

Molekulare Mechanismen der
Staphylococcus aureus
induzierten Autophagie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

- Dr. rer. nat. -

im Fachbereich Biologie
an der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Katja Sabel

aus Limburg a. d. Lahn

Köln 2009

Berichtersteller: Prof. Dr. J.C. Howard
Prof. Dr. M. Krönke

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juni 2009

*für
meine Eltern*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.2	<i>Staphylococcus aureus</i> als intrazelluläres Pathogen	2
1.3	Regulation der Expression von Virulenzfaktoren	3
1.4	Autophagie	4
1.5	Molekularer Ablauf der Autophagie bei Säugetieren	6
1.6	Die Atg1 Homologe Ulk1, Ulk2 und Ulk 3	8
1.7	Intrazelluläre <i>single chain variable Fragments</i>	10
1.8	Zielsetzung	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Lösungen und Puffer	14
2.1.2	Medien und Medienzusätze	15
2.1.2.1	Zellkultur	15
2.1.2.2	Bakterienkultur	16
2.1.3	Chemikalien	16
2.1.4	Eukaryotische Zelllinien	17
2.1.5	Bakterienstämme	17
2.1.6	Enzyme und Polymerasen	17
2.1.7	Antikörper	17
2.1.7.1	Primärantikörper	17
2.1.7.2	Sekundärantikörper	18
2.1.8	Bibliothek	18
2.1.9	Vektoren	18
2.1.10	Oligonukleotide	19
2.1.10.1	RNA Interferenz	19
2.1.10.2	Primer	20
2.1.11	Kits	20
2.1.12	Verbrauchsmaterialien	21
2.1.13	Geräte	21
2.1.14	Datenbanken und Software	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	22
2.2.1.1	Präparation und Isolierung von DNA	22
2.2.1.2	Elektrophoretische Auftrennung und Aufreinigung von DNA	22
2.2.1.3	DNA-Sequenzierung	22
2.2.1.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	23
2.2.1.5	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	23
2.2.1.6	Klonierung der intrazellulären scFv-Bibliothek	24
2.2.1.7	Klonierung stabiler <i>short hairpin</i> RNA Konstrukte	27
2.2.1.8	Klonierung der Ulk-EGFP Fusionskonstrukte	28
2.2.2	Mikrobiologische Methoden	29
2.2.2.1	Kultivierung von <i>Staphylococcus aureus</i>	29
2.2.2.2	<i>In vitro</i> Infektion nicht-professioneller Phagozyten mit <i>S. aureus</i>	29
2.2.2.3	Bestimmung der Wirtszellvitalität nach <i>S. aureus</i> Infektion	29
2.2.2.4	Bestimmung der intrazellulären Bakterienmenge (CFU-Analyse)	30
2.2.2.5	Markierung von Lysosomen durch <i>Fluid Phase</i> Marker	30
2.2.3	Zellbiologische Methoden	31
2.2.3.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	31

2.2.3.2	Induktion und Inhibition von Autophagie	31
2.2.3.3	Transiente Transfektion von Zellen	31
2.2.3.4	Produktion von Lentiviren und Titration des lentiviralen Stocks	32
2.2.3.5	Herstellung stabiler Zelllinien durch lentivirale Transduktion	33
2.2.3.6	Selektion der lentiviralen scFv Bibliothek durch <i>S. aureus</i> Infektion.....	33
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	34
2.2.4.1	Floureszenzmikroskopie adhärenter Zellen	34
2.2.4.2	Herstellung von Zellysaten	34
2.2.4.3	SDS/PAGE, Western Blot und Immunfärbung	35
2.2.4.4	Quantifizierung von Western Blot Banden	35
3	Ergebnisse	37
3.1	Untersuchung der Rollen von Ulk1, Ulk2 und Ulk3 in der <i>S. aureus</i>-induzierten Autophagie	37
3.1.1	Analyse der <i>S. aureus</i> -vermittelten Autophagie.....	37
3.1.1.1	Quantitativer Nachweis der Autophagieinduktion durch <i>S. aureus</i> Infektion	37
3.1.1.2	Kinetik der <i>S. aureus</i> -vermittelten Autophagosomenbildung	39
3.1.1.3	Subzelluläre Lokalisation <i>S. aureus</i> -induzierter Autophagosomen.....	40
3.1.2	Analyse der LC3-Konversion in transient Ulk-defizienten Zellen.....	42
3.1.2.1	Transiente Inhibition der Ulk1, Ulk2 und Ulk3 Expression durch siRNA.....	42
3.1.2.2	Einfluss der Ulk-Defizienz auf LC3-Expression und Konversion.....	43
3.1.3	Rolle der Ulk Proteine in der <i>S. aureus</i> -vermittelten Autophagie	46
3.1.3.1	Generierung stabiler Ulk-defizienter Zelllinien.....	46
3.1.3.2	Analyse der LC3-Konversion in stabilen Ulk-defizienten Zelllinien durch <i>S. aureus</i> Infektion.....	47
3.1.3.3	Untersuchung der <i>S. aureus</i> Replikation in Ulk-defizienten Zellen	49
3.1.3.4	Untersuchung der Wirtszelltoxizität von <i>S. aureus</i> in Ulk-defizienten Zellen	50
3.1.3.5	Analyse der Kolokalisation von <i>agr</i> -defizienten <i>S. aureus</i> mit LC3 und lysosomalem Marker	51
3.1.4	Rolle der Ulk-Proteine in der Rapamycin-induzierten Autophagie.....	54
3.2	Konstruktion und Selektion einer intrazellulären scFv-Antikörper Bibliothek zur Inhibition intrazellulärer Pathogene	57
3.2.1	Generierung und Analyse der intrazellulären scFv Bibliothek	58
3.2.1.1	Klonierung der scFv-Bibliotheken.....	58
3.2.1.2	Qualitätskontrolle der scFv-Bibliothek	59
3.2.2	Analyse der intrazellulären Expression der scFv Bibliothek	61
3.2.3	Selektion der Bibliothek durch <i>S. aureus</i> Infektion	64
3.2.3.1	Selektion und Auswahl der Klone.....	64
3.2.3.2	Evaluierung der scFv-vermittelten <i>S. aureus</i> Resistenz	66
3.2.3.3	Analyse der Autophagie in <i>S. aureus</i> resistenten Klonen.....	67
4	Diskussion	69
4.1	Erhöhte Replikation und Toxizität von <i>agr</i>-defizienten <i>S. aureus</i> in Ulk1-defizienten Zellen.....	69
4.2	Die Rolle von Ulk1 in der Autophagie ist kontrovers	70
4.3	In Ulk1-defizienten Zellen ist die LC3-II Konzentration erhöht.....	71
4.4	Rolle von Ulk1 bei der autophagosomalen Reifung.....	73
4.5	Bedeutung von Ulk2 und Ulk3 in der Autophagie	74
4.6	Inhibition des <i>S. aureus</i>-induzierten Zelltodes durch die Expression eines <i>Intrabodies</i>	75
4.7	Hypothese zur Funktion von Ulk1 bei der Infektion mit <i>S. aureus</i>	76
5	Zusammenfassung.....	78
6	Summary	79
7	Referenzen	80
Anhang	91

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>agr</i>	<i>accessory gene regulator</i>
AIC	<i>Autophagy Initiation Complex</i>
5'AMP	5' Adenosinmonophosphat
ASP	<i>antisense Primer</i>
Atg	<i>Autophagy-related</i>
att	<i>attachment site</i>
C-	carboxyterminal
°C	Grad Celsius
CA	<i>community-acquired</i>
CCR5	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CD4+	<i>cluster of differentiation 4</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDR	<i>Complementary Determining Regions</i>
CFU	<i>colony forming units</i>
CHX	Cycloheximid
CMV	Cytomegalievirus
CTD	carboxyterminale Domäne
Cvt	<i>Cytoplasm-to-vacuole</i>
dGTP	2'-Deoxi-5'-Guanosintriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E2	<i>Ubiquitin conjugating enzyme</i>
E3	<i>Ubiquitin protein Ligase</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
eIF2 α	eukaryotischer Initiationsfaktor 2 α
EtOH	Ethanol
F	Farat

FCS	Fötales Kälberserum
FIP200	<i>Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD</i>
g	Erdbeschleunigung
G ₁₂₀	Glycinrest 120
GAS	Gruppe A Streptokokki
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HA	<i>hospital-acquired</i>
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HeLa	epitheliale Cervixkarzinomzelllinie
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
Kontr.	Kontrolle
LAMP-2	<i>lysosome-associated membrane protein-2</i>
LB	Luria Bertani
LC3	<i>Microtubule-associated protein light-chain 3</i>
3'LTR	<i>3' long terminal repeats</i>
m-	<i>mammalian-</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRSA	Methicillin-resistente <i>S. aureus</i> Stämme
MSCRAMMs	<i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>
N-	aminioterminal
NEAA	<i>non-essential amino acids</i>
OD	Optische Dichte
PAS	Präautophagosomale Struktur
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Protease Inhibitoren

P/S	Penicillin / Streptomycin
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
cAMP PKA	cyclische AMP-abhängige Proteinkinase
Ripa	<i>Radio Immunoprecipitation Assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>sae</i>	<i>S. aureus exoprotein expression</i>
scFv	<i>single chain variable fragment</i>
scr	<i>scrambled</i>
SDS/PAGE	Sodium Dodecylphosphat Polyacrylamid Gelelektrophorese
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth</i>
SP	<i>sense Primer</i>
spez.	spezifisch
<i>Sar</i>	<i>Staphylococcal accessory regulator</i>
St.	Stunde
TOR	<i>Target of Rapamycin</i>
TRITC	<i>Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate</i>
TU	<i>transducing units</i>
UbC	Ubiquitin C
Ulk	<i>unc-51-like Kinase</i>
V _H	variable Region der schweren Antikörperkette
V _L	variable Region der leichten Antikörperkette
VSV	<i>Vesicular Stomatitis Virus</i>
Wt	<i>Wildtyp</i>
YT	<i>Yeast Tryptone</i>
Ω	Ohm

1 Einleitung

1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylokokken sind runde, gram-positive Kokken, die der Familie der Staphylococcaceae (früher Micrococcaceae) zugeordnet werden. Die 0,5-1,5 µm großen Bakterien teilen sich in zwei Ebenen und wachsen so zu traubenförmigen Kolonien. Staphylokokken sind fakultativ aneorob, unbeweglich und bilden keine Sporen. Als Besiedler der Haut und der Schleimhäute von Mensch und Tier sind Staphylokokken weit verbreitet. Die größte humanpathogene Bedeutung kommt der goldgelb pigmentierten, koagulase-positiven Spezies *Staphylococcus aureus* zu. Bei etwa 25% der Bevölkerung besiedelt *S. aureus* dauerhaft die Nasenschleimhäute, 50% werden vorübergehend kolonialisert (Gordon & Lowy, 2008; Laupland et al, 2003; Lindsay, 1997). Aus diesen Reservoirs kann *S. aureus* durch Verletzungen der Hautoberfläche ins Gewebe eindringen und lokal zu Haut- und Weichteilinfektionen wie Abszessen und Furunkeln, aber durch systemische Ausbreitung auch zu Osteomyelitis, Pneumonie und Endokarditis führen. Gelangen die Bakterien in den Blutstrom, so kann es zu lebensbedrohlichen Krankheiten wie Bakteriämie und Sepsis kommen (Crossley & Archer, 1997; Lowy, 1998; Petti & Fowler, 2003). Durch die Sekretion von bakteriellen Toxinen können Lebensmittelintoxikationen, toxische epidermische Nekrosen und das potentiell lebensbedrohliche *Toxic Shock Syndrom* verursacht werden (Lowy, 1998).

Durch stetigen Selektionsdruck, vor allem im nosokomialen Umfeld, sind *S. aureus* Stämme heute weitgehend resistent gegenüber β-Lactam Antibiotika und werden als Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) zusammengefasst (Gordon & Lowy, 2008). Die meisten multiresistenten *S. aureus* können mit dem Glykopeptid-Antibiotikum Vancomycin behandelt werden. Seit 2002 existieren jedoch auch Stämme, die eine vollständige Vankomycin-Resistenz aufweisen (Weigel et al, 2003). Bedingt durch die steigende Zahl immunsuprimierter Patienten und den zunehmenden Einsatz von Kathetern und Implantaten werden fast 30% aller Infektionen, die im Krankenhaus auftreten, von (*hospital-acquired*) HA-MRSA verursacht (Laupland et al, 2003). Seit den 1990ern stellen jedoch auch aggressive, außerhalb des Krankenhauses erworbene (*community-acquired*) CA-

MRSA Stämme ein ernstzunehmendes Gesundheitsproblem dar (Gordon & Lowy, 2008; Naimi et al, 2003).

1.2 *Staphylococcus aureus* als intrazelluläres Pathogen

S. aureus wird traditionell als extrazelluläres Pathogen klassifiziert (Finlay & Cossart, 1997; Lowy, 2000). Verschiedene nicht-professionelle Phagozyten verfügen jedoch über Mechanismen, die eine Aufnahme von Mikroorganismen ermöglichen (Bonazzi & Cossart, 2006). So wurde gezeigt, dass *S. aureus* in Endothelzellen (Ogawa et al, 1985), Epithelzellen (Almeida et al, 1996), Fibroblasten (Sinha et al, 1999), Keratinozyten (Nuzzo et al, 2000) und Osteoblasten (Bayles et al, 1998; Hudson et al, 1995) eindringen kann. Die Internalisierung von *S. aureus* erfolgt durch bakterielle Fibronectin-bindende Proteine (FnBPA und FnBPB), die über eine Fibronectinbrücke am Integrinrezeptor $\alpha_5\beta_1$ der Wirtszelle adhären. Dies führt zur Stimulation der zellulären Aktin-Polymerisierung, die durch den Umbau des Zytoskeletts die Aufnahme der Bakterien in Phagosomen ermöglicht (Dziewanowska et al, 2000; Schroder et al, 2006; Sinha et al, 1999).

Eine intrazelluläre Lokalisation wurde sowohl für Laborstämme als auch für klinische Isolate nachgewiesen (Krut et al, 2003; Sinha et al, 1999). Während einige Stämme nach der Internalisierung im Phagolysosom degradiert werden, können andere, geschützt vor der extrazellulären Wirkung von Antibiotika und den Abwehrmechanismen des Wirtes (Defensine, Komplementsystem, professionelle Phagozyten), intrazellulär überleben und eventuell zum Tod der Wirtszelle führen (Bayles et al, 1998; Garzoni & Kelley, 2009). Es wird spekuliert, dass intrazelluläre *S. aureus* als Reservoir für beispielsweise chronische Osteomyelitis (Ellington et al, 2003; Reilly et al, 2000) oder Mastitis (Almeida et al, 1996; Bayles et al, 1998) dienen. Auch für die Etablierung von systemischen und metastasierenden Infektionen kann die Aufnahme von *S. aureus* in endotheliale Zellen eine Schlüsselrolle spielen (Lowy, 1998). Entscheidend für das intrazelluläre Schicksal der Bakterien ist die differentielle Expression der bakteriellen Virulenzfaktoren nach dem Eintritt in das intrazelluläre Milieu (Garzoni et al, 2007).

1.3 Regulation der Expression von Virulenzfaktoren

Die sequenzielle Synthese der mehr als 40 Virulenzfaktoren wird durch regulatorische Loci wie z.B. *agr*, *sae*, oder *sar* koordiniert. Eine zentrale Rolle nimmt das Zweikomponentensystem *agr* (*accessory gene regulator*) ein, das als *Quorum Sensing* System die Genexpression in Abhängigkeit von der Bakteriendichte steuert (Giraud et al, 1997; Lindsay, 1997; Recsei et al, 1986).

In der frühen exponentiellen Wachstumsphase werden hauptsächlich zellwandassoziierte Proteine exprimiert. Da sie die Kolonisation und Ausprägung der Infektion ermöglichen, werden sie als *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* (MSCRAMMs) zusammengefasst. Zu dieser Gruppe gehören z. B. FnBPA, Clumpingfaktor A und *fibrinogen binding protein* (Foster & Hook, 1998; Mazmanian et al, 1999; Patti & Hook, 1994). Als Schutz vor der extrazellulären Immunantwort des Wirts wird beispielsweise Protein A exprimiert, welches durch seine Bindung an die Fc-Region von Immunglobulin G die Phagozytose und die Aktivierung des Komplementsystems inhibiert (Foster, 2005).

In der stationären Phase induziert das *agr* System vor allem die Expression sezernierter Proteine, wie Leukozidin, Hyaluronidasen und α -Toxin, die durch die Zerstörung von Wirtsgewebe die Ausbreitung der Bakterien ermöglichen. Zudem wird die Immunantwort des Wirtes moduliert. So vermittelt die Peptidoglycan O-Acetyltransferase beispielsweise die Resistenz vor lysozymaler Degradierung (Bera et al, 2006), während die Staphylokinase α -Defensine inaktiviert (Jin et al, 2004). Außerdem hemmt die Expression von Carotenoiden aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung die Eliminierung der Bakterien durch Neutrophile (Liu et al, 2005).

Virulenzfaktoren, die zellautonome Abwehrmechanismen beeinflussen und dadurch das Überleben von *S. aureus* in nicht-professionellen Phagozyten ermöglichen, sind bislang noch weitgehend unbekannt. Das intrazelluläre Schicksal der Bakterien ist jedoch von einem funktionellen *agr*-System abhängig. Während *agr*-defiziente (*agr*⁻) Stämme in den Phagolysosomen von Fibroblasten und HeLa Zellen degradiert werden, können Stämme mit intaktem *agr* System (wt *agr*) intrazellulär replizieren und den Tod der Wirtszelle verursachen (Krut et al, 2003; Schnaith et al, 2007). Als potenzielle Mechanismen, die zum Zelltod führen,

werden CD95-abhängige-Apoptose oder α -Toxin vermittelte Nekrose diskutiert (Baran et al, 2001; Bayles et al, 1998; Essmann et al, 2003; Haslinger-Löffler et al, 2005).

Schnaith et al, (2007) konnten jedoch zeigen, dass *agr*-Wildtyp Stämme den zellulären Mechanismus der Autophagie nutzen, um in einer protektiven Nische zu replizieren und anschließend Caspase-unabhängig den Tod der Wirtzelle zu induzieren.

1.4 Autophagie

Autophagie ist ein physiologischer Prozess, der auf basalem Niveau in jeder Zelle homeostatische Funktionen wie das Recycling von Proteinen und Organellen reguliert. Dabei werden zytoplasmatische Komponenten von einer charakteristischen Doppelmembran, der sog. Isolationsmembran, umschlossen, aus der sich das Autophagosom bildet. Die Fusion des Autophagosoms mit Endosomen und Lysomen führt schließlich zur Degradation des autophagosomalen Inhalts (Levine & Kroemer, 2008).

Dieser intrazelluläre Abbaumechanismus ist von *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Dictyostelium discoideum*, *Caenorhabditis elegans* und *Arabidopsis thaliana* bis hin zu Säugetieren konserviert (Kourtis & Tavernarakis, 2009; Meijer et al, 2007; Melendez & Neufeld, 2008). Erhöhte Induktion von Autophagie erfolgt als zelluläre Reaktion auf Stimuli wie Nährstoffmangel, Depletion von Wachstumsfaktoren, oxidativer Stress, Hitze sowie die Akkumulation defekter, überschüssiger oder abnormer Proteine (Huang & Klionsky, 2007; Levine & Kroemer, 2008). Pexophagie, Reticulophagie und Mitophagie sind spezialisierte autophagische Prozesse zur selektiven Entfernung von Organellen (Huang & Klionsky, 2007; Yu et al, 2008).

Die Dysregulation von Autophagie dagegen wird mit der Pathogenese neurodegenerativer Krankheiten sowie der Entstehung von Muskel-, Herz-Kreislauf- und Leberkrankheiten in Verbindung gebracht. Darüber hinaus beeinflusst eine erhöhte bzw. reduzierte autophagosomale Aktivität die Tumorgenese, die Regulierung des Zellzyklus sowie das Altern (Cuervo, 2004; Levine & Kroemer, 2008; Levine & Kroemer, 2009; Mizushima et al, 2008).

Aktuelle Studien zeigen, dass Autophagie außerdem sowohl in der adaptiven als auch in der angeborenen Immunantwort eine Rolle spielt (Schmid & Munz, 2007). Als Xenophagie bezeichnet man den zellautonomen Abwehrmechanismus, durch den intrazelluläre Bakterien, die dem phagosomalen Abbauweg entkommen, eliminiert werden (Levine & Kroemer, 2008; Swanson, 2006).

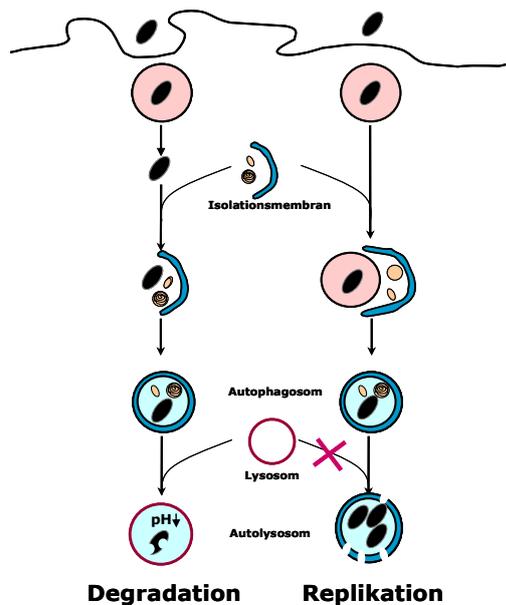


Abbildung E1: Autophagie ermöglicht die Eliminierung oder das Überleben intrazellulärer Bakterien.

Sowohl Gruppe A *Streptokokken* (GAS) (Nakagawa et al, 2004) und metabolisch inhibierte *Listeria monocytogenes*, die toxin-vermittelt ins Zytoplasma übertreten (Rich et al, 2003), als auch *Mycobakterium tuberculosis*, die die Reifung des Phagosoms inhibieren können, werden im Autophagosom degradiert. Andere Bakterien haben Mechanismen entwickelt, um effektiv im Inneren von Autophagosomen zu replizieren. Während *Francisella tularensis* (Checroun et al, 2006) und *Brucella abortus* (Celli et al, 2003) die Reifung des Autophagosoms verhindern, sind *Coxiella burnetii* (Gutierrez et al, 2005) und *Legionella pneumophila* dazu in der Lage, in Autophagosomen, die bereits positiv für lysosomale Marker sind, zu überleben (**Abb. E1**). Dabei wird die Induktion von Autophagie durch *L. pneumophila* wahrscheinlich durch die Sekretion von Virulenzfaktoren ins Zytoplasma ausgelöst (Amer & Swanson, 2005).

Auch wildtyp *agr Staphylococcus aureus* können in charakteristischen multilamellaren Vesikeln nachgewiesen werden, die mit dem autophagosomalen Markerprotein LC3 koloalisieren. Die Replikation der Bakterien wird durch

Aktivatoren der Autophagie stimuliert und in Zellen, die defizient für essentielle Autophagieproteine sind, inhibiert. Im Gegensatz zu *agr*-defizienten Stämmen, die mit LAMP-2 und LysoTracker kolokalisieren, verhindern *agr* wildtyp Stämme die Autophagosomenreifung oder die Fusion mit dem Lysosom und führen zum Tod der Wirtszelle. Bei *agr*-defizienten Stämmen konnte durch die Induktion von Autophagie ein zytotoxischer Phänotyp hervorgerufen werden (Schnaith et al, 2007).

1.5 Molekularer Ablauf der Autophagie bei Säugetieren

Durch eine Serie genetischer *screenings* in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Harding et al, 1995; Suzuki et al, 2007; Thumm et al, 1994; Tsukada & Ohsumi, 1993) konnten bis heute über 31 *Atg* (*Autophagy-related*) Gene identifiziert werden (Huang & Klionsky, 2007), die die komplexe Autophagiemaschinerie steuern. Für viele *Atg* Proteine sind mittlerweile Säugetierhomologe bzw. -orthologe bekannt; ihr Zusammenspiel weist sowohl Parallelen als auch Unterschiede auf (Mizushima et al, 2002). Generell wird Autophagie in drei Phasen unterteilt (**Abb. E2**):

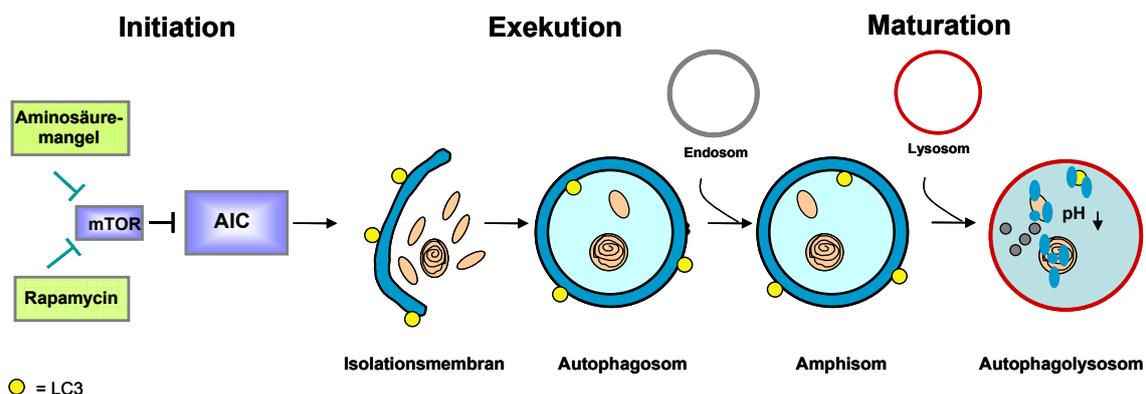


Abbildung E2: Schematischer Ablauf der Autophagie. Die Autophagie wird in Initiation, Exekution und Maturation unterteilt. LC3-II assoziiert mit der inneren und äußeren Autophagosomenmembran (Kirkegaard et al, 2004, modifiziert).

Bei der (i) Initiation führen stimulatorische Signale zu einer mTOR-abhängigen Aktivierung des Autophagieinitiationskomplexes (AIC). Während der (ii) Exekution wird die Isolationmembran gebildet, expandiert und zum Autophagosom geschlossen. Bei der (iii) Maturation fusioniert das Autophagosom zunächst mit Endosomen zu Amphisomen. Nach der Fusion mit Lysosomen werden der Inhalt

und die innere Membran des Autophagolysosoms degradiert (Huang & Klionsky, 2007; Suzuki & Ohsumi, 2007; Tooze et al, 1990).

Die Serin/Threoninkinase *mammalian target of Rapamycin* (mTOR) ist der wichtigste inhibitorische Regulator der Autophagie. Sind genügend Nährstoffe und Wachstumsfaktoren vorhanden, so wird mTOR z.B. durch Tyrosinkinasen des Klasse I Phosphatidylinositol-3-kinase(PI3K)/Akt Signalwegs, der durch Bindung am Insulinrezeptor aktiviert wird, phosphoryliert (Lum et al, 2005). Weitere regulatorische Signale sind die 5'AMP aktivierte Proteinkinase, die durch ein niedriges zelluläres Energieniveau aktiviert wird. Der eukaryotische Initiationsfaktor 2α (eIF2 α) reagiert auf Aminosäuremangel (Levine & Kroemer, 2008). Pharmakologisch kann Autophagie durch den mTOR Inhibitor Rapamycin induziert werden (Noda & Ohsumi, 1998). In der Hefe führt die Inaktivierung von TOR zur Dephosphorylierung von Atg13, welches zusammen mit Atg1 und Atg17 den Autophagieinitiationskomplex (*Autophagy Initiation Complex*, AIC) bildet, der die Entstehung der präautophagosomalen Struktur (PAS) (Suzuki et al, 2001) und die Rekrutierung der Atg Proteine initiiert (Cheong et al, 2008; Kamada et al, 2000). Die Säugetierhomologe dieser Proteine wurden erst kürzlich identifiziert (Ganley et al, 2009; Hara et al, 2008; Hosokawa et al, 2009; Jung et al, 2009).

Die Bildung der Isolationsmembran wird in Säugetieren durch den autophagie-spezifischen Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K)-Komplex initiiert (Kihara et al, 2001). Daher kann Autophagie durch die PI3K Inhibitoren Wortmannin und 3-Methyladenin pharmakologisch inhibiert werden.

Für die Elongation der Isolationsmembran sind zwei miteinander gekoppelte Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme essentiell (Geng & Klionsky, 2008; Yorimitsu & Klionsky, 2005). Das erste System führt zur Bildung eines Komplexes aus mAtg12-mAtg5 (Tanida et al, 1999) und Atg16L, der nur mit der äußeren Autophagosomenmembran assoziiert ist (Mizushima et al, 1998). Im zweiten Konjugationssystem spaltet die Cysteinprotease mAtg4 (Kirisako et al, 2000) posttranslational fünf Aminosäuren vom carboxyterminalen Ende des Atg8 Homologs LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) ab. Das zytoplasmatische LC3-I wird am entstandenen Glycerinrest (G₁₂₀) durch das E1-ähnliche Aktivierungsenzym mAtg7 und das E2-ähnliche Konjugationssystem mAtg3 (Tanida et al, 2002) an Phosphatidylethanolaminreste (PE) der inneren und äußeren Membranschicht der sich bildenden Isolationsmembran konjugiert. LC3-

PE/LC3-II bleibt stabil mit der Autophagosomen-Doppelmembran assoziiert und wird als spezifisches Markerprotein für den Nachweis autophagosomaler Aktivität in Säugetieren benutzt (Ichimura et al, 2000; Kabeya et al, 2000). Während das lipidierte Protein zusammen mit der inneren Autophagosomenmembran degradiert wird, erfolgt die Dekonjugation von LC3-II von der äußeren Membran ebenfalls durch mAtg4 (Kirisako et al, 2000). Das Recycling der Atg Proteine von den autophagosomalen Membranen wird durch den mAtg2-mAtg18 Komplex, wahrscheinlich im Zusammenspiel mit dem Transmembranprotein mAtg9, organisiert (Levine & Kroemer, 2008; Yorimitsu & Klionsky, 2005).

Die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom erfolgt bei Säugetieren u.a. durch Mikrotubuli und die lysosomalen Proteine LAMP-2 und CLN3 (Cao et al, 2006; Tanaka et al, 2000); der autophagosomale Inhalt wird durch die lysosomalen Cysteinproteasen Cathepsin B, D und L degradiert (Koike et al, 2005).

1.6 Die Atg1 Homologe Ulk1, Ulk2 und Ulk 3

In Hefe wurde die Serin/Threoninkinase Atg1 als erster kritischer Regulator der Autophagie identifiziert (Matsuura et al, 1997; Straub et al, 1997; Thumm et al, 1994; Kourtis & Tavernarakis, 2009). Sind genügend Nährstoffe vorhanden, so wird Atg1 von der cyclische AMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) phosphoryliert (Budovskaya et al, 2005) und initiiert zusammen mit Atg17 und weiteren Atg Proteinen das *cytoplasm to vacuole trageting* (Cvt), einen konstitutiven Prozess, bei dem die Proteine Aminopeptidase I und α -Mannosidase in Vesikeln zur Vakuole transportiert werden (**Abb. E3**).

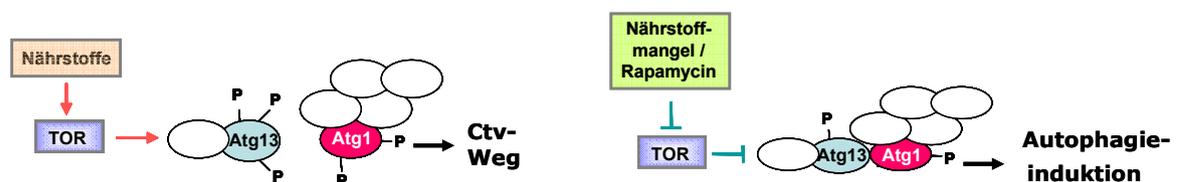


Abbildung E3: TOR-abhängige Bildung des Autophagieinitiationskomplexes

Erst bei Nährstoffmangel wird Atg13 TOR-abhängig dephosphoryliert, wodurch Atg1 und Atg13 miteinander interagieren und den AIC bilden können (Kamada et al, 2000; Kamada et al, 2004; Kawamata et al, 2008).

Neben dieser regulatorischen Rolle steuert Atg1 zusammen mit Atg2 und Atg18 den zyklischen Transport des Transmembranproteins Atg9 zur PAS (Reggiori et al, 2005). Darüber hinaus spielt Atg1 eine Rolle bei der Rückgewinnung von Atg8, Atg17 und Atg23 von der PAS (Reggiori et al, 2004). Ob die Aktivität der Kinasedomäne nur für diesen Recyclingschritt oder auch für die Initiation der Autophagie essentiell ist, wird kontrovers diskutiert (Abeliovich et al, 2003; Cheong & Klionsky, 2008; Kabeya et al, 2005; Kamada et al, 2000).

Das Hefeprotein Atg1 ist in *Arabidopsis thaliana* (AtATG) (Hanaoka et al, 2002), *Dictyostelium discoideum* (DdATG) (Otto et al, 2004), *Caenorhabditis elegans* (unc-51) (Ogura et al, 1994) und *Drosophila melanogaster* (DrATG1) (Scott et al, 2004) konserviert (Meijer et al, 2007). In Säugetieren zeigen drei Proteine Homologien zu Atg1: Die *unc-51-like* Kinasen Ulk1 (Kuroyanagi et al, 1998; Tomoda et al, 1999; Yan et al, 1998), Ulk2 (Yan et al, 1999) und Ulk3. Während Ulk1 und Ulk2 analog zu Atg1 aus einer carboxyterminalen Domäne (CTD), einer Prolin-Serin-reichen Domäne und einer aminoterminalen Kinasedomäne bestehen (Straub et al, 1997), besitzt Ulk3 nur die Kinasedomäne (**Abb. E4**). In dieser weisen Ulk1, Ulk2 und Ulk3 38%, 37% bzw. 39% Homologie mit Atg1 auf.

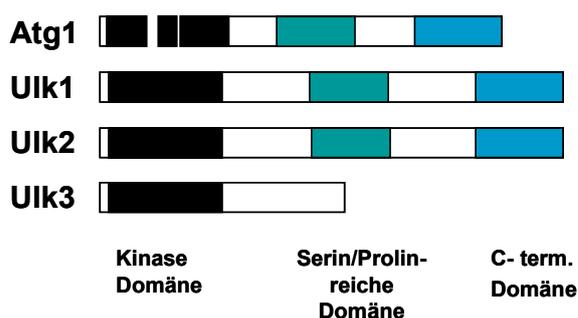


Abbildung E4: Vergleich der funktionellen Domänen von Atg1, Ulk1, Ulk2 und Ulk3

In einer Analyse des Transkriptionsprofils von HeLa Zellen, die mit wt-*agr S. aureus* infiziert wurden, konnte drei Stunden nach der Infektion ein signifikanter Anstieg der Transkription von Ulk1 detektiert werden (S. Leggio, Dissertation). In der Maus zeigen Ulk1 und Ulk2 weitgehend überlappende, ubiquitäre Expressionsmuster (Yan et al, 1998; Yan et al, 1999). Ebenso wurde in humanen

Gewebe für die Ulk Proteine eine weite Verbreitung der Transkripte gezeigt. Eine besonders starke Expression wurde für Ulk1 im Herz und in der Plazenta, für Ulk2 im Herz und im Gehirn und für Ulk3 in Gehirn, Herz, Milz, Niere, Leber und Dünndarm detektiert (S. Leggio, Dissertation).

Während die Funktion von Ulk3 noch völlig unklar ist, werden die Rollen von Ulk1 und Ulk2 (Chan et al, 2009; Hara et al, 2008; Jung et al, 2009) in aktuellen Studien diskutiert. Inhibiert man die Expression von Ulk1 transient durch siRNA, so sind sowohl die Autophagie (Chan et al, 2007) als auch die zyklische Translokation von mAtg9 (Young et al, 2006) inhibiert. Kürzlich wurde gezeigt, dass Ulk1, im Gegensatz zu seinem Homolog in der Hefe, bei der Initiation der Autophagie in Säugetieren konstitutiv einen Komplex mit mAtg13 und FIP200 bildet. Durch Aminosäuremangel wird Ulk1 mTOR-abhängig dephosphoryliert und aktiviert daraufhin sich selbst, mAtg13 und FIP200 (Ganley et al, 2009; Hara et al, 2008; Hosokawa et al, 2009; Jung et al, 2009). Bei Ulk1^{-/-} Mäusen läuft die Embryonalentwicklung und die Autophagie jedoch normal ab, sie zeigen lediglich Defekte in der Mitophagie (Kundu et al, 2008). Darüber hinaus spielt Ulk1 eine Rolle bei der Extension von Neuriten (Tomoda et al, 1999).

1.7 Intrazelluläre *single chain variable Fragments*

Staphylococcus aureus nutzt das Autophagosom als intrazelluläre Nische, um zu replizieren. Das intrazelluläre Überleben ist abhängig von der Präsenz eines funktionellen *agr* Systems (Schnaith et al, 2007). Er ist jedoch unklar, ob *S. aureus* als gram-positives Bakterium dazu in der Lage ist, die Bildung autophagosomaler Kompartimente durch die Sekretion von Virulenzfaktoren zu induzieren. Auch die Faktoren, die zur Inhibition der Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom führen, sind unbekannt.

Zur Identifizierung von bakteriellen Faktoren bzw. von Komponenten zellautonomer Abwehrmechanismen, die das intrazelluläre Überleben zytotoxischer Bakterien ermöglichen, bieten sich Bibliotheken intrazellulär exprimierter, interagierender Moleküle an. Dabei können *antisense* RNA (Wagner & Flanagan, 1997) oder *small interfering* RNA (Hannon, 2002; Tuschl & Borkhardt, 2002) Techniken angewandt werden, bei denen die Expression von Zielgenen durch posttranskriptionale Inhibition verhindert wird (Silva et al, 2004). Auch durch

die Expression von spezifischen cDNA Bibliotheken können Wechselwirkungen zwischen Proteinen identifiziert werden. So konnte beispielsweise die Expression von CD14 cDNA in CD4+T-Zellen eine Resistenz gegen HIV-induzierten Zelltod vermitteln (Kawano et al, 2004).

Eine weitere Möglichkeit, Proteininteraktionen gezielt zu modulieren, ist die Expression von *single chain variable fragments* (scFvs). ScFvs bestehen nur aus der variablen Region der schweren und leichten Antikörperkette (V_H und V_L), die durch einen flexiblen Peptidlinker genetisch fusioniert sind (**Abb. E5**) (Bird et al, 1988; Huston et al, 1988). Sie enthalten die durch die *complementary determining regions* (CDR) kodierte Antigen-spezifität und -affinität und bilden die aus CDRs und dazwischenliegenden Frameworkregionen bestehende Antigenbindetasche. Da scFvs im Gegensatz zu vollständigen Antikörpern nur aus einer Kette bestehen und mit 30 kDa ein wesentlich geringes Molekulargewicht aufweisen, können sie intrazellulär exprimiert werden (Lobato & Rabbitts, 2003).

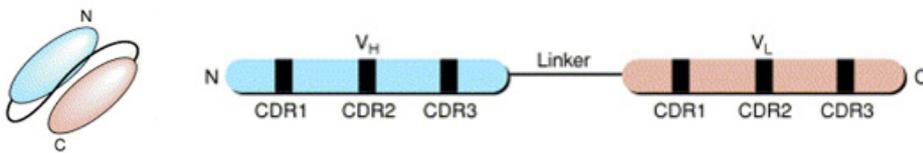


Abbildung E5: Schematische Darstellung eines *single chain variable fragments* (Lobato & Rabbitts, 2003).

Im Gegensatz zu siRNA Strategien können Proteine durch die Bindung intrazellulär exprimierter scFvs (*Intrabodies*) posttranslational modifiziert werden (Cao & Heng, 2005). So können nicht nur vollständige Proteine, sondern auch einzelne Proteindomänen ausgeschaltet werden. *Intrabodies* können auf unterschiedliche Weise mit Zielproteinen interagieren. So kann beispielsweise die Funktion von Proteinen in komplexen Signalwegen analysiert werden (Paz et al, 2005). Es wurde gezeigt, dass die Bindung eines scFvs an hCyclin die Protein-Protein Interaktion mit dem HIV Tat Protein verhindert (Bai et al, 2003). Ebenso können enzymatische Funktionen inhibiert (Levy-Mintz et al, 1996; Maciejewski et al, 1995) oder die zelluläre Lokalisation von Proteinen durch die Bindung eines scFvs beeinflusst werden (Marasco et al, 1993; Poznansky et al, 1998). Durch Lokalisationssequenzen können *Intrabodies* in zelluläre Kompartimente dirigiert werden. Die scFv-vermittelte Hemmung der Oberflächenexpression des CCR5

Rezeptors zeigt, das auch die Bindung zellulärer Faktoren zur Inhibition von viralen Infektionen beitragen kann (Steinberger et al, 2000).

1.8 Zielsetzung

Staphylococcus aureus kann als fakultativ intrazelluläres Pathogen nicht-professionelle Phagozyten infizieren, im Autophagosom replizieren und den Tod der Wirtszelle induzieren. *Agr*-defiziente *S. aureus* werden dagegen über den phagolysosomalen Weg abgebaut.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Säugetierhomologe des für die Initiation der Autophagie in der Hefe essentiellen Proteins Atg1 auch entscheidend für die *S. aureus*-vermittelte Autophagie sind. Dazu sollte durch RNA Interferenz die zelluläre Expression der Serin/Threoninkinasen Ulk1, Ulk2 und Ulk3 jeweils individuell gehemmt werden. In den Ulk-defizienten HeLa Zellen sollte die durch *S. aureus* Infektion induzierte Autophagie sowie die Replikation und die Zytotoxizität *agr* wildtypischer und *agr*-defizienter *S. aureus* Stämme untersucht werden. Eventuelle Unterschiede sollten anhand subzellulärer Lokalisationsstudien präzisiert werden. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob die Defizienz der Ulk Proteine zu *S. aureus*-spezifischen oder allgemeinen Veränderungen der Autophagie führt.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte evaluiert werden, ob es möglich ist, Wirtszellen durch die intrazelluläre Expression von *single chain variable fragments* (scFvs) vor dem Zelltod durch *agr* wildtyp *S. aureus* Stämme zu schützen. Dazu sollten die scFvs der Tomlison *Phage Display* Bibliothek in ausreichender Anzahl und Diversität in ein lentivirales System kloniert werden. Durch die Transduktion von HeLa Zellen sollte eine intrazelluläre scFv Bibliothek generiert werden, deren *Intrabodies* stabil und löslich exprimiert werden. Durch mehrfache *S. aureus* Infektionen sollten Zellen isoliert werden, die durch die scFv-Expression dauerhaft vor der Infektion mit zytotoxischen *S. aureus* Stämmen geschützt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden mit deionisiertem, zweifach destilliertem Wasser (EASYpure UV/UF, Werner Reinstwassersysteme, Leverkusen) angesetzt. Hitzelabile Lösungen wurden steril filtriert (Porendurchmesser 0,2 µm), hitzestabile Lösungen wurden autoklaviert.

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
50 x TAE-Puffer	40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 2 mM Na ₂ EDTA, pH 8,5
10 x TBE-Puffer	890 mM Tris Base, 20 mM Borat, 890 mM EDTA, pH 8,5
Ethidiumbromid Stammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in H ₂ O
TE Puffer, pH 8	10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA, pH 8
NaAcetat-Puffer	3 M NaAcetat, pH 5,2
TNE Lysepuffer	150 mM NaCl, 100 mM Tris, pH 7,2, 10 mM EDTA, 1% NP-40, Complete Protease Inhibitor Cocktail
Extraktionspuffer	10 mM HEPES, pH 7,6, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5% NP-40, Complete Protease Inhibitor Cocktail
Ripa Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Natriumdesoxicholat, 0,1% SDS, Complete Protease Inhibitor Cocktail
Tris Puffer I	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
Tris Puffer II	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
SDS-Lösung	10% (w/v) SDS
Acrylamid-Lösung	AppliChem
APS-Lösung	10% (w/v) Ammoniumpersulfat
5 x Laemmli Probenpuffer	60 mM Tris/HCl (pH 6.8), 2% SDS, 25% Glycerol, 0,2% Bromphenolblau, 10% 2-β Mercaptoethanol
1 x Laemmli 8M Urea Probenpuffer	8 M Harnstoff, 60 mM Tris/HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% Glycerol, 0,01% Bromphenolblau, 5% 2-β Mercaptoethanol
10 x SDS Laufpuffer (Tris/Glycine)	25 mM Tris, 192 mM Gycin, 1% SDS

20 x MOPS Puffer	Invitrogen
Westernblot Transferpuffer	25 mM Tris7HCl, 192 mM Glycin, 20% Methanol
Ponceau-Lösung	0,2% (w/v) Ponceau S, 10% Essigsäure
Blockinglösung	5% Magermilchpulver, 2% BSA in 1 x TBST
TBST Waschpuffer (10x)	1.5 M NaCl, 0.5 M Tris, 0,5% Tween 20, pH 7.4
ECL- Detection Reagent Kit	Amersham Pharmacia
Super Signal Femto West Maximum Sensitivity Substrate	Pierce
Paraformaldehydlösung	3% Paraformaldehyd in 1 x PBS
Saponin Waschpuffer	0,05% Saponin in PBS
Saponin Blockpuffer	0,05% Saponin, 5% BSA in PBS
Kristallviolett	2% Kristallviolett in 3% Formaldehyd, 10% EtOH

2.1.2 Medien und Medienzusätze

2.1.2.1 Zellkultur

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
Dulbecco's MEM (1x)	Biochrom AG
Fötale Kälberserum (FCS)	BioWest
Penicillin-Streptomycin (PS)	Biochrom AG
Trypsin (10x)	Biochrom AG
L-Glutamin	Biochrom AG
Na-Pyruvat	Biochrom AG
Nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom AG
PBS	Biochrom AG
Optimem Reduced Serum	Invitrogen
Eale's Buffered Salt Solution (EBSS)	Invitrogen
Genitacin (G-418)	Stammlösung: 50 mg/ml in H ₂ O, Arbeitslösung: 500 µg/ml, Gibco
Blasticidin S HCl	Stammlösung: 10 mg/ml in H ₂ O, Arbeitslösung: 5 µg/ml, Invitrogen
Puromycin	Stammlösung: 10 mg/ml in H ₂ O, Arbeitslösung: 2 µg/ml, Sigma-Aldrich

2.1.2.2 Bakterienkultur

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
2xYT Medium	31 g /l Difco Yeast Trypton Medium, BD
LB (Luria-Bertani) Medium	25 g/l Difco LB Broth, BD
SOC Medium	2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 2.5 ml 1 M KCl, 5 ml 2M MgCl ₂ , 20 mM Glucose, pH 7.0
LB-Agarplatten	25 g/l Difco LB Broth, 15 g/l Agar, BD
Blutagarplatten	Oxoid
Mueller-Hinton Platten	Oxoid
Ampicillin	Stammlösung: 100 mg/ml in H ₂ O, Arbeitslösung: 100 µg/ml Roth
Kanamycin	Stammlösung: 50 mg/ml in H ₂ O, Arbeitslösung: 50 µg/ml Roth

2.1.3 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders aufgeführt, in p.a. Qualität von den Firmen Sigma, Merck oder Roth bezogen und entsprechend der Angaben des Herstellers in Wasser oder DMSO verdünnt.

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Invitrogen
Complete Protease Inh. Mix (EDTAfree)	Roche
DMSO	Merck
Lysostaphin	Sigma-Aldrich
ProLong Gold Antifade Reagent	Invitrogen
Rapamycin	LC Laboratories, Woburn, USA
TRIZOL®	Invitrogen
Trypanblau-Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Polybrene®	Sigma-Aldrich
Glycogen	Fermentas
3 kDa Dextran, TexasRed-konjugiert	Invitrogen

2.1.4 Eukaryotische Zelllinien

Bezeichnung	Bezugsquelle
HeLa (ATCC CCI-2)	ATCC (American Type Culture Collection), Manassas, USA
HeLa-EGFP-LC3	(Schnaith et al, 2007)
HEK293 (ACC 305)	DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Graham et al, 1977)
HEK293FT	Invitrogen

2.1.5 Bakterienstämme

Bezeichnung	Bezugsquelle
<i>S. aureus</i> MW2 (NRS 123)	NARSA, (The network of antimicrobial resistance in <i>Staphylococcus aureus</i>), Herdon, USA
<i>S. aureus</i> NRS 151	NARSA
<i>E. coli</i> DH5 α	Invitrogen
<i>E. coli</i> ElektroMax DH5 α	Invitrogen
<i>E. coli</i> Stbl3	Invitrogen
<i>E. coli</i> DB3.1	Invitrogen

2.1.6 Enzyme und Polymerasen

Alle Restriktionsenzyme wurden von der Firma Fermentas bezogen und nach Angaben des Herstellers verwendet.

Hersteller	Bezugsquelle
Pfu Polymerase	Fermentas
Taq Polymerase	Fermentas
High Fidelity Polymerase	Fermentas
Phusion Hot Start Polymerase	Finnzymes
T4 Ligase	Fermentas
Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix	Invitrogen

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Primärantikörper

anti-human LC3B IgG	polyklonaler Kaninchen-anti LC3B Antikörper, Sigma-Aldrich, 1:500
anti-EGFP (JL-8) IgG	monoklonaler Maus-anti EGFP Antikörper, Clontech, 1:1000

anti- β -Actin IgG	monoklonaler Maus-anti β -Actin Antikörper, Sigma-Aldrich, 1:10000
anti-p62-C-terminal IgG	polyklonaler Meerschweinchen-anti p62 Antikörper, Progen 1:1000
anti- <i>S. aureus</i> -Protein A IgG	monoklonaler Maus-anti Protein A Antikörper, Sigma-Aldrich 1:2000

2.1.7.2 Sekundärantikörper

anti-Maus IgG	HRP-konjugierter. Ziege-anti-Maus Antikörper, Sigma-Aldrich, 1:5000 Western Blot
anti-Kaninchen IgG	HRP-konjugierter Esel-anti-Kaninchen AK, Sigma-Aldrich, 1:5000 Western Blot
anti-Meerschweinchen IgG	HRP-konj. Kaninchen-anti-Meerschweinchen AK, Sigma-Aldrich, 1:5000 Western Blot
anti Maus IgG	Alexa 568 Fluor-konjugierter Ziege-anti-Maus AK, Molecular Probes, 1: 1000 Immunfluoreszenz

2.1.8 Bibliothek

Human Single Fold scFv Phage Display Bibliothek I+J	MRC, Center for Protein Engineering Cambridge, UK
---	--

Die Tomlinson Bibliotheken I+J bestehen aus nur einem humanen Antikörper Framework für das V_H Gen ($V3-23/DP-47$ und J_H4b) und das V_L Gen ($O12/O2/DPK9$ und J_k1). Sie enthält insgesamt $2,8 \times 10^8$ verschiedene Klone, die Varianzen in 18 Positionen der CDR2 und CDR3 der leichten und schweren Kette aufweisen. Während dies bei Bibliothek J alle Aminosäuren sowie das Amber Stopkodon sein können, ist die Varianz von Bibliothek I durch nur acht mögliche Aminosäuren eingeschränkt (de Wildt et al, 2000; Goletz et al, 2002).

2.1.9 Vektoren

Vektor	Bezugsquelle
pENTR4	Invitrogen
pEntry-EGFP	Klonierungsprodukt dieser Arbeit
pEntry-SUPER-RNAi	Klonierung: B. Yazdanpanah
pLenti6/V5-Dest	Invitrogen
pLenti6/UbC/V5-Dest	Invitrogen
pLenti6/Puro/EGFP-Dest	Klonierung: B. Yazdanpanah
pLenti6/Puro-Dest	Klonierungsprodukt dieser Arbeit

pEGFP-N3	BD Biosciences Clontech
pEGFP-C1	BD Biosciences Clontech
pUlk1-EGFP und EGFP-Ulk1	Klonierungsprodukt dieser Arbeit
pUlk2-EGFP und EGFP-Ulk2	Klonierungsprodukt dieser Arbeit
pUlk3-EGFP und EGFP-Ulk3	Klonierung: S. Leggio

2.1.10 Oligonukleotide

2.1.10.1 RNA Interferenz

Für die transiente Inhibition von Proteinen wurden prähybridisierte *small interfering* RNA (siRNA) Oligonukleotide der Firma Ambion verwendet. Alle siRNA Oligonukleotide wurden mit Wasser zu einer Stocklösung von 200 µM verdünnt, bei den damit durchgeführten Transfektionen wurde eine Arbeitskonzentration von 30 nM verwendet. Folgende Oligomere wurden für die transiente Inhibition der Expression von Ulk1, Ulk2 und Ulk3 ausgewählt:

Ulk1:	<i>sense</i>	5' GAAGGAACUGAAACAUGAAtt 3'
	<i>antisense</i>	5' UUCAUGUUUCAGUUCUUCag 3'
Ulk2:	<i>sense</i>	5' GGUUUUAUUGAUGAAAUCAAtt 3'
	<i>antisense</i>	5' UUGAUUUCAUCAUAAACctc 3'
Ulk3:	<i>sense</i>	5' GAAGGAGGCAAUUAAGGCAtt 3'
	<i>antisense</i>	5' UGCCUUAAUUGCCUCCUUCt 3'

Als Kontrolle wurde eine *non targeting* siRNA verwendet (Ambion, Katalog Nr 4635).

Um die Expression von Proteinen konstitutiv zu inhibieren, wurde ein Gateway kompatibles *short hairpin* shRNA System verwendet (B. Yazdanpanah). Dazu wurden Primer verwendet, die die 19 spezifischen Basen der Zielsequenz wie folgt enthalten (siehe Kap. 2.2.1.7):

sense Primer (SP)

5' GATCCCCGAAGGAACTGAAACATGAATTCAAGAGATTCATGTTTCAGTTCCTTCTTTTTA 3'

antisense Primer (ASP)

5'AGCTTAAAAAGAAGGAACTGAAACATGAATCTCTTGAATTCATGTTTCAGTTCCTTCGGG 3'

Ulk1 shRNA spez	GAAGGAACTGAAACATGAA
Ulk2 shRNA spez	GGTTTATTGATGAAATCAA
Ulk3 shRNA spez	GAAGGAGGCAATTAAGGCA
Ulk shRNA scr	AGAGTCGACGGTACAAGGA

2.1.10.2 Primer

Alle DNA Primer wurden von der Firma Biomers bezogen und in Wasser zu einer Stocklösung von 100 pmol/μl verdünnt und zu Arbeitslösungen von 10 pmol/μl für die Klonierung und 3 pmol/μl für die Sequenzierung verdünnt.

Ulk1-SP	5' GCAGAATTCCACCATGGAGCCCGGCCGCGG 3'
Ulk1-ASP	5' GCCAGGATCCGGCACAGATGCCAGTCAGCA 3'
Ulk2-SP	5' CGCCTCGAGCCACCATGGAGGTGGTGGGTGA 3'
Ulk2-ASP	5' CGCAAGCTTTTCACGGTTGCGGTGCTATGGC 3'
Ulk2/Stop-ASP	5' CGCAAGCTTTTCACACGGTTGCGGTGCTATGGC 3'
LMP3-SP	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'
pHEN-ASP	5' CTATGCGGCCCCATTCA 3'
pEntry/EGFP-SP	5' GATAATGCGGCCGCTGCAGCAGCAGT- GAGCAAGGGCGAG 3'
pEntry/EGFP-ASP	5' CCGAGTGATATCTTACTTGTACAGCTC 3'
pEntry-SP	5' CGTTTCTACAACTCTTCCTGTTAG 3'
pEntry-ASP	5' GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC 3'
pDest/CMV-SP	5' CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG 3'
pDest/scFv SP	5' GCTCCACCATGGCCGAGG 3'
pDest/V5 -ASP	5' ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT 3'
EGFP-ASP	5' AACTTGTGGCCGTTTACGTGC 3'

2.1.11 Kits

Bezeichnung	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Pierce
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
dGTP Big Dye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
NucleoSpin Extract II	Machery & Nagel
QIAPrep Spin Miniprep Kit	Qiagen
Endo Free Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Maxi Prep Kit	Qiagen
DNeasy Tissue Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RNeasy MinElute Cleanup Kit	Qiagen
RNase free DNase Kit	Qiagen
ViraPower™ Lentiviral Expression System	Invitrogen

2.1.12 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Nirozellosemembran Protran 0,2 mm	Schleicher & Schüll
Hyperfim ECL	Amersham Biosciences
Criterion Fertgkassette	BioRad
Fertiggele (10% Tris/Bis)	Invitrogen
Zellkulturplastik	TPP
Sterilfilteraufsätze	Sarstedt
Elektroporationsküvetten	BioRad
Countess Zählkammern	Invitrogen

2.1.13 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Gel- und Blotsystem Critericon Midi	BioRad
Bakterienplatierer EDDY Jet	IUL Instruments
ELISA Reader MRX TC	Dynex Technologies
Geldokumentation GelDoc 2000	BioRad
Entwicklermaschine AGFA Curix 60	AGFA
Power Supply Power Pac 3000	BioRad
Spectrophotometer	Thermo
Elektroporator Gene Pulser Xcell	BioRad
Inversmikroskop Olympus IX81 mit F-View Trigger Kamera	Olympus
Kolonienzähler Countermat	IUL Instruments
Zellzähler Countess	Invitrogen

2.1.14 Datenbanken und Software

Bezeichnung	Hersteller
Blast	www.blast.com
VBASE2	www.vbase2.org
Chromas Pro	Technelysium Pty Ltd
Revelation ELISA Reader Software	MTX Lab Systems
Quantity One Software	BioRad
SIM Vector Software	Premier Biosoft
VectorNTI Software	Invitrogen

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Präparation und Isolierung von DNA

Die Präparation von Plasmid DNA aus Bakterienkulturen im Mini- oder Maximaßstab erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse und wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep bzw. Endo Free Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Zur Isolierung von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen wurde das DNeasy Tissue Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers benutzt.

DNA Konzentrationen wurden entweder durch Abschätzung der Bandenintensität auf Elektrophoresegelele ermittelt oder photometrisch gemessen.

2.2.1.2 Elektrophoretische Auftrennung und Aufreinigung von DNA

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren wurden abhängig von der Fragmentgröße 0,7-3%-ige, ethidiumbromidhaltige TAE-Gele verwendet. Die Auftrennung der Fragmente der DNA-Fingerprintanalyse erfolgte mit 3,5%-igen vertikalen TBE Gelen.

Die Aufreinigung von DNA erfolgte durch Bindung an eine Siliciumoxidmembran mit dem NucleoSpin Extract II Kit (Machery & Nagel) nach Herstellerprotokoll. Alternativ wurden EtOH Präzipitationen durchgeführt. Dazu wurde DNA mit 1 µl Glycogen, einem zehntel Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und dem 2,5-fachen Volumen 100% EtOH gemischt und mindestens zwei Stunden bei -20°C präzipitiert. Die DNA wurde zweimal mit 70% EtOH gewaschen und in H₂O oder TE Puffer (pH 8) aufgenommen.

2.2.1.3 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al, 1977) mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden. Die Reaktionen wurden mit dem Big Dye Terminator Kit angesetzt, für die Sequenzierung von GC-reichen Regionen bei der Klonierung der stabil shRNA exprimierenden Zelllinien wurde der dGTP Big Dye Terminator Kit (Applied Biosystems) verwendet. Es wurden

jeweils 150-300 ng Plasmid DNA bzw. 25-50 ng PCR-Produkt und 3 pmol Primer eingesetzt und wie folgt inkubiert:

2 min 95°C	30 Zyklen
30 sek 95°C	
2'10 min 60°C	
2 min 72°C	
8 min 72°C	

Die Reaktionen wurden im Institut für Genetik, Köln sequenziert und mit der Chromas Pro Software analysiert.

2.2.1.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die exponentielle Amplifizierung von DNA aus Plasmiden oder genomischer DNA erfolgte durch PCR nach Standardprotokoll:

2 min 95°C	25 Zyklen
30 sek 95°C	
1 min 55-65°C	
2 min 72°C	
8 min 72°C	

Zur präparativen Amplifizierung von DNA Fragmenten wurden entweder die Pfu Polymerase (Fermentas) oder die Phusion HotStart Polymerase (Finnzym) nach Herstellerprotokoll eingesetzt. Die Vervielfältigung von DNA aus eukaryotischen Zellen wurde mit der HighFidelity Polymerase (Fermentas) durchgeführt.

Zur Analyse von Klonen nach der Transformation wurden Colony PCRs durchgeführt, bei denen als *Template* eine Bakterienkolonie eingesetzt wird, die durch einen initialen Inkubationsschritt bei 95°C lysiert wird.

2.2.1.5 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Die Transformation von DNA in Bakterien erfolgte entweder chemisch (Hanahan, 1983) oder durch Elektroporation:

Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Bakterien

LB Medium wurde im Verhältnis 1:100 mit einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. Die Bakterien wurden bei 2500 g abzentrifugiert

und dreimal in eiskaltem Waschpuffer (0,1 M CaCl₂) resuspendiert, inkubiert und anschließend in 0,1 M CaCl₂, 15% Glycerol aufgenommen, aliquotiert und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Zur Transformation wurden Bakterien aufgetaut und 20 Minuten mit DNA auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte 45-90 Sekunden bei 42°C, anschließend wurden die Bakterien zunächst zwei Minuten auf Eis, dann in LB Medium bei 37°C inkubiert und schließlich auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C, 220 rpm kultiviert.

Herstellung und Transformation elektroporationskompetenter Bakterien

2xYT Medium (Difco) wurde im Verhältnis 1:100 mit einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,45 kultiviert. Die Bakterien wurden bei 2800 g zentrifugiert und dreimal in eiskaltem Waschpuffer (0,1 M Hepes pH 7,5, 10% Glycerol) durch Drehen des Tubes resuspendiert, in Waschpuffer aufgenommen, aliquotiert und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Zur Transformation wurden Bakterien auf Eis aufgetaut, mit DNA versetzt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte mit dem Gene Pulser Xcell (BioRad) nach folgenden Parametern:

<i>E. coli</i> ElektroMax DH5α (20 µl, 0,1 cm Küvette)	2,0 kV	200 Ω	25 µF
<i>E. coli</i> Stbl3 (200 µl, 0,2 cm Küvette)	2,5 kV	200 Ω	25 µF

Anschließend wurde 1 ml SOC Medium zu den Bakterien gegeben, eine Stunde auf 37°C, 220 rpm inkubiert, auf LB-Agar Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

2.2.1.6 Klonierung der intrazellulären scFv-Bibliothek

Um die Tomlinson scFv Libraries I+J (MRC, Center for Protein Engineering, Cambridge, UK) stabil in eukaryotischen Zellen exprimieren zu können, wurde das GatewayTM-Klonierungssystem (Invitrogen) in Kombination mit dem lentiviralen ViraPowerTM Expressionssystem (Invitrogen) benutzt. Das Gateway System basiert auf dem Rekombinationssystem des Lambda Phagen. Dabei wurden die scFv-Gene zunächst zwischen die *attL* Regionen des Entry-Vektors kloniert (**Abb. M1**). Im Rekombinationsschritt vermitteln die Proteine Excisionase, Integrase und *integration host factor* den Transfer der *attL* flankierten scFv-Gene zwischen die beiden *attR* Regionen des Destinationsvektors (GatewayTMpLenti6/V5-Dest).

Durch Restriktionsverdau mit *NotI* und *Eco321* wurde das PCR Fragment *in frame* mit der *Multiple Cloning Site* (MCS) in den Gateway™pEntry4 Vektor eingebracht. Zusammen mit den drei carboxyterminalen Alanin-Aminosäuren der leichten scFv Kette ergab sich so ein Alanin₍₆₎-Linker.

0,6 pmol des ebenfalls mit *NotI* und *NcoI* geschnittenen pEntry-Linker-EGFP-Stop Vektors wurden in drei Versuchsansätzen mit 0,6 pmol der isolierten scFvs der Tomlinson Bibliothek zwei Stunden bei 22°C ligiert. Die Ligationsansätze wurden vereinigt, durch EtOH Präzipitation aufgereinigt und in 12 Ansätzen durch Elektroporation in *E. coli* ElektroMax DH5α Bakterien transformiert und eine Stunde bei 37°C inkubiert (Kap. 2.2.1.5). Anschließend wurden alle Ansätze gemischt und jeweils ein Milliliter wurde auf 20 x 20 cm LB-Agar Platten (50 µg/ml Kanamycin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurden Verdünnungen ausgestrichen, um die Anzahl der Kolonien zu bestimmen. Unter gleichen Bedingungen wurde in einer Probe der Anteil an Religanden abgeschätzt. Der durchschnittliche Titer der 12 Transformationen lag bei ca. $1,82 \times 10^7$ colony forming units CFU/Transformation. Alle gewachsenen Bakterienkolonien wurden mit Medium von der Platte abgestrichen, vereinigt und bei 4000 rpm 20 Minuten abzentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden bei -20°C gelagert.

Klonierung der pDest-scFv Bibliothek

Aus den Bakterienpellets der pEntry-scFv Bibliothek wurde die DNA mit dem Plasmid Maxi Prep Kit (Qiagen) isoliert. In 20 Reaktionen wurden 2 pmol der pEntry-scFv Bibliothek mit 1 pmol des pLenti6/V5-Dest Vektors mit dem Gateway LR-Clonase Enzyme Mix nach Herstellerprotokoll 15 Stunden bei 25°C inkubiert und anschließend mit Proteinase K behandelt und inaktiviert. Nach EtOH Präzipitation wurden in insgesamt 52 Ansätzen die DNA in elektrokompente *E. coli* Stbl3 Bakterien (Kap. 2.2.1.5) transformiert. Nach der Inkubation bei 37°C wurden alle Ansätze gemischt und jeweils ein Milliliter wurde auf 20 x 20 cm LB-Agar Platte (100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen. Die Transformationseffizienz der 52 Reaktionen lag im Durchschnitt bei $1,46 \times 10^6$ CFU/Transformation. Alle Bakterienkolonien wurden mit Medium von der Platte abgestrichen, vereinigt und bei 4000 rpm 20 Minuten abzentrifugiert. Die Pellets wurden bei -20°C gelagert. Nach Isolierung der DNA mit dem Qiagen Plasmid Maxi Prep Kit und zusätzlicher EtOH-Präzipitation konnte die pDEST-scFv Bibliothek zur Herstellung von Lentiviren eingesetzt werden

Zur Qualitätskontrolle der pDest-scFv Bibliothek wurden randomisierte Klone der Titrationsplatten kultiviert. Aus der daraus isolierten Plasmid-DNA wurden die scFv Sequenzen durch PCR mit den Primern pDest/CMV-SP und pDest/V5-ASP analysiert.

Generierung der lentiviralen Bibliothek

Die lentivirale Bibliothek wurde durch Kotransfektion der Produzentenzelllinie HEK293FT mit der DNA der pDest Bibliothek und den Verpackungsplasmiden pLP1, pLP2 und pVSV generiert (Kap 2.2.3.4). In drei Ansätzen wurden insgesamt 1×10^9 HEK293FT Zellen mit 56,4 μg pDEST-scFv Bibliothek kotransfiziert. Die resultierenden lentiviralen Bibliotheken wiesen in jeweils 62 ml einen durchschnittlichen Titer von $2,5 \times 10^5$ TU/ml auf, so dass jede der drei lentiviralen Bibliotheken aus ca. $1,5 \times 10^7$ *transducing units* (TU) bestand.

Reklonierung selektionierter scFvs

Aus den selektionierten Klonen der intrazellulären scFv-Bibliothek wurde die genomische DNA, wie in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben, isoliert. In einer auf 15 Zyklen verkürzten PCR wurden die scFv-Gene mit den Primern pDest/CMV-SP und pDest/scFv-ASP und Taq Polymerase (Fermentas) amplifiziert, sequenziert und wiederum schrittweise in das lentivirale Vektorsystem eingebracht. Erneut wurden Lentiviren eingebracht und zur Transduktion von HeLa Zellen eingesetzt.

2.2.1.7 Klonierung stabiler *short hairpin* RNA Konstrukte

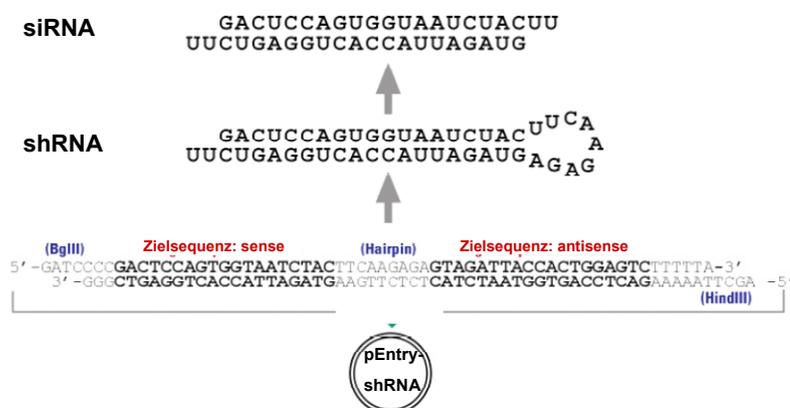


Abbildung M2: Transkription des pEntry-shRNA Konstruktes zu funktionellen siRNAs

In Zielzellen wird vom Polymerase-III H1 RNA Promoter die Expression des shRNA Transkriptes gesteuert, das sich zu einer Hairpin-Struktur faltet und weiter zu einer funktionsfähigen siRNA prozessiert wird.

Um die Expression von Proteinen in Zellen langfristig unterdrücken zu können, wurden mit Hilfe des Gateway kompatiblen pSUPER RNAi Systems (OligoEngine) und des lentiviralen ViraPower Systems short hairpin RNA-Konstrukte stabil in Zielzellen eingebracht.

Dazu wurden Oligonukleotide entworfen, die zwischen den Restriktionsschnittstellen *BglIII* und *HindIII* sowie einer *hairpin*-Sequenz die 19 spezifischen Nukleotide, die von der mRNA des Zielgens abgeleitet sind, in *sense* und *antisense* Orientierung enthalten (**Abb. M2**). Diese Oligonukleotide wurden nachdem pSUPER RNAi System Herstellerprotokoll zusammengefügt und in einen pEntry Vektor kloniert, der den Polymerase-III H1 RNA Promoter und die siRNA Klonierungstelle des pSUPER Vektors enthält.

Das inhibitorische Potenzial der pEntry-shRNA Konstrukte wurde durch transiente Transfektion (Kap. 2.2.3.3) von eukaryotischen Zellen überprüft und dann durch LR Rekombination nach Herstellerprotokoll in den pLenti/Puro-Dest Vektor kloniert. Dieser Vektor wurde aus dem pLenti/Puro/EGFP Vektor generiert, aus dem zuvor durch Restriktionsverdau mit *XhoI* und das EGFP-Gen herausgeschnitten wurde. Die resultierenden pLenti/Puro/Dest-shRNA Konstrukte können in Lentiviren verpackt und stabil in Zielzellen eingebracht werden (Kap. 2.2.3.4-5).

2.2.1.8 Klonierung der Ulk-EGFP Fusionskonstrukte

Um die Proteine Ulk1 und Ulk2 als amino- bzw. carboxyterminale EGFP-Fusionsproteine exprimieren zu können, wurden sie in den pEGFP-N3 bzw. pEGFP-C1 Expressionsvektor kloniert (BD Biosciences, Clontech).

Dazu wurde die Ulk1 DNA-Sequenz zusammen mit den Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *EcoRI* durch PCR amplifiziert (Primer: Ulk1-SP und Ulk1-ASP). Durch Klonierung in den pEGFP-N3 und pEGFP-C1 Vektor ergaben sich die Konstrukte pUlk1-EGFP sowie pEGFP-Ulk1.

Analog dazu wurde Ulk2 mit den Primern Ulk2-SP und Ulk2-ASP amplifiziert und über *XhoI* und *HindIII* Restriktionsschnittstellen kloniert. Für das pEGFP-Ulk2 Konstrukt wurde der Antisenseprimer Ulk2/Stop-ASP benutzt.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung von *Staphylococcus aureus*

Zur Kultivierung von *S. aureus* wurden die Bakterien auf einer Blutagarplatte ausgestrichen. Nach mindestens 12 Stunden Inkubation bei 37°C wurde eine Kolonie in eine 5 ml LB Vorkultur überführt und bei 37°C, 220 rpm über Nacht kultiviert. Daraus wurde eine Großkultur im Verhältnis 1:100 in LB Medium inokuliert und bei 37°C, 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 kultiviert. Die Bakterien wurden 10 Minuten bei 4°C, 4000g zentrifugiert und in 1 ml PBS aufgenommen und auf eine OD₆₀₀ von 3 eingestellt, die 1x10⁹ Bakterien/ml (CFU/ml) entspricht. Bakterienverdünnungen für die Infektion von eukaryotischen Zellen wurden in DMEM ohne den Zusatz von Antibiotika angesetzt.

2.2.2.2 *In vitro* Infektion nicht-professioneller Phagozyten mit *S. aureus*

Zur Infektion von eukaryotischen Zellen mit *Staphylococcus aureus* Stämmen wurden 3x10⁵ HeLa Zellen bzw. 5x10⁵ HEK293 Zellen in 6-Lochplatten ausgesät und nach 24 Stunden infiziert. Dazu wurden *S. aureus* Bakterien kultiviert, abhängig vom jeweiligen Experiment in einer *multiplicity of infection* (MOI) von 20-300 eingesetzt und eine Stunde bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach der Infektion wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA von der Platte abgelöst und in Reaktionsgefäßen zweimal mit Medium ohne Antibiotika gewaschen. Um extrazelluläre Bakterien zu töten, wurden die Zellen 15 Minuten bei 37°C mit 200 µg/ml Lysostaphin (Sigma) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Wurde die Infektion im 12- oder 24-Lochformat durchgeführt, so wurden die Zellen nicht abgelöst, sondern in der Kulturplatte weiter behandelt.

Sollte zusätzlich Autophagie induziert werden, so wurden die Zellen vom Beginn der Infektion an vier Stunden mit 80 µg/ml Rapamycin behandelt.

2.2.2.3 Bestimmung der Wirtszellvitalität nach *S. aureus* Infektion

Um die Wirtszellvitalität zu ermitteln, wurden Zellen nach der *S. aureus* Infektion in Medium mit dem Zusatz von Antibiotika ausgesät. Nach 24 Stunden wurde die Vitalität durch Trypanblaufärbung entweder in einer Neubauerkammer oder mit dem Countess-Zellzähler bestimmt.

2.2.2.4 Bestimmung der intrazellulären Bakterienmenge (CFU-Analyse)

Zur Bestimmung der intrazellulären Bakterienanzahl wurden die Zellen nach der *S. aureus* Infektion (Kapitel 2.2.2.2) auf der Kulturplatte gewaschen und anschließend in DMEM mit Antibiotika kultiviert. Sechs bzw. 24 Stunden nach Beginn der Infektion wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und auf der Kulturplatte mit 0,05%-igem Triton-X 100 5 Minuten bei 37°C lysiert. Die Lysate wurden verdünnt, 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt und in zwei verschiedenen Verdünnungen mit Hilfe des EDDYJet Bakterienplattierers (IUL Instruments) spiralförmig auf Mueller-Hinton Platten ausgestrichen. Parallel dazu wurde in einem separaten Ansatz die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt. Die Bakterienplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Auszählung der gewachsenen Bakterienkolonien erfolgt mit dem Countermat Kolonienzähler (IUL Instruments) und wurde als *colony forming units* (CFU) pro Zelle berechnet.

2.2.2.5 Markierung von Lysosomen durch *Fluid Phase Marker*

Zum Nachweis der Kollokalisierung von Bakterien mit Lysosomen wurden 5×10^4 Zellen auf Deckgläschen etwa 15 Stunden mit 10 μM TexasRed-konjugierten 3 kDa Dextran inkubiert (*Pulse*). Anschließend wurden die Proben fünfmal mit PBS gewaschen, um die Dextrane, die nicht endozytiert wurden, zu entfernen. Die *Chase* der *Fluid Phase Marker* in die Lysosomen erfolgte durch die Zugabe von frischem Medium für drei Stunden. Anschließend wurden die Zellen nach Standardprotokoll (Kap. 2.2.2.2) eine Stunde in einer MOI von 20 mit *S. aureus* NRS-GFP infiziert, mit Lysostaphin behandelt. Ein, zwei oder drei Stunden nach der Infektion wurden die Zellen mit 3% Paraformaldehyd fixiert, auf Objektträgern eingebettet und mikroskopisch analysiert (Kap. 2.2.4.1).

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Die Kultivierung der HeLa (humane Cervixkazinoma) und der HEK293 (*human embryonic kidney*) Zelllinien erfolgte in DMEM Medium mit dem Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FCS), 100 Units/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin (P/S). Zur Kultivierung der HEK293FT Zelllinie wurde DMEM *complete*, das zusätzlich 1% NaPyruvat, 1% NEAA, 1% L-Glutamin und 500 µg/ml Genitacin enthält, verwendet.

Die Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert und alle 2-3 Tage passagiert. Die Langzeitlagerung erfolgte in DMEM Medium (10% FCS, 1% P/S) mit dem Zusatz von 10% DMSO in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

2.2.3.2 Induktion und Inhibition von Autophagie

Zur Induktion von Autophagie wurden Zellen auf Kulturplatten ausgesät. Transient transfizierte Zellen wurden 48 Stunden nach der Infektion wie folgt behandelt:

Zwei bis vier Stunden Inkubation mit 40-80 µg/ml Rapamycin (LC Laboratories) oder eine Stunde Infektion mit *S. aureus* (Kapitel 2.2.2.2).

Zur Inhibition von Proteasen wurde der Complete Protease Inhibitor Mix (EDTA-free) (PI) nach Herstellerprotokoll verwendet. Alle Reagenzien wurden in DMEM ohne Zusatz von Antibiotika verdünnt und die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

2.2.3.3 Transiente Transfektion von Zellen

Transiente Transfektionen von Zelllinien wurden mit dem kationischen, lipidbasierten Reagenz LipofectamineTM 2000 (Invitrogen) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Dabei wurden die Zellen unmittelbar vor der Transfektion mit Trypsin/EDTA abgelöst und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

Ausgehend von Anwendung und Zelllinie wurden unterschiedliche Zellzahlen, Formate, Lipofectamine- und DNA-Konzentrationen eingesetzt:

Tabelle M1: Transfektionsparameter für die transiente Transfektion

Anwendung	Format	Zellzahl	DNA-Menge	Lipofectamin-Menge
Transfektion von Plasmiden	12-Loch	$1,5 \times 10^5$	0,25-1 µg	2,5 µl
Transfektion von siRNA	6-Loch	$1,5 \times 10^5$	30 nM	5 µl
Kotransfektion von Plasmid und siRNA	12-Loch	3×10^5	0,25 -0,75 µg 30 nM siRNA	2,5 µl

2.2.3.4 Produktion von Lentiviren und Titration des lentiviralen Stocks

Zur Herstellung von Lentiviren wurde die Produzentenzelllinie HEK293FT mit dem entsprechenden pLenti6-Dest Vektor und den Verpackungsplasmiden pLP1, pLP2 und pVSV kotransfiziert. Diese Verpackungsplasmide (pLps) enthalten die DNA für die Expression des VSV-G Proteins und HIV Genprodukte Gag-Pol und Rev, die die Generierung von lentiviralen Partikeln und deren randomisierte Integration ins Genom der Zielzelle vermitteln (Dull et al, 1998; Naldini, 1999). Eine Deletion in der 3'LTR ($\Delta U3$) des lentiviralen Expressionsvektors führt zur Selbstinaktivierung des Lentivirus nach der Integration (Zufferey et al, 1998).

Tabelle M2: Transfektionsparameter für die Generierung von Lentiviren

Herstellung von Lentiviren für	Format	Zellzahl	DNA-Menge	Lipofectamin-Menge
stabile scFv Library	150 [cm ²] Kulturflasche	$1,5 \times 10^7$	7,5 µl pDest je 7,5 µl pLps	90 µl
stabile Zelllinien	75 [cm ²] Kulturflasche	$7,5 \times 10^6$	3,3 µl pDest je 3,3 µl pLps	30 µl

Die sezernierten Lentiviren wurden aus dem zwischen 17 und 40 Stunden nach der Transfektion produzierten Kulturüberstand geerntet, nach Protokoll gereinigt und unverdünnt bei -80°C eingefroren.

Um die Effizienz der Lentivirusproduktion zu ermitteln, wurden Zielzellen nach Herstellerprotokoll mit verschiedenen Konzentrationen des unverdünnten lentiviralen Überstandes sowie 2 µg/ml des positiv geladenen Polymers Polybrene® inkubiert. 48 Stunden nach der Transduktion wurden die Zellen mit 5 µg/ml Blasticidin selektioniert. Nach ca. 14 Tagen wurde die Anzahl stabil transduzierter Klone durch Kristallviolett-Färbung ermittelt, und der lentivirale Titer

wurde als transduzierende Einheiten *transducing units* pro Milliliter (TU/ml) errechnet.

2.2.3.5 Herstellung stabiler Zelllinien durch lentivirale Transduktion

Je 1×10^5 HeLa Zellen wurden nach Herstellerprotokoll im 6-Loch-Format mit verschiedenen Verdünnungen des lentiviralen Überstandes transduziert und nach 48 Stunden durch die kontinuierliche Zugabe von 5 $\mu\text{g/ml}$ Blastocidin oder 2 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin selektioniert. Überlebende Klone wurden entweder aus den entsprechenden Verdünnungen gepickt oder per *limited dilution* vereinzelt und subkultiviert.

2.2.3.6 Selektion der lentiviralen scFv Bibliothek durch *S. aureus* Infektion

Zur Selektion der scFv Bibliothek durch *S. aureus* Infektion wurden 1×10^7 HeLa Zellen mit lentiviralem Überstand in einer MOI von 0,5 transduziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Blastocidin selektioniert.

Acht Tage nach der Transduktion wurden 3×10^6 Zellen mit dem *S. aureus* Stamm MW2 (MOI=200) infiziert. Überlebende Zellen wurden 24 Stunden nach der Infektion unter Blastocidin Selektionsdruck weiterkultiviert. Nach jeweils etwa einer Woche wurde die Antibiotikaselektion unterbrochen und die Infektion mit den überlebenden Zellen wiederholt. Nach der zweiten Infektion wurden die Zellen in zehn Pools aufgeteilt, die während der weiteren Infektionen beibehalten wurden. Nach der vierten Infektion wurde die Vitalität aller zehn Zellpools bestimmt und die Zellen der vier Pools mit den höchsten Vitalitäten wurden durch *limited dilution* subkultiviert. Klone, die unter dem Fluoreszenzmikroskop eine starke scFv-Expression zeigten wurden weiter kultiviert

Für die Reselektion der scFvs wurden die scFv-Gene der selektionierten Pools wie in Kapitel 2.2.1.6 beschrieben mit Hilfe des Gateway Systems in den pDest Vektor kloniert und zur erneuten Produktion von Lentiviren eingesetzt. Damit wurden wie in Kapitel 2.2.3.5 beschrieben stabile, scFv-exprimierende Zelllinien hergestellt.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Fluoreszenzmikroskopie adhärenter Zellen

Zur mikroskopischen Analyse wurden Zellen im 24 Lochformat auf Deckgläschen ausgesäht und wie in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben behandelt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 3% Paraformaldehyd fixiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurden EGFP exprimierende Zellen bzw. Bakterien entweder direkt mit ProLong Gold Antifade Reagenz (Invitrogen) auf Objektträgern eingebettet oder für die Immunfluoreszenzfärbung mit 0,05 % Saponin in PBS 15 Minuten permeabilisiert. Danach wurden unspezifisch bindende intrazelluläre Proteine zehn Minuten mit Saponin-Blockingpuffer (0,05 % Saponin, 5% BSA in PBS) gesättigt. Die Inkubation mit anti-Protein A spezifischem Primärantikörper erfolgte im Verhältnis 1:2000, die mit Alexa Fluor 468 gekoppeltem spezifischem Sekundärantikörper im Verhältnis 1:1000 in Blockingpuffer in einer feuchten Kammer. Überschüssige Antikörper wurden jeweils mit Blockingpuffer entfernt. Schließlich wurden die Deckgläschen mit ProLong Gold auf Objektträger eingebettet und nach 24 Stunden Aushärtung bei Raumtemperatur mit dem Olympus IX81 Mikroskop analysiert.

2.2.4.2 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die zu analysierenden adhärenen Zellen mit 1 x Trypsin/EDTA abgelöst und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Wenn nicht gesondert erwähnt, wurden die Zellen in TNE Lysepuffer resuspendiert und 20 Minuten bei 20000 g, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 6 x Laemmli Puffer aufgekocht.

Zur Unterscheidung von löslicher und unlöslicher zellulärer Fraktion wurden die Zellen in Extraktionspuffer resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 20000 g, 4°C wurde der Überstand als lösliche Fraktion mit 6 x Laemmli Puffer aufgekocht. Das Pellet wurde in 1 x Laemmli 8 M Urea Lysepuffer resuspendiert und 5 Minuten aufgekocht. Der Überstand enthielt die lösliche zelluläre Fraktion.

Zur Herstellung von Ganzzelllysaten wurden Zellen in Ripa Lysepuffer resuspendiert, mit einer 27G Kanüle homogenisiert, 30 Minuten auf Eis inkubiert

und anschließend 20 Minuten bei 20000 g, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 6 x Laemmli Puffer aufgeköcht.

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde vor dem Aufkochen mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce) nach Herstellerprotokoll bestimmt, und die Proteinmenge der Proben wurde, wenn nicht gesondert erwähnt, auf 20 µg eingestellt.

2.2.4.3 SDS/PAGE, Western Blot und Immunfärbung

Zelllysate wurden nach der von Schagger & von Jagow (1987) beschriebenen Methode durch SDS/PAGE aufgetrennt. Als apparatives System diente die Criterion Midi Gelapparatur kombiniert mit 10%-igen Tris/Bis-Gelen (Invitrogen) und MOPS-Laufpuffer. 12-14%-ige Tris/Glycin-Gele wurden in Criterion-Leerkassetten gegossen und mit Tris/Glycin Laufpuffer versetzt. Zum Nachweis der LC3 Konversion wurden jeweils 14%ige Gele benutzt, Ulk-EGFP Fusionsproteine wurden in 10%igen und scFv-EGFP Fusionsproteine in 12%igen Gelen aufgetrennt.

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Protran 0,2 mm, Schleicher und Schuell) erfolgte mit Hilfe des Criterion Midi Blotsystems (BioRad) nach Herstelleranweisung 90 Minuten bei 250 mA. Um freie Bindungsstellen zu sättigen, wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockinglösung inkubiert. Die spezifische Detektion der Proteine erfolgte durch Primär- und Sekundärantikörper, die verdünnt in Blockinglösung je eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert wurden. Überschüssige Antikörper wurden jeweils durch Waschen mit TBST entfernt. Die Detektion der Proteine erfolgt durch Chemilumineszenz mit dem ECL- Detection Reagent Kit (Amersham Bioscience) oder Super Signal Femto West MaximumSensitivity Substrate (Pierce). Die Röntgenfilme wurden mit der Curix 60 Entwicklermaschine (AGFA) entwickelt.

2.2.4.4 Quantifizierung von Western Blot Banden

Zur Messung der Intensität von Signalen auf dem entwickelten Röntgenfilm wurde dieser gescannt und mit der QuantityOne Software (BioRad) analysiert. Dazu

wurde die optische Dichte der Schwärzung auf dem Film gemessen, ein Dichteprofil erstellt und das Integral wurde als Trace [Intensität x mm] berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Rollen von Ulk1, Ulk2 und Ulk3 in der *S. aureus*-induzierten Autophagie

3.1.1 Analyse der *S. aureus*-vermittelten Autophagie

3.1.1.1 Quantitativer Nachweis der Autophagieinduktion durch *S. aureus* Infektion

In nicht-professionellen Phagozyten wurde die Translokation von *S. aureus* in das autophagosomale Kompartiment bisher nur mikroskopisch durch die Lokalisation der Bakterien in charakteristischen multilamellaren Vesikeln und die Kolokalisierung mit dem autophagosomalen Markerprotein LC3 gezeigt (Schnaith et al, 2007). Das quantitative Ausmaß der Autophagieinduktion kann anhand der Konversion des zytoplasmatischen LC3-I Proteins in seine lipidierte, membrangebundene Form LC3-II analysiert werden, da die Menge an LC3-II mit der Autophagosomenbildung korreliert (Ichimura et al, 2000; Kabeya et al, 2000) (**Abb. 1A**).

Zur quantitativen Analyse der *S. aureus*-vermittelten Autophagie wurden Zellen der epithelialen Zelllinien HEK293 und HeLa mit dem *wt-agr S. aureus* Stamm MW2 infiziert. Im Vergleich dazu wurden unbehandelte oder mit dem pharmakologischen Autophagieaktivator Rapamycin behandelte Zellen analysiert. Mittels Western Blot und Immunfärbung mit LC3-spezifischem Antikörper wurde in HEK293 Zellen durch die Infektion mit *S. aureus* eine deutliche Intensitätszunahme der LC3-II Bande auf 750% und nach Rapamycinbehandlung auf 550% der unbehandelten Kontrolle nachgewiesen. In HeLa Zellen nahm der Gehalt an LC3-II im Vergleich zur Kontrolle nach Infektion oder Rapamycinbehandlung auf etwa 270% zu (**Abb. 1B+C**). Während in HEK293 Zellen die Menge an zytoplasmatischem LC3-I konstant blieb, führte die Induktion von Autophagie in HeLa Zellen zu einer deutlichen Abnahme der LC3-I Bande. Um diese Veränderungen der Gesamtproteinmenge an LC3 bei der Quantifizierung der Autophagie zu berücksichtigen, wurde zusätzlich die Lipidierungsänderung als Verhältnis der LC3-II Menge zur LC3-Gesamtmenge berechnet. So führten

Infektion bzw. Rapamycinbehandlung in HEK293 Zellen zu einer Erhöhung des lipidierten LC3-Anteils auf etwa 300% und in HeLa Zellen auf 200% der Kontrolle (Abb. 1D+E).

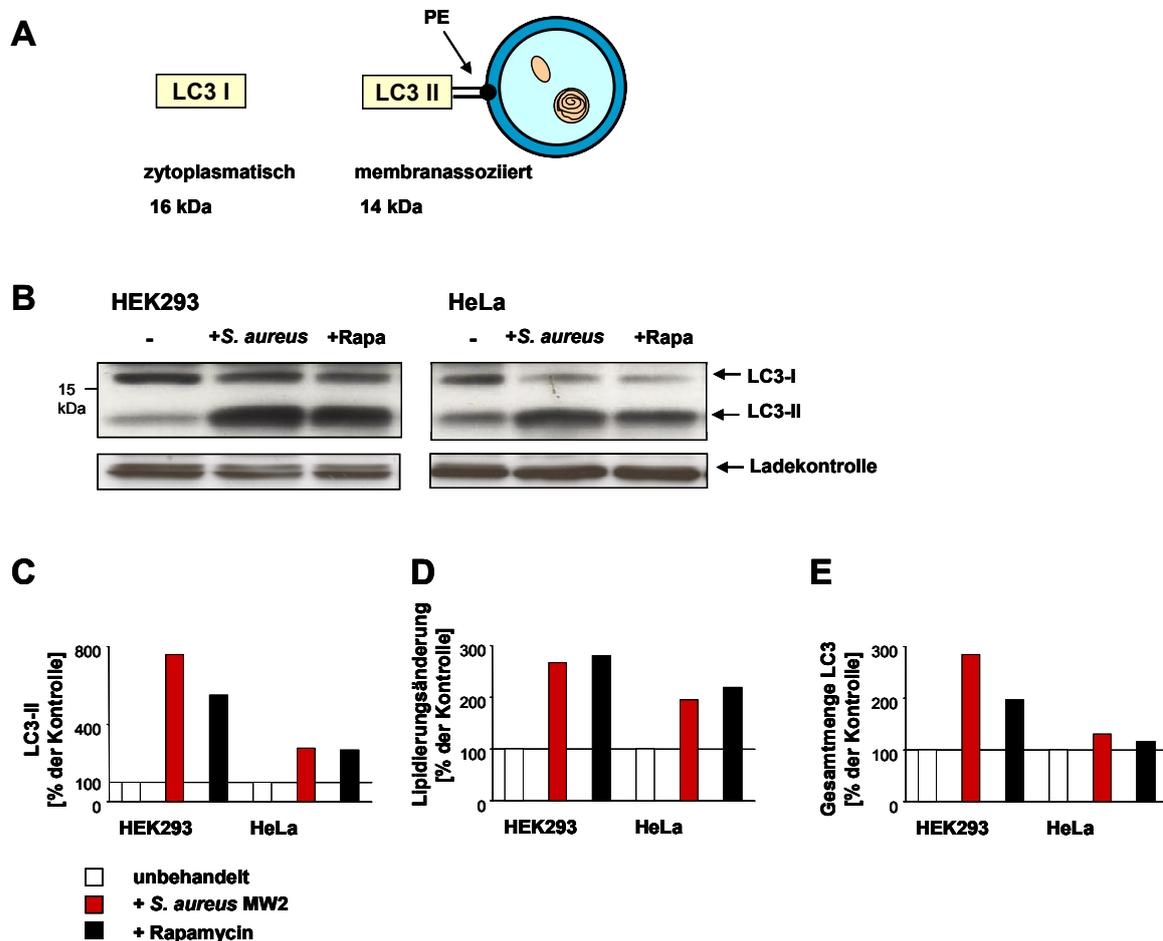


Abbildung 1: Autophagieinduktion durch *S. aureus* Infektion

A) Als Nachweis für Autophagie kann die Konversion der zytoplasmatischen LC3-I Form (16 kDa) in die membrangebundene LC3-II Form (14 kDa) durch SDS/PAGE und Western Blot Analyse detektiert werden. (PE = Phosphatidylethanolamin) **B**) HEK293 oder HeLa Zellen wurden entweder für eine Stunde mit *S. aureus* MW2 (MOI=200) infiziert oder zwei Stunden mit 40 µg/ml Rapamycin inkubiert. Die Proben wurden durch Western Blot mit anti-LC3 Antikörper analysiert. Die Intensitäten der LC3-I und -II Banden sowie der Ladekontrolle wurden densitometrisch quantifiziert. Die graphische Darstellung erfolgte entweder als **C**) LC3 Menge = LC3-II/Ladekontrolle, **D**) Lipidierungsänderung = LC3-II/(LC3-I+II) oder **E**) LC3-Gesamtproteinmenge = LC3-I+II/Ladekontrolle. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils auf 100% gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen.

3.1.1.2 Kinetik der *S. aureus*-vermittelten Autophagosomenbildung

Um die Kinetik der Autophagieinduktion zu untersuchen, wurden HEK293 Zellen für 30 bis 120 Minuten mit Rapamycin behandelt oder mit *S.aureus* MW2 infiziert. Zwei bis vier Stunden nach Infektionsbeginn wurde die LC3-Konversion durch Western Blot und LC3-Immunfärbung analysiert.

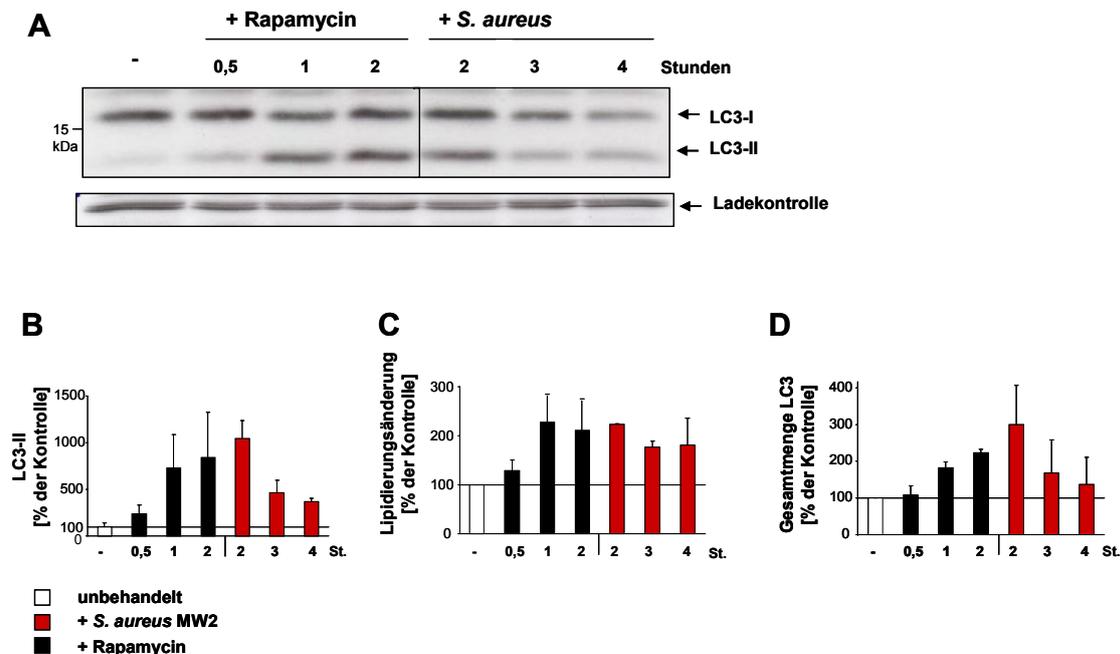


Abbildung 2: Kinetik der Rapamycin- und *S. aureus*-vermittelten Autophagie-Induktion

A) HEK293 Zellen wurden 30 Minuten, eine oder zwei Stunden mit 40 µg/ml Rapamycin induziert oder eine Stunde mit *S. aureus* MW2 (MOI=200) infiziert. Zwei, drei oder vier Stunden nach Beginn der Infektion wurden die Proben durch Western Blot mit anti-LC3 Antikörper analysiert. Die Intensitäten der LC3-I und -II Banden sowie der Ladekontrolle wurden densitometrisch quantifiziert. Die graphische Darstellung erfolgte entweder als **B)** LC3 Menge = LC3-II/Ladekontrolle, **C)** Lipidierungsänderung = LC3-II/(LC3-I+II) oder **D)** LC3-Gesamtproteinmenge = LC3-I+II/Ladekontrolle. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils auf 100% gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Die Werte zweier unabhängiger Experimentreihen wurden gemittelt.

Während der Rapamycinbehandlung nahm die LC3-II Menge über die gesamte Inkubationszeit zu und betrug nach zwei Stunden im Durchschnitt 840% der unbehandelten Kontrolle. In infizierten Zellen erreichte die LC3-II Menge bereits zwei Stunden nach Beginn der Infektion mit etwa 1000% ein Maximum (**Abb. 2A+B**). Drei bis vier Stunden nach Infektionsbeginn nahm sowohl die Konzentration an LC3-II als auch an LC3-I deutlich ab. Aufgrund der reduzierten Gesamtproteinmenge blieb die Lipidierungsänderung zu diesen Zeitpunkten in etwa konstant (**Abb. 2D+C**).

3.1.1.3 Subzelluläre Lokalisation *S. aureus*-induzierter Autophagosomen

Mikroskopisch konnten die Veränderungen der zellulären LC3-Lokalisation durch die Verwendung einer stabilen GFP-LC3 exprimierenden HeLa Zelllinie analysiert werden (Schnaith et al, 2007).

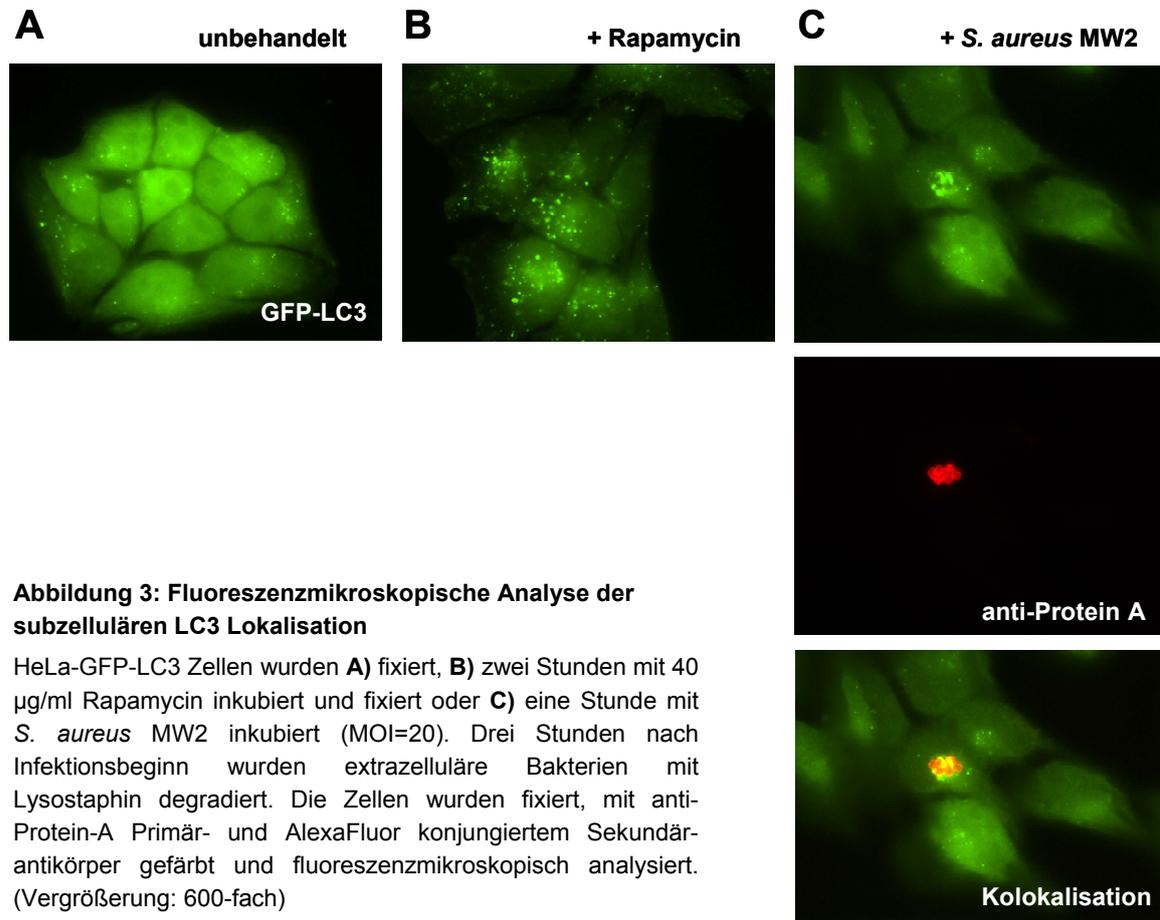


Abbildung 3: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der subzellulären LC3 Lokalisation

HeLa-GFP-LC3 Zellen wurden **A**) fixiert, **B**) zwei Stunden mit 40 µg/ml Rapamycin inkubiert und fixiert oder **C**) eine Stunde mit *S. aureus* MW2 inkubiert (MOI=20). Drei Stunden nach Infektionsbeginn wurden extrazelluläre Bakterien mit Lysostaphin degradiert. Die Zellen wurden fixiert, mit anti-Protein-A Primär- und AlexaFluor konjugiertem Sekundärantikörper gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. (Vergrößerung: 600-fach)

Unbehandelte Zellen wiesen eine gleichmäßige, zytosolische Verteilung des GFP-LC3-Proteins auf (**Abb. 3A**). Nach zweistündiger Rapamycin-Behandlung konnte LC3 in kleineren, über die gesamte Zelle verteilten Punkten detektiert werden (**Abb. 3B**). Diese Punkte entstehen durch die Assoziation von GFP-LC3-II mit der autophagosomalen Membran (Kabeya et al, 2004) und waren bedingt durch basale Autophagie auch in unbehandelten Zellen vereinzelt zu sehen. Drei Stunden nach Beginn der *S. aureus* Infektion akkumulierte LC3-II lokal in wesentlich größeren Strukturen, die mit *S. aureus* kolokalisierten (**Abb. 3C**).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit dem *wt-agr S. aureus* Stamm MW2 in HEK293 und Hela Zellen zu einer Erhöhung der zellulären LC3-II-Menge bzw. LC3-Lipidierung, und damit zur Bildung autophagosomaler Kompartimente führt. Innerhalb der Zelle akkumulierte LC3 lokal an den Bakterien enthaltenden Kompartimenten.

3.1.2 Analyse der LC3-Konversion in transient Ulk-defizienten Zellen

3.1.2.1 Transiente Inhibition der Ulk1, Ulk2 und Ulk3 Expression durch siRNA

Bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist die Serin/Threoninkinase Atg1 als Teil des Autophagieinitiationskomplexes essentiell für die Induktion der Autophagie (Matsuura et al, 1997; Straub et al, 1997). In Säugetieren zeigen die Proteine Ulk1, Ulk2 und Ulk3 ausgeprägte Homologien zu Atg1.

Um die Bedeutung der drei Proteine bei der *S. aureus*-vermittelten Autophagie zu analysieren, wurden *small interfering RNAs* (siRNAs), die spezifisch für die mRNA Sequenzen von Ulk1, Ulk2 oder Ulk3 sind, entworfen. Die Evaluierung des inhibitorischen Potenzials einzelner siRNAs erfolgte durch transiente Kotransfektion von siRNA und Ulk1-, Ulk2- oder Ulk3-EGFP Fusionskonstrukten, die durch Western Blot mit EGFP-spezifischem Antikörper analysiert wurden.

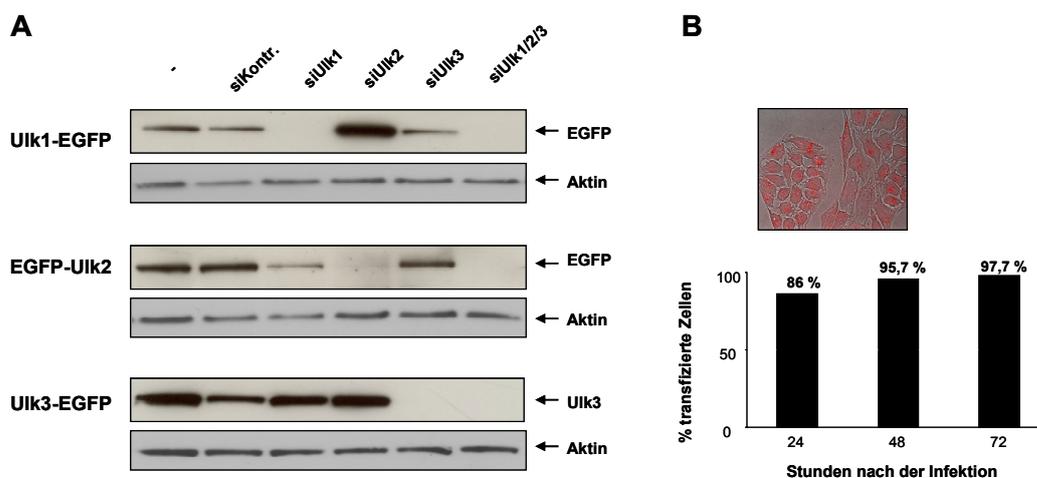


Abbildung 4: Analyse der spezifischen Inhibition der Ulk1, Ulk2 und Ulk3 Expression durch siRNA

A) HeLa Zellen wurden mit 30 nM siRNA und 500 ng Ulk1-EGFP, 750 ng EGFP-Ulk2 oder 250 ng Ulk3-EGFP Konstrukt transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden Ganzzelllysate durch Western Blot mit anti-EGFP bzw. anti-Aktin Antikörper analysiert. **B)** HeLa Zellen wurden mit 30 nM TRITC-markierter siRNA transfiziert, nach 24, 48 und 72 Stunden fixiert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Der prozentuale Anteil an TRITC-markierten Zellen wurde graphisch dargestellt.

Durch die transiente Transfektion einzelner siRNAs konnte die Expression von Ulk1, Ulk2 und Ulk3 in HeLa Zellen jeweils individuell inhibiert werden, während die Transfektion der Kontroll-siRNA das Expressionsniveau der Ulk Proteine nicht

beeinflusste. Die Kombination der drei spezifischen siRNAs führte jeweils zur Hemmung der Expression aller drei Proteine (**Abb. 4A**).

Zur Abschätzung der Transfektionseffizienz wurden HeLa Zellen mit einer TRITC-markierten siRNA transfiziert und mikroskopisch analysiert. Bereits 24 Stunden nach der Infektion waren 86% der Zellen und nach 48 bzw. 72 Stunden mehr als 96% der Zellen mit der siRNA transfiziert (**Abb. 4B**).

3.1.2.2 Einfluss der Ulk-Defizienz auf LC3-Expression und Konversion

Zunächst wurden die Auswirkungen der Inhibition der Ulk Proteine auf die basale und Rapamycin-induzierte Autophagie in HeLa Zellen analysiert.

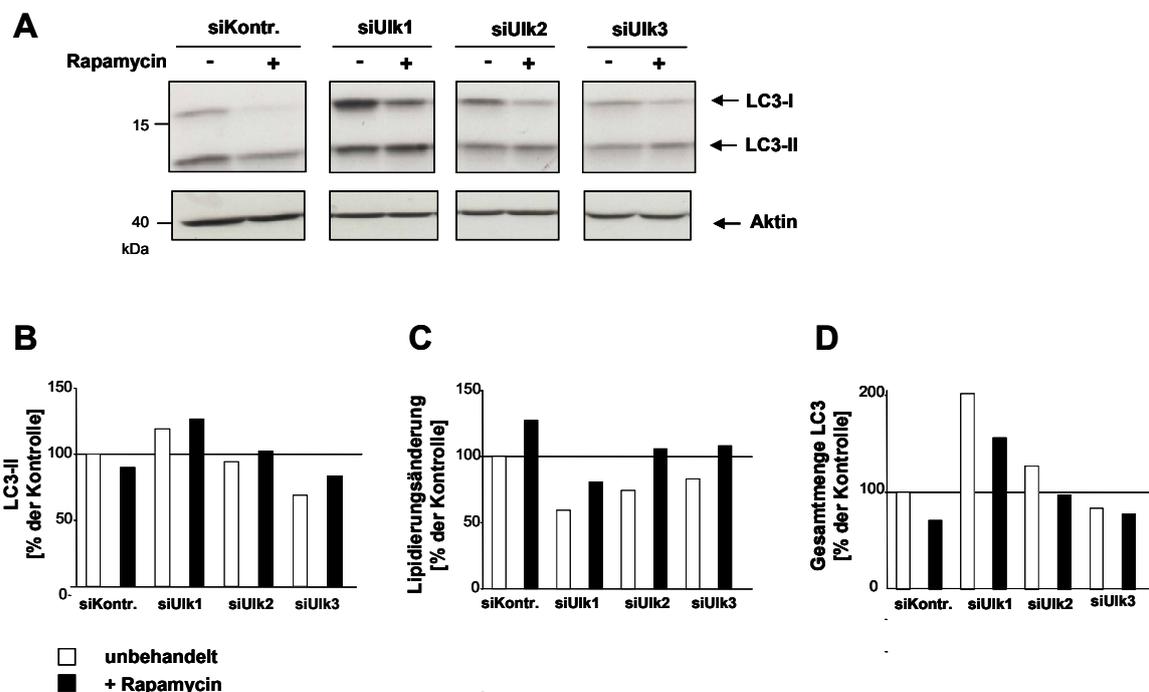


Abbildung 5: Analyse der LC3-Konversion nach transienter Ulk1, Ulk2 und Ulk3 Inhibition

A) HeLa Zellen wurden mit 30 nM siRNA transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion entweder nicht behandelt oder zwei Stunden mit 40 µg/ml Rapamycin inkubiert und anschließend mittels Western Blot mit anti-LC3 Antikörper analysiert. Die Intensität der LC3 Banden sowie der Aktin-Ladekontrolle wurde densitometrisch quantifiziert. Die graphische Darstellung erfolgte entweder als **B)** LC3-II Menge = LC3-II/Aktin, **C)** Lipidierungsänderung = LC3-II/(LC3-I+II) oder **D)** LC3-Gesamtproteinmenge = LC3-I+II/Aktin. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils auf 100% gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen.

Die Analyse der LC3-Konversion nach transienter Inhibition von Ulk1, Ulk2 oder Ulk3 in HeLa Zellen erfolgte durch Western Blot. Durch den Vergleich der LC3-II Mengen der jeweiligen Proben konnte keine eindeutige Veränderung der Intensität

in Rapamycin behandelten Proben nachgewiesen werden (**Abb. 5A+B**). Erst die Betrachtung der Lipidierungsänderung zeigte, dass die Behandlung mit Rapamycin bei jeder Probe zu einer Erhöhung der LC3-Lipidierung führte. Im Vergleich zu den Zellen, die mit der Kontroll-siRNA oder der Ulk2- oder Ulk3-spezifischen siRNAs transfiziert wurden, führte die Inhibition der Expression von Ulk1 zu einer Steigerung der LC3-II und der LC3-I Menge. Dadurch sind in Ulk1-defizienten Zellen die Werte für die LC3-Lipidierungsänderung niedriger (**Abb. 5C+D**).

Um zu klären, ob die erhöhten LC3-I und II Mengen in Zellen, in denen die Expression von Ulk1 transient herunter reguliert wurde, auf einen unspezifischen Effekt der verwendeten siRNA zurück zu führen waren, wurden zwei weitere spezifische siRNAs getestet, die an andere Zielsequenzen der Ulk1 mRNA binden. Nach Kotransfektion der drei Ulk1 spezifischen siRNAs mit einem Ulk1-EGFP Konstrukt konnte im Western Blot durch die Expression von siUlk1#1 eine Reduktion und für siUlk1#2 und #3 eine Inhibition der Ulk1-EGFP Expression nachgewiesen werden (**Abb. 6A**).

Die Analyse der basalen und durch Rapamycin induzierten LC3-Konversion dieser Proben zeigte, dass die Induktion der Autophagie durch Rapamycin bei allen Proben zu einer Erhöhung der LC3-II Menge gegenüber dem basalen Wert führte. Bei den transfizierten Proben waren im Vergleich zu der nicht transfizierten Probe bereits die LC3-II Mengen der unbehandelten Proben um das Doppelte erhöht, was auf eine unspezifische, transfektionsbedingte Autophagieinduktion hinweist (**Abb. 6B+C**). Bei allen Proben kam es nach pharmakologischer Autophagieinduktion zu einer Erhöhung der Lipidierungsänderung (**Abb. 6D**). Die Hemmung der Ulk1 Expression durch alle drei siRNAs führte zu einem erhöhten LC3-I Gehalt und damit zu einer etwa doppelt so hohen Gesamtmenge an LC3 (**Abb. 6E**).

Wurde die Neusynthese von Proteinen in Zellen, die mit Kontroll- oder Ulk1-siRNA transfiziert wurden mit Cycloheximid inhibiert, so war der LC3-I Gehalt beider Proben gleichermaßen verringert. Die zuvor beobachtete, erhöhte LC3-I Menge wurde demnach als Reaktion auf die Inhibition von Ulk1 neu synthetisiert (**Abb. 6F**).

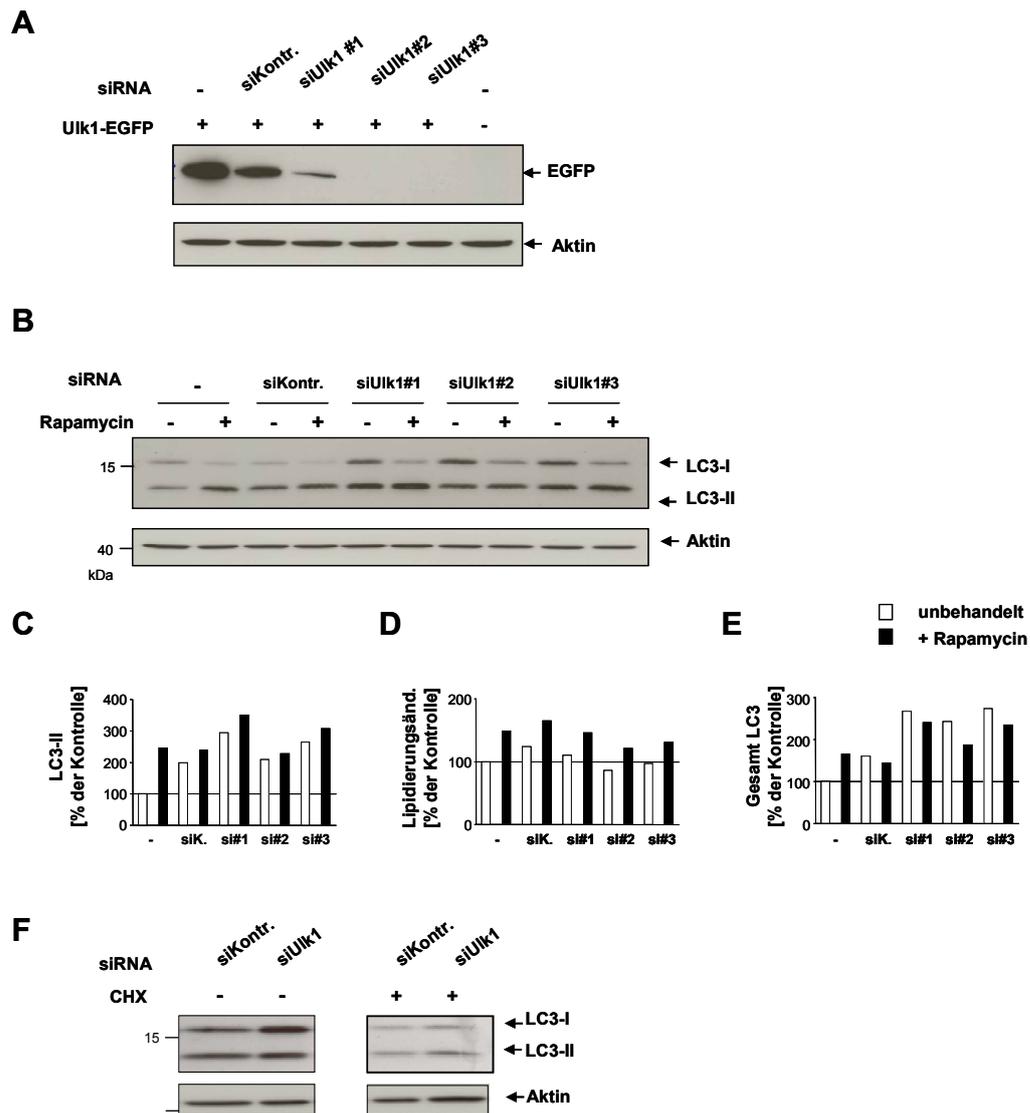


Abbildung 6: Analyse der LC3-Konversion nach Ulk1 Inhibition

A) HeLa Zellen wurden mit 30 nM siRNA Ulk1 #1, #2 oder #3 und 500 ng Ulk1-EGFP kotransfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden Ganzzelllysate hergestellt und durch Western Blot mit anti-EGFP oder anti-Aktin Antikörper analysiert. **B)** HeLa Zellen wurden mit 30 nM siRNA transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion für zwei Stunden mit 40 µg/ml Rapamycin induziert und durch Western Blot mit anti-LC3 Antikörper analysiert. Die Intensität der LC3 Banden sowie der Aktin-Ladekontrolle wurde densitometrisch quantifiziert. Die graphische Darstellung erfolgte entweder als **C)** LC3 Menge = LC3-II/Aktin, **D)** Lipidierungsänderung = LC3-II/(LC3-I+II) oder **E)** LC3-Gesamtproteinmenge = LC3-I+II/Aktin. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils auf 100% gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. **F)** HeLa Zellen wurden in Ab- oder Anwesenheit von 1 µg/ml Cycloheximid (CHX) mit 30 nM siRNA transfiziert. Nach 24 Stunden wurden Lysate hergestellt und durch Western Blot mit anti-LC3 bzw. anti-Aktin Antikörper analysiert.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass nach der transienten Inhibition der Expression von Ulk1, Ulk2 und Ulk3 Autophagie weiterhin pharmakologisch induziert werden konnte. In Ulk1-defizienten Zellen kam es zu einer Erhöhung der zellulären LC3-II Menge und der Neusynthese von LC3-I.

3.1.3 Rolle der Ulk Proteine in der *S. aureus*-vermittelten Autophagie

3.1.3.1 Generierung stabiler Ulk-defizienter Zelllinien

Obwohl durch die Verwendung transient transfizierter siRNAs bei hoher Transfektionseffizienz eine spezifische Inhibition der Ulk Proteine erreicht werden konnte, führte die Transfektion selbst zu einer unspezifischen Erhöhung der basalen Autophagie (siehe Abb. 6B). Zudem zeigten transfizierte HeLa-GFP-LC3 Zellen in fluoreszenzmikroskopischen Analysen bereits basal vermehrt LC3-haltige Aggregate (Daten nicht gezeigt). Um diese unspezifischen Effekte bei der Analyse der *S. aureus* vermittelten Autophagie zu minimieren, wurden stabile *short hairpin* RNA (shRNA) exprimierende Zelllinien generiert. Dazu wurden die zuvor verwendeten Ulk1, Ulk2 und Ulk3 spezifischen siRNA Sequenzen sowie eine *scrambled* (Scr) Kontrollsequenz mit Hilfe von Lentiviren stabil in HeLa und HeLa-GFP-LC3 Zellen transduziert (siehe Kap. 2.2.1.7 und 2.2.3.4+5).

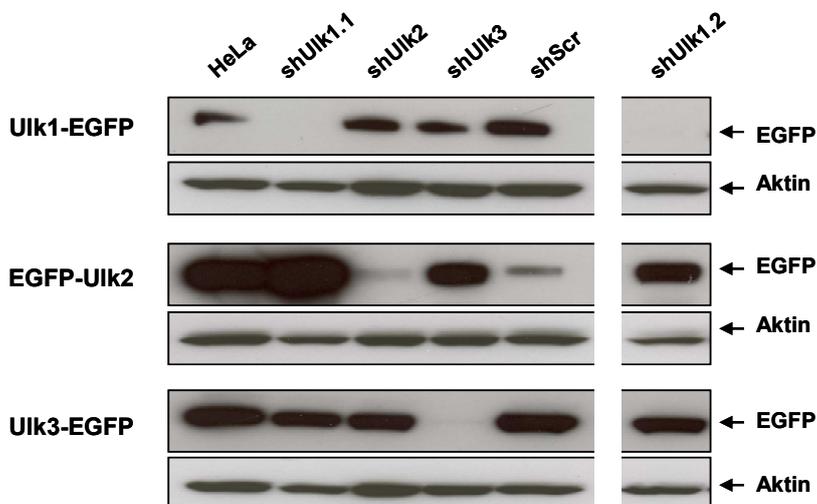


Abbildung 7: Analyse der spezifischen Inhibition der Ulk-Expression in stabilen shRNA exprimierenden Zelllinien

Ulk1, Ulk2, Ulk3 und Scr shRNA-Oligonukleotide wurden über das Gateway-kompatible, lentivirale shRNA-System kloniert. Nach der Produktion von Lentiviren wurden HeLa Zellen transduziert und Einzelklone subkultiviert. Die Zellen wurden mit 500 ng Ulk1-EGFP, 750 ng EGFP-Ulk2 oder 250 ng Ulk3-EGFP Konstrukt transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden Ganzzelllysate hergestellt und durch Western Blot mit anti-EGFP bzw. anti-Aktin Antikörper analysiert.

Durch Transfektion mit den drei Ulk-EGFP Fusionskonstrukten wurde die Spezifität der generierten Zelllinien überprüft. So wurden stabil shRNA

exprimierende Hela Zelllinien ausgewählt, in denen die Expression von Ulk1, Ulk2 und Ulk3 spezifisch unterdrückt wurde. Die shScr exprimierende Zelllinie zeigte keine Beeinträchtigung der Expression von Ulk1- und Ulk3-EGFP. Das Expressionsniveau des EGFP-Ulk2 Konstruktes war jedoch deutlich verringert. Diese unterschiedlichen Transkriptionsniveaus sind Nachteile der transienten Nachweismethode, die hier angewendet werden mußte, da das endogene Protein mangels spezifischen Antikörpers nicht detektiert werden konnte. Um unspezifische Effekte, die auf die Position der genomischen Integration der shRNA Kasette zurückzuführen sind, auszuschließen, wurde zusätzlich ein weiterer Ulk1-spezifischer Klon mit derselben Zielsequenz (shUlk1.2) verwendet (**Abb. 7**).

3.1.3.2 Analyse der LC3-Konversion in stabilen Ulk-defizienten Zelllinien durch *S. aureus* Infektion

Um die Rolle von Ulk1, Ulk2 und Ulk3 bei der *S. aureus*-vermittelten Induktion der Autophagie zu analysieren, wurden die stabil shRNA exprimierenden Zellen mit dem wt-*agr S. aureus* Stamm MW2 infiziert und die LC3-Konversion wurde durch Western Blot analysiert.

Betrachtet man das membranassoziierte LC3-II, so führte die *S. aureus* Infektion bei allen Zelllinien zu einer Erhöhung der LC3-II Menge. In den beiden Ulk1-defizienten Zelllinien waren sowohl die basalen als auch die induzierten Mengen an LC3-II im Vergleich zu den Kontrollzelllinien signifikant erhöht. Sie erreichten bereits basal Werte von 250%, die höher als die Werte der infizierten Proben der übrigen Zelllinien waren. Demnach ist die Menge an autophagosomalen Kompartimenten in Ulk1 defiziente Zellen stark erhöht (**Abb. 8A+B**).

Zusätzlich war in Ulk1-defizienten Zellen der Gehalt an zytoplasmatischem LC3-I deutlich gesteigert, was zu einer signifikanten Erhöhung der LC3-Gesamtproteinmenge führte. Die Berechnung der Lipidierungsänderung zeigte, dass der Anteil an LC3-II im Verhältnis zum gesamten zellulären LC3 bei der parentalen, der Scr- sowie der shUlk2- und shUlk3 Zelllinien nach *S. aureus* Infektion zunahm. Bei den beiden Ulk1-defizienten Linien war die Lipidierungsänderung jedoch aufgrund der hohen LC3 Gesamtmenge reduziert (**Abb. 8C+D**).

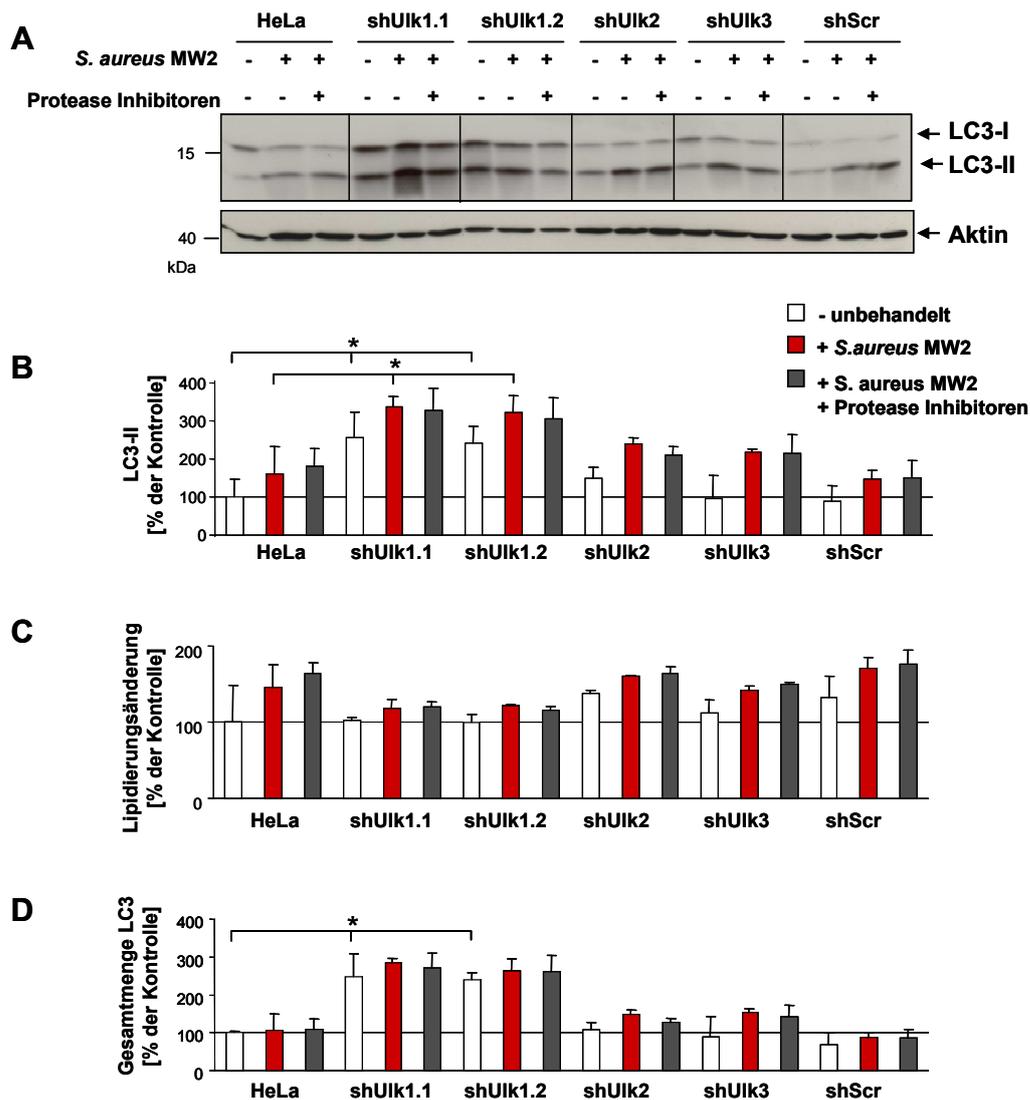


Abbildung 8: LC3-Konversion nach *S. aureus* Infektion in Ulk-defizienten Zellen

A) Stabile HeLa shUlk-Zelllinien wurden entweder nicht behandelt, eine Stunden mit *S. aureus* MW2 (MOI=200) infiziert oder zusätzlich während der Infektion mit Protease Inhibitoren (PI) behandelt. Zwei Stunden nach Beginn der Infektion wurden die Zellen durch Western Blot mit anti-LC3 bzw. anti-Aktin Antikörper analysiert. Die Intensität der LC3 Banden sowie der Aktin-Ladekontrolle wurde densitometrisch quantifiziert. Die graphische Darstellung erfolgte entweder als **B)** LC3 Menge = LC3-II/Aktin, **C)** Lipidierungsänderung = LC3-II/(LC3-I+II) oder **D)** LC3-Gesamtproteinmenge = LC3-I+II/Aktin. Die Werte dreier unabhängiger Experimente wurden gemittelt. Der Mittelwert der unbehandelten Kontrolle der parentalen Zelllinie wurde auf 100% gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. (*: $p < 0,05$)

Da LC3-II in der inneren Autophagosomenmembran nach der Fusion mit dem Lysosom abgebaut wird, wurden in einem weiteren Ansatz Zellen während der Infektion zusätzlich mit Protease Inhibitoren behandelt (Mizushima & Yoshimori, 2007; Tanida et al, 2005). In Zellen, bei denen Autophagosomenreifung und lysosomale Fusion intakt sind, sollte die Abwesenheit von Proteasen zu einer zusätzlichen Anreicherung an lipidiertem LC3 Protein führen. Diese konnte in den

Kontrollzelllinien, der Ulk2- und der Ulk3-defizienten Linie gezeigt werden. In Ulk1 defizienten Zellen dagegen änderte sich die Lipidierung trotz Zugabe von Protease Inhibitoren nicht (**Abb. 8C**).

Demnach resultiert die konstitutive Ulk1-Defizienz in einer Zunahme an autophagosomalen Kompartimenten, deren Maturation bzw. lysosomaler Abbau jedoch beeinträchtigt war.

3.1.3.3 Untersuchung der *S. aureus* Replikation in Ulk-defizienten Zellen

Intrazelluläre wt-*agr* *S. aureus* nutzen das Autophagosom als protektive Nische, um geschützt vor den Abwehrmechanismen der Wirtszelle replizieren zu können (Schnaith et al, 2007). Um zu klären, ob die Bakterien in Ulk-defizienten Zellen ebenfalls effizient replizieren können, wurde die intrazelluläre Bakterienanzahl der shUlk exprimierenden Zellen sechs Stunden nach der Infektion mit dem wt-*agr* Stamm MW2 bestimmt.

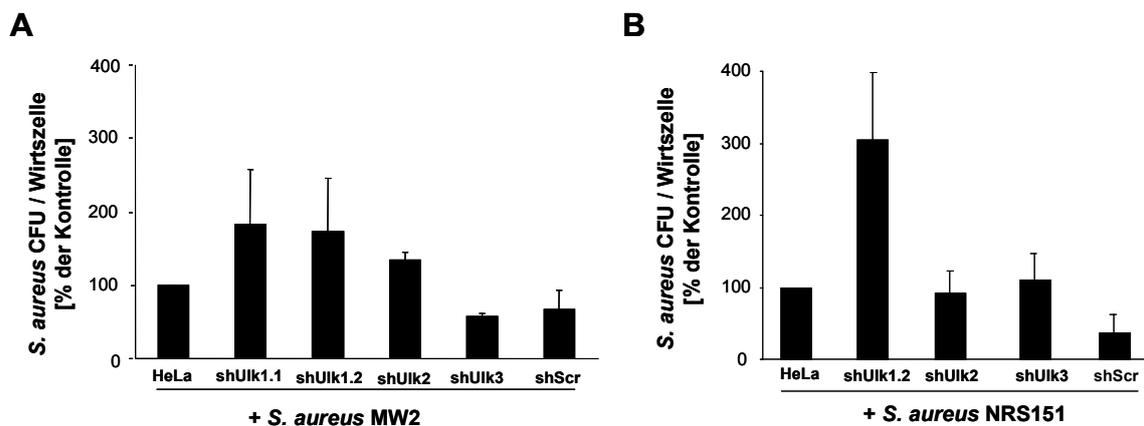


Abbildung 9: Analyse der intrazellulären Bakterienanzahl in Ulk-defizienten Zelllinien

A) Stabile HeLa shUlk-Zelllinien wurden eine Stunde mit dem wt-*agr* Stamm *S. aureus* MW2 (MOI=50) infiziert, extrazelluläre Bakterien wurden mit Lysostaphin abgebaut. Sechs Stunden nach Beginn der Infektion wurden die Zellen lysiert. **B)** Die stabilen HeLa shUlk-Zelllinien wurden eine Stunde mit dem *agr*-defizienten *S. aureus* Stamm NRS151 (MOI=300) infiziert, anschließend mit Lysostaphin behandelt und nach 24 Stunden lysiert. Die Lysate wurden in zwei Verdünnungen auf Kulturplatten ausgestrichen. Gleichzeitig wurde die Vitalität der Wirtszellen bestimmt und die intrazelluläre Bakterienmenge als Anzahl an CFU/Wirtszelle errechnet. Der Wert der HeLa-Kontrollzelllinie wurde auf 100% gesetzt und die übrigen Werte wurden darauf bezogen. Die Proben eines Experimentes wurden jeweils in Duplikaten angesetzt und die Werte zweier unabhängiger Experimente wurden gemittelt.

Die Anzahl an kolonienbildenden Einheiten (*colony forming units*, CFU) pro Wirtszelle war bei den Ulk1-defizienten Zelllinien shUlk1.1 und shUlk1.2 etwa um das Doppelte erhöht. Auch Ulk2 defiziente Linien wiesen eine leicht erhöhte intrazelluläre Bakteriendichte auf (**Abb. 9A**). Bei wt-*agr* *S. aureus*, die bereits

effizient in Autophagosomen replizieren können, führte demnach die Abwesenheit von Ulk1 zu einem leichten Replikationsvorteil.

Um die Auswirkungen der Abwesenheit der Ulk Proteine auf die Replikation des *agr*-defizienten *S. aureus* Stammes NRS151 zu untersuchen, wurden die Zellen 24 Stunden nach der Infektion analysiert. In shUlk1 exprimierenden Zellen wurden mehr als dreimal so viele *S. aureus* CFU pro Wirtszelle als in Kontroll- und shUlk2- bzw. shUlk3 exprimierenden Zelllinien nachgewiesen (**Abb. 9B**). Hier führte die Ulk1-Defizienz zu einem deutlichen Replikationsvorteil.

3.1.3.4 Untersuchung der Wirtszelltoxizität von *S. aureus* in Ulk-defizienten Zellen

Nach der Replikation im Autophagosom gelangen *wt-agr S. aureus* ins Zytoplasma und verursachen dort den Tod der Wirtszelle. Um nachzuweisen, ob die im vorangegangenen Experiment beobachtete, erhöhte Replikation von *wt*- und *agr*-defizienten *S. aureus* Stämmen in Ulk1-defizienten Zellen auch zu einer Änderung der Wirtszellvitalität führt, wurden die shUlk-exprimierenden Zelllinien zunächst mit einer geringen MOI an *wt-agr S. aureus* MW2 infiziert und 24 Stunden nach der Infektion wurde die Vitalität der Zellen bestimmt. Während die *S. aureus* Infektion bei den Kontrollzelllinien sowie bei Ulk2- und Ulk3-defizienten Zelllinien bei etwa 50% der Zellen zum Tod führte, war die Vitalität der beiden Ulk1-defizienten Zelllinien auf 38% reduziert (**Abb. 10A**).

Agr-defiziente Stämme sind nicht zytotoxisch. Induziert man Autophagie jedoch pharmakologisch durch Rapamycin, so können auch sie ihre Wirtszellen töten (Schnaith et al, 2007). Um die Auswirkungen der Ulk-Defizienzen auf die Zytotoxizität *agr*-defizienter *S. aureus* Stämme zu überprüfen, wurden die shUlk exprimierenden Zelllinien mit dem *agr*-defizienten Bakterienstamm NRS151 infiziert. Kontrollzelllinien, shUlk2 und shUlk3 Zelllinien zeigten mit 80% bis 86% eine zur unbehandelten Kontrolle vergleichbare Vitalität, während bei der Ulk1-defizienten Zelllinie shUlk1.2 nur 60% der Zellen überlebten. Diese signifikante Steigerung der Toxizität entsprach in etwa dem Ausmaß, in dem in den übrigen Zelllinien durch die Autophagieinduktion mit Rapamycin die Zytotoxizität erhöht werden konnte. Die Stimulation von Ulk1-defizienten Zellen mit Rapamycin führte zu einer zusätzlichen leichten Reduktion der Wirtszellvitalität (**Abb. 10B**).

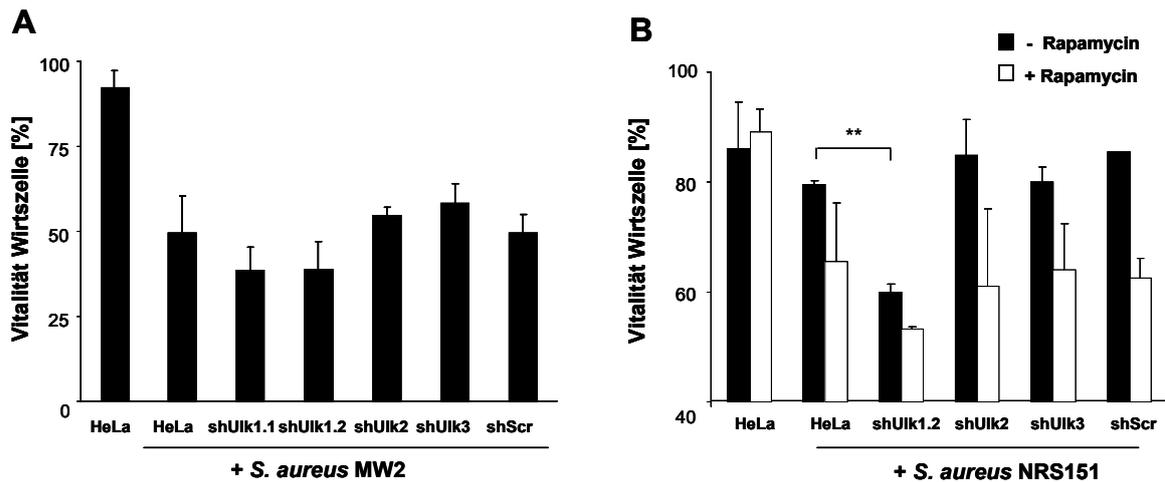


Abbildung 10: Analyse der Wirtszellvitalität Ulk-defizienter Zelllinien nach *S. aureus* Infektion

A) Stabile HeLa shUlk-Zelllinien wurden für eine Stunde mit dem wt-*agr* Stamm *S. aureus* MW2 (MOI=50) infiziert. Extrazelluläre Bakterien wurden mit Lysostaphin abgebaut. **B)** Stabile HeLa shUlk-Zelllinien wurden für eine Stunde mit dem *agr*-defizienten *S. aureus* Stamm NRS151 (MOI=300) infiziert und anschließend mit Lysostaphin behandelt (schwarze Balken). Zusätzlich wurden Zellen von Beginn der Infektion an für vier Stunden mit 80 µg/ml Rapamycin inkubiert (weiße Balken).

Jeweils 24 Stunden nach der Infektion wurde der prozentuale Anteil an überlebenden Wirtszellen durch Trypan-Blau Färbung ermittelt. Die Proben eines Experimentes wurden jeweils in Duplikaten angesetzt und die Werte zweier unabhängiger Experimente wurden gemittelt. (**: $p < 0,01$)

3.1.3.5 Analyse der Kolokalisation von *agr*-defizienten *S. aureus* mit autophagosomalem und lysosomalem Marker

Agr-defiziente Bakterien zeigen in Ulk1-defizienten Zellen eine deutlich erhöhte Replikation und Zytotoxizität. In weiteren Experimenten sollte analysiert werden, ob der *agr*⁻ *S. aureus* Stamm NRS151 in Ulk1-defizienten Stämmen Veränderungen in der Kolokalisation mit autophagosomalen oder lysosomalen Markern aufweist.

Zur Analyse der Kolokalisation von *S. aureus* NRS151 mit überexprimierten GFP-LC3 wurde die parentale, die shScr- und die shUlk1-exprimierende HeLa-GFP-LC3 Linie mit *S. aureus* NRS151 infiziert. Während bei den beiden Kontrollzelllinien 30% bzw. 33% der Bakterien mit LC3 kolokalisierten, war der prozentuale Anteil an Bakterien, die eine Kolokalisation mit dem autophagosomalen Markerprotein aufwiesen in HeLa-LC3 shUlk1 Zellen um das 1,5-fache erhöht (**Abb. 11A**).

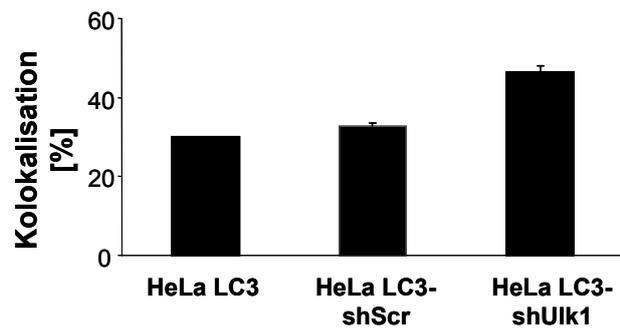
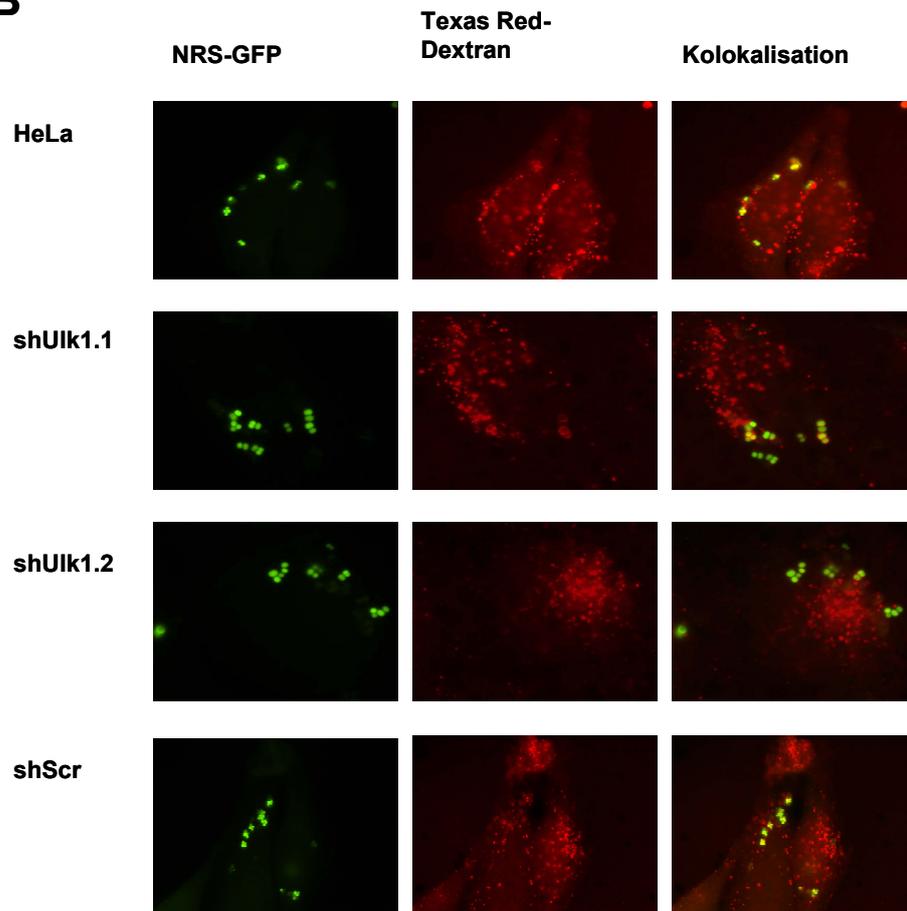
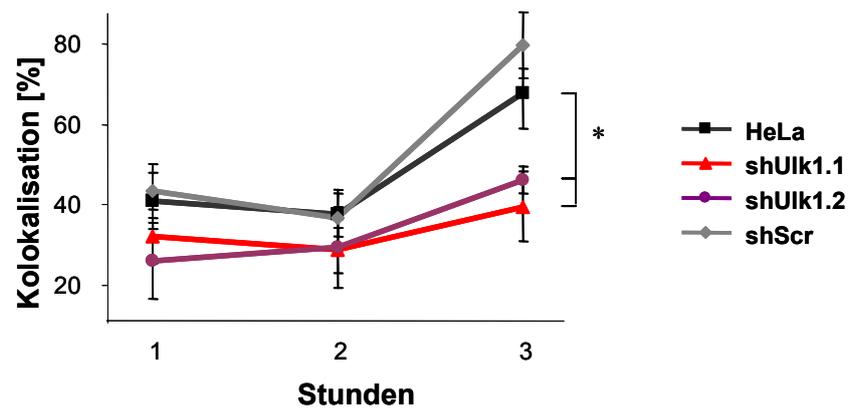
A**B****C**

Abbildung 11: Analyse der Kolokalisation von *S. aureus* mit autophagosomalem und lysosomalem Marker

A) Stabile HeLa-GFP-LC3-Zelllinien wurden eine Stunde mit dem *agr*⁻ Stamm *S. aureus* NRS151 (MOI=20) infiziert. Extrazelluläre Bakterien wurden mit Lysostaphin abgebaut. 3 Stunden nach Beginn der Infektion wurden die Zellen fixiert und mit anti-Protein A Primär- und AlexaFluor-konjugiertem Sekundäntikörper gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Je Probe wurden etwa 100 Bakterien analysiert und die prozentuale Kolokalisation mit LC3 wurde graphisch dargestellt. Die Werte zweier Experimente wurden gemittelt. **B)** Stabile shUlk HeLa Zelllinien wurden über Nacht mit TexasRed-konjugierten 3 kDa Dextranen inkubiert (*Pulse*) und drei Stunden vor Beginn der Infektion mit NRS151-GFP (MOI=20) mit frischem Medium versetzt (*Chase*). Ein, zwei oder drei Stunden nach der Infektion wurden die Zellen fixiert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. **C)** Anhand von randomisierten Aufnahmen wurde die prozentuale Kolokalisation von Bakterien und *Fluid Phase* Markern berechnet und die Werte der einzelnen Aufnahmen wurden gemittelt. Je Probe wurden etwa 100 Bakterien ausgezählt. (*: $p < 0,05$)

Um zu überprüfen, ob die autophagosomalen Kompartimente, mit denen die *agr*-defizienten Bakterien kolokalisieren, in der Lage sind, mit Lysosomen zu fusionieren, wurde TexasRed-konjugiertes Dextran als *Fluid Phase* Marker verwendet. Dieses gelangt in den lysosomalen Abbauweg, wird aber nicht durch lysosomale Proteasen abgebaut und kann daher als lysosomaler Marker verwendet werden. Die Kolokalisation von Bakterien und Dextranen wurde fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

In den beiden Ulk1-defizienten Zelllinien zeigten zu allen analysierten Zeitpunkten weniger Bakterien eine Kolokalisation mit dem lysosomalen Marker als die beiden Kontrollzelllinien. Während die Unterschiede zwischen Kontroll- und Ulk1-defizienten Zellen ein und zwei Stunden nach Beginn der Infektion bei weniger als 10% lagen, lokalisieren nach drei Stunden mit maximal 50% in Ulk1-defizienten Zellen 1,5-fach weniger Bakterien mit dem lysosomalen Marker (**Abb. 11B+C**).

Demnach ist in Ulk1-defizienten Zellen die Kolokalisation *agr*-defizienter *S. aureus* mit dem autophagosomalen Marker erhöht und mit lysosomalem Marker statistisch signifikant verringert. Das könnte der Grund für die erhöhte Replikation und Wirtszelltoxizität der Bakterien sein.

3.1.4 Rolle der Ulk Proteine in der Rapamycin-induzierten Autophagie

In Ulk1-defizienten Zellen führte die Infektion mit wt-*agr S. aureus* MW2 zu einer erhöhten Bildung autophagosomaler Kompartimente und einer Beeinträchtigung der Maturation bzw. des lysosomalen Abbaus dieser Kompartimente.

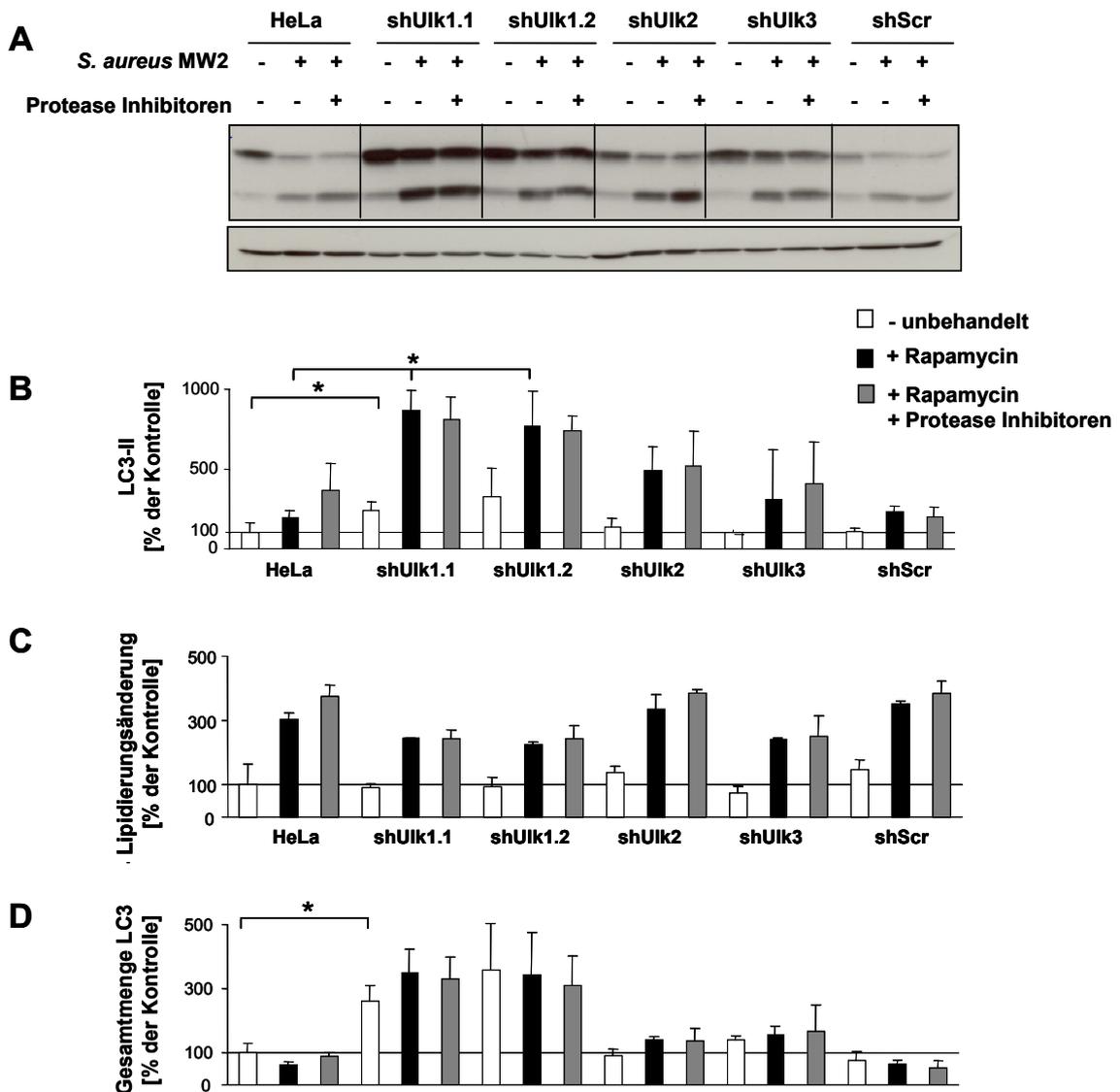


Abbildung 12: LC3-Konversion nach Autophagieinduktion durch Rapamycin in Ulk-defizienten Zellen

A) Stabile HeLa shUlk-Zelllinien wurden entweder nicht behandelt, zwei Stunden mit 40 $\mu\text{g/ml}$ Rapamycin inkubiert oder zusätzlich zur Rapamycinbehandlung mit Protease Inhibitoren behandelt und durch Western Blot mit anti-LC3 bzw. anti-Aktin Antikörper analysiert. Die Intensität der LC3- sowie der Aktin-Banden wurde densitometrisch quantifiziert. Die graphische Darstellung erfolgte entweder als **B)** LC3 Menge = LC3-II/Aktin, **C)** Lipidierungsänderung = LC3-II/(LC3-I+II) oder **D)** LC3-Gesamtproteinmenge = LC3-I+II/Aktin. Drei unabhängige Experimente wurden gemittelt. Der Wert der unbehandelten Kontrolle der parentalen Zelllinie wurde auf 100% gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. (*: $p < 0,05$)

Um zu überprüfen, ob die Ulk Proteine die gleiche Funktion in der *S. aureus*- und in der Rapamycin-induzierten Autophagie haben, wurden shUlk1, shUlk2 und shUlk3-exprimierende HeLa Zelllinien und Kontrollzelllinien entweder nicht behandelt, zwei Stunden mit Rapamycin inkubiert oder zusätzlich mit Protease Inhibitoren behandelt. Die LC3-Expression und Konversion der Proben wurde durch Western Blot analysiert.

Die Autophagieinduktion durch Rapamycin führte bei allen Zelllinien zu einer Erhöhung der LC3-II Menge. Dabei waren die LC3-II Level in den Ulk1-defizienten Linien sowohl basal als auch in den infizierten Proben höher als die der übrigen Linien. Im Vergleich zur *S. aureus* Infektion (siehe Abb. 8) konnte die LC3-II Menge durch Rapamycinbehandlung noch stärker gesteigert werden (**Abb. 12A+B**).

Auch hier war die Menge an LC3-I in den Ulk1-defizienten Zellen deutlich gesteigert. Die Inhibition von lysosomalen Proteasen führte in Ulk1-defizienten Zellen zu keiner zusätzlichen Erhöhung der LC3-Lipidierung, ein Hinweis darauf, dass auch hier die Maturation bzw. der lysosomale Abbau beeinträchtigt war (**Abb. 12 C+D**).

Die Veränderung der zellulären Lokalisation des LC3-Proteins durch die Behandlung mit Rapamycin wurde in stabilen Ulk-defizienten HeLa-GFP-LC3 Zellen analysiert. Die Anzahl an Autophagosomen wurde als LC3-Punkta pro Zelle quantifiziert. Dabei konnte in den Kontrollzellen sowie in den Ulk2- bzw. Ulk3-defizienten Zellen basal eine gleichmäßige zytoplasmatische LC3-I Expression beobachtet werden. Die Autophagiestimulation durch Rapamycin führte bei diesen Zelllinien zur Bildung von LC3-II dekorierten Autophagosomen und zu einer bis zu fünffachen Steigerung der Punkta pro Zelle. In Ulk1-defizienten Zellen war bereits basal die Anzahl an autophagosomalen Kompartimenten mit 270% der unbehandelten HeLa-LC3-Kontrolle deutlich erhöht. Durch Rapamycinbehandlung konnte in shUlk1 exprimierenden Zellen keine weitere Erhöhung der Anzahl an Autophagosomen erreicht werden (**Abb. 13A+B**).

Diese Daten untermauern, dass die Defizienz von Ulk1 zu einer Erhöhung der basalen Anzahl autophagosomaler Kompartimente führt.

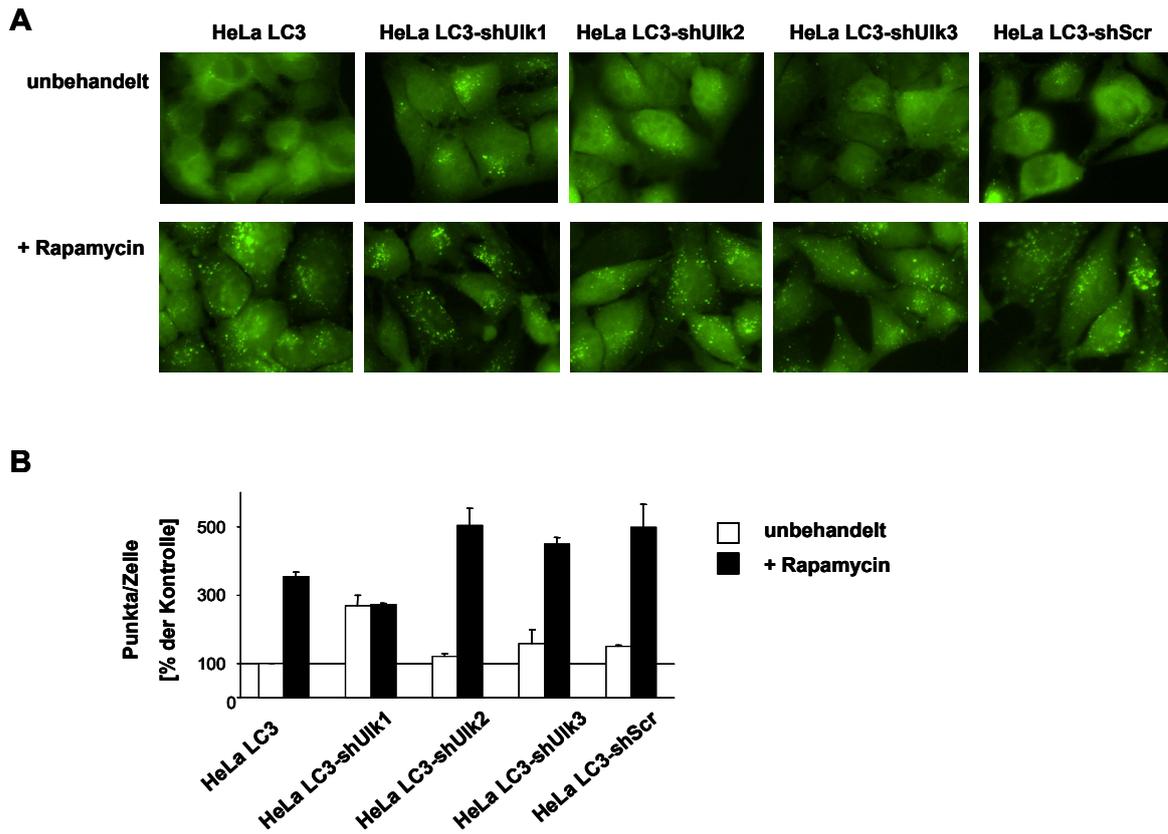


Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Autophagosomenbildung durch Rapamycin

Stabile Ulk-defiziente HeLa-GFP-LC3 Zellen wurden für zwei Stunden mit 80 µg/ml Rapamycin inkubiert und anschließend fixiert. **A)** Von jeder Probe wurden exemplarische Aufnahmen abgebildet. **B)** Die Anzahl an Autophagosomen wurde als LC3-Punkta/Zelle quantifiziert. Ca. 100 Zellen jedes Ansatzes wurden gezählt. Die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente wurden gemittelt. (Vergrößerung: 600-fach)

3.2 Konstruktion und Selektion einer intrazellulären scFv-Antikörper Bibliothek zur Inhibition intrazellulärer Pathogene

Wie im ersten Teil dieser Arbeit dargestellt ermöglicht der zelluläre Prozess der Autophagie dem Humanpathogen *Staphylococcus aureus* das Überleben und die Replikation in nicht-professionellen Phagozyten. Mit dem Ziel, Mechanismen der komplexen Interaktion zwischen Wirtszelle und Pathogen während der *Staphylococcus aureus* Infektion zu identifizieren, sollte im zweiten Teil der vorliegenden Doktorarbeit eine Bibliothek aus intrazellulär exprimierten, rekombinanten Antikörperfragmenten konstruiert werden.

Die für diesen Zweck zur Anwendung kommenden *single chain variable fragments* (scFvs) bestehen nur aus den variablen Regionen einer leichten und schweren Antikörperkette (V_H und V_L), die durch einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind. Während der Infektion mit einem intrazellulären Pathogen sind scFvs aufgrund ihrer Bindungseigenschaften theoretisch dazu in der Lage, einerseits pathogene Proteine zu binden und zu neutralisieren oder andererseits mit Proteinen der Wirtszelle zu interagieren, die zur Etablierung der Infektion notwendig sind und dadurch zellautonome Abwehrmechanismen zu restaurieren.

Voraussetzung für die Selektion solcher scFvs ist die Klonierung einer Bibliothek von intrazellulären scFvs, die (i) eine ausreichende Größe und Diversität aufweist, um theoretisch jedes pathogene und zelluläre Antigen binden zu können und (ii) konstitutiv und löslich in Zielzellen exprimiert wird. Schließlich sollte ein geeignetes Selektionssystem gewährleisten, dass (iii) jene Zellen die einen inhibitorischen scFv exprimieren, auch isoliert werden können.

3.2.1 Generierung und Analyse der intrazellulären scFv Bibliothek

3.2.1.1 Klonierung der scFv-Bibliotheken

Zur Konstruktion dieser intrazellulären scFv Bibliothek wurde die „Human Single Fold scFv Library I+J (Tomlinson I+J)“ Bibliothek verwendet (MRC HGMP Resource Center, Cambridge, UK). Bibliothek I und J weisen zusammen eine Größe von ca. $2,8 \times 10^8$ verschiedenen scFv-Fragmenten auf.

Um eine konstitutive Expression der scFv-Fragmente in Zielzellen zu gewährleisten, wurden die scFv-Gene der Ausgangsbibliothek in drei Klonierungsschritten carboxyterminal mit EGFP fusioniert und in eine lentivirale Bibliothek umkloniert (Kap. 2.1.16). Die scFv-EGFP Kassetten dieser Bibliothek konnten durch Transduktion stabil in das Genom von Zielzellen eingebracht werden (Naldini, 1999).

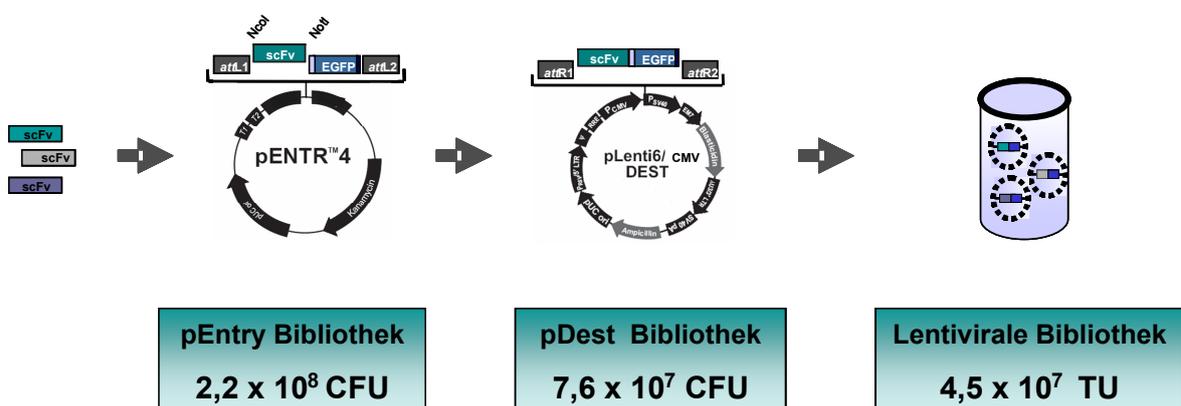


Abbildung 14: Klonierung der lentiviralen scFv-EGFP Bibliothek

Die scFvs der Tomlinson Bibliothek I+J wurden isoliert und in den pEntry-EGFP Vektor ligiert. Die scFvs der pEntry-scFv Bibliothek wurden durch Rekombination in den pLenti6/CMV/DEST Vektor transferiert. Aus der pDest-scFv Bibliothek wurde in einer Produzentenzelllinie die lentivirale Bibliothek generiert. Die Anzahl an Klonen bzw. Lentiviren wurde nach jedem Klonierungsschritt durch Titrationsexperimente ermittelt und als CFU (*colony forming units*) oder TU (*transducing units*) dargestellt.

Um die Diversität und Größe der Bibliothek zu maximieren, wurde jeder Klonierungsschritt optimiert (siehe Anhang).

Die Größe der Tomlinson Ausgangsbibliothek ($2,8 \times 10^8$ CFU) konnte bei der Klonierung der pEntry Bibliothek mit einer Größe von $2,2 \times 10^8$ CFU weitgehend erhalten werden. Die pDest Bibliothek repräsentiert mit $7,6 \times 10^7$ CFU mehr als ein Drittel der Ausgangsklone. Daraus konnten in drei Ansätzen insgesamt $4,5 \times 10^7$

transduzierende Einheiten (*transducing units*, TUs) der lentiviralen Bibliothek generiert werden (**Abb. 14**).

3.2.1.2 Qualitätskontrolle der scFv-Bibliothek

Da die Tomlinson scFv Primärbibliothek vor Beginn der Klonierung in einem Amplifikationsschritt expandiert wurde, wurde anhand von Qualitätskontrollen gezeigt, dass die so entstandenen Aliquots der Sekundärbibliothek über die ursprüngliche Diversität verfügen (siehe Anhang).

Um zu überprüfen, ob die Diversität der Bibliotheken während der ersten beiden Klonierungsschritte beibehalten werden konnte, wurden 42 randomisierte Klone der pDest scFv Bibliothek durch DNA-Sequenzierung überprüft. Alle 42 scFvs zeigten individuelle Sequenzen in den variablen Regionen der CDR2 und CDR3 der schweren und leichten Kette. 47% der Klone konnten aufgrund ihrer charakteristischen Aminosäuren der Tomlinson Bibliothek I und 53% der Bibliothek J zugeordnet werden. Somit konnte das Verhältnis 1:1 zwischen Bibliothek I und J, das ursprünglich eingesetzt wurde, während der Klonierungsschritte beibehalten werden (**Abb. 15A**).

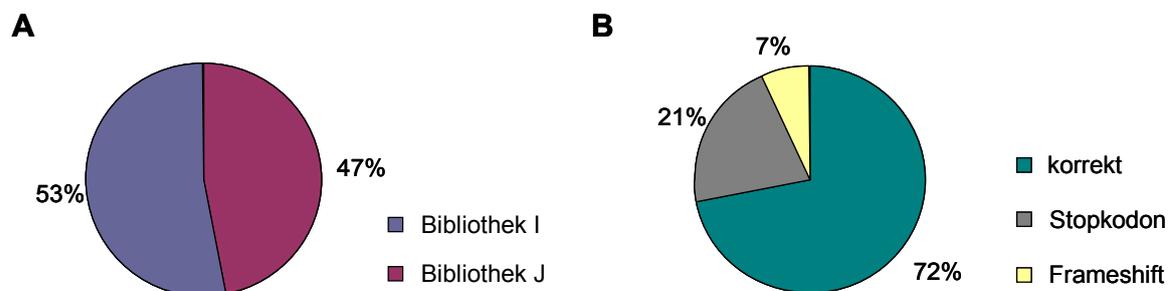


Abbildung 15: Qualitätskontrolle der pDEST-scFv Bibliothek

Von den Titrationsplatten der pDest-scFv Bibliothek wurden 42 Kolonien kultiviert. Die Plasmid DNA wurde isoliert und sequenziert (Anhang). **A)** Der prozentuale Anteil an Klonen der Bibliothek I und J wurde durch Vergleich der randomisierten Aminosäuren in den CDRs ermittelt. **B)** Der Anteil an korrekten und mutierten scFvs wurde ebenfalls durch Sequenzvergleich bestimmt.

72% der analysierten Klone wiesen eine vollständige, korrekte scFv-Sequenz auf, bei 7% der Klone wurden Frameshiftmutationen detektiert. Das Auftreten eines Stopkodons bei 21% der Klone ist darauf zurückzuführen, dass die Nukleotide, die die variablen Aminosäuren von Bibliothek J kodieren, eine hohe Diversität

aufweisen und so mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 33% das Amber Stopkodon zulassen (de Wildt et al, 2000).

Nach dieser Analyse sind knapp dreiviertel aller Klone potentiell bindungsfähig, was der Qualität der ursprünglichen Tomlinson Bibliothek entsprach (**Abb. 15B**).

3.2.2 Analyse der intrazellulären Expression der scFv Bibliothek

Da sich die intramolekularen Disulfidbrücken des scFvs im reduzierenden Milieu des Zytoplasmas nicht ausbilden können, ist die intrazelluläre Löslichkeit ein Hauptproblem der *Intrabody*-Expression. Die verwendete Tomlinson scFv Bibliothek basiert auf den humanen Frameworks V_H3 für die schwere und V_K1 für die leichte Kette (Holt et al, 2000), dass sich in nur vier Aminosäuren von einer Konsensus-Sequenz für intrazellulär stabile scFvs unterscheidet (Tanaka & Rabbitts, 2003; Tse et al, 2002; Visintin et al, 2002).

Die intrazelluläre Expression der scFv-EGFP Fusionskonstrukte der generierten Bibliothek wurde in HEK293 Zellen analysiert. Dabei wurde einerseits das Expressionsniveau der scFv-EGFP Bibliothek unter der Kontrolle des CMV (*Cytomegalievirus*) Promoters mit dem des schwächeren UbC (Ubiquitin C) Promoters verglichen. Zusätzlich wurde überprüft, ob die Expressionseigenschaften der scFv-EGFPs nach lentiviraler Transduktion und genomischer Integration der scFv-EGFP-Kassette gegenüber der transienten Transfektion von pDest-Konstrukten verbessert waren. Dazu wurden neben der klonierten pDest CMV-scFv-EGFP Bibliothek noch eine kleinere pDest UbC-scFv-Bibliothek und ein pDest CMV-EGFP Kontrollkonstrukt hergestellt, von denen ebenfalls lentivirale Partikel generiert wurden. Die lösliche und unlösliche zelluläre Fraktion der Zellen wurde durch Western Blot mit EGFP-spezifischem Antikörper analysiert.

Nach transienter Transfektion zeigte das CMV-scFv-EGFP Konstrukt im Vergleich zur Expression unter Kontrolle des UbC Promoters eine stärkere Expression. Neben der scFv-EGFP spezifischen Bande bei ca. 55 kDa wurden mehrere kleinere Banden detektiert, bei denen es sich vermutlich um Abbauprodukte handelte. Ein Großteil des Proteins befand sich nach dem Zellaufschluss in der unlöslichen zellulären Fraktion. Betrachtet man dagegen die Expression der stabil ins Genom integrierten scFv-EGFP bzw. EGFP-Konstrukte, so konnte die Proteinexpression nur bei den beiden CMV-Konstrukten nachgewiesen werden. Das scFv-EGFP Protein befand sich fast vollständig in der löslichen zellulären Fraktion und es wurden keine Abbauprodukte detektiert (**Abb. 16A**).

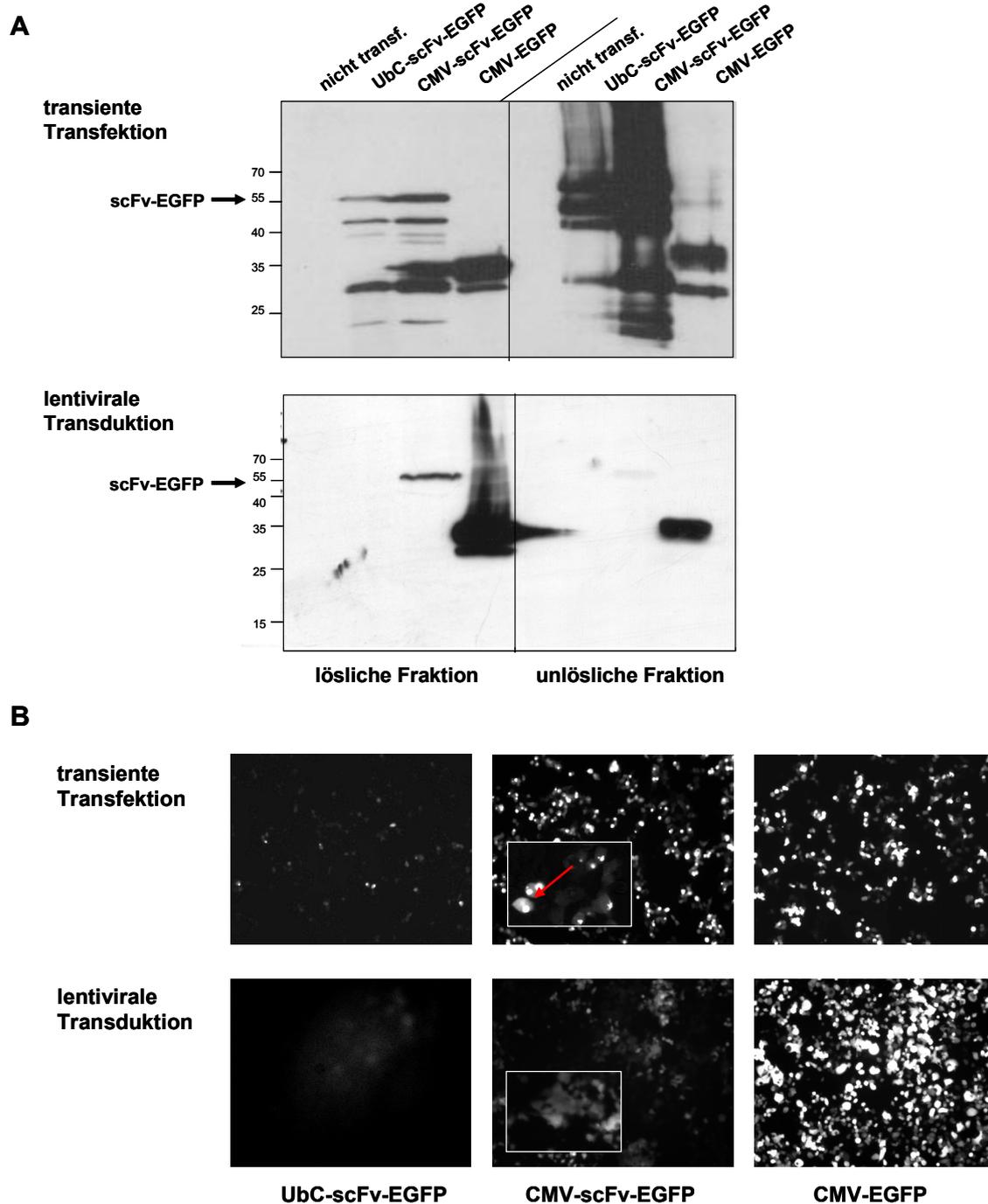


Abbildung 16: Expressionsanalyse der scFv-EGFP Bibliothek

HEK293 Zellen wurden entweder mit den pDEST-Konstrukten UbC-scFv-EGFP, CMV-scFv-EGFP oder CMV-EGFP transient transfiziert und nach 48 Stunden wurden die Zellen analysiert, oder aus diesen Konstrukten wurden Lentiviren zur stabilen Transduktion von HEK293 Zellen generiert. 10 Tage nach der Transduktion wurden die Zellen analysiert. **A)** Je 1×10^6 Zellen wurden in Extraktionspuffer lysiert und die löslichen und unlöslichen zellulären Fraktionen wurden durch Western Blot mit anti-EGFP Antikörper analysiert. **B)** Die EGFP-Expression der Proben wurde fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Vergrößerung: 100-fach).

Ergänzend dazu zeigte auch die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellen, dass die Expression der scFv-EGFP Proteine aller Konstrukte nach der transienten Transfektion stärker war. Betrachtet man das CMV-scFv-EGFP Konstrukt, so konnte man jedoch innerhalb der Zellen Regionen mit erhöhter Fluoreszenzintensität nachweisen, bei denen es sich möglicherweise um Proteinaggregate handelte. Nach lentiviraler Transduktion zeigten die Zellen eine schwächere, aber über das gesamte Zytoplasma der Zellen verteilte scFv-EGFP Expression (**Abb. 16B**).

Die für die Klonierung der Bibliothek verwendete Kombination aus stärkerem CMV-Promoter und lentiviraler Transduktion führte demnach zu einer stabilen und löslichen Expression des scFv-EGFP Proteins.

3.2.3 Selektion der Bibliothek durch *S. aureus* Infektion

Um zu überprüfen, ob es möglich ist, aus Zellen, die die scFvs der generierten Bibliothek stabil exprimieren, jene zu selektionieren, denen die Expression des scFvs eine erhöhte Resistenz gegenüber einer *S. aureus* Infektion ermöglicht, wurde die *in vitro Staphylococcus aureus* Infektion von HeLa Zellen als Selektionssystem angewendet. Infiziert man HeLa Zellen mit dem stark zytotoxischen *S. aureus* Stamm MW2, so sterben ca. 90% der infizierten Zellen. Diese Zellen sollten durch weitere *S. aureus* MW2 Infektionen selektioniert werden.

3.2.3.1 Selektion und Auswahl der Klone

Für die Selektion wurden HeLa Zellen in einer MOI von 0,5 mit 5×10^6 TU der Lentiviralen scFv Bibliothek transduziert und mit *S. aureus* MW2 infiziert. Überlebende Zellen wurden kultiviert und reinfiziert. Die Infektion wurde fünf Mal wiederholt (siehe Kap. 2.2.3.6).

Nach der ersten Infektion wurden keine Unterschiede zwischen den scFv-EGFP exprimierenden Zellen der intrazellulären Bibliothek und Zellen, die das EGFP-Kontrollkonstrukt exprimierten, beobachtet. Eine weitere Infektion und anschließende Selektion überlebten jedoch nur Zellen der Bibliothek. Nach der vierten *S. aureus* Infektion wurden überlebende Zellen durch *Limited Dilution* vereinzelt und in einer fünften Selektionsrunde mit *S. aureus* MW2 infiziert.

24 Stunden nach der Infektion wurde die Vitalität dieser Zellklone durch Trypan-Blaufärbung bestimmt und die Expression der scFv-EGFP-Fusionsproteine wurde durch Western Blot mit EGFP-spezifischem Antikörper analysiert. Im Vergleich zur parentalen HeLa Zelllinie, bei der 13,1% der Zellen die Infektion überlebten, wiesen alle selektionierten Einzelklone, mit Ausnahme von 3.6 und 4.1, eine erhöhte Vitalität von bis zu 65% auf (**Abb. 17A**). Zur weiteren Analyse wurden die Zellklone 1.6 und 2.5 ausgewählt, die sowohl eine hohe Vitalität als auch eine starke scFv-EGFP Expression aufwiesen (**Abb. 17B**).

Infizierte man Zellen dieser ausgewählten Klone erneut mit *S. aureus* und bestimmte die Vitalität 24 Stunden nach der Infektion, so konnte der *S. aureus*-resistente Effekt reproduziert werden. Im Vergleich zur parentalen HeLa-Zelllinie

überlebten 3,7- bzw. 3,3-mal mehr Zellen der scFv-exprimierenden Zelllinien 1.6 und 2.5 die Infektion (**Abb 17C**).

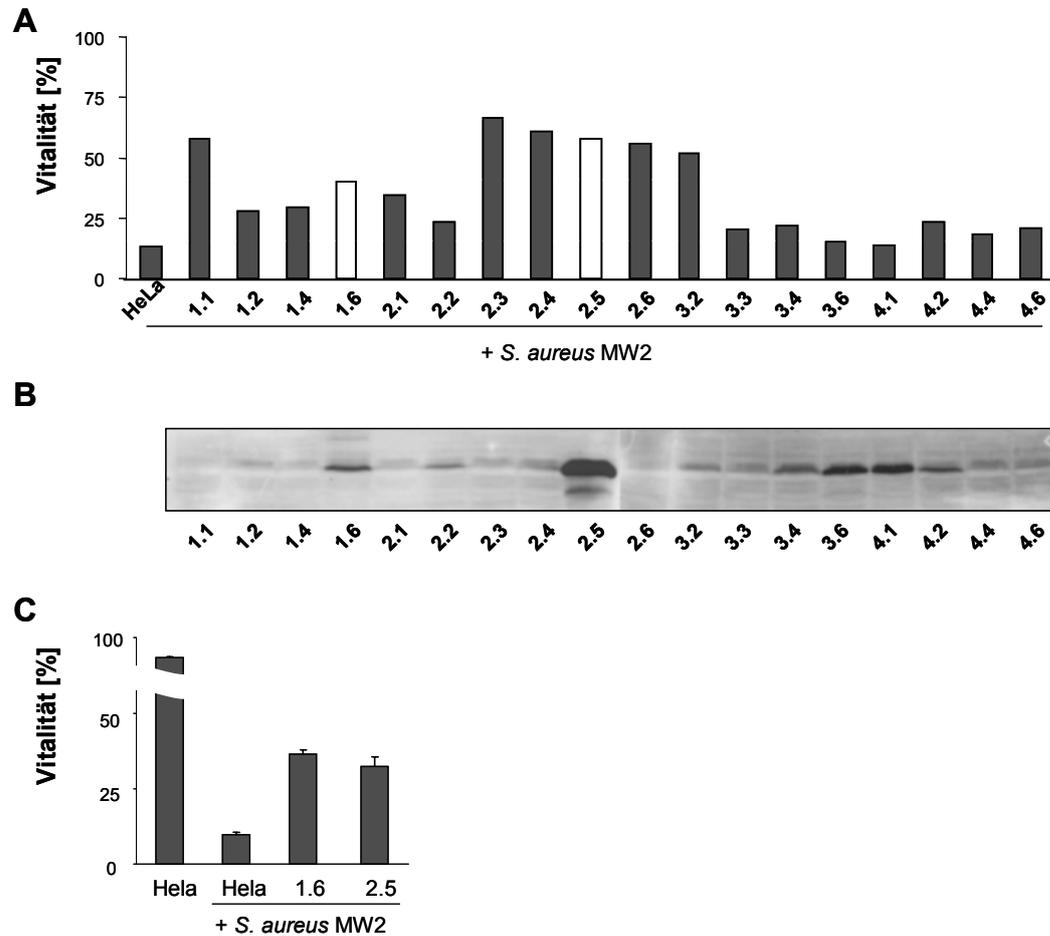


Abbildung 17: Vitalität und scFv Expression der überlebenden Zellklone nach der 5. *S. aureus* Infektion

ScFv-EGFP transduzierte HeLa Zellen wurden nach vier Infektionen mit *S. aureus* (MOI=200) vereinzelt. **A)** Nach der fünften Infektion wurde die Vitalität der Zellklone durch Trypan Blaufärbung bestimmt und als prozentualer Anteil an lebenden Zellen dargestellt. Weiß markierte Zellklone wurden weiter analysiert. **B)** Von den Zellklonen wurden jeweils $2,5 \times 10^5$ Zellen lysiert und durch Western Blot mit anti-EGFP Antikörper analysiert. **C)** Zellen der selektierten Klone 1.6 und 2.5 wurden mit *S. aureus* MW2 infiziert und die Vitalität wurde nach 24 Stunden bestimmt. Die Werte zweier unabhängiger Experimente wurden gemittelt.

3.2.3.2 Evaluierung der scFv-vermittelten *S. aureus* Resistenz

Um zu evaluieren, ob die erhöhte Vitalität der selektierten Klone 1.6 und 2.5 nach *S. aureus* Infektion auf die Expression der scFv-Fragmente zurückzuführen ist, wurden die scFv-Gene dieser Zelllinien erneut in Hela Zellen kloniert. Ist der *S. aureus* protektive Effekt scFv-abhängig, so sollten auch diese Zelllinien höhere Überlebensraten nach der Infektion zeigen.

Dazu wurden die scFv-Gene mittels PCR aus der genomischen DNA amplifiziert. Die DNA-Sequenzierung dieser PCR-Fragmente ergab, dass im Genom der beiden Zelllinien jeweils mehr als ein scFv inseriert hatte. In der Zelllinie 1.6 konnten zwei und in der Zelllinie 2.5 vier verschiedene scFv-Sequenzen nachgewiesen werden (siehe Anhang).

Zur ‚Reklonierung‘ wurden die scFv-Pools erneut in Lentiviren verpackt. Um sicherzustellen, dass nur ein scFv pro Zelle integrierte, wurde bei der Transduktion eine MOI von 0,05 verwendet. Transduzierte Zellen wurden durch *Limited Dilution* vereinzelt und Zellklone, bei denen die scFv-EGFP Expression mikroskopisch nachgewiesen werden konnte, wurden subkultiviert.

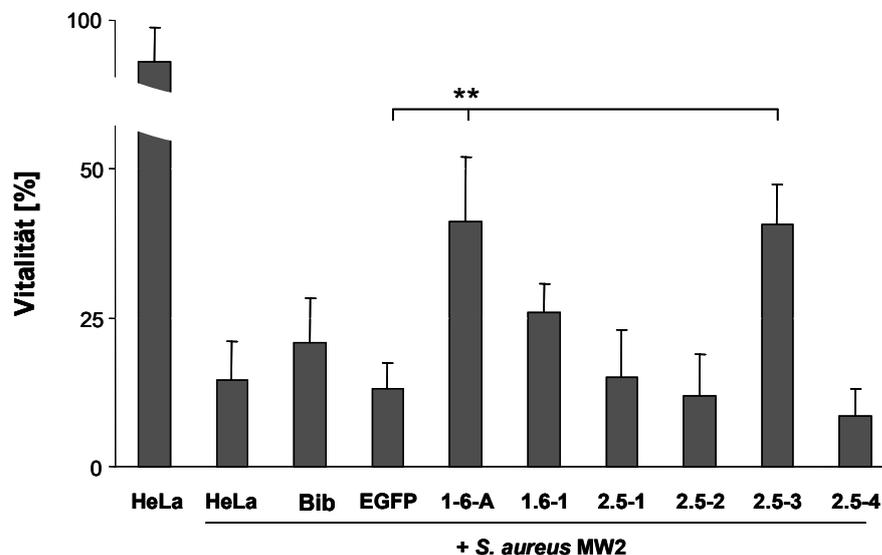


Abbildung 18: Vitalität der ‚reklonierten‘ Zelllinien nach *S. aureus* Infektion

Die scFvs der selektierten Zelllinien 1.6 und 2.5 wurden isoliert und durch Gatewayklonierung und lentivirale Transduktion stabil in Hela Zellen rekloniert. 24 Stunden nach der *S. aureus* MW2 Infektion (MOI=200) wurde die Vitalität der Zelllinien durch Trypan-Blaufärbung bestimmt und als prozentualer Anteil an lebenden Zellen dargestellt. Die Proben eines Experimentes wurden jeweils in Duplikaten angesetzt und die Werte zweier unabhängiger Experimente wurden gemittelt. (*Bib*: Zellen, die mit dem gesamten Pool an scFvs der lentiviralen Bibliothek transduziert wurden, *EGFP*: Zellen, die ein EGFP Kontrollkonstrukt exprimieren. (**: $p < 0,01$))

Durch DNA-Sequenzierung konnte die Klonalität der sechs Zelllinien nachgewiesen werden. Während die Klone 1.6-A und 1.6-1 unterschiedliche scFv-Sequenzen aufwiesen, exprimierten die Klone 2.5-1 bis -4 jeweils den gleichen scFv (siehe Anhang).

Zellen der sechs ‚reklonierten‘ scFv-exprimierenden Zelllinien wurden zusammen mit Kontrollzelllinien mit *S. aureus* MW2 infiziert und die Vitalität wurde 24 Stunden nach der Infektion ermittelt. Im Vergleich zur parentalen Zelllinie oder einer EGFP exprimierenden Kontrolle, bei denen durchschnittlich 14,5% der Zellen die Infektion überlebten, zeigten Zellen, die den gesamten Pool an scFvs der Bibliothek exprimieren eine leicht erhöhte Vitalität. Die Überlebensraten der ‚reklonierten‘ Zelllinien variierten: Jeweils eine Zelllinie, die einen aus der Zelllinie 1.6 bzw 2.5 isolierten scFv exprimierte, wies eine signifikant erhöhte Vitalität von 41% auf (**Abb. 18**). In diesen beiden Zelllinien konnte der *S. aureus* resistente Effekt reproduziert werden.

3.2.3.3 Analyse der Autophagie in *S. aureus* resistenten Klonen

Wie in Kapitel 3.2.3.1 gezeigt wurde, wiesen die scFv exprimierenden Zelllinien 1.6 und 2.5 nach der Infektion mit dem zytotoxischen *S. aureus* Stamm MW2 eine 3,7- bzw. 3,3-fach höhere Überlebensrate als die HeLa Kontrollzelllinien auf. Um zu überprüfen, ob die selektionierten Klone Veränderungen in der *S. aureus*-vermittelten Autophagie zeigen, wurde die Konversion des zytoplasmatischen LC3-I Proteins in die mit der autophagosomalen Membran assoziierten LC3-II Form durch Western Blot analysiert und quantifiziert.

Die Infektion mit *S. aureus* MW2 führte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei allen analysierten Zelllinien zu einer Konversion von LC3-I zu LC3-II. Betrachtet man jedoch die prozentuale Änderung der LC3-II Menge im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, die auf 100% gesetzt wurde, so nahm die Intensität der LC3-II Bande bei der parentalen Zelllinie auf 280% zu. Bei der Linie 2.5 war diese prozentuale Änderung der LC-3 Menge leicht reduziert. Die Zelllinie 1.6 wies nach der Infektion nur eine Steigerung auf 130% auf und war somit gegenüber der parentalen Zelllinie signifikant reduziert (**Abb. 19**).

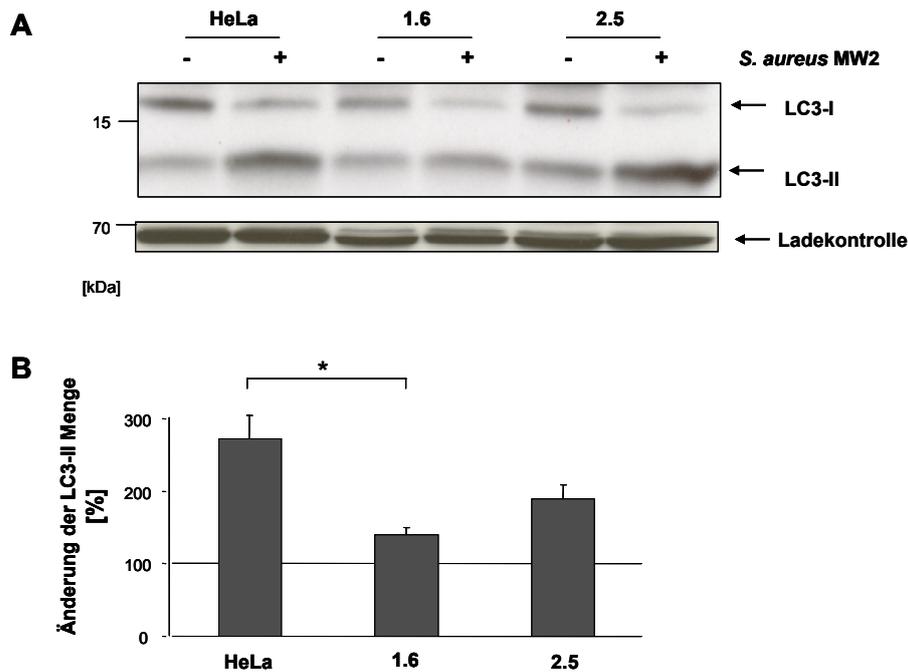


Abbildung 19: Analyse der Autophagie nach *S. aureus* Infektion in den selektionierten Zelllinien

Die scFv exprimierenden Zelllinien 1.6 und 2.5 sowie die parentale HeLa Zelllinie wurden mit *S. aureus* MW2 (MOI=200) infiziert. **A**) Zwei Stunden nach Beginn der Infektion wurden die infizierten bzw. unbehandelten Proben lysiert und 20 µg Protein wurde per SDS/PAGE aufgetrennt und durch Immunfärbung mit anti-LC3 Antikörper analysiert. **B**) Die Intensität der LC3-II Banden wurde quantifiziert und die prozentuale Änderung der LC3-II Menge der induzierten im Vergleich zur unbehandelten Probe wurde graphisch dargestellt. Die Werte zweier unabhängiger Experimente wurden gemittelt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass aus der in dieser Arbeit klonierten intrazellulären scFvs Bibliothek durch mehrfache *S. aureus* Infektion zwei Wirtszellklone selektioniert werden konnten, in welchen die Expression des scFvs einen reproduzierbaren, *S. aureus* resistenten Effekt vermittelt. Einer dieser beiden Klone zeigte eine statistisch signifikante Reduktion in der *S. aureus* induzierten Autophagosomenbildung.

4 Diskussion

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde durch Analyse der LC3-Konversion nachgewiesen, dass die *S. aureus* Infektion in epithelialen Zellen zur Autophagieinduktion führt. Nach transienter und konstitutiver Inhibition der Expression der Säugetierhomologe von Atg1 (Ulk1, Ulk2 und Ulk3), wiesen nur Ulk1-defiziente Zellen Veränderungen in der Autophagie auf. In diesen Zellen kam es zu einem signifikanten Anstieg der zellulären LC3-II Menge. Nach Autophagieinduktion durch *S. aureus* Infektion oder Rapamycinbehandlung war der Abbau von LC3-II durch lysosomale Proteasen inhibiert. *Agr*-defiziente *S. aureus* zeigten in den Ulk1-defizienten Zellen eine erhöhte Kolokalisation mit dem autophagosomalen Marker LC3 und eine verringerte Kolokalisation mit lysosomalem Marker. Nach der Infektion mit *agr*-defizienten Bakterien war sowohl die Replikation als auch die Wirtszelltoxizität deutlich gesteigert.

4.1 Erhöhte Replikation und Toxizität von *agr*-defizienten *S. aureus* in Ulk1-defizienten Zellen

Wt-*agr* *Staphylococcus aureus* replizieren in Autophagosomen und induzieren schließlich den Tod der Wirtszelle. *Agr*-defiziente Stämme dagegen werden in Phagolysosomen degradiert (Schnaith et al, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass *agr*-defiziente *S. aureus* in Zellen, in denen die Expression des Atg1 Homologes Ulk1 inhibiert wurde, vermehrt mit dem autophagosomalen Markerprotein LC3 kolokalisierten, deutlich stärker replizierten und eine signifikant erhöhte Wirtszelltoxizität aufwiesen. Auch wt-*agr* *S. aureus* zeigten in Ulk1-defizienten Zellen tendenziell eine Erhöhung der Replikation und der Zytotoxizität (Abb. 9-11). Diese Ergebnisse sind überraschend, da aktuelle Studien zeigen, dass die Expression von Ulk1 für die durch Aminosäuremangel induzierte Autophagie essentiell ist. Ulk1 reguliert im Komplex mit mAtg13 und FIP200 (mAtg17) mTOR-abhängig die Induktion von Autophagie (Ganley et al, 2009; Hara et al, 2008; Hosokawa et al, 2009; Jung et al, 2009). Nach transienter siRNA Inhibition der Expression von Ulk1 wurde eine starke Reduktion der LC3-Modifikation (Chan et al, 2007; Chan et al, 2009; Young et al, 2006) und des Abbaus zytosolischer Proteine demonstriert (Young et al, 2006). Diesen Studien

zufolge sollte *S. aureus* in Ulk1-defizienten Zellen keine replikative Nische vorfinden und so im Phagolysosom degradiert werden. Stattdessen scheint die Abwesenheit von Ulk1 gerade *agr*-defizienten *S. aureus* Stämmen einen Vorteil für das intrazelluläre Überleben zu verschaffen.

4.2 Die Rolle von Ulk1 in der Autophagie ist kontrovers

In dieser Arbeit wurde die Rolle der Serin/Threoninkinasen Ulk1, Ulk2 und Ulk3 in der durch *S. aureus* Infektion oder mTOR Inhibition induzierten Autophagie durch die Analyse der Konversion des Markerproteins LC3 untersucht. Diese Methode gilt als zuverlässigster Nachweis für spezifische Autophagie, da LC3-II als einziges Protein mit dem vollständigen Autophagosom assoziiert bleibt (Klionsky et al, 2008); (Kirkegaard et al, 2004). Wie in HEK293 und HeLa Zellen gezeigt wurde (Abb. 1), kann LC3-II in humanen Zelllinien jedoch bereits ohne die Stimulation von Autophagie detektiert werden. In HeLa Zellen nahm die absolute LC3-II Menge durch die Induktion von Autophagie nicht zwangsläufig zu, sondern äußerte sich auch durch eine Abnahme der LC3-I Konzentration. Diese Beobachtungen stimmen mit denen von Tanida et al, (2005 & 2006) in unbehandelten bzw. durch Aminosäuremangel stimulierten HEK293 und HeLa Zellen überein. Daher muss bei der Analyse der LC3-Konversion zwischen der absoluten Menge an LC3-II, die laut Kabeya et al, (2000) mit dem Ausmaß der Autophagosomenbildung korreliert und der Lipidierungsänderung, die sich aus dem Verhältnis von LC3-II zu LC3-I+II ergibt, differenziert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der Analyse der LC3-Konversion in HeLa Zellen, in denen die Expression von Ulk1 konstitutiv inhibiert war, die Menge des autophagosomalen Markerproteins LC3-II durch die Infektion mit wt *agr S. aureus* (Abb. 8) oder durch Rapamycinbehandlung (Abb. 12) gesteigert werden. Diese Daten weisen darauf hin, dass es auch in Abwesenheit von Ulk1 zur Induktion von Autophagie und der daraus resultierenden Bildung von Autophagosomen kommen kann.

Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu Studien, die durch Analyse der LC3 Konversion zu dem Ergebnis kommen, dass die Autophagie in Ulk1-defizienten Zellen inhibiert ist. In diesen Studien wird jedoch nicht wie in der vorliegenden Arbeit die Modifikation des endogenen LC3 Proteins, sondern die eines in HEK293

Zellen stabil überexprimierten GFP-LC3 Fusionsproteins analysiert (Chan et al, 2007; Chan et al, 2009; Young et al, 2006). Darüber hinaus evaluieren diese Gruppen die Autophagieinduktion nur anhand der Lipidierungsänderung, die auch in dieser Arbeit, bedingt durch die erhöhte Gesamtproteinmenge an LC3, in Ulk1-defizienten Zellen reduziert war.

Im Einklang mit den Daten dieser Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass Ulk1 *knock-out* Mäuse, im Gegensatz zu Atg5^{-/-} und Atg7^{-/-} Mäusen, die innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt sterben (Komatsu et al, 2005; Kuma et al, 2004), keine Beeinträchtigungen in der Embryonalentwicklung oder der Autophagieinduktion aufweisen. Stattdessen zeigen Ulk1^{-/-} Mäuse Defizite bei der Beseitigung von Mitochondrien und Ribosomen während der Erythrocytenreifung (Kundu et al, 2008). Aufgrund dieses Phänotypes ist es möglich, dass Ulk1 zwar essentiell für die Induktion dieser spezialisierten Form der Autophagie ist, die Rolle bei der Induktion der allgemeinen Autophagie jedoch redundant ist. Ergänzend dazu konnte durch ein *Screening* in der Hefe *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass Atg8, das Hefehomolog von LC3, auch in Δ Atg1-Deletionsmutanten an der präautophagosomalem Struktur (PAS) lokalisiert. In einem auf dieser Studie basierenden hierarchischen Model ist Atg1 nur für die Lokalisation von Atg2 und Atg18 an die PAS notwendig (Suzuki et al, 2007; Suzuki & Ohsumi, 2007). Auch diese Daten weisen darauf hin, dass Ulk1 möglicherweise bei der Initiation der Autophagie ersetzbar ist.

4.3 In Ulk1-defizienten Zellen ist die LC3-II Konzentration erhöht

Die Analyse der LC3-Konversion in Ulk1-defizienten Zellen zeigte auch eine stark erhöhte LC3-II Menge. Diese wurde sowohl in unbehandelten Zellen als auch nach der Induktion der Autophagie durch *S. aureus* Infektion oder Rapamycinbehandlung detektiert (Abb. 8 + 12). Der signifikante Anstieg des membranassoziierten LC3-IIs in Ulk1-defizienten Zellen weist auf die gesteigerte Bildung autophagosomaler Kompartimente hin. Auch Studien in der Hefe *S. cerevisiae* zeigen, dass das LC3-II Homolog Atg8-PE in Atg1, -2, -6, -13, -14, -16 und -17 Deletionsmutanten (Δ Atg) gebildet werden kann (Suzuki et al, 2001;

Suzuki et al, 2007). Stark beeinträchtigt ist die Lipidierung nur in Δ Atg5, -10 und -12 bzw. komplett blockiert in Δ Atg3, -4 und -7 Stämmen.

In Säugetieren wurde eine starke LC3-II Akkumulation nach der transienten Inhibition von mAtg13 gezeigt (Hosokawa et al, 2009). Auch in FIP200^{-/-} (mAtg17) Zellen wurde nach Aminosäuremangel LC3-II gebildet (Hara et al, 2008). Darüber hinaus wurden in Zellen, in denen mAtg14 oder Vsp34 inhibiert ist (Itakura et al, 2008), bereits basal hohe Mengen an LC3-II detektiert. Hosokawa et al, (2009) interpretieren die gezeigte LC3-II Akkumulation jedoch nicht als erhöhte Autophagie. Vielmehr spekulieren sie, dass die Abwesenheit der Atg Proteine zu einer ektopischen Anreicherung von LC3-II an ‚anomalen Membranen‘ führt. Demnach würde LC3-II in Ulk1 defizienten Zellen entweder an Vesikeln, die unabhängig von der Autophagieinduktion gebildet werden (Gimenez-Xavier et al, 2008), oder aber an autophagosomalen Kompartimenten, deren Maturation bzw. Fusion defekt ist, akkumulieren.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass im Vergleich zu den anderen Zelllinien die Änderung der LC3-Lipidierung in Ulk1-defizienten Zellen durch die Zugabe von Proteaseinhibitoren nicht weiter gesteigert werden konnte. In Einklang damit wurde auch in Ulk1^{-/-} MEFs bereits basal eine starke LC3-II Bande detektiert, die durch Aminosäuremangel bzw. der Zugabe von Protease Inhibitoren nicht weiter zunahm (Jung et al, 2009). Durch die Verwendung von Protease Inhibitoren kann differenziert werden, ob eine erhöhte LC3-II Menge auf eine (i) erhöhte Konversion von LC3-I zu LC3-II oder (ii) die Inhibition der Dissoziation von LC3-II von der autophagosomalen Membran zurückzuführen ist (Mizushima & Klionsky, 2007; Mizushima & Yoshimori, 2007; Tanida et al, 2005). Dabei wird einerseits der Anteil an LC3-II, der mit der inneren Autophagosomenmembran assoziiert ist, durch lysosomale Proteasen degradiert. Andererseits wird LC3-II von der äußeren Membran durch die Cysteinprotease mAtg4B dekonjugiert (Kirisako et al, 2000). Da die LC3-Lipidierung in stimulierten, Ulk1-defizienten Zellen durch die Anwesenheit von Protease Inhibitoren nicht weiter gesteigert werden konnte, kann man davon ausgehen, dass mindestens einer dieser Mechanismen gestört war. Die verringerte Kolokalisation von *agr*-defizienten Bakterien mit lysosomalen Markern gibt einen Hinweis darauf, dass in Ulk1-defizienten Zellen die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom gestört ist (Abb. 11).

4.4 Rolle von Ulk1 bei der autophagosomalen Reifung

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Ulk1 eine Rolle bei der Regulation der Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen spielt. In der Hefe *S. cerevisiae* wird eine duale Rolle für Atg1 beschrieben (Cheong & Klionsky, 2008; Cheong et al, 2008). Analog zu Ulk1 führt Atg1 einerseits im Komplex mit Atg13 und Atg17 eine strukturelle Rolle aus, die der effizienten Rekrutierung von Atg-Proteinen an die präautophagosomale Struktur (PAS) dient und durch die carboxyterminale Domäne reguliert wird. Auf der anderen Seite reguliert Atg1 aber auch die Dissoziation verschiedener Atg Proteine von der PAS. Atg1 Mutanten mit defekter Kinasedomäne zeigen eine starke Akkumulation von Atg8, Atg17 und Atg23 (Yorimitsu & Klionsky, 2005). Zudem spielt Atg1 zusammen mit Atg2 und Atg18 kinase-unabhängig eine Rolle beim Rücktransport von Atg9 von der PAS (Reggiori et al, 2005; Reggiori et al, 2004; Wang et al, 2001).

Aktuelle Studien in Hefe zeigen einen Zusammenhang zwischen Atg1-Defizienz und Atg8-PE-Akkumulation. Fluoreszenzmikroskopisch konnte nach Autophagieinduktion durch Aminosäuremangel die Dynamik der Atg8 Assoziation und Dissoziation von der PAS gezeigt werden. In Atg1 Deletions- bzw. Kinasemutantestämmen dagegen blieben die Atg8-Punkta während der gesamten Beobachtungszeit bestehen (Cheong et al, 2008; Xie et al, 2008a). Übereinstimmend damit wurden in der vorliegenden Arbeit in Ulk1 defizienten Zellen gleiche Mengen an LC3-Punkta in unbehandelten und Rapamycin-induzierten Zellen detektiert (Abb. 13).

In der Hefe prozessiert die Cysteinprotease Atg4 einerseits das Atg8 Vorläuferprotein und vermittelt andererseits durch die Dekonjugation des PE-Restes die Dissoziation von Atg8 von der autophagosomalen Membran (Kirisako et al, 2000). *In vitro* wurde gezeigt, dass LC3-Oligomere für den Kontakt und die Hemifusion von Vesikeln benötigt werden (Nakatogawa et al, 2007; Subramani & Farre, 2007). Dagegen postulieren Xie et al, (2008b) ein Modell, bei dem die Dekonjugation von Atg8 von der äußeren autophagosomalen Membran essentiell für die Ausbildung des vollständigen Autophagosoms ist. Die Dekonjugation kann durch Überexpression einer Atg4 Mutante verhindert werden (Fujita et al, 2008; Fujita et al, 2009). Wenn auch der zeitliche Ablauf noch unklar ist, so scheint doch

die Dynamik der Atg8 Assoziation und Dissoziation wichtig für die Reifung des Autophagosoms bzw. die Fusion mit dem Lysosom zu sein.

Die Beobachtung, dass das Ausmaß der LC3-II Akkumulation in stabilen, Ulk1-defizienten Zellen höher, als nach transienter Inhibition ist (Abb. 4, 5, 8 und 12), unterstützt die Hypothese, dass LC3 nur in Gegenwart von Ulk1 von der äußeren Autophagosomenmembran dissoziieren kann. Unklar ist, ob Ulk1 direkt oder durch Interaktion mit mAtg4 die Dissoziation von LC3-II vermitteln kann. Durch *yeast-two-hybrid* Studien wurden direkte Interaktionen zwischen Ulk1 und den Proteinen GATE-16 und GABARAP nachgewiesen, die LC3 strukturell sehr ähneln (Okazaki et al, 2000).

Neben der LC3-II Akkumulation wurden in Ulk1-defizienten Zellen auch erhöhte Konzentrationen an LC3-I detektiert. Durch Inhibition der Proteinneusynthese konnte gezeigt werden, dass LC3-I als Reaktion auf die transiente Inhibition der Ulk1-Expression neu synthetisiert wurde (Abb. 5). In konstitutiv Ulk1-defizienten Zellen war die LC3-I Konzentration noch höher (Abb. 8 und 12). Geht man davon aus, dass LC3-II in diesen Zellen nicht durch Dekonjugation in seine zytoplasmatische Form zurückgeführt werden kann, so wäre der zelluläre Pool an LC3-I in diesen Zellen niedrig und würde möglicherweise kompensatorisch durch LC3-I Neusynthese aufgefüllt werden.

4.5 Bedeutung von Ulk2 und Ulk3 in der Autophagie

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der Atg1 Homologe Ulk1, Ulk2 und Ulk3 in der *S. aureus* vermittelten Autophagie zu analysieren. Im Gegensatz zu Ulk1 wurden in Ulk2- und Ulk3-defizienten Zellen keine Veränderungen in der Autophagie beobachtet. Im Einklang damit zeigten Chan et al, (2007) und Young et al, (2006), dass die transiente Inhibition von Ulk2 die Autophagieinduktion nicht beeinflusst. In anderen Studien wurde jedoch die autophagieabhängige Lokalisation von Ulk2 an der Isolationsmembran (Chan et al, 2009; Hara et al, 2008) und im Initiationskomplex (Jung et al, 2009; Chan et al, 2009) demonstriert.

Aufgrund des milden Phänotyps der Ulk1^{-/-} Maus (Kundu et al, 2008) wird spekuliert, ob Ulk2 in Abwesenheit von Ulk1 Autophagiefunktionen übernehmen kann. Um diese Frage vollständig zu klären, müssten Zelllinien generiert werden, bei denen die Expression beider Proteine gehemmt ist.

Im Gegensatz zu Ulk3 weist Ulk2 nicht nur im Hinblick auf die Domänenstruktur eine hohe Homologie zu Ulk1 auf, sondern zeigt auch weitgehend überlappende mRNA Expressionsmuster (Yan et al, 1998; Yan et al, 1999). Könnte Ulk2 tatsächlich die Rolle von Ulk1 bei der Initiation von Autophagie ersetzen, so würde das erklären, warum in Zellen, in denen die Ulk1 Expression konstitutiv inhibiert ist, nur der LC3-II Akkumulationsphänotyp so stark ausgeprägt ist. Möglicherweise ist Ulk1 allein nicht entscheidend für die Initiation der Autophagie, sondern nimmt eine generelle regulatorische Aufgabe wahr, bei der der Ablauf der Autophagie durch die Modulation der LC3-Konjugation beeinflusst werden kann.

4.6 Inhibition des *S. aureus*-induzierten Zelltodes durch die Expression eines Intrabodies

Um die Identifikation von Überlebensstrategien zytotoxischer *S. aureus* in der Wirtszelle zu ermöglichen, wurden im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die scFvs einer *Phage Display* Bibliothek so umkloniert, dass sie stabil und löslich in Zielzellen exprimiert werden konnten. Nach Selektion dieser intrazellulären scFv (*Intrabody*) Bibliothek durch Infektionen mit wt-*agr S. aureus* wurden zwei Zellklone isoliert, denen die Expression des scFvs reproduzierbar eine Resistenz gegenüber der Infektion vermittelte. Dies ist die erste uns bekannte *Intrabody* Bibliothek, aus der spezifische scFvs *in vivo* isoliert werden konnten.

Die Analyse der LC3-Konversion der beiden selektionierten Klone ergab, dass Klon 1.6 eine statistisch signifikante Reduktion der *S. aureus*-induzierten LC3-II Zunahme zeigte. Die beobachtete erhöhte Wirtszellvitalität dieses Klones könnte also darauf zurück zu führen sein, dass die Expression des scFvs zu einer verminderten Bildung von autophagosomalen Kompartimenten führt. Durch Vergleich der *S. aureus*- und Rapamycin induzierten LC3-Konversion könnte geklärt werden, ob der exprimierte scFv mit einem pathogenen Protein interagiert oder einen zellulären, in die Autophagosomenbildung involvierten Faktor, bindet. Durch Koimmunpräzipitation des EGFP-gekoppelten scFvs könnte dieser Faktor isoliert und durch Massenspektroskopie identifiziert werden.

4.7 Hypothese zur Funktion von Ulk1 bei der Infektion mit *S. aureus*

Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann eine Arbeitshypothese formuliert werden, nach der Ulk1, analog zu Atg1 in der Hefe, eine duale Funktion ausübt. Als Teil des AICs spielt Ulk1 eine Rolle bei der Initiation der Autophagie, die zur Rekrutierung der mAtg Proteine an die Isolationsmembran und schließlich zur Bildung der Autophagosomen führt. Darüber hinaus reguliert Ulk1 aber auch - direkt oder indirekt über mAtg4 - die Dekonjugation von LC3-II von der autophagosomalen Membran, die essentiell für die Maturation bzw. die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom ist (**Abb. D4**).

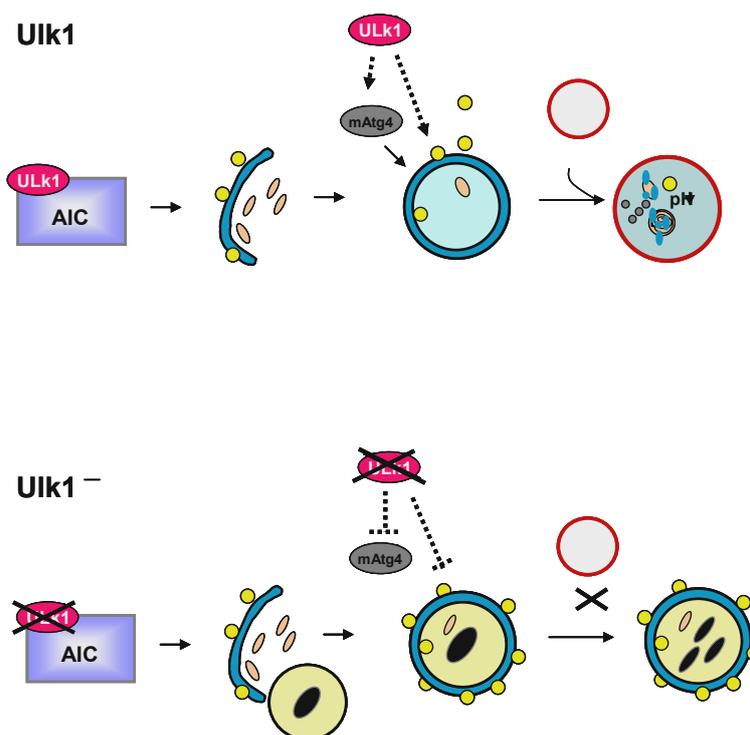


Abbildung D1: Hypothetische Funktion von Ulk1 bei der Infektion mit *agr*-defizienten *S. aureus*

In Ulk1 exprimierenden Zellen werden *agr*-defiziente *S. aureus* bereits im Phagolysosom abgebaut. Wt *agr* Stämme dagegen sind in der Lage, unabhängig von Ulk1 in den autophagosomalen Kompartimenten zu replizieren und den Tod der Wirtszelle zu induzieren. Wie auch Nakagawa et al, (2004) für *Streptococcus pyogenes* gezeigt haben, sind bakteriell induzierte Autophagosomen größer als durch Rapamycin bzw. Aminosäuremangel induzierte und zellulär ausschließlich

um das Bakterium lokalisiert (Abb. 3). Aktuelle Studien haben gezeigt, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) an der Regulation von mAtg4 beteiligt sind und durch den Austritt aus dem Mitochondrium zur lokalen Bildung autophagosomaler Membranen führen (Scherz-Shouval et al, 2007). So könnten *wt-agr S. aureus* durch die Sekretion von Virulenzfaktoren innerhalb des Phagosom ebenfalls zur Bildung von ROS, der Aktivierung von mAtg4 und dadurch zur lokalen Induktion autophagosomaler Membranen führen.

In Ulk1-defizienten Zellen ist die Funktion von Ulk1 bei der Bildung der autophagosomalen Kompartimente - möglicherweise durch Ulk2 - kompensierbar. Dagegen kann Ulk1 bei der Regulierung der Dekonjugation von LC3-II nicht ersetzt werden. Als Folge entstehen LC3-dekorierte, autophagosomale Kompartimente, die nicht weiter maturieren bzw. fusionieren können. Diese anomalen Vesikel akkumulieren in der Zelle und bieten *agr*-defizienten *S. aureus* eine protektive Nische, in der sie effizient replizieren können, ohne selbst *agr*-abhängig die Bildung von autophagosomalen Membranen oder die Inhibition der autophagosomalen Maturation induzieren zu müssen. Als Folge sind auch sie dazu in der Lage die Wirtszellen zu töten.

5 Zusammenfassung

Staphylococcus aureus ist dazu in der Lage nicht-professionelle Phagozyten zu infizieren. Wildtyp *agr S. aureus* Stämme nutzen das Autophagosom als protektive Nische, um intrazellulär zu replizieren und verursachen schließlich den Tod der Wirtszelle. *S. aureus* Stämme, die über kein intaktes *agr*-Genregulationssystem verfügen, werden über den phagolysosomalen Weg eliminiert.

In der Hefe ist Atg1 ein essentieller Regulator der Autophagie. Daher wurden im ersten Teil dieser Arbeit die Rollen der Atg1-Säugetierhomologe, Ulk1, Ulk2 und Ulk3 in der *S. aureus*-vermittelten Autophagie analysiert. Überraschenderweise konnten in Zellen, in denen die Ulk1 Expression konstitutiv inhibiert war, bereits in nicht infizierten Zellen signifikant erhöhte Mengen des autophagosomalen Markerproteins LC3-II detektiert werden. Während die Induktion der Autophagie durch *S. aureus* oder Rapamycin nicht beeinträchtigt war, wiesen Ulk1-defiziente Zellen Defekte in der autophagosomalen Maturation bzw. dem lysosomalen Abbau auf. Ulk2- und Ulk3-defiziente Zellen zeigten dagegen keine Veränderungen der Autophagie. *Agr*-defiziente *S. aureus* Stämme zeigten in Ulk1-defizienten Zellen eine deutlich erhöhte Replikation und Wirtszelltoxizität. Zusätzlich war die Kolokalisation *agr*-defizienter Bakterien mit dem autophagosomalen Marker LC3 erhöht und mit lysosomalem Marker verringert. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Abwesenheit von Ulk1 zu einer zellulären Akkumulation defekter, autophagosomaler Kompartimente führt, die von *agr*-defizienten *S. aureus* als replikative Nische genutzt werden können.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde überprüft, ob die intrazelluläre Expression von *single chain variable fragment* (scFv) Wirtszellen vor dem Zelltod durch *S. aureus* Infektion schützen kann. Dazu wurden die scFvs der Tomlinson *Phage Display* Bibliothek so umkloniert, dass sie stabil und löslich in Hela Zellen exprimiert werden konnten. Durch mehrfache Infektion dieser intrazellulären Bibliothek mit dem zytotoxischen *S. aureus* Stamm MW2 wurden aus dem Pool von *Intrabody* exprimierenden Zellen zwei Klone selektioniert, die eine erhöhte Vitalität nach der Infektion zeigten. Durch Reklonierung der scFv-kodierenden Gene konnte der *S. aureus* resistente Phänotyp reproduziert werden. Analysen der Autophagie in den selektionierten Klonen ergaben, dass die intrazelluläre Expression des einen scFvs zu einer verringerten *S. aureus*-induzierten Autophagosomenbildung führte.

6 Summary

Staphylococcus aureus is able to infect non-professional phagocytes. Wildtype *agr* *S. aureus* strains use the autophagosome as a protective niche for intracellular replication and eventually induce host cell death. However, *S. aureus* strains that are deficient for the *agr* gene regulator will be eliminated by the phago-lysosomal pathway.

Atg1 is an essential autophagy regulator in yeast. In the first part of this thesis the roles of the mammalian Atg1 homologues, Ulk1, Ulk2 and Ulk3 were analysed in *S. aureus*-mediated autophagy. Surprisingly, in non-infected cells where Ulk1 protein expression was constitutively inhibited, the amount of the autophagosomal marker protein LC3-II was significantly increased. Induction of autophagy in Ulk1-deficient cells by *S. aureus* infection or rapamycin treatment was unaffected, while autophagosomal maturation or lysosomal degradation was defective. However, cells deficient in Ulk2 or Ulk3 showed no alterations in autophagy. In Ulk1-deficient cells, replication and host cell toxicity of *agr*-deficient *S. aureus* strains was clearly increased. Additionally, *agr*-deficient *S. aureus* showed increased co-localisation with the autophagosomal marker LC3 and reduced co-localisation with a lysosomal marker. These results suggest, that the absence of Ulk1 results in a cellular accumulation of defective autophagosomal compartments, which provide a replicative niche for *agr*-deficient *S. aureus* strains.

In the second part of this project the question of whether the intracellular expression of single chain variable fragments (scFvs) can protect cells from *S. aureus* induced cell death was addressed. To this end, the scFvs of the Tomlinson Phage Display library were subcloned, so that soluble protein fragments were stably expressed in HeLa cells. After multiple infections of this intracellular library with the cytotoxic *S. aureus* strain MW2, two clones that exhibited increased vitality were selected out of the pool of intrabody expressing cells. The *S. aureus* resistant effect could be reproduced by subcloning of the scFv-coding genes. Analysis of the autophagic properties of these selected clones suggested that the intracellular expression of one of the scFvs causes reduced *S. aureus*-induced autophagosome formation.

7 Referenzen

Abeliovich H, Zhang C, Dunn WA, Jr., Shokat KM, Klionsky DJ (2003) Chemical genetic analysis of Apg1 reveals a non-kinase role in the induction of autophagy. *Mol Biol Cell* 14(2): 477-490

Almeida RA, Matthews KR, Cifrian E, Guidry AJ, Oliver SP (1996) *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* 79(6): 1021-1026

Amer AO, Swanson MS (2005) Autophagy is an immediate macrophage response to *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* 7(6): 765-778

Bai J, Sui J, Zhu RY, Tallarico AS, Gennari F, Zhang D, Marasco WA (2003) Inhibition of Tat-mediated transactivation and HIV-1 replication by human anti-hCyclinT1 intrabodies. *J Biol Chem* 278(3): 1433-1442

Baran J, Weglarczyk K, Mysiak M, Guzik K, Ernst M, Flad HD, Pryjma J (2001) Fas (CD95)-Fas ligand interactions are responsible for monocyte apoptosis occurring as a result of phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 69(3): 1287-1297

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(1): 336-342

Bera A, Biswas R, Herbert S, Gotz F (2006) The presence of peptidoglycan O-acetyltransferase in various staphylococcal species correlates with lysozyme resistance and pathogenicity. *Infect Immun* 74(8): 4598-4604

Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M (1988) Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242(4877): 423-426

Bonazzi M, Cossart P (2006) Bacterial entry into cells: a role for the endocytic machinery. *FEBS Lett* 580(12): 2962-2967

Budovskaya YV, Stephan JS, Deminoff SJ, Herman PK (2005) An evolutionary proteomics approach identifies substrates of the cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(39): 13933-13938

Cao T, Heng BC (2005) Intracellular antibodies (intrabodies) versus RNA interference for therapeutic applications. *Ann Clin Lab Sci* 35(3): 227-229

Cao Y, Espinola JA, Fossale E, Massey AC, Cuervo AM, MacDonald ME, Cotman SL (2006) Autophagy is disrupted in a knock-in mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Biol Chem* 281(29): 20483-20493

Celli J, de Chastellier C, Franchini DM, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel JP (2003) *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 198(4): 545-556

Chan EY, Kir S, Tooze SA (2007) siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem* 282(35): 25464-25474

- Chan EY, Longatti A, McKnight NC, Tooze SA (2009)** Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Mol Cell Biol* 29(1): 157-171
- Checroun C, Wehrly TD, Fischer ER, Hayes SF, Celli J (2006)** Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(39): 14578-14583
- Cheong H, Klionsky DJ (2008)** Dual role of Atg1 in regulation of autophagy-specific PAS assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy* 4(5): 724-726
- Cheong H, Nair U, Geng J, Klionsky DJ (2008)** The Atg1 kinase complex is involved in the regulation of protein recruitment to initiate sequestering vesicle formation for nonspecific autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 19(2): 668-681
- Crossley KB, Archer GL (1997)** *The Staphylococci in human disease*, New York: Churchill Livingstone Inc.
- Cuervo AM (2004)** Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol* 14(2): 70-77
- de Wildt RM, Mundy CR, Gorick BD, Tomlinson IM (2000)** Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions. *Nat Biotechnol* 18(9): 989-994
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L (1998)** A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72(11): 8463-8471
- 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(11): 6321-6328
- Ellington JK, Harris M, Webb L, Smith B, Smith T, Tan K, Hudson M (2003)** Intracellular *Staphylococcus aureus*. A mechanism for the indolence of osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Br* 85(6): 918-921
- Essmann F, Bantel H, Totzke G, Engels IH, Sinha B, Schulze-Osthoff K, Janicke RU (2003)** *Staphylococcus aureus* alpha-toxin-induced cell death: predominant necrosis despite apoptotic caspase activation. *Cell Death Differ* 10(11): 1260-1272
- Finlay BB, Cossart P (1997)** Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 276(5313): 718-725
- Foster TJ (2005)** Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* 3(12): 948-958
- Foster TJ, Hook M (1998)** Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 6(12): 484-488
- Fujita N, Hayashi-Nishino M, Fukumoto H, Omori H, Yamamoto A, Noda T, Yoshimori T (2008)** An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Mol Biol Cell* 19(11): 4651-4659
- Fujita N, Noda T, Yoshimori T (2009)** Atg4B(C74A) hampers autophagosome closure: a useful protein for inhibiting autophagy. *Autophagy* 5(1): 88-89
- Ganley IG, Lam DH, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X (2009)** ULK1-ATG13-FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem*

- Garzoni C, Francois P, Huyghe A, Couzinet S, Tapparel C, Charbonnier Y, Renzoni A, Lucchini S, Lew DP, Vaudaux P, Kelley WL, Schrenzel J (2007)** A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells. *BMC Genomics* 8: 171
- Garzoni C, Kelley WL (2009)** *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol* 17(2): 59-65
- Geng J, Klionsky DJ (2008)** The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep* 9(9): 859-864
- Gimenez-Xavier P, Francisco R, Platini F, Perez R, Ambrosio S (2008)** LC3-I conversion to LC3-II does not necessarily result in complete autophagy. *Int J Mol Med* 22(6): 781-785
- Giraud AT, Cheung AL, Nagel R (1997)** The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Arch Microbiol* 168(1): 53-58
- Goletz S, Christensen PA, Kristensen P, Blohm D, Tomlinson I, Winter G, Karsten U (2002)** Selection of large diversities of antiidiotypic antibody fragments by phage display. *J Mol Biol* 315(5): 1087-1097
- Gordon RJ, Lowy FD (2008)** Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 46 Suppl 5: S350-359
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977)** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36(1): 59-74
- Gutierrez MG, Vazquez CL, Munafò DB, Zoppino FC, Beron W, Rabinovitch M, Colombo MI (2005)** Autophagy induction favours the generation and maturation of the *Coxiella*-replicative vacuoles. *Cell Microbiol* 7(7): 981-993
- Hanahan D (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166(4): 557-580
- Hanaoka H, Noda T, Shirano Y, Kato T, Hayashi H, Shibata D, Tabata S, Ohsumi Y (2002)** Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene. *Plant Physiol* 129(3): 1181-1193
- Hannon GJ (2002)** RNA interference. *Nature* 418(6894): 244-251
- Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S, Natsume T, Guan JL, Mizushima N (2008)** FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol* 181(3): 497-510
- Harding TM, Morano KA, Scott SV, Klionsky DJ (1995)** Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Cell Biol* 131(3): 591-602
- 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(8): 1087-1097

- Hink MA, Griep RA, Borst JW, van Hoek A, Eppink MH, Schots A, Visser AJ (2000)** Structural dynamics of green fluorescent protein alone and fused with a single chain Fv protein. *J Biol Chem* 275(23): 17556-17560
- Holt LJ, Bussow K, Walter G, Tomlinson IM (2000)** By-passing selection: direct screening for antibody-antigen interactions using protein arrays. *Nucleic Acids Res* 28(15): E72
- Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura SI, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, Mizushima N (2009)** Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1-Atg13-FIP200 Complex Required for Autophagy. *Mol Biol Cell* 20(7): 1981-1991
- Huang J, Klionsky DJ (2007)** Autophagy and human disease. *Cell Cycle* 6(15): 1837-1849
- Hudson MC, Ramp WK, Nicholson NC, Williams AS, Nousiainen MT (1995)** Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb Pathog* 19(6): 409-419
- Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, Ridge RJ, Brucoleri RE, Haber E, Crea R, et al. (1988)** Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(16): 5879-5883
- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M, Noda T, Ohsumi Y (2000)** A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408(6811): 488-492
- Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N (2008)** Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell* 19(12): 5360-5372
- 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(2): 1169-1176
- Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH (2009)** ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Mol Biol Cell* 20(7): 1992-2003
- Kabeya Y, Kamada Y, Baba M, Takikawa H, Sasaki M, Ohsumi Y (2005)** Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy. *Mol Biol Cell* 16(5): 2544-2553
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T (2000)** LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J* 19(21): 5720-5728
- Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T (2004)** LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* 117(Pt 13): 2805-2812
- Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y (2000)** Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 150(6): 1507-1513

- Kamada Y, Sekito T, Ohsumi Y (2004)** Autophagy in yeast: a TOR-mediated response to nutrient starvation. *Curr Top Microbiol Immunol* 279: 73-84
- Kawamata T, Kamada Y, Kabeya Y, Sekito T, Ohsumi Y (2008)** Organization of the pre-autophagosomal structure responsible for autophagosome formation. *Mol Biol Cell* 19(5): 2039-2050
- Kawano Y, Yoshida T, Hieda K, Aoki J, Miyoshi H, Koyanagi Y (2004)** A lentiviral cDNA library employing lambda recombination used to clone an inhibitor of human immunodeficiency virus type 1-induced cell death. *J Virol* 78(20): 11352-11359
- Kihara A, Noda T, Ishihara N, Ohsumi Y (2001)** Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 152(3): 519-530
- Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T, Ohsumi Y (2000)** The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol* 151(2): 263-276
- Kirkegaard K, Taylor MP, Jackson WT (2004)** Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2(4): 301-314
- Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, Baba M, Baehrecke EH, Bahr BA, Ballabio A, Bamber BA, Bassham DC, Bergamini E, Bi X, Biard-Piechaczyk M, Blum JS, Bredesen DE, Brodsky JL, Brumell JH, Brunk UT, Bursch W, Camougrand N, Cebollero E, Cecconi F, Chen Y, Chin LS, Choi A, Chu CT, Chung J, Clarke PG, Clark RS, Clarke SG, Clave C, Cleveland JL, Codogno P, Colombo MI, Coto-Montes A, Cregg JM, Cuervo AM, Debnath J, Demarchi F, Dennis PB, Dennis PA, Deretic V, Devenish RJ, Di Sano F, Dice JF, Difiglia M, Dinesh-Kumar S, Distelhorst CW, Djavaheri-Mergny M, Dorsey FC, Droge W, Dron M, Dunn WA, Jr., Duszenko M, Eissa NT, Elazar Z, Esclatine A, Eskelinen EL, Fesus L, Finley KD, Fuentes JM, Fueyo J, Fujisaki K, Galliot B, Gao FB, Gewirtz DA, Gibson SB, Gohla A, Goldberg AL, Gonzalez R, Gonzalez-Estevez C, Gorski S, Gottlieb RA, Haussinger D, He YW, Heidenreich K, Hill JA, Hoyer-Hansen M, Hu X, Huang WP, Iwasaki A, Jaattela M, Jackson WT, Jiang X, Jin S, Johansen T, Jung JU, Kadowaki M, Kang C, Kelekar A, Kessel DH, Kiel JA, Kim HP, Kimchi A, Kinsella TJ, Kiselyov K, Kitamoto K, Knecht E, Komatsu M, Kominami E, Kondo S, Kovacs AL, Kroemer G, Kuan CY, Kumar R, Kundu M, Landry J, Laporte M, Le W, Lei HY, Lenardo MJ, ... Deter RL (2008)** Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4(2): 151-175
- Koike M, Shibata M, Waguri S, Yoshimura K, Tanida I, Kominami E, Gotow T, Peters C, von Figura K, Mizushima N, Saftig P, Uchiyama Y (2005)** Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Pathol* 167(6): 1713-1728
- Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T (2005)** Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 169(3): 425-434
- Kourtis N, Tavernarakis N (2009)** Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death Differ* 16(1): 21-30

- Krut O, Utermohlen O, Schlossherr X, Kronke M (2003)** Strain-specific association of cytotoxic activity and virulence of clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Infect Immun* 71(5): 2716-2723
- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T, Mizushima N (2004)** The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432(7020): 1032-1036
- Kundu M, Lindsten T, Yang CY, Wu J, Zhao F, Zhang J, Selak MA, Ney PA, Thompson CB (2008)** Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood* 112(4): 1493-1502
- Kuroyanagi H, Yan J, Seki N, Yamanouchi Y, Suzuki Y, Takano T, Muramatsu M, Shirasawa T (1998)** Human ULK1, a novel serine/threonine kinase related to UNC-51 kinase of *Caenorhabditis elegans*: cDNA cloning, expression, and chromosomal assignment. *Genomics* 51(1): 76-85
- Laupland KB, Church DL, Mucenski M, Sutherland LR, Davies HD (2003)** Population-based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections. *J Infect Dis* 187(9): 1452-1459
- Leggio SA (2008)** Autophagie und *Staphylococcus aureus* - Pathogen-Wirtszell-Interaktionen, Dissertation
- Levine B, Kroemer G (2008)** Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132(1): 27-42
- Levine B, Kroemer G (2009)** Autophagy in aging, disease and death: the true identity of a cell death impostor. *Cell Death Differ* 16(1): 1-2
- Levy-Mintz P, Duan L, Zhang H, Hu B, Dornadula G, Zhu M, Kulkosky J, Bizub-Bender D, Skalka AM, Pomerantz RJ (1996)** Intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle by targeting human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J Virol* 70(12): 8821-8832
- Lindsay JA (1997)** *Staphylococcus*: Molecular Genetics, Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Liu GY, Essex A, Buchanan JT, Datta V, Hoffman HM, Bastian JF, Fierer J, Nizet V (2005)** *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med* 202(2): 209-215
- Lobato MN, Rabbitts TH (2003)** Intracellular antibodies and challenges facing their use as therapeutic agents. *Trends Mol Med* 9(9): 390-396
- Lowy FD (1998)** *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339(8): 520-532
- Lowy FD (2000)** Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? *Trends Microbiol* 8(8): 341-343
- Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB (2005)** Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120(2): 237-248

- Maciejewski JP, Weichold FF, Young NS, Cara A, Zella D, Reitz MS, Jr., Gallo RC (1995)** Intracellular expression of antibody fragments directed against HIV reverse transcriptase prevents HIV infection in vitro. *Nat Med* 1(7): 667-673
- Marasco WA, Haseltine WA, Chen SY (1993)** Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(16): 7889-7893
- Matsuura A, Tsukada M, Wada Y, Ohsumi Y (1997)** Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 192(2): 245-250
- 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(5428): 760-763
- Meijer WH, van der Klei IJ, Veenhuis M, Kiel JA (2007)** ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes. *Autophagy* 3(2): 106-116
- Melendez A, Neufeld TP (2008)** The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story. *Development* 135(14): 2347-2360
- Mizushima N, Klionsky DJ (2007)** Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr* 27: 19-40
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ (2008)** Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451(7182): 1069-1075
- Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T (2002)** Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct* 27(6): 421-429
- Mizushima N, Sugita H, Yoshimori T, Ohsumi Y (1998)** A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J Biol Chem* 273(51): 33889-33892
- Mizushima N, Yoshimori T (2007)** How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3(6): 542-545
- Morvan J, Kochl R, Watson R, Collinson LM, Jefferies HB, Tooze SA (2009)** In vitro reconstitution of fusion between immature autophagosomes and endosomes. *Autophagy* 5(5)
- Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, Johnson SK, Vandenesch F, Fridkin S, O'Boyle C, Danila RN, Lynfield R (2003)** Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Jama* 290(22): 2976-2984
- Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, Nara A, Funao J, Nakata M, Tsuda K, Hamada S, Yoshimori T (2004)** Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science* 306(5698): 1037-1040
- Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y (2007)** Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* 130(1): 165-178

- Naldini L (1999)** In vivo gene delivery by lentiviral vectors. *Thromb Haemost* 82(2): 552-554
- Noda T, Ohsumi Y (1998)** Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* 273(7): 3963-3966
- Nuzzo I, Sanges MR, Folgore A, Carratelli CR (2000)** Apoptosis of human keratinocytes after bacterial invasion. *FEMS Immunol Med Microbiol* 27(3): 235-240
- Ogawa SK, Yurberg ER, Hatcher VB, Levitt MA, Lowy FD (1985)** Bacterial adherence to human endothelial cells in vitro. *Infect Immun* 50(1): 218-224
- Ogura K, Wicky C, Magnenat L, Tobler H, Mori I, Muller F, Ohshima Y (1994)** *Caenorhabditis elegans* unc-51 gene required for axonal elongation encodes a novel serine/threonine kinase. *Genes Dev* 8(20): 2389-2400
- Okazaki N, Yan J, Yuasa S, Ueno T, Kominami E, Masuho Y, Koga H, Muramatsu M (2000)** Interaction of the Unc-51-like kinase and microtubule-associated protein light chain 3 related proteins in the brain: possible role of vesicular transport in axonal elongation. *Brain Res Mol Brain Res* 85(1-2): 1-12
- Otto GP, Wu MY, Kazgan N, Anderson OR, Kessin RH (2004)** Dictyostelium macroautophagy mutants vary in the severity of their developmental defects. *J Biol Chem* 279(15): 15621-15629
- Patti JM, Hook M (1994)** Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. *Curr Opin Cell Biol* 6(5): 752-758
- Paz K, Brennan LA, Iacolina M, Doody J, Hadari YR, Zhu Z (2005)** Human single-domain neutralizing intrabodies directed against Etk kinase: a novel approach to impair cellular transformation. *Mol Cancer Ther* 4(11): 1801-1809
- Petti CA, Fowler VG, Jr. (2003)** *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis. *Cardiol Clin* 21(2): 219-233, vii
- Poznansky MC, Foxall R, Mhashilkar A, Coker R, Jones S, Ramstedt U, Marasco W (1998)** Inhibition of human immunodeficiency virus replication and growth advantage of CD4+ T cells from HIV-infected individuals that express intracellular antibodies against HIV-1 gp120 or Tat. *Hum Gene Ther* 9(4): 487-496
- Recsei P, Kreiswirth B, O'Reilly M, Schlievert P, Gruss A, Novick RP (1986)** Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. *Mol Gen Genet* 202(1): 58-61
- Reggiori F, Shintani T, Nair U, Klionsky DJ (2005)** Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. *Autophagy* 1(2): 101-109
- Reggiori F, Tucker KA, Stromhaug PE, Klionsky DJ (2004)** The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Dev Cell* 6(1): 79-90
- Reilly SS, Hudson MC, Kellam JF, Ramp WK (2000)** In vivo internalization of *Staphylococcus aureus* by embryonic chick osteoblasts. *Bone* 26(1): 63-70
- Rich KA, Burkett C, Webster P (2003)** Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy. *Cell Microbiol* 5(7): 455-468

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-5467
- Schagger H, von Jagow G (1987)** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166(2): 368-379
- Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z (2007)** Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *Embo J* 26(7): 1749-1760
- Schmid D, Munz C (2007)** Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity* 27(1): 11-21
- Schnaith A, Kashkar H, Leggio SA, Addicks K, Kronke M, Krut O (2007)** *Staphylococcus aureus* subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death. *J Biol Chem* 282(4): 2695-2706
- Schroder A, Schroder B, Roppenser B, Linder S, Sinha B, Fassler R, Aepfelbacher M (2006)** *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein-A induces motile attachment sites and complex actin remodeling in living endothelial cells. *Mol Biol Cell* 17(12): 5198-5210
- Scott RC, Schuldiner O, Neufeld TP (2004)** Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev Cell* 7(2): 167-178
- Silva J, Chang K, Hannon GJ, Rivas FV (2004)** RNA-interference-based functional genomics in mammalian cells: reverse genetics coming of age. *Oncogene* 23(51): 8401-8409
- 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(2): 101-117
- Steinberger P, Andris-Widhopf J, Buhler B, Torbett BE, Barbas CF, 3rd (2000)** Functional deletion of the CCR5 receptor by intracellular immunization produces cells that are refractory to CCR5-dependent HIV-1 infection and cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(2): 805-810
- Straub M, Bredschneider M, Thumm M (1997)** AUT3, a serine/threonine kinase gene, is essential for autophagocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 179(12): 3875-3883
- Subramani S, Farre JC (2007)** A ubiquitin-like protein involved in membrane fusion. *Cell* 130(1): 18-20
- Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y (2001)** The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *Embo J* 20(21): 5971-5981
- Suzuki K, Kubota Y, Sekito T, Ohsumi Y (2007)** Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells* 12(2): 209-218

- Suzuki K, Ohsumi Y (2007)** Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett 581(11): 2156-2161
- Swanson MS (2006)** Autophagy: eating for good health. J Immunol 177(8): 4945-4951
- Tanaka T, Rabbitts TH (2003)** Intrabodies based on intracellular capture frameworks that bind the RAS protein with high affinity and impair oncogenic transformation. Embo J 22(5): 1025-1035
- Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lullmann-Rauch R, Janssen PM, Blanz J, von Figura K, Saftig P (2000)** Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. Nature 406(6798): 902-906
- Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E (2005)** Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. Autophagy 1(2): 84-91
- Tanida I, Mizushima N, Kiyooka M, Ohsumi M, Ueno T, Ohsumi Y, Kominami E (1999)** Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. Mol Biol Cell 10(5): 1367-1379
- Tanida I, Tanida-Miyake E, Komatsu M, Ueno T, Kominami E (2002)** Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. J Biol Chem 277(16): 13739-13744
- Tanida I, Wakabayashi M, Kanematsu T, Minematsu-Ikeguchi N, Sou YS, Hirata M, Ueno T, Kominami E (2006)** Lysosomal turnover of GABARAP-phospholipid conjugate is activated during differentiation of C2C12 cells to myotubes without inactivation of the mTor kinase-signaling pathway. Autophagy 2(4): 264-271
- Thumm M, Egner R, Koch B, Schlumpberger M, Straub M, Veenhuis M, Wolf DH (1994)** Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett 349(2): 275-280
- Tomoda T, Bhatt RS, Kuroyanagi H, Shirasawa T, Hatten ME (1999)** A mouse serine/threonine kinase homologous to *C. elegans* UNC51 functions in parallel fiber formation of cerebellar granule neurons. Neuron 24(4): 833-846
- Tooze J, Hollinshead M, Ludwig T, Howell K, Hoflack B, Kern H (1990)** In exocrine pancreas, the basolateral endocytic pathway converges with the autophagic pathway immediately after the early endosome. J Cell Biol 111(2): 329-345
- Tse E, Lobato MN, Forster A, Tanaka T, Chung GT, Rabbitts TH (2002)** Intracellular antibody capture technology: application to selection of intracellular antibodies recognising the BCR-ABL oncogenic protein. J Mol Biol 317(1): 85-94
- Tsukada M, Ohsumi Y (1993)** Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett 333(1-2): 169-174
- Tuschl T, Borkhardt A (2002)** Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. Mol Interv 2(3): 158-167
- Visintin M, Settanni G, Maritan A, Graziosi S, Marks JD, Cattaneo A (2002)** The intracellular antibody capture technology (IACT): towards a consensus sequence for intracellular antibodies. J Mol Biol 317(1): 73-83

- Wagner RW, Flanagan WM (1997)** Antisense technology and prospects for therapy of viral infections and cancer. *Mol Med Today* 3(1): 31-38
- Wang CW, Kim J, Huang WP, Abeliovich H, Stromhaug PE, Dunn WA, Jr., Klionsky DJ (2001)** Apg2 is a novel protein required for the cytoplasm to vacuole targeting, autophagy, and pexophagy pathways. *J Biol Chem* 276(32): 30442-30451
- Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, Kolonay JF, Shetty J, Killgore GE, Tenover FC (2003)** Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 302(5650): 1569-1571
- Xie Z, Nair U, Klionsky DJ (2008a)** Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell* 19(8): 3290-3298
- Xie Z, Nair U, Klionsky DJ (2008b)** Dissecting autophagosome formation: the missing pieces. *Autophagy* 4(7): 920-922
- Yan J, Kuroyanagi H, Kuroiwa A, Matsuda Y, Tokumitsu H, Tomoda T, Shirasawa T, Muramatsu M (1998)** Identification of mouse ULK1, a novel protein kinase structurally related to *C. elegans* UNC-51. *Biochem Biophys Res Commun* 246(1): 222-227
- Yan J, Kuroyanagi H, Tomemori T, Okazaki N, Asato K, Matsuda Y, Suzuki Y, Ohshima Y, Mitani S, Masuho Y, Shirasawa T, Muramatsu M (1999)** Mouse ULK2, a novel member of the UNC-51-like protein kinases: unique features of functional domains. *Oncogene* 18(43): 5850-5859
- Yorimitsu T, Klionsky DJ (2005)** Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2: 1542-1552
- Young AR, Chan EY, Hu XW, Kochl R, Crawshaw SG, High S, Hailey DW, Lippincott-Schwartz J, Tooze SA (2006)** Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci* 119(Pt 18): 3888-3900
- Yu L, Strandberg L, Lenardo MJ (2008)** The selectivity of autophagy and its role in cell death and survival. *Autophagy* 4(5): 567-573
- Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D (1998)** Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery. *J Virol* 72(12): 9873-9880

Anhang

Tabelle A1: Optimierung der Klonierungsschritte für pEntry und pDest scFv Bibliothek

	pEntry scFv Bibliothek	pDest scFv Bibliothek
molaes Verhältnis	1 : 1 scFv-Gen : pENTRY-EGFP	2 : 1 pENTRY-scFv-EGFP : pDEST
DNA-Aufreinigung	EtOH-Präzipitation, Aufnahme in H ₂ O	EtOH-Präzipitation, Aufnahme in H ₂ O
Transformations-Protokoll	<i>E. coli</i> ElektroMax DH5 α (Invitrogen)	<i>E. Coli</i> Stbl 3 eigenes Protokoll
max. Effizienz	ca. $7,6 \times 10^7$ (cfu/Transformation)	ca. $2,8 \times 10^6$ (cfu/Transformation)

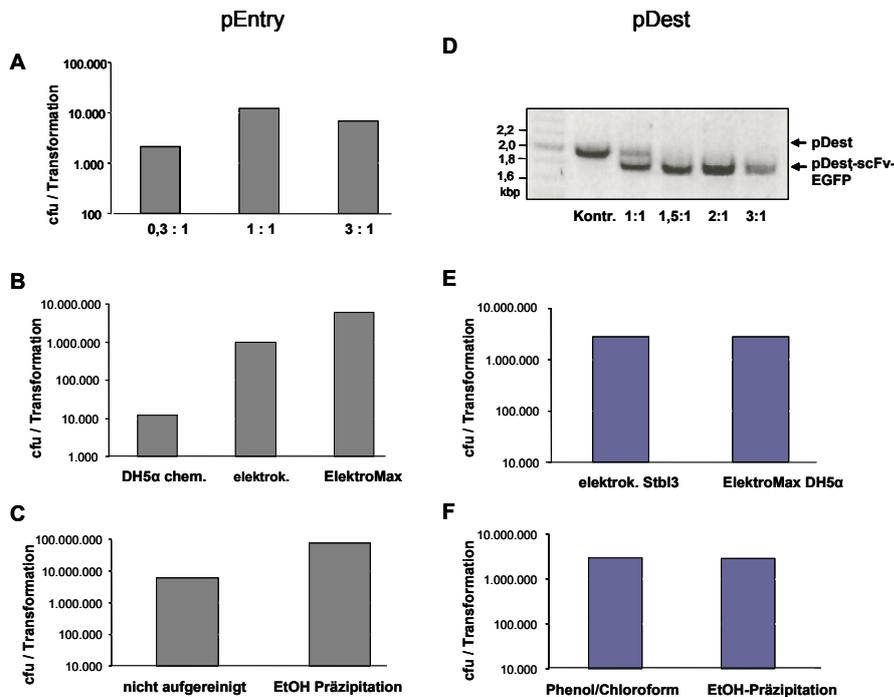
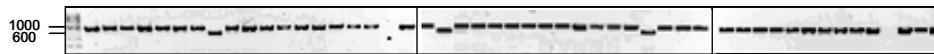
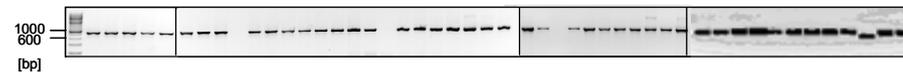
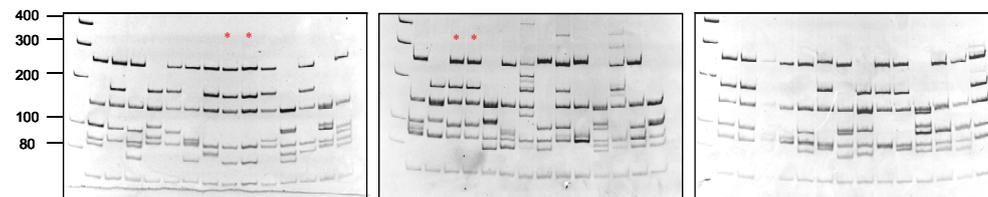
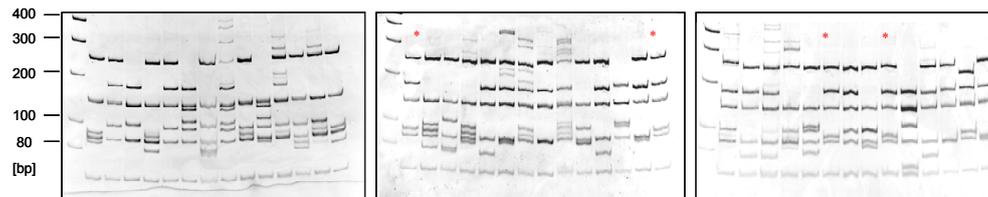


Abbildung A1: Optimierung der Klonierungsschritte von pEntry und pDest-Bibliothek

A) Zur Optimierung des molaren Verhältnisses wurden scFv-Fragmente und pEntry-EGFP Vektor im angegebenen Verhältnis ligiert und in chemisch kompetente DH5 α transformiert. **B)** Gleiche Mengen einer Ligationreaktion wurden durch Hitzeschock in chemisch kompetente oder nach eigenem Protokoll präparierte und ElektroMax (Invitrogen) DH5 α transformiert. **C)** Gleiche Mengen der Ligationreaktion wurden unbehandelt oder nach EtOH-Präzipitation in ElektroMax DH5 α transformiert. **D)** LR-Rekombinationsreaktionen wurden im angegebenen molaren Verhältnis von pEntry-scFv-EGFP und pDest Vektor angesetzt und nach der Inkubation durch PCR mit den vektorständigen Primern pDest-CMV-SP und pDest-ASP amplifiziert. **E)** Gleiche Mengen einer LR-Reaktion wurden in selbst präparierte Stbl3 und gekaufte ElektroMax (Invitrogen) DH5 α transformiert. **F)** Gleiche Mengen der LR-Rekombinationsreaktion wurden nach Phenol/Chloroform oder nach EtOH-Präzipitation in Stbl3 Bakterien transformiert. Die Anzahl an Kolonien wurde als *colony forming units* pro Transformationsansatz (cfu/Transformation) dargestellt.

A**Bibliothek I****Bibliothek J****B****Bibliothek I****Bibliothek J****Abbildung A2: Qualitätskontrolle der Tomlinson Bibliotheken I und J**

A) Bakterien der sekundären Tomlinson Phage Display Bibliotheken I+J wurden über Nacht auf LB Platten kultiviert. Je 50 bzw. 48 Kolonien der Bibliotheken I bzw. J wurden durch Colony PCR mit den plamidständigen Primern pHEN und pBMP amplifiziert und auf 1,5%igen TAE-Agarosegelen analysiert. **B)** Je 42 PCR Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen FspBI, HinfI, MboI und RsaI 3 Stunden bei 37°C verdaut und auf einem 3,5%igem vertikalen TBE Gel aufgetrennt. PCR Produkte, die ähnliche Muster aufwiesen, wurden zusätzlich sequenziert.

A	V _H 3:	CDR2	CDR3	V _K 1: CDR2	CDR3		
A6	S	I QFS	G S R T T	VHGQ	S A S T	ALKM P P	→LibJ
A7	G	I NLK	G G K T T	RGPQ	D A S S	SITP P A	→LibJ
A8	D	I STY	G Y S T S	TGNS	N A S T	YCAS P A	→Lib I
A9	A	I *SN	G A A T T	LNLT	R A S V	QRHP P P	→LibJ
A10	D	I S * S	G E P T T	GKTR	D A S Q	PLQQ P Q	→LibJ
A11	A	I SAS	G T A T G	TYSS	Y A S S	TNDT P A	→Lib I
A12	C	I SNA	G N G T G	STDT	G A S S	TSSY P A	→Lib I
B1	T	I GAC	G A T T N	SCGN	S A S S	SGYS P T	→Lib I
B2	T	I ASC	G Y N T Y	TSDN	G A S S	GDSG P T	→Lib I
B3	D	I ATA	G G T T S	NAAA	Y A S D	TSSN P S	→Lib I
B4	G	I TND	G N A T D	NDAS	A A S T	YNNY P D	→Lib I
B5	S	I GSN	G T A T T	DSST	N A S S	TSYN P Y	→Lib I
B7	A	I RIT	G Y L T T	SQTK	V A S S	RERS P F	→LibJ
B9	*	I RDA	G R P T K	V* RP	N A S R	QLTR P A	→LibJ
B10	A	I TDT	G T A T A	NADG	S A S Y	NDSA P T	→Lib I
D1	D	I GTS	G T Y T S	TGYS	A A S S	DADN P S	→Lib I
D3	S	I TLL	G X X T X	NNDA	D A S Y	YYSS P A	→LibJ
D4	T	I VGS	G S V T S	NVRR	A A S S	SYST P N	→LibJ
D5	A	I *PS	G R P T A	RPPS	A A S S	EPHH P C	→LibJ
D6	S	I PSL	G G H T D	LSHP	A A S V	QLEE P D	→LibJ
D8	N	I ATG	G T N T S	TSSG	Y A S S	CSDD P A	→Lib I
D10	S	I SGS	G G T T K	NNSS	S A S T	DSCS P A	→LibJ
D11	M	I TP*	G P Y T E	SQGP	S A S K	PRPK P G	→LibJ
D12	C	I NNS	G S S T A	TTCA	N A S Y	STNS P A	→Lib I
E1	N	I SAG	G T Y T A	SGSS	T A S N	TSTS P S	→Lib I
E2	S	I LAQ	G H E T S	DELT	R A S T	FMSL P N	→LibJ
F6	N	I GAA	G V R T D	TPVS	G A S H	PPGH P Q	→LibJ
F7	S	I SRE	G Q* T G	TWSK	A A S L	RVNA P Q	→LibJ
F8	T	I NAD	G D Y T T	DATN	S A S G	YYNC P C	→Lib I
F9	A	I YNT	G T T T D	NDTD	A A S S	GTTS P Y	→Lib I
F11	P	I VPS	G R P T L	FPFR	T A S A	LSLP P T	→LibJ
F12	D	I GYN	G S N T G	LPY	S A S K	PRPK P G	→LibJ
G2	S	I SSS	G A D T D	SAAS	T A S T	SGSS P A	→Lib I
G3	G	I GNA	G S S T G	GAA*	R A S F	SFTP P A	→LibJ
G4	T	I LTS	G E* T Q	RAPR	A A S S	SYST P N	→LibJ
G5	S	I STY	G N Y T N	SYTG	A A S G	SYST P N	→Lib I
G6	S	I TCN	G T N T N	AYSC	T A S N	GNGS P T	→LibJ
G7	T	I PDQ	G W Q T T	ALND	A A S S	SYST P N	→Lib I
G8	Q	I SSR	G A K T Y	F* WI	K A S T	QKNP P S	→LibJ
G9	G	I TDY	G D T T D	ANNG	S A S N	SYTN P N	→Lib I
G10	T	I RSL	G R P T S	LQSS	A A S H	ASNT P P	→LibJ
G11	A	I QVV	G K Y T S	SAYK	T A S N	SLQP P R	→LibJ

B	V _H 3:	CDR2	CDR3	V _K 1: CDR2	CDR3
1.6	S	ISSNGADTG	SDNS	TASS	AASTPS
	D	ISTTGNSTY	NSGT	SASS	TYDYPP
2.5	N	NIANDGNGTS	NNSA	SASS	DGTYP S
	S	SISFPGGTTL	PAYP	HASL	* VPSPG
	T	TIYANGFTTN	TDYT	AASR	M*HRPH
	S	SISSDGATTS	STTS	QASQ	NLNPPT

C	V _H 3:	CDR2	CDR3	V _K 1: CDR2	CDR3
1.6-A	S	ISSNGADTG	SDNS	TASS	AASTPS
1.6-1	D	ISTTGNSTY	NSGT	SASS	TYDYPP
2.5-1	S	SISSDGATTS	STTS	QASQ	NLNPPT
2.5-2	S	SISSDGATTS	STTS	QASQ	NLNPPT
2.5-3	S	SISSDGATTS	STTS	QASQ	NLNPPT
2.5-4	S	SISSDGATTS	STTS	QASQ	NLNPPT

Abbildung A3: Sequenzen der scFv-Gene

A) Qualitätskontrolle der pDest-scFv Bibliothek: Aus 42 randomisierten Bakterienkolonien der pDest-scFv Bibliothek wurde die Plasmid-DNA isoliert und mit dem pDest/CMV-SP bzw. pDest/V5-ASP Primer sequenziert. **B)** Die genomische DNA der isolierten Zellklone 1.6 und 2.5 wurde präpariert und die scFv-Gene wurden mittels PCR mit den Primern pDest/CMV-SP und pDest/V2-ASP amplifiziert und erneut in den pEntry-EGFP Vektor kloniert. Einzelne pEntry-scFv-EGFP Klone wurden mit dem Primer pEntry-SP bzw. EGFP-ASP sequenziert. **C)** Die genomische DNA der reklonierten scFvs der Zellklone 1.6 und 2.5 wurden isoliert, mit den Primern pDest/scFv-SP und EGFP-ASP amplifiziert, aufgereinigt und mit dem Primer pDest/scFv-SP sequenziert.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel angegeben und die Stellen in der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen – die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Martin Krönke und Prof. Dr. Jonathan C. Howard betreut worden.