)
Magnetrührer	(IKA-COMBIMAG-RET)
Mikroskope	(Zeiss/Leica)
NanoDrop	(PiqLab)
pH meter: PHM220	(Radiometer, Meterlab)
Power-Supply für Gelelektrophorese	(Amersham Biosciences)
Rotator: Sample Mixer	(Dyna)
Schüttler (Bakterien): Multitron	(Infors HT)

Spectrophotometer: Helios, Unicam	(Gene-Quantpro)
Sterilbank: Hera Safe	(Heraeus)
Thermocycler: Biometra T Gradient	(Applied Biosystems)
Vortexer: VV3	(VWR)
Waagen: PC-4400, delta range	(Mettler)
Wasserbad	(GFL)
Zentrifugen: 5810R	(Eppendorf)
5417R	(Eppendorf)
4K15	(Sigma)

### 3.1.10 Verbrauchsmaterialien

0,2 µm Filter	(Sarstedt)
0,5 µm Filter	(Pall)
Centriplus Centricons	(Millipore)
Chamber slide <sup>TM</sup> (LabTek): chambered coverslips	(Thermo Scientific)
Cryotubes	(Nunc)
Facs-Röhrchen	(Becton Dickinson)
Glaswaren	(Fisher/Schott)
Migrations-Zellkultureinsätze	(Ibidi)
Mono S 5/50 GL Säule	(GE Healthcare)
Nitrocellulose-Membran	(Whatman)
Petrischalen	(Greiner Bio-One)
Pipettenspitzen	(Sarstedt/Brand)
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	(Corning)
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	(Sarstedt)
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	(Greiner Bio-One)
Whatman Filterpapier	(Schleicher & Schnell)
Zellkulturplastikwaren	(PAA)
Zellschaber	(Nunc)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Kultur von Bakterien

Die hier verwendeten Bakterien wurden nach allgemein gültigen Arbeitsprotokollen ausgestrichen und kultiviert. Staphylokokken-Stämme und *Escherichia coli* wurden auf Blutplatten ausgestrichen und in LB-Medium kultiviert. Bei der Kultivierung von konstitutiv GFP-exprimierendem SA113 wurde das LB-Medium (Difco) mit 10 µg/ml Erythromycin supplementiert. Wundisolate von *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus lugdenensis* wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen und in TSB-Medium (Difco) kultiviert. Für Standardexperimente wurden 10 ml Kultur in 100 ml Glaskolben mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte inokuliert und über Nacht (12-14 Stunden) bei 150 rpm und 37 °C aerob bebrütet.

##### 3.2.1.1.1 Stammhaltung

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden Glycerindauerkulturen verwendet. Dazu wurden 10 ml LB Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht (12 -14 Stunden) bei 37 °C im Schüttler bebrütet. 1 ml dieser Kultur wurde mit 1 ml Glycerin (80 %) versetzt, in Cryoröhrchen überführt und bei - 70°C gelagert.

#### 3.2.1.2 Kultur von eukaryotischen Zellen

Die Kultivierung aller verwendeten eukaryotischen Zellen erfolgte in einem Inkubator (ThermoScientific) in feuchter Atmosphäre bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 %. Alle Arbeiten wurden an einer Sterilbank (Heraeus) durchgeführt. HaCaT wurden in MCDB<sup>+</sup> Medium (Biochrom) kultiviert, während primäre Keratinozyten serumfrei in KBM<sup>+</sup> Medium (Lonza) gehalten wurden.

##### 3.2.1.2.1 Subkultivierung

Die Zellen wurden bei Erreichen von 80-90 % Konfluenz regelmäßig gesplittet. Dazu wurden sie mit PBS gewaschen und mit einem kleinen Volumen Trypsin-EDTA (PAA) bedeckt. Sobald alle Zellen abgekugelt waren, erfolgte der Übergang in Suspension durch vorsichtiges Klopfen. Daraufhin wurde die Trypsinaktivität durch Zugabe von MCDB<sup>+</sup> oder Trypsin Neutralizing Solution (Promo Cell) gestoppt, die Zellen pelletiert

(500 g, 5 min) und in entsprechendem Medium resuspendiert. Je nach Bedarf wurden die Zellen verdünnt und in neue Kulturgefäße überführt. HaCaT wurden in der Regel 1:10 und primäre Keratinozyten 1:15 gesplittet. Für Versuche wurden die Passagen zwei bis fünf der primären Keratinozyten verwendet, HaCaT wurden maximal für 24 Passagen in Kultur gehalten.

#### 3.2.1.2.2 Einfrieren und Auftauen

Zur Erhaltung der Zelllinien wurden diese in der Gasphase über flüssigem Stickstoff gelagert. Hierfür wurden sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindende Zellen nach dem Trypsinieren in vorgekühltem Einfriermedium (Kulturmedium ohne Antibiotika, mit 30 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert ( $1 \times 10^7$  Zellen/ml), um die Bildung von Eiskristallen zu vermeiden. Aliquots zu je 1 ml wurden in Cryotubes (Nunc) über Nacht langsam auf  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gebracht. Anschließend wurden sie zur Langzeitaufbewahrung in die Gasphase über flüssigem Stickstoff überführt.

Um eingefrorene Zellen in Kultur zu nehmen, wurden diese möglichst schnell bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad aufgetaut und sofort in entsprechendes, vorgewärmtes Medium überführt. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt, um DMSO-Rückstände zu entfernen. Nach zwei bis drei Tagen begann die normale Subkultivierung der Zellen.

#### 3.2.1.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Zum Aussäen einer bestimmten Zellzahl und beim Einfrieren von Zellen ist die genaue Kenntnis der vorhandenen Zellzahl erforderlich. Die Zelldichte einer Suspension wurde mit einem „cell counter“ (Invitrogen) bestimmt. Dazu wurden  $10\text{ }\mu\text{l}$  der Zellsuspension mit  $10\text{ }\mu\text{l}$  Trypanblau (0,5%) (Invitrogen) verdünnt, in Cover slips gegeben und vom Gerät automatisch ausgezählt. Die Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen fand dabei mit Hilfe von Trypanblau statt. Lebende Zellen mit intakter Zellmembran nehmen diesen Farbstoff nicht auf, wohingegen er bei toten Zellen ins Zytoplasma gelangt und sich dort anreichert. Darum erscheinen tote Zellen nach der Farbstoffzugabe mikroskopisch bläulich angefärbt.

#### 3.2.1.2.4 Test auf Mykoplasmen mittels PCR

Nach dem Auftauen bzw. der Isolation, sowie nach zwei Monaten in Kultur wurden alle Zellen auf Mykoplasmen getestet. Hierzu wurde das VenorGeM-Mykoplasmen-Detektionskit (Minerva-Biolabs) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Dabei wird durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ein Abschnitt der 16S rRNA Region des Mykoplasmen-genoms vervielfältigt. Das amplifizierte PCR-Produkt hat eine Größe von ca. 267 bp und wurde in einem 2 %igen Agarosegel (2 g Agarose in 100 ml TAE gelöst; 0,0015% Ethidiumbromid zur Detektion) nachgewiesen.

### **3.2.2 Herstellung und Überprüfung einer SA113 *eap*-Mutante**

#### **3.2.2.1 Phagentransduktion**

Bei der Phagentransduktion wird genetisches Material eines Donors von einem Bakteriophagen während dessen Vermehrungszyklus aufgenommen und bei der anschließenden Infektion des Rezipienten in diesen eingeführt (transduziert). Diese Methode wurde zur Übertragung des *Eap*-Gen-Knockouts -bei dem das Gen durch eine Erythromycin-Resistenzkassette ersetzt wurde- von Newman mAH12 in SA113 verwendet. Dabei werden während des lytischen Zyklus alle viralen Komponenten in den mit Phagen infizierten Bakterien synthetisiert. Die neuen Phagen setzen sich anschließend durch „self-assembly“ zusammen, wobei zusammen mit der Phagen-DNA bakterielle DNA-Bruchstücke in die Phagen integriert werden können. Nach der Lyse der Bakterien werden die Phagen aufgereinigt und mit dem Empfängerstamm inkubiert. Infiziert solch ein Phage eine Bakterienzelle, folgt der Einbau des zu übertragenden bakteriellen DNA-Fragments in das bakterielle Genom durch homologe Rekombination. Auf erfolgreiche Insertion wird mit Hilfe der Resistenzkassette selektioniert.

#### *Herstellung des Phagenlysats*

Der Ausgangsstamm Newman mAH12 mit dem zu übertragenden *Eap*-Knockout wurde in 20 ml LB angesetzt und über Nacht bebrütet (37 °C, 150 rpm). Zu der Übernachtskultur wurden 100 µl 1 M CaCl<sub>2</sub> gegeben und jeweils 300 µl dieser Mischung in 6 sterile Glasröhrchen überführt. Zu jedem Röhrchen wurden 100 µl Phagensuspension (5 µl des Phagen 85 wurden mit 135 µl Phagenpuffer [4 ml LB mit 5 mM CaCl<sub>2</sub>] versetzt und 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-5</sup> verdünnt) einer Verdünnung gegeben und

15 Minuten bei RT inkubiert. Jeder Ansatz wurde zusammen mit 4 ml 50 °C warmem LB-softy mit 5 mM CaCl<sub>2</sub> auf eine Blutagarplatte gegossen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Tag wurde die Platte mit optimaler Phagenverdünnung ausgewählt, welche durch das Vorhandensein eines gerade nicht konfluierenden Plaquemusters gekennzeichnet ist. Um die Phagen aus dem Softagar zu extrahieren wurden 2 ml LB mit 5 mM CaCl<sub>2</sub> zugegeben, die Softagarschicht mit einem Glasspatel zerkleinert, gevortext und der Agar durch Zentrifugation bei 9000 rpm für 10 Minuten von dem Phagenlysat abgetrennt. Dieses wurde sterilfiltriert (0.2 µm Filter) und bei 4 °C gelagert.

### *Transduktion*

Der in 20 ml LB über Nacht (37 °C, 150 rpm) kultivierte Empfängerstamm SA113 wurde wie bei der Herstellung des Phagenlysats beschrieben mit dem gewonnenen Phagenlysat gemischt (Verdünnungen 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-5</sup> in Phagenpuffer) und 15 Minuten bei RT inkubiert. Jeder Ansatz wurde mit 4 ml 50 °C warmem LB-softy ohne Zusatz von CaCl<sub>2</sub> auf LB-Platten mit 5 µg/ml Erythromycin gegossen und über Nacht bei 37 °C bebrütet, da der Ausgangsstamm Newman mAH12 an Stelle der Deletion eine Resistenzkassette gegen Erythromycin besitzt. Nach 24-48 Stunden bei 37 °C wurden in der Regel Transduktanten selektioniert und sowohl phänotypisch (Western-Blot, vgl. 3.2.2.2) als auch mittels "pulsed-field" Gelelektrophorese (PFGE, vgl. 3.2.2.3) überprüft.

### **3.2.2.2 Kontrolle der Eap-Expression durch Oberflächenprotein-Extraktion und Western-Blot-Analyse**

Die bei der Phagentransduktion erhaltenen Transduktanten mit dem *eap*-Knockout aus Newman mAH12 wurden phänotypisch auf die Expression von Eap überprüft. Dazu wurden 10 ml LB-Medium mit einer OD<sub>600</sub> von 0,1 aus Übernachtskulturen der Transduktanten und zur Kontrolle auch des Wildtyps (SA113) angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 150 rpm bebrütet bis eine OD<sub>600</sub> von ca. 1,0 erreicht wurde (ca. 1,0 x 10<sup>9</sup> Zellen/ml). Dadurch, dass sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, sollte gewährleistet werden, dass in allen Proben eine möglichst geringe Anzahl an toten Zellen vorhanden ist. Nachdem die Kulturen zweimal mit PBS gewaschen wurden, wurde das Pellet in 300 µl 125 mM Tris-HCl mit 2 % SDS resuspendiert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß

überführt und 7 Minuten bei 95 °C inkubiert, um die Oberflächenproteine zu extrahieren. Durch Zentrifugieren (4 °C, 10000 g, 10 min) wurden die Bakterien vom Überstand mit den Oberflächenproteinen abgetrennt. Dieser wurde abgenommen und bei -20 °C gelagert. Jeweils 30 µl des Überstandes wurden mit 10 µl 4 x LD gemischt und erhitzt (10 min, 85 °C). Die so vorbereiteten Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine Western-Blot-Analyse (vgl. 3.2.3.2 und 3.2.3.3) mit anti-Eap-Antikörpern auf die Anwesenheit von Eap überprüft.

### 3.2.2.3 “Pulsed field“ Gelelektrophorese

Bei der Phagentransduktion einer Deletion von einem *S. aureus* Isolat in ein anderes, können bei der Infektion des Empfängerstammes größere genetische Rearrangements in dessen Genom auftreten. Um diesen unerwünschten Nebeneffekt in den erhaltenen Transduktanden auszuschließen und, um sicherzustellen, dass keine Kontaminanten selektioniert wurden, wurde eine “pulsed field“ Gelelektrophorese (PFGE) durchgeführt. Hierbei wird der “genetische Fingerabdruck“ der erhaltenen Transduktanden mit dem des Ausgangsstammes verglichen. Dazu werden die aus dem Verdau mit SmaI (einem Restriktionsenzym, welches nur selten innerhalb des Genoms von *S. aureus* schneidet) resultierenden Genomfragmente, die mehrere 100 kb lang sein können, durch das PFGE-Verfahren elektrophoretisch aufgetrennt. Bei dieser Sonderform der gelbasierenden, elektrophoretischen Auftrennung, wird die Trennung der großen DNA-Fragmente durch ihre unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit in einem seine Richtung regelmäßig wechselnden Feld erreicht. Diese Untersuchung wurde im Diagnostiklabor unseres Instituts durchgeführt.

## 3.2.3 Proteinbiochemische Methoden/Protein-Analytik:

### 3.2.3.1 Aufreinigung von Eap aus dem *S. aureus* Stamm Newman

Natives Eap wurde wie von Athanasopoulos beschrieben aus Newman aufgereinigt (Athanasopoulos *et al.*, 2006). Dazu wurden jeweils 5 ml einer Übernachtskultur in 4 x 500 ml MBB überführt und bei 37 °C und 150 rpm über Nacht kultiviert. Die Kulturen wurden bei 4 °C und 5000 g für 15 Minuten pelletiert. Nach dem Waschen mit 150 ml PBS, wurden sie in je 60 ml 1 M LiCl (pH 5,4 – 5,6) resuspendiert und für 2 Stunden bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Durch Zentrifugation (4 °C, 5000 g, 15 min) wurden

die zellulären Bestandteile vom Überstand abgetrennt und dieser in sechs 20 cm lange Dialyseschläuche (Größe 10, Inf Dia 1/4", 31.7 mm: 15M Approx., Medicell International Ltd) überführt. Die Dialyseschläuche wurden vor der Nutzung 10 Minuten in 800 ml 2 % NaHCO<sub>3</sub> mit 1 mM EDTA (pH 8.0) gekocht, nochmals 10 Minuten in 800 ml 1 mM EDTA (pH 8.0) gekocht und mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Proben wurden anschließend zweimal etwa 45 Minuten in 3 l PBS bei 4 °C unter Rühren dialysiert. Zum Konzentrieren der Proteinprobe wurden die Schläuche mit PEG (Polyethylenglykol) bestreut und bei 4 °C für 1 – 2 Stunden inkubiert. Darauf wurden alle Proben vereinigt und sterilfiltriert (0,2 µm Filter). Dann wurde Eap durch FPLC (BioLogic DuoFlow, Bio-Rad) über eine Mono S 5/50 GL Säule (GE Healthcare) mittels Kationen-Austauschchromatographie weiter aufgereinigt: die Matrix der Mono S Säule besitzt negativ geladene Sulfonat-Gruppen, welche positiv geladene Proteine wie Eap binden können, während ungeladene oder negativ geladene Proteine von der Säule gewaschen werden. Danach können die gebundenen Proteine mit einem Elutionspuffer, der eine hohe Salzkonzentration besitzt und in einem linearen Gradienten zugegeben wird, wieder von der Säule gelöst werden. Jedes Protein wird aufgrund seiner Bindungseigenschaften bei einer bestimmten Salzkonzentration durch die positiven Ionen des Elutionspuffers von den Bindungsstellen der Matrix verdrängt und von der Säule eluiert. Zum Waschen der Säule wurde Puffer A (50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8,2) und zum Eluieren von Eap ein linearer Gradient aus Puffer A und Puffer B (50 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8,2) verwendet. Das Eluat wurde in Fraktionen von je 2 ml aufgefangen, diese wurden mittels SDS-PAGE überprüft und die Eap-positiven Fraktionen vereinigt. Die Aufkonzentrierung und Umpufferung dieser Proben erfolgte mit Hilfe von Centricons (Centriplus, Millipore) nach Herstellerangaben. Das aufgereinigte Protein wurde sterilfiltriert und bei -70 °C eingefroren. Eap wurde von Julia Schmitt und Karin Hilgert aufgereinigt (Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Uniklinik Homurg). Zur Konzentrationsbestimmung von Eap wurde das BCA<sup>TM</sup> Kit (Thermo Scientific) verwendet. Endotoxin-Freiheit wurde mit Hilfe des Limulus Amoebocyte Lysate-Kits (Lonza) getestet. Beide Kits wurden nach den Angaben der jeweiligen Hersteller durchgeführt. Um eine Kontamination der Aufreinigung mit LTA auszuschließen, wurde in den Versuchen eine Kontrolle mit durch Proteinase K verdautem Eap mitgeführt.

### 3.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Bei der SDS-Page werden Proteine entsprechend ihrer Molekülgröße elektrophoretisch aufgetrennt. Nachdem das anionische Detergenz SDS an die Proteine gebunden hat, weisen sie eine konstante, negative Ladungsverteilung auf, so dass die Wanderung im elektrischen Feld nicht mehr von der Eigenladung der Proteine, sondern von der Molekülgröße abhängt.

Das „engmaschige“ Trenngel, in welchem die Größenauftrennung stattfindet, hatte in der Regel einen Acrylamidgehalt von 10 % und wurde nach Zugabe von APS und TEMED zwischen zwei Glasplatten gegossen. Nach der Polymerisation wurde es mit dem „weitmaschigen“ 5%igen Sammelgel, welches der Aufkonzentrierung der Proben dient, überschichtet. Das vollständig auspolymerisierte Gel wurde in die Gelkammer gespannt und mit SDS-Laufpuffer überschichtet. Die Proteinproben wurden in 4 x LD aufgenommen und für 10 Minuten bei 85 °C gekocht, bevor sie in die Taschen des Sammelgels eingefüllt wurden. Die Proteinauftrennung erfolgte bei 100 V. Nach der Auftrennung, wurde eine Immunoblot-Analyse (vgl. 3.2.3.3) angeschlossen, um einzelne Proteine mit spezifischen Antikörpern zu detektieren.

### 3.2.3.3 Immunoblot-Analyse (Western-Blot)

Bei der Immunoblot-Analyse (Western-Blot) werden zuvor durch SDS-Page separierte Proteine antikörpervermittelt detektiert. Dazu wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Acrylamidgel durch Elektrotransfer in einer Blot-Kammer (Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell, Bio-Rad) auf eine Protan Nitrocellulose Membran (Whatman) übertragen. Membran und Filter wurden zuvor im Transferpuffer inkubiert. Zum Blotten wurde für 1 Stunde eine von der Anzahl und Größe der Blots abhängige Stromstärke angelegt (eine Membran: 55 mA; zwei Membranen: 110 mA). Danach wurden die noch freien Bindungsstellen der Membran für 1 Stunde in 3%iger Magermilch in TBS/T geblockt. Anschließend wurde die Membran mit dem für das zu detektierende Protein spezifischen primären Antikörper (verdünnt in 3%iger Magermilch) bei 4 °C über Nacht inkubiert (vgl. 3.1.4). Im Anschluss wurde 3x für 15 Minuten bei RT mit TBS/T gewaschen und der entsprechende Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelte Sekundärantikörper für 1 Stunde bei RT zugegeben. Um ungebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran erneut 3x für 15 Minuten bei RT gewaschen, bevor die Banden mit Hilfe des ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) sichtbar gemacht wurden. Dabei wird

das in der ECL-Lösung enthaltene Substrat von HRP unter Abstrahlung von Lumineszenz umgesetzt. Diese Lumineszenz wurde mit dem Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Bio-Rad) dokumentiert. Die Bandenintensität wurde mit QuantityOne (Bio-Rad) bestimmt und jeweils auf GAPDH oder  $\beta$ -actin als Ladungskontrolle normalisiert.

#### **3.2.3.4 Ernten von Ganzzell-Lysaten**

Zur Gewinnung des Gesamtzellproteins, wurden die Zellen einer 6-Loch-Platte zweimal mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 350  $\mu$ l kaltem RIPA-Puffer lysiert. Die lysierten Zellen wurden abgeschabt, in Eppendorfgefäß überführt und 15 sec bei 50 Watt sonifiziert. Anschließend wurden Zelldebris bei 5000 g 10 Minuten pelletiert. Jeweils 30  $\mu$ l des Überstandes wurden mit 10  $\mu$ l LD versetzt, 10 Minuten bei 85 °C gekocht und mittels SDS-Page und Western-Blot analysiert. Während der gesamten Versuchsdurchführung befanden sich die Proben auf Eis, um Proteindegradation zu verhindern.

#### **3.2.3.5 Zellfraktionierung**

Um das Gesamtzellmaterial in drei Fraktionen (Zelldebris/Nuclei, Zellmembran, Cytosol) aufzutrennen, wurde eine grobe Zellfraktionierung mittels Zentrifugation durchgeführt. Dazu wurden die Zellen einer 6-Loch-Platte zweimal mit PBS gewaschen, mit 400  $\mu$ l kaltem Homogenisierungspuffer abgeschabt und in Eppendorfgefäße überführt. Die Proben wurden 20 sec bei 50 Watt sonifiziert, anschließend wurden grobe Zelldebris und die Nuclei 5 Minuten bei 500 g und 4 °C abzentrifugiert. Die oberen 350  $\mu$ l des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Pelletierung der Membran erfolgte durch 45 minütige Zentrifugation bei 20.000 g und 4 °C. Die oberen 200  $\mu$ l des so entstandenen Überstandes entsprachen der Cytosol-Fraktion und wurden erneut in ein Reaktionsgefäß überführt, während der untere Teil des Überstandes verworfen wurde. Das membranhaltige Pellet wurde mit Homogenisierungspuffer gewaschen und anschließend in 200  $\mu$ l Homogenisierungspuffer mit 1 % TritonX100 resuspendiert.

Jeweils 24  $\mu$ l der Cytosol- und Membran-Fractionen wurden mit 8  $\mu$ l LD versetzt, 10 Minuten bei 85 °C gekocht und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Während der gesamten Versuchsdurchführung befanden sich die Proben auf Eis, um

Proteindegradation zu verhindern. Da Cadherin nur in der Membran und GAPDH nur im Cytosol vorhanden ist, wurde die Reinheit der Fraktionen durch Detektion dieser Proteine im Western-Blot überprüft.

### **3.2.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA- und Bradford-Assay)**

Die Konzentration von Proteinproben wurde entweder mit dem BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit (Thermo Scientific) oder mit dem Bradford Assay (BioRad) bestimmt. Ersteres beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  durch Proteine, wobei Cystein, Cystin, Tyrosin, Tryptophan und die Peptidbindung reduzierend wirken. Der violette Farbkomplex, welcher von BCA und  $\text{Cu}^+$  gebildet wird und ein Absorptionsmaximum von 562 nm besitzt, kann photometrisch gemessen werden. Das Prinzip der Proteinbestimmung nach Bradford besteht darin, dass in saurer Lösung befindliches Coomassie Brilliant-Blau G-250 an kationische und unpolare Teile von Proteinen bindet und daraus eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von  $\lambda = 465$  nm nach  $\lambda = 595$  nm resultiert, welche photometrisch gemessen werden kann. Beide Assays wurden nach den Angaben der Hersteller durchgeführt. Dazu wurde jeweils eine Eichgerade mit verschiedenen Mengen an Rinderserumalbumin (BSA) (5 bis 200  $\mu\text{g}$ ) erstellt, um aus den gemessenen Absorptionen die Regressionsgerade zu berechnen, mit deren Hilfe die Proteinkonzentration der Proben ermittelt werden konnte.

### **3.2.3.7 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Eap**

Natives Eap (26  $\mu\text{g}$ ) wurde in 1 x alkalischer Phosphatase-Puffer (Fermentas) mit 1  $\mu\text{l}$  alkalischer Phosphatase (Fermentas) 30 Minuten bei 37°C inkubiert, um es zu dephosphorylieren, oder in Acetylphosphat-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4) mit 4,2 mM Acetylphosphat (Fluka), um es zu phosphorylieren. Das unbehandelte Eap wurde ebenso inkubiert. Anschließend wurde mit MCDB<sup>-</sup> Medium auf 650  $\mu\text{l}$  aufgefüllt (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Pro Ansatz wurden 300  $\mu\text{l}$  davon eingesetzt. Um einen Effekt der alkalischen Phosphatase oder von Acetylphosphat auf die Internalisierung auszuschließen, wurde ein weiterer Ansatz, bei dem Eap durch das gleiche Volumen PBS ersetzt wurde, im Versuch verwendet.

### 3.2.4 Infektionsexperimente

Keratinozyten wurden so in 24-Loch Platten ausgesät, dass nach eintägiger Kultivierung Konfluenz erreicht wurde (ca.  $4,0 \times 10^5$  Zellen/Loch). Um gereifte Keratinozyten zu generieren, wurden die konfluenten Zellen für weitere 2 bzw. 7 Tage kultiviert.

Die Keratinozyten wurden mit Eap in den angegebenen Konzentrationen (0,3 ml pro Ansatz, in MCDB<sup>-</sup> verdünnt) 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde mit PBS gewaschen, um überschüssiges Eap zu entfernen, und 0,3 ml MCDB<sup>-</sup> zugegeben. Währenddessen wurden die Bakterien 5 Minuten bei 4000 rpm pelletiert, mit PBS gewaschen und in PBS resuspendiert. Filtration durch einen 0,5 µm Filter diente der Vereinzelung der Bakterien. Danach wurden die OD<sub>600</sub> gemessen und eine 10<sup>-6</sup> Verdünnung zur Kontrolle der aus der OD<sub>600</sub> berechneten CFU ausplattiert. Die Keratinozyten wurden mit 100 Bakterien pro eukaryotischer Zelle (Moi, multiplicity of infection) inokuliert. In der Regel wurden die infizierten Zellen 90 Minuten bei 37 °C ko-kultiviert.

#### 3.2.4.1 Adhäsionsassay

Vor der Bestimmung der bakteriellen Adhäsion wurden die infizierten Zellen gründlich mit PBS gewaschen, um ungebundene Bakterien zu entfernen. Die darauffolgende Zugabe von 0,5%igem Trypsin (Biochrom) resultierte im Ablösen der infizierten Keratinozyten, welche anschließend durch die Zugabe von Wasser und Sonifizierung (50 Watt, 15 sec) lysiert wurden. Die daraus resultierenden adhären (und aufgrund der vergleichbar geringen Zahl vernachlässigbaren, intrazellulären) Bakterien wurden seriell verdünnt und die „colony forming units“ (CFU) durch Ausplattieren auf Müller-Hinton Agarplatten bestimmt.

#### 3.2.4.2 Internalisierungsassay

Nach der Infektionszeit (in der Regel 90 Minuten) wurde das Medium durch 0,2 ml MCDB<sup>-</sup> mit 20 µg/ml Lysostaphin (Genmedics) und 100 µg/ml Gentamycin (Merck) ersetzt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, um die extrazellulären, nicht internalisierten Bakterien abzutöten. Nach dem Waschen mit PBS resultierte die Zugabe von 0,5%igem Trypsin (Biochrom) im Ablösen der infizierten Keratinozyten, welche anschließend durch die Zugabe von Wasser und Sonifizierung (50 Watt, 15 sec)

lysiert wurden. Die intrazellulären Bakterien wurden seriell verdünnt und die „colony forming units“ (CFU) durch Ausplattieren auf Müller-Hinton Agarplatten bestimmt.

#### 3.2.4.2.1 Analyse der Internalisierung mit Durchflusszytometrie (Facs-Analyse)

Das Internalisierungsassay wurde wie oben beschrieben mit HOM 70 (SA113 GFP), welcher konstitutiv GFP exprimiert, durchgeführt. Nach dem Ablösen der infizierten Keratinozyten mit Trypsin, erfolgte die Analyse durch „fluorescence-activated cell sorting“ (Facs, CellQuestPro, Becton Dickinson). Gleichzeitig konnten Proliferation und Apoptose im Facs gemessen werden (vgl. 3.2.5.1 und 3.2.5.2).

#### 3.2.4.2.2 Langzeitkultivierung

Das Internalisierungsassay wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Nach dem Verdau der extrazellulären Bakterien wurden die infizierten Keratinozyten in Anwesenheit von 100 µg/ml Gentamycin bis zu 48 Stunden weiter kultiviert bevor die internalisierten Bakterien wie beschrieben bestimmt wurden.

#### 3.2.4.2.3 Inhibition der Internalisierung

HaCaT-Zellen wurden mit Cytochalasin D, Genistein oder Src-Inhibitor 1 in den angegebenen Konzentrationen 1 Stunden bei 37°C vorinkubiert. In Experimenten mit Eap-Vorinkubation erfolgte dies in Anwesenheit von 40 µg/ml Eap. Anschließend wurde die Internalisierung wie oben beschrieben mittels Internalisierungsassay bestimmt.

### **3.2.5 Untersuchung der Eigenschaften von Keratinozyten mit Zellkultur-Assays**

#### **3.2.5.1 Proliferationsassay mit dem Click-it® Edu Flow Cytometry Assay Kit**

Bei Edu (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) handelt es sich um ein Nukleosid-Analogon von Thymidin, welches während der bei der Proliferation stattfindenden DNA-Synthese in die DNA eingebaut wird. Dieses kann durch eine von Cu<sup>2+</sup> katalysierte, kovalente Bindung eines Alexa-Fluor® 647 gekoppelten Azids detektiert werden.

Dazu wurde in zu 50 % konfluente 6-Loch Platten 1,5 ml Proliferationsmedium (MCDB<sup>-</sup> für HaCaT, KBM<sup>-</sup> für NHEK mit jeweils 50 ng/ml KGF; oder MCDB<sup>+</sup> für HaCaT; KBM<sup>+</sup> für NHEK) mit den angegebenen Eap-Konzentrationen gegeben und

für 16 Stunden bei 37 °C weiterkultiviert (0-20 µg/ml; 20 µg/ml mit Proteinase K verdautes Eap diente als Negativkontrolle). Bei HaCaT-Zellen wurde nach 13 Stunden 3 µl Edu pro Loch hinzugefügt, während dies bei NHEK aufgrund der langsameren Proliferationsrate bereits nach 4 Stunden geschah. Im Anschluss an die 16 Stunden-Inkubation wurde Edu entsprechend der Herstellerangaben detektiert. Dabei wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert bevor die kovalente Reaktion zwischen Edu und dem Alexa-Fluor® 647 gekoppelten Azid stattfinden konnte. Dieses wurde bei der anschließenden Facs-Analyse detektiert.

### 3.2.5.2 Apoptoseassay

Das Apoptoseassay beruht auf der Bindung von AnnexinV an Serinreste, welche ausschließlich während der Apoptose auf der extrazellulären Zelloberfläche vorhanden sind. Im Gegensatz dazu kann Propidiumiodid nur in Zellen mit einer löchrigen Zellmembran eindringen und diese anfärben. Da das bei spätapoptotischen und nekrotischen Zellen der Fall ist, sind diese mittels Propidiumiodid-Färbung von frühapoptotischen Zellen unterscheidbar.

Dazu wurden 6 bzw. 24 Loch-Platten entweder wie beim Proliferationsassay (vgl. 3.2.5.1) oder wie beim Internalisierungsassay (vgl. 3.2.4.1) beschrieben mit Keratinozyten angeimpft und entsprechend mit Eap und Bakterien inkubiert.

Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen durch Trypsinierung geerntet. Eine Zellzahl von  $10^7$  Zellen/ml wurde in Annexin-Bindungspuffer eingestellt, wovon  $10^6$  Zellen 20 Minuten mit 3 µl AnnexinV-AlexaFluor647 bei RT inkubiert wurden. Die letzten 5 Minuten wurde zu jedem Ansatz zusätzlich 1 µl Propidiumiodid gegeben. Nach dem Waschen mit PBS wurden die gefärbten Zellen mittels Facs analysiert, wobei früh apoptotische Zellen positiv für AnnexinV waren, während spätapoptotische und nekrotische Zellen eine gleichzeitige Färbung mit AnnexinV und Propidiumiodid aufwiesen.

### 3.2.5.3 Migrationsassay

Zur Bestimmung der Migrationsgeschwindigkeit wurde ein Wundassay verwendet. Hierbei wurde eine zellfreie Lücke im konfluenten Zellrasen mit Hilfe von IBidi-Zellkulturinserts generiert und anschließend durch Migration geschlossen. Nach einer bestimmten Inkubationszeit wird die geschlossene Fläche ausgemessen und der Prozentsatz von Proben ohne Zusätze mit dem von Proben mit Zusätzen verglichen.

Dazu wurden Keratinozyten so in 24-Loch Platten mit Ibidi-Zellkultureinsätzen ausgesät, dass nach eintägiger Kultivierung Konfluenz erreicht war (ca.  $1,2 \times 10^6$  Zellen/Loch). Morgens wurde das Medium gegen 1,0 ml Migrationsmedium (MCDB<sup>-</sup> mit 200 ng/ml EGF bei HaCaT, KBM<sup>+</sup> mit 100 ng/ml EGF bei NHEK) mit Eap in den angegebenen Konzentrationen und 5 µl Aphidicolin pro Loch ausgetauscht. Aphidicolin inhibierte die Proliferation zu 99% ohne Apoptose zu induzieren, während EGF die Migration stimulierte. Nach 2 stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellkultureinsätze entfernt. Das dadurch generierte zellfreie Gebiet sollte während der darauffolgenden Inkubation durch Migration geschlossen werden. In den Proben ohne Eap erfolgte dies bei HaCaT in der Regel innerhalb von 8 Stunden und bei NHEK innerhalb von 12 Stunden. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, mit 3,7% Formaldehyd fixiert, mit 0,1% TritonX100 permeabilisiert und mit Dapi angefärbt (1:1000 verdünnt, 30 min RT). Die Dokumentation erfolgte bei 100-facher Vergrößerung an einem Zeiss Mikroskop (Durchlicht und Dapi-Filter).

#### **3.2.5.4 Untersuchung der Keratinozyten-Differenzierung**

Mit zunehmender Differenzierung exprimieren Keratinozyten eine Reihe von Proteinen. Keratin10 wird bereits sehr früh exprimiert, während Involucrin und Filaggrin erst in fast ausdifferenzierten Zellen exprimiert werden. Dementsprechend ist Keratin10 ein geeigneter Marker für frühe Differenzierung und Involucrin bzw. Filaggrin für späte Differenzierung.

Um die Differenzierung von Keratinozyten zu bestimmen, wurden diese so in 6 Loch-Platten ausgesät, dass nach 4 Tagen maximal 80%ige Konfluenz erreicht wurde. Da FCS eine nicht genau angegebene und zudem variable Menge an CaCl<sub>2</sub> enthält, wurden bei diesem Versuch sowohl NHEK als auch HaCaT serumfrei in KBM<sup>+</sup> kultiviert. An Tag 1 nach dem Aussäen wurde das alte Medium entfernt und durch Medium mit Zusätzen ersetzt. Dabei blieb ein Ansatz jeweils unbehandelt, einer wurde mit 3 µg/ml Eap und einer mit 6 µg/ml Eap versetzt, während ein Ansatz als Positivkontrolle diente, indem die Differenzierung mit 1,5 mM CaCl<sub>2</sub> induziert wurde. Nach 3 tägiger Kultivierung mit den Zusätzen, wurden an Tag 4 sowohl Proteine als auch RNA geerntet und mittels Western-Blot und quantitativer Real-time PCR analysiert (qRT-PCR).

#### 3.2.5.4.1 Untersuchung der Zelldifferenzierung durch den Nachweis von Proteinen

Parallel zur Isolierung von RNA für die Real-time PCR wurden von jedem Ansatz auch die Proteine in Form eines Ganzzell-Lysats isoliert. Dies wurde wie unter 3.2.3.4 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden Keratin10, Involucrin und als Ladekontrolle  $\beta$ -actin nach der Größenauftrennung mittels SDS-Page im Western-Blot (vgl. 3.2.3.2 und 3.2.3.3) detektiert.

#### 3.2.5.4.2 Untersuchung der Differenzierung mit quantitativer Real-time PCR

Zur Bestimmung der Transkriptionsrate der Gene, die mit fortschreitender Differenzierung der Keratinozyten verstärkt exprimiert werden, wurde die Methode der quantitativen real-time PCR (qRT-PCR) verwendet. Da die isolierte mRNA nicht mit Hilfe einer PCR detektiert werden kann, wurde sie in cDNA umgeschrieben und in einer anschließenden, quantitativen PCR mit spezifischen Primern und Sonden analysiert.

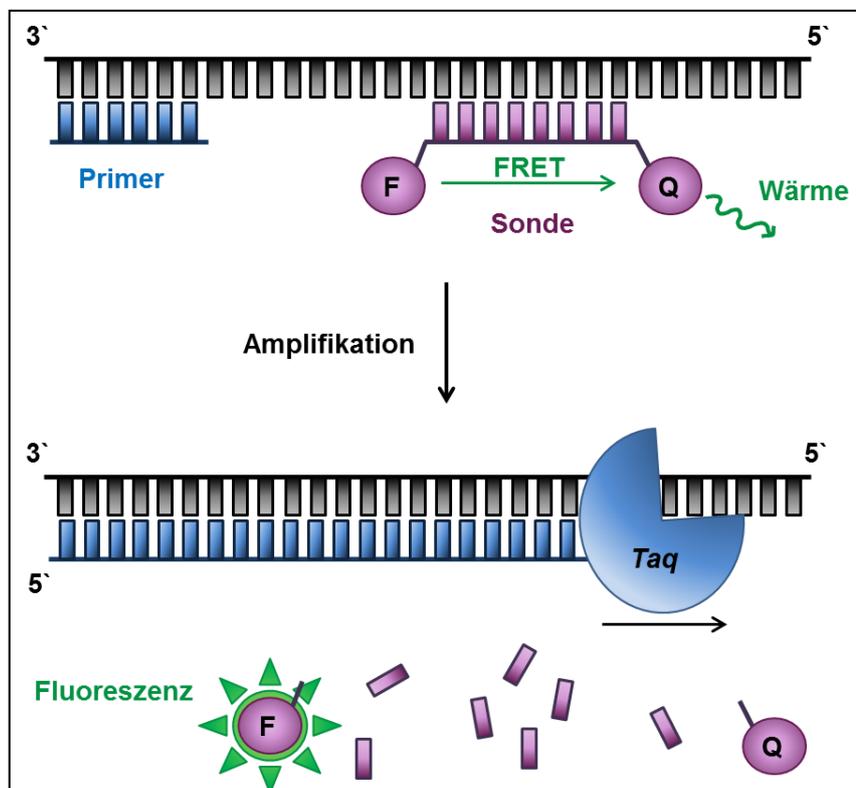
#### *RNA-Isolierung*

Die RNA-Isolierung aus den Keratinozyten wurde mit dem NucleoSpin RNA II-Kit von Macherey-Nagel nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der Homogenisierung wurde das Lysat auf eine Säule aufgetragen. Die Nukleinsäuren wurden von der in der Säule enthaltenen Matrix gebunden, mit DNase behandelt und nach mehreren Waschschritten eluiert. Die Konzentration und Reinheit der so isolierten RNA wurde photometrisch bei 260 nm und 280 nm im NanoDrop bestimmt. Um mögliche Kontaminationen mit DNA zu beseitigen, wurden 5  $\mu$ g jeder Probe erneut mit RNase-freier DNase (Turbo-DNA-free<sup>TM</sup> Kit (Ambion)) nach dem Protokoll des Herstellers behandelt. Anschließend erfolgte die Umschreibung der RNA in cDNA mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) gemäß den Herstellerangaben. Während der 10 minütigen Inkubation bei 25 °C erfolgte die Bindung des oligo dT-Primers an die Poly A(+) -RNA, die zweistündige cDNA-Synthese fand anschließend bei 37 °C statt, gefolgt von einer 2 minütigen Hitzeinaktivierung bei 85 °C.

#### *qRT-PCR*

Bei der quantitativen Real-time PCR wird die gewonnene cDNA nach dem Prinzip der herkömmlichen PCR amplifiziert, gleichzeitig ist die Quantifizierung der neu

gebildeten DNA mittels Hydrolysesonden möglich. Die Sonden stammen aus dem „Universal Probe Library System“ der Firma Roche, welches 165 verschiedene, 8-9 Nukleotid lange Sonden umfasst. Aufgrund der kurzen Sequenz wird fast das gesamte Genom mit diesen Sonden abgedeckt. Bei der Analyse der Keratin10 Transkriptionsrate wurde die Sonde Nummer 45 verwendet, bei Involucrin Sonde Nummer 11 und bei RPL13a Sonde Nummer 28. Am 5` Ende ist jede Sonde mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (6-Carboxyfluorescein-phosphoramidit) (F) und am 3` Ende mit einem dark Quencher (Q) gekoppelt. Die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors wird in den Hydrolysesonden aufgrund der räumlichen Nähe durch Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) auf den Quencher unterdrückt (vgl. Abb. 3-1).



**Abb. 3-1: Quantifizierung der Nucleinsäuren mit Hilfe von Hydrolysesonden bei der qRT-PCR.** Während des PCR-Zyklus hybridisieren Primer und Sonde mit dem komplementären DNA-Strang. Die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors (F) wird bei intakten Hydrolysesonden durch den Quencher (Q) mittels Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) unterdrückt. Bei der Synthese des Gegenstrangs durch die *Taq*-Polymerase wird die Sonde aufgrund der 5'-3'-Exonucleaseaktivität der Polymerase hydrolysiert. Durch die räumliche Trennung von Reporter und Quencher, wird das Fluoreszenzsignal nicht länger unterdrückt und kann gemessen werden.

Dieser gibt die übertragene Energie in Form von Wärme ab. Während eines PCR-Zyklus hybridisieren Primer und Sonde zunächst mit dem komplementären DNA-

Strang (eine Übersicht über die verwendeten Primer und Sonden ist in Tabelle 3-5 gegeben). Anschließend synthetisiert die synthetische Einheit der *Taq*-Polymerase den Gegenstrang. Aufgrund der 5`-3`-Exonucleaseaktivität der Polymerase wird die Sonde dabei hydrolysiert. Durch die räumliche Trennung von Reporter und Quencher, wird das Fluoreszenzsignal nicht länger unterdrückt und wird proportional zu der Menge an PCR-Produkt intensiver. Je stärker das Signal ist und je früher es sich detektieren lässt, desto mehr cDNA befindet sich in dem Ansatz. Die qRT-PCR wurde von Anna Schneider (Institut für Virologie, Uniklinik Homburg) durchgeführt.

Der Mix für die PCR wurde wie folgt zusammenpipetiert:

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
MgCl <sub>2</sub>	2,3,4 oder 5 µM
10 x Taq-Puffer	2 µl
TE-SS 40 ng/µl	1 µl
DMSO	1 µl
Tween 20, 10%	1 µl
BSA 20 ng/µl	0,5 µl
d`NTPs 10 mM	0,4 µl
Sonde 1 µM	0,8 µl
Sense Primer 10 µM	0,5 µl
Antisense Primer 10 µM	0,5 µl
Taq-Polymerase 5 U/µl	0,1 µl
PCR-Wasser	auf 15 µl

15 µl des Mixes wurden pro Loch einer 96 Loch Platte pipetiert und je 5 µl der cDNA Verdünnung dazugegeben. Anschließend wurde die cDNA im LightCycler mit einem PCR-Programm für UPL-Sonden amplifiziert und das Fluoreszenzsignal detektiert.

Um die Menge der cDNA quantifizieren zu können, wird ein Standard benötigt. Dazu wird statt der cDNA eine Verdünnungsreihe eines Plasmides, welches das zu detektierende Gen trägt, in der qRT-PCR eingesetzt. Durch Sequenzierung des Plasmids ist die Größe des Inserts bekannt, so dass die Menge der Amplifikate pro Verdünnung berechnet und mit den gemessenen ct-Werten eine Standardkurve erstellt werden kann. Unter dem ct-Wert (cycle threshold) versteht man die Nummer des Amplifikationszyklus in dem das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant über die

Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Mit Hilfe der Standardkurve lassen sich die Konzentrationen zu den gemessenen ct-Werten berechnen.

Die Expression der mRNA der verschiedenen Gene wurde mit Hilfe des Housekeeping-Gens RPL13a normiert. Diese Werte wurden für die statistische Auswertung benutzt. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden die Werte anschließend auf die Kontrolle ohne Zusätze normiert und in einem Schaubild graphisch dargestellt.

Gen	Primer	Primer-Sequenz	Sonde
<i>involucrin</i>	forward	5'-AAGGGATCAGCAGCTAAACAAA-3'	11
	reverse	5'-TTGATCCAGTTGCTGGTCTAAG-3'	
<i>keratin 10</i>	forward	5'-AAACCATCGATGACCTTAAAAATC-3'	45
	reverse	5'-GCGCAGAGCTACCTCATTCT-3'	
<i>rpl13a</i>	forward	5'-AGCGGATGAACACCAACC-3'	28
	reverse	5'-TTTGTGGGGCAGCATACTC-3'	

**Tab. 3-5: Übersicht über die in dieser Arbeit bei der qRT-PCR verwendeten Primer und Sonden.**

### 3.2.5.5 Erk-Phosphorylierung

Zur Bestimmung der Phosphorylierung von Erk1/2 wurden unter serumreduzierten Bedingungen kultivierte HaCaT nach Eap-Vorinkubation mit KGF stimuliert, um die Phosphorylierung anzuregen. Anschließend wurde das Gesamtzellprotein geerntet und nach Größenauftrennung in der SDS-Page mittels Western-Blot analysiert.

Dazu wurden HaCaT subkonfluent in 6 Loch-Platten ausgesät und über Nacht in MCDB<sup>-</sup> Medium mit 0,5 % FCS kultiviert. Morgens wurde das Medium durch MCDB<sup>-</sup> ersetzt. Nach 4 Stunden wurde Eap in den angegebenen Konzentrationen zu den Ansätzen gegeben und die Zellen eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium möglichst vorsichtig abgenommen, gewaschen und vorgewärmtes MCDB<sup>-</sup> mit 50 ng/ml KGF zugegeben, um die Phosphorylierung von Erk 1/2 zu induzieren. Nach den angegebenen Zeiten wurde das Gesamtzellprotein wie unter 3.2.3.4 beschrieben geerntet, mittels SDS-Page aufgetrennt und in einem Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen phospho-Erk1/2 analysiert (vgl. 3.2.3.2 und 3.2.3.3).

### 3.2.6 Immunfluoreszenz-Färbung

Die Detektion von Eap erfolgte durch monoklonale Maus-anti-Eap-Antikörper oder durch polyklonale Kaninchen-anti-Eap-Antikörper, welche anschließend mit sekundären, Alexa-Fluor®488-konjugierten anti-Maus- bzw. anti-Kaninchen-Antikörpern angefärbt und im Fluoreszenzmikroskop dokumentiert wurden.

#### 3.2.6.1 Immunfluoreszenz-Färbung von extrazellulärem Eap

In „chambered cover-slips“ (LabTek) kultivierte HaCaT-Zellen wurden 1 Stunde bei 37 °C mit 5 µg/ml Eap inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden sie 20 Minuten mit 3,7 % Formaldehyd bei Raumtemperatur fixiert und erneut gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 5 % BSA in PBS (Blockierungslösung) 30 Minuten blockiert. Die Detektion von extrazellulärem Eap erfolgte 2 Stunden bei Raumtemperatur durch monoklonale Maus-anti-Eap-Antikörper (1:1000 verdünnt in Blockierungslösung). Alternativ wurden unspezifische Maus-IgGs gleicher Konzentration als Kontrolle verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit Blockierungslösung wurden die primären Antikörper mittels sekundären, Alexa-Fluor®488 konjugierten anti-Maus-Antikörpern (1:500, 1 h, RT, dunkel) angefärbt. Die gewaschenen HaCaT wurden anschließend durch 30 minütige Inkubation mit 1 % TritonX100 in Blockierungslösung permeabilisiert, worauf die Proben erneut gewaschen und mit einem Mix von Phalloidin-TRITC (1:500) und Dapi (1:2000) in Blockierungslösung für 30 Minuten inkubiert wurden (RT, dunkel), um F-Aktin und Nuclei anzufärben. Schließlich wurden die gefärbten HaCaT fünf Mal in Blockierungslösung gewaschen, in „mounting medium“ (MobiTec) eingedeckt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

#### 3.2.6.2 Immunfluoreszenz-Färbung von intrazellulärem Eap

In „chambered cover-slips“ (LabTek) kultivierte HaCaT-Zellen wurden 1 Stunde bei 37 °C mit 5 µg/ml Eap inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden sie 20 Minuten mit 3,7 % Formaldehyd bei Raumtemperatur fixiert und erneut gewaschen. Extrazelluläres Eap wurde durch Inkubation mit polyklonalen Kaninchen-anti-Eap-Antikörpern in Blockierungslösung blockiert (1:100, 1 h, RT). Die gewaschenen HaCaT wurden anschließend durch 30 minütige Inkubation mit 1 % TritonX100 in Blockierungslösung permeabilisiert, worauf die Proben erneut gewaschen und intrazelluläres Eap 2 Stunden bei Raumtemperatur mit

monoklonalem Maus-anti-Eap-Antikörper (1:1000 verdünnt in Blockierungslösung) detektiert wurde. Alternativ wurden unspezifische Maus-IgGs gleicher Konzentration als Kontrolle verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit Blockierungslösung wurden die primären Antikörper mittels sekundären, Alexa-Fluor®488 konjugierten anti-Maus-Antikörpern (1:500, 1 h, RT, dunkel) angefärbt. F-Aktin und Nuclei wurden mittels Phalloidin-TRITC (1:500) und Dapi (1:2000) markiert. Schließlich wurden die gefärbten HaCaT fünf Mal in Blockierungslösung gewaschen, in „mounting medium“ (MobiTec) eingedeckt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

### 3.2.6.3 Immunfluoreszenz-Färbung von intrazellulär sekretiertem Eap

In „chambered cover-slips“ (LabTec) kultivierte HaCaT-Zellen wurden mit dem *S. aureus* Wundisolat#30 90 Minuten infiziert (Mol 20). Nach dem Verdau der extrazellulären Bakterien wurden die infizierten Keratinozyten in Anwesenheit von 20 µg/ml Lysostaphin und 100 µg/ml Gentamycin 24 Stunden weiter kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen anschließend 20 Minuten mit 3,7 % Formaldehyd bei Raumtemperatur fixiert, erneut gewaschen und durch 30 minütige Inkubation mit 1 % TritonX100 in Blockierungslösung permeabilisiert. Die Blockierung der Antikörper-Bindungsstellen (wie zB Protein A) auf den Bakterien erfolgte durch einstündige Inkubation bei RT mit unspezifischen Maus-IgGs (1:100) in Blockierungslösung. Worauf die Proben erneut gewaschen und Eap 4 Stunden bei Raumtemperatur mit polyklonalen Kaninchen-anti-Eap-Antikörpern (1:20.000 verdünnt in Blockierungslösung) detektiert wurde. Alternativ wurden unspezifische Kaninchen-IgGs gleicher Konzentration als Kontrolle verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit Blockierungslösung wurden die primären Antikörper mittels sekundären, Alexa-Fluor®488-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörpern (1:500, 1 h, RT, dunkel) angefärbt, während die Nuclei gleichzeitig mittels Dapi (1:2000) markiert wurden. Schließlich wurden die gefärbten HaCaT fünf Mal in Blockierungslösung gewaschen, in „mounting medium“ (MobiTec) eingedeckt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

### 3.2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte für abhängige Proben mit dem Rangsummentest von Wilcoxon (Wilcoxon signed-rank test) und für unabhängige Proben mit dem Mann-Whitney U-Test, welche mit dem Programm „R“ durchgeführt wurden. Sofern

nichts anderes angegeben ist, wurde der Rangsummentest von Wilcoxon verwendet. Ein niedrigerer  $p$ -Wert als 0,05 galt als statistisch signifikant (NS = nicht signifikant; \*  $\leq 0,05$ ; \*\*  $\leq 0,01$ ; \*\*\*  $\leq 0,001$ ). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit dem Standardfehler für  $n$  unabhängige, im Duplikat durchgeführte Experimente dargestellt, sofern nichts anderes vermerkt wurde.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Eap ist im Cytosol von Keratinozyten vorhanden

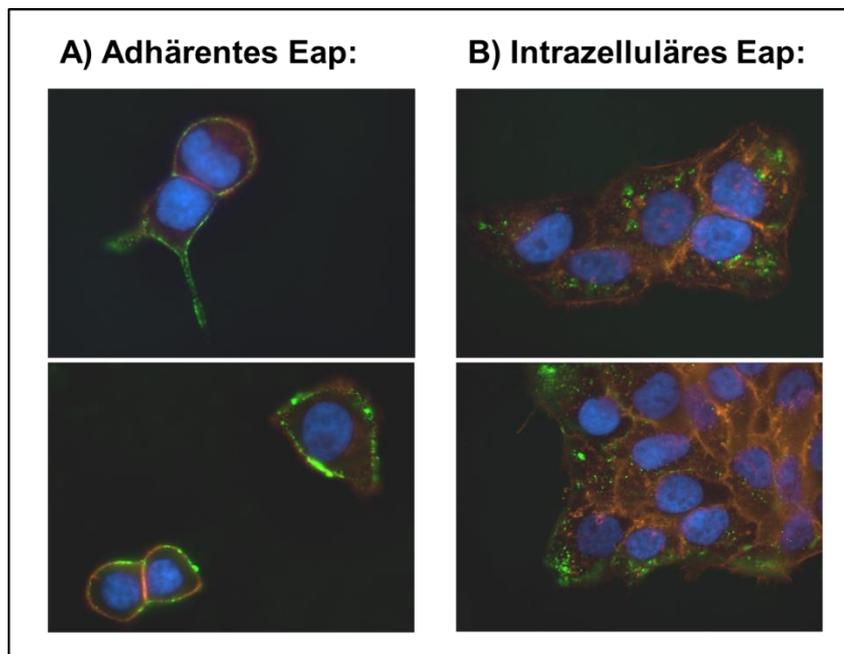
Aufgrund der verstärkten Expression von Eap in Wunden (Joost *et al.*, 2009), ergab sich zunächst die Frage, ob dieses von *S. aureus* sekretierte Protein in das Cytosol von Keratinozyten gelangen kann. Dazu wurden im Folgenden einerseits die Aufnahme von extrazellulärem Eap und andererseits die Expression durch internalisierte Bakterien untersucht.

#### 4.1.1 Aufnahme von extrazellulärem Eap durch Keratinozyten

Um zu untersuchen, ob Keratinozyten von *S. aureus* sekretiertes Eap aufnehmen können, wurden HaCaT-Zellen mit aufgereinigtem Eap inkubiert und anschließend mittels Immunfluoreszenzfärbung oder nach Zellfraktionierung die Cytosol- und Membran-Fractionen im Western Blot analysiert.

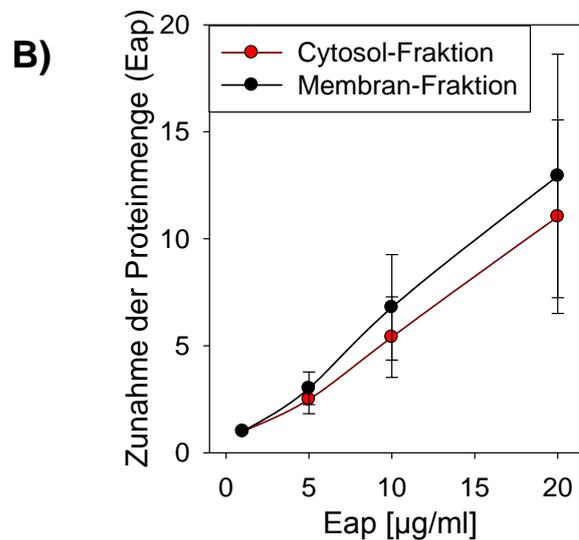
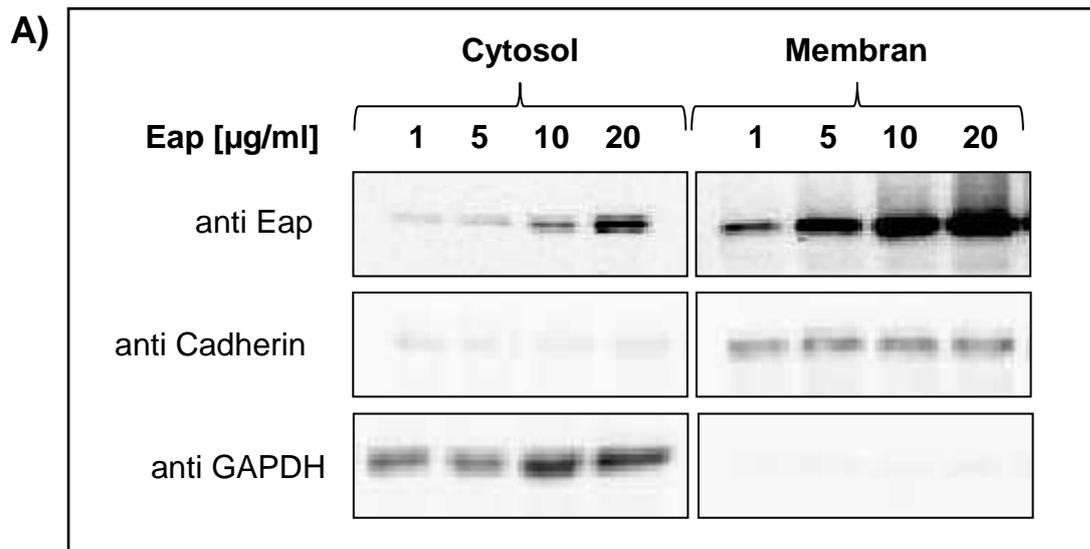
Um nach der Eap-Inkubation extrazelluläres Eap von intrazellulärem Eap mittels Immunfluoreszenzfärbung unterscheiden zu können, wurden zwei verschiedene Färbeprotokolle verwendet (vgl. Material und Methoden 3.2.6). Ohne Permeabilisierung der HaCaT-Zellen resultierte die Inkubation mit Maus- $\alpha$ -Eap-Antikörpern in der Detektion des extrazellulären Eap. Sollte das aufgenommene Eap angefärbt werden, wurde das extrazelluläre Eap zunächst durch Inkubation mit Kaninchen- $\alpha$ -Eap-Antikörpern blockiert. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung der Zellen und die Detektion des intrazellulären Eap mit Maus- $\alpha$ -Eap-Antikörpern. In beiden Versuchen wurden die Maus- $\alpha$ -Eap-Antikörper schließlich mit AlexaFluor®488 konjugierten  $\alpha$ -Maus-Antikörpern angefärbt. Des Weiteren wurden die Nuclei mit Dapi und das Actin-Zytoskelett mit Phalloidin-TRITC sichtbar gemacht. In der Abbildung 4-1 sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen beider Färbungen dargestellt. Adhärentes Eap auf der Zelloberfläche (Abb. 4-7 A) ist ebenso wie intrazelluläres Eap (Abb. 4-7 B) im Cytosol deutlich anhand der grünen Färbung erkennbar. Bei Zellinseln aus mehreren Keratinozyten erfolgte die Aufnahme von Eap hauptsächlich in den am Rand gelegenen Zellen. Die Kontrolle

mit unspezifischen Maus-Antikörpern war nach Färbung mit AlexaFluor®488 konjugierten  $\alpha$ -Maus-Antikörpern negativ (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4-1: Detektion von adhärenthem und internalisiertem Eap durch Immunfluoreszenz-Färbung.** HaCaT-Zellen wurden 1 h mit 5  $\mu$ g/ml Eap inkubiert. Anschließend wurde extrazelluläres (A) und intrazelluläres (B) Eap gemäß dem Immunfluoreszenzfärbungs-Protokoll (vgl. 3.2.6) mit Eap-spezifischen und sekundären AlexaFluor®488 gekoppelten Antikörpern detektiert (grün). Das Aktin-Zytoskelett wurde mit Phalloidin-TRITC (orange) und der Nucleus mit Dapi (blau) angefärbt. Gezeigt sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen (400-fache Vergrößerung).

Dieser erste Hinweis darauf, dass Eap von Keratinozyten aufgenommen wird, sollte nach Fraktionierung des Gesamtzellmaterials mittels Western-Blot bestätigt werden. Nach der Inkubation mit steigenden Eap-Konzentrationen, wurde das geerntete Gesamtzellmaterial dazu durch mehrere Zentrifugationsschritte in drei Fraktionen aufgetrennt: die Membran-Fraktion, die Cytosol-Fraktion und eine Fraktion mit Nuclei und Zelldebris. Anschließend fand die Detektion des adhärenthem Eap in der Membran-Fraktion und des internalisierten Eap in der Cytosol-Fraktion mit  $\alpha$ -Eap-Antikörpern im Western-Blot statt. Abbildung 4-2 A zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Blots, während die Quantifizierung von vier Versuchen in Abbildung 4-2 B dargestellt ist. Dabei wurden die Bandenintensitäten von Eap auf die der jeweiligen internen Kontrolle (Cytosol-Fraktion: GAPDH; Membran-Fraktion: Cadherin) normiert und auf den Wert von 1  $\mu$ g/ml Eap relativiert. Da GAPDH nur im Cytosol vorhanden ist, während Cadherin in der Membran lokalisiert ist, wurde die Reinheit der Fraktionen mit Hilfe dieser Proteine bestätigt (Abb. 4-2 A).



**Abb. 4-2: Detektion von adhärenthem und internalisiertem Eap durch Zellfraktionierung und Western-Blot-Analyse.** HaCaT-Zellen wurden mit den angegebenen Eap-Konzentrationen 15 min inkubiert. Nach Ernte und Fraktionierung des Gesamtzellproteins, wurde Eap in der Membranfraktion und in der Cytosolfraction mittels Western-Blot-Analyse detektiert. In **(A)** ist ein repräsentativer Blot gezeigt und in **(B)** die Quantifizierung der Bandenintensitäten mit anschließender Normierung auf die interne Kontrolle (Cytosol-Fraktion: GAPDH; Membran-Fraktion: Cadherin). Die Werte sind relativ zum Wert der Probe mit 1 µg/ml Eap dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte aus je vier unabhängigen Experimenten mit den jeweiligen Standardfehlern.

Sowohl in der Cytosol- als auch in der Membran-Fraktion war eine konzentrationsabhängige Zunahme von Eap feststellbar (Abb. 4-2 B). Das adhärenthe Eap wurde durch Vorinkubation mit 20 statt 1 µg/ml Eap um den Faktor 12,9 erhöht, während das internalisierte Eap 11,0-fach anstieg.

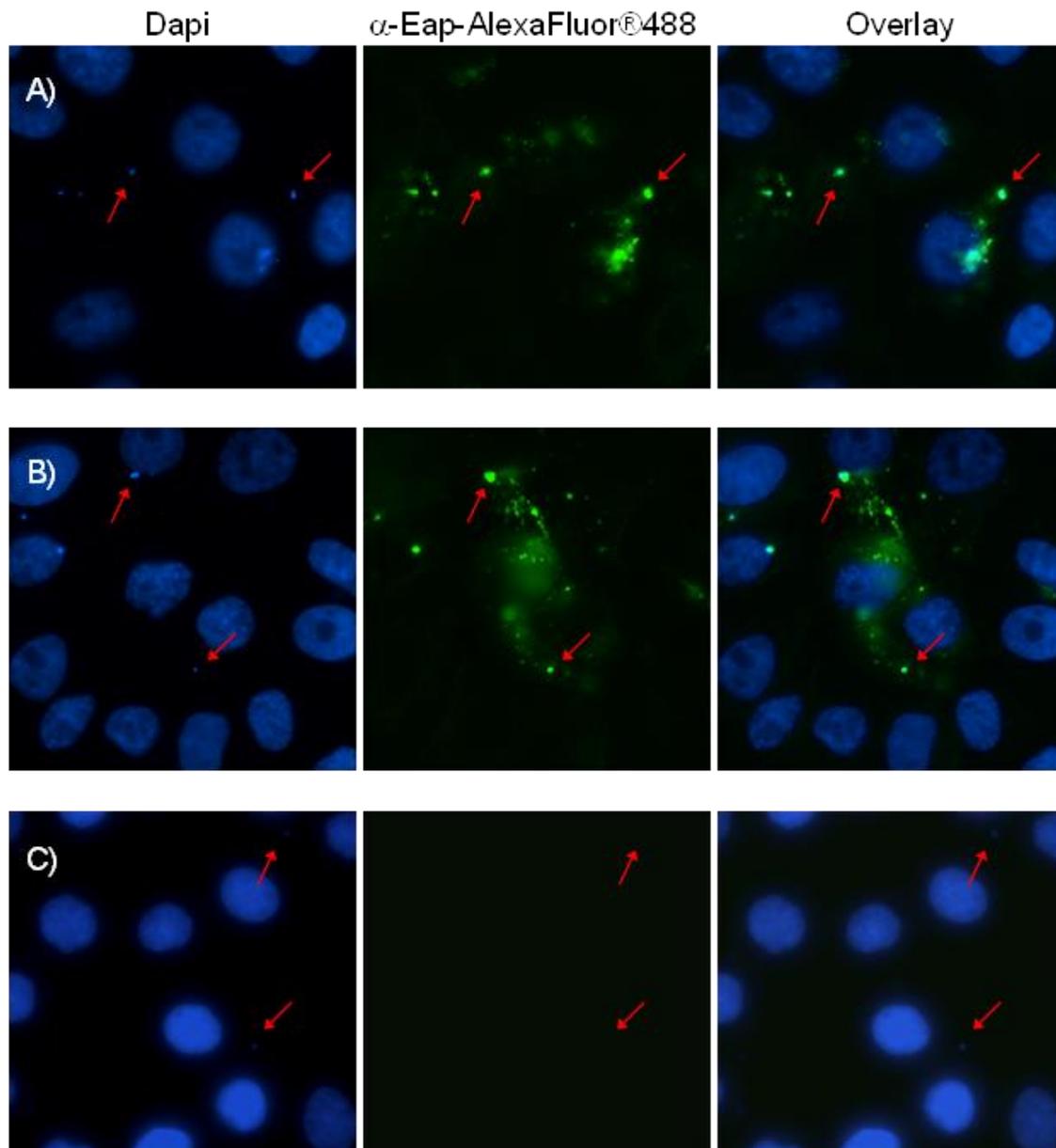
Die Immunfluoreszenz- und Zellfraktionierungs-Experimente zeigten damit übereinstimmend, dass extrazelluläres Eap nicht nur an HaCaT-Zellen adhäriert, sondern nach der Aufnahme auch intrazellulär lokalisiert ist.

#### **4.1.2 *S. aureus* exprimiert Eap intrazellulär**

Es ist bekannt, dass *S. aureus* in Wunden verstärkt Eap exprimiert (Joost *et al.*, 2011). Da sich der bakterielle Stoffwechsel nach der Invasion in Keratinozyten verändert (Sendi und Proctor, 2009), wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht, ob Eap nach der Internalisierung im Cytosol weiterhin exprimiert wird.

Dazu wurden mit dem *S. aureus* Wundisolat #30 infizierte HaCaT-Zellen (90 Minuten Ko-Kultivierungszeit, Mol 20) in Anwesenheit von Lysostaphin und Gentamycin 24 Stunden weiter kultiviert. Anschließend wurde Eap gemäß dem Immunfluoreszenzfärbungs-Protokoll intrazellulär detektiert (vgl. 3.2.6.3) Dabei erfolgte die Blockierung der bakteriellen Antikörper-bindenden Proteine (wie z.B. Protein A) durch Inkubation mit unspezifischen Maus-IgGs. Anschließend wurde Eap mit polyklonalen Kaninchen- $\alpha$ -Eap-Antikörpern detektiert. Alternativ wurden unspezifische Kaninchen-IgGs als Kontrolle verwendet. Die primären Antikörper wurden von sekundären, Alexa-Fluor®488-konjugierten  $\alpha$ -Kaninchen-Antikörpern grün angefärbt, während die Nuclei gleichzeitig durch Dapi blau markiert wurden. In Abbildung 4-3 sind repräsentative Ergebnisse der Färbung dargestellt. Eap wurde trotz Anwesenheit von bakteriellen, Antikörper-bindenden Proteinen spezifisch detektiert, da bei der Kontrolle mit unspezifischen Antikörpern kein Signal vorhanden war (Abb. 4-3 C). Die Oberfläche von *S. aureus* wies die höchste Eap-Konzentration auf. Des Weiteren wurde Eap nicht nur in unmittelbarer Nähe der Mikroorganismen detektiert, sondern fand sich auch weiter entfernt im Cytosol und sogar im Cytosol von Keratinozyten, die zu diesem Zeitpunkt nicht (mehr) mit *S. aureus* infiziert waren (Abb. 4-3 A und B).

Diese Resultate zeigten, dass Eap ins Cytosol von Keratinozyten gelangen kann, indem es von internalisierten Bakterien exprimiert wird.



**Abb. 4-3: *S. aureus* exprimiert Eap intrazellulär in Keratinozyten. A und B:** Mit dem *S. aureus* Wundisolat #30 infizierte HaCaT-Zellen (90 min Ko-Kultivierungszeit, Mol 20) wurden in Anwesenheit von Lysostaphin und Gentamycin 24 h weiter kultiviert. Anschließend wurde Eap gemäß dem Immunfluoreszenzfärbungs-Protokoll intrazellulär mittels Kaninchen- $\alpha$ -Eap-Ak detektiert, welche mit AlexaFluor®488 gekoppelt waren (grün). **C:** als Kontrolle wurden alternativ unspezifische Kaninchen-Ak verwendet. Nuclei wurden mit Dapi angefärbt (blau). Pfeile kennzeichnen stellvertretend einzelne Bakterien. Gezeigt sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen (400-fache Vergrößerung).

## **4.2 Auswirkungen von Eap auf die Epithelisation während der Wundheilung**

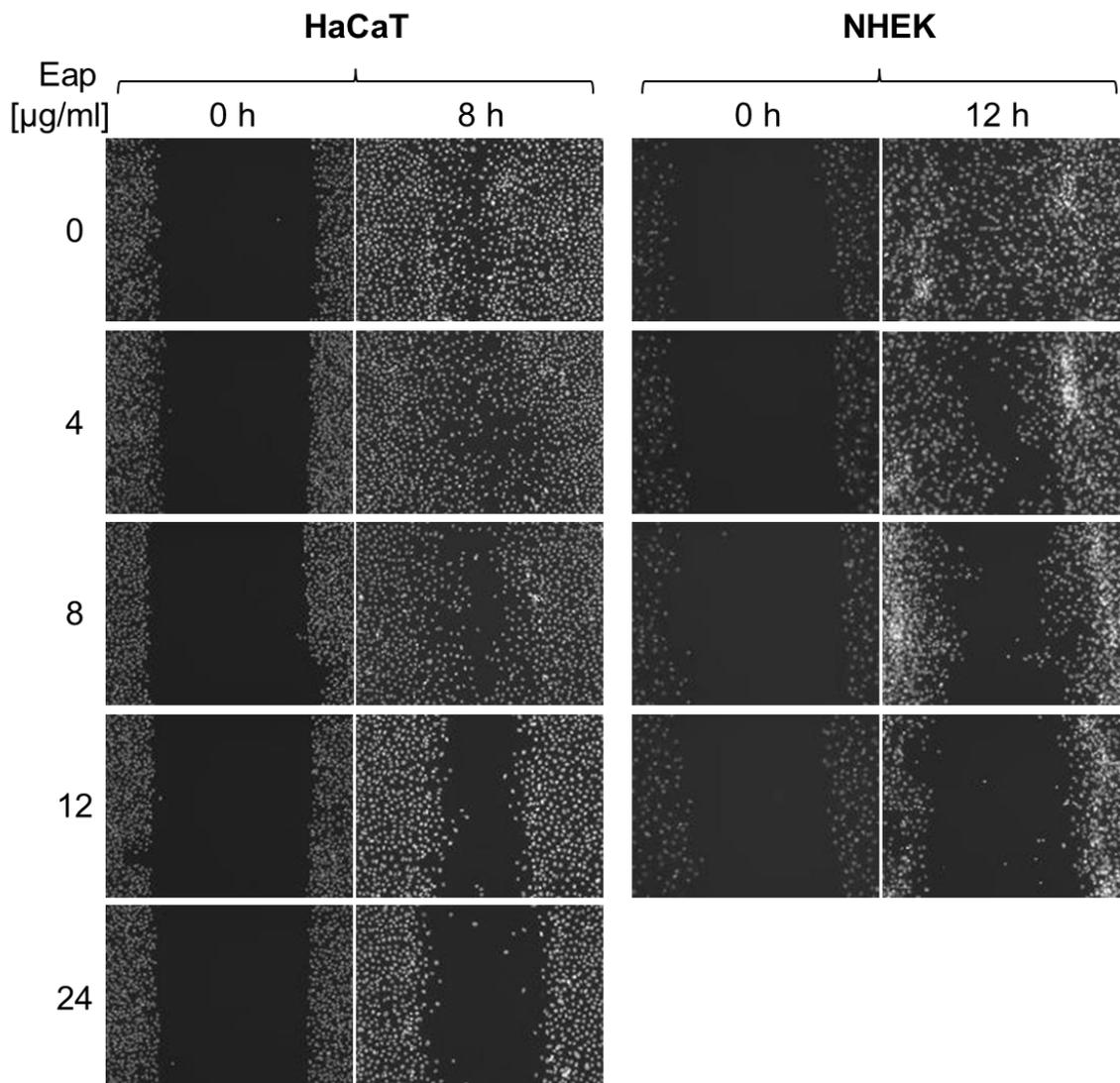
Nachdem die bisherigen Resultate zeigten, dass Eap von Keratinozyten aufgenommen wird und aufgrund der zentralen Rolle der Hautzellen bei der Epithelisation, ergab sich die Frage, ob bzw. wie Eap diese wichtige Phase der Wundheilung beeinflusst. Da die Wundoberfläche dabei ausgehend von im Wundrand vorhandenem, intaktem Epithelgewebe durch Migration, Proliferation und Differenzierung geschlossen wird, um die ursprünglich vorhandene, mehrschichtige und differenzierte Epidermis wieder herzustellen (Martin, 1997, Singer und Clark, 1999), sollte der Einfluss von Eap auf diese Prozesse untersucht werden.

### **4.2.1 Inhibition der Migration durch Eap**

Migration der Keratinozyten über das Granulationsgewebe ist der erste Schritt der Epithelisation und damit entscheidend für die Schließung der Wundoberfläche. Bei diesem Prozess wandern die Zellen vom Wundrand zur Wundmitte (Kirfel und Herzog, 2004, Morasso und Tomic-Canic, 2005). Im Folgenden wurde in einem Wundassay untersucht, ob Eap die Migrationsgeschwindigkeit beeinflusst, indem eine zellfreie Lücke im konfluenten Zellrasen mit Hilfe von IBidi-Zellkulturinserts generiert und die durch Migration geschlossene Fläche anschließend dokumentiert wurde.

Dazu sind Keratinozyten so in 24-Loch Platten mit Ibidi-Zellkultureinsätzen ausgesät worden, dass nach eintägiger Kultivierung Konfluenz erreicht war. Anschließend wurde das Medium durch Migrationsmedium (MCDB<sup>-</sup> mit 200 ng/ml EGF bei HaCaT, KBM<sup>+</sup> mit 100 ng/ml EGF bei NHEK) ausgetauscht und mit dem Proliferationshemmer Aphidicolin und Eap in den angegebenen Konzentrationen (0-15 µg/ml) versetzt. Aphidicolin inhibierte die Proliferation zu 99 % ohne Apoptose zu induzieren (Daten nicht gezeigt), während EGF die Migration stimulieren sollte. Nach zweistündiger Inkubation wurden die Zellkultureinsätze entfernt. Das so generierte, ca. 600 µm breite, zellfreie Gebiet (Zeitpunkt 0 h) sollte während der darauffolgenden Inkubation durch Migration geschlossen werden. In Versuchen mit HaCaT-Zellen wurden die Proben nach 8 Stunden fixiert, permeabilisiert und mit Dapi gefärbt,

während dies in Versuchen mit primären Keratinozyten (NHEK) nach 12 Stunden erfolgte.



**Abb. 4-4: Reduktion der Migration von Keratinozyten durch Eap.** Migration fand in Anwesenheit von angegebenen Eap-Konzentrationen und von Aphidicolin in Migrationsmedium statt (HaCaT: MCDB<sup>-</sup> mit 200 ng/ml EGF; NHEK: KBM<sup>+</sup> mit 100 ng/ml EGF). Durch Entfernen der Ibidi-Zellkultureinsätze wurde ein ca. 600 µm breites, zellfreies Gebiet im konfluenten Rasen generiert. Die Proben wurden nach 0 h und 8 h (HaCaT) bzw. 0 h und 12 h (NHEK) fixiert und mit Dapi angefärbt. Gezeigt sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen (100-fache Vergrößerung, Dapi-Filter).

Ein repräsentatives Foto für jede Eap-Konzentration ist in Abbildung 4-4 abgebildet. Während die Lücke im Zellrasen ohne Eap komplett geschlossen wurde, konnte in Abhängigkeit von der Eap-Menge eine Vergrößerung der zellfreien, nicht geschlossenen Fläche beobachtet werden. Folglich nahm die Migrationsgeschwindigkeit von HaCaT-Zellen und NHEK umgekehrt proportional zur Eap-Konzentration ab. NHEK reagierten dabei empfindlicher auf Eap: mit 12 µg/ml

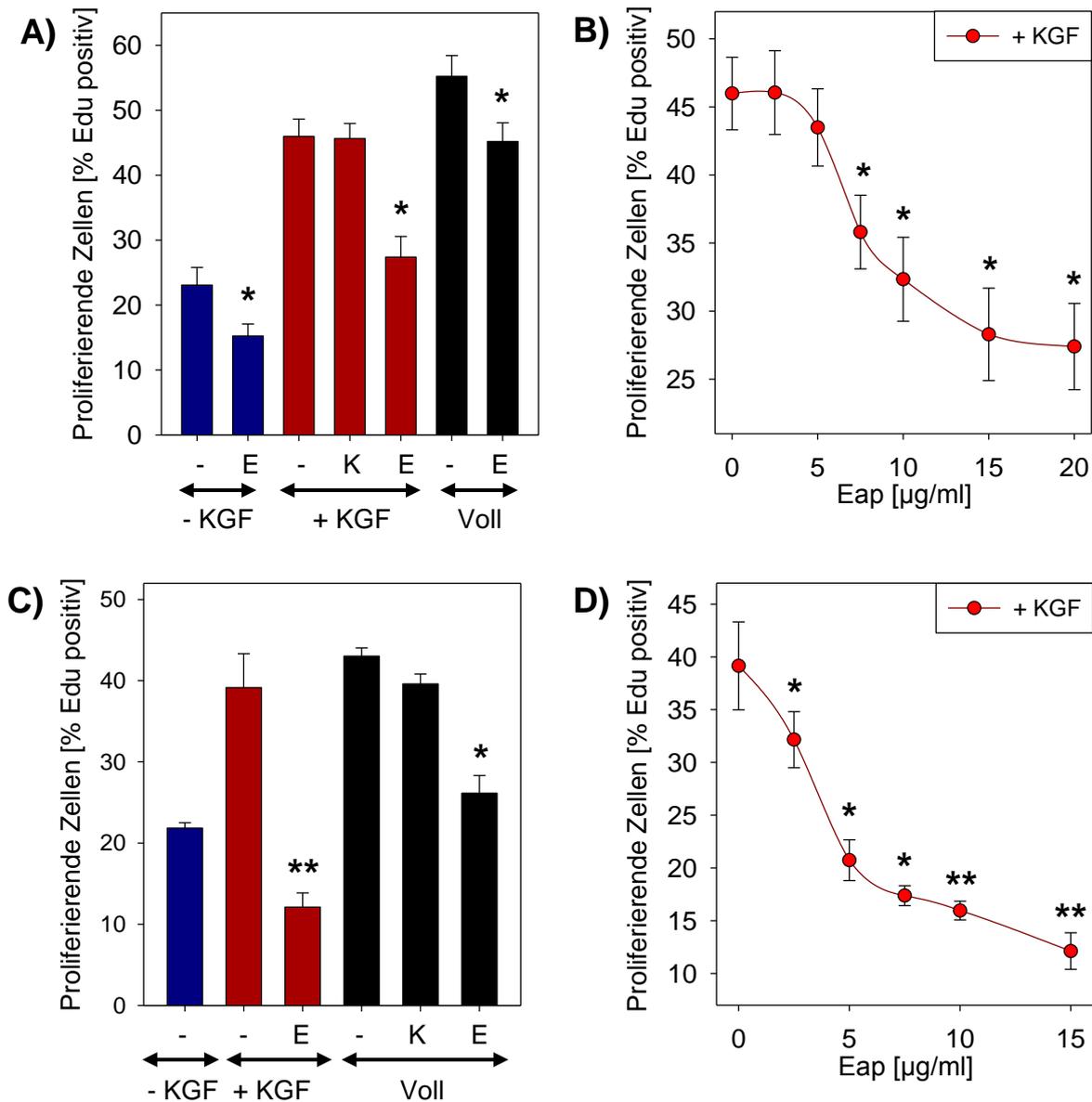
Eap fand beispielsweise eine komplette Inhibition der Migration statt, wohingegen bei HaCaT-Zellen mit 24 µg/ml noch ein Teil des zellfreien Gebiets durch Migration geschlossen wurde.

Zusammengefasst zeigen diese Resultate, dass die Migration sowohl in HaCaT als auch in NHEK signifikant durch Eap inhibiert wurde, was theoretisch in einer Beeinträchtigung des ersten Schrittes der Epithelisation resultiert.

#### **4.2.2 Inhibition der Proliferation durch Eap**

Die Proliferation von Keratinozyten ist eine weitere Voraussetzung für eine erfolgreiche Epithelisation. Zunächst proliferieren Keratinozyten im Wundrand, um die über die Wundoberfläche migrierenden Zellen zu ersetzen. Daran anschließend erfolgt die Wiederherstellung der epidermalen Schichten durch Proliferation der zuvor migrierten Zellen. Um den Einfluss von Eap auf diesen Prozess zu analysieren, wurde im Folgenden ein Edu-Inkorporationsassay verwendet. Gleichzeitig wurde die Apoptoserate mittels AnnexinV- und Propidiumiodid-Färbung bestimmt.

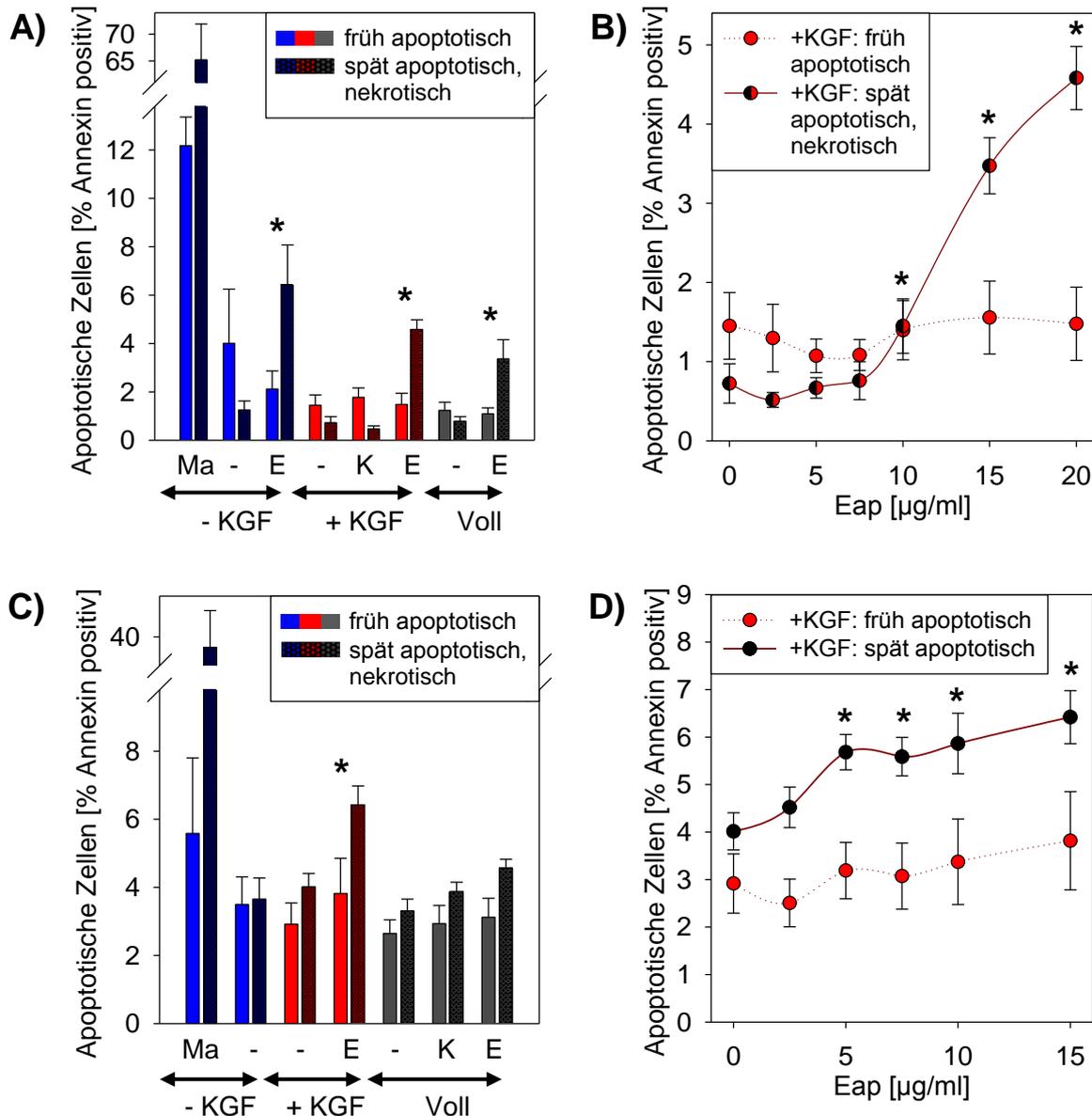
Bei Edu (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) handelt es sich um ein Nukleosid-Analogon von Thymidin, welches während der bei der Proliferation stattfindenden DNA-Synthese in die DNA eingebaut wird. Subkonfluente HaCaT oder NHEK wurden dabei ohne (-) oder mit Eap (E) in Medium ohne Zusatz (-KGF), in Medium mit 50 ng/ml KGF (+KGF) oder in Vollmedium (Voll) in Anwesenheit von Edu kultiviert. Dieses wurde anschließend nach kovalenter Bindung eines Alexa-Fluor® 647 gekoppelten Azids per Facs detektiert. Sowohl in HaCaT als auch in NHEK stimulierte die Zugabe von KGF oder Vollmedium die Proliferation (Abb. 4-5: A HaCaT, C NHEK). In HaCaT stieg die Proliferationsrate von 23 % auf 46 % mit KGF und auf 55 % mit Vollmedium. In NHEK konnte ein ähnlicher Anstieg von 22 % auf 39 % bzw. auf 43 % festgestellt werden. Mit Proteinase K verdautes Eap wurde als Kontrolle verwendet und zeigte in beiden Zelltypen keinen Effekt. Im Gegensatz dazu führte unter allen Kultivierungsbedingungen die Anwesenheit von 20 µg/ml Eap (E) sowohl in HaCaT als auch in NHEK zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation. Beispielsweise verringerte sich die Zahl der mit Vollmedium proliferierenden HaCaT-Zellen durch Eap-Zugabe von 55 % auf 45 %. In NHEK war dieser Effekt ausgeprägter, hier sank die Proliferationsrate von 43 % auf 26 %. Proliferation in Abhängigkeit steigender Eap-Konzentrationen wurde in Medium mit KGF (+KGF) bestimmt (Abb.4-5: B HaCaT, D NHEK). Sowohl in HaCaT-Zellen als auch in NHEK war ein



**Abb. 4-5: Reduktion der Keratinozyten-Proliferation durch Eap.** A und C: Subkonfluente HaCaT (A) oder NHEK (C) wurden ohne (-), mit Eap (E) oder mit Proteinase K verdautem Eap (K) in Medium ohne Zusatz (-KGF), in Medium mit 50 ng/ml KGF (+KGF) oder in Vollmedium (Voll) in Anwesenheit von Edu kultiviert. Dieses wurde anschließend nach kovalenter Bindung eines Alexa-Fluor® 647 gekoppelten Azids im Facs detektiert. B und D: Subkonfluente HaCaT (B) oder NHEK (D) wurden für den gleichen Versuch in Medium mit 50 ng/ml KGF (+KGF) in Anwesenheit der angegebenen Eap-Konzentrationen inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen, im Duplikat durchgeführten Experimenten mit den jeweiligen Standardfehlern (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ). Die behandelten Proben wurden statistisch mit der entsprechenden unbehandelten Probe verglichen.

konzentrationsabhängiger, reduzierender Effekt feststellbar, welcher ausgeprägter als der Effekt in Vollmedium war. So sank die Zahl der proliferierenden HaCaT-Zellen mit 20 µg/ml Eap maximal von 46 % auf 27 % und mit 15 µg/ml in NHEK maximal von 39 % auf 12 % ab, was bedeutet, dass die Proliferation ungefähr halbiert bzw. um zwei Drittel reduziert worden ist. Die Proliferation von NHEK war dabei durch

geringere Eap-Konzentrationen signifikant inhibierbar als die von HaCaT (Konzentrationen  $\geq 2,5 \mu\text{g/ml}$  im Vgl. zu  $\geq 7,5 \mu\text{g/ml}$ ). In HaCaT-Zellen wurde die Proliferation sogar in Medium ohne Zusätze von 23 % durch Eap-Zugabe auf 15 % signifikant vermindert.



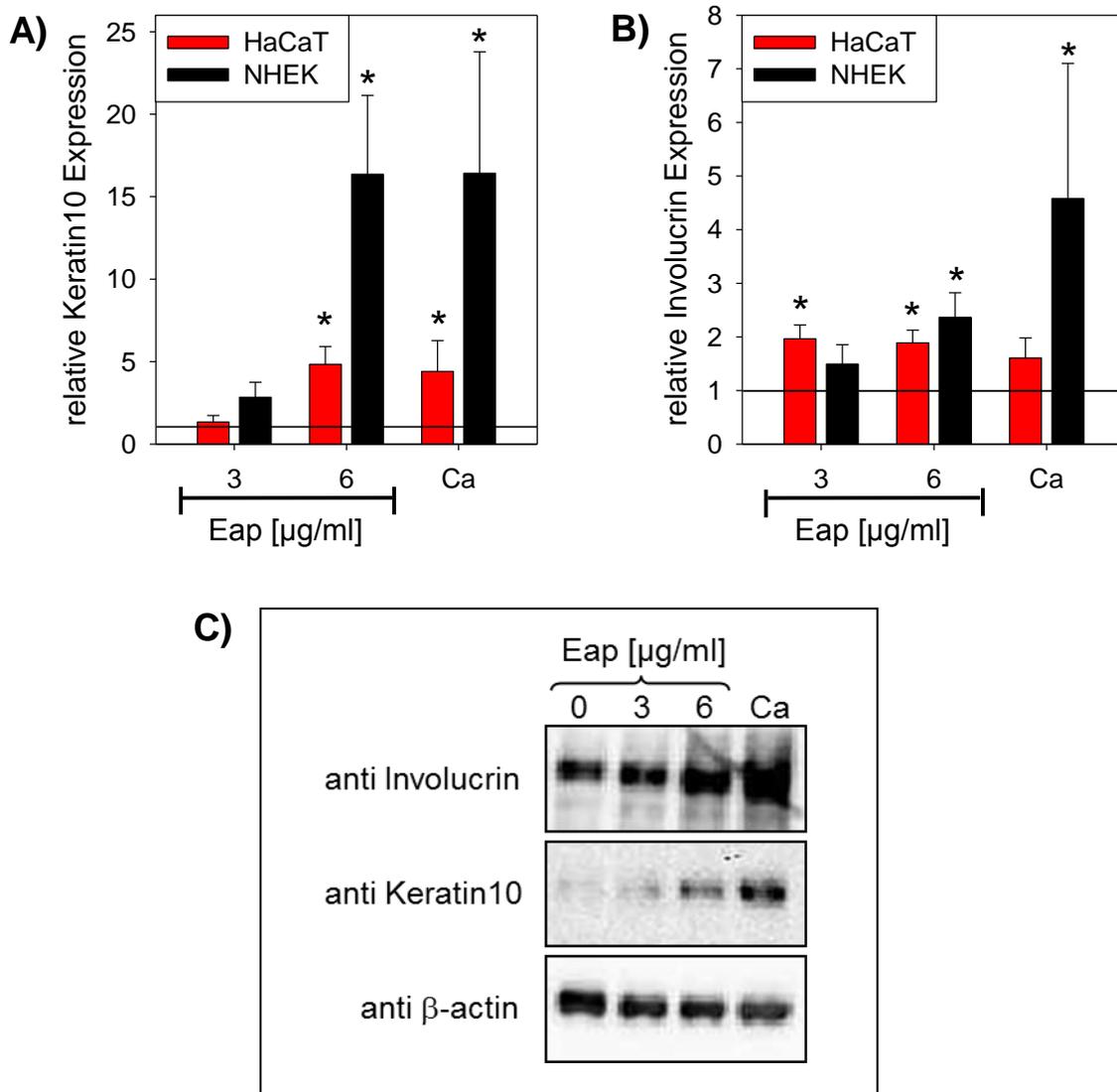
**Abb. 4-6: Einfluss von Eap auf die Apoptoserate von Keratinozyten.** A und B: Subkonfluent HaCaT (A) oder NHEK (C) wurden ohne (-), mit Eap (E) oder mit Proteinase K verdautem Eap (K) in Medium ohne Zusatz (-KGF), in Medium mit 50 ng/ml KGF (+KGF) oder in Vollmedium (Voll) kultiviert. Manumycin (Ma) induziert Apoptose und wurde zur Kontrolle zugegeben. Anschließend wurden frühapoptotische Zellen mit AnnexinV-647 oder spätapoptotische/nekrotische Zellen mit Propidiumiodid und AnnexinV-647 angefärbt und im Facs detektiert. C und D: Subkonfluent HaCaT (B) oder NHEK (D) wurden für den gleichen Versuch in Medium mit 50 ng/ml KGF (+KGF) in Anwesenheit der angegebenen Eap-Konzentrationen inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen, im Duplikat durchgeführten Experimenten mit den jeweiligen Standardfehlern (\*  $p \leq 0,05$ ). Die behandelten Proben wurden statistisch mit der entsprechenden unbehandelten Probe verglichen.

Um zu klären, ob Eap Apoptose induziert, in deren Verlauf die Reduktion der Proliferation ein Nebeneffekt wäre, oder, ob Eap den Proliferationsprozess an sich inhibiert, wurde im Folgenden die Apoptoserate der Zellen analysiert. Dazu wurde jeweils ein Teil der mit Edu inkubierten Zellen für die Messung der Apoptoserate verwendet, so dass zu jedem Proliferationswert der entsprechende Apoptosewert bestimmt werden konnte. Nach der Färbung mit AnnexinV-AlexaFluor®647 und Propidiumiodid wurden die Zellen im FACS analysiert, wobei früh apoptotische Zellen AnnexinV-AlexaFluor®647 positiv waren, während spätapoptotische und nekrotische Zellen eine gleichzeitige Färbung mit AnnexinV-AlexaFluor®647 und Propidiumiodid aufwiesen. Dies beruht auf der Bindung von AnnexinV an Serinreste, welche ausschließlich während der Apoptose auf der extrazellulären Zelloberfläche vorhanden sind, während Propidiumiodid nur in spätapoptotische und nekrotische Zellen mit einer löchrigen Zellmembran eindringen und deren Nucleus anfärben kann. Der Farnesyl-Transferaseinhibitor und Apoptose-Induzierer Manumycin A diente als Positivkontrolle und induzierte in HaCaT in 65 % der Zellen und in NHEK in 38 % späte Apoptose (Abb. 4-6: A HaCaT, C NHEK). Während sich die frühe Apoptose unter allen Kultivierungsbedingungen weder in HaCaT noch in NHEK durch Eap-Zugabe signifikant erhöhte, konnte ein Anstieg der späten Apoptose/Nekrose festgestellt werden, welcher in beiden Zelltypen in Medium mit KGF konzentrationsabhängig war (Abb. 4-6: B HaCaT, D NHEK). In HaCaT stieg die späte Apoptoserate sowohl in Medium ohne Zusätze (um 5,2 %), als auch in Medium mit KGF (um 3,9 %) und in Vollmedium (um 2,6 %) durch Eap-Zugabe geringfügig an. Im Gegensatz dazu konnte bei NHEK nur eine Erhöhung in Medium mit KGF festgestellt werden, welche mit 2,8 % deutlich niedriger als die entsprechende 27 %ige Reduktion der Proliferation war. Die Apoptose wurde folglich in deutlich weniger HaCaT-Zellen und NHEK stimuliert als die Proliferation inhibiert wurde, was dafür spricht, dass Eap den Proliferationsprozess an sich inhibiert.

#### **4.2.3 Förderung der Differenzierung durch Eap**

Bei der Epithelisation ist die Differenzierung der letzte Schritt zur Wiederherstellung der differenzierten, mehrschichtigen Epidermis. Mit zunehmender Differenzierung beginnen Keratinozyten bestimmte Proteine zu exprimieren. Keratin10 wird während dieses Prozesses beispielsweise bereits sehr früh exprimiert, während Involucrin nur in fast ausdifferenzierten Zellen vorhanden ist. Dementsprechend ist Keratin10 ein

geeigneter Marker für frühe Differenzierung und Involucrin für die späte Differenzierung. Um den Einfluss von Eap auf die Differenzierung zu analysieren, wurden die Transkriptionsraten dieser Differenzierungsmarker in Abhängigkeit von der Eap-Konzentration überprüft.



**Abb. 4-7: Stimulation der Differenzierung von Keratinozyten durch Eap.** Nach dreitägiger, subkonfluenter Kultivierung mit 3  $\mu\text{g/ml}$  Eap, 6  $\mu\text{g/ml}$  Eap oder 1,5 mM  $\text{CaCl}_2$  wurde die RNA aus HaCaT-Zellen (rote Balken) und NHEK (schwarze Balken) isoliert. Nach Umschreibung in cDNA erfolgte die Analyse der Transkriptionsraten von Keratin10 (**A**) und Involucrin (**B**) in einer quantitativen real-time PCR. Die Werte wurden auf die Transkription von RPL13a normiert und sind relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen, im Duplikat durchgeführten Experimenten mit den jeweiligen Standardfehlern (\*  $p \leq 0,05$ ). Die normierten Werte der Proben mit Supplementen wurden statistisch jeweils mit denen der unbehandelten Kontrolle verglichen. **C:** Das Gesamtzellprotein von NHEK wurde ebenso geerntet und im Immunoblot mit Antikörpern gegen Involucrin, Keratin10 und  $\beta$ -actin analysiert. In (C) ist ein repräsentativer Blot dargestellt.

Dazu wurden subkonfluente HaCaT und NHEK unter Anwesenheit von 3 µg/ml oder 6 µg/ml Eap kultiviert. Inkubation mit CaCl<sub>2</sub> (1,5 mM), das in Keratinozyten die Differenzierung stimuliert, diente als Positivkontrolle. Da FCS eine nicht genau angegebene und zudem variable Menge an CaCl<sub>2</sub> enthält, mussten beide Zelltypen bei diesem Versuch serumfrei in KBM<sup>+</sup> kultiviert werden. Nach dreitägiger Kultivierung mit Supplementen wurden Gesamtzellprotein und RNA aus den subkonfluenten Zellen isoliert. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und diese mit Hilfe von spezifischen Primern für die Gene der frühen (Keratin10) und späten Differenzierungsmarker (Involucrin) in einer real-time PCR im Institut für Virologie von Anna Schneider analysiert. Dabei zeigte sich, dass Eap die Transkription beider Proteine im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle stimulierte (Abb. 4-7). Die Transkriptionsraten wurden jeweils auf die der internen Kontrolle (RPL13a) normiert und die Transkription der Kontrollprobe ohne Zusätze in jedem Versuch als 1 definiert. Während die Expression von Keratin10 mit 6 µg/ml Eap in HaCaT und NHEK um den Faktor 4,8 und 16,4 signifikant erhöht wurde, war die Stimulation mit 3 µg/ml Eap in beiden Zelltypen geringer und nicht signifikant. Addition von CaCl<sub>2</sub> führte mit einer 4,4- und 16,4-fachen Steigerung der Expression zu einer fast identischen Induktion. Der Eap-Effekt auf die Transkriptionsraten von Involucrin fiel geringer aus, dennoch war mit 6 µg/ml Eap eine signifikante Zunahme der Expression vorhanden. In HaCaT war eine Erhöhung um den Faktor 1,9 und in NHEK um den Faktor 2,4 feststellbar. Die Positivkontrolle mit CaCl<sub>2</sub> wies für Involucrin ebenfalls niedrigere Werte auf als für Keratin10 (HaCaT 1,6; NHEK 4,6).

Um zu bestätigen, dass diese erhöhten Transkriptionsraten zu einer vergrößerten Proteinmenge führten, wurde im gleichen Versuch parallel zur RNA-Isolation auch das Gesamtzellprotein geerntet (vgl. 3.2.3.4) und mittels Immunoblot analysiert. Aufgrund einer zu geringen Menge an Involucrin und Keratin10, konnten in keinem Ansatz mit HaCaT-Zellen und nur in zwei von sechs Versuchen mit NHEK Signale detektiert werden. In Abb. 4-7 C ist für NHEK ein repräsentativer Western-Blot gezeigt. Während die Menge der internen Kontrolle (β-actin) relativ gleich blieb, nahm sowohl die Menge an Involucrin, als auch an Keratin10 mit Eap und CaCl<sub>2</sub> zu.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Transkriptionsraten von Keratin10 und Involucrin durch Eap und CaCl<sub>2</sub> vergleichbar gesteigert wurden. Da die Expression dieser Proteine mit fortschreitender Differenzierung der Keratinozyten

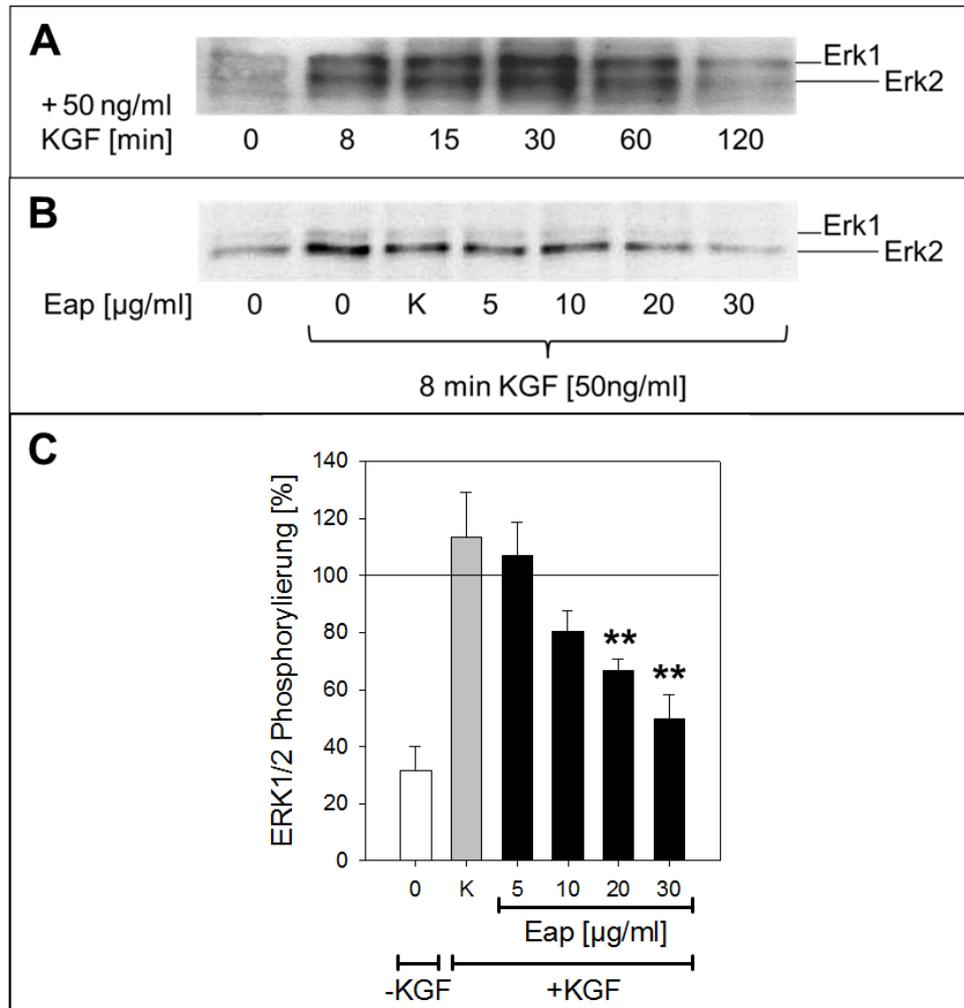
erhöht wird, sprechen diese Resultate dafür, dass Eap die Differenzierung in HaCaT und NHEK induziert.

#### 4.2.4 Beeinflussung von Signalkaskaden durch Eap

Es ist bekannt, dass Eap die Ras/Raf/MEK/Erk-Signaltransduktion in Endothelzellen durch Interaktion mit Ras inhibiert (Sobke *et al.*, 2006). In Keratinozyten wird die „extracellular signal-regulated kinase 1 and 2“ (Erk1/2) ebenfalls durch Ras via Raf und MEK phosphoryliert, worauf weitere Proteine von phosphoryliertem Erk1/2 aktiviert werden, die Proliferation und Migration stimulieren, während die Differenzierung über phosphoryliertes Raf gehemmt wird (Kern *et al.*, 2011). Um herauszufinden, ob der beobachtete Eap-Effekt auf Migration, Proliferation und Differenzierung in Keratinozyten möglicherweise ebenfalls auf eine Inhibierung der Erk1/2-vermittelten Signaltransduktion zurückführbar ist, wurde die Phosphorylierung von Erk1/2 nach Eap-Inkubation untersucht.

Für diese Versuche wurden unter serumreduzierten Bedingungen kultivierte HaCaT-Zellen verwendet, deren Erk1/2 kaum phosphoryliert ist. Durch Addition von Keratinozyten-Wachstumsfaktor (keratinocyte growth factor, KGF), wurde die Ras-Signalkaskade stimuliert, was zu einer Phosphorylierung von Erk1/2 führte. Nach verschiedenen Zeitpunkten (0-120 min) wurde das Gesamtzellprotein geerntet und mittels spezifischer Antikörper gegen phosphoryliertes Erk1 und 2 im Western Blot analysiert (Abb. 4-8 A). Bereits 8 Minuten nach Zugabe von KGF war eine deutlich erhöhte Phosphorylierung vorhanden, welche nach 60 Minuten wieder abnahm, um sich nach 120 Minuten wieder dem ursprünglichen Phosphorylierungslevel anzunähern. Im folgenden Versuch wurde das Gesamtzellprotein aller Proben nach 8 Minuten geerntet. Vor der Induktion mit KGF fand eine Inkubation mit steigenden Eap-Konzentrationen statt (0-30 µg/ml). Abbildung 4-8 B zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs, während die Quantifizierung der Bandenintensitäten von 6 Versuchen in Abbildung 4-8 C dargestellt ist. Dabei wurden die Werte des phosphorylierten Erk in jeder Probe auf die Werte der internen Kontrolle (β-actin) relativiert und in jedem Versuch der Phosphorylierungswert mit KGF als 100 % definiert. Die Grundphosphorylierung von 31,7 % wurde durch Stimulation mit KGF 3,2-fach auf 100 % erhöht. Eap Konzentrationen  $\geq 10$  µg/ml führten zu einer Reduktion dieser stimulierten Phosphorylierung ( $\leq 80,5$  %), welche ab Konzentrationen  $\geq 20$  µg/ml statistisch signifikant war ( $\leq 66,7$  %). Mit 30 µg/ml Eap

wurde eine maximale, 2-fache Reduzierung der Phosphorylierung auf 49,5 % beobachtet. Proteinase K verdautes Eap wurde als Kontrolle verwendet und wies keine signifikante Beeinflussung der Phosphorylierung auf. Die Reduktion der Erk1/2-Phosphorylierung durch Eap bestätigte die These, dass Eap Signalkaskaden, die über Erk1/2 vermittelt werden, in Keratinozyten beeinflusst.



**Abb. 4-8: Reduktion der Erk1/2-Phosphorylierung durch Eap.** In unter serumreduzierten Bedingungen kultivierten HaCaT wurde Phosphorylierung von Erk1/2 mit 50 ng/ml KGF stimuliert. Das nach 0-120 min geerntete Gesamtzellprotein wurde im Western-Blot mit anti-phospho-Erk1/2-Antikörpern detektiert (**A**). Unter serumreduzierten Bedingungen kultivierte, 1 h mit Eap inkubierte (0-30  $\mu\text{g/ml}$ , K = 30  $\mu\text{g/ml}$  ProteinaseK verdautes Eap) HaCaT wurden mit KGF stimuliert, nach 8 min erfolgte die Ernte des Gesamtzellproteins, welches im Western-Blot analysiert wurde. In (**B**) ist ein repräsentativer Blot gezeigt und in (**C**) die Quantifizierung der Bandenintensitäten mit anschließender Normierung auf die interne Kontrolle ( $\beta$ -actin). Die Werte sind relativ zum Wert der unbehandelten Probe mit KGF dargestellt und wurden vor der Relativierung statistisch mit diesem verglichen (Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten mit den jeweiligen Standardfehlern; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ).

## 4.3 Invasion von *Staphylococcus aureus* in Keratinozyten

### 4.3.1 Charakterisierung der Internalisierung von *S. aureus* in Keratinozyten

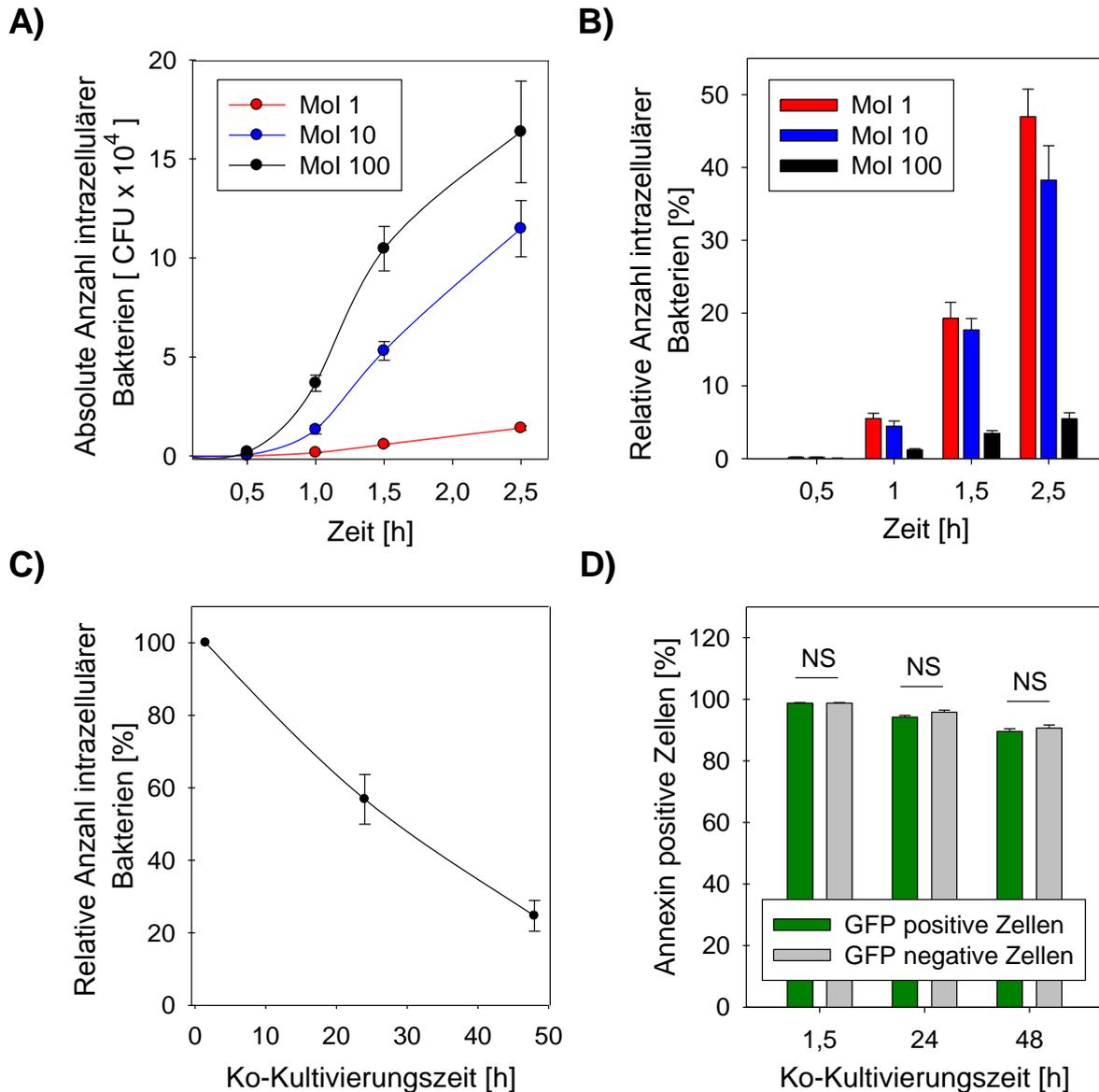
Zunächst sollte die Adhäsion und Internalisierung von *S. aureus* in HaCaT und primäre Keratinozyten im Allgemeinen untersucht werden. Dabei wurde analysiert, von welchen Faktoren die Invasion abhängig ist und welche Mechanismen zugrunde liegen.

#### 4.3.1.1 Die Internalisierung in Keratinozyten ist abhängig von Zeit und Mol

Es wurde bereits beschrieben, dass *S. aureus* fähig ist in humane, nichtprofessionelle Phagozyten einzudringen (Almeida *et al.*, 1996, Bayles *et al.*, 1998, Bost *et al.*, 1999, Ellington *et al.*, 1999, Deitch *et al.*, 1995, Jevon *et al.*, 1999, Sinha und Herrmann, 2005). Um die Internalisierungskapazität von *S. aureus* in Keratinozyten zu untersuchen, wurde ein Internalisierungsassay verwendet, welches auf dem Schutz intrazellulärer Bakterien vor Gentamycin und Lysostaphin beruht. Bereits nach 30 Minuten wurde der *fnbAB*-positive *S. aureus* Stamm SA113 von HaCaT-Zellen aufgenommen (Abb. 4-9 A). Die Anzahl der internalisierten Bakterien war sowohl von der Ko-Kultivierungszeit, als auch von der Zahl der zugegebenen Bakterien abhängig. Nach 1,5 Stunden führte die Infektion mit einer bzw. mit zehn Bakterienzellen pro eukaryotischer Zelle (multiplicity of infection, Mol) zur Aufnahme von 19 % bzw 17 % der zugegebenen Bakterien, wohingegen die niedrigere Internalisierungsrate von 3,5 % (Abb. 4-9 B) mit Mol 100 auf eine Sättigung der Bakterienaufnahme hinweist. Dies zeigte sich auch in den absoluten Zahlen der internalisierten Bakterien: nach Verzehnfachung der Mol von 10 auf 100, verdoppelte sich die Anzahl der intrazellulären Bakterien (von  $5,3 \times 10^4$  auf  $1,0 \times 10^5$ ). In den folgenden Versuchen wurden in der Regel eine Ko-Kultivierungszeit von 1,5 Stunden und Mol 100 verwendet, so dass deutlich mehr Bakterien vorhanden waren als die Hautzellen aufnehmen konnten.

Um zu untersuchen, ob *S. aureus* nach der Invasion in der Lage ist im Cytosol von Keratinozyten zu persistieren, wurden für 1,5 Stunden mit SA113 infizierte HaCaT-Zellen unter Anwesenheit von Gentamycin weiter kultiviert. Die Zahl der

internalisierten Bakterien nach 1,5, 24 und 48 Stunden wurde bestimmt (Abb. 4-9 C). Mit fortschreitender Zeit nahmen die intrazellulär überlebenden Bakterien signifikant ab: nach 24 Stunden waren 56,8 % und nach 48 Stunden noch 24,7 % der nach 1,5 Stunden vorhandenen Bakterien detektierbar.



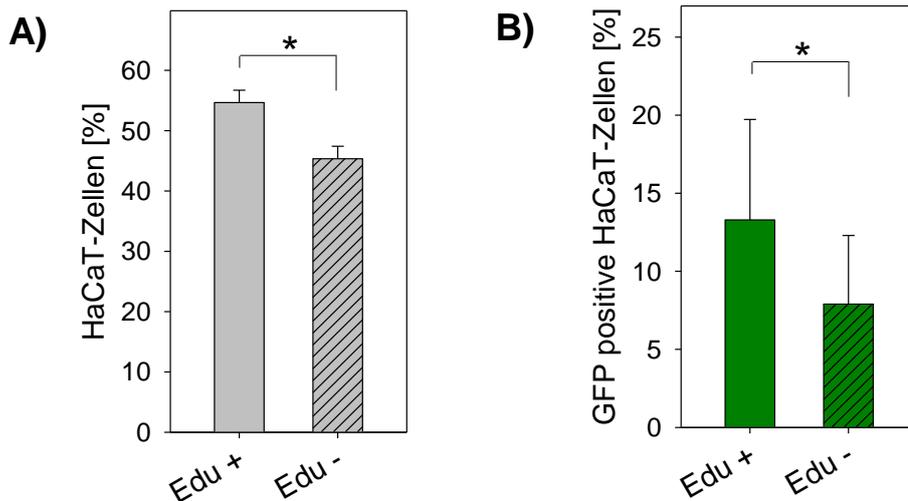
**Abb. 4-9: Internalisierung und Langzeitüberleben von *S. aureus* in HaCaT-Zellen.** Die absolute (A) und relative (B) Internalisierung von *S. aureus* SA113 wurde in Abhängigkeit der „multiplicity of infection“ (Mol) und der Inkubationszeit mittels Internalisierungsassay (vgl. Methoden) untersucht. C: Um das Langzeitüberleben zu bestimmen, wurden infizierte Keratinozyten (90 min Ko-Kultivierungszeit, Mol 100) in Anwesenheit von Gentamycin bis zu 48 h weiter kultiviert. D: Der gleiche Versuch wurde mit SA113 GFP durchgeführt, wobei zu den angegebenen Zeitpunkten eine AnnexinV-647 Färbung der apoptotischen Zellen und Analyse mittels FACS stattfanden. Gezeigt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen, im Duplikat durchgeführten Experimenten mit den jeweiligen Standardfehlern (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ , NS = nicht signifikant).

Bei Zellschädigung, welche infolge bakterieller Toxinproduktion auftreten kann, sind intrazelluläre Bakterien aufgrund der damit einhergehenden Membranschädigung nicht mehr vor Gentamycin geschützt. Um diese Ursache für die beobachtete Abnahme der Bakterienzahl ausschließen zu können, wurde die Anzahl der apoptotischen Zellen mittels AnnexinV-Färbung bestimmt. Bei diesem Versuch wurde ein konstitutiv GFP-produzierender SA113 Stamm (HOM70) verwendet, so dass internalisierte Bakterien mittels Facs detektiert werden konnten. Zu allen Zeitpunkten wiesen die infizierten, GFP-positiven HaCaT-Zellen im Vergleich zu den nicht infizierten Zellen eine vergleichbare Apoptoserate auf (Abb. 4-9 D).

#### **4.3.1.2 Internalisierung und Persistenz sind von der Differenzierung der Keratinozyten abhängig**

Bei der Epithelisation wird die Wundoberfläche zunächst von migrierenden Keratinozyten geschlossen, welche anschließend die mehrschichtige Epidermis durch Proliferation wieder herstellen. Während am Wundrand in der unverletzten Epidermis vor allem ausdifferenzierte Zellen vorhanden sind, handelt es sich bei den migrierenden und proliferierenden Keratinozyten um undifferenzierte Zellen. Da bisher nichts darüber bekannt ist, welche der in einer Wunde vorhandenen Keratinozyten bevorzugt von Staphylokokken infiziert werden, sollten die Internalisierungsraten in proliferierende und differenzierte Keratinozyten im Folgenden untersucht werden.

HaCaT-Proliferation wurde nach Edu-Inkorporation und -Färbung mittels Facs detektiert. Um gleichzeitig die internalisierten Bakterien nachzuweisen, wurde der konstitutiv GFP-exprimierende SA113 Stamm HOM70 verwendet. Abbildung 4-10 A zeigt, dass 55 % der HaCaT Zellen proliferierten. Da der Anteil an nicht proliferierenden Zellen mit 45 % signifikant geringer war, war die Wahrscheinlichkeit, dass Bakterien in proliferierende Zellen internalisieren erhöht. Tatsächlich waren 13,3 % der proliferierenden und 7,9 % der nicht proliferierenden Zellen GFP-positiv (Abb. 4-10 B). Diese geringe, aber signifikante 1,68-fach höhere Internalisierung in proliferierende Zellen, lässt sich nur zum Teil auf die 1,22-fach höhere Anzahl an proliferierenden Zellen zurückführen.



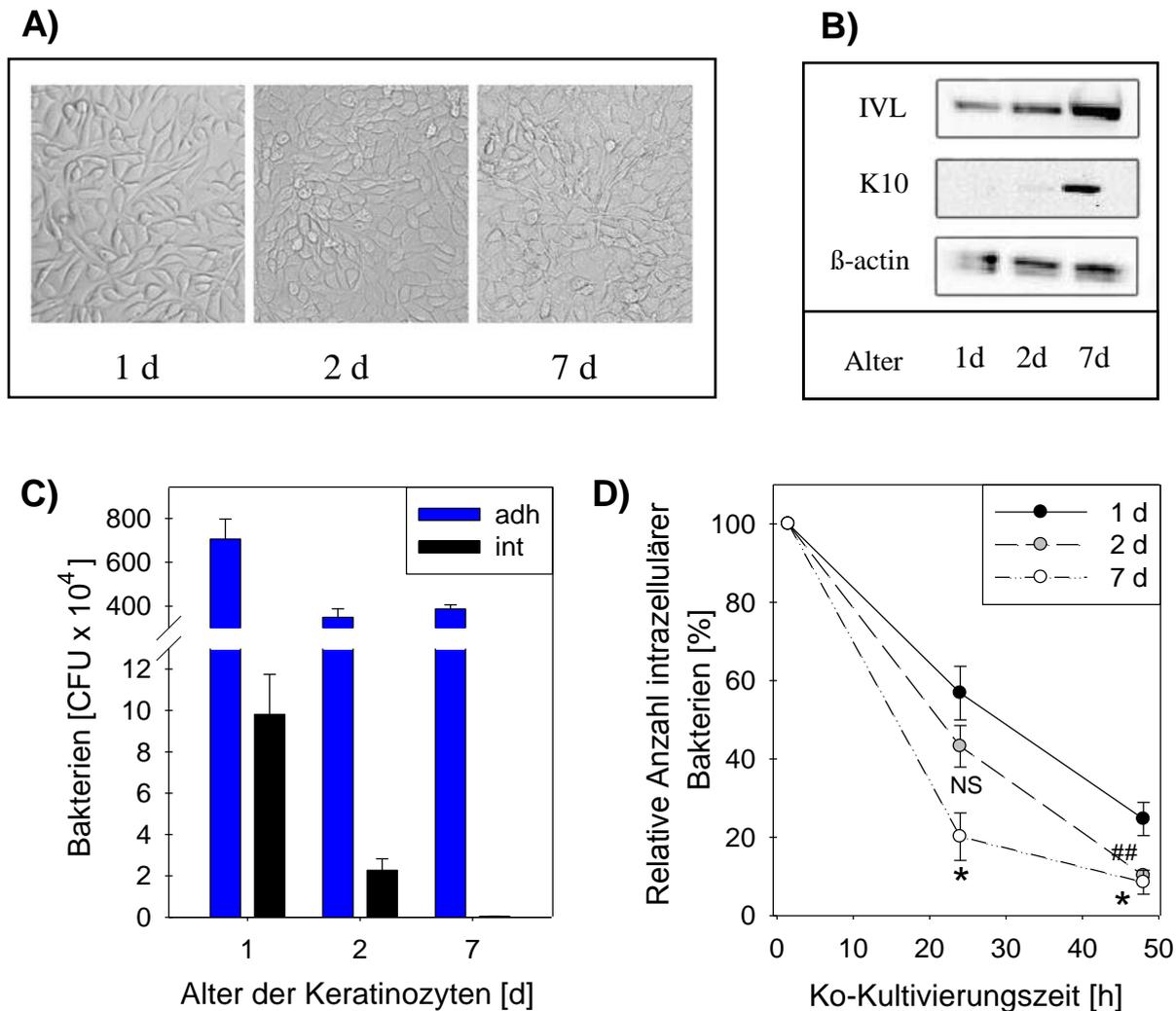
**Abb. 4-10: Internalisierung in Abhängigkeit vom Proliferationsstatus der HaCaT-Zellen.** HaCaT-Zellen wurden mit HOM70 (SA113 P<sub>blaz</sub>-GFP) unter gleichzeitiger Zugabe von Edu inokuliert (Mol 100). Der Verdau der extrazellulären Bakterien fand nach 60-120 min durch Zugabe von Lysostaphin/Gentamycin statt. Anschließend wurde bei der Proliferation in die DNA inkorporiertes Edu im Proliferationsassay mit AlexaFluor®647 angefärbt und im Facs zusammen mit der bakteriellen Invasion detektiert. In **(A)** ist der prozentuale Anteil der proliferierenden (Edu +) und nicht proliferierenden (Edu -) HaCaT-Zellen dargestellt und in **(B)** der Anteil der gleichzeitig GFP positiven HaCaT. Gezeigt sind Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten mit den jeweiligen Standardfehlern (\*  $p \leq 0,05$ ).

Im Gegensatz dazu war die Invasion in differenzierte Zellen stark reduziert (Abb 4-11 C). Hierbei wurden mit HaCaT angeimpfte wells statt wie bisher üblich nicht für 1 Tag, sondern für 2 bzw. 7 Tage kultiviert, bevor der Internalisierungsassay durchgeführt wurde. Während dieses Zeitraums fand eine Veränderung der Zellmorphologie statt: die einzelnen Zellen verkleinerten sich und flachten ab (Abb 4-11 A). Gleichzeitig differenzierten sie zunehmend aus, was durch die steigende Expression von Keratin 10 und Involucrin im Western-Blot nachgewiesen werden konnte (Abb 4-11 B). Unterdessen blieb die HaCaT-Apoptose-/Nekroserate unter 6 % (Daten nicht gezeigt).

Die Adhäsion von SA113 sank bei den für 7 Tagen kultivierten Keratinozyten im Vergleich zu den 1 Tag alten Zellen auf 57 %, im Gegensatz dazu wurden nur noch 0,4 % der Bakterien internalisiert. Darüber hinaus wurde durch den erhöhten Differenzierungsstatus nicht nur die Invasion in Keratinozyten, sondern anschließend auch die intrazelluläre Überlebensfähigkeit der Bakterien reduziert (Abb 4-11 D). Während nach 24 Stunden in den 1 Tag alten Zellen 56,8 % der nach 1,5 Stunden vorhandenen Bakterien detektiert werden konnten, waren es in 2 Tage alten Zellen 43,2 % und in 7 Tage alten Zellen nur noch 21,2 %. Obwohl die intrazellulären Bakterien nach 48 Stunden überwiegend eliminiert waren, konnte eine signifikant

niedrigere Überlebensrate in 2 und 7 Tage alten im Vergleich zu 1 Tag alten HaCaT nachgewiesen werden (10,6 % bzw. 8,5 % im Vgl. zu 24,7 %).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass in einer Wunde undifferenzierte, proliferierende Keratinozyten bevorzugt von *S. aureus* infiziert werden, wobei der Differenzierungsstatus eine größere Rolle spielt. Des Weiteren ist die Überlebensfähigkeit der Bakterien in undifferenzierten Zellen höher.

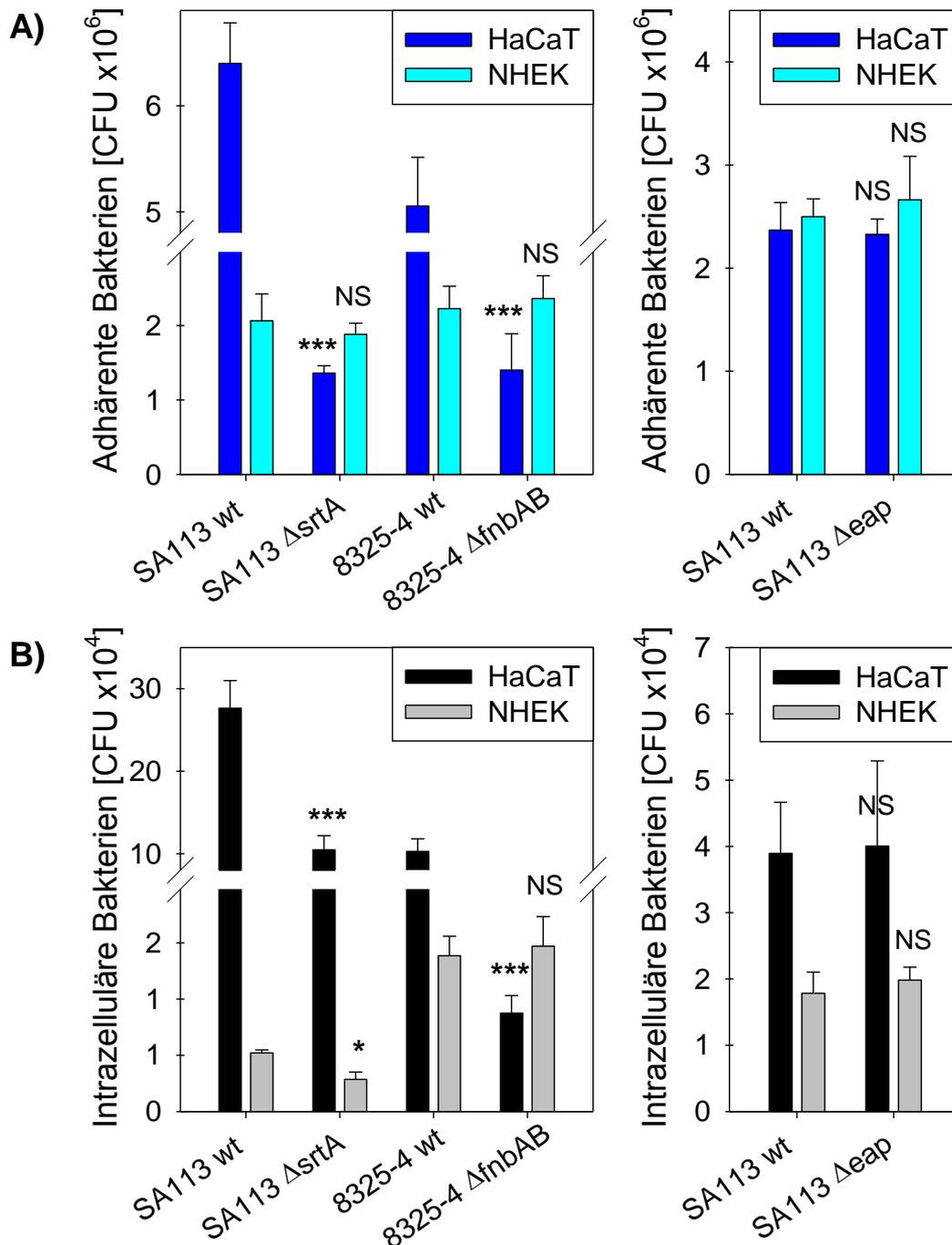


**Abb. 4-11: Adhäsion, Internalisierung und Langzeitüberleben von *S. aureus* in Abhängigkeit vom Differenzierungsstatus der HaCaT-Zellen.** Konfluente HaCaT-Zellen wurden 1, 2 oder 7 Tage kultiviert. In **(A)** sind mikroskopische Aufnahmen (200-fache Vergrößerung) und in **(B)** durch Western-Blot-Analyse detektierte Expression von Keratin10 (K10), Involucrin (IVL) und  $\beta$ -actin in den unterschiedlich alten Kulturen dargestellt. **C:** Adhäsion (blaue Balken) und Internalisierung (schwarze Balken) von SA113 in 1 d, 2 d und 7 d alte HaCaT-Zellen wurden mittels Adhäsions- und Internalisierungssassay bestimmt (90 min Ko-Kultivierungszeit, Mol 100). **D:** Um das Langzeitüberleben zu bestimmen, wurden die infizierten Keratinozyten aus **(C)** in Anwesenheit von Gentamycin bis zu 48 h weiter kultiviert. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen (A und B) oder Mittelwerte aus vier unabhängigen, im Duplikat durchgeführten Experimenten mit den jeweiligen Standardfehlern (C und D) (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; NS = nicht signifikant). Bei **(D)** wurden 2 d mit 1 d (#) oder 7 d mit 1 d (\*) statistisch verglichen.

#### 4.3.1.3 Die Internalisierung in primäre Keratinozyten ist unabhängig von Fibronektin-Bindeproteinen

Es wurde in mehreren Publikationen übereinstimmend gezeigt, dass die Internalisierung in Endothelzellen hauptsächlich von zellwandgebundenen FnBPs vermittelt wird, welche ebenso wie die  $\beta$ 1-Integrine auf der eukaryotischen Zelloberfläche an Fibronektin binden. Fibronektin vermittelt die Bindung zwischen Bakterien- und Wirtszelle, wodurch eine anschließende Invasion möglich wird (Edwards *et al.*, 2011, Dziewanowska *et al.*, 1999, Fowler *et al.*, 2000, Jevon *et al.*, 1999, Lammers *et al.*, 1999, Sinha *et al.*, 1999, Sinha und Fraunholz, 2010). Um zu untersuchen, ob die Internalisierung in Keratinozyten ebenfalls auf diese FnBP-abhängige oder auf eine von anderen MSCRAMMs vermittelte Interaktion angewiesen ist, wurden FnBP und MSCRAMM defiziente Mutanten im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp im Adhäsions- und Internalisierungsassay verwendet und miteinander verglichen. Es handelte sich dabei um ein isogenes *fnbAB*<sup>+</sup>/*fnbAB*<sup>-</sup> (8325-4/8325-4  $\Delta$ *fnbAB* bzw. DU5883) und ein isogenes *srtA*<sup>+</sup>/*srtA*<sup>-</sup> Stammpaar (SA113/SA113  $\Delta$ *srtA*). Während beim ersten nur der Effekt von fehlenden FnBPs analysiert wurde, konnte beim zweiten Paar der Einfluss aller zellwandgebundenen MSCRAMMs untersucht werden, da das fehlende Enzym Sortase A die kovalente Bindung der MSCRAMMs an die gram-positive Zellwand vermittelt (Mazmanian *et al.*, 1999). Da es nicht gelungen war eine SA113 *fnbAB* Mutante (SA113  $\Delta$ *fnbAB*) zu generieren, musste der nah verwandte *S. aureus* Stamm 8325-4 verwendet werden. Adhäsion und Aufnahme beider Wildtypstämme fand in größerem Ausmaß mit HaCaT-Zellen statt als mit primären Keratinozyten. Obwohl beide Stämme einen ähnlichen genetischen Hintergrund besitzen und in ähnlichem Maß an beide Zelltypen adhärten, wurde SA113 effizienter in HaCaT-Zellen aufgenommen als 8325-4, wohingegen das Gegenteil mit NHEK der Fall war. In HaCaT Zellen waren sowohl Adhäsion als auch Internalisierung der *srtA* und *fnbAB* Mutanten im Vergleich zum jeweiligen WT signifikant reduziert: die Adhäsion wurde um 78 % bzw. 71 % und die Invasion um 61 % bzw. 89 % erniedrigt (Abb. 4-12 A). Im Gegensatz dazu konnte mit beiden Mutanten kein signifikanter Unterschied bei der Adhäsion an primäre Keratinozyten festgestellt werden. Auf die ähnliche Adhäsionsrate folgte aber nur bei der *fnbAB* Mutante eine mit dem WT vergleichbare Internalisierungsrate, die *srtA* Mutante wurde auch in primären Keratinozyten signifikant zu 44 % weniger internalisiert als der WT (Abb. 4-12 B), was dafür spricht, dass die Invasion in NHEK,

im Gegensatz zur Adhäsion, von anderen MSCRAMMs als den FnBPs vermittelt wird.

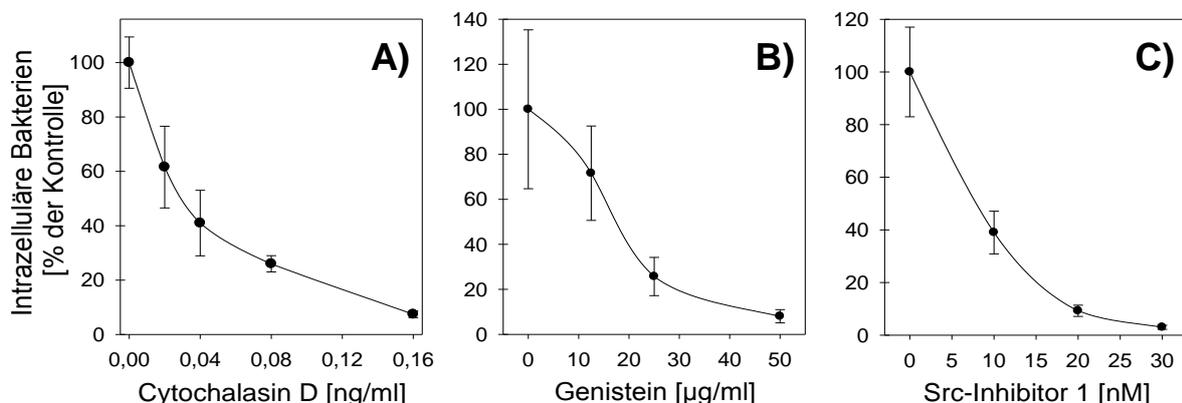


**Abb. 4-12: Adhäsion und Internalisierung von *S. aureus* in Keratinozyten in Abhängigkeit von MSCRAMMs, FnBPs und Eap.** Adhäsion (A) und Internalisierung (B) von isogenen *fnbAB*<sup>+</sup>/*fnbAB*<sup>-</sup> (8325-4/8325-4  $\Delta$ *fnbAB*), *srtA*<sup>+</sup>/*srtA*<sup>-</sup> (SA113/SA113  $\Delta$ *srtA*) und *eap*<sup>+</sup>/*eap*<sup>-</sup> (SA113/SA113  $\Delta$ *eap*) Stammpaaren in HaCaT und NHEK wurden mittels Adhäsions- und Internalisierungsassay bestimmt (90 min Ko-Kultivierungszeit, Mol 100). Gezeigt sind Mittelwerte aus drei bis fünf unabhängigen, im Duplikat durchgeführten Experimenten mit den jeweiligen Standardfehlern (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ , NS = nicht signifikant). Die Mutanten wurden statistisch jeweils mit dem entsprechenden Wildtyp verglichen.

Da überexprimiertes Eap beispielsweise im *S. aureus* Stamm Newman den Verlust von FnBPs kompensieren kann (Haggar *et al.*, 2003, Harraghy *et al.*, 2003, Hussain *et al.*, 2002), wurde des Weiteren ein isogenes  $eap^+/eap^-$  Stammpaar (SA113/SA113  $\Delta eap$ ) verwendet, um die Bedeutung der endogenen Eap-Produktion zu untersuchen. Die unveränderte Internalisierung und Adhäsion der *eap* Mutante im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4-12) spricht jedoch dafür, dass das zellwandgebundene Eap eher unbedeutend für die Interaktion mit Keratinozyten ist. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass – anders als in HaCaT-Zellen – die Adhäsion an und Internalisierung in primäre Keratinozyten unabhängig von FnBPs stattfanden. Im Gegensatz zu Endothelzellen, bei denen die Invasion hauptsächlich durch FnBP vermittelt wird, erfolgte die Aufnahme der Staphylokokken in Keratinozyten also mit Hilfe verschiedener Rezeptoren, wobei das Bakterienzellwand-assoziierte Eap ebenfalls nicht beteiligt zu sein scheint.

#### 4.3.1.4 Mechanismus der Internalisierung

Es wurde gezeigt, dass *S. aureus* nach dem Anheften an die eukaryotische Zelloberfläche durch Rezeptor-vermittelte Endozytose von verschiedenen Zelltypen aufgenommen wird (Agerer *et al.*, 2005, Fraunholz und Sinha, 2012). Während dieses Prozesses finden sowohl Polymerisation des Aktin-Zytoskeletts als auch Aktivierung wirtseigener Phosphotyrosinkinasen (PTK) wie Src statt (Agerer *et al.*, 2003, Fowler *et al.*, 2003). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob dieselben Mechanismen die Invasion in Keratinozyten vermitteln.



**Abb. 4-13: Abhängigkeit der Internalisierung von der Aktin-Zytoskelett-Polymerisation und von Phosphotyrosinkinasen.** HaCaT-Zellen wurden mit Cytochalasin D (A), Genistein (B) oder Src-Inhibitor1 (C) in den angegebenen Konzentrationen 1 h vorinkubiert. Anschließend wurde die Internalisierung von SA113 mittels Internalisierungsassay bestimmt (90 min Ko-Kultivierungszeit, Mol 100). Gezeigt sind Mittelwerte aus vier unabhängigen, im Duplikat durchgeführten Experimenten mit den jeweiligen Standardfehlern.

Pharmakologische Inhibition der Polymerisation des Aktin-Zytoskeletts durch Cytochalasin D führte zu einer dosisabhängigen Erniedrigung der Invasion von *S. aureus* (Abb. 4-13 A). In Anwesenheit von 0,16 ng/ml des Inhibitors internalisierten noch 5,7 % der Kontrolle. Vergleichbare Reduktionen der Internalisierungsraten erfolgten auch durch Genistein, einem kompetitiven Inhibitor von PTKs im allgemeinen, und durch den Src-Inhibitor 1, einem Inhibitor der – eine Schlüsselrolle bei der intrazellulären Signaltransduktion einnehmenden – Src-Kinase (8,0 % und 3,0 % der Kontrolle) (Abb. 4-13 B und C).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass an die bakterielle Adhäsion anschließend die Polymerisation des Aktin-Zytoskeletts und Aktivität von wirtseigenen PTKs zur Aufnahme von *S. aureus* benötigt werden.

### **4.3.2 Eap-Vorinkubation von Keratinozyten erhöht Adhäsion und Internalisierung**

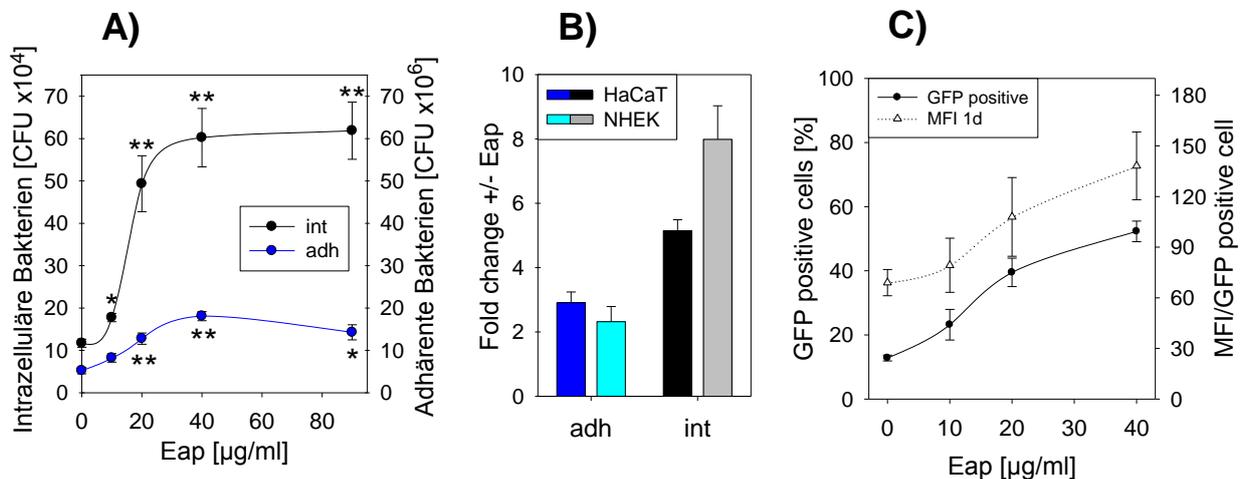
Eap, welches in einer *S. aureus* infizierten Wunde sezerniert und anschließend von Keratinozyten aufgenommen oder, welches von intrazellulärem *S. aureus* exprimiert wurde, kann, wie in Abschnitt 4.1.1 und 4.1.2 gezeigt, im Cytosol nachgewiesen werden. Im Folgenden wurde untersucht, ob bzw. wie dieses intrazelluläre Eap die Aufnahme von *S. aureus* in Keratinozyten beeinflusst.

#### **4.3.2.1 Charakterisierung des Eap-Effekts**

Um zu analysieren, ob sekretiertes Eap die Adhäsion und Aufnahme von *S. aureus* beeinflusst, wurden HaCaT-Zellen mit steigenden Eap-Konzentrationen inkubiert, dann – um ungebundenes Eap zu entfernen – gewaschen und anschließend für das Adhäsions- und Internalisierungssassay mit SA113 verwendet. Eap beeinflusste sowohl Adhäsion als auch Internalisierung konzentrationsabhängig (Abb. 4-14 A).

Die Adhäsion wurde durch Eap-Konzentrationen  $\geq 20 \mu\text{g/ml}$  signifikant erhöht, während dazu bei der Internalisierung bereits Konzentrationen  $\geq 10 \mu\text{g/ml}$  ausreichten. Konzentrationen über  $40 \mu\text{g/ml}$  Eap führten zu keiner weiteren Erhöhung des Eap-Effekts. Maximal wurde die Adhäsion 2,9-fach gesteigert, während die Internalisierung 5,1-fach zunahm. Der gleiche Versuch wurde mit  $40 \mu\text{g/ml}$  Eap in primären Keratinozyten durchgeführt (Abb. 4-14 B). Hier konnten

eine mit dem Eap-Effekt in HaCaT vergleichbare 2,3-fache Erhöhung der Adhäsion und 8,0-fache Erhöhung der Internalisierung beobachtet werden. Mit Proteinase K degradiertes Eap wurde zur Kontrolle im gleichen Versuch verwendet und beeinflusste weder Adhäsion noch Internalisierung (Daten nicht gezeigt).

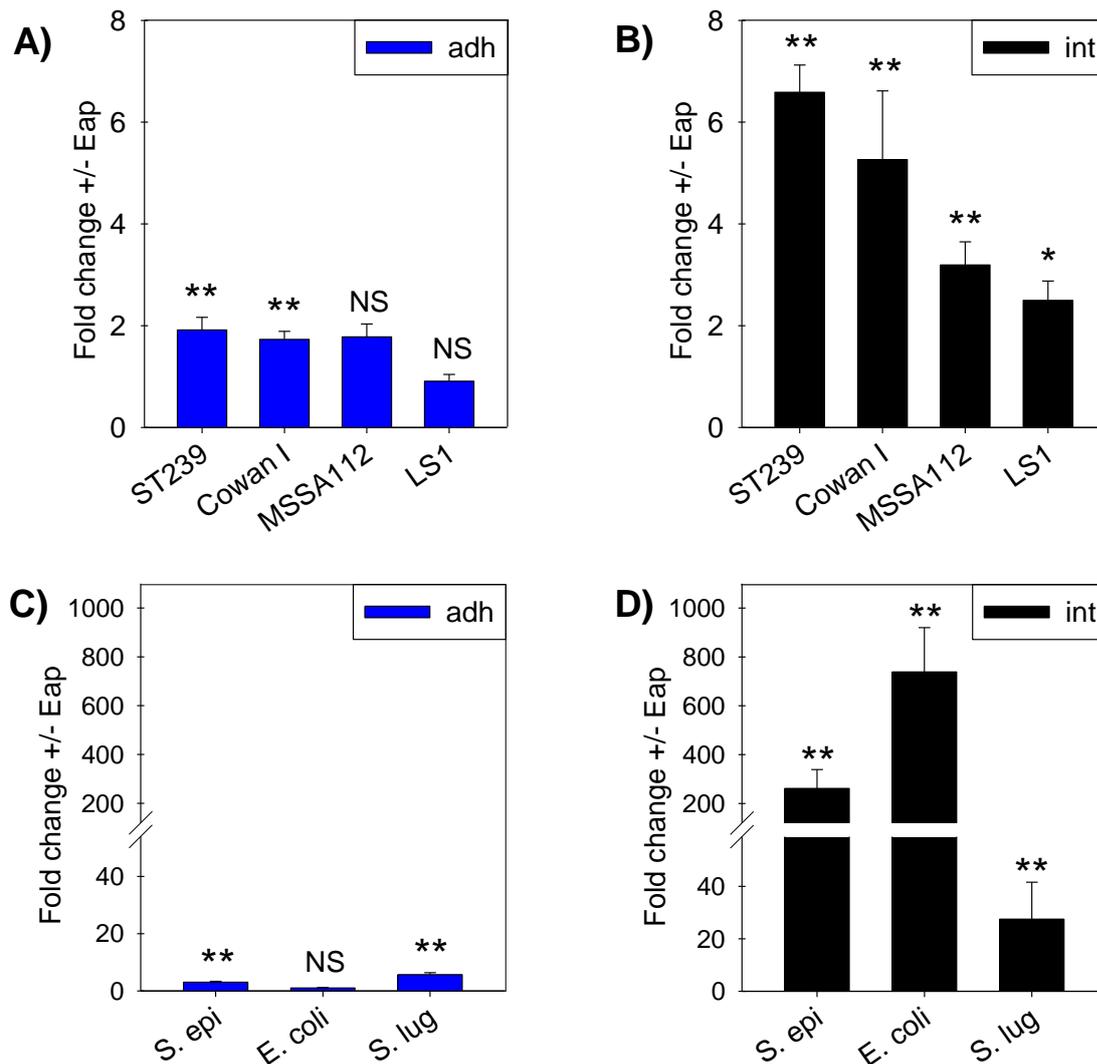


**Abb. 4-14: Effekt der Eap-Vorinkubation von Keratinozyten auf Adhäsion und Internalisierung von *S. aureus*.** **A:** HaCaT wurden mit Eap der angegebenen Konzentrationen vorinkubiert bevor Adhäsion (blau) und Internalisierung (schwarz) von SA113 mittels Adhäsions- und Internalisierungsassay bestimmt wurden (90 min Ko-Kultivierungszeit, Mol 100). **B:** Der „fold change“ der CFU-Werte von mit 40 µg/ml Eap vorinkubierten HaCaT und NHEK ist dargestellt. **C:** Internalisierung von SA113 GFP in HaCaT wurde im Facs analysiert. Die Anzahl der GFP positiven Zellen (geschlossene Kreise) und die durchschnittlichen Fluoreszenz pro GFP-positiver Zelle (mean fluorescence intensity, MFI) (offene Dreiecke) sind dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte aus vier unabhängigen, im Duplikat durchgeführten Experimenten mit den jeweiligen Standardfehlern (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ). CFU-Werte mit Eap-Vorinkubation wurden statistisch mit dem Kontrollwert ohne Eap verglichen.

Um zu untersuchen, ob der beobachtete Eap-Effekt bei der Internalisierung auf eine Subpopulation der eukaryotischen Zellen beschränkt ist, oder, ob Eap die Aufnahme von *S. aureus* in allen Keratinozyten stimuliert, wurde das konstitutiv GFP-exprimierende SA113 Derivat HOM70 im Internalisierungsassay mit Eap verwendet und internalisierte Bakterien mittels Facs detektiert. Da sowohl die Anzahl der GFP positiven, infizierten Zellen als auch die mittlere Fluoreszenz (mean fluorescence intensity, MFI) pro infizierter Zelle zunahm (Abb. 4-14 C), scheint Eap nicht nur die durchschnittliche Anzahl der von einer Hautzelle aufgenommenen Mikroorganismen zu erhöhen, sondern auch die Zahl der Keratinozyten, die überhaupt Bakterien aufnehmen.

#### 4.3.2.2 Eap erhöht die Internalisierung verschiedener *S. aureus* Isolate und von Gamma-Proteobakteria

Um auszuschließen, dass der beobachtete Eap-Effekt auf die nah verwandten Stämme SA113 und 8325-4 beschränkt ist, wurden vier weitere *S. aureus* Isolate mit genetisch unterschiedlichem Hintergrund im Adhäsions- und Internalisierungsassay ohne und mit Eap-Vorinkubation der HaCaT-Zellen getestet.



**Abb. 4-15: Eap erhöht die Adhäsion und Internalisierung verschiedener *S. aureus* Isolate und Gamma-Proteobakteria.** Einfluss einer Eap-Vorinkubation (40 µg/ml) auf die Adhäsion (blaue Balken) und Internalisierung (schwarze Balken) der *S. aureus* Stämme Cowan1, LS1, MSSA112 und ST239 (A) oder der Wundisolat *S. epidermidis* (*S. epi*), *S. lugdenensis* (*S. lug*) und *E. coli* (B) in HaCaT Zellen (90 min Ko-Kultivierungszeit, Mol 100). Der fold change gibt die Erhöhung der CFU-Werte nach Eap-Vorinkubation an. Gezeigt sind Mittelwerte aus vier (A) oder drei (B) unabhängigen, im Duplikat durchgeführten Experimenten mit den jeweiligen Standardfehlern (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; NS = nicht signifikant). Die Werte der Eap-behandelten Proben wurden statistisch mit den Werten der entsprechenden unbehandelten Proben verglichen.

Bei den Stämmen Cowan1, LS1, MSSA1112 und ST239 war wie bei SA113 ein geringer Eap-Effekt auf die Adhäsion feststellbar, welche zwischen 0,9- (LS1) und 1,9-fach (ST239) erhöht wurde (statistisch signifikant bei Cowan1 und ST239) (Abb. 4-15 A). Im Gegensatz dazu wurde die Internalisierungsrate durch Eap-Vorinkubation in allen Stämmen signifikant zwischen 2,5- (LS1) und 6,6-fach (ST239) gesteigert (Abb. 4-15 B).

Hautinfektionen sind häufig polymikrobiell, dabei treten Koinfektionen von *S. aureus* mit anderen Koagulase-negativen Staphylokokken wie *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus lugdenensis*, oder mit Vertretern der Enterobacteriaceae wie *Escherichia coli* auf. Darum wurde der Eap-Effekt auf die Adhäsion und Internalisierung dieser Spezies im Folgenden in HaCaT-Zellen untersucht. Während *E. coli* nach Eap-Vorinkubation nahezu unverändert an Keratinozyten adhärierte, wurde die Adhäsion von *S. epidermidis* 3,1-fach und die von *S. lugdenensis* 5,7-fach erhöht (Abb. 4-15 C). Im Gegensatz zu *S. aureus* wiesen die Wundisolate von *S. epidermidis*, *S. lugdenensis* und *E. coli* sehr niedrige Internalisierungsraten auf (Daten nicht gezeigt), welche durch Eap extrem gesteigert wurden: Die Invasion von *S. lugdenensis* erhöhte sich 24-fach, die von *S. epidermidis* 268-fach und die von *E. coli* 738-fach (Abb. 4-15 D).

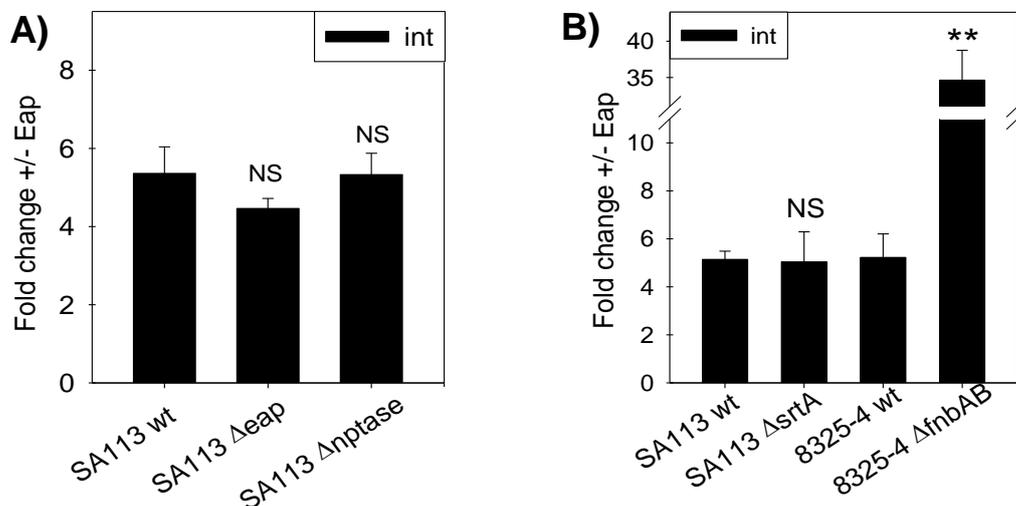
Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass extrazelluläres Eap in mit *S. aureus* infizierten Wunden nicht nur die Invasion von *S. aureus*, sondern auch die Aufnahme von anderen, möglicherweise in der Wunde vorhandenen, Mikroorganismen fördern kann.

### 4.3.3 Beeinflussung des Eap-Effekts

Nachdem im Abschnitt 4.3.3 gezeigt worden ist, dass eine Eap-Vorinkubation die Adhäsion und Internalisierung von *S. aureus* in Keratinozyten erhöht, wurde im Folgenden untersucht von welchen Faktoren dieser Eap-Effekt abhängig ist. Da außerdem demonstriert wurde, dass die Internalisierungsrate nicht immer der Adhäsionsrate entspricht (4.3.1.2 und 4.3.1.3) und folglich die von Eap beeinflusste Adhäsion an Bedeutung verliert, wurde in diesem Abschnitt weitestgehend auf Adhäsionsraten verzichtet.

#### 4.3.3.1 Beeinflussung des Eap-Effekts durch Mutationen bakterieller Oberflächenproteine

Da die Neutrale Phosphatase (Nptase), welche von *S. aureus* sekretiert und zum Teil nicht-kovalent an die bakterielle Oberfläche rückgebunden wird, als Bindungspartner von Eap identifiziert worden ist (Flock und Flock, 2001), wurde im Folgenden anhand einer *nptase* defizienten SA113 Mutante (SA113  $\Delta nptase$ ) untersucht, ob die Eap-Nptase-Bindung an die bakterielle Oberfläche für den stimulierenden Effekt von Eap benötigt wird. Da Eap auf der bakteriellen Zelloberfläche des Weiteren an sich selbst binden kann, wurde die in dieser Arbeit mittels Phagentransduktion hergestellte SA113  $\Delta eap$  Mutante (Vgl. Material und Methoden 3.2.2) ebenfalls analysiert. Beide Mutanten und der WT wurden im Internalisierungsassay mit und ohne Eap-Vorinkubation verwendet. In Abbildung 4-16 A ist erkennbar, dass der Eap-Effekt bei allen 3 Stämmen ähnlich ausgeprägt war: 5,4-fach beim WT, 4,5-fach bei SA113  $\Delta eap$  und 5,3-fach bei SA113  $\Delta nptase$ . Folglich wurden für die Internalisierungsstimulierende Wirkung von Eap weder Nptase noch Eap auf der bakteriellen Oberfläche als Bindungspartner benötigt.



**Abb. 4-16: Beeinflussung des stimulierenden Eap-Effekts auf die Internalisierung durch Mutationen bakterieller Oberflächenproteine.** Internalisierung von SA113 und den isogenetischen *eap* und *nptase* Mutanten (SA113/SA113  $\Delta eap$ /SA113  $\Delta nptase$ ) **(A)** oder isogenetischen *fnbAB*<sup>+</sup>/*fnbAB*<sup>-</sup> (8325-4/8325-4  $\Delta fnbAB$ ) und *srtA*<sup>+</sup>/*srtA*<sup>-</sup> (SA113/SA113  $\Delta srtA$ ) Stammepaaren **(B)** wurde nach Eap-Vorinkubation (40  $\mu$ g/ml) der HaCaT-Zellen mittels Internalisierungsassay bestimmt (90 min Ko-Kultivierungszeit, Mol 100). Der fold change gibt die Erhöhung der CFU-Werte nach Eap-Vorinkubation an. Die entsprechenden Grundinternalisierungsraten sind in Abb. 4-12 dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte aus vier unabhängigen, im Duplikat durchgeführten Experimenten mit den jeweiligen Standardfehlern (\*\*  $p \leq 0,01$ ; NS = nicht signifikant). Die Mutanten wurden statistisch mit dem entsprechenden Wildtyp verglichen.

Aufgrund der Beobachtung, dass sowohl die *fnbAB* als auch die *srtA* Mutation die Adhäsion und Internalisierung von *S. aureus* in HaCaT-Zellen deutlich reduzierten (Abschnitt 4.3.1.3), wurde der Einfluss dieser Mutationen auf den Eap-Effekt in HaCaT untersucht. Während die Internalisierung von SA113 WT, SA113  $\Delta$ *srtA* und 8325-4 WT durch Eap-Vorinkubation ähnlich stimuliert wurden (5,0– bis 5,2 –fach), erhöhte Eap die Internalisierung von 8325-4  $\Delta$ *fnbAB* um den Faktor 34,6, also sieben Mal stärker als in den anderen Stämmen (Abb. 4-16 B).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass das Vorhandensein der untersuchten bakteriellen Oberflächenproteine keine Voraussetzung für den stimulierenden Effekt von Eap war, da dieser in keiner der getesteten Mutanten reduziert worden ist.

#### **4.3.3.2 Beeinflussung des Eap-Effekts durch Differenzierung der Keratinozyten**

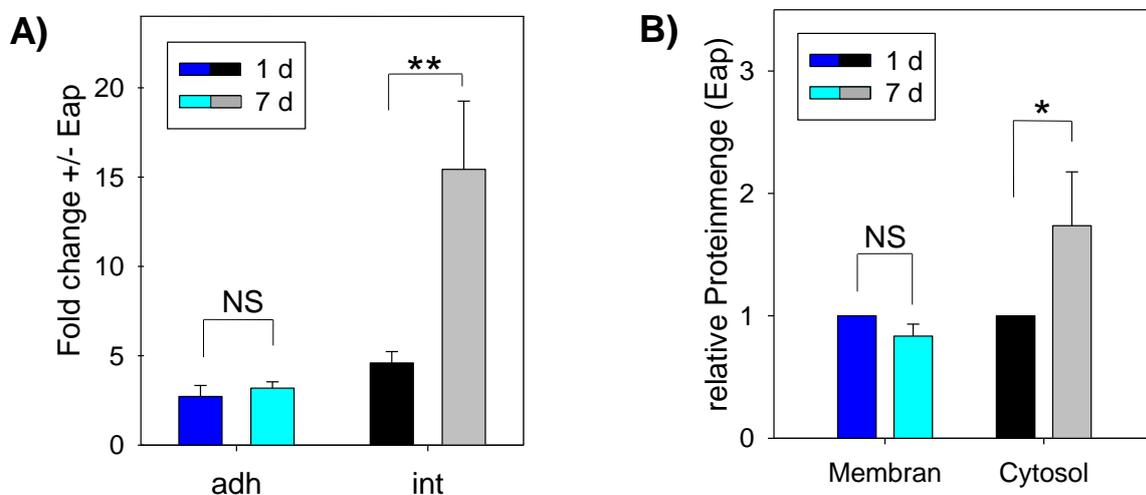
In Abschnitt 4.3.1.2 wurde beschrieben, dass die Internalisierung in differenzierte, für 7 Tage kultivierte Keratinozyten im Vergleich zu undifferenzierten, für 1 Tag kultivierte Zellen stark reduziert ist. Um zu untersuchen, ob der Differenzierungsstatus der Keratinozyten auch einen Einfluss auf den Eap-Effekt hat, wurden die unterschiedlich lange kultivierten HaCaT ohne und mit Eap-Vorinkubation für das Adhäsions- und Internalisierungsassay mit SA113 verwendet.

Beim Effekt von Eap auf die Adhäsion war kein signifikanter Unterschied zwischen differenzierten und undifferenzierten HaCaT feststellbar. Im Gegensatz dazu wurde die Internalisierung in den differenzierten, für 7 Tage kultivierten Zellen signifikant stärker stimuliert (Abb 4-17 A). Während die Internalisierung dort 15,4-fach erhöht wurde, stieg die Aufnahme von SA113 nach Eap-Vorinkubation in den undifferenzierten Zellen nur 4,7-fach an. Dieser stärkere Eap-Effekt in differenzierten Keratinozyten ließ sich nicht auf eine verstärkte Adhäsion nach Eap-Vorinkubation zurückführen, da die Adhäsionsraten vergleichbar waren.

Aufgrund der dargestellten Resultate ergab sich die Frage, ob deren Ursache eine veränderte Adhäsion bzw. Aufnahme von Eap in den für 7 Tage kultivierten Zellen sein könnte. Um dies zu klären, wurde das Gesamtzellprotein nach Inkubation mit Eap geerntet, fraktioniert und im Western-Blot analysiert. Die Quantifizierung von sechs Versuchen ist in Abbildung 4-17 B dargestellt. In differenzierten, 7 Tage kultivierten Zellen waren im Vergleich zu 1 Tag kultivierten HaCaT noch 84 % des adhärenen Eap in der Membran-Fraktion vorhanden, wohingegen das internalisierte

Eap in der Cytosol-Fraktion in den differenzierten Zellen um 74 % erhöht wurde. Den Resultaten aus dem Internalisierungsassay entsprechend führte die Differenzierung der Keratinozyten folglich zu einer geringen, nichtsignifikanten Reduktion des adhärennten Eap, während signifikant mehr Eap aufgenommen wurde.

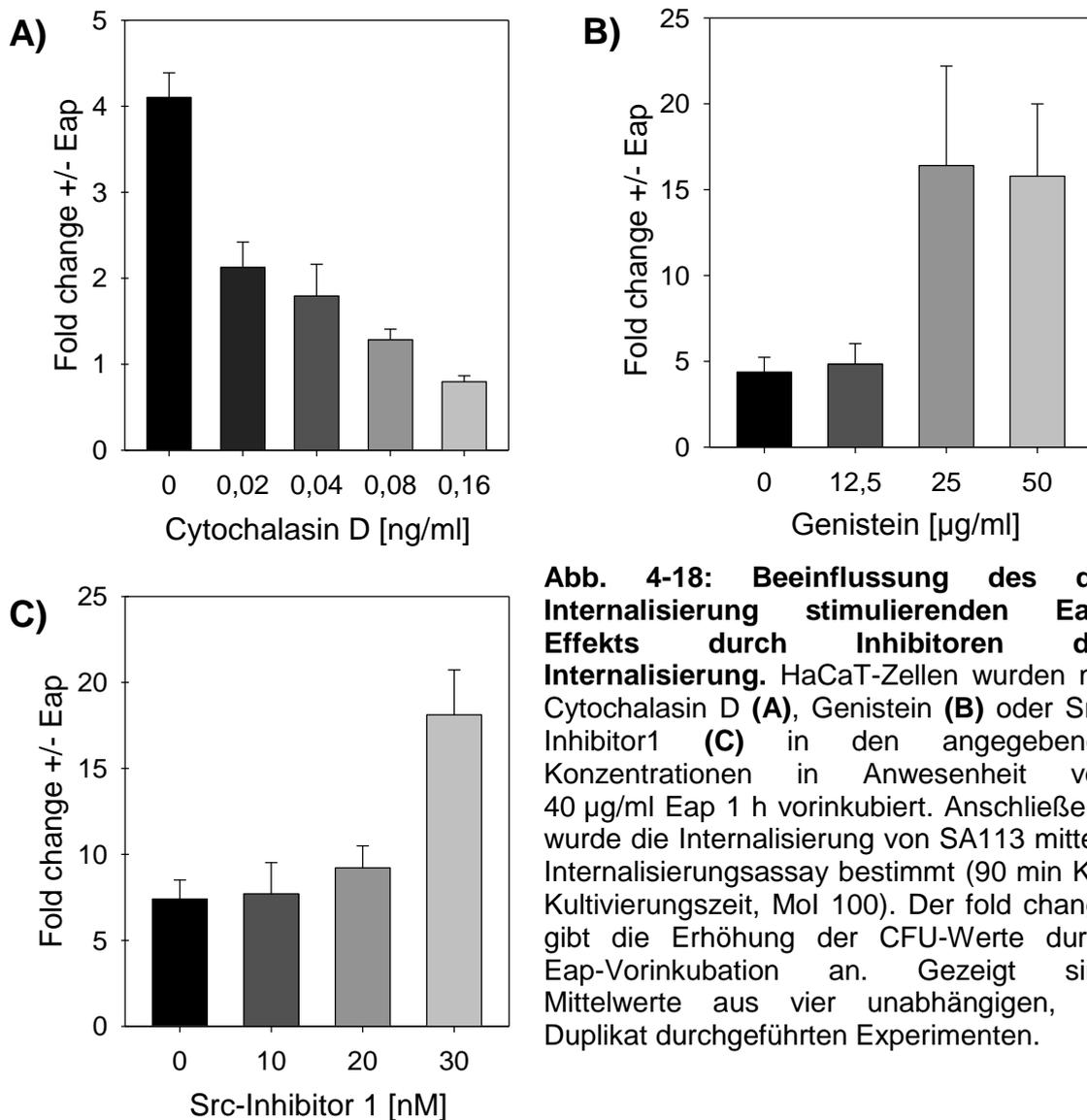
Der fehlende Eap-Effekt auf die Adhäsion, zusammen mit der erhöhten Aufnahme von Eap in differenzierte Zellen, deutet erneut an, dass der stimulierende Effekt von Eap auf die Invasion nicht allein durch eine erhöhte Adhäsion erklärbar ist, sondern, dass außerdem eine Induktion der intrazellulären Aufnahme-Mechanismen erfolgen muss.



**Abb. 4-17: Eap-Effekt auf Adhäsion und Internalisierung in Abhängigkeit vom Differenzierungsstatus der HaCaT-Zellen.** Adhäsion (blaue Balken) und Internalisierung (schwarze Balken) von SA113 in 1 d kultivierte, undifferenzierte HaCaT-Zellen und 7 d kultivierte, differenzierte Zellen wurden mittels Adhäsions- und Internalisierungsassay bestimmt (90 min Ko-Kultivierungszeit, Mol 100). Der fold change gibt die Erhöhung der CFU-Werte (vgl. Abb. 4-11C) nach Eap-Vorinkubation an. Gezeigt sind Mittelwerte aus vier unabhängigen, im Duplikat durchgeführten Experimenten mit den jeweiligen Standardfehlern (\*\*  $p \leq 0,01$ ; NS = nicht signifikant). **B:** 1 d und 7 d kultivierte HaCaT-Zellen wurden mit 40  $\mu\text{g/ml}$  Eap 1 h inkubiert. Nach Ernte und Fraktionierung des Gesamtzellproteins, wurde Eap in der Membranfraktion und in der Cytosolfraktion mittels Western-Blot-Analyse detektiert. Die Bandenintensitäten wurden quantifiziert, auf die interne Kontrolle normiert (Cytosol-Fraktion: GAPDH; Membran-Fraktion: Cadherin) und den Wert der undifferenzierten Zellen relativiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus je sechs unabhängigen Experimenten mit den jeweiligen Standardfehlern (normierte Werte wurden zur statistischen Berechnung verwendet; \*  $p \leq 0,05$ ; NS = nicht signifikant).

#### 4.3.3.3 Beeinflussung des Eap-Effekts durch Inhibitoren der Internalisierung

Da die normale Aufnahme von *S. aureus* via RME ein aktiver Prozess der Wirtszelle ist, der die Polymerisation des Aktin-Zytoskeletts und die Aktivität von wirtseigenen PTKs wie der Src-Kinase benötigt (Abschnitt 4.3.1.4), sollte analysiert werden, ob die von Eap stimulierte Internalisierung über die gleichen Prozesse vermittelt wird.



**Abb. 4-18: Beeinflussung des die Internalisierung stimulierenden Eap-Effekts durch Inhibitoren der Internalisierung.** HaCaT-Zellen wurden mit Cytochalasin D (A), Genistein (B) oder Src-Inhibitor 1 (C) in den angegebenen Konzentrationen in Anwesenheit von 40 µg/ml Eap 1 h vorinkubiert. Anschließend wurde die Internalisierung von SA113 mittels Internalisierungsassay bestimmt (90 min Ko-Kultivierungszeit, Mol 100). Der fold change gibt die Erhöhung der CFU-Werte durch Eap-Vorinkubation an. Gezeigt sind Mittelwerte aus vier unabhängigen, im Duplikat durchgeführten Experimenten.

Dazu wurden mit 40 µg/ml Eap vorinkubierte HaCaT-Zellen zusätzlich mit steigenden Konzentrationen der in Abschnitt 4.3.1.4 getesteten Inhibitoren der Internalisierung versetzt, bevor sie mit SA113 inokuliert und internalisierte Bakterien mittels Internalisierungsassay detektiert wurden. Der 4-fache Eap-Effekt nahm mit steigender Cytochalasin D Konzentration und damit einhergehender Inhibition der Aktin-Polymerisation bis auf einen Wert von 0,8-fach ab (Abb. 4-18 A), was darauf hinweist, dass die Polymerisation des Aktin-Zytoskeletts für den stimulierenden Effekt von Eap auf die Internalisierung benötigt wird. Im Gegensatz dazu wurde der Eap-Effekt mit steigender Genistein- und Src-Inhibitor 1-Konzentration größer und stieg auf 15,4- (Genistein) bis 18,1-fach (Src-Inhibitor 1) an (Abb. 4-18 B und C). Dieser Anstieg resultierte vermutlich daraus, dass die Internalisierung ohne Eap durch diese

Inhibitoren kontinuierlich reduziert worden ist, während die Internalisierung mit Eap in geringerem Maß beeinflusst wurde. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass Eap durch Beeinflussung der PTKs dem Effekt der Inhibitoren entgegenwirkt oder, dass andere Kinasen die durch Eap stimulierte Invasion vermitteln.

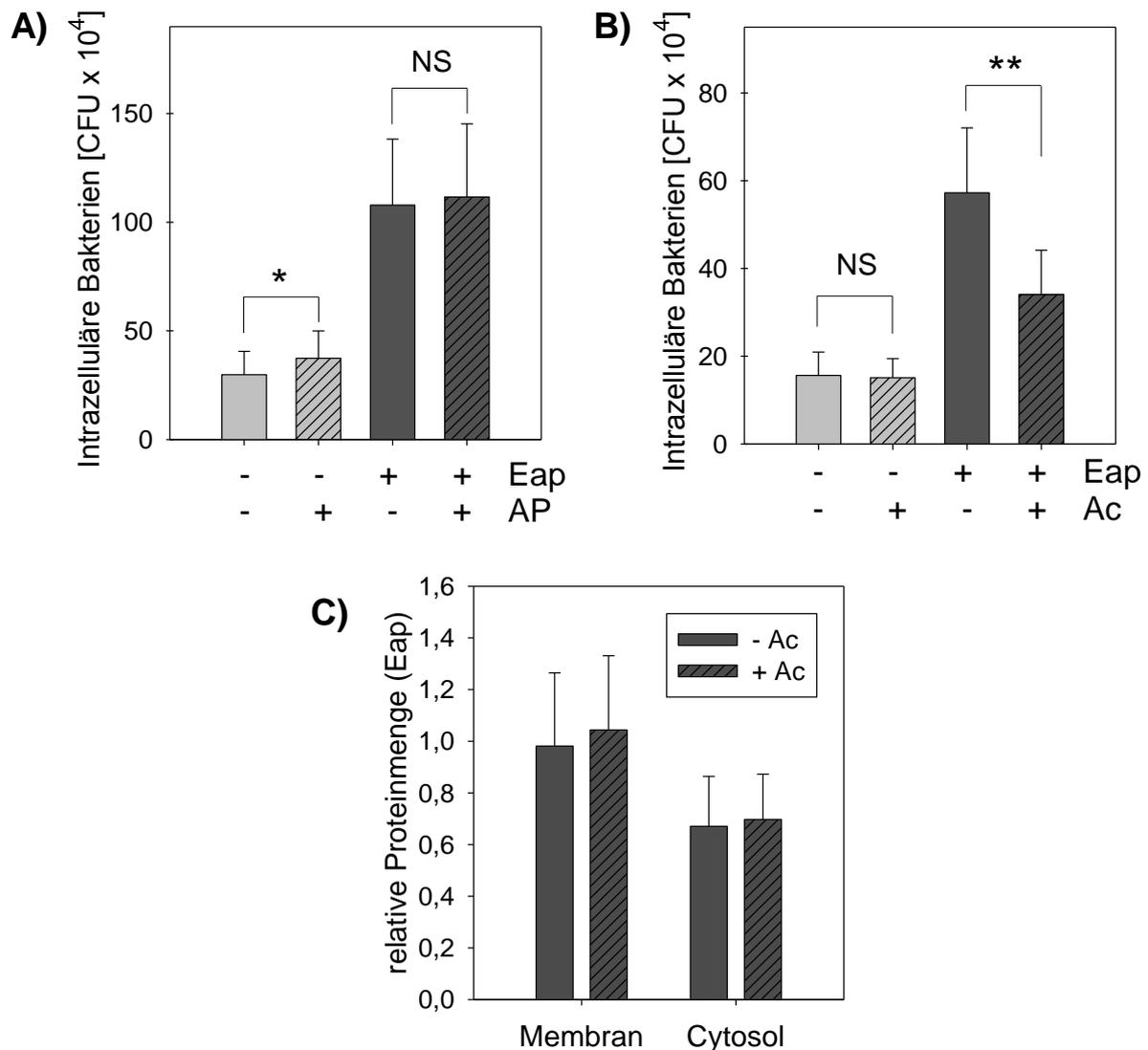
#### **4.3.3.4 Beeinflussung des Eap-Effekts durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Eap**

Aufgrund der These, dass Eap die Invasion möglicherweise durch Wechselwirkung mit PTKs – welche durch Phosphorylierung reguliert werden – stimuliert, und der Beobachtung, dass Eap mehrere YXNX-Motive aufweist, welche theoretisch durch die wirtseigenen PTKs phosphorylierbar sind (Rajbhandari, 2011), wurde der Einfluss von Phosphorylierung und Dephosphorylierung auf den Eap-Effekt untersucht.

Dazu wurde Eap 30 Minuten mit Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert oder mit Acetylphosphat phosphoryliert, bevor es zur Inkubation der Keratinozyten während des Internalisierungsassays verwendet wurde. Gleiche Reaktionsansätze ohne Eap wurden ebenfalls getestet, um zu kontrollieren, ob die Grundinternalisierungsrate durch Alkalische Phosphatase oder Acetylphosphat verändert worden ist. Während die Internalisierung ohne Eap nach Inkubation mit der Phosphatase von  $29,8$  auf  $37,3 \times 10^4$  Bakterien stieg, blieb die mittels Eap-Vorinkubation erhöhte Anzahl der internalisierten Bakterien mit und ohne Phosphatase gleich (Abb. 4-19 A). Im Gegensatz dazu reduzierte sich die Anzahl der nach Eap-Vorinkubation internalisierten Bakterien durch Phosphorylierung mit Acetylphosphat signifikant um 40 % von  $57,2 \times 10^4$  auf  $34,0 \times 10^4$  (Abb. 4-19 B), während die Internalisierung ohne Eap nicht von Acetylphosphat beeinflusst wurde.

Um auszuschließen, dass der geringere Eap-Effekt aus einer reduzierten Aufnahme von phosphoryliertem Eap resultiert, wurden HaCaT-Zellen mit  $40 \mu\text{g/ml}$  unbehandeltem (-Ac) oder mit Acetylphosphat behandeltem Eap (+Ac) inkubiert. Nach Ernte und Fraktionierung des Gesamtzellproteins, fand die Detektion von Eap in der Membran-Fraktion und in der Cytosol-Fraktion mittels Western-Blot-Analyse statt. Die Quantifizierung von vier Versuchen ist in Abbildung 4-19 C dargestellt. Sowohl adhärentes als auch aufgenommenes Eap konnten unabhängig von der Behandlung mit Acetylphosphat in vergleichbaren Mengen in der Membran- (0,98 vs. 1,0) und Cytosol-Fraktion (0,67 vs. 0,70) detektiert werden. Damit kann eine

geringere Aufnahme von phosphoryliertem Eap als Grund für den reduzierten Eap-Effekt ausgeschlossen werden.



**Abb. 4-19: Einfluss von Phosphorylierung und Dephosphorylierung auf den Eap-Effekt.** Eap wurde mit alkalischer Phosphatase (AP) (A) oder Acetylphosphat (Ac) (B) behandelt, bevor HaCaT-Zellen mit 40 µg/ml unbehandeltem Eap, 40 µg/ml behandeltem Eap oder mit den entsprechenden Kontrollen ohne Eap 1 h vorinkubiert wurden. Anschließend wurde die Internalisierung von SA113 mittels Internalisierungsassay bestimmt (90 min Ko-Kultivierungszeit, Mol 100). Gezeigt sind Mittelwerte aus vier unabhängigen, im Duplikat durchgeführten Experimenten mit den jeweiligen Standardfehlern (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; NS = nicht signifikant). C: HaCaT-Zellen wurden mit 40 µg/ml unbehandeltem Eap (-Ac) oder mit Acetylphosphat behandeltem Eap (+Ac) 1 h inkubiert. Nach Ernte und Fraktionierung des Gesamtzellproteins, wurde Eap in der Membranfraktion und in der Cytosolfraktion mittels Western-Blot-Analyse detektiert. Die Bandenintensitäten wurden quantifiziert und auf die interne Kontrolle normiert (Cytosol-Fraktion: GAPDH; Membran-Fraktion: Cadherin). Gezeigt sind Mittelwerte aus je vier unabhängigen Experimenten mit den jeweiligen Standardfehlern.

Dass der Eap-Effekt durch Dephosphorylierung nicht beeinflusst worden ist, während er durch Phosphorylierung reduziert wurde, weist auf eine mögliche Regulierung der Eap-Aktivität durch Phosphorylierung hin. Dadurch wird die These, dass Eap die Invasion durch Phosphorylierungs-abhängige Wechselwirkung mit PTKs stimuliert, bekräftigt. Um diese Aussage zu bestätigen sind jedoch weitere Experimente notwendig.

## 5. DISKUSSION

### 5.1 Aufnahme von Eap durch Keratinozyten

Eap ist *in vivo* nicht nur in *S. aureus* infizierten Wunden vorhanden, was mittels Immunfluoreszenz und Western-Blot nachgewiesen wurde (Athanasopoulos *et al.*, 2006), sondern es wird auch bis zu 100-fach stärker in diesen exprimiert als bei *in vitro* Kultur (Joost *et al.*, 2009). Aufgrund der zahlreichen Eigenschaften dieses Virulenzfaktors ergeben sich vielfältige Möglichkeiten der Wechselwirkungen, welche Schutz vor dem Immunsystem, Kolonisierung, Adhäsion oder Internalisierung von *S. aureus* vermitteln können. Eine Möglichkeit solche Wechselwirkungen zu vermitteln wäre eine intrazelluläre Beeinflussung der Signatransduktion wie sie bereits für Endothelzellen gezeigt wurde (Sobke *et al.*, 2006). Dazu müsste Eap ins Cytosol der Keratinozyten gelangen. Nach Inkubation mit aufgereinigtem Eap konnten tatsächlich nicht nur mittels Immunfluoreszenzfärbung, sondern auch durch Zellfraktionierung mit anschließender Western-Blot-Analyse extrazellulär an die Membran gebundenes und intrazelluläres Eap in Keratinozyten nachgewiesen werden (Abb. 4-1 und 4-2). Sowohl die Menge des adhärenenten als auch die Menge des aufgenommenen Eaps waren abhängig von der zugegebenen Eap-Menge, wobei bis 20 µg/ml keine Sättigung eintrat (Abb. 4-2). Diese Ergebnisse stimmen mit Resultaten aus Endothelzellen überein, bei welchen Eap ebenfalls im Cytosol und an der Membran gebunden nachgewiesen werden konnte (Joost, unveröffentlichte Daten). Offen ist in diesem Zusammenhang die Frage welcher Mechanismus der Aufnahme zugrunde liegt. In Frage kommen passiver Transport, aktiver Transport oder die verschiedenen Formen der Endozytose. Das darauf folgende intrazelluläre Schicksal ist unabhängig vom Transportmechanismus (Johannes und Lamaze, 2002), muss für Eap aber ebenfalls noch geklärt werden. Falls Eap über Endozytose aufgenommen und direkt in Phagosom degradiert wird, wäre trotz Aufnahme kein freies Eap im Cytosol vorhanden und somit wären keine intrazellulären Wechselwirkungen möglich. Da solche intrazellulären Interaktionen für Endothelzellen bereits beschrieben wurden, erscheint diese Möglichkeit jedoch unwahrscheinlich (Sobke *et al.*, 2006). Auch in dieser Dissertation konnte gezeigt

werden, dass Eap nicht nur verschiedene Eigenschaften von Keratinozyten, sondern auch die Erk1/2-vermittelte Signaltransduktion beeinflusst (vgl. 5.2 und 5.4), was die Vermutung zulässt, dass Eap auch in Keratinozyten nach der Aufnahme frei im Cytosol vorliegt. Um den genauen Aufnahmemechanismus und die anschließend stattfindenden Prozesse zu bestimmen, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Eine andere Möglichkeit wie Eap ins Cytosol von Keratinozyten gelangen kann, besteht in der Expression durch internalisierte Bakterien. Aufgrund des fehlenden LPXTG-Motivs sollte Eap in die Umgebung sezerniert werden (Flock und Flock, 2001). Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit dem Wundisolat #30 zeigten in dieser Arbeit, dass Eap nach der Internalisierung der Bakterien sowohl auf der bakteriellen Oberfläche als auch im Cytosol nachweisbar war (Abb. 4-3). Ähnliches wurde bereits für verschiedene *S. aureus* Stämme in Endothelzellen beobachtet (S. Kerdudou, unveröffentlicht). Diese Beobachtungen stimmen mit Versuchen überein, bei denen Eap aus dem Kultur-Überstand und von der bakteriellen Oberfläche extrahiert wurde: 30 % des sekretierten Proteins wurden trotz fehlendem LPXTG-Motiv an die bakterielle Oberfläche zurückgebunden (Palma *et al.*, 1999). Als mögliche Bindungspartner wurden die Neutrale Phosphatase (Flock und Flock, 2001) und zwei weitere *S. aureus* Oberflächenproteine (Kreikemeyer *et al.*, 2002) identifiziert. Des Weiteren war Eap nicht nur in infizierten Keratinozyten detektierbar, sondern auch in benachbarten Zellen, in denen zum Zeitpunkt der Analyse keine Bakterien vorhanden waren. Ob dieses Eap von den infizierten Hautzellen auf die benachbarten Zellen übertragen wurde oder, ob es von Bakterien stammt, die degradiert wurden, muss anhand weiterer Experimente überprüft werden. Hierzu wäre es von Vorteil, ein Eap-GFP Fusionsprotein in *S. aureus* zu exprimieren, dessen Ausbreitung in Zellen mit Zeitraffer-Aufnahmen dokumentiert werden könnte.

Der Aufnahme-Mechanismus und das intrazelluläre Schicksal von Eap bleiben zwar weiterhin ungeklärt, aber es konnte gezeigt werden, dass sowohl extrazelluläres Eap aufgenommen, als auch intrazellulär Eap von internalisierten Bakterien sezerniert wird. Folglich ist eine intrazelluläre Wechselwirkung von Eap mit Keratinozyten prinzipiell möglich.

## 5.2 Beeinflussung der Epithelisation durch Eap

Nach momentanem Wissensstand ist Eap – neben weiteren Staphylokokken-Virulenzfaktoren, die Zell- und Gewebeschädigend wirken (Chavakis *et al.*, 2007) – aufgrund seiner anti-inflammatorischen und anti-angiogenen Eigenschaften eine wesentliche Ursache für die mit *S. aureus* assoziierte, schlechte Wundheilung (Athanasopoulos *et al.*, 2006, Chavakis *et al.*, 2002, Haggart *et al.*, 2004). Über den Einfluss von Eap auf die darauffolgenden Phasen der Wundheilung ist jedoch noch nichts bekannt. Eine dieser Phasen ist die Epithelisation, während der die Wundoberfläche, ausgehend von im Wundrand vorhandenem, intaktem Epithelgewebe, durch Migration, Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten geschlossen und die ursprünglich vorhandene, mehrschichtige und differenzierte Epidermis wieder hergestellt wird (Martin, 1997, Singer und Clark, 1999). Die Untersuchung der drei Prozesse im Rahmen dieser Dissertation zeigte, dass Migration und Proliferation von Eap inhibiert wurden, wohingegen es zu einer Stimulation der Differenzierung kam. Eine solche Beeinflussung der Keratinozyten wurde auch für *Candida albicans* beschrieben. Dieser Hefepilz beeinflusst die Motilität und den Differenzierungsstatus oraler Keratinozyten, um die orale Kolonisation zu erleichtern (Rollenhagen *et al.*, 2009).

Zu Beginn der Epithelisation migrieren Keratinozyten vom Wundrand zur Wundmitte über das Granulationsgewebe (Kirfel und Herzog, 2004, Martin, 1997). Dieser Vorgang wurde imitiert, indem eine zellfreie Lücke in einem konfluenten Zellrasen generiert und anschließend beobachtet wurde, wie viel dieser Fläche in Abhängigkeit von zugegebenem Eap geschlossen wurde. Dabei wurde die Migration durch EGF stimuliert (Cao *et al.*, 2006), während die Proliferation gleichzeitig mittels Aphidicolin inhibiert wurde. Dadurch war sichergestellt, dass die Lücke ohne Beteiligung von proliferativen Vorgängen, lediglich durch Migration geschlossen werden konnte. Ohne Zugabe von Eap erfolgte die Schließung der freien Fläche mit HaCaT-Zellen innerhalb von 8 Stunden, während dieser Vorgang bei NHEK mit 12 Stunden etwas länger benötigte. Unterschiede zwischen diesen beiden Keratinozyten-Linien zeigten sich auch bei der Empfindlichkeit gegenüber Eap. Die Inhibition der Migration war bei HaCaT ab 8 µg/ml detektierbar, während dies bei NHEK bereits ab 4 µg/ml der Fall war. Des Weiteren fand mit 12 µg/ml Eap eine komplette Inhibition der NHEK-

Migration statt, wohingegen bei HaCaT-Zellen mit 24 µg/ml noch ein Teil des zellfreien Gebiets geschlossen werden konnte. Die Migration von NHEK war folglich nicht nur langsamer, sondern auch sensitiver gegenüber Eap. Da im Gegensatz zum HaCaT-Medium im NHEK-Medium neben EGF unter anderem auch Insulin und verschiedene in der bovinen Hypophyse vorkommende Substanzen enthalten waren, könnten die beobachteten Unterschiede durch eine dieser Substanzen verursacht worden sein. Die D1-D4 Wiederholungen von FnBPB inhibieren die Migration von Keratinozyten ebenfalls, wobei dieser Effekt vermutlich durch eine extrazelluläre Interaktion mit Fibronectin und nicht durch eine direkte Zell-Interaktion verursacht wird (Kintarak *et al.*, 2004a). Eap ist somit erst das zweite Protein von *S. aureus*, für das ein Einfluss auf die Migration nachgewiesen werden konnte und möglicherweise das erste Protein, bei dem dieser Effekt aus intrazellulären Interaktionen resultieren könnte.

Inhibierung der Proliferation durch Eap ist hingegen bereits wohlbekannt. So wird der negative Einfluss auf die Neogenese von Blutgefäßen zum Teil auf die Hemmung der bFGF bzw. VEGF stimulierten Proliferation von Endothelzellen zurückgeführt (Sobke *et al.*, 2006). Ebenso resultiert die Inkubation mit mehr als 9 µg/ml Eap in einer Reduktion der proliferativen T-Zellantwort, während geringere Eap-Mengen hier aktivierend wirken (Haggart *et al.*, 2005, Hussain *et al.*, 2008). Diese Resultate stimmen mit unseren Beobachtungen, dass Eap die Proliferation von NHEK und HaCaT sowohl in Medium ohne Zusätze, als auch in mit KGF sublimiertem Medium und in Vollmedium inhibiert (Abb. 4-5), überein. Die Reduktion der Proliferation war im Medium mit KGF-Zugabe jedoch ausgeprägter als im Vollmedium. Da die Proliferation im Vollmedium nicht nur durch KGF sondern durch verschiedene weitere Wachstumsfaktoren über unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert wird, scheint Eap folglich nur einen Teil der beteiligten Signalkaskaden zu beeinflussen. Lee und Kollegen berichteten, dass Eap die T-Zellproliferation durch Induktion von Apoptose indirekt hemmt (Lee *et al.*, 2002). Ein ähnlicher Effekt auf Keratinozyten konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden: während sich die frühe Apoptose unter allen Kultivierungsbedingungen weder in HaCaT noch in NHEK durch Eap-Zugabe signifikant erhöhte, konnte ein leichte, konzentrationsabhängige Zunahme der späten Apoptose/Nekrose um maximal 5,2 % festgestellt werden (Abb. 4-6). Die Apoptose wurde folglich in deutlich weniger Keratinozyten induziert als die Proliferation inhibiert

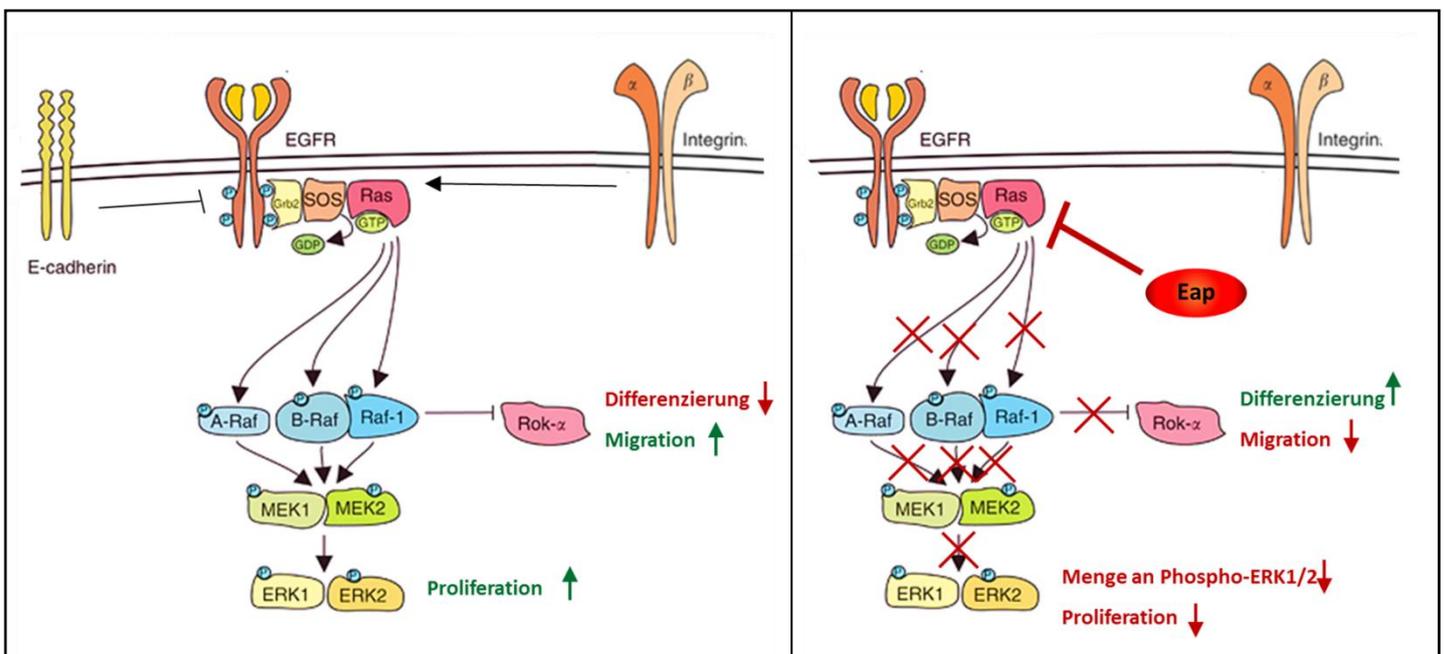
wurde (z.B. Zunahme der Apoptose von NHEK um 2,8 %, Reduktion der Proliferation um 27 %), was dafür spricht, dass Eap keine Apoptose auslöst, sondern den Proliferationsprozess an sich inhibiert. Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Resultate liefert – neben den unterschiedlichen, verwendeten Zelltypen – die verwendete Eap-Menge, welche mit 400 µg/ml bei Lee sehr viel höher als die in dieser Arbeit verwendeten 15 bzw. 20 µg/ml war. Fände die Reduktion der Proliferation auch *in vivo* statt, wäre ein entscheidender Prozess der Epithelisation inhibiert (Martin, 1997, Singer und Clark, 1999).

Darüber hinaus konnte ein stimulierender Effekt von Eap auf die Differenzierung in NHEK und HaCaT nachgewiesen werden. Sowohl die Transkriptionsraten des frühen Differenzierungsmarker Keratin 10, als auch des späten Differenzierungsmarker Involucrin wurden durch Eap konzentrationsabhängig erhöht (Abb. 4-7). Die Bestätigung dieses Ergebnisses auf Proteinebene war jedoch nur für NHEK möglich (Abb. 4-7), da die entsprechende Proteinmenge in HaCaT-Zellen so gering war, dass die Konzentration unter der Nachweisgrenze des Western-Blots lag. Obwohl bereits ein von *S. aureus* exprimierter Inhibitor der epidermalen Differenzierung bekannt ist (Sugai *et al.*, 1990), wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt, dass das Bakterium die Differenzierung auch stimulieren kann. Da die Regulation von Proliferation und Differenzierung meist reziprok proportional verläuft (Kern *et al.*, 2011) und Eap einen umgekehrten Effekt auf diese Vorgänge hatte, ergibt sich die These, dass die Eap-Effekte aus einer Wechselwirkung mit dem Regulationsmechanismus resultieren könnten. Am Beispiel der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalkaskade wird diese These im übernächsten Abschnitt diskutiert.

NHEK reagierten in allen Assays empfindlicher auf Eap als HaCaT, was möglicherweise den zellbiologischen Eigenschaften dieser immortalisierten Zelllinie zuzuschreiben ist. Zwar repräsentieren NHEK aufgrund ihres Status als primäre Zellen die tatsächlichen Vorgänge in der Wunde besser als die immortalisierten HaCaT-Zellen, dennoch können diese artifiziiellen *in vitro* Versuche nur einen Hinweis auf die tatsächlich in der Wunde ablaufenden Prozesse geben. Dort werden Migration, Proliferation und Differenzierung durch komplizierte Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen gesteuert und hängen von diversen Faktoren, wie beispielsweise der Festigkeit des Schorfs oder der Proteinzusammensetzung des

Granulationsgewebes, ab. Außerdem sind zahlreiche Wachstumsfaktoren, Cytokine und Proteasen beteiligt (Martin, 1997, Singer und Clark, 1999, Werner und Grose, 2003). Ob Eap seinen inhibitorischen Effekt auf Migration und Proliferation bzw. den stimulierenden Effekt auf die Differenzierung unter diesen komplexen Bedingungen ebenfalls entfaltet, muss letztlich im Tiermodell geklärt werden, da diese Prozesse *in vitro* nur unzureichend untersucht werden können.

Unabhängig von der Komplexität der extrazellulären Regulation ist intrazellulär die Ras-abhängige Signaltransduktion entscheidend an der Homöostase von Proliferation und Differenzierung beteiligt. Ras kann „downstream“ vom EGF-Rezeptor oder von Integrinen aktiviert werden, wohingegen Adhäsions-Moleküle wie E-Cadherin hemmend wirken. Proliferation und Migration werden über die Ras/Raf/MEK/ERK-Signalkaskade stimuliert, während die Differenzierung durch



**Abb. 5-1: Vereinfachte Übersicht über die Ras-Signalkaskade in Keratinozyten (links) und deren Beeinflussung durch Eap (rechts) (abgeänderter Nachdruck einer Vorlage von Kern *et al.* (2011) mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: [British Journal of Cancer], copyright (2011)).** Ras kann downstream vom EGF-Rezeptor oder von Integrinen aktiviert werden, wohingegen Adhäsions-Moleküle wie E-Cadherin hemmend wirken. Mit Hilfe der downstream Effektoren werden Proliferation und Migration über die Raf/MEK/ERK-Signalkaskade stimuliert und die Differenzierung wird durch Hemmung von Rok- $\alpha$  gering gehalten. Eine inhibitorische Interaktion von Eap mit Ras würde diese Stimulation und Hemmung aufheben, was eine Erhöhung der Differenzierung, aber Erniedrigung von Phospho-ERK1/2, Migration und Proliferation zur Folge hätte. Pfeile stehen für Stimulation, stumpfe Pfeile für Hemmung. Nach oben zeigende, grüne Pfeile symbolisieren Erhöhung, wohingegen nach unten gerichtete, rote Pfeile Reduktionen verdeutlichen.

Hemmung von ROK- $\alpha$  gering gehalten wird (Kern *et al.*, 2011, Shibata *et al.*, 2012) (Abb. 5-1). Diese von Raf-1 vermittelte Inhibition ist außerdem die Voraussetzung für eine normale Migrationsfähigkeit (Ehrenreiter *et al.*, 2005). Da die Ras-abhängige Signaltransduktion in Keratinozyten folglich alle Prozesse mitreguliert, auf die Eap in unseren Untersuchungen einen Effekt hatte, bietet sich diese Signalkaskade als Interaktionspartner für Eap an. Phosphoryliertes ERK1/2 lässt sich besonders gut in einer Western-Blot-Analyse nachweisen, darum wurde die Vermutung anhand dieses downstream-Effektors von Ras untersucht. Tatsächlich fand durch Eap-Vorinkubation eine konzentrationsabhängige Reduktion der KGF-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung statt (Abb.4-8). Mit 30  $\mu\text{g/ml}$  Eap wurde die Phosphorylierung um 50,5% reduziert. Dieses Ergebnis stimmt mit Resultaten aus Endothelzellen überein, welche mit Eap-Inkubation ebenfalls eine Reduktion der VEGF bzw. bFGF induzierten ERK1/2-Phosphorylierung aufwiesen (Sobke *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde gezeigt, dass diese Inhibierung der Ras/Raf/MEK/Erk-Signalkaskade aus der Blockade der Ras-Aktivierung resultierte (Sobke *et al.*, 2006).

Diese Tatsache macht die These wahrscheinlich, dass die hier beobachtete Reduktion von Phospho-ERK1/2 in Keratinozyten ebenfalls auf eine Inhibition der Ras-Aktivierung zurückführbar ist. Eine solche Interaktion von Eap mit Ras würde die normalerweise stattfindende Stimulation und Hemmung aufheben, was eine Erhöhung der Differenzierung, aber Erniedrigung von Phospho-ERK1/2, der Migration und Proliferation zur Folge hätte (Abb. 5-1). Eine Eap-Inkubation führte interessanterweise bei allen Prozessen zu genau diesen Resultaten (vgl. 4.2.1-4.2.4), was die These, dass Eap die Ras-abhängige Signaltransduktion in Keratinozyten oberhalb von Raf beeinflusst, bekräftigt. Um den Interaktionspartner, bei dem es sich möglicherweise um Ras handelt, eindeutig zu identifizieren, sind jedoch weitere Experimente notwendig.

Da die hier gefundene *in vitro* Interaktion von Eap mit der Epithelisation neue Möglichkeiten der Behandlung von *S. aureus*-infizierten Wunden eröffnet, indem beispielsweise Proliferation und Migration der Keratinozyten gezielt aktiviert werden, empfiehlt es sich *in vitro* und *in vivo* weiterführende Untersuchungen vorzunehmen, um den Mechanismus der Inhibition von Proliferation und Migration bzw. der Stimulation der Differenzierung eindeutig zu klären.

### 5.3 Charakterisierung der Internalisierung von *S. aureus* in Keratinozyten

Bevor der zugrundeliegende Mechanismus untersucht wurde, sollte die Internalisierung in Keratinozyten besser charakterisiert werden. Entsprechend der Kenntnis, dass *S. aureus* fähig ist in humane, nichtprofessionelle Phagozyten einzudringen (Almeida *et al.*, 1996, Bayles *et al.*, 1998, Bost *et al.*, 1999, Ellington *et al.*, 1999, Deitch *et al.*, 1995, Jevon *et al.*, 1999), konnte die Invasion auch in Hautzellen mit SA113 nachgewiesen werden (Abb. 4-9). Diese nahm mit Inkubationszeit und zugegebener Bakterienmenge zu, wobei eine Sättigung feststellbar war. Nach der Internalisierung nahm die Zahl der intrazellulär überlebenden Bakterien mit fortschreitender Zeit jedoch signifikant ab. Nach 48 Stunden war noch ein Viertel der nach 1,5 Stunden vorhandenen Bakterien detektierbar (Abb. 4-9). Dass nur ein Teil der Bakterien in der Lage war, das Phagosom aufzulösen und im Cytosol zu persistieren, während die restlichen im Phagolysosom degradiert werden, ist eine mögliche Erklärung für diese Abnahme (Bayles *et al.*, 1998, Schroder *et al.*, 2006a). Das Entkommen aus dem Phagosom ist von *agr* und dem synergistischen Effekt von  $\delta$ - und  $\beta$ -Toxin abhängig (Giese *et al.*, 2011, Wesson *et al.*, 1998). Für andere Stämme von *S. aureus* wurde außerdem gezeigt, dass infizierte Zellen aufgrund einer hohen Toxinproduktion abgetötet wurden (Haslinger-Löffler *et al.*, 2005, Wesson *et al.*, 1998, Wesson *et al.*, 2000), wodurch antimikrobielle Wirkstoffe in die Zellen eindringen und die intrazellulären Bakterien abtöten könnten. Dieser Prozess konnte hier aber weitestgehend ausgeschlossen werden, da infizierte und nicht-infizierte Zellen die gleichen Apoptose-Raten besaßen (Abb. 4-9).

Die in der normalen Epidermis und in einer Wunde vorhandenen Keratinozyten unterscheiden sich in ihren Eigenschaften voneinander. Bisher wurden die Internalisierungskapazitäten dieser Keratinozyten-Phänotypen weder für *S. aureus* noch für andere Bakterien untersucht. Der Differenzierungsstatus spielt beispielsweise bei chronischen Geschwüren eine besondere Rolle, da Keratinozyten aus den nicht-heilenden Wundrändern durch eine gestörte Differenzierung gekennzeichnet sind (Stojadinovic *et al.*, 2008). Dies ist deswegen von Bedeutung,

weil *S. aureus* der vorherrschende Erreger in den als Paradebeispiel für chronische Haut-Infektionen geltenden, infizierten, chronischen Geschwüren ist (Brook und Frazier, 1998, Lipsky *et al.*, 2004, Thomsen *et al.*, 2010). Differenzierte Keratinozyten wurden in der hier vorliegenden Arbeit generiert, indem ein konfluenter Zellrasen bis zu sieben Tage weiter kultiviert wurde. Die Expression entsprechender Marker kennzeichnet in unverletzter Haut den Übergang von der basalen Schicht in die darüber liegenden Schichten und die damit einhergehenden Stadien der Differenzierung (Candi *et al.*, 2005, LaPres und Hudson, 1996, Leigh *et al.*, 1993, Watt, 1983). Dementsprechend bestätigte die erhöhte Expression von Keratin 10 und Involucrin, mit welcher morphologische Veränderungen der Keratinozyten einhergingen, die vorhandene Differenzierung in unserem Versuchsansatz (Abb. 4-11). Während die Adhäsion von SA113 durch die zunehmende Differenzierung lediglich halbiert wurde, fand eine drastische Reduktion der Internalisierung um 99,6 % statt (Abb. 4-11). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Adhäsion alleine nicht ausreichend ist, um die Aufnahme von Bakterien zu vermitteln, vielmehr scheinen intrazelluläre Mechanismen in den Hautzellen ausschlaggebend zu sein. Noch ungeklärte intrazelluläre Mechanismen sind außerdem dafür verantwortlich, dass die Überlebensfähigkeit der intrazellulären Staphylokokken durch den Differenzierungsstatus negativ beeinflusst wurde (Abb. 4-11). Denkbar sind Unterschiede in der bakteriell induzierten Auflösung der Phagosomen oder bei der Verschmelzung mit Lysosomen. Apoptotische/nekrotische Prozesse tragen hier nicht zur reduzierten Überlebensfähigkeit bei, da die differenzierten Keratinozyten vergleichbare Apoptose- bzw. Nekrose-Raten aufwiesen wie undifferenzierte Zellen (Daten nicht gezeigt). Folglich ist die Infektion von differenzierten Keratinozyten aus zwei Gründen erschwert: Neben der verminderten Aufnahme von Staphylokokken scheinen die internalisierten Bakterien erfolgreicher eliminiert zu werden. Im Gegensatz dazu hatte der Proliferationsstatus der Keratinozyten einen geringen Einfluss auf die Internalisierungsrate von SA113. Zwar war die Anzahl der von proliferierenden Zellen aufgenommenen Bakterien signifikant höher als in nicht-proliferativen HaCaT, dies ist jedoch zum Teil auf den größeren Anteil an proliferierenden Zellen zurückführbar (Abb. 4-10). Diese *in vitro* Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Invasion *in vivo* bevorzugt in bestimmten Bereichen der Wunde stattfinden könnte und lassen die gestörte Differenzierung in chronischen Geschwüren (Stojadinovic *et al.*, 2008) in einem neuen Licht erscheinen.

Die Analyse der Adhäsion an und Aufnahme verschiedener Adhäsionsprotein-Deletionsmutanten durch HaCaT-Zellen und primäre Keratinozyten zeigte nicht nur in Hinblick auf die Wildtypen, sondern auch die Mutanten betreffende Unterschiede. Warum die beiden Wildtypstämme SA113 und 8325-4 besser mit HaCaT-Zellen interagierten, als mit primären Keratinozyten, ist fraglich (Abb. 4-12). Eine mögliche Erklärung wäre, dass HaCaT-Zellen mehr  $\alpha 5\beta 1$ -Integrine exprimieren als NHEK, oder, dass das Zellmedium aufgrund der FCS-Zugabe eine größere Menge an ECM-Proteinen enthält. Obwohl beide Stämme einen ähnlichen genetischen Hintergrund besitzen und in ähnlichem Maß an beide Zelltypen adhärten, wurde SA113 effizienter von HaCaT-Zellen aufgenommen als 8325-4, wohingegen das Gegenteil mit NHEK der Fall war. Beide stammen von NCTC8325 ab, besitzen aber minimale genetische Unterschiede. 8325-4 enthält im Gegensatz zu NCTC8325 keine Prophagen, während SA113 ein N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin mutagenisiertes Derivat mit veränderten Restriktions- und Modifikationseigenschaften darstellt, das *in vitro* eine erhöhte Fähigkeit zur Biofilmbildung aufweist (Iordanescu und Surdeanu, 1976, Novick, 1967). Die Unterschiede in der Invasivität dieser beiden WT Stämme können in solchen geringfügigen Änderungen begründet sein. Stamm-abhängige Effekte auf die Zell-Viabilität konnten aufgrund ähnlicher Apoptose/Nekrose-Raten (< 5%) jedoch ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Bei HaCaT-Zellen adhärten und internalisierten die jeweiligen *srtA* und *fnbAB*-Mutanten schlechter als der entsprechende Wildtyp. Diese Beobachtung stimmt mit vorherigen Ergebnissen überein, die zeigten, dass die Invasion von 8325-4 in HaCaT in Abhängigkeit von FnBPs erfolgte (Edwards *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu konnte mit NHEK kein Unterschied in der Adhäsion festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass sich die Adhäsions-Mechanismen in HaCaT und NHEK unterscheiden. Die *fnbAB*-Mutante wies außerdem keine reduzierte Internalisierung auf, wohingegen die Aufnahme der *srtA*-Mutante vermindert war. Dies deutet zum einen darauf hin, dass in primären Keratinozyten neben FnBPs andere oberflächen-gebundene Proteine an der Invasion beteiligt sind, zum anderen demonstriert es, dass die Invasion unabhängig von der Adhäsion erfolgte. Neben der Verankerung des Bakteriums auf der Wirtszelle scheinen zusätzliche Faktoren für eine anschließende Aufnahme benötigt zu werden. Ähnliche Resultate wurden auch von anderen Arbeitsgruppen veröffentlicht: So zeigten Cho und Kollegen, dass die Adhäsion an gesunde und von Schuppenflechte betroffene Haut unabhängig von

FnBPs stattfand (Cho *et al.*, 2001), während Kintarak *et al.* zeigen konnten, dass die Invasion in primäre Keratinozyten zwar stammabhängig, aber ebenfalls unabhängig von FnBPs erfolgte (Kintarak *et al.*, 2004b). Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Invasions-Mechanismen in HaCaT und NHEK könnten ungleiche Expressions-Level der  $\alpha 5\beta 1$ -Integrine darstellen (Edwards *et al.*, 2011), da diese zusammen mit Fibronectin als Hauptinteraktionspartner der FnBPs gelten. Insgesamt ist die Rolle der FnBPs bei der Invasion von Keratinozyten nicht so eindeutig geklärt wie bei der Internalisierung in andere Zelltypen (Edwards *et al.*, 2011, Dziwanowska *et al.*, 1999, Fowler *et al.*, 2000, Jevon *et al.*, 1999, Lammers *et al.*, 1999, Sinha *et al.*, 1999, Sinha und Fraunholz, 2010). Dementsprechend ersetzt gelöstes Eap in diesem Fall zum ersten Mal nicht die Funktion der FnBPs, sondern bekommt eine Bedeutung als eigenständiges Invasin (vgl. 5.4). Die unveränderte Internalisierung und Adhäsion der *eap* Mutante im Vergleich zum Wildtyp spricht hingegen dafür, dass das zellwandgebundene Eap eher unbedeutend für die Interaktion mit Keratinozyten ist. Eine Erklärung hierfür wäre, dass *S. aureus* eine Reihe von Adhäsinen mit überlappenden Bindungseigenschaften produziert, welche das Fehlen von Eap kompensieren können. Darum weisen *eap*-Mutanten auch keine verminderte Bindung an Fibronectin, Fibrinogen (Chavakis *et al.*, 2002, Hussain *et al.*, 2002) oder Vitronectin auf (Kreikemeyer *et al.*, 2002).

Es ist bekannt, dass die Invasion in verschiedenen Zelltypen mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose stattfindet (Agerer *et al.*, 2003, Agerer *et al.*, 2005, Dziwanowska *et al.*, 1999, Ellington *et al.*, 1999, Fowler *et al.*, 2003, Fraunholz und Sinha, 2012, Jevon *et al.*, 1999, Schroder *et al.*, 2006b). Daran beteiligt sind sowohl Polymerisation des Aktin-Zytoskeletts als auch wirtseigene Phosphotyrosinkinasen (PTK) wie Src (Agerer *et al.*, 2003, Fowler *et al.*, 2003). Hier konnten diese Prozesse in Keratinozyten nun ebenfalls bestätigt werden. Die pharmakologische Inhibition der Polymerisation des Aktin-Zytoskeletts durch Cytochalasin D führte zu einer dosisabhängigen Erniedrigung der Invasion von *S. aureus* bis hin zur fast vollständigen Blockade (Abb. 4-13). Vergleichbare Reduktionen der Internalisierungsraten erfolgten auch durch Genistein, einem kompetitiven Inhibitor von PTKs im Allgemeinen, und durch Src-Inhibitor 1, einem Inhibitor der Src-Kinase, im Speziellen (Abb. 4-13). Diese Ergebnisse verdeutlichen nicht nur die Beteiligung eines aktiven Zytoskeletts und von Phosphotyrosinkinasen an der bakteriellen

Aufnahme, sie stimmen außerdem mit den Beobachtungen aus anderen Zelltypen sehr gut überein. So wurde beispielsweise gezeigt, dass die Src-Phosphotyrosinkinase notwendig ist, um die Invasion von Cowan I in 293T-Zellen zu vermitteln (Agerer *et al.*, 2003) oder, dass das Zytoskelett an der Aufnahme von NCTC6571 in Osteoblasten beteiligt ist (Jevon *et al.*, 1999). Folglich deuten sie darauf hin, dass die Aufnahme von *S. aureus* in Keratinozyten ebenso wie in anderen Zelltypen über Rezeptor-vermittelte Endozytose erfolgt. Der Aufnahme-Mechanismus von Staphylokokken scheint demnach in allen nicht-phagozytotischen, eukaryotischen Zellen gleich zu sein.

## 5.4 Stimulation der bakteriellen Invasion durch Eap-Vorinkubation der Keratinozyten

Eap, welches in einer mit *S. aureus* infizierten Wunde sezerniert wurde, kann nach der Adhäsion an Keratinozyten in deren Cytosol gelangen (vgl. 5.1). Dieses adhärenste und intrazelluläre Eap beeinflusst die Bindung und Aufnahme von SA113 in Keratinozyten positiv (Abb. 4-14). Beide Vorgänge wurden konzentrationsabhängig in HaCaT erhöht, wobei der Effekt auf die Invasion ausgeprägter war. In primären Keratinozyten konnten vergleichbare Resultate nachgewiesen werden (Abb. 4-14). Um die Experimente unabhängig von chargen-spezifischen Schwankungen durchführen zu können, wurde die Analyse des Eap-Effekts jedoch in HaCaT-Zellen durchgeführt. Da in Facs-Analysen mit GFP-exprimierendem *S. aureus* sowohl die Anzahl der infizierten, GFP-positiven Keratinozyten, als auch die mittlere Fluoreszenz der infizierten Zellen mit steigender Eap-Konzentration zunahm (Abb. 4-14), kann davon ausgegangen werden, dass Eap nicht nur die Gesamtzahl an HaCaT-Zellen, welche Bakterien aufnehmen, vergrößerte, sondern darüber hinaus die Menge der von einzelnen Keratinozyten-Zellen aufgenommenen Bakterien erhöhte. Nachdem in verschiedenen Untersuchungen bereits gezeigt wurde, dass eine Eap-Vorinkubation der Bakterien die Adhäsion und Invasion stimuliert (Hagggar *et al.*, 2003, Hussain *et al.*, 2002, Palma *et al.*, 1999), wurde durch diese Interaktion mit eukaryotischen Zellen die Fähigkeiten des Adhäsionsfaktors Eap um einen weiteren Aspekt ergänzt. Dabei ist sichergestellt, dass der Eap-Effekt nicht auf die nah verwandten Stämme SA113 und 8325-4 beschränkt ist, da die Internalisierung der *S. aureus*-Stämme

Cowan I (ATCC 12598), LS1 (Bremell *et al.*, 1992), MSSA 1112 (Entenza *et al.*, 1997), und ST239 (Grundmeier *et al.*, 2010), welche einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund besitzen, ebenfalls durch Eap signifikant erhöht wurde (Abb. 4-15). Des Weiteren fand eine noch stärkere Stimulation der Aufnahme von *S. epidermidis*, *S. lugdenensis* und *E. coli* statt (Abb. 4-15). Diese Vertreter der Koagulase-negativen Staphylokokken und Enterobacteriaceae wurden aus Wunden isoliert und können als Koinfektion mit *S. aureus* auftreten. Der Eap-Effekt auf deren Internalisierung war bis zu 112-fach größer als bei *S. aureus*-Stämmen, wohingegen die Auswirkung auf die Adhäsion vergleichbar war. Dass Eap einen solch ausgeprägten Effekt auf die Aufnahme hat, kann mit der sehr geringen Grundinternalisierungsrate der Wundisolate zusammenhängen (Daten nicht gezeigt). Außerdem war deren Adhäsion an immobilisiertes Eap im Vergleich zu *S. aureus* vermindert (Palma *et al.*, 1999), woraus der vergleichbar geringe Effekt auf die Adhäsion resultieren könnte. Aufgrund dieser Ergebnisse und angesichts der häufig auftretenden polymikrobiellen Hautinfektionen kann angenommen werden, dass sekretiertes Eap *in vivo* neben der Invasion von *S. aureus* auch die Aufnahme von anderen fakultativ pathogenen, gram-positiven oder gram-negativen Mikroorganismen stimuliert.

Es konnte kein Oberflächenprotein von *S. aureus* identifiziert werden, dessen Anwesenheit für den stimulierenden Effekt von Eap erforderlich ist. Wie bereits diskutiert, führten sowohl die *fnbAB* als auch die *srtA* Mutationen zu einer deutlich reduzierten Adhäsion und Internalisierung von *S. aureus* in HaCaT-Zellen. Dennoch konnte kein verminderter Eap-Effekt mit diesen Mutanten festgestellt werden (Abb. 4-16), was demonstriert, dass das Vorhandensein der dazugehörigen Proteine nicht notwendig für die Eap-vermittelte Aufnahme war. Die Invasion der *fnbAB* Mutante wurde im Gegenteil sogar sieben Mal mehr stimuliert als die der anderen Stämme. Das unterstützt die aus Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen stammende Vermutung, dass Eap das Fehlen von FnBPs in Hinblick auf die Internalisierungsfähigkeit zum Teil kompensieren kann, indem es sowohl an die bakterielle Oberfläche als auch an Komponenten der extrazellulären Matrix bindet bzw. durch intrazelluläre Beeinflussung des Aufnahme-Mechanismus (Fraunholz und Sinha, 2012, Hussain *et al.*, 2002, Haggart *et al.*, 2003, Palma *et al.*, 1999). Obwohl der Eap-Effekt nicht vermindert wurde, konnte der Verlust aller zellwandgebundenen

Proteine bei der *srtA* Mutante nicht von Eap ausgeglichen werden, was dafür spricht, dass weitere Oberflächen-Proteine gemeinsam mit Eap oder den FnBPs am Invasions-Mechanismus beteiligt sind. Des Weiteren wurden weder Nptase noch zellwandgebundenes Eap auf der bakteriellen Oberfläche als Bindungspartner benötigt, da in den entsprechenden Mutanten der Eap-Effekt unverändert blieb (Abb. 4-16). Zwar wurde die Nptase als Eap-Bindungspartner identifiziert (Flock und Flock, 2001), es kommen jedoch noch zwei weitere, bis dato unbekannte Interaktionspartner in Frage (Kreikemeyer *et al.*, 2002), die den Verlust kompensieren könnten. Dass die endogene Eap-Produktion keinen Einfluss auf den Eap-Effekt hatte, unterstreicht erneut den geringen Einfluss des zellwandgebundenen Eaps auf die Internalisierungsfähigkeit in Keratinozyten.

Da in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen die Bakterien mit Eap vorinkubiert wurden und folglich keine Interaktion mit eukaryotischen Zellen möglich war, ist der stimulierende Effekt von Eap auf die Internalisierung dort wahrscheinlich eine Folge der erhöhten Adhäsion (Haggar *et al.*, 2003, Hussain *et al.*, 2002, Palma *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu wurden in dieser Arbeit die Keratinozyten mit Eap inkubiert, wodurch erstmals deutliche Hinweise dafür gefunden werden konnten, dass Eap die Internalisierung nicht nur durch extrazelluläre Bindungs-Phänomene erhöht, sondern auch durch eine intrazelluläre Beeinflussung des Aufnahme-Mechanismus. Da die Adhäsion von *E.coli* beispielsweise nicht von Eap beeinflusst wurde, kann die extreme, Eap-vermittelte Steigerung der Internalisierung in diesem Fall nicht auf eine erhöhte Adhäsion zurückgeführt werden. Auch der stärkere Eap-Effekt in differenzierten Keratinozyten im Vergleich zu undifferenzierten Keratinozyten ließ sich nicht auf eine verstärkte Adhäsion nach Eap-Vorinkubation zurückführen, da die Adhäsionsraten vergleichbar waren (Abb. 4-17). Die Analyse der Aufnahme und Adhäsion von Eap bestärkte die These, dass intrazelluläre Mechanismen beeinflusst werden, da die Menge des adhärenen Eaps in differenzierten Keratinozyten nichtsignifikant verändert war, wohingegen beim intrazellulären Eap eine deutliche und signifikante Erhöhung im Vergleich zu undifferenzierten Zellen feststellbar war (Abb. 4-17). Damit konnte der verstärkte Eap-Effekt zum ersten Mal auf eine entsprechend höhere Eap-Menge in den eukaryoten Zellen zurückgeführt werden. Diese Resultate zeigen, dass lösliches Eap vor oder während der Bindung von Bakterien mit Keratinozyten interagiert und dabei

die Invasion durch intrazelluläre Wechselwirkungen stimulieren könnte. Im Gegensatz zum zellwandgebundenen Eap scheint das sekretierte Eap folglich eine bedeutende Rolle bei der Invasion von Keratinozyten und damit bei der Etablierung einer persistierend-rezidivierenden Infektion zu spielen.

Die Aufnahme von *S. aureus* via Rezeptor-vermittelte Endozytose ist ein aktiver Prozess der Wirtszelle, der in Keratinozyten – wie in dieser Arbeit gezeigt wurde - Polymerisation des Aktin-Zytoskeletts und Aktivität von wirtseigenen PTKs wie Src-Kinase voraussetzt, wobei der Mechanismus noch nicht in allen Einzelheiten bekannt ist (Abschnitt 4.3.1.4). Folglich bieten sich zahlreiche Möglichkeiten der Wechselwirkung für Eap, von denen hier nur wenige mit Hilfe von Inhibitoren überprüft werden konnten. Die Polymerisation des Aktin-Zytoskeletts scheint am stimulierenden Effekt von Eap auf die Internalisierung beteiligt zu sein, da der Effekt von Eap mit zunehmender Cytochalasin D-Konzentration sank (Abb. 4-18). Im Gegensatz dazu nahm der Eap-Effekt mit Genistein, einem Inhibitor der PTKs allgemein, und mit Src-Inhibitor 1 zu (Abb. 4-18). Dieser Anstieg resultierte vermutlich daraus, dass die Internalisierung ohne Eap durch diese Inhibitoren kontinuierlich reduziert worden ist (Abb. 4-13), während die Internalisierung mit Eap in geringerem Maß beeinflusst wurde. Es ist dabei jedoch fraglich, ob die durch Eap stimulierte Internalisierung zum Teil von anderen Kinasen vermittelt wird, oder, ob Eap durch Beeinflussung der PTKs dem Effekt der Inhibitoren entgegenwirkt. PTKs sind häufig Bestandteil von Signalkaskaden, bei welchen sie andere Proteine durch Addition eines Phosphatrestes aktivieren und dadurch Signale weiterleiten (Jin und Pawson, 2012). Da für Eap sowohl in Endothelzellen eine Interaktion mit Ras (Sobke *et al.*, 2006), als auch in dieser Arbeit eine Beeinflussung der ERK1/2 Signalkaskade nachgewiesen wurden (vgl. 5.2), kann vermutet werden, dass Eap den Aufnahme-Mechanismus ebenfalls durch eine Interaktion mit Signalkaskaden stimuliert. Das identifizierte YXNX-Motiv, welches in den Eap-Domänen 3 und 4 hoch konserviert ist, kommt als mögliche Phosphorylierungsstelle in Frage (S. Kerdudou, unveröffentlicht). Die Bedeutung der Tyrosin-Phosphorylierung in YXNX wurde weiter bestätigt, indem gezeigt werden konnte, dass Eap-Mutanten, in denen aufgrund einer Punktmutation im YXNX-Motiv keine Tyrosin-Phosphorylierung mehr möglich war, einen geringeren Effekt auf Adhäsion und Internalisierung besaßen (Rajbhandari, 2011). Dementsprechend kann die These, dass Eap möglicherweise mit Signalkaskaden

interagiert, dahingehend erweitert werden, dass diese Wechselwirkung durch Phosphorylierung vermittelt werden könnte. Die dazugehörigen Untersuchungen mit dephosphoryliertem und phosphoryliertem Eap konnten diese Vermutung bekräftigen. Während eine Dephosphorylierung keinen Einfluss auf den Eap-Effekt hatte, führte eine Phosphorylierung zu einem reduzierten Effekt (Abb. 4-19). Aufgrund gleicher Mengen an phosphoryliertem und nativem Eap in der Membran- und Cytosolfraktion, konnte ausgeschlossen werden, dass diese Verminderung aus einer geringeren Aufnahme des phosphorylierten Eaps resultierte (Abb. 4-19). Da Eap durch Phosphorylierung unwirksamer wird, kann davon ausgegangen werden, dass sekretiertes, unphosphoryliertes Eap bei der Stimulation der Internalisierung phosphoryliert wird. Bisher gelang es uns nicht den Phosphorylierungsstatus von Eap nachzuweisen, was dringend erforderlich ist, um diese These zu bestätigen und dementsprechend Gegenstand laufender Untersuchungen ist. Des Weiteren sollen in weiterführenden Versuchen die möglichen Interaktionspartner identifiziert werden. Mehrere bakterielle Erreger wie enteropathogene *E. coli* (EPEC), *Helicobacter pylori* oder *Chlamydia trachomatis* sekretieren Tyrosinkinase-Substrate, welche in Wirtszellen eindringen (Backert und Selbach, 2005, Kenny und Finlay, 1997, Mehlitz *et al.*, 2008, Tegtmeyer und Backert, 2011). Im Cytosol werden diese Proteine in der Regel von Kinasen der Wirtszelle phosphoryliert, was entweder direkt den gewünschten Effekt induziert oder woraufhin sie mit anderen cytosolischen Proteinen interagieren, um die Wirtszell-Funktionen zum Nutzen des Erregers zu modulieren (Backert und Selbach, 2005). Die Tatsache, dass Phosphorylierung bakterieller Proteine durch Wirts-Kinasen bei anderen Erregern ein bekanntes Vorgehen ist, lässt zusammen mit den in dieser Arbeit bzw. von R. Rajbhandari gezeigten Resultaten (Rajbhandari, 2011) die Möglichkeit einer ähnlichen Eap-Interaktion bei der Stimulation der Internalisierung zunehmend wahrscheinlich erscheinen.

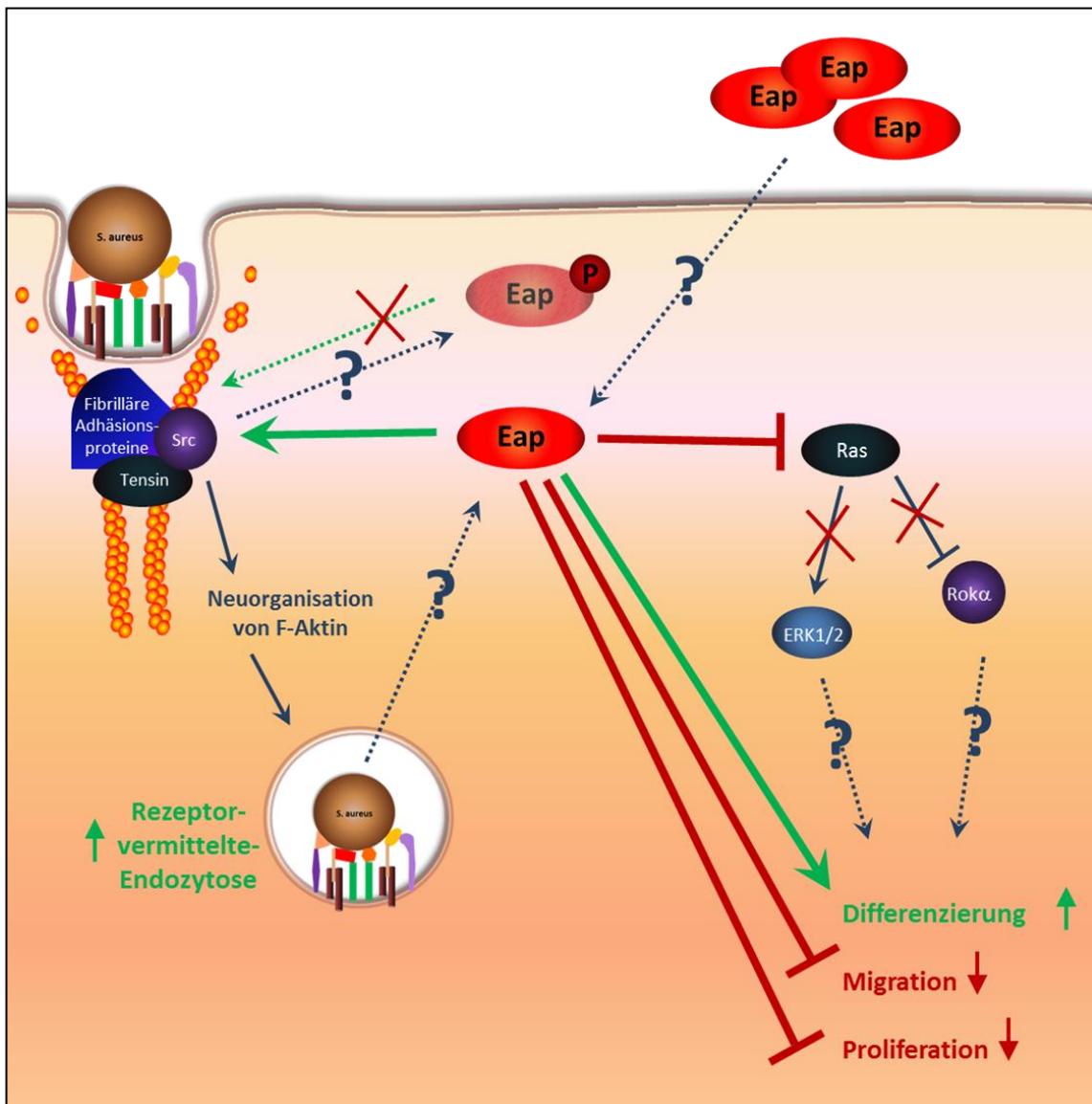
Obwohl in dieser Arbeit *in vitro* mit primären Keratinozyten und HaCaT-Zellen neue Einblicke in die Internalisierungs-stimulierenden Fähigkeiten von Eap gewonnen werden konnten, darf nicht vergessen werden, dass *in vivo* zahlreiche weitere Faktoren die Aufnahme von *S. aureus* beeinflussen. Zwar besteht die normale Epidermis zu 95 % aus Keratinozyten, enthält unter anderem aber auch Mastzellen (Abel *et al.*, 2011), Makrophagen und dendritische Zellen (Nagl *et al.*, 2002), die nicht nur ebenfalls in der Lage sind Bakterien aufzunehmen, sondern darüber hinaus

dabei eine bedeutendere Rolle spielen könnten als Keratinozyten. In einer Wunde herrschen außerdem gänzlich veränderte Zustände vor. Je nach Heilungsphase sind prozentual keine bis sehr wenige Keratinozyten, dafür aber zahlreiche andere Zelltypen wie Fibroblasten vorhanden (Martin, 1997, Singer und Clark, 1999, Werner und Grose, 2003). Des Weiteren ist nicht sicher, ob sich die bakterielle Invasion *in vivo* im dreidimensionalen Gewebe mit der Aufnahme im artifiziellen Monolayer des *in vitro* Systems vergleichen lässt. Tierversuche könnten diese Fragen klären. Außerdem sekretieren Keratinozyten *in vivo* antimikrobielle Peptide (Braff *et al.*, 2005), deren Wechselwirkung mit der Internalisierung von *S. aureus* nicht untersucht wurde. Diese Peptide besitzen nicht nur einen direkten Effekt auf die bakterielle Zellmembran (Harder und Schroder, 2005), sondern gehen auch indirekt durch ihre immunmodulatorischen Eigenschaften gegen die Bakterien vor (Oppenheim und Yang, 2005).

## 5.5 Konklusion und Ausblick

Eap kann entweder über einen unbekanntem Mechanismus in Keratinozyten aufgenommen oder direkt von internalisierten Bakterien im Cytosol sezerniert werden (Abb. 5-2). Intrazellulär ist Eap in der Lage die Rezeptor-vermittelte Endozytose und die Differenzierung zu stimulieren, während Migration und Proliferation gehemmt werden (Abb. 5-2). Die Menge an Phospho-ERK1/2 wird ebenfalls reduziert, was vermutlich durch die Hemmung der Ras-abhängigen Signaltransduktion verursacht wird (Abb. 5-2). Da diese Signalkaskade Differenzierung, Migration und Proliferation reguliert, wäre deren Hemmung eine mögliche Erklärung für die beobachteten Eap-Effekte auf die Epithelisationsprozesse. Ohne Migration und Proliferation kann keine Epithelisation stattfinden (Kirfel und Herzog, 2004, Morasso und Tomic-Canic, 2005), was zwangsläufig zu chronischen, nicht heilenden Wunden führt. Man kann mutmaßen, dass die Heilung durch *S. aureus* gezielt verzögert wird, da das Bakterium in diesem Milieu möglicherweise eine persistierende Infektion besser etablieren kann, als in normaler Haut. Insgesamt bieten diese Ergebnisse Ansätze für neue Behandlungsmöglichkeiten chronischer Wunden auf Basis einer Eap-Inaktivierung. Zunächst müsste dazu überprüft werden, ob und an welcher Stelle Eap mit der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalkaskade interagiert und, ob diese Interaktion

tatsächlich die Ursache für den Eap-Effekt auf die Differenzierung, Migration und Proliferation ist.



**Abb. 5-2: Vereinfachtes Schaubild über die möglichen Wechselwirkungen von Eap mit Keratinozyten.** Eap kann entweder über einen unbekanntem Mechanismus aufgenommen oder – je nach Stamm und intrazellulärem Schicksal der internalisierten Bakterien – intrazellulär sezerniert werden. Im Cytosol stimuliert Eap (grüne Pfeile) die Rezeptor-vermittelte Endozytose und die Differenzierung, während Migration und Proliferation gehemmt werden (rote, stumpfe Pfeile). Die Menge an ERK1/2 wird ebenfalls reduziert, was vermutlich aus der Blockade der Ras-abhängigen Signaltransduktion resultiert. Diese reguliert Differenzierung, Migration und Proliferation, weswegen die hier beobachteten Eap-Effekte möglicherweise ebenfalls auf die Beeinflussung der Signalkaskade zurückführbar sind. Phosphoryliertes Eap, welches evtl. bei der Stimulation der RME entsteht, hat keinen Einfluss auf die RME. Nach oben zeigende, grüne Pfeile symbolisieren Erhöhung, wohingegen nach unten gerichtete, rote Pfeile für Reduktion stehen.

Die Untersuchungen zum Einfluss von Eap auf die Epithelisation können zur verbesserten Behandlung von mit *S. aureus* infizierten Wunden beitragen, was aufgrund der mit *S. aureus*-assoziierten schlechten Wundheilung von großem Nutzen wäre.

Die Aufnahme von *S. aureus* in Keratinozyten betreffend, konnten ebenfalls neue Erkenntnisse in dieser Arbeit gewonnen werden. Diese kann unabhängig von FnBPs erfolgen und findet bevorzugt in proliferierenden, undifferenzierten Keratinozyten statt. Zusätzlich ist die Überlebensfähigkeit in undifferenzierten Zellen höher als in differenzierten. Die Invasion findet vermutlich – wie in anderen eukaryotischen Zellen bereits gezeigt – mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose statt.

Außerdem konnten einige neue Beobachtungen zur Rolle von Eap als Invasin gemacht werden: während zellwandgebundenes Eap keinen Einfluss hatte, erhöhte gelöstes Eap unabhängig von der FnBP-Expression die Invasion in Keratinozyten stark. Dabei scheint nicht die verstärkte bakterielle Bindung an die eukaryotische Zelloberfläche die Ursache für diesen Effekt zu sein, sondern vielmehr die intrazelluläre Beeinflussung der an der Aufnahme beteiligten Prozesse, welche möglicherweise durch Phosphorylierung von Eap erfolgt (Abb. 5-2). Als Folge wird die Rezeptor-vermittelte Endozytose erhöht. Dazu ist die Aktivität des Zytoskeletts erforderlich. Ob die an der normalen Internalisierung beteiligten Kinasen durch Eap aktiviert, oder ob weitere Kinasen involviert werden, blieb jedoch ungeklärt und ist Gegenstand weiterführender Untersuchungen. Dabei ist ein vordringliches Ziel den Phosphorylierungsstatus von Eap bestimmen zu können, um zu klären, ob Eap in der eukaryotischen Zelle tatsächlich phosphoryliert wird. Im nächsten Schritt wäre es sinnvoll den Interaktionspartner zu bestimmen.

Sekretiertes Eap scheint folglich eine bedeutende Rolle bei der Invasion von Keratinozyten und damit bei der Etablierung einer persistierend-rezidivierenden Infektion zu spielen, da die Aufnahme sowohl Schutz vor dem Immunsystem als auch die Ausbreitung in neue ökologische Nischen ermöglicht (Garzoni und Kelley, 2009, Sendi und Proctor, 2009). Des Weiteren kann angesichts der Tatsache von häufig auftretenden polymikrobiellen Hautinfektionen angenommen werden, dass sekretiertes Eap neben der Invasion von *S. aureus* auch die Aufnahme von anderen

fakultativ pathogenen, gram-positiven oder gram-negativen Mikroorganismen *in vivo* stimuliert. Um diese Vermutungen zu bestätigen, sind Versuche im Tiermodell erforderlich.

Da die erfolgreiche Therapie einer Wundinfektion voraussetzt, dass die Erreger zugänglich für antimikrobielle Therapeutika sind, ist es notwendig zu verstehen wie Bakterien ebendies durch Invasion verhindern. Das Verständnis dieses Vorgangs bietet vielleicht einen neuen Angriffspunkt für die Behandlung persistierender Hautinfektionen. Neue Erkenntnisse über Details dieser Vorgänge könnten des Weiteren die Entwicklung neuer antimikrobieller Therapeutika unterstützen.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Abel J, Goldmann O, Ziegler C, Holtje C, Smeltzer MS, Cheung AL, Bruhn D, Rohde M, Medina E (2011). *Staphylococcus aureus* evades the extracellular antimicrobial activity of mast cells by promoting its own uptake. *J Innate Immun* 3: 495-507
2. Agerer F, Lux S, Michel A, Rohde M, Ohlsen K, 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: 2189-2200
3. Agerer F, Michel A, Ohlsen K, Hauck CR (2003). Integrin-mediated invasion of *staphylococcus aureus* into human cells requires src family protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 278: 42524-42531
4. Almeida RA, Matthews KR, Cifrian E, Guidry AJ, Oliver SP (1996). *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* 79: 1021-1026
5. Athanasopoulos AN, Economopoulou M, Orlova VV, Sobke A, Schneider D, Weber H, Augustin HG, Eming SA, Schubert U, Linn T, Nawroth PP, Hussain M, Hammes HP, Herrmann M, Preissner KT, Chavakis T (2006). The extracellular adherence protein (eap) of *staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. *Blood* 107: 2720-2727
6. Backert S, Selbach M (2005). Tyrosine-phosphorylated bacterial effector proteins: The enemies within. *Trends Microbiol* 13: 476-484
7. Barber M, Rozwadowska-Dowzenko M (1948). Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet* 2: 641-644
8. Bayles KW, Wesson CA, Liou LE, Fox LK, Bohach GA, Trumble WR (1998). Intracellular *staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun* 66: 336-342
9. Bera A, Herbert S, Jakob A, Vollmer W, Gotz F (2005). Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? the peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 55: 778-787
10. Boden MK, Flock JI (1992). Evidence for three different fibrinogen-binding proteins with unique properties from *staphylococcus aureus* strain newman. *Microb Pathog* 12: 289-298
11. Bost KL, Ramp WK, Nicholson NC, Bento JL, Marriott I, Hudson MC (1999). *Staphylococcus aureus* infection of mouse or human osteoblasts induces high levels of interleukin-6 and interleukin-12 production. *J Infect Dis* 180: 1912-1920

12. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106: 761-771
13. Braff MH, Bardan A, Nizet V, Gallo RL (2005). Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J Invest Dermatol* 125: 9-13
14. Bremell T, Abdelnour A, Tarkowski A (1992). Histopathological and serological progression of experimental *staphylococcus aureus* arthritis. *Infect Immun* 60: 2976-2985
15. Brenner DJ, Boone DR, Garrity GM, Goodfellow M, Krieg NR, Rainey FA, Schleifer K, Staley JT, Vos P (2005). *Bergey's Manual of systematic bacteriology*.
16. Brook I, Frazier EH (1998). Aerobic and anaerobic microbiology of chronic venous ulcers. *Int J Dermatol* 37: 426-428
17. Bunikowski R, Mielke ME, Skarabis H, Worm M, Anagnostopoulos I, Kolde G, Wahn U, Renz H (2000). Evidence for a disease-promoting effect of *staphylococcus aureus*-derived exotoxins in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 105: 814-819
18. Candi E, Schmidt R, Melino G (2005). The cornified envelope: A model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 328-340
19. Cao C, Sun Y, Healey S, Bi Z, Hu G, Wan S, Kouttab N, Chu W, Wan Y (2006). EGFR-mediated expression of aquaporin-3 is involved in human skin fibroblast migration. *Biochem J* 400: 225-234
20. Charpentier E, Anton AI, Barry P, Alfonso B, Fang Y, Novick RP (2004). Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *J Biol Chem* 279: 6076-6085
21. Chavakis T, Hussain M, Kanse SM, Peters G, Bretzel RG, Flock JI, Herrmann M, Preissner KT (2002). *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med* 8: 687-693
22. Chavakis T, Preissner KT, Herrmann M (2007). The anti-inflammatory activities of *staphylococcus aureus*. *Trends Immunol* 28: 408-418
23. Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, Herrmann M (2005). *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: The role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost* 94: 278-285
24. Cheng AG, DeDent AC, Schneewind O, Missiakas D (2011). A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation. *Trends Microbiol* 19: 225-232

25. Cheng AG, Kim HK, Burts ML, Krausz T, Schneewind O, Missiakas DM (2009). Genetic requirements for *staphylococcus aureus* abscess formation and persistence in host tissues. *FASEB J* 23: 3393-3404
26. Cho SH, Strickland I, Boguniewicz M, Leung DY (2001). Fibronectin and fibrinogen contribute to the enhanced binding of *staphylococcus aureus* to atopic skin. *J Allergy Clin Immunol* 108: 269-274
27. Clarke SR, Foster SJ (2006). Surface adhesins of *staphylococcus aureus*. *Adv Microb Physiol* 51: 187-224
28. Claro T, Widaa A, O'Seaghdha M, Miajlovic H, Foster TJ, O'Brien FJ, Kerrigan SW (2011). *Staphylococcus aureus* protein A binds to osteoblasts and triggers signals that weaken bone in osteomyelitis. *PLoS One* 6: e18748
29. Clement S, Vaudaux P, Francois P, Schrenzel J, Huggler E, Kampf S, Chaponnier C, Lew D, Lacroix JS (2005). Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *J Infect Dis* 192: 1023-1028
30. Cosgrove K, Coutts G, Jonsson IM, Tarkowski A, Kokai-Kun JF, Mond JJ, Foster SJ (2007). Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 189: 1025-1035
31. Cunnion KM, Zhang HM, Frank MM (2003). Availability of complement bound to *staphylococcus aureus* to interact with membrane complement receptors influences efficiency of phagocytosis. *Infect Immun* 71: 656-662
32. de Haas CJ, Veldkamp KE, Peschel A, Weerkamp F, Van Wamel WJ, Heezius EC, Poppelier MJ, Van Kessel KP, van Strijp JA (2004). Chemotaxis inhibitory protein of *staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J Exp Med* 199: 687-695
33. Deitch EA, Haskel Y, Cruz N, Xu D, Kvietys PR (1995). Caco-2 and IEC-18 intestinal epithelial cells exert bactericidal activity through an oxidant-dependent pathway. *Shock* 4: 345-350
34. Desai D, Desai N, Nightingale P, Elliott T, Neuberger J (2003). Carriage of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* is associated with an increased risk of infection after liver transplantation. *Liver Transpl* 9: 754-759
35. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M, SENTRY Participants Group (2001). Survey of infections due to staphylococcus species: Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the united states, canada, latin america, europe, and the western pacific region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 32 Suppl 2: S114-32

36. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM (2000). Exotoxins of *staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 13: 16-34, table of contents
37. Dziewanowska K, Carson AR, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW, Bohach GA (2000). Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: Role in internalization by epithelial cells. Infect Immun 68: 6321-6328
38. Dziewanowska K, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW, Trumble WR, Bohach GA (1999). Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *staphylococcus aureus* by epithelial cells. Infect Immun 67: 4673-4678
39. Edwards AM, Bowden MG, Brown EL, Laabei M, Massey RC (2012). *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein triggers TNFalpha release, promoting attachment to endothelial cells via protein A. PLoS One 7: e43046
40. Edwards AM, Potter U, Meenan NA, Potts JR, Massey RC (2011). *Staphylococcus aureus* keratinocyte invasion is dependent upon multiple high-affinity fibronectin-binding repeats within FnBPA. PLoS One 6: e18899
41. Ehrenreiter K, Piazzolla D, Velamoor V, Sobczak I, Small JV, Takeda J, Leung T, Baccarini M (2005). Raf-1 regulates rho signaling and cell migration. J Cell Biol 168: 955-964
42. Ellington JK, Elhofy A, Bost KL, Hudson MC (2001). Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in *staphylococcus aureus* invasion of normal osteoblasts. Infect Immun 69: 5235-5242
43. Ellington JK, Reilly SS, Ramp WK, Smeltzer MS, Kellam JF, Hudson MC (1999). Mechanisms of *staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts. Microb Pathog 26: 317-323
44. Entenza JM, Vouillamoz J, Glauser MP, Moreillon P (1997). Levofloxacin versus ciprofloxacin, flucloxacillin, or vancomycin for treatment of experimental endocarditis due to methicillin-susceptible or -resistant *staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 41: 1662-1667
45. Flock M, Flock JI (2001). Rebinding of extracellular adherence protein eap to *staphylococcus aureus* can occur through a surface-bound neutral phosphatase. J Bacteriol 183: 3999-4003
46. Fournier B, Philpott DJ (2005). Recognition of *staphylococcus aureus* by the innate immune system. Clin Microbiol Rev 18: 521-540
47. Fowler T, Johansson S, Wary KK, Hook M (2003). Src kinase has a central role in in vitro cellular internalization of *staphylococcus aureus*. Cell Microbiol 5: 417-426

48. Fowler T, Wann ER, Joh D, Johansson S, Foster TJ, Hook M (2000). Cellular invasion by *staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur J Cell Biol* 79: 672-679
49. Fraunholz M, Sinha B (2012). Intracellular *staphylococcus aureus*: Live-in and let die. *Front Cell Infect Microbiol* 2: 43
50. Garzoni C, Kelley WL (2009). *Staphylococcus aureus*: New evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol* 17: 59-65
51. Geisbrecht BV, Hamaoka BY, Perman B, Zemla A, Leahy DJ (2005). The crystal structures of EAP domains from *staphylococcus aureus* reveal an unexpected homology to bacterial superantigens. *J Biol Chem* 280: 17243-17250
52. Giese B, Glowinski F, Paprotka K, Dittmann S, Steiner T, Sinha B, Fraunholz MJ (2011). Expression of delta-toxin by *staphylococcus aureus* mediates escape from phago-endosomes of human epithelial and endothelial cells in the presence of beta-toxin. *Cell Microbiol* 13: 316-329
53. Greene C, McDevitt D, Francois P, Vaudaux PE, Lew DP, 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* 17:1143-52
54. Grimble SA, Magee TR, Galland RB (2001). Methicillin resistant *staphylococcus aureus* in patients undergoing major amputation. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 22: 215-218
55. Grundmeier M, Hussain M, Becker P, Heilmann C, Peters G, Sinha B (2004). Truncation of fibronectin-binding proteins in *staphylococcus aureus* strain newman leads to deficient adherence and host cell invasion due to loss of the cell wall anchor function. *Infect Immun* 72: 7155-7163
56. Grundmeier M, Tuchscher L, Bruck M, Viemann D, Roth J, Willscher E, Becker K, Peters G, Loffler B (2010). Staphylococcal strains vary greatly in their ability to induce an inflammatory response in endothelial cells. *J Infect Dis* 201: 871-880
57. Guillen C, McInnes IB, Vaughan DM, Kommajosyula S, Van Berkel PH, Leung BP, Aguila A, Brock JH (2002). Enhanced Th1 response to *staphylococcus aureus* infection in human lactoferrin-transgenic mice. *J Immunol* 168: 3950-3957
58. Hagggar A, Ehrnfelt C, Holgersson J, Flock JI (2004). The extracellular adherence protein from *staphylococcus aureus* inhibits neutrophil binding to endothelial cells. *Infect Immun* 72: 6164-6167

59. Hagggar A, Hussain M, Lonnie H, Herrmann M, Norrby-Teglund A, Flock JI (2003). Extracellular adherence protein from *staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect Immun* 71: 2310-2317
60. Hagggar A, Shannon O, Norrby-Teglund A, Flock JI (2005). Dual effects of extracellular adherence protein from *staphylococcus aureus* on peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis* 192: 210-217
61. Haim M, Trost A, Maier CJ, Achatz G, Feichtner S, Hintner H, Bauer JW, Onder K (2010). Cytokeratin 8 interacts with clumping factor B: A new possible virulence factor target. *Microbiology* 156: 3710-3721
62. Hansen U, Hussain M, Villone D, Herrmann M, Robenek H, Peters G, Sinha B, Bruckner P (2006). The anchorless adhesin eap (extracellular adherence protein) from *staphylococcus aureus* selectively recognizes extracellular matrix aggregates but binds promiscuously to monomeric matrix macromolecules. *Matrix Biol* 25: 252-260
63. Harder J, Schroder JM (2005). Antimicrobial peptides in human skin. *Chem Immunol Allergy* 86: 22-41
64. Harraghy N, Hussain M, Hagggar A, Chavakis T, Sinha B, Herrmann M, Flock JI (2003). The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *staphylococcus aureus* protein eap. *Microbiology* 149: 2701-2707
65. Harraghy N, Kormanec J, Wolz C, Homerova D, Goerke C, Ohlsen K, Qazi S, Hill P, Herrmann M (2005). Sae is essential for expression of the staphylococcal adhesins eap and emp. *Microbiology* 151: 1789-1800
66. Hartmann M, Berditsch M, Hawecker J, Ardakani MF, Gerthsen D, Ulrich AS (2010). Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 3132-3142
67. Haslinger-Löffler B, Kahl BC, Grundmeier M, Strangfeld K, Wagner B, Fischer U, Cheung AL, Peters G, Schulze-Osthoff K, Sinha B (2005). Multiple virulence factors are required for *staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells. *Cell Microbiol* 7: 1087-1097
68. Hecker M, Becher D, Fuchs S, Engelmann S (2010). A proteomic view of cell physiology and virulence of *staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 300: 76-87
69. Hirschhausen N, Schlesier T, Schmidt MA, Gotz F, Peters G, Heilmann C (2010). A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. *Cell Microbiol* 12: 1746-1764

70. Hussain M, Becker K, von Eiff C, Peters G, Herrmann M (2001a). Analogs of eap protein are conserved and prevalent in clinical *staphylococcus aureus* isolates. Clin Diagn Lab Immunol 8: 1271-1276
71. Hussain M, Becker K, von Eiff C, Schrenzel J, Peters G, Herrmann M (2001b). Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of *staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. J Bacteriol 183: 6778-6786
72. Hussain M, Haggar A, Heilmann C, Peters G, Flock JI, Herrmann M (2002). Insertional inactivation of eap in *staphylococcus aureus* strain newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts. Infect Immun 70: 2933-2940
73. Hussain M, Haggar A, Peters G, Chhatwal GS, Herrmann M, Flock JI, Sinha B (2008). More than one tandem repeat domain of the extracellular adherence protein of *staphylococcus aureus* is required for aggregation, adherence, and host cell invasion but not for leukocyte activation. Infect Immun 76: 5615-5623
74. Iordanescu S, Surdeanu M (1976). Two restriction and modification systems in *staphylococcus aureus* NCTC8325. J Gen Microbiol 96: 277-281
75. Jahreis A, Beckheinrich P, Hausteil UF (2000). Effects of two novel cationic staphylococcal proteins (NP-tase and p70) and enterotoxin B on IgE synthesis and interleukin-4 and interferon-gamma production in patients with atopic dermatitis. Br J Dermatol 142: 680-687
76. Jahreis A, Yousif Y, Rump JA, Drager R, Vogt A, Peter HH, Schlesier M (1995). Two novel cationic staphylococcal proteins induce IL-2 secretion, proliferation and immunoglobulin synthesis in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of both healthy controls and patients with common variable immunodeficiency (CVID). Clin Exp Immunol 100: 406-411
77. Jevon M, Guo C, Ma B, Mordan N, Nair SP, Harris M, Henderson B, Bentley G, Meghji S (1999). Mechanisms of internalization of *staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. Infect Immun 67: 2677-2681
78. Jevons MP, Coe AW, Parker MT (1963). Methicillin resistance in staphylococci. Lancet 1: 904-907
79. Jin J, Pawson T (2012). Modular evolution of phosphorylation-based signalling systems. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 367: 2540-2555
80. Jin T, Bokarewa M, Foster T, Mitchell J, Higgins J, Tarkowski A (2004). *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. J Immunol 172: 1169-1176

81. Johannes L, Lamaze C (2002). Clathrin-dependent or not: Is it still the question? *Traffic* 3: 443-451
82. Jonsson K, McDevitt D, McGavin MH, Patti JM, Hook M (1995). *Staphylococcus aureus* expresses a major histocompatibility complex class II analog. *J Biol Chem* 270: 21457-21460
83. Joost I, Blass D, Burian M, Goerke C, Wolz C, von Muller L, Becker K, Preissner K, Herrmann M, Bischoff M (2009). Transcription analysis of the extracellular adherence protein from *staphylococcus aureus* in authentic human infection and in vitro. *J Infect Dis* 199: 1471-1478
84. Joost I, Jacob S, Utermohlen O, Schubert U, Patti JM, Ong MF, Gross J, Justinger C, Renno JH, Preissner KT, Bischoff M, Herrmann M (2011). Antibody response to the extracellular adherence protein (eap) of *staphylococcus aureus* in healthy and infected individuals. *FEMS Immunol Med Microbiol* 62: 23-31
85. Kalmeijer MD, van Nieuwland-Bollen E, Bogaers-Hofman D, de Baere GA (2000). Nasal carriage of *staphylococcus aureus* is a major risk factor for surgical-site infections in orthopedic surgery. *Infect Control Hosp Epidemiol* 21: 319-323
86. Kenny B, Finlay BB (1997). Intimin-dependent binding of enteropathogenic escherichia coli to host cells triggers novel signaling events, including tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma1. *Infect Immun* 65: 2528-2536
87. Kern F, Niaux T, Baccarini M (2011). Ras and raf pathways in epidermis development and carcinogenesis. *Br J Cancer* 104: 229-234
88. Kintarak S, Nair SP, Speight PM, Whawell SA (2004a). A recombinant fragment of the fibronectin-binding protein of *staphylococcus aureus* inhibits keratinocyte migration. *Arch Dermatol Res* 296: 250-257
89. Kintarak S, Whawell SA, Speight PM, Packer S, Nair SP (2004b). Internalization of *staphylococcus aureus* by human keratinocytes. *Infect Immun* 72: 5668-5675
90. Kirfel G, Herzog V (2004). Migration of epidermal keratinocytes: Mechanisms, regulation, and biological significance. *Protoplasma* 223: 67-78
91. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Fridkin SK, Active Bacterial Core surveillance (ABCs) MRSA Investigators (2007). Invasive methicillin-resistant *staphylococcus aureus* infections in the united states. *JAMA* 298: 1763-1771
92. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H (1997). Nasal carriage of *staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 10: 505-520

93. Kluytmans JA, Mouton JW, Ijzerman EP, Vandenbroucke-Grauls CM, Maat AW, Wagenvoort JH, Verbrugh HA (1995). Nasal carriage of *staphylococcus aureus* as a major risk factor for wound infections after cardiac surgery. *J Infect Dis* 171: 216-219
94. Koziel J, Maciag-Gudowska A, Mikolajczyk T, Bzowska M, Sturdevant DE, Whitney AR, Shaw LN, DeLeo FR, Potempa J (2009). Phagocytosis of *staphylococcus aureus* by macrophages exerts cytoprotective effects manifested by the upregulation of antiapoptotic factors. *PLoS One* 4: e5210
95. Kreikemeyer B, McDevitt D, Podbielski A (2002). The role of the map protein in *staphylococcus aureus* matrix protein and eukaryotic cell adherence. *Int J Med Microbiol* 292: 283-295
96. Krut O, Utermohlen O, Schloscherr X, Kronke M (2003). Strain-specific association of cytotoxic activity and virulence of clinical *staphylococcus aureus* isolates. *Infect Immun* 71: 2716-2723
97. Kubica M, Guzik K, Koziel J, Zarebski M, Richter W, Gajkowska B, Golda A, Maciag-Gudowska A, Brix K, Shaw L, Foster T, Potempa J (2008). A potential new pathway for *staphylococcus aureus* dissemination: The silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 3: e1409
98. Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y, Barbu EM, Vazquez V, Hook M, Etienne J, Vandenesch F, Bowden MG (2007). *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* 315: 1130-1133
99. Lammers A, Nuijten PJ, Smith HE (1999). The fibronectin binding proteins of *staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS Microbiol Lett* 180: 103-109
100. LaPres JJ, Hudson LG (1996). Identification of a functional determinant of differentiation-dependent expression in the involucrin gene. *J Biol Chem* 271: 23154-23160
101. Le Loir Y, Baron F, Gautier M (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res* 2: 63-76
102. Lee LY, Miyamoto YJ, McIntyre BW, Hook M, McCrean KW, McDevitt D, Brown EL (2002). The *staphylococcus aureus* map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. *J Clin Invest* 110: 1461-1471
103. Leigh IM, Purkis PE, Whitehead P, Lane EB (1993). Monospecific monoclonal antibodies to keratin 1 carboxy terminal (synthetic peptide) and to keratin 10 as markers of epidermal differentiation. *Br J Dermatol* 129: 110-119

104. Li X, Fusco WG, Seo KS, Bayles KW, Mosley EE, McGuire MA, Bohach GA (2009). Epithelial cell gene expression induced by intracellular *staphylococcus aureus*. Int J Microbiol 2009: 753278
105. Lipsky BA, Berendt AR, Deery HG, Embil JM, Joseph WS, Karchmer AW, LeFrock JL, Lew DP, Mader JT, Norden C, Tan JS, Infectious Diseases Society of America (2004). Diagnosis and treatment of diabetic foot infections. Clin Infect Dis 39: 885-910
106. Lowy FD (1998). *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 339: 520-532
107. Luzar MA, Coles GA, Faller B, Slingeneyer A, Dah GD, Briat C, Wone C, Knefati Y, Kessler M, Peluso F (1990). *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. N Engl J Med 322: 505-509
108. Madsen SM, Westh H, Danielsen L, Rosdahl VT (1996). Bacterial colonization and healing of venous leg ulcers. APMIS 104: 895-899
109. Martin P (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. Science 276: 75-81
110. Mazmanian SK, Liu G, Ton-That H, Schneewind O (1999). *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. Science 285: 760-763
111. McGavin MH, Krajewska-Pietrasik D, Ryden C, Hook M (1993). Identification of a *staphylococcus aureus* extracellular matrix-binding protein with broad specificity. Infect Immun 61: 2479-2485
112. Mehlitz A, Banhart S, Hess S, Selbach M, Meyer TF (2008). Complex kinase requirements for chlamydia trachomatis tarp phosphorylation. FEMS Microbiol Lett 289: 233-240
113. Melter O, Radojevic B (2010). Small colony variants of *staphylococcus aureus*--review. Folia Microbiol (Praha) 55: 548-558
114. Morasso MI, Tomic-Canic M (2005). Epidermal stem cells: The cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing. Biol Cell 97: 173-183
115. Nagl M, Kacani L, Mullauer B, Lemberger EM, Stoiber H, Sprinzl GM, Schennach H, Dierich MP (2002). Phagocytosis and killing of bacteria by professional phagocytes and dendritic cells. Clin Diagn Lab Immunol 9: 1165-1168
116. Nitsche-Schmitz DP, Rohde M, Chhatwal GS (2007). Invasion mechanisms of gram-positive pathogenic cocci. Thromb Haemost 98: 488-496

117. Novick R (1967). Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *staphylococcus aureus*. *Virology* 33: 155-166
118. Oppenheim JJ, Yang D (2005). Alarmins: Chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 17: 359-365
119. Oviedo-Boyso J, Cortes-Vieyra R, Huante-Mendoza A, Yu HB, Valdez-Alarcon JJ, Bravo-Patino A, Cajero-Juarez M, Finlay BB, Baizabal-Aguirre VM (2011). The phosphoinositide-3-kinase-akt signaling pathway is important for *staphylococcus aureus* internalization by endothelial cells. *Infect Immun* 79: 4569-4577
120. Palma M, Haggar A, Flock JI (1999). Adherence of *staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J Bacteriol* 181: 2840-2845
121. Panizzi P, Friedrich R, Fuentes-Prior P, Richter K, Bock PE, Bode W (2006). Fibrinogen substrate recognition by staphylocoagulase.(pro)thrombin complexes. *J Biol Chem* 281: 1179-1187
122. Percival SL, Cutting KF (2009). Biofilms: Possible strategies for suppression in chronic wounds. *Nurs Stand* 23: 64, 66, 68 passim
123. Percival SL, Hill KE, Williams DW, Hooper SJ, Thomas DW, Costerton JW (2012). A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair Regen* 20: 647-657
124. Plouin-Gaudon I, Clement S, Huggler E, Chaponnier C, Francois P, Lew D, Schrenzel J, Vaudaux P, Lacroix JS (2006). Intracellular residency is frequently associated with recurrent *staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *Rhinology* 44: 249-254
125. Rajbhandari R (2011). Studies on the role of the putative phosphorylation consensus sequence YXNX in the tandem repeat domains of the *Staphylococcus aureus* Mu50 Extracellular Adherence Protein (Eap). Promotionsschrift, Universität des Saarlandes (2011)
126. Rollenhagen C, Wollert T, Langford GM, Sundstrom P (2009). Stimulation of cell motility and expression of late markers of differentiation in human oral keratinocytes by candida albicans. *Cell Microbiol* 11: 946-966
127. Rooijackers SH, Ruyken M, Roos A, Daha MR, Presanis JS, Sim RB, van Wamel WJ, van Kessel KP, van Strijp JA (2005). Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat Immunol* 6: 920-927
128. Rooijackers SH, van Strijp JA (2007). Bacterial complement evasion. *Mol Immunol* 44: 23-32
129. Roos G, Garcia-Pino A, Van Belle K, Brosens E, Wahni K, Vandebussche G, Wyns L, Loris R, Messens J (2007). The conserved active site proline

- determines the reducing power of *staphylococcus aureus* thioredoxin. J Mol Biol 368: 800-811
130. Safdar N, Bradley EA (2008). The risk of infection after nasal colonization with *staphylococcus aureus*. Am J Med 121: 310-315
131. Schroder A, Kland R, Peschel A, von Eiff C, Aepfelbacher M (2006a). 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 195: 185-194
132. Schroder A, Schroder B, Roppenser B, Linder S, Sinha B, Fassler R, Aepfelbacher M (2006b). *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein-A induces motile attachment sites and complex actin remodeling in living endothelial cells. Mol Biol Cell 17: 5198-5210
133. Schwartz J, Leidal KG, Femling JK, Weiss JP, Nauseef WM (2009). Neutrophil bleaching of GFP-expressing staphylococci: Probing the intraphagosomal fate of individual bacteria. J Immunol 183: 2632-2641
134. Scriba TJ, Sierro S, Brown EL, Phillips RE, Sewell AK, Massey RC (2008). The staphylococcus aureus eap protein activates expression of proinflammatory cytokines. Infect Immun 76: 2164-2168
135. Sendi P, Proctor RA (2009). *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: The role of small colony variants. Trends Microbiol 17: 54-58
136. Shannon O, Uekotter A, Flock JI (2005). Extracellular fibrinogen binding protein, efb, from *staphylococcus aureus* as an antiplatelet agent in vivo. Thromb Haemost 93: 927-931
137. Shibata S, Tada Y, Asano Y, Hau CS, Kato T, Saeki H, Yamauchi T, Kubota N, Kadowaki T, Sato S (2012). Adiponectin regulates cutaneous wound healing by promoting keratinocyte proliferation and migration via the ERK signaling pathway. J Immunol 189: 3231-3241
138. Singer AJ, Clark RA (1999). Cutaneous wound healing. N Engl J Med 341: 738-746
139. Sinha B, Francois P, Que YA, Hussain M, Heilmann C, Moreillon P, Lew D, Krause KH, Peters G, Herrmann M (2000). Heterologously expressed *staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. Infect Immun 68: 6871-6878
140. Sinha B, Francois PP, Nusse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Herrmann M, Krause KH (1999). Fibronectin-binding protein acts as *staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. Cell Microbiol 1: 101-117
141. Sinha B, Fraunholz M (2010). *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. Int J Med Microbiol 300: 170-175

142. Sinha B, Herrmann M (2005). Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by *staphylococcus aureus*. *Thromb Haemost* 94: 266-277
143. Sobke AC, Selimovic D, Orlova V, Hassan M, Chavakis T, Athanasopoulos AN, Schubert U, Hussain M, Thiel G, Preissner KT, Herrmann M (2006). The extracellular adherence protein from *staphylococcus aureus* abrogates angiogenic responses of endothelial cells by blocking ras activation. *FASEB J* 20: 2621-2623
144. Stojadinovic O, Pastar I, Vukelic S, Mahoney MG, Brennan D, Krzyzanowska A, Golinko M, Brem H, Tomic-Canic M (2008). Deregulation of keratinocyte differentiation and activation: A hallmark of venous ulcers. *J Cell Mol Med* 12: 2675-2690
145. Sugai M, Enomoto T, Hashimoto K, Matsumoto K, Matsuo Y, Ohgai H, Hong YM, Inoue S, Yoshikawa K, Suginaka H (1990). A novel epidermal cell differentiation inhibitor (EDIN): Purification and characterization from *staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 92-98
146. Talan DA, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, Limbago B, Albrecht V, Moran GJ, EMERGENCY ID Net Study Group (2011). Comparison of *staphylococcus aureus* from skin and soft-tissue infections in US emergency department patients, 2004 and 2008. *Clin Infect Dis* 53: 144-149
147. Tegtmeyer N, Backert S (2011). Role of abl and src family kinases in actin-cytoskeletal rearrangements induced by the helicobacter pylori CagA protein. *Eur J Cell Biol* 90: 880-890
148. Thomas D, Chou S, Dauwalder O, Lina G (2007). Diversity in *staphylococcus aureus* enterotoxins. *Chem Immunol Allergy* 93: 24-41
149. Thompson KM, Abraham N, Jefferson KK (2010). *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein contributes to biofilm formation in the presence of serum. *FEMS Microbiol Lett* 305: 143-147
150. Thomsen TR, Aasholm MS, Rudkjoberg VB, Saunders AM, Bjarnsholt T, Givskov M, Kirketerp-Moller K, Nielsen PH (2010). The bacteriology of chronic venous leg ulcer examined by culture-independent molecular methods. *Wound Repair Regen* 18: 38-49
151. Thomson CH (2011). Biofilms: Do they affect wound healing? *Int Wound J* 8: 63-67
152. Tuchscher L, Heitmann V, Hussain M, Viemann D, Roth J, von Eiff C, Peters G, Becker K, Loffler B (2010). *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *J Infect Dis* 202: 1031-1040
153. Tuchscher L, Medina E, Hussain M, Volker W, Heitmann V, Niemann S, Holzinger D, Roth J, Proctor RA, Becker K, Peters G, Loffler B (2011). *Staphylococcus aureus* phenotype switching: An effective bacterial strategy

- to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol Med* 3: 129-141
154. von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G (2001). Nasal carriage as a source of *staphylococcus aureus* bacteremia. study group. *N Engl J Med* 344: 11-16
  155. Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K, Whitman WB (2009). *Bergey's Manual of systematic bacteriology*.
  156. Wang H, von Rohrscheidt J, Roehrbein J, Peters T, Sindrilaru A, Kess D, Preissner KT, Scharffetter-Kochanek K (2010). Extracellular adherence protein of *staphylococcus aureus* suppresses disease by inhibiting T-cell recruitment in a mouse model of psoriasis. *J Invest Dermatol* 130: 743-754
  157. Watt FM (1983). Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J Invest Dermatol* 81: 100s-3s
  158. Weidenmaier C, Kokai-Kun JF, Kristian SA, Chanturiya T, Kalbacher H, Gross M, Nicholson G, Neumeister B, Mond JJ, Peschel A (2004). Role of teichoic acids in *staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nat Med* 10: 243-245
  159. Weidenmaier C, Kokai-Kun JF, Kulauzovic E, Kohler T, Thumm G (2008). Differential roles of sortase-anchored surface proteins and wall teichoic acid in *staphylococcus aureus* nasal colonization. *J Infect Dis* 298: 505-513
  160. Weidenmaier C, Peschel A, Xiong YQ, Kristian SA, Dietz K, Yeaman MR, Bayer AS (2005). Lack of wall teichoic acids in *staphylococcus aureus* leads to reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of endocarditis. *J Infect Dis* 191: 1771-1777
  161. Werner S, Grose R (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83: 835-870
  162. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL (2005). The role of nasal carriage in *staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5: 751-762
  163. Wertheim HF, Walsh E, Choudhury R, Melles DC, Boelens HA, Miajlovic H, Verbrugh HA, Foster T, van Belkum A (2008). Key role for clumping factor B in *staphylococcus aureus* nasal colonization of humans. *PLoS Med* 5: e17
  164. Wesson CA, Deringer J, Liou LE, Bayles KW, Bohach GA, Trumble WR (2000). Apoptosis induced by *staphylococcus aureus* in epithelial cells utilizes a mechanism involving caspases 8 and 3. *Infect Immun* 68: 2998-3001
  165. Wesson CA, Liou LE, Todd KM, Bohach GA, Trumble WR, Bayles KW (1998). *Staphylococcus aureus* agr and sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis. *Infect Immun* 66: 5238-5243

166. Xie C, Alcaide P, Geisbrecht BV, Schneider D, Herrmann M, Preissner KT, Luscinskas FW, Chavakis T (2006). Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by extracellular adherence protein of *staphylococcus aureus*. J Exp Med 203: 985-994
167. Yousif, Y., Mertz, A., Batsford, S. R. & Vogt, A. (1991). Cationic staphylococcal antigens have high affinity for glomerular structures. Possible pathogenic role in glomerulonephritis. Zentbl Bakteriologie 21 (Suppl.), 168–169.
168. Zamir E, Geiger B (2001). Components of cell-matrix adhesions. J Cell Sci 114: 3577-3579
169. Zautner AE, Krause M, Stropahl G, Holtfreter S, Frickmann H, Maletzki C, Kreikemeyer B, Pau HW, Podbielski A (2010). Intracellular persisting *staphylococcus aureus* is the major pathogen in recurrent tonsillitis. PLoS One 5: e9452

## PUBLIKATIONEN/KONGRESSBEITRÄGE

Publikationen**Stephanie Bur, Klaus T. Preissner, Mathias Herrmann, Markus Bischoff**The *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein promotes bacterial internalization by keratinocytes independent of fibronectin-binding proteins*Journal of Investigative Dermatology*, Februar 2013 (doi:10.1038)<http://www.nature.com/jid/journal/v133/n8/full/jid201387a.html>

## ORIGINAL ARTICLE

## The *Staphylococcus aureus* Extracellular Adherence Protein Promotes Bacterial Internalization by Keratinocytes Independent of Fibronectin-Binding Proteins

Stephanie Bur<sup>1</sup>, Klaus T. Preissner<sup>2</sup>, Mathias Herrmann<sup>1</sup> and Markus Bischoff<sup>1</sup>

*Staphylococcus aureus*, the leading causal pathogen of skin infections, is strongly associated with skin atopy, and a number of bacterial adhesins allow the microbe to adhere to and invade eukaryotic cells. One of these adhesive molecules is the multifunctional extracellular adherence protein (Eap), which is overexpressed *in situ* in authentic human wounds and was shown to delay wound healing in experimental models. Yet, its role during invasion of keratinocytes is not clearly defined. By using a gentamicin/lysostaphin protection assay we demonstrate here that preincubation of HaCaT cells or primary keratinocytes with Eap results in a concentration-dependent significant increase in staphylococcal adhesion, followed by an even more pronounced internalization of bacteria by eukaryotic cells. Flow cytometric analysis revealed that Eap increased both the number of infected eukaryotic cells and the bacterial load per infected cell. Moreover, treatment of keratinocytes with Eap strongly enhanced the internalization of coagulase-negative staphylococci, as well as of *E. coli*, and markedly promoted staphylococcal invasion into extended-culture keratinocytes, displaying expression of keratin 10 and involucrin as differentiation markers. Thus, wound-related staphylococcal Eap may provide a major cellular invasion function, thereby enhancing the pathogen's ability to hide from the host immune system during acute and chronic skin infection.

*Journal of Investigative Dermatology* (2013) 133, 2004–2012; doi:10.1038/jid.2013.87; published online 4 April 2013

## INTRODUCTION

*S. aureus* is an opportunistic pathogen with the ability to cause acute-fulminant, as well as chronic-persistent disease. The Gram-positive microorganism is the leading cause of superficial and deep skin infections; it is frequently associated with impaired wound healing and is closely associated with atopic reactions of the skin (Madsen *et al.*, 1996; Bunikowski *et al.*, 2000; Grimble *et al.*, 2001). As *S. aureus* is able to invade and persist in nonprofessional phagocytes such as fibroblasts, osteoblasts, and various epithelial cell types (Deitch *et al.*, 1995; Almeida *et al.*, 1996; Bayles *et al.*, 1998; Bost *et al.*, 1999; Ellington *et al.*, 1999; Jevon *et al.*, 1999), such intracellular niches are thought to have a major role in the pathogenesis of infections. More recently, the intracellular

localization of *S. aureus* has also been demonstrated in tissues derived from patients, suggesting a role of this niche for shielding of bacteria from host defense, and as a reservoir for persistent microorganisms (Clement *et al.*, 2005; Plouin-Gaudon *et al.*, 2006; Garzoni and Kelley, 2009; Sendi and Proctor, 2009; Zautner *et al.*, 2010).

In order to invade eukaryotic cells, Staphylococci have to first attach to their cell surface. This initial attachment of *S. aureus* is mediated by a number of cell wall-bound adhesins, including MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) (Nitsche-Schmitz *et al.*, 2007) and secretable expanded repertoire adhesion molecules (Chavakis *et al.*, 2005). Bridging between fibronectin-binding proteins (FnBPs) and  $\alpha 5 \beta 1$  integrins by soluble fibronectin (Fn) is supposed to be the basis for the crucial role of MSCRAMMs as major invasins of *S. aureus* (Dziewanowska *et al.*, 1999; Lammers *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 1999; Fowler *et al.*, 2000; Sinha *et al.*, 2000); for epithelial cells, an additional role of a direct interaction between FnBPs and an epithelial cell-expressed heat shock protein (HSP-60) has been demonstrated (Dziewanowska *et al.*, 2000). The internalization step itself involves receptor-mediated endocytotic mechanisms that include the formation and uptake of clathrin-coated pits via rearrangement of the cytoskeleton (Sinha and Fraunholz, 2010), F-actin polymerization (Ellington *et al.*, 1999; Jevon *et al.*, 1999), and the activation of protein tyrosin kinases such as Src-tyrosin kinase (Dziewanowska *et al.*, 1999; Agerer *et al.*, 2003).

<sup>1</sup>Institute for Medical Microbiology and Hygiene, University of Saarland Medical Center, Homburg, Germany and <sup>2</sup>Department of Biochemistry, University of Giessen, Giessen, Germany

Correspondence: Markus Bischoff, Institute for Medical Microbiology and Hygiene, University of Saarland Medical Center, Kirrberger Street 1, 66424 Homburg, Germany. E-mail: markus.bischoff@uks.eu

Abbreviations: Eap, extracellular adherence protein; Fn, fibronectin; FnBP, fibronectin-binding proteins; Mol, multiplicity of infection; MSCRAMM, microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules; WT, wild-type

Received 19 September 2012; revised 1 February 2013; accepted 5 February 2013; accepted article preview online 27 February 2013; published online 4 April 2013

Secreted expanded repertoire adhesive molecules are either secreted or decorate the bacterial cell surface by noncovalent binding to putative bacterial receptors contributing to bacterial uptake by less well-understood mechanisms. Among these adhesion proteins, the "extracellular adherence protein" (Eap), which is produced by all isolates of *S. aureus* but not by other staphylococcal species (Hussain *et al.*, 2001), has been best described with respect to its adhesive functions and anti-inflammatory properties. Eap has been shown to bind to a number of host cell matrix and plasma proteins such as Fn, fibrinogen, prothrombin, vitronectin, thrombospondin-1, collagen I, IV, and VI, to extracellular matrix aggregates, and to the endothelial cell adhesion molecule ICAM-1 (reviewed in Chavakis *et al.*, 2005; and Hussain *et al.*, 2008). After preincubation of bacteria with Eap, adherence to and internalization by eukaryotic cells was found to be enhanced (Palma *et al.*, 1999; Haggart *et al.*, 2003), and—in analogy to MSCRAMM-mediated mechanisms—it was presumed that Eap provides an anchoring function due to recognition by eukaryotic cell surface molecules that may mediate subsequent bacterial uptake. However, none of the ligands mentioned above have been experimentally proven to be required for the Eap effect on adhesion/internalization. Eap further exhibits immunomodulatory and antiangiogenic functions (Chavakis *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Athanasopoulos *et al.*, 2006; Sobke *et al.*, 2006; Chavakis *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010) that delay wound healing (Athanasopoulos *et al.*, 2006), as well as antiproliferative activities that are related to interference of Eap with intracellular mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling (Sobke *et al.*, 2006). Another aspect related to staphylococcal wound infections is the massive increase of *S. aureus eap* transcription in authentic human wounds (Joost *et al.*, 2009), suggesting the presence of high extracellular Eap levels in *S. aureus*-infected wound tissue resulting in a delay in wound healing and in enhanced humoral host response (Joost *et al.*, 2011).

In light of wound-associated Eap, as well as of its multifunctional activities it is necessary to scrutinize the Eap-

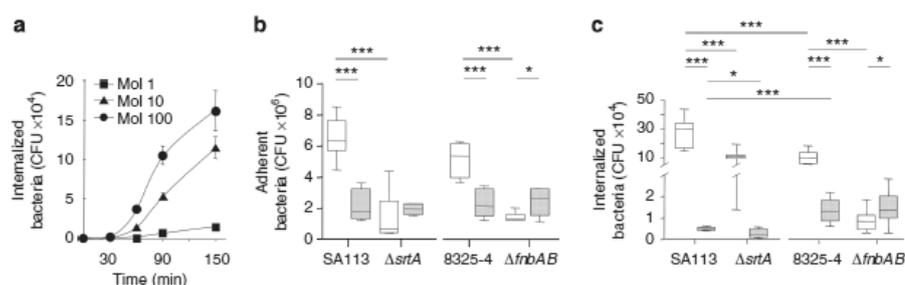
mediated adhesion and invasion process in skin cells in closer detail in order to define potential Eap-mediated mechanisms contributing to the invasive skin infection of *S. aureus*. Moreover, as skin infections are frequently of polymicrobial origin, a role of secreted Eap on the uptake of other microorganisms needs to be addressed.

## RESULTS AND DISCUSSION

### FnBPs-independent adhesion and internalization of *S. aureus* by keratinocytes

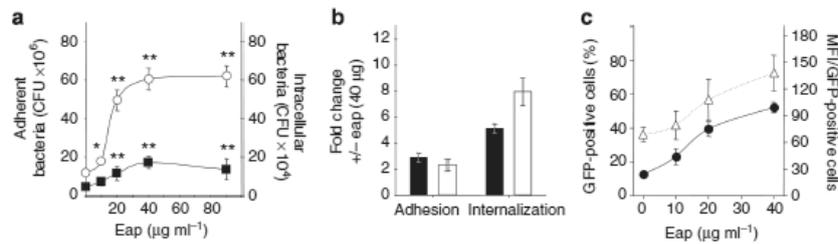
To determine the impact of FnBPs and other MSCRAMMs during internalization of *S. aureus* by keratinocytes, the invasiveness of isogenic *fnbAB*<sup>+</sup>/*fnbAB*<sup>-</sup> (8325-4/DU5883) (McElroy *et al.*, 2008) and *srtA*<sup>+</sup>/*srtA*<sup>-</sup> (SA113/SA113  $\Delta$ *srtA*) (Weidenmaier *et al.*, 2008) (*srtA* confers expression of sortase A, an enzyme providing covalent linkage of MSCRAMM to the Gram-positive cell wall (Mazmanian *et al.*, 1999); *srtA* mutants are devoid of cell-bound MSCRAMM molecules) strain pairs into HaCaT cells and primary keratinocytes (normal human epidermal keratinocytes (NHEK)) was determined in gentamicin/lysostaphin protection assays. Initially, the impact of the multiplicity of infection (Moi) and incubation time on the internalization capacity of the *fnbAB*<sup>+</sup> strain SA113 into HaCaT cells was analyzed (Figure 1a). SA113 was readily taken up, and the amount of internalized microorganisms was dependent on the Moi and cocultivation time: After 90 minutes of cocultivation, an Moi of 1, 10, and 100 resulted in a total of  $5.8 \times 10^3$ ,  $5.3 \times 10^4$ , and  $1 \times 10^5$  internalized bacteria per  $4.5 \times 10^5$  cells, respectively. The uptake process appeared to be saturable as a 10-fold increase in Moi (from 10 to 100) resulted in a twofold increase in intracellular bacteria only. Subsequent experiments were conducted with an Moi of 100 and a cocultivation time of 90 minutes.

Analysis of staphylococcal adhesion to and uptake by HaCaT cells and by NHEK revealed important differences both with respect to interaction events, as well as with respect to the keratinocyte cell type used. Both wild-type (WT) strains adhered and internalized more effectively to/into HaCaT cells



**Figure 1. Adhesion and internalization of *S. aureus* by keratinocytes.** (a) Freshly passaged HaCaT cells were grown to confluence and incubated with *S. aureus* SA113 at the multiplicities of infection (Moi) indicated, and internalization rates were determined as outlined in Methods. The data represent mean  $\pm$  SEM ( $n=4$ ). (b, c) Determination of the adhesion (b) and internalization rates (c) of isogenic *srtA*<sup>+</sup>/*srtA*<sup>-</sup> (SA113/SA113  $\Delta$ *srtA*) and *fnbAB*<sup>+</sup>/*fnbAB*<sup>-</sup> (8325-4/DU5883) strain pairs in HaCaT cells (open boxes) and primary keratinocytes (patterned boxes). Data are presented in box and whisker plots showing the interquartile range (25–75%; box), median (horizontal line), and whiskers (bars; min/max). \* $P<0.05$ ; \*\*\* $P<0.001$  for WT versus WT and WT versus mutant, respectively (the Mann–Whitney *U*-test). CFU, colony-forming unit.

S Bur et al.  
Eap-Mediated *S. aureus* Invasion of Keratinocytes



**Figure 2.** Effect of extracellular adherence protein (Eap)-preincubation of keratinocytes on the adhesion/internalization capacities of *S. aureus*. (a) Adhesion (filled squares) and internalization (open circles) rates of *S. aureus* strain SA113 to/into HaCaT cells preincubated with the Eap concentrations indicated. (b) The recovered fold change of colony-forming unit (CFU) numbers was determined in HaCaT (filled bars) or primary keratinocytes (open bars) in the absence or presence of Eap (40 µg ml<sup>-1</sup>). (c) Internalization of green fluorescent protein (GFP)-expressing *S. aureus* HOM 70 was determined by FACS analysis as indicated by the portion of GFP-positive keratinocytes (filled circles) and mean fluorescence intensity (MFI) (open triangles) of gated GFP-positive cells. Data represent mean ± SEM ( $n = 4$ ). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  for Eap-supplemented versus unsupplemented cells (Wilcoxon signed-rank test).

than to/into NHEK cells. In addition, in comparison with the respective WT strains, both *fnbAB* and *srtA* mutants revealed a profoundly and significantly lower amount of bacteria being adherent to and internalized by HaCaT cells (Figure 1b and c). This finding is in accordance with a previous report, indicating that *S. aureus* strain 8325-4 internalization occurs in an FnBPA-dependent manner upon incubation with HaCaT cells (Edwards et al., 2011).

In contrast to the interaction with HaCaT cells, both the *fnbAB* and *srtA* mutants adhered to NHEK to the same extent when compared with WT strains (Figure 1b). With respect to internalization, the results were found to depend on the type of deletion-mutation: Whereas for the *srtA* mutant a significant decrease in internalization was observed, for the *fnbAB* mutant no such difference was discernable (Figure 1c). These findings not only demonstrate that *S. aureus* adhesion mechanisms differ between NHEK and HaCaT cells but further reveal, at least for the *srtA* mutant, an important dissociation between adhesion and internalization events, suggesting that an anchoring mechanism provided by the MSCRAMM–host cell receptor interaction might not be the sole mechanism that contributes to uptake of *S. aureus* by primary keratinocytes.

We also observed significant differences in the internalization capacities of the WT strains, although both strains share a similar genetic background. Whereas 8325-4 internalized less efficiently into HaCaT cells compared with SA113, the opposite was observed with primary keratinocytes (Figure 1c). However, as the gene repertoires of SA113 and 8325-4 differ slightly (both are descendants of NCTC8325, but 8325-4 lacks the prophages of its ancestor, and SA113 represents an N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine mutagenized derivative of NCTC8325 with altered restriction/modification properties and an increased biofilm formation capacity (Novick, 1967; Iordanescu and Surdeanu, 1976)), the differences in invasiveness observed between these two strains might be caused by such minor alterations. Strain-dependent effects on cell viability could be largely excluded, as both WT strains induced similar levels of apoptosis in HaCaT cells and NHEK (<5%).

In part, these findings are in accordance with published results reporting adherence to atopic and normal skin occurring via FnBP-independent mechanisms (Cho et al., 2001), and via FnBP-independent albeit strain-dependent mechanisms also for invasion of primary human keratinocytes (in contrast to results with the keratinocyte cell lines HaCaT, UP, and NHK showing FnBP invasion dependency) (Kintarak et al., 2004). In HaCaT cells, invasion with 8325-4 derivatives was found to be FnBP-dependent, and activity could be attributed to individual FnBP repeat regions (Edwards et al., 2011). Variations in expression levels of the  $\alpha 5 \beta 1$  integrin (as recognition site for various bacterial adhesins) on different eukaryotic cell types might also contribute to differences in pathogen binding and internalization (Edwards et al., 2011). The role of Eap, however, on adhesion and internalization was believed to be only of importance for invasion of strains devoid of or equipped with aberrant FnBPs (Grundmeier et al., 2004) and had been demonstrated to partly compensate for loss of their function (Palma et al., 1999; Haggart et al., 2003). Yet, as our and others' findings revealed a differential role of FnBPs with respect to *S. aureus*–keratinocyte interaction in an FnBP functional background, as a next step purified Eap was used to elucidate its role in adhesion/internalization mechanisms with keratinocytes in various *fnb* backgrounds.

#### Eap-mediated and FnBP-independent adhesion/internalization of *S. aureus* by keratinocytes

HaCaT cells were preincubated with increasing concentrations of Eap, washed to remove unbound Eap, and subsequently exposed to strain SA113 in a gentamicin/lysostaphin protection assay. In a concentration-dependent manner, Eap affected both adhesion and internalization: Upon preincubation with Eap at concentrations of  $\geq 20$  µg ml<sup>-1</sup>, adhesion of SA113 to HaCaT cells was significantly increased, whereas lower concentrations of Eap (< 10 µg ml<sup>-1</sup>) were sufficient to significantly promote internalization of this strain by HaCaT cells (Figure 2a). Higher concentrations of Eap (40 µg ml<sup>-1</sup>) induced saturable bacterial adhesion and internalization, promoting both events 2.8-fold and 5.5-fold, respectively.

Similarly, pretreatment of NHEK with Eap ( $40\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ) and subsequent incubation with SA113 promoted adhesion and internalization 2.1-fold and 8.0-fold, respectively (Figure 2b). These findings suggest that Eap pretreatment has an even stronger impact on internalization than on adhesion in both epithelial cell types. Experiments performed with  $40\ \mu\text{g ml}^{-1}$  of Eap degraded with proteinase K showed no effect on adhesion or internalization (data not shown).

To determine whether the effect of Eap pretreatment on staphylococcal adhesion to and internalization by HaCaT cells is restricted to only a small subpopulation of eukaryotic cells, or whether Eap might enhance the overall number of HaCaT cells ingesting *S. aureus*, Eap-pretreated HaCaT cells were incubated with an SA113 derivative constitutively expressing green fluorescent protein, and the number of internalized bacteria was monitored by FACS analyses. As an increase in function of the Eap concentration could be monitored with respect to both the number of green fluorescent protein-positive keratinocytes and the mean fluorescence intensities of the infected cells (Figure 2c), it is suggested that Eap promotes both the mean number of bacteria taken up by an individual keratinocyte cell and the overall number of HaCaT cells participating in the internalization of *S. aureus*.

On the basis of the above observations—that is, that *srtA* and *fnbAB* mutations markedly affected the adhesion and internalization of *S. aureus* in HaCaT cells—adhesion and internalization of Eap-pretreated keratinocytes were also determined for the *fnbAB* and the *srtA* mutants in this robust and well-studied cell line. When compared with results on Eap-promoted adhesion and internalization of strain SA113, the 8325-4 WT strain revealed a comparable promotion of adhesion and internalization upon preincubation with Eap, although the Eap effect on adhesion appeared to be less pronounced (Figure 3a and b). Moreover, upon incubation of the SA113 *srtA* mutant with HaCaT cells preincubated with Eap, the promoting effect of Eap was not found to be different with respect to either adhesion or internalization when compared with the WT (Figure 3b). Upon using the 8325-4 *fnbAB* mutant and comparing it with the WT (Figure 3a), however, the promoting effect of Eap on mutant adhesion and internalization (fold increases WT/ $\Delta$ *fnbAB*, 1.4/3.1 and 5.2/34.6) amounted to ratios of 2.2- and 6.6-fold, respectively. It is noteworthy that the reduced adhesion and internalization (Figure 1) as a function of the *fnbAB* mutation (resulting in fold-decrease of 3.4 and 8.9 for adhesion and internalization, respectively) was almost compensated for by preincubation with Eap, whereas reduced adhesion and internalization upon  $\Delta$ *srtA* introduction was not compensated for by Eap.

To test whether Eap attached to the bacterial surface of *S. aureus* might also affect the adhesion and internalization capacity of this pathogen, we next tested an SA113 *eap* mutant in our adhesion/internalization assay. The deletion of *eap* in SA113 affected neither the adhesion nor the internalization capacities to HaCaT cells (Figure 3c). Moreover, preincubating keratinocytes with exogenous Eap increased the adhesion and internalization of the *eap* mutant to/into keratinocytes to the same extents as those observed with the parental strain. Combined with recent observations reported

S Bur et al.  
Eap-Mediated *S. aureus* Invasion of Keratinocytes

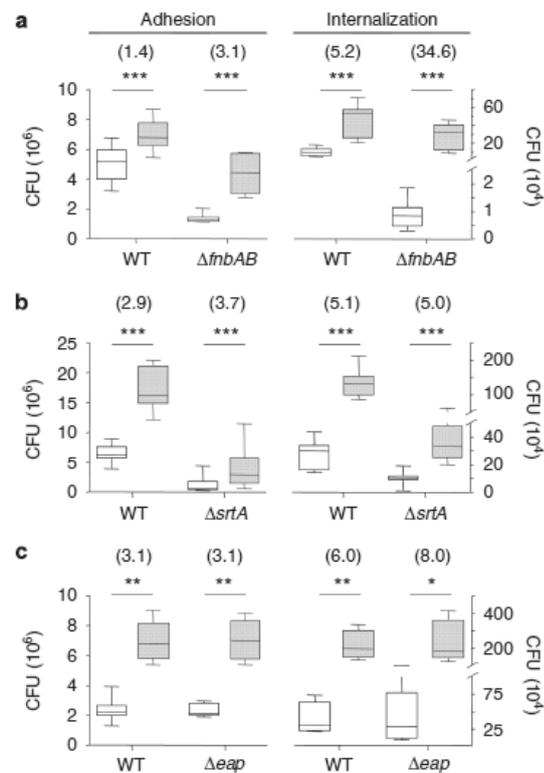


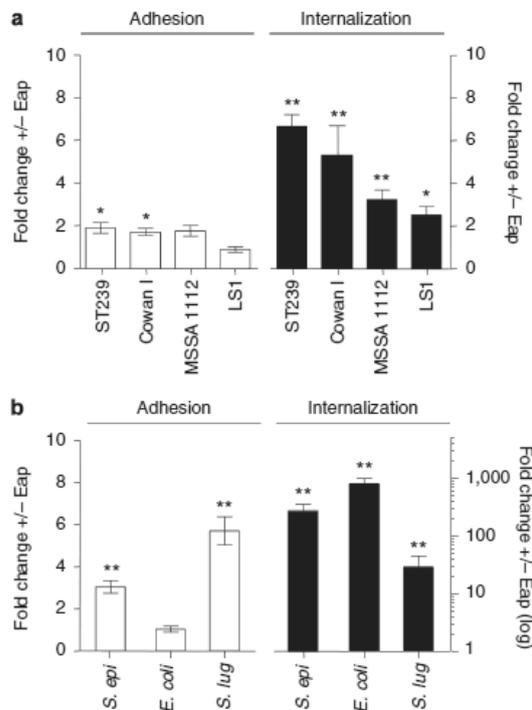
Figure 3. Effect of extracellular adherence protein (Eap)-preincubation of keratinocytes on the adhesion and internalization capacities of different *S. aureus* mutants. Influence of *fnbAB* (a), *srtA* (b), and *eap* (c) mutations on the adhesion and internalization capacities of *S. aureus* by HaCaT cells. Adhesion and internalization were tested in the absence (open boxes) or presence of Eap ( $40\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ; patterned boxes). Data are presented in box and whisker plots ( $n=3-4$ ). \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$  for Eap-supplemented versus unsupplemented cells (Wilcoxon signed-rank test). CFU, colony-forming unit; WT, wild-type.

by Edwards *et al.*, (2012) showing that an *eap* mutant adhered as efficiently to endothelial cells as did its parental strain, it can now be inferred that bacterial cell wall-bound Eap is of only minor importance for the binding of *S. aureus* to both endothelial and epithelial cells, whereas—if present in a soluble form being secreted by staphylococci and interacting with the eukaryotic cell before or during contact with the bacterial cell—it is capable of exerting its promoting effect on adhesion and internalization (at least with epithelial cells as demonstrated in this study).

#### Eap-promoted adhesion and internalization of various staphylococcal species and gamma-proteobacteria

To verify that the observed Eap effect is not restricted to the closely related strains SA113 and 8325-4, four selected *S. aureus* strains of different genetic backgrounds, Cowan I (ATCC 12598), LS1 (Bremell *et al.*, 1992), MSSA 1112 (Entenza *et al.*, 1997), and ST239 (Grundmeier *et al.*, 2010),

S Bur et al.  
Eap-Mediated *S. aureus* Invasion of Keratinocytes



**Figure 4.** Promotion of adhesion and internalization of various staphylococcal species and gamma-proteobacteria by extracellular adherence protein (Eap). Impact of Eap preincubation on adhesion (open bars) and internalization (filled bars) of (a) *S. aureus* strains Cowan I, LS1, MSSA 1112, and ST239, and (b) of clinical wound isolates of *S. epidermidis* (*S. epi*), *S. lugdenensis* (*S. lug*), and *E. coli*, to/into HaCaT cells. Fold-change values indicate the number of colony-forming units (CFUs) recovered from cells after Eap preincubation ( $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) over the number of CFUs from untreated cells. The data represent mean  $\pm$  SEM ( $n = 3-4$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  for Eap-treated versus untreated cells (the Wilcoxon signed-rank test).

were tested for adhesion and internalization by HaCaT cells in the absence or presence of Eap (Figure 4a). Similar to our findings made with SA113 and 8325-4, we found only minor effects of Eap preincubation on adhesion, which ranged from 0.9 (LS1) to 1.9 (ST239), and were only significantly increased for strains ST239 and Cowan I. In contrast, Eap preincubation of HaCaT cells significantly promoted the internalization rates of all four tested laboratory strains between 2.5-fold (LS1) and 6.6-fold (ST239).

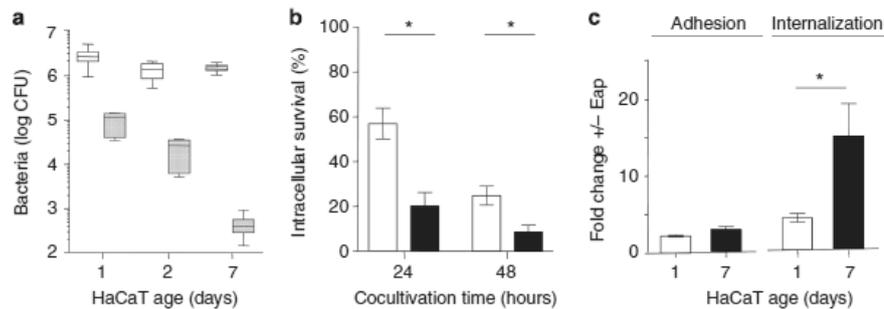
On the basis of the rationale of frequently encountered polymicrobial skin infections including coinfection of *S. aureus* with other coagulase-negative staphylococcal species such as *Staphylococcus epidermidis* or *Staphylococcus lugdenensis*, as well as with the preminent clinical representative of the family of Enterobacteriaceae, *E. coli*, adhesion and internalization of such microorganisms were analyzed in the absence or presence of Eap (Figure 4b). In contrast to *S. aureus*, wound isolates of *S. epidermidis*, *S. lugdenensis*,

and *E. coli* yielded very low internalization rates (data not shown). The preincubation of HaCaT cells with Eap promoted the adhesion of the staphylococcal microorganisms by factors of 3.1 (*S. epidermidis*) and 5.7 (*S. lugdenensis*), respectively, whereas binding of *E. coli* was not apparently affected. However, the internalization rates of all three species were strongly promoted upon Eap pretreatment and increased by factors of 24 for *S. lugdenensis* up to 738 for *E. coli*. These findings indicate once again that the Eap-induced internalization rates cannot be explained by binding phenomena only. Moreover, they suggest that Eap in wound tissue of *S. aureus*-infected wounds not only promotes the internalization rates of microorganisms of the Eap-producing species, i.e. *S. aureus*, but also of other facultative pathogenic Gram-positive or Gram-negative microorganisms that might be present in the wound.

#### Promotion of Eap-mediated staphylococcal internalization by HaCaT cells and relation to keratinocyte differentiation

Bacteria-infected chronic ulcers are considered a paradigmatic entity for chronic skin infection, and *S. aureus* has been shown to be the predominant pathogen in this setting (Brook and Frazier, 1998; Lipsky et al., 2004; Thomsen et al., 2010). As a hallmark, keratinocytes derived from the nonhealing edges of such ulcers display an abnormal phenotype with the disconcerted expression of cellular differentiation markers (Stojadinovic et al., 2008). In order to investigate the impact of keratinocyte differentiation on the Eap-stimulated internalization phenotype, HaCaT cells were grown to confluency and maintained for either 2 or 7 days before incubation with *S. aureus* SA113. Under such prolonged incubation, HaCaT cells underwent morphological changes and became flattened and smaller in size (Supplementary Figure S1A online). Concomitantly, HaCaT cells started to express keratin 10 and involucrin (Supplementary Figure S1B online). In intact skin, expression of these markers indicates the transition of the epidermal cell from basal to suprabasal localization, which is strongly associated with differentiation features (Watt, 1983; Leigh et al., 1993; LaPres and Hudson, 1996; Candi et al., 2005).

Although the prolonged cultivation times of HaCaT cells did not markedly affect the adhesion rate of SA113, their internalization rates drastically declined (Figure 5a). As little as 0.4% of the number of microorganisms was found to be internalized in cells cultivated for 7 days when compared with the number of bacteria recovered from cultures cultivated for 1 day after reaching confluency. Moreover, the age of the eukaryotic cell culture also affected the survival/persistence rates of internalized bacteria, whereby extended cell cultures allowed significantly less bacterial survival (Figure 5b): On analyzing the 24 hour survival, it was found that in 1-day-old keratinocyte cultures 56.8% of the initial number of viable organisms were recovered, in contrast to a fraction of 21.2% of surviving organisms recovered from 7-day-old cultures. Even the 48 hour survival analysis, albeit approaching elimination of microorganisms, yielded a significant difference between 1-day and 7-day-old cultures (24.7% survival as compared with 8.5%). This observation suggests that



**Figure 5.** Promotion of staphylococcal internalization by preincubation of HaCaT cells with extracellular adherence protein (Eap) as a function of keratinocyte differentiation. (a) Adhesion to (open boxes) and internalization (patterned boxes) of SA113 by 1-day, 2-day, and 7-day-old HaCaT cell cultures. (b) Intracellular survival of SA113 in 1-day (open bars) and 7-day-old (filled bars) HaCaT cell cultures. (c) Adhesion (open bars) to and internalization (filled bars) of SA113 by 1-day and 7-day-old HaCaT cell cultures in the absence or presence of Eap ( $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Fold-change values indicate the number of colony-forming units (CFUs) recovered from cells after Eap preincubation over the number of CFUs from untreated cells. Data are presented in box and whisker plots or represent mean  $\pm$  SEM ( $n=3-6$ ). \* $P<0.05$ , for 1-day versus 7-day-old cells (the Wilcoxon signed-rank test).

differentiated cells might clear internalized bacteria more efficiently compared with undifferentiated cells. However, the mechanisms underlying this phenomenon remain unclear. Phagosome maturation and disintegration may have a role, as internalized bacteria have been shown to be partly able to escape the phagolysosome and to survive for a prolonged time in the cytosol (Bayles *et al.*, 1998; Schroder *et al.*, 2006), and it is suggested that the phagosomal escape is associated with production of *agr*-encoded  $\delta$ -toxin and *agr*-dependent  $\beta$ -toxin (Wesson *et al.*, 1998; Giese *et al.*, 2011). In contrast to results from previous studies using other types of eukaryotic or bacterial cells as those studied here (Wesson *et al.*, 1998, 2000; Giese *et al.*, 2011), in our study at least apoptotic or necrotic processes (with potential entry of antimicrobials from the medium) appeared not to contribute to reduced intracellular survival, as all HaCaT cell cultures tested contained comparable fractions of apoptotic/necrotic cells (data not shown).

In contrast to the apparent protective effect of keratinocyte differentiation toward staphylococcal uptake and long-term survival, the preincubation of these differentiated, 7-day-old cells with Eap caused a significant, 15.4-fold increase in the number of internalized bacteria over the number of internalized bacteria in untreated cells, and a 3.3-fold effect on internalization by differentiated, Eap-pretreated cells compared with undifferentiated pretreated cells (again, an effect that could not be related to a difference in adhesion of *S. aureus* to such differentiated versus nondifferentiated cells, as adhesion rates were found to be comparable) (Figure 5c). These results indicate that Eap may be of particular importance for pathogenesis as well as for the persistent and relapsing nature of skin ulcer infections.

#### Study limitations

Although we have determined invasion in HaCaT cells and in primary keratinocytes, it is unclear whether these cells, although constituting up to 95% of the cell population in skin tissue, truly represent the bacterial uptake-proficient cell populations in the intact human skin, which is also composed

of innate immune cells such as mast cells (Abel *et al.*, 2011), monocyte-derived macrophages, or dendritic cells (Nagl *et al.*, 2002), all capable of bacterial ingestion yet to a different extent. Moreover, it is unclear whether intact or diseased skin cells such as keratinocytes would be accessible for staphylococci in a similar manner compared with the artificial conditions in a monolayer cell culture in the *in vitro* infection system. Furthermore, our study does not take into account the effect of the secretion of antimicrobial peptides (Braff *et al.*, 2005) by keratinocytes and their direct functional effect on the bacterial membrane (Harder and Schroder, 2005), or more indirectly through an immunomodulatory function such as recruitment and activation of antigen-presenting cells (Oppenheim and Yang, 2005).

#### Conclusions

This study contributes a number of observations with respect to the role of Eap as a microbial adhesion and internalization factor, in part independent of the MSCRAMM-type adhesins: Eap appears to elicit a strong and FnBP-independent effect on staphylococcal invasion of keratinocytes, an effect that appears to be unrelated to an anchoring mechanism for bacteria on the eukaryotic cell surface. Eap secreted by *S. aureus* has a profound effect on the internalization rate of other pathogenic bacteria frequently encountered in the context of polymicrobial skin infections, and Eap elicits a substantial effect on internalization of staphylococci in keratinocytes of various differentiation states, a process that has to be assessed in context with the differentiation state-dependent staphylococcal uptake and intracellular survival rates. Although not experimentally addressed here, Eap might enhance the uptake of *S. aureus* by keratinocytes—similar to FnBPs—by binding to the major host cell Fn receptor integrin  $\alpha 5 \beta 1$  via the bridging molecule Fn, thereby inducing a zipper-type uptake of the attached bacterial cells. However, unlike the bacterial cell wall-bound FnBPs, which only induce the Fn- $\alpha 5 \beta 1$  driven uptake cascade if the bacterium is directly bound to the host cell receptor, exogenous Eap might induce

**S Bur et al.**Eap-Mediated *S. aureus* Invasion of Keratinocytes

this uptake mechanism even if the bacterium is not directly linked to the integrin, thereby increasing the uptake rate of bacterial cells that are attached to the keratinocytes by other host cell matrix molecules. Especially in eukaryotic cell types that only weakly express  $\alpha 5\beta 1$ , Eap might thus largely contribute to the invasiveness of this pathogen. Alternatively, exogenous Eap might interact with host signaling cascades that are involved in the control of the phagocytotic machinery. Support for such uptake mechanisms is given by preliminary results showing that the Eap effect on internalization can be fully blocked by adding the actin polymerization inhibitor cytochalasin D, suggesting that Eap might promote the internalization of bacteria via actin-dependent phagocytosis (S. Bur, unpublished data). Further experiments are ongoing in our laboratory to address this question.

**MATERIALS AND METHODS****Cell culture**

NHEK were purchased from Lonza (Walkersville, MD) and cultured in serum-free keratinocyte growth medium supplemented with the singleQuot kit ingredients (Lonza). The spontaneously immortalized human keratinocyte cell line HaCaT (Boukamp *et al.*, 1988) was obtained from the German Cancer Research Center (Heidelberg, Germany) and was cultivated in MCDB153 medium (Biochrom, Berlin, Germany) containing 10% fetal bovine serum (PAA, Pasching, Austria), penicillin ( $100 \text{ U ml}^{-1}$ ), and streptomycin ( $100 \text{ U ml}^{-1}$ ) (Biochrom). Cells were cultivated in a humidified atmosphere at  $37^\circ\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$  and were subcultured regularly.

**Bacterial strains and growth conditions**

Strains and plasmids used in this study are listed in Supplementary Table S1 online. The *S. aureus* SA113  $\Delta eap$  mutant was obtained by transducing the resistance cassette tagged *eap* mutation of mAHI2 (Hussain *et al.*, 2002) into SA113 using phage 85. Bacteria were routinely grown in Luria-Bertani medium or tryptic soy broth (Difco, Detroit, MI) at  $37^\circ\text{C}$  and 150 r.p.m. All strains were sensitive to gentamicin according to EUCAST criteria (<http://www.eucast.org>).

**Eap purification**

Native Eap was purified from *S. aureus* strain Newman as described previously (Athanasopoulos *et al.*, 2006). Protein concentration and purity of the product were checked by SDS-PAGE and Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, München, Germany), respectively. Purified Eap was found to be free of detectable endotoxin by using a Limulus amoebocyte lysate kit from Lonza and following the manufacturer's recommendations.

**Adhesion and internalization assays**

The adhesion and internalization assays were carried out as previously described (Sinha *et al.*, 1999) with the following modifications. HaCaT cells were grown for 24 hours in 24-well plates until confluence ( $\sim 4.5 \times 10^5$  cells per well). To obtain matured keratinocytes, confluent HaCaT cells were further cultivated for 1–7 days. Eap was mixed with unsupplemented medium at the concentrations indicated and incubated for 60 minutes at  $37^\circ\text{C}$ . Subsequently, the wells were washed to remove excessive Eap, and prewarmed medium without supplements was added.

Bacteria from overnight cultures were harvested by centrifugation, washed, and resuspended in phosphate-buffered saline. If not indicated otherwise, cells were inoculated with a  $\text{Mol}$  of  $10^6$  and cocultivated for 90 minutes at  $37^\circ\text{C}$ . Thereafter, wells were thoroughly washed three times with phosphate-buffered saline to remove unbound bacteria before adding 0.5% Trypsin (Biochrom) to detach the keratinocytes. Trypsinated keratinocytes were subsequently lysed by sonication at 50 W for 15 seconds in  $\text{H}_2\text{O}$ , and colony-forming units were determined by plating serial dilutions of the lysates on sheep blood agar. Alternatively, detached keratinocytes were washed in phosphate-buffered saline and subjected to fluorescence-activated cell sorting (FACS, CellQuestPro, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). For the lysostaphin/gentamicin protection assays (internalization) with the staphylococcal species, before the trypsination step, cell culture media were supplemented with  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  lysostaphin (Genmedics, Reutlingen, Germany) and  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  gentamicin (Refobacin, Merck, Darmstadt, Germany), incubated for 1 hour at  $37^\circ\text{C}$  to kill extracellular bacteria, and washed again in phosphate-buffered saline to remove the antimicrobials. Extracellular *E. coli* cells were killed by adding  $600 \mu\text{g ml}^{-1}$  of gentamicin and incubating the cell cultures for 1 hour at  $37^\circ\text{C}$ . Wells without eukaryotic cells were routinely run in parallel to control the efficacy of the gentamicin and lysostaphin/gentamicin treatments. For long-term survival experiments, infected keratinocytes were cultivated in the presence of gentamicin (24 and 48 hours, respectively), and the colony-forming units were determined as described above.

**Statistical analyses**

Statistical comparisons were made using the Mann-Whitney *U*-test (for unpaired analyses) and the Wilcoxon signed-rank test (for paired analyses). *P*-values  $< 0.05$  were considered statistically significant. Results shown are values for *n* independent experiments performed in duplicate.

**CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

**ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by grants from the German Federal Ministry for Education and Science (BMBF grant #01 KI 07103 Skin Staph to M.H. and to K.T.P.) and through the HOMFOR program of the University of Saarland Hospitals to M.B. We thank K. Bartsch and M. Birke for excellent technical assistance and K. Hilgert, J. Jozak, T. Hartmann, U. Schubert, and L. von Müller for valuable hints and explanations.

**SUPPLEMENTARY MATERIAL**

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/jid>

**REFERENCES**

- Abel J, Goldmann O, Ziegler C *et al.* (2011) *Staphylococcus aureus* evades the extracellular antimicrobial activity of mast cells by promoting its own uptake. *J Innate Immun* 3:495–507
- Agerer F, Michel A, Ohlsen K *et al.* (2003) Integrin-mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires src family protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 278:42524–31
- Almeida RA, Matthews KR, Cifrian E *et al.* (1996) *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* 79:1021–6
- Athanasopoulos AN, Economopoulou M, Orlova VV *et al.* (2006) The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits

S Bur et al.

Eap-Mediated *S. aureus* Invasion of Keratinocytes

- wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. *Blood* 107:2720-7
- Bayles KW, Wesson CA, Liou LE et al. (1998) Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun* 66:336-42
- Bost KL, Ramp WK, Nicholson NC et al. (1999) *Staphylococcus aureus* infection of mouse or human osteoblasts induces high levels of interleukin-6 and interleukin-12 production. *J Infect Dis* 180:1912-20
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D et al. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106:761-71
- Bräff MH, Bardan A, Nizet V et al. (2005) Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J Invest Dermatol* 125:9-13
- Bremell T, Abdelnour A, Tarkowski A (1992) Histopathological and serological progression of experimental *Staphylococcus aureus* arthritis. *Infect Immun* 60:2976-85
- Brook I, Frazier EH (1998) Aerobic and anaerobic microbiology of chronic venous ulcers. *Int J Dermatol* 37:426-8
- Bunikowski R, Mielke ME, Skarabis H et al. (2000) Evidence for a disease-promoting effect of *Staphylococcus aureus*-derived exotoxins in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 105:814-9
- Candi E, Schmidt R, Melino G (2005) The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:328-40
- Chavakis T, Hussain M, Kanse SM et al. (2002) *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med* 8:687-93
- Chavakis T, Preissner KT, Herrmann M (2007) The anti-inflammatory activities of *Staphylococcus aureus*. *Trends Immunol* 28:408-18
- Chavakis T, Wiedmann K, Preissner KT et al. (2005) *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost* 94:278-85
- Cho SH, Strickland I, Boguniewicz M et al. (2001) Fibronectin and fibrinogen contribute to the enhanced binding of *Staphylococcus aureus* to atopic skin. *J Allergy Clin Immunol* 108:269-74
- Clement S, Vaudaux P, Francois P et al. (2005) Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *J Infect Dis* 192:1023-8
- Deitch EA, Haskel Y, Cruz N et al. (1995) Caco-2 and IEC-18 intestinal epithelial cells exert bactericidal activity through an oxidant-dependent pathway. *Shock* 4:345-50
- Dziewanowska K, Carson AR, Patti JM et al. (2000) Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: role in internalisation by epithelial cells. *Infect Immun* 68:6321-8
- Dziewanowska K, Patti JM, Deobald CF et al. (1999) Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalisation of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect Immun* 67:4673-8
- Edwards AM, Bowden MG, Brown EL et al. (2012) *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein triggers TNF $\alpha$  release, promoting attachment to endothelial cells via protein A. *PLoS One* 7:e43046
- Edwards AM, Potter U, Meenan NA et al. (2011) *Staphylococcus aureus* keratinocyte invasion is dependent upon multiple high-affinity fibronectin-binding repeats within FnBPA. *PLoS One* 6:e18899
- Ellington JK, Reilly SS, Ramp WK et al. (1999) Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts. *Microb Pathog* 26:317-23
- Entenza JM, Vouillamoz J, Glauser MP et al. (1997) Levofloxacin versus ciprofloxacin, flucloxacillin, or vancomycin for treatment of experimental endocarditis due to methicillin-susceptible or -resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 41:1662-7
- Fowler T, Wann ER, Joh D et al. (2000) Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur J Cell Biol* 79:672-9
- Garzoni C, Kelley WL (2009) *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol* 17:59-65
- Giese B, Glowinski F, Paprotka K et al. (2011) Expression of delta-toxin by *Staphylococcus aureus* mediates escape from phago-endosomes of human epithelial and endothelial cells in the presence of beta-toxin. *Cell Microbiol* 13:316-29
- Grimble SA, Magee TR, Galland RB (2001) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in patients undergoing major amputation. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 22:215-8
- Grundmeier M, Hussain M, Becker P et al. (2004) Truncation of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* strain Newman leads to deficient adherence and host cell invasion due to loss of the cell wall anchor function. *Infect Immun* 72:7155-63
- Grundmeier M, Tuchscher L, Bruck M et al. (2010) Staphylococcal strains vary greatly in their ability to induce an inflammatory response in endothelial cells. *J Infect Dis* 201:871-80
- Haggar A, Hussain M, Lonnie H et al. (2003) Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalisation into eukaryotic cells. *Infect Immun* 71:2310-7
- Harder J, Schroder JM (2005) Antimicrobial peptides in human skin. *Chem Immunol Allergy* 86:22-41
- Hussain M, Becker K, von Eiff C et al. (2001) Analogs of Eap protein are conserved and prevalent in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Clin Diagn Lab Immunol* 8:1271-6
- Hussain M, Haggar A, Heilmann C et al. (2002) Insertional inactivation of Eap in *Staphylococcus aureus* strain Newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts. *Infect Immun* 70:2933-40
- Hussain M, Haggar A, Peters G et al. (2008) More than one tandem repeat domain of the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus* is required for aggregation, adherence, and host cell invasion but not for leukocyte activation. *Infect Immun* 76:5615-23
- Iordanescu S, Surdeanu M (1976) Two restriction and modification systems in *Staphylococcus aureus* NCTC8325. *J Gen Microbiol* 96:277-81
- Jevon M, Guo C, Ma B et al. (1999) Mechanisms of internalisation of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infect Immun* 67:2677-81
- Joost I, Blass D, Burian M et al. (2009) Transcription analysis of the extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* in authentic human infection and in vitro. *J Infect Dis* 199:1471-8
- Joost I, Jacob S, Utermohlen O et al. (2011) Antibody response to the extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* in healthy and infected individuals. *FEMS Immunol Med Microbiol* 62:23-31
- Kintarak S, Whawell SA, Speight PM et al. (2004) Internalisation of *Staphylococcus aureus* by human keratinocytes. *Infect Immun* 72:5668-75
- Lammers A, Nuijten PJ, Smith HE (1999) The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS Microbiol Lett* 180:103-9
- LaPres JJ, Hudson LG (1996) Identification of a functional determinant of differentiation-dependent expression in the involucrin gene. *J Biol Chem* 271:23154-60
- Lee LY, Miyamoto YJ, McIntyre BW et al. (2002) The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. *J Clin Invest* 110:1461-71
- Leigh IM, Purkis PE, Whitehead P et al. (1993) Monospecific monoclonal antibodies to keratin 1 carboxy terminal (synthetic peptide) and to keratin 10 as markers of epidermal differentiation. *Br J Dermatol* 129:110-9
- Lipsky BA, Berendt AR, Deery HG et al. (2004) Diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis* 39:885-910
- Madsen SM, Westh H, Danielsen L et al. (1996) Bacterial colonization and healing of venous leg ulcers. *APMIS* 104:895-9
- Mazmanian SK, Liu G, Ton-That H et al. (1999) *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* 285:760-3
- McElroy MC, Cain DJ, Tyrrell C et al. (2002) Increased virulence of a fibronectin-binding protein mutant of *Staphylococcus aureus* in a rat model of pneumonia. *Infect Immun* 70:3865-73

**S Bur et al.**Eap-Mediated *S. aureus* Invasion of Keratinocytes

- Nagj M, Kacani L, Mullauer B *et al.* (2002) Phagocytosis and killing of bacteria by professional phagocytes and dendritic cells. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:1165–8
- Nitsche-Schmitz DP, Rohde M, Chhatwal GS (2007) Invasion mechanisms of gram-positive pathogenic cocci. *Thromb Haemost* 98:488–96
- Novick R (1967) Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. *Virology* 33:155–66
- Oppenheim JJ, Yang D (2005) Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 17:359–65
- Palma M, Haggar A, Flock JI (1999) Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J Bacteriol* 181:2840–5
- Plouin-Gaudon I, Clement S, Huggler E *et al.* (2006) Intracellular residency is frequently associated with recurrent staphylococcus aureus rhinosinusitis. *Rhinology* 44:249–54
- Schroder A, Kland R, Peschel A *et al.* (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* 195:185–94
- Sendi P, Proctor RA (2009) *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol* 17: 54–8
- Sinha B, Francois PP, Nusse O *et al.* (1999) Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cell Microbiol* 1:101–17
- Sinha B, Fraunholz M (2010) *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *Int J Med Microbiol* 300:170–5
- Sinha B, Herrmann M, Krause KH (2000) Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? *Trends Microbiol* 8:343–4
- Sobke AC, Selimovic D, Orlova V *et al.* (2006) The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* abrogates angiogenic responses of endothelial cells by blocking Ras activation. *FASEB J* 20:2621–3
- Stojadinovic O, Pastar I, Vukelic S *et al.* (2008) Deregulation of keratinocyte differentiation and activation: a hallmark of venous ulcers. *J Cell Mol Med* 12:2675–90
- Thompson KM, Abraham N, Jefferson KK (2010) *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein contributes to biofilm formation in the presence of serum. *FEMS Microbiol Lett* 305:143–7
- Thomsen TR, Aasholm MS, Rudkjøbing VB *et al.* (2010) The bacteriology of chronic venous leg ulcer examined by culture-independent molecular methods. *Wound Repair Regen* 18:38–49
- Wang H, von Rohrscheidt J, Roehrbein J *et al.* (2010) Extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus* suppresses disease by inhibiting T-cell recruitment in a mouse model of psoriasis. *J Invest Dermatol* 130:743–54
- Watt FM (1983) Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J Invest Dermatol* 81:100s–3ss
- Weidenmaier C, Kokai-Kun JF, Kulauzovic E *et al.* (2008) Differential roles of sortase-anchored surface proteins and wall teichoic acid in *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *Int J Med Microbiol* 298:505–13
- Wesson CA, Deringer J, Liou LE *et al.* (2000) Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* in epithelial cells utilizes a mechanism involving caspases 8 and 3. *Infect Immun* 68:2998–3001
- Wesson CA, Liou LE, Todd KM *et al.* (1998) *Staphylococcus aureus agr* and *sar* global regulators influence internalisation and induction of apoptosis. *Infect Immun* 66:5238–43
- Zautner AE, Krause M, Stropahl G *et al.* (2010) Intracellular persisting *Staphylococcus aureus* is the major pathogen in recurrent tonsillitis. *PLoS One* 5:e9452

**Publizierte Abstracts (peer-reviewed)**

**Stephanie Bur, Insa Joost, Julia Schmitt, Lutz von Müller, Uwe Schubert, Astrid Sobke, Klaus T. Preissner, Markus Bischoff, Mathias Herrmann**

Interaction of the extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* with human keratinocytes

*International Journal of Medical Microbiology*, Vol. 299 (Suppl no. 1), S. 56, 2009 zur 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Göttingen

**Stephanie Bur, Insa Joost, Julia Schmitt, Lutz von Müller, Klaus T. Preissner, Andreas Peschel, Markus Bischoff, Mathias Herrmann**

Impact of the extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* on the internalization into human keratinocytes

*Biospektrum-Abstractband zur 3. Gemeinsamen Tagung von DGHM und VAAM*, S. 199 -200, 2010 zur 3. Gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Hannover

**Stephanie Bur, Insa Joost, Lutz von Müller, Andreas Peschel, Markus Bischoff, Mathias Herrmann**

Preincubation of human keratinocytes with extracellular adherence protein (Eap) stimulates the internalisation of *Staphylococcus aureus*

14th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections (ISSSI), 2010, Bath (United Kingdom), S. 156

**Stephanie Bur, Uwe Schubert, Klaus T. Preissner, Lutz von Müller, Markus Bischoff, Mathias Herrmann**

Eap stimulates the internalisation of *Staphylococcus aureus* by interference with eukaryotic uptake mechanisms

*International Journal of Medical Microbiology*, Vol. 301 (Suppl no. 1), S. 74, 2011 zur 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Essen

**Julia Schmitt, Stephanie Bur, Eric P. Skaar, Markus Bischoff, Mathias Herrmann**

Hemin induces a *sae*-dependent regulation of Eap production in *Staphylococcus aureus*

*International Journal of Medical Microbiology*, Vol. 299 (Suppl no. 1), S. 57, 2009 zur 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Göttingen

**Melanie Finke, Stephanie Bur, Mathias Herrmann, Markus Bischoff**

Importance of *Staphylococcus aureus* ClpB and ClpC in intracellular persistence

*International Journal of Medical Microbiology*, Vol. 301 (Suppl no. 1), S. 72-73, 2011 zur 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Essen

## **DANKSAGUNGEN**

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die mich auf unterschiedliche Weise unterstützt und damit zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. Mathias Herrmann für die Bereitstellung des Themas und der Arbeitsmaterialien, seine stete Diskussionsbereitschaft, Korrekturen, Ratschläge und konstruktive Kritik, die nicht nur zum Gelingen dieser Arbeit beitragen.

Ich danke auch P.D. Dr. Markus Bischoff herzlich für die hilfreichen Diskussionen und vor allem für die unermüdlichen und geduldigen Korrekturen sämtlicher Poster, Abstracts und Veröffentlichungen, für deren Korrektur ich mich des Weiteren bei Prof. Dr. Preissner bedanke.

Bei Prof. Dr. Martina Sester möchte ich mich für die Übernahme der Betreuung und Beurteilung dieser Arbeit bedanken.

Herzlich danken möchte ich auch allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und auch die ein oder andere Ablenkung und Aufheiterung. Ein ganz besonderer Dank gilt Martina Birke, Karoline Bartsch und Uwe Schubert, die mir sowohl durch ihre tatkräftige praktische, als auch moralische Unterstützung enorm dabei geholfen haben den manchmal überwältigend erscheinenden Berg an Arbeit zu überwinden.

Karin Hilgert möchte ich dafür danken, dass sie nicht nur durch eine perfekte Organisation, sondern auch durch schnelle Lösung sämtlicher auftretender Probleme im Labor, den reibungslosen Ablauf des Arbeitsalltags erst ermöglichte.

Dem ganzen Sekretariats-Team danke ich für die stets freundliche, schnelle und unkomplizierte Hilfe bei allen auftretenden Fragen und Problemen.

P.D. Dr. von Müller danke ich für seine Hilfe bei den Facs-Messungen, ebenso wie Prof. Dr. Smola für ihre Diskussionsbereitschaft und für die Hilfe bei der Durchführung der RT-PCR-Versuche, für die ich Anna Schneider ebenfalls Danke.

Bei Daniel Scherzer bedanke ich mich fürs Korrekturlesen. Zum Schluss möchte ich ganz herzlich meinen lieben Freunden, insbesondere Torsten und Götz, und natürlich meiner Familie danken, die mich stets unterstützt haben und mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen und somit sehr entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

