

Spontane bakterielle Keratitis in CD36^{-/-} Knockout- Mäusen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von: Julia Klocke
geboren am: 05.02.1984 in Berlin

angefertigt: an der Universität Leipzig, Klinik und Poliklinik für
Augenheilkunde, Leipzig / Schepens Eye Research Institute,
Boston, USA

Betreuer: Professor Dr. med P. Wiedemann
M. Gregory –Ksander, Ph.D.

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: **20.03.2012**

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Bibliographische Zusammenfassung..... | I |
| Abkürzungsverzeichnis..... | II |
| Abbildungsverzeichnis..... | III |
| 1. Einführung..... | 4 |
| 1.1 Die Schutzmechanismen des Auges..... | 5 |
| 1.2 Bakterielle Keratitis..... | 7 |
| 1.2.1 <i>In vivo</i> Modelle..... | 8 |
| 1.3 Der Scavenger- Rezeptor CD36..... | 9 |
| 1.3.1 CD36 als Ko- Rezeptor von TLR2..... | 10 |
| 1.3.2 CD36 als Rezeptor von Diacylglyceriden..... | 10 |
| 1.3.3 CD36 als phagozytischer Rezeptor von <i>Staphylococcus aureus</i> | 10 |
| 1.3.4 CD36 als Rezeptor von TSP1 und seine Rolle in der Aufrechterhaltung..... der Avaskularität der Kornea | 11 |
| 1.3.5 CD36 und seine Rolle in der Migration und Adhäsion epithelialer Zellen..... | 11 |
| 1.4 Arbeitshypothese..... | 12 |
| 2. Publikation..... | 16 |
| 3. Zusammenfassung..... | 25 |
| 4. Literaturverzeichnis..... | 30 |
| 5. Eigenständigkeitserklärung..... | 33 |
| 6. Curriculum Vitae..... | 34 |
| 7. Danksagung..... | 36 |

Bibliographische Zusammenfassung

Name: Julia Klocke

Titel: **Spontane bakterielle Keratitis in CD36^{-/-} Knockout Mäusen**

Universität Leipzig, Dissertation

S.: 36; Lit.: 59; Abb.: 3

Referat:

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Ursachen für die spontane Entstehung bakterieller Keratitis in CD36^{-/-} Knockout Mäusen untersucht. CD36 ist ein Scavenger- Rezeptor der Klasse B und unter anderem für die Homöostase der epidermalen Barriere zuständig. Ziel dieser Arbeit war es (i), herauszufinden, ob CD36 notwendig für die Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere bei Infektionen ist und (ii) ob Mäuse, denen CD36 fehlt, eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Keratitiden zeigen. Dazu wurden zunächst die Augen von CD36^{-/-}, TLR2^{-/-}, TSP-1^{-/-} Knockout Mäusen sowie C57BL/6 WT Mäusen im Alter von 2-25 Monaten mit Hilfe einer Spaltlampe oder *ex vivo* überprüft und ihre Augen anhand der Schwere der Korneaveränderungen in die Kategorien I-III eingeteilt. Es wurde der Beweis erbracht, dass es sich bei den Korneopathologien der Kategorie III in CD36^{-/-} Knockout Mäusen um bakterielle Keratitiden handelt, die durch das Bakterium *Staph. xylosus* ausgelöst wurden. Anschließend wurde die Integrität der Muzinschicht sowie der epithelialen Barriere, bestehend aus Tight Junctions, mit Hilfe von Rose Bengal- und LC- Biotin- Färbungen in diesen Mäusen untersucht. Um die Affinität von Bakterien zu den Korneae von CD36^{-/-} Knockout Mäusen zu testen, wurde ein FITC-konjugierter *Staph. aureus* Stamm genutzt.

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, dass CD36^{-/-} Knockout Mäuse unabhängig von TSP-1 und TLR2 mit zunehmendem Alter einen zentralen Defekt der Kornea ausbilden, welcher sich zu einer fulminanten bakteriellen Keratitis entwickelt. Das Fehlen von CD36 führt zu (i) Defekten in der Muzinschicht und Verlust der Tight Junctions, (ii) Infiltration von Makrophagen und (iii) vermehrtes Binden gram-positiver Bakterien an die Kornea der betroffenen Tiere.

Diese Arbeit ist der erste Bericht über spontane bakterielle Keratitiden in Mäusen.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CFU | Colony Forming Units, Kolonie-bildende-Einheiten |
| engl. | englisch |
| EZM | Extrazellulärmatrix |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| GP IV | Glykoprotein IV |
| kD | kilo Dalton |
| lat. | lateinisch |
| LDL | Low Density Lipoprotein |
| LTA | Lipoteichonsäure |
| mind. | mindestens |
| MMP | Matrix Metalloproteinase |
| NF- κ B | nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells |
| Staph. aureus | Staphylococcus aureus |
| Staph. xylosus | Staphylococcus xylosus |
| TLR | Toll-like Rezeptor |
| TNF α | Tumor necrosis factor α |
| TSP-1 | Thrombospondin1 |
| s.o. | siehe oben |
| vgl. | vergleiche |

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kornea beim Menschen

Abbildung 2: Aufbau des CD36 Rezeptors

Abbildung 3: Stadien in der Entstehung einer bakteriellen Keratitis

1. Einführung

Aufgrund seiner exponierten Lage ist das Auge leicht verwundbar und anfällig für Infektionen, ausgelöst durch Bakterien und Viren.

Staphylococcus aureus ist der häufigste Erreger der bakteriellen Keratitis beim Menschen¹⁻⁸. Diese Krankheit ist eine häufig vorkommende und ernstzunehmende Infektion des Auges. Sie stellt einen klinischen Notfall dar, welcher im schlimmsten Fall bis zur Erblindung des betroffenen Auges führen kann⁶.

Die Kornea schützt sich physiologisch durch unterschiedliche Mechanismen vor der Besiedelung mit Bakterien. Zu diesen Schutzmechanismen gehören unter anderem die Muzine des Tränenfilms und die Tight Junctions des Korneaepithels^{9, 10}. Bakterielle Keratitiden entwickeln sich nur, wenn ein Defekt dieser Schutzschichten vorliegt¹¹.

Um diese Infektionskrankheit zu untersuchen stehen bisher verschiedene *in vivo* Modelle zur Verfügung^{6, 12, 13}. Aufgrund der bestehenden Schutzmechanismen ist es allerdings schwierig, eine bakterielle Keratitis in den Augen der Versuchstiere zu induzieren. Um die schützende Barriere experimentell zu umgehen, muss das Korneaepithel entweder durch manuell zugeführte Kratzer verletzt^{6, 13, 14} oder durch bakterielle, intrastromale Injektionen umgangen werden¹⁵. Zusätzlich müssen große, nicht physiologische Mengen an Bakterien ($1-4 \times 10^8$ CFU) auf die Kornea appliziert werden¹¹.

Anhand der bekannten Tiermodelle war es bisher nicht möglich, die frühen Stadien der Infektion, Adhäsion und Invasion unter physiologisch korrekten Bedingungen zu studieren. Diese Arbeit stellt ein neues *in vivo* Modell vor, in dem die Versuchstiere spontan an einer bakteriellen Keratitis erkranken.

CD36^{-/-} Knockout- Mäuse entwickeln einen Korneadefekt. Dieser Defekt tritt mit fortschreitendem Alter der Versuchstiere gehäuft auf und zeigt eine Progredienz des Schweregrades. Bakterien der Standortflora von Mäusen (*Staphylococcus xylosus*) binden spontan an die Kornea dieser Tiere und induzieren eine Infektion. Dabei ist weder eine Verletzung der Kornea erforderlich, noch müssen zusätzlich Bakterien appliziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Oberflächenrezeptor CD36 in seiner bisher unbekanntenen Funktion als wichtiger Bestandteil der Schutzmechanismen des Auges vorgestellt. Das Fehlen dieses Rezeptors führt zu einer Zerstörung der Muzinschicht und der epithelialen Barriere der Kornea, so dass Bakterien an die Kornea binden und die Entstehung einer Keratitis induzieren können. Weitere mögliche Ursachen für die spontane Entstehung kornealer Defekte und darauf folgend bakterieller Keratitis in CD36^{-/-} Knockout- Mäusen werden in dieser Arbeit ebenfalls diskutiert. So könnte die Funktion von CD36 als Ko- Rezeptor von TLR2 (Toll-like-Rezeptor 2) und damit seine Beteiligung an der Immunantwort auf infiltrierende Bakterien ursächlich sein. Auch die Interaktion zwischen CD36 und TSP1 (Thrombospondin- 1) in seiner Rolle als antiangiogenetischer Faktor wäre als Verstärkungsfaktor vorstellbar. Des Weiteren wird die Rolle von CD36 in Adhäsion und Migration epithelialer Zellen sowie die Beteiligung infiltrierender Makrophagen als mögliche Ursache diskutiert.

1.1 Die Schutzmechanismen des Auges

Das Auge besitzt verschiedene Mechanismen, um sich vor der bakteriellen Besiedelung zu schützen. Dabei spielt unter anderem der Aufbau des Tränenfilms in dem Muzine zu finden sind ¹⁶ sowie der Aufbau der Kornea eine wichtige Rolle. Vor allem das Korneaepithel bildet mit Hilfe seiner Tight Junctions eine dichte Barriere gegen Bakterien ¹⁷.

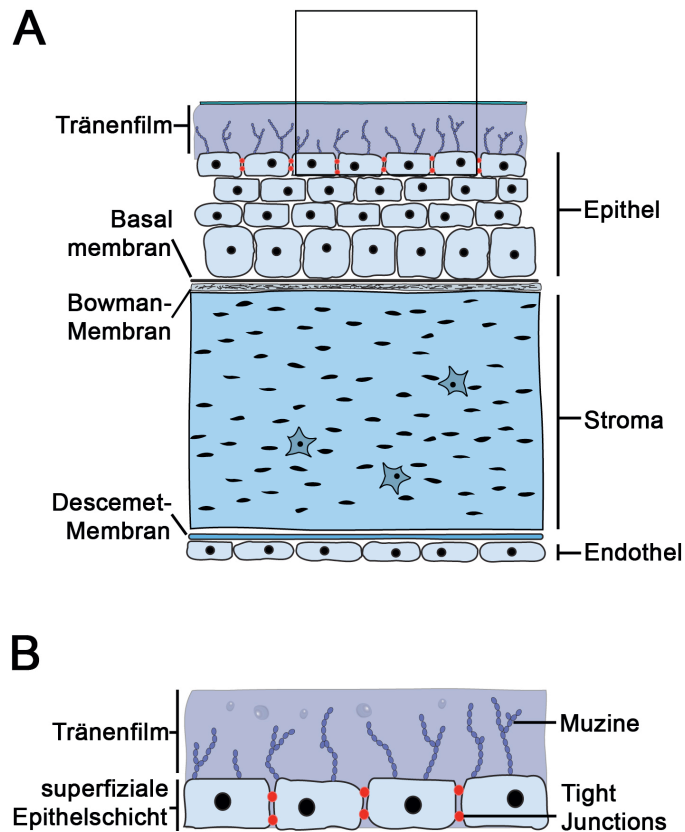


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Kornea beim Menschen

(A) Aufbau der Kornea mit angrenzendem Tränenfilm. Die Kornea besteht aus drei Schichten: Epithel, Stroma, Endothel. Die Schichten werden durch Membranen voneinander getrennt. Die Basalmembran trennt Epithel und Stroma, die Descemet-Membran Stroma von Endothel. Bei Menschen liegt eine zusätzliche Membran, die Bowman-Membran, zwischen Basalmembran und Stroma. Im Stroma findet man neben extrazellulärer Matrix auch Keratozyten. Der Kasten im oberen Epithel markiert den in C vergrößerten Abschnitt.

(B) Vergrößerung der superfizialen Epithelschicht. Auf der Oberfläche des Epithels findet man Muzine, die das Binden von Bakterien verhindern. Zwischen den Zellen der superfizialen Schicht liegen Tight Junctions, welche die epitheliale Barriere bilden und eine Invasion von Bakterien verhindern.

Die Kornea gliedert sich in drei verschiedene Abschnitte (vgl. Abb. 1A): Ein mehrschichtiges nicht verhornendes Plattenepithel, welches gefolgt von dem breiten Stroma mit einem einschichtigen Endothel abschließt. Auf der äußersten Schicht des Epithels findet man membrangebundene Muzine, die das Binden von Bakterien an die Korneaoberfläche verhindern (vgl. Abb. 1A und 1B). Zwischen den Zellen der superfizialen Epithelschicht liegen Tight Junctions (lat. Zonula occludens) (vgl. Abb. 1A und 1B). Hierbei handelt es sich um Proteinkomplexe, die unter physiologischen Bedingungen eine dichte Barriere bilden. Trotzdem ermöglicht diese Schicht den parazellulären Transport von Molekülen über das Epithel und wird daher auch als Diffusionsbarriere bezeichnet¹⁸.

Des Weiteren findet man im Epithel Langerhans-Zellen, welche in der Lage sind, Antigene zu erkennen, zu phagozytieren und letztendlich dem Immunsystem zu präsentieren. Sie sind hauptsächlich in der Peripherie der Kornea zu finden¹⁹ und sind unter anderem für die Aktivierung der B- und T-Lymphozyten zuständig²⁰.

Der Basalmembran des Epithels folgt beim Menschen eine Ansammlung von Kollagenfibrillen und Proteoglykanen, die sogenannte Bowman-Membran (Lamina

limitans anterior) (vgl. Abb. 1A). Diese ist nicht bei allen Säugetieren ausgebildet. Mäuse besitzen beispielsweise keine Bowman- Membran²¹.

Das Stroma, welches an die Bowman- Membran anschließt, macht 90% der Dicke der Kornea aus. Der Großteil des Stromas besteht aus Extrazellulärmatrix und einigen Keratozyten (vgl. Abb. 1A). Lediglich nach Aktivierung des Immunsystems wandern Immunzellen in das Stroma ein.

Eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung bakterieller Keratitiden ist die Möglichkeit der Bakterien, an die Kornea zu binden und das Stroma zu infiltrieren. Dies wird normalerweise durch die Muzine und die Tight Junctions verhindert^{17, 22}.

1.2 Bakterielle Keratitis

Eine bakterielle Keratitis, ausgelöst durch *Staph. aureus*, wird aufgrund möglicher schwerer Komplikationen als klinischer Notfall eingestuft. Häufige Risikofaktoren stellen Traumata der Kornea dar²⁰. Schon kleinste Kratzer auf der Oberfläche, die manchmal schon durch den Gebrauch von Kontaktlinsen verursacht werden, ermöglichen das Binden opportunistischer Erreger, deren Invasion in das Stroma und die dortige Auslösung einer Entzündung.

Staphylococcus- Keratitiden führen häufig zu einer lokalen Inflammation und damit zur Zerstörung des Gewebes. Dafür verantwortlich sind zum einen die Toxine des Bakteriums, aber auch die Immunantwort des Gewebes. Diese führt zu einer rasch fortschreitenden Gewebszerstörung³. In der avaskulären Kornea erreichen neutrophile Granulozyten, die normalerweise im Limbus und der Konjunktiva anzutreffen sind¹⁵, das Gebiet der Infiltration über zytokingesteuerte Chemotaxis durch das Stroma²³ und den Tränenfilm^{24, 25}.

Narbenbildung der Kornea und daraus folgend eine Verminderung der Sehschärfe können Komplikationen einer bakteriellen Keratitis sein. Im schlimmsten Fall bildet sich ein Abszess. Penetriert dieser, kommt es zu schwersten Endophthalmitiden und teilweise zum Verlust des gesamten Auges⁶.

1.2.1 *In vivo* Modelle

Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Tiermodelle entwickelt, um die Entstehung einer bakteriellen Keratitis *in vivo* zu studieren^{6, 12, 13}.

Es war allerdings stets eine Verletzung des Epithels notwendig, damit die Bakterien das Stroma infiltrieren- und eine Infektion auslösen konnten (s.o.).

Die Verletzung des Epithels wurde zu diesem Zweck meist durch Zerkratzen der Kornea herbeigeführt⁶. Andere Arbeitsgruppen führten an Teilen der Kornea eine Keratektomie durch¹⁴. Auf diese Verletzungen wurden die Bakterien dann entweder direkt appliziert⁶ oder es wurden Kontaktlinsen, die zuvor mit Bakterien inkubiert wurden, auf das Auge aufgebracht¹³. Hierzu wurde eine Bakterienzahl von mind. $1-4 \times 10^8$ CFU benötigt. Kleinere Bakterienmengen waren bei diesen Methoden nicht in der Lage, eine Infektion auszulösen^{6, 11}.

Eine weitere Möglichkeit eine bakterielle Keratitis zu induzieren, ist die direkte intrastromale Injektion von Bakterien. Mit dieser Technik wird eine Verletzung des Epithels umgangen. Hierbei sind kleinere Mengen von Bakterien ausreichend. Eine Injektion von 100 CFUs in das Stroma führt bereits zu einer schweren Keratitis und ist charakterisiert durch bakterielle Replikation und schwere okuläre Veränderungen wie korneale Ödeme, Zerstörung des Korneaepithels, Iritis und die Migration von Neutrophilen¹⁵.

Bisher konnte man mit den beschriebenen Techniken die späten Stadien der bakteriellen Keratitis wie z. B die Wirts- Immunantwort untersuchen, allerdings ist dabei zu beachten, dass der Versuchsaufbau weit entfernt von der physiologischen Situation ist. Die zugeführten Wunden des Epithels sind sehr groß und es muss eine nicht physiologische Bakterienmenge ($1-4 \times 10^8$ CFU) appliziert werden¹¹.

Die frühen Stadien der Infektion, Adhäsion und Infiltration, konnten mit den bisherigen Methoden nicht erforscht werden.

1.3 Der Scavenger- Rezeptor CD36

Der Oberflächenrezeptor CD36 (Glykoprotein GPIV) gehört zu der Familie der Scavenger-Rezeptoren (scavenger engl. für Fress- Zelle). Insgesamt sind acht verschiedene Klassen von Scavenger- Rezeptoren bekannt: A, B, C, D, E, F, G, H ^{26, 27}. Diese Rezeptoren können sowohl membrangebunden als auch gelöst vorliegen und besitzen verschiedenste Aufgaben. Die Funktion, durch die diese Rezeptoren bekannt geworden sind, ist das Binden von modifizierten LDLs (Low Density Lipoprotein), wie zum Beispiel acetyliertes oder oxidiertes LDL ²⁸.

CD36 ist ein 88kD schweres Glykoprotein und gehört zu der Scavenger Rezeptorklasse B.

Es ist ein membrangebundener Rezeptor mit zwei transmembranen Domänen, einer extrazellulären Schleife, welche viele Glykosylierungsstellen besitzt, und zwei kurzen intrazellulären Schwänzen: $-COOH$ und $-NH_2$ ²⁹. Die Liganden- bindende Domäne befindet sich laut Puente Navazo et al. ³⁰ höchstwahrscheinlich im extrazellulären Teil des Rezeptors. Aber auch das intrazellulär liegende $-COOH$ Ende stellt eine Bindungsstelle dar ³¹.

CD36 wird auf vielen unterschiedlichen Zellen exprimiert. Er ist auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen, Thrombozyten, Adipozyten, Kardiomyozyten und einigen Epithel- und Endothelzellen zu finden ³². Auch im Epithel der Kornea konnte der Rezeptor nachgewiesen werden ^{9, 10, 32}.

Zu den Liganden von CD36 zählen unter anderem TSP-1, oxidierte LDLs, oxidierte Phospholipide und apoptotische Zellen ³³. Auch LTA (Lipoteichonsäure), eine Zellwandkomponente des gram- positiven Bakteriums *Staph. aureus* gehört zu den Liganden von CD36 ³⁴.

Des Weiteren werden dem CD36 Rezeptor unterschiedlichste homöostatische und pathologische Funktionen zugeschrieben. So ist dieser Oberflächenrezeptor beteiligt

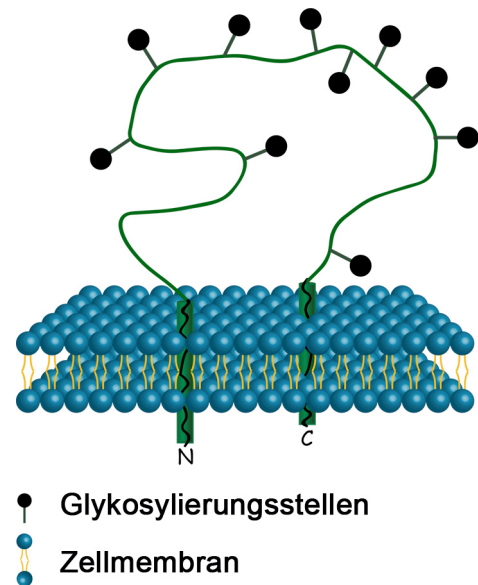


Abbildung 2. Aufbau des CD36 Rezeptors

an Angiogenese, Arteriosklerose, Phagozytose, Inflammation, Lipidmetabolismus und der Aufnahme apoptotischer Zellen³².

1.3.1 CD36 als Ko- Rezeptor von TLR2

Als Ko- Rezeptor von TLR2 ist CD36 bei der Invasion von Bakterien direkt an der Immunantwort des Organismus beteiligt.

CD36 sammelt LTA, eine Zellwandkomponente gram- positiver Bakterien, auf der Zelloberfläche. Durch die anschließende Präsentation seiner Liganden an den TLR2 Rezeptor, bildet dieser Heterodimere mit TLR6. Hierdurch wird eine Signalkaskade eingeleitet, wodurch es zu einer Aktivierung von NF- κ B und dadurch zur Sekretion proinflammatorischer Proteine kommt³⁵.

1.3.2 CD36 als Rezeptor von Diacylglyceriden

Die Arbeitsgruppe um Emma Hoeb war die erste, die 2005 die Funktion von CD36 als Rezeptor mikrobieller Diacylglyceride entdeckte³⁴. Bis dahin waren keine Moleküle bakteriellen Ursprungs als Liganden von CD36 bekannt.

Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass das Binden von Diacylglyceriden an CD36 über TLR2 unter physiologischen Umständen zu einer gesteigerten NF- κ B-Produktion führt. In den Versuchstieren, die eine mutierte Form des CD36 Rezeptors exprimierten, kam es zu einer spontanen Kolonisation der Augen mit *Corynebakterien* und *Staphylococcus lentus*. Nach 6 bis 12 Monaten entwickelte sich daraus eine Endophthalmitis.

Zusätzlich waren diese Tiere nicht in der Lage, intradermal oder intravenöse *Staph. aureus*- Inokula zu bekämpfen. Die Ursache hierfür lag in einer verminderten Makrophagenaktivität, welche durch eine reduzierte TNF α - Produktion nachgewiesen werden konnte.

1.3.3 CD36 als phagozytotischer Rezeptor von *Staphylococcus aureus*

Sowohl Emma Hoeb³⁴, als auch Linda Stuart³¹, fiel die große Ähnlichkeit der Funktion von CD36 und CD14, einem sehr gut erforschten Oberflächenrezeptor, auf. Beide binden Bestandteile bakterieller Membranen, was nach einer Präsentation an ihre TLRs zu einer Aktivierung der Makrophagen führt.

2005 zeigte die Arbeitsgruppe um Linda Stuart, dass CD36 im Gegensatz zu CD14 in der Lage ist, mit Hilfe seines zytoplasmatisch gelegenen –COOH Endes *Staph.*

aureus und dessen LTA zu internalisieren und somit einen phagozytotischen Prozess einzuleiten³⁶.

CD36 ist daher nicht nur ein Oberflächenrezeptor der eine Liganden präsentierende Funktion besitzt, er kann zusätzlich ein gesamtes Bakterium und dessen LTA internalisieren und in Phagosomen/ Endosomen konzentrieren. Nur durch die dortige Aktivierung der TLR2/6- Signalkaskade ist eine vollständige Immunantwort auf infiltrierende Bakterien möglich.

Da durch das Fehlen des Rezeptors in CD36^{-/-} Knockout Mäusen keine vollständige Aktivierung der TLR2/6 Signalkaskade stattfindet, kommt es zu einer nicht ausreichenden Immunantwort, wodurch die Mäuse *Staph. aureus* nicht effizient bekämpfen können.

1.3.4 CD36 als Rezeptor von TSP1 und seine Rolle in der Aufrechterhaltung der Avaskularität der Kornea

Eine weitere Funktion von CD36 ist die Aufrechterhaltung der Avaskularität der Kornea³⁷. Als Rezeptor von TSP-1, einem potenten endogenen Inhibitor der Angiogenese^{29, 38}, ist CD36 direkt daran beteiligt.

Entsprechend wird von Mwaikambo et al.³⁷ davon ausgegangen, dass die Neovaskularisation, welche sie in alternden CD36^{-/-} Knockout Mäusen sahen, auf die Interaktion von CD36 und TSP-1 zurückzuführen ist.

1.3.5 CD36 und seine Rolle in der Migration und Adhäsion epithelialer Zellen

Strikte Regulation der Zell- Migration und Adhäsion ist Voraussetzung für eine funktionierende Homöostase in der Kornea. Um die epitheliale Barriere aufrecht zu erhalten ist es notwendig, dass das Epithel für Erneuerung, Wachstum und Wundheilung als zusammenhängende Schicht migriert³⁹. Studien gehen davon aus, dass CD36 durch Interaktion mit Aktin, Thrombospondin, $\alpha3\beta1$ - und $\alpha6\beta1$ - Integrinen an Adhäsion und Migration beteiligt ist^{31, 40-43}. Kollagen und Thrombospondin sind wichtige Bestandteile der Basalmembran der Kornea⁴⁴. $\alpha3\beta1$ - und $\alpha6\beta1$ - Integrine werden ständig im basalen Epithel exprimiert, wo sie die Verbindungen der Zellen zu Matrixproteinen der Basalmembran vermitteln⁴⁴.

Es konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion der Zellen an die Basalmembran wichtig für das Überleben der Zellen ist. Zellen, die sich hingegen von der Basalmembran lösen, gehen durch Apoptose zu Grunde ⁴⁵.

1.4 Arbeitshypothese

CD36^{-/-} Knockout- Mäuse entwickeln im Laufe ihres Lebens einen zentralen Defekt der Kornea. Anhand des Phänotyps wurden die Augen der Mäuse einer Kolonie in drei unterschiedliche Kategorien eingeteilt. Kategorie I: unauffällige Augen, Kategorie II: Korneae, die eine zentrale Trübung zeigen, bei denen die Iris aber noch sichtbar ist, Kategorie III: Augen mit einer starken Neovaskularisation der Kornea. Aufgrund der großen kornealen Trübung ist hier die Iris nicht mehr sichtbar. Nachdem gezeigt wurde, dass es sich bei den Auffälligkeiten der Kategorie III um bakterielle Keratitis handelt, wurde in dieser Arbeit vor allem die Ursache der Entstehung dieser Korneopathologien untersucht.

Um eine Infektion in der Kornea zu induzieren, müssen Bakterien drei verschiedene Stadien durchlaufen (vgl. Abb. 3). Sie müssen an die Korneaoberfläche binden (vgl. Abb. 3A), um dann in das Epithel der Kornea eindringen zu können ⁴⁶ (vgl. Abb. 3B). Im Stroma müssen sie sich schließlich vervielfältigen (vgl. Abb. 3C) und führen letztlich zu Inflammation und Gewebszerstörung.

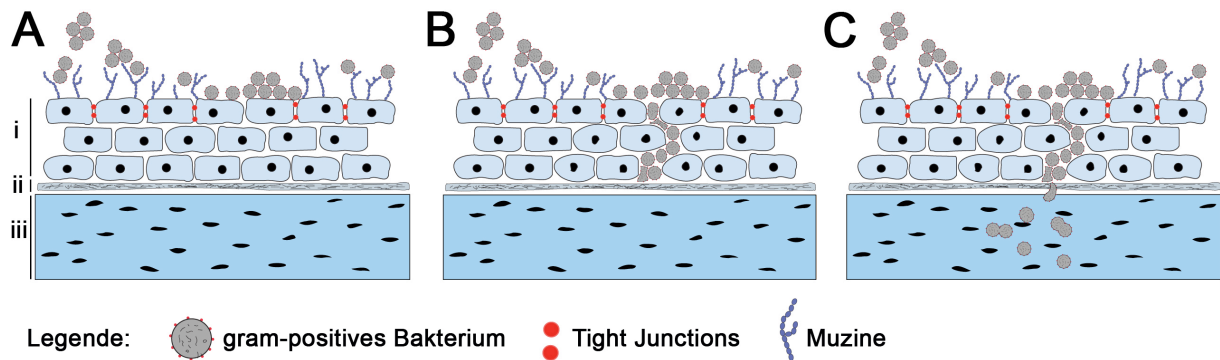


Abbildung 3. Stadien in der Entstehung einer bakteriellen Keratitis

Die Abbildung zeigt die drei verschiedenen Stadien in der Entstehung einer bakteriellen Keratitis. A: Adhäsion, B: Invasion, C: Proliferation. Die Zeichen i-iii beschreiben i: Epithel, ii: Basalmembran, iii: Stroma. **(A) Adhäsion.** Durch Defekte in der Muzinschicht sind Bakterien in der Lage, an die Epitheloberfläche zu binden. **(B) Invasion.** Zerstörte Tight Junctions ermöglichen die Invasion durch das Epithel in das Stroma der Kornea. **(C) Proliferation.** Sie findet im Stroma statt. Die Ausschüttung von Bakterientoxinen aber auch die Immunantwort des Wirtes führen zu einer Gewebszerstörung.

Dem Bakterium *Staph. aureus* ist es normalerweise nicht möglich, an die Oberfläche eines gesunden Auges zu binden. Dies wird durch Muzine, die sich im Tränenfilm und auf der Korneaoberfläche befinden, verhindert¹⁰. Eine Invasion ist aufgrund der epithelialen Tight Junctions nicht möglich⁴⁷.

Falls doch einzelne Bakterien binden und infiltrieren, kommt es durch eine Liganden-Präsentation des Oberflächenrezeptors CD36 an TLR2 zu einer Immunantwort.

CD36^{-/-} Knockout Mäuse entwickeln jedoch spontan einen Defekt der zentralen Kornea, der sich mit zunehmendem Alter zu einer bakteriellen Keratitis entwickelt.

Eine mögliche Erklärung für die Entstehung dieser Infektion könnten insuffiziente Schutzmechanismen der Augen dieser Mäuse sein. Ein Defekt in der Muzinschicht würde dazu führen, dass Bakterien der Standortflora an die Korneaoberfläche binden. Die anheftenden Bakterien könnten durch defekte Tight Junctions das Epithel infiltrieren und im Stroma eine Entzündung auslösen.

CD36^{-/-} Knockout Mäuse mit Defekt der Kornea müssten im Gegensatz zu Mäusen ohne Defekt eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Keratitiden zeigen.

Hoeb et al. konnten 2005 bereits zeigen, dass CD36 ein Rezeptor für mikrobielle Diacylglyceride darstellt und über TLR2 zu einer Aktivierung von Makrophagen führt³⁴.

Die Arbeitsgruppe um Stuart fand heraus, dass die Aktivierung des angeborenen Immunsystems abhängig von dem zytoplasmatisch gelegenen -COOH Ende des

Rezeptors ist. Fehlt CD36, kommt es zu Defekten in der Zytokinantwort und Phagozytose, was zu einer schweren Bakteriämie führt.

Sowohl Hoeb als auch die Arbeitsgruppe um Linda Stuart konnten zeigen, dass CD36 notwendig für die Aktivierung von Makrophagen über die TLR2 Signalkaskade als Antwort auf eine Invasion mit *Staph. aureus* ist. Somit ist CD36 an der direkten Immunantwort des Wirts beteiligt und ein Fehlen dieses Oberflächenrezeptors könnte zu der Entstehung bakterieller Keratitiden beitragen.

CD36 ist nicht nur Ko- Rezeptor für TLR2 ³¹, sondern er bindet auch TSP-1 und verhindert somit die Aktivierung der angiogenetischen Signalkaskade ³⁷.

Mwaikambo et al. gehen davon aus, dass fehlendes Binden von TSP-1 in alternden CD36^{-/-} Knockout Mäusen zur Neovaskularisation in der Kornea führt. Die gleichzeitig damit vergesellschaftete Inflammation in den Korneae dieser Tiere konnten sie nicht erklären. Eine in dieser Arbeit diskutierte Möglichkeit für die Entstehung der Neovaskularisation ist die bakterielle Keratitis in den Augen dieser Tiere. Nicht aufgrund der fehlenden Interaktion von TSP-1 und CD36, sondern wegen der Infektion in den Augen dieser Tiere kommt es zur Neovaskularisation.

Eine mögliche Erklärung für die Entstehung der Defekte der Kategorie II, die einer bakteriellen Keratitis vorausgehen, ist die Beteiligung von CD36 in der Adhäsion und Migration des Epithels ^{31, 41-43}. Ein Fehlen dieses Rezeptors könnte zu einer Lösung der Zellen von der Basalmembran führen, wodurch die Zellen durch Apoptose zugrunde gehen würden ⁴⁵. Es entsteht ein mikroskopisch sichtbarer Defekt der Korneaoberfläche, welcher zusätzlich durch fehlende Tight Junctions und Muzine charakterisiert ist.

Die Entstehung der Pathologien der Kategorie III könnte durch anschließende Besiedelung des Defekts mit Bakterien der Standortflora zu erklären sein.

Ferner werden weitere beteiligende Faktoren, wie z.B. die Rolle infiltrierender und MMPs sezernierender Makrophagen in die Augen von Mäusen, in dieser Arbeit diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass CD36^{-/-} Knockout Mäuse unabhängig von TLR2 und TSP-1 zunächst einen Defekt der Kornea entwickeln. Dieser ist charakterisiert durch (i) Defekte in der Muzinschicht, (ii) zerstörte Tight Junctions, (iii)

infiltrierende Makrophagen direkt unterhalb des Defekts und (iv) Ablösung epithelialer Zellen von der Basalmembran. Aufgrund dieses Defekts entwickelt sich mit zunehmendem Alter der Tiere eine bakterielle Keratitis.

Zusätzlich bietet diese Arbeit ein neues Tiermodell für Studien an bakterieller Keratitis in Mäusen. Die Infektion muss nicht, wie bisher üblich, induziert werden, da sie im vorliegenden Tiermodell spontan auftritt.

Diese Arbeit ist der erste Bericht über eine spontane bakterielle Keratitis in Mäusen.

2. Publikation:

Title: Spontaneous bacterial keratitis in CD36 knockout mice

Author(s): Klocke, J., Barcia, R. N., Heimer, S., Cario, E., Zieske, J., Gilmore, M. S., Ksander, B. R., Gregory, M. S.

Source: Invest Ophthalmol Vis Sci. 52(1):256-63

Published: 2011

References: 47

Language: English

Publisher: The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Inc.

ISSN: 1552-5783 (Electronic)
0146-0404 (Linking)

DOI: 10.1167/iovs.10-5566

Impact Factor: 3,47

Spontaneous Bacterial Keratitis in CD36 Knockout Mice

Julia Klocke,¹ Rita N. Barcia,¹ Susan Heimer,¹ Elke Cario,² James Zieske,¹
Michael S. Gilmore,¹ Bruce R. Ksander,¹ and Meredith S. Gregory¹

PURPOSE. CD36 is a Class B scavenger receptor that is constitutively expressed in the corneal epithelium and has been implicated in many homeostatic functions, including the homeostasis of the epidermal barrier. The aim of this study is to determine (1) whether CD36 is required for the maintenance of the corneal epithelial barrier to infection, and (2) whether CD36-deficient mice present with an increased susceptibility to bacterial keratitis.

METHODS. The corneas of CD36^{-/-}, TSP1^{-/-}, TLR2^{-/-}, and C57BL/6 WT mice were screened via slit lamp microscopy or ex vivo analysis. The epithelial tight junctions and mucin layer were assessed via LC-biotin and Rose Bengal staining, respectively. Bacterial quantification was performed on corneal buttons and GFP-expressing *Staphylococcus aureus* was used to study bacterial binding.

RESULTS. CD36^{-/-} mice develop spontaneous corneal defects that increased in frequency and severity with age. The mild corneal defects were characterized by a disruption in epithelial tight junctions and the mucin layer, an infiltrate of macrophages, and increased bacterial binding. Bacterial quantification revealed high levels of *Staphylococcus xylosum* in the corneas of CD36^{-/-} mice with severe defects, but not in wild-type controls.

CONCLUSIONS. CD36^{-/-} mice develop spontaneous bacterial keratitis independent of TLR2 and TSP1. The authors conclude that CD36 is a critical component of the corneal epithelial barrier, and in the absence of CD36 the barrier breaks down, allowing bacteria to bind to the corneal epithelium and resulting in spontaneous keratitis. This is the first report of spontaneous bacterial keratitis in mice. (*Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:256-263) DOI:10.1167/iovs.10-5566

Although *Staphylococci* are found in the normal flora of the ocular surface, mice are highly resistant to infection and do not develop spontaneous bacterial keratitis. Resistance to a corneal infection is dependent on the presence of multiple barriers that prevent bacterial adhesion and invasion. The disruption of any one of these barriers increases significantly the

susceptibility to infection. Two of the critical barriers are the mucin layer, which prevents bacterial binding to the cornea, and the intercellular tight junctions of the corneal epithelium, which prevent bacterial penetration into the cornea.^{1,2} In the normal cornea, these barriers effectively prevent infection. However, a disruption of these barriers due to injury or disease significantly increases the risk of bacterial keratitis.

CD36 is a Class B scavenger receptor that is expressed on multiple cell types, and recently it was found expressed constitutively on the corneal epithelium.³⁻⁵ CD36 has multiple ligands, including TSP1, oxidized LDLs, oxidized phospholipids, and apoptotic cells.⁴ As a pleiotropic ligand, CD36 has been implicated in multiple homeostatic and pathologic functions, including angiogenesis, atherosclerosis, phagocytosis, inflammation, lipid metabolism, and uptake of apoptotic cells.³ Recently Hardy and colleagues⁴ demonstrated that CD36 prevents corneal neovascularization and helps maintain the avascularity of the cornea. Furthermore they report that CD36^{-/-} mice develop spontaneous corneal neovascularization that increases in severity with age.⁵ However, our data suggest that the neovascularization is not spontaneous but is actually secondary to corneal defects that occur in the epithelium of aged CD36^{-/-} mice.

Herein we report that CD36^{-/-} mice develop spontaneous bacterial keratitis with age. Furthermore, the development of bacterial keratitis is secondary to the breakdown of two critical components of the corneal epithelial barrier to infection: the mucin layer and epithelial tight junctions. Mice are normally highly resistant to bacterial keratitis, and this is the first report of spontaneous keratitis developing in a mouse from resident flora, highlighting a novel function for CD36 in maintaining the corneal epithelial barrier to infection.

METHODS

Animals

Female C57BL/6 WT mice were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). The CD36^{-/-} (C57BL/6 background) mice were originally received from Kathryn J. Moore (Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA).^{6,7} The TSP1^{-/-} mice (C57BL/6 background) were originally received from Jack Lawler (BIDMC, Harvard Medical School, Boston, MA).⁸ All mice were bred and maintained in a pathogen-free facility at Schepens Eye Research Institute and provided with autoclaved tap water and autoclaved standard laboratory chow ad libitum. All animals were treated according to the Association for Research in Vision and Ophthalmology Resolution on the Use of Animals in Research. The Schepens IACUC committee approved all procedures involving mice. Elke Cario provided enucleated eyes from TLR2^{-/-} mice (Tlr2tm1Kir; F10 [C57BL6/J]) housed under pathogen-free conditions at the Central Animal Facility of University Hospital of Essen. All animals were treated in compliance with German law for use of live animals and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the University Hospital of Essen and the responsible district government.

From the ¹Schepens Eye Research Institute, Department of Ophthalmology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts; and ²Division of Gastroenterology and Hepatology, University Hospital of Essen, and Medical School, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany.

Supported by Research to Prevent Blindness Sybil B. Harrington Scholar Award (MSGr), EY016486 (BRK), EY017381 (MSGi), and DFG CA226/4-2 (EC).

Submitted for publication March 22, 2010; revised May 5, 2010; accepted August 3, 2010.

Disclosure: **J. Klocke**, None; **R.N. Barcia**, None; **S. Heimer**, None; **E. Cario**, None; **J. Zieske**, None; **M.S. Gilmore**, None; **B.R. Ksander**, None; **M.S. Gregory**, None

Corresponding author: Meredith S. Gregory, Schepens Eye Research Institute, 20 Staniford Street, Boston, MA 02114; meredith.gregory@schepens.harvard.edu.

Clinical Scoring

A one-time slit lamp examination was performed on each eye of every mouse in our C57BL/6 WT ($n = 87$), CD36^{-/-} ($n = 90$), and TSP1^{-/-} ($n = 83$) colonies. An additional subset of CD36^{-/-} mice ($N = 8$) was used to study disease progression and as such were monitored monthly via slit lamp examinations for 13 months. After slit lamp examination, the eyes were placed into three categories: (1) no corneal defect, clear cornea; (2) mild corneal defect, mild corneal haze in which the iris is still visible; and (3) severe corneal defect, corneal opacity and neovascularization in which the iris is not visible. Enucleated eyes from TLR2^{-/-} mice ($N = 8$ mice) were examined ex vivo using a dissecting microscope.

Histologic Analysis

Mice were euthanatized, and one group of eyes was enucleated, fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin (H&E). A second group of eyes was enucleated and snap-frozen (Tissue-Tek OCT compound; Sakura Finetek, Torrance, CA). The frozen eyes were sectioned at 12- μ m increments and stored at -20°C until ready for use. Macrophages were detected using a rat anti-mouse F4/80 antibody (Caltag, Burlingame, CA). Neutrophils were detected using a rat anti-mouse Ly-6 (GR1) antibody (Pharmingen, San Diego, CA) followed with a Cy3-conjugated goat anti-rat IgG_{2b} antibody (Jackson Laboratories, West Grove, PA). Purified rat IgG_{2b} was used as an isotope control (Pharmingen). A cyanine nucleic acid stain (To-Pro-3; Molecular Probes, Eugene, OR) was used to stain all cells. After immunostaining, tissue sections were mounted (VectaShield Mounting Medium; Vector Laboratories, Burlingame, CA), protected with coverslips, and stored at 4°C until analyzed by confocal microscopy. Immunostained tissue sections were analyzed using a confocal laser scanning microscope (TCS 4D; Leica, Wetzlar, Germany). Gram staining was performed on paraffin-embedded tissues using a Gram stain kit according to the manufacturer's protocol (Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ).⁹

Bacterial Quantification and Identification

To quantify bacterial load in corneas from CD36^{-/-} mice with either no corneal defects, mild defects, or severe defects, we enucleated the eyes, and removed the corneas in a sterile environment. Each cornea was minced with a sterile blade and transferred into an Eppendorf tube containing 100 μ L sterile PBS. Cultures were plated on BHI agar plates (Bacto Brain and Heart Infusion and Difco agar; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) and grown at 37°C overnight. Colonies were counted the following day. Five representative single colonies from each BHI plate were streaked for identification (BBL Chromagar Orientation agar plates; Becton Dickinson) and incubated at 37°C overnight. The bacterial species were preliminarily identified based on colony color (opaque pink) as described in the manufacturer's guidelines (Becton Dickinson).

16S rRNA Sequencing and Analysis

For 16S rRNA gene sequence identification, single colonies from each BHI agar plate (five representative colonies) were suspended in 50 μ L sterile water, and a colony PCR was performed using 16S rRNA gene eubacterial oligonucleotide primers 27F and 1429R (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) as previously described.¹⁰ PCR products were confirmed by electrophoresis through a 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. The 16S rRNA amplicons were sequenced by the DNA Sequencing Center for Vision Research at the Ocular Molecular Genetics Institute, Massachusetts Eye and Ear Infirmary (BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing Ready Reaction mixture; Applied Biosystems, Foster City, CA). All 16S rRNA sequences were compiled using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) analysis.

Rose Bengal Staining

The corneal mucin layer was assessed in CD36^{-/-} and C57BL/6 WT mice using a slightly modified Rose Bengal staining protocol that was originally developed for rabbits.¹¹ Briefly, Rose Bengal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was diluted in sterile saline to make a 0.1% solution. One drop of Rose Bengal was applied to the cornea of anesthetized mice. After one minute of incubation, the drop of Rose Bengal was removed by carefully placing a sponge at the limbus to absorb the excess dye without damaging the corneal surface. The eyes were examined under a slit lamp (Topcon Cooperation, Tokyo, Japan) using white light, and representative pictures were taken.

LC-Biotin Staining

The integrity of the corneal epithelial tight junctions was assessed in CD36^{-/-} and wild-type (WT)-C57BL/6 mice using the LC-biotin staining method as described previously.^{12,13} Briefly, 1 mg/mL stain (EZ-Link-Sulfo-NHS-LC-Biotin; Pierce, Rockford, IL) was dissolved in a salt solution (Hank's Balanced Salt Solution; Lonza, Walkersville, MD) with 2 mM MgCl₂ and 1 mM CaCl₂.¹³ At the time of euthanatization, one drop of LC-biotin was applied to each eye. After 15 minutes, the eyes were rinsed with PBS and enucleated. Eyes were frozen on dry ice (Tissue-Tec O.C.T Compound; Sakura Finetek), and 8 μ m sections were cut using a cryostat. The sections were fixed in acetone, blocked with 1% BSA (bovine serum albumin, Sigma-Aldrich), and incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated streptavidin (1:50 in 1% BSA) and a nuclear dye (TO-PRO-3, 1:1000 in PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) for 1 hour at room temperature. The stained sections were mounted (Vectashield Mounting Medium for Fluorescein; Vector Laboratories), and examined with a confocal laser-scanning microscope (Leica Microsystems).

Staphylococcus aureus Binding Assay

To visualize bacterial binding to the cornea, a GFP-expressing strain of *S. aureus* (ALC 1435) was used. *S. aureus* ALC 1435 is a derivative of RN6390 containing the plasmid pALC1420 encoding GFP, whose constitutive expression is controlled through the *sar* P1 promoter.¹⁴ Here 5 mL BHI (Bacto Brain and Heart Infusion; Becton Dickinson) was inoculated with a single colony of ALC 1435 isolated from a BHI agar plate and grown statically at 37°C overnight until the estimated density of 1×10^8 colony forming units [CFUs]/mL was reached. After 17 hours of static growth the culture was diluted 1:25 in BHI and grown shaking (200 rpm) until reaching an estimated density of 5×10^7 CFUs/mL or OD₅₉₅ = 0.22×2 . The bacteria were pelleted, washed twice with PBS, and resuspended in 10 mL PBS. To assess bacterial binding, freshly enucleated eyes were incubated with 1×10^8 CFUs of the GFP-ALC1435 in a 48-well plate for 30 minutes at 37°C . After incubation the eyes were washed twice with PBS. The corneas were then excised in a sterile environment, mounted (Vectashield Mounting Medium for Fluorescein; Vector Laboratories), and examined under a confocal laser-scanning microscope (Leica).

Statistical Analysis

The appearance of corneal defects in CD36^{-/-} mice was statistically analyzed using Fisher's exact test. This test was also used to analyze the bacterial load in corneas with and without severe defects. Significance was determined at $P < 0.05$. The relationship between age and the development of corneal defects was analyzed using proportional odds logistic regression (LogXact v.8; Cytel Inc., Cambridge, MA).

RESULTS

Age-Related Development of Corneal Defects in CD36^{-/-} Knockout Mice

Similar to the corneal epithelium, a critical function of the epidermis of the skin is to provide a barrier between the

external environment and the organism. Furthermore, CD36 has been shown to play a critical role in both maintaining the epidermal barrier and restoring the barrier after injury.^{15,16} Therefore, we tested the hypothesis that the spontaneous development of corneal opacity and neovascularization in CD36^{-/-} mice⁵ is due to a breakdown in the epithelial barrier, rendering the cornea more susceptible to infection.

To determine the frequency and severity of corneal defects in CD36^{-/-} mice, we performed a slit lamp examination of each mouse in our CD36^{-/-} ($N = 90$) and WT-C57BL/6 ($N = 87$) colonies. The age of mice at the time of examination ranged from 2 to 16 months in both colonies. After examination the eyes were placed into three categories: (1) no corneal defect, clear cornea; (2) mild corneal defect, mild corneal haze through which the iris is visible; and (3) severe corneal defect, corneal opacity and neovascularization through which the iris is not visible. All the WT-C57BL/6 mice, regardless of age, presented with normal clear corneas (Figs. 1A and 1C). By contrast, the CD36^{-/-} mice presented with mild corneal defects as early as 2 months old at a frequency of 7% (2/28). The frequency of mild corneal defects increased significantly with age, and in 16-month-old CD36^{-/-} mice the frequency of mild corneal defects was 60% (12/20) (Figs. 1A and 1B). The severe corneal defects first appeared at 6 months of age and increased in frequency to 40% (8/20) in 16-month-old CD36^{-/-} mice. Moreover, monthly monitoring of a subset of CD36^{-/-} mice revealed the development of mild defects always preceded the development of severe defects (Fig. 1D). Overall, the frequency and severity of mild and severe corneal defects observed in CD36^{-/-} mice increased with age, and by 16 months 100% of CD36^{-/-} mice displayed either mild or severe defects (Figs. 1B and 1D). There was a statistically significant relationship between increasing age and the presence of corneal defects in CD36^{-/-} mice compared with controls as determined by proportional odds logistic regression ($\beta = -0.3652$, $P =$

5.005×10^{-8}). We conclude that CD36^{-/-} mice spontaneously develop corneal defects that increase in frequency and severity with age.

Histologic Analysis of Corneal Defects in CD36^{-/-} Mice

Histologic analysis and immunofluorescence was performed to identify the histologic changes that coincide with the mild and severe defects. H&E staining of clear corneas isolated from young CD36^{-/-} mice revealed a normal corneal epithelium, stroma, and endothelium (Figs. 2A and 2B). Mild corneal defects coincided with the presence of disorganized apical epithelial layers, thickened basement membrane, and an infiltrate into the apical stroma just under the epithelial defect (Figs. 2A and 2B). Severe defects coincided with the presence of significant epithelial damage and a massive inflammatory infiltrate throughout the cornea (Figs. 2A and 2B). Interestingly, immunofluorescence revealed an increased number of F4/80 macrophages in "clear" (no defects visible) corneas from young CD36^{-/-} mice compared with WT-C57BL/6 mice (Fig. 2C). The numbers of macrophages increased with the severity of the defect and were localized to the site of the corneal defect. By contrast, neutrophils were detected only in corneas with severe defects (Fig. 2D). The histology of the severe corneal defects is consistent with the histology observed in bacterial keratitis.^{17,18} Therefore, the next series of studies were performed to determine whether bacteria were present in the corneas with severe lesions.

Bacterial Quantification

Bacterial quantification was performed to determine whether the severe corneal defects coincided with bacterial keratitis. Two methods were used to detect the presence of bacteria within the corneal tissue: Gram stain and enumeration of

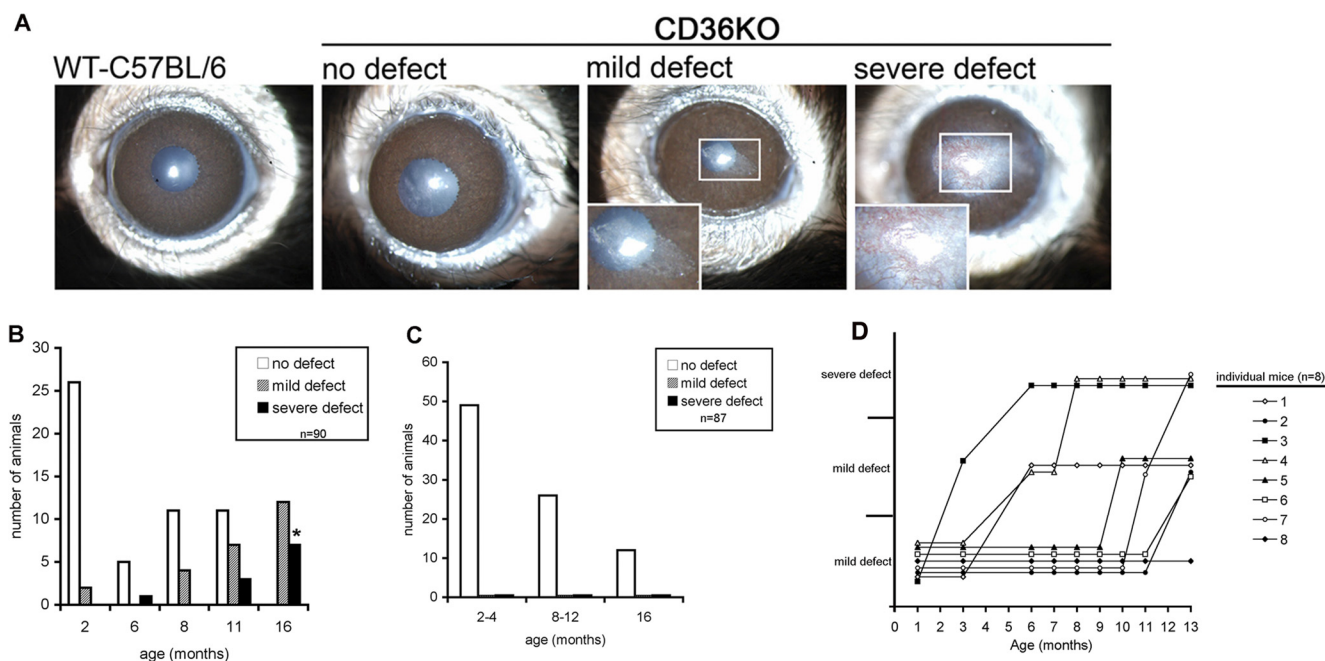


FIGURE 1. CD36^{-/-} mice spontaneously developed corneal defects that increase in frequency and severity with age. **(A)** Slit lamp pictures of representative eyes from of CD36^{-/-} mice that display (1) no corneal defect, clear cornea; (2) mild corneal defect, mild corneal haze through which the iris is visible; and (3) severe corneal defect, corneal opacity, and neovascularization through which the iris is not visible. **(B)** The frequency of corneal defects in CD36^{-/-} mice ($n = 90$). **(C)** Age-matched WT C57BL/6 mice served as a negative control ($n = 87$). **(D)** Disease progression was monitored monthly in a subset of CD36^{-/-} mice ($n = 8$). Asterisk indicates significant difference in the frequency of severe lesions between 16-month-old CD36^{-/-} and WT-C57BL/6 mice ($P = 1.745 \times 10^{-9}$) and was determined by Fisher's exact test. Development of corneal defects in CD36^{-/-} mice was age dependent as determined by proportional odds logistic regression ($\beta = -0.3652$, $P = 5.005 \times 10^{-8}$).

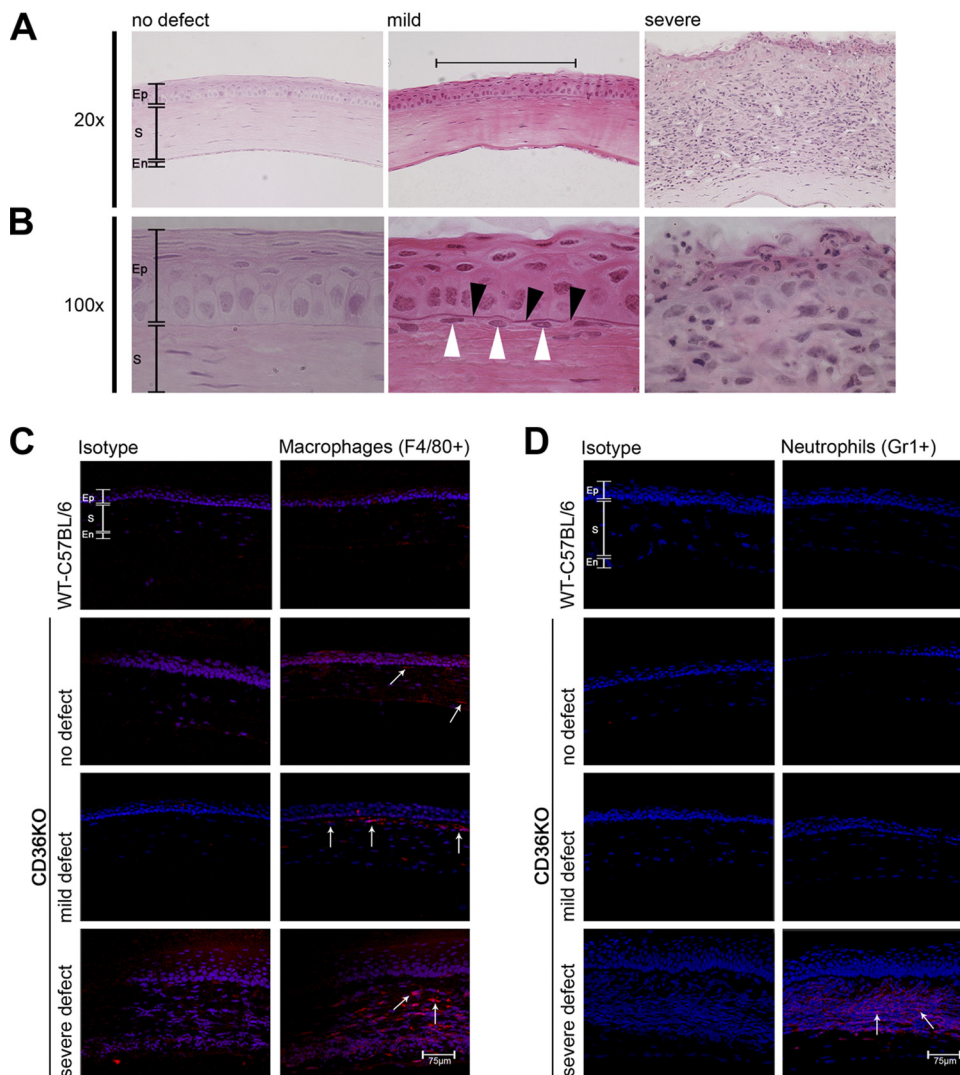


FIGURE 2. Histology of corneal defects. Corneas were recovered from mice with no defects, young $CD36^{-/-}$ mice; mild defects; or severe defects. (**A, B**) Corneas were fixed, paraffin embedded, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin. (**C**) Corneas were recovered from WT C57BL/6 mice or $CD36^{-/-}$ mice with either no defect, mild defect, or severe defects. Corneas were snap frozen in OCT, sectioned, and stained with either an isotype-matched control antibody or an anti-F4/80 antibody (specific for macrophages). (**D**) A similar set of corneal sections were stained with either an isotype-matched control antibody or an anti-Gr1 antibody (specific for neutrophils). All sections were stained with a cyanine nucleic acid stain (blue) to identify the cell nucleus. Immunofluorescence was examined via confocal microscopy. Ep, epithelium; S, stroma; En, endothelium. *Black arrowheads* identify a thickened basement membrane. *White arrowheads* identify a stromal infiltrate directly under the mild corneal defect. *White arrows* identify F4/80- and Gr1-positive cells.

bacterial colonies from corneal tissue. Gram staining was performed on $CD36^{-/-}$ corneas with no defect, mild defects, and severe defects (Fig. 3A). No bacteria were detected by Gram stain in corneas with either no defects or mild defects. By contrast, a large amount of Gram-positive bacteria (dark purple) were detected in severe corneal defects (Fig. 3A). Higher magnification revealed individual cocci indicative of Gram-positive bacteria. Bacteria present in the corneas of WT-C57BL/6 and $CD36^{-/-}$ mice with no defect, mild defect, or severe defect were quantified by plate count. Bacterial quantification revealed large numbers of bacteria (>1000 CFUs) in 75% of the $CD36^{-/-}$ corneas with severe defects (Fig. 3B). Moderate colonization (<1000 CFUs) of 25% of $CD36^{-/-}$ corneas with severe defects as well as 25% of corneas with mild defects was observed. There was a statistically significant difference in the frequency of corneas with a high bacterial load in mice with severe lesions compared with either (1) wild-type corneas or (2) corneas from young $CD36^{-/-}$ mice with no defects. (Fisher's exact test, significance $P = 0.01$). Representative colonies grown on BHI plates from corneas with severe defects were cultured (BBL Chromagar orientation plates; Becton Dickinson) and produced opaque pink colonies, indicative of *Staphylococci* (data not shown). In addition, 16s ribosomal RNA sequencing and BLAST analysis in GenBank revealed a 99% homology to *Staphylococcus xylosus*, a commensal bac-

terium on the skin of humans and rodents (data not shown)^{19,20}.

Corneal Defects in $TSP1^{-/-}$ and $TLR2^{-/-}$ Mice

$CD36$ is a member of the class B scavenger receptor family with multiple functions.³⁻⁵ Previous studies demonstrated that $CD36$ inhibited neovascularization through the binding of thrombospondin-1 (TSP1) and activation of anti-angiogenic pathways.⁴ In addition, $CD36$ acts as a co-receptor for TLR2 and is required for the internalization of *S. aureus* and initiation of TLR2/6 signaling.⁷ Therefore, the development of bacterial keratitis in $CD36^{-/-}$ mice may be due to inhibition of the TSP1 and/or TLR2 signaling pathway. To determine whether corneal defects develop in $CD36^{+/+}$ mice that lack either TSP1 or TLR2, we examined the corneas of $TSP1^{-/-}$ and $TLR2^{-/-}$ mice. Clinical examination and histologic analysis revealed no corneal defects in $TSP1^{-/-}$ or $TLR2^{-/-}$ mice up to 25 months of age (Table 1). In $CD36^{-/-}$ mice, 38% (14/36) of the mice present with either a mild or severe corneal defect by 11 months of age. By contrast, 0% (0/43) of the $TSP1^{-/-}$ mice displayed any corneal defects. Furthermore, 100% (20/20) of the $CD36^{-/-}$ mice present with a mild or severe corneal defect by 16 months of age, while 0% (0/8) of the $TLR2^{-/-}$ mice present with any corneal defects at 25 months of age. These results indicate

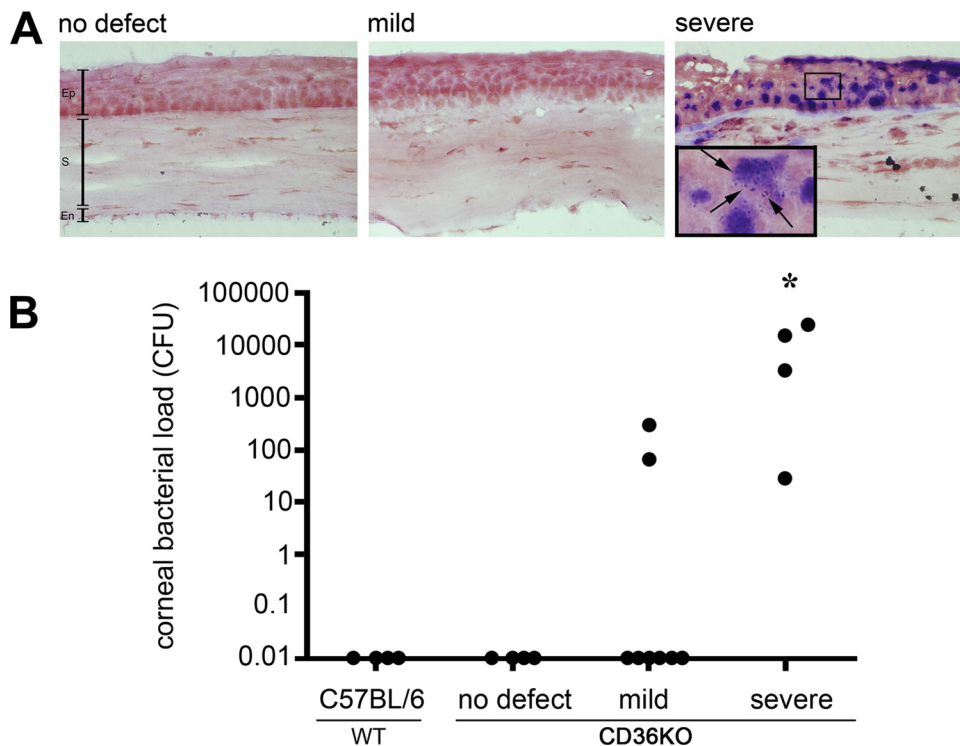


FIGURE 3. Detecting bacteria in corneal defects. Corneas were recovered from WT-C57BL/6 mice or CD36^{-/-} mice with either no defects, mild defects, or severe defects. (A) Corneal sections were stained with a Gram stain. Gram-positive bacteria (dark purple) were detected in corneas with severe lesions. Pictures are representative of corneas from at least three different mice. (B) The bacterial load within individual corneas was determined by homogenizing and culturing the corneal tissue in BHI agar cultures. Bacterial colonies were enumerated and the CFUs for each cornea displayed [$n = 4$ (C57BL/6), $n = 4$ (no defect), $n = 8$ (mild defect), $n = 4$ (severe defect)]. Asterisk indicates significant increase in bacterial load compared with all other groups (Fisher's exact test, $P = 0.01$). Ep, epithelium; S, stroma; En, endothelium. Black arrows identify Gram-positive cocci.

that the spontaneous corneal defects that occur in CD36^{-/-} mice are independent of either TSP1 or TLR2 pathway.

Rose Bengal Staining in CD36^{-/-} Mice

The mucin layer is a major component of the ocular tear film involved in preventing bacterial adherence to the cornea.¹ Rose Bengal staining was used to determine whether the mild and/or severe corneal defects coincided with a disruption in the mucin layer.²¹ An intact mucin layer prevents positive Rose Bengal staining in healthy eyes.²² By contrast, increased Rose Bengal staining coincides with the disruption of the mucin layer.²³ Rose Bengal staining was negative in C57BL/6 WT eyes and CD36^{-/-} corneas with no corneal defects (Fig. 4A). By contrast, positive Rose Bengal staining was observed in CD36^{-/-} corneas with either mild or severe defects. Moreover, the Rose Bengal staining was localized to the site of the

corneal defect, indicating that the mucin layer was only disrupted at the site of the cornea defect (Fig. 4A).

LC-Biotin Staining in CD36^{-/-} Mice

Tight junctions located in the superficial layer of the corneal epithelium act as a physical barrier to invading microorganisms. The integrity of the epithelial tight junctions was tested using a surface biotinylation (LC-biotin) method. This method makes use of a small compound (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin) that normally does not penetrate the epithelial tight junctions.^{12,24,25} Therefore, where the tight junctions are intact, LC-biotin will biotinylate only the primary amines on the corneal surface.^{12,13} By contrast, when the junctions are disrupted, the compound passes between cells and stains the stroma. The LC-biotin stain did not penetrate into the epithelium in either normal WT C57BL/6 or clear CD36^{-/-} corneas, indicating that the tight junctions are intact (Fig. 4B). By contrast, LC-biotin penetrated the epithelium in corneas of CD36^{-/-} mice with either mild or severe defects. Interestingly, the LC-biotin staining of the corneas with mild defects reveals a detachment of the basal epithelium from the basement membrane, suggesting a possible defect in cell adherence. In conclusion, the LC-biotin staining in corneas with mild defects demonstrates that, in the absence of CD36, a breakdown in the corneal barriers precedes the development of bacterial keratitis.

Bacterial Binding to Corneas of CD36^{-/-} Mice

A critical step in the development of bacterial keratitis is the binding of bacteria to the cornea. Under normal conditions, the mucin barrier prevents bacterial binding, and the epithelial cell tight junctions block bacteria from entering the cornea.^{26,27} Because these barriers are disrupted in CD36^{-/-} mice, we next determined whether there is increased bacterial binding to CD36^{-/-} corneas with mild defects. To analyze bacterial binding, GFP-expressing *S. aureus* was incubated with corneas with mild defects. Eyes from WT C57BL/6 mice and CD36^{-/-}

TABLE 1. Corneal Defects in TSP1^{-/-}, TLR2^{-/-}, and CD36^{-/-} Mice

| Mouse Strain | Age (mo) | Severity of Defect* | | |
|-------------------------------|----------|---------------------|-------------|---------------|
| | | No Defect | Mild Defect | Severe Defect |
| CD36 ^{-/-} knockout* | 2-6 | 31 | 2 | 1 |
| | 8-11 | 22 | 11 | 3 |
| | 16 | 0 | 12 | 8† |
| TSP1 ^{-/-} knockout‡ | 2-6 | 40 | 0 | 0 |
| | 8-11 | 43 | 0 | 0 |
| TLR2 ^{-/-} knockout§ | 19-25 | 8 | 0 | 0 |

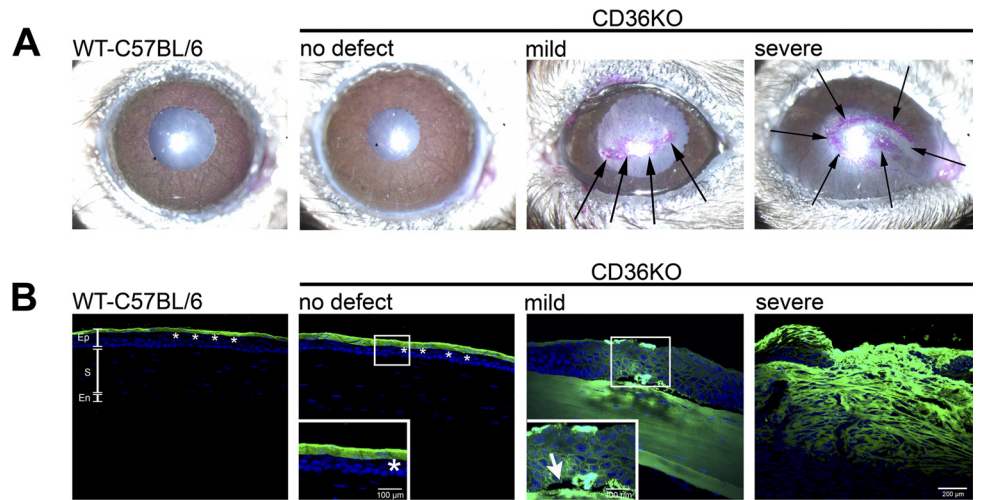
* Data presented in Figure 1 and summarized here, $n = 90$.

† Frequency of severe defects was compared using Fisher's exact test between (1) CD36^{-/-} mice 16 months old with TLR2^{-/-} mice 19-25 years old ($P = 6.4 \times 10^{-7}$), and (2) CD36^{-/-} mice 8-11 months old with TSP1^{-/-} mice 8-11 months old ($P = 3.1 \times 10^{-6}$).

‡ $n = 83$.

§ $n = 8$.

FIGURE 4. The epithelial barrier function in the corneas of CD36^{-/-} mice. **(A)** Rose Bengal staining was performed on WT-C57BL/6 mice and CD36^{-/-} mice with different defects. Rose Bengal stains positive (pink) for disrupted mucin layers. **(B)** Epithelial tight junctions were examined with LC-biotin. Intact epithelial tight junctions prevent LC-biotin from penetrating the cornea and staining the stroma (WT-C57BL/6 and CD36^{-/-} mice with no defect). Disrupted epithelial tight junctions allow LC-biotin to penetrate and stain the stroma (CD36^{-/-} mice with mild and severe defects). All sections were counterstained with a cyanine nucleic acid stain (blue nuclei) and analyzed via confocal microscopy. Pictures are representative of five mice per group. Ep, epithelium; S, stroma; En, endothelium. *Black arrows* identify the positive Rose Bengal staining in CD36^{-/-} corneas with mild and severe defects. *Asterisks* identify the LC-biotin (green) sitting on top of an intact epithelial barrier in WT-C57BL/6 and young CD36^{-/-} mice with no defect. *White arrow* identifies epithelial detachment from the basement membrane.



mice with clear corneas were used as negative controls. As a positive control, GFP-expressing *S. aureus* was added to WT-C57BL/6 eyes with a corneal epithelium debridement wound (data not shown). Confocal analysis revealed no bacterial binding to corneas of WT-C57BL/6 mice and CD36^{-/-} knockout mice without any corneal defects (Fig. 5B). However, significant binding of GFP-expressing *S. aureus* was observed in CD36^{-/-} mice with mild defects, and the binding was confined to the defect. These data indicate that the breakdown of the barriers in the corneas with mild defects coincided with increased bacterial binding. Moreover, this increased susceptibility to bacterial binding in CD36^{-/-} precedes the development of bacterial keratitis.

DISCUSSION

The cornea has multiple barriers that make it highly resistant to bacterial keratitis. This resistance became apparent when researchers in the past attempted to develop animal models of bacterial keratitis. Several *in vivo* models were developed, using rabbits,²⁸ mice,²⁹ and guinea pigs.³⁰ However, each of these models required either epithelial wounding^{28,29,31} or

intrastromal injection of bacteria³² to induce a successful infection. Furthermore, although each of these techniques induced bacterial keratitis, large nonphysiological amounts of bacteria ($1-4 \times 10^8$ CFUs) were also required in addition to a corneal wound.^{20,29} The administration of a small amount of bacteria to a corneal wound routinely failed to induce an infection. Herein, we describe the first report of spontaneous bacterial keratitis occurring in mice. Not surprisingly, keratitis only developed after a breakdown in the epithelial barriers, indicating the importance these physical defense mechanisms in preventing infection.

Our study identifies CD36 as a critical component of the corneal epithelial barrier to infection. In the absence of CD36, the mucin layer and epithelial tight junctions break down with age, allowing a member of the normal flora (*S. xylosum*) to bind and penetrate the cornea resulting in spontaneous bacterial keratitis. Although *Staphylococcus* is one of the most common causes of bacterial keratitis in humans, it is considered an opportunistic pathogen, inducing keratitis only when one or more of the corneal barriers are breached.²⁰ Our study identifies a novel function for CD36 in maintaining the corneal barriers to infection and preventing bacterial keratitis induced by normal flora. Moreover, this novel function of CD36 is independent of TSP1 and TLR2, because TSP1^{-/-} and TLR2^{-/-} mice failed to develop spontaneous keratitis.

CD36 is a member of the class B scavenger receptor family with multiple functions. Beutler and colleagues³³ were the first to identify CD36 as a receptor of microbial diacylglycerides. Moreover, they demonstrated that "oblivious" mice expressing a mutant form of CD36 were unable to clear an intradermal and/or intravenous *S. aureus* inoculum.³³ This inability to clear a *Staphylococcus* inoculation coincided with reduced macrophage function as determined by TNF α production. Stuart and colleagues⁷ demonstrated that induction of the innate immune response to *S. aureus* requires CD36-mediated phagocytosis, which triggers TLR2/6 signaling. The function of CD36 is analogous to the LPS receptor, CD14, which clusters the LPS on the cell surface where it engages with TLR2/6.⁷ Similarly, CD36 recognizes *S. aureus* and its cell wall component LTA and clusters LTA at the cell surface, where it engages with TLR2/6. Unlike CD14, however, CD36 can also phagocytose *S. aureus* and LTA, concentrating them in the endosome where they again engage TLR2/6. In the absence of CD36, macrophages

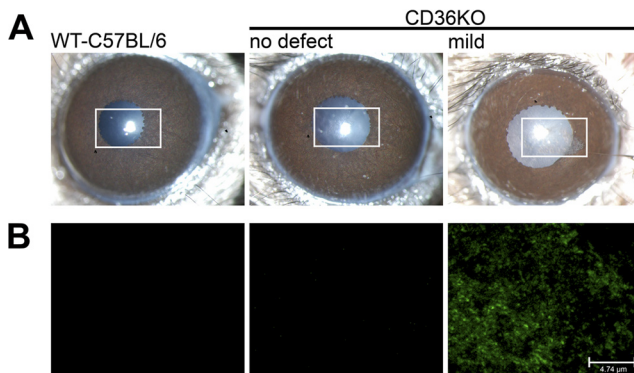


FIGURE 5. Bacterial binding to corneal defects. **(A)** Slit lamp pictures of eyes of WT-C57BL/6 mice and CD36^{-/-} mice without and with mild corneal defects. **(B)** The corneas displayed were recovered and incubated *in vivo* with GFP-expressing *S. aureus*. Corneas were then washed and examined by confocal microscopy for fluorescent bacteria. Images are representative of at least three different mice per group.

display a reduced ability to phagocytose bacteria, resulting in a failure to activate the TLR2 signaling pathway.⁷ Therefore, knocking out either CD36 or TLR2 resulted in a significantly reduced protective innate immune response to an intravenous challenge of *S. aureus*.

By contrast, the primary function of CD36 in the cornea appears to be maintaining the physical barriers that prevent bacterial binding. Intravenous injection of 10^{-7} CFUs of *S. aureus* resulted in the death of 50% of CD36^{-/-} mice compared with 0% of WT mice.⁷ However, we demonstrated that young CD36^{-/-} mice (without any cornea defect) show no increased susceptibility to *S. aureus*-induced keratitis when as much as 10^{-8} CFUs of *S. aureus* was added to an intact cornea. Only after the development of the cornea defects did CD36^{-/-} mice display increased binding of bacteria at the site of the defect. Moreover, TLR2^{-/-} mice did not develop either corneal defects or spontaneous bacterial keratitis, indicating the corneal pathology observed in CD36^{-/-} mice was due to the role of CD36 in barrier function and not innate immunity. In agreement with our study, Beutler and colleagues³³ reported in supplementary data that aged "oblivious" mice (that had not received a bacterial inoculation) developed spontaneous endophthalmitis. As endophthalmitis was not the focus of their study, these investigators examined only a small number of aged "oblivious" mice and did not examine the corneas of these mice at an earlier stage of their infection (BRK, personal communication with Bruce Beutler, 2006). Therefore, they could not rule out a bacterial keratitis as the initial infection in the eye. Taken together with our current studies, we propose the endophthalmitis reported by Beutler and colleagues³³ was actually secondary to an initial bacterial keratitis caused by a breakdown in the cornea allowing the bacteria to adhere to the corneal surface.

Hardy and colleagues⁴ reported that an additional function of CD36 in the cornea was to maintain the avascularity of the cornea. In a mouse model of inflammatory corneal neovascularization, they demonstrated that CD36 inhibits corneal neovascularization directly by inhibiting vessel outgrowth and indirectly by inhibiting macrophage-derived VEGF-A expression.⁴ The authors went on to demonstrate that CD36^{-/-} mice developed age-dependent corneal neovascularization accompanied by increased expression of angiogenic factors and inflammation.⁵ However, the cause of inflammation in these older mice was unclear. Interestingly, we demonstrate that before the development of neovascularization, CD36^{-/-} mice develop a mild corneal defect that is characterized by a breakdown in the mucin layer, a loss of epithelial tight junctions, and a mild macrophage infiltration into the stroma underlying the epithelial defect. Furthermore, in vitro, we observed increased bacterial binding to the area within the mild defect. Together, this suggests that the inflammation and neovascularization observed by Hardy and colleagues is secondary to the breakdown of the corneal epithelium and subsequent binding of normal flora.

Strict regulation of cell migration and adhesion is critical in the homeostasis and wound repair of the corneal epithelium. Several studies implicate CD36 in both cell adhesion and migration through interactions with actin, collagen, thrombospondin, and $\alpha 3 \beta 1$ and $\alpha 6 \beta 1$ integrins.³⁴⁻³⁸ Interestingly, collagen and thrombospondin are major components of the corneal epithelial basement membrane,³⁹ while both $\alpha 3 \beta 1$ and $\alpha 6 \beta 1$ integrins are constitutively expressed in the basal epithelium of the cornea where they mediate cell attachment to matrix proteins in the basement membrane.⁴⁰ Cellular migration is a complex process involving cell-to-matrix and cell-to-cell adhesion and in the cornea in particular, the epithelium must move as an intact sheet to maintain the barrier function.⁴¹ Taken together, these data suggest a novel function for CD36

in maintaining the structural integrity of the corneal epithelial cell sheet as the cells continually migrate to replace the outermost shed layer. In addition, attachment to the basement membrane is critical for the survival of adherent cells and epithelial cells that detach from their underlying basement membrane undergo apoptosis.⁴²⁻⁴⁴ The LC-biotin staining of our CD36^{-/-} corneas with mild defects reveal a detachment of the basal epithelium from the basement membrane coinciding with the loss of tight junctions, suggesting a defect in cell adhesion may underlie the formation of the mild corneal defects. However, the development of the mild defect also coincides with a mild infiltrate of macrophages into the underlying stroma. Infiltrating macrophages have the ability to secrete a variety of matrix metalloproteinases (MMPs) that digest extracellular matrix and integrins. In particular MMP2 and MMP9 are known to cleave specifically type 4 collagen, which is a major structural component of the basement membrane.^{45,46} Therefore, we cannot rule out that an early infiltration of macrophages secreting MMPs does not contribute to the detachment of the corneal epithelium and loss of epithelial tight junctions. In vitro experiments are currently underway to determine whether corneal epithelial cells that lack CD36 exhibit defective adhesion and migration properties.

Interestingly, although CD36^{-/-} mice lack CD36 from birth, development of the corneal defects and subsequent spontaneous keratitis occurs only in aged mice. This suggests that early in life other factors and/or pathways compensate for the loss of CD36. However, there are numerous age-related changes that occur in the cornea, resulting in increased cell senescence, increased epithelial permeability, decreased expression of adhesion molecules, and diminished epithelial adhesion to the basal lamina.⁴⁷ More important, we predict age-related changes in the cornea coincide with decreased efficiency in compensatory mechanisms. For these reasons we believe the corneal pathogenesis associated with CD36 deficiency becomes apparent only with age and occurs in the central cornea where exposure to environmental insults is the greatest.

In conclusion, our data suggest a novel function for CD36 in the maintenance of the corneal epithelial barriers to infection. In the absence of CD36, the epithelial barrier and mucin layer are disrupted, allowing the normal corneal flora to bind and promoting the development of bacterial keratitis. This is the first report of spontaneous bacterial keratitis in a mouse.

Acknowledgments

The authors thank Marie Ortega and Michelle Mammolenti for their excellent assistance with animal breeding, Don Pottle for technical assistance with Confocal Analysis, and Pablo Argüeso for assistance with Rose Bengal staining.

References

1. Ricciuto J, Heimer SR, Gilmore MS, Argüeso P. Cell surface O-glycans limit *Staphylococcus aureus* adherence to corneal epithelial cells. *Infect Immun*. 2008;76:5215-5220.
2. Yi X, Wang Y, Yu FS. Corneal epithelial tight junctions and their response to lipopolysaccharide challenge. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:4093-4100.
3. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*. 2001;108:785-791.
4. Mwaikambo BR, Sennlaub F, Ong H, Chemtob S, Hardy P. Activation of CD36 inhibits and induces regression of inflammatory corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:4356-4364.
5. Mwaikambo BR, Sennlaub F, Ong H, Chemtob S, Hardy P. Genetic ablation of CD36 induces age-related corneal neovascularization. *Cornea*. 2008;27:1037-1041.

6. Moore KJ, El Khoury J, Medeiros LA, et al. A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of beta-amyloid. *J Biol Chem.* 2002;277:47373-47379.
7. Stuart LM, Deng J, Silver JM, et al. Response to Staphylococcus aureus requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol.* 2005;170:477-485.
8. Agah A, Kyriakides TR, Lawler J, Bornstein P. The lack of thrombospondin-1 (TSP1) dictates the course of wound healing in double-TSP1/TSP2-null mice. *Am J Pathol.* 2002;161:831-839.
9. Beveridge TJ. Use of the gram stain in microbiology. *Biotech Histochem.* 2001;76:111-118.
10. Cox CR, Gilmore MS. Native microbial colonization of Drosophila melanogaster and its use as a model of Enterococcus faecalis pathogenesis. *Infect Immun.* 2007;75:1565-1576.
11. Toshida H, Nguyen DH, Beuerman RW, Murakami A. Evaluation of novel dry eye model: preganglionic parasympathetic denervation in rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:4468-4475.
12. Xu KP, Li XF, Yu FS. Corneal organ culture model for assessing epithelial responses to surfactants. *Toxicol Sci.* 2000;58:306-314.
13. Hutcheon AE, Sippel KC, Zieske JD. Examination of the restoration of epithelial barrier function following superficial keratectomy. *Exp Eye Res.* 2007;84:32-38.
14. Cheung AL, Nast CC, Bayer AS. Selective activation of sar promoters with the use of green fluorescent protein transcriptional fusions as the detection system in the rabbit endocarditis model. *Infect Immun.* 1998;66:5988-5993.
15. Schmutz M, Ortegon AM, Mao-Qiang M, Elias PM, Feingold KR, Stahl A. Differential expression of fatty acid transport proteins in epidermis and skin appendages. *J Invest Dermatol.* 2005;125:1174-1181.
16. Harris IR, Farrell AM, Memon RA, Grunfeld C, Elias PM, Feingold KR. Expression and regulation of mRNA for putative fatty acid transport related proteins and fatty acyl CoA synthase in murine epidermis and cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1998;111:722-726.
17. Hazlett LD, McClellan S, Kwon B, Barrett R. Increased severity of Pseudomonas aeruginosa corneal infection in strains of mice designated as Th1 versus Th2 responsive. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:805-810.
18. Girgis DO, Sloop GD, Reed JM, O'Callaghan RJ. A new topical model of Staphylococcus corneal infection in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:1591-1597.
19. Kloos WE, Zimmerman RJ, Smith RF. Preliminary studies on the characterization and distribution of Staphylococcus and Micrococcus species on animal skin. *Appl Environ Microbiol.* 1976;31:53-59.
20. Nagase N, Sasaki A, Yamashita K, et al. Isolation and species of staphylococci from animal and human skin. *J Vet Med Sci.* 2002;64:245-250.
21. Argueso P, Tisdale A, Spurr-Michaud S, Sumiyoshi M, Gipson IK. Mucin characteristics of human corneal-limbal epithelial cells that exclude the rose bengal anionic dye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:113-119.
22. Kim J. The use of vital dyes in corneal disease. *Curr Opin Ophthalmol.* 2000;11:241-247.
23. Feenstra RP, Tseng SC. What is actually stained by rose bengal? *Arch Ophthalmol.* 1992;110:984-993.
24. Chen Y, Merzdorf C, Paul DL, Goodenough DA. COOH terminus of occludin is required for tight junction barrier function in early Xenopus embryos. *J Cell Biol.* 1997;138:891-899.
25. Merzdorf CS, Chen YH, Goodenough DA. Formation of functional tight junctions in Xenopus embryos. *Dev Biol.* 1998;195:187-203.
26. Mantelli F, Argueso P. Functions of ocular surface mucins in health and disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008;8:477-483.
27. Huang AJ, Tseng SC, Kenyon KR. Paracellular permeability of corneal and conjunctival epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989;30:684-689.
28. Hume EB, Dajcs JJ, Moreau JM, Sloop GD, Willcox MD, O'Callaghan RJ. Staphylococcus corneal virulence in a new topical model of infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:2904-2908.
29. Hume EB, Cole N, Khan S, et al. A Staphylococcus aureus mouse keratitis topical infection model: cytokine balance in different strains of mice. *Immunol Cell Biol.* 2005;83:294-300.
30. Chusid MJ, Davis SD. Experimental bacterial keratitis in neutropenic guinea pigs: polymorphonuclear leukocytes in corneal host defense. *Infect Immun.* 1979;24:948-952.
31. Zieske JD, Higashijima SC, Spurr-Michaud SJ, Gipson IK. Biosynthetic responses of the rabbit cornea to a keratectomy wound. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1987;28:1668-1677.
32. Sloop GD, Moreau JM, Conerly LL, Dajcs JJ, O'Callaghan RJ. Acute inflammation of the eyelid and cornea in Staphylococcus keratitis in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:385-391.
33. Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature.* 2005;433:523-527.
34. Park YM, Febbraio M, Silverstein RL. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J Clin Invest.* 2009;119:136-145.
35. Stuart LM, Bell SA, Stewart CR, et al. CD36 signals to the actin cytoskeleton and regulates microglial migration via a p130Cas complex. *J Biol Chem.* 2007;282:27392-27401.
36. Tandon NN, Kralisz U, Jamieson GA. Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J Biol Chem.* 1989;264:7576-7583.
37. Barnwell JW, Asch AS, Nachman RL, Yamaya M, Aikawa M, Ingravallo P. A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Clin Invest.* 1989;84:765-772.
38. Thorne RF, Marshall JF, Shafren DR, Gibson PG, Hart IR, Burns GF. The integrins alpha3beta1 and alpha6beta1 physically and functionally associate with CD36 in human melanoma cells. Requirement for the extracellular domain OF CD36. *J Biol Chem.* 2000;275:35264-35275.
39. Maguen E, Zorapapel NC, Zieske JD, et al. Extracellular matrix and matrix metalloproteinase changes in human corneas after complicated laser-assisted in situ keratomileusis (LASIK). *Cornea.* 2002;21:95-100.
40. Stepp MA. Corneal integrins and their functions. *Exp Eye Res.* 2006;83:3-15.
41. Zelenka PS, Arpitha P. Coordinating cell proliferation and migration in the lens and cornea. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19:113-124.
42. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol.* 1994;124:619-626.
43. Grossmann J. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis-Anoikis." *Apoptosis.* 2002;7:247-260.
44. Valentijn AJ, Zouq N, Gilmore AP. Anoikis. *Biochem Soc Trans.* 2004;32:421-425.
45. Corotti MV, Zambuzzi WF, Paiva KBS et al. Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development. *Arch Oral Biol.* 2009;54:764-771.
46. Visse R and Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003;92:827-839.
47. Chang SW, Hu FR. Changes in corneal autofluorescence and corneal epithelial barrier function with aging. *Cornea.* 1993;12:493-499.

3. Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Titel: Spontane bakterielle Keratitis in CD36^{-/-} Knockout Mäusen

eingereicht von: Julia Klocke

angefertigt an der: Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde, Universität Leipzig /
Schepens Eye Research Institute, Boston, USA

betreut von: Prof. Dr. med. P. Wiedemann, M. Gregory- Ksander, PH.D.

September, 2011

Zusammenfassung

Staphylococcus aureus Infektionen sind häufig Ursache bakterieller Keratitiden beim Menschen ⁶. Das gram-positive Bakterium kann in der Standortflora von Säugetieren nachgewiesen werden ⁴⁸. Ein gesunder Organismus ist durch verschiedene Mechanismen in der Lage, sich vor Infektionen mit Erregern der Standortflora zu schützen.

Auch das Auge besitzt verschiedenste Schutzmechanismen. Hierzu gehören Muzine des Tränenfilms, die das Binden von *Staph. aureus* verhindern ¹⁰, sowie Tight Junctions der superfizialen Epithelschicht, die eine dichte Barriere formen, so dass die Invasion von Bakterien unmöglich wird ⁹. Erst Defekte in den Schutzmechanismen des Auges ermöglichen die Entstehung einer Infektion ¹¹.

Es existieren verschiedene Tiermodelle, um diese Krankheit zu untersuchen ^{6, 12, 13}. *In vivo* Experimente setzten allerdings bisher artifizielle Verletzungen der Kornea ^{6, 13, 14} sowie die Applikation großer Bakterienmengen ^{6, 11} oder intrastromale

Bakterieninjektionen ¹⁵ voraus, so dass man die frühen Stadien der Erkrankung nicht untersuchen kann.

CD36^{-/-} Knockout Mäuse entwickeln mit zunehmendem Alter spontan einen Defekt der zentralen Kornea, der sich im weiteren Verlauf zu einer bakteriellen Keratitis entwickelt. Daher kann man diese Mäuse für Untersuchungen der frühen Stadien der Infektion heranziehen.

CD36 ist ein Scavenger- Rezeptor der Klasse B, der neben verschiedensten homöostatischen Funktionen auch an der Erkennung und Internalisierung von *Staph. aureus* beteiligt ist ⁴⁹. Zu seinen Liganden zählt unter anderem TSP-1 (Thrombospondin 1), wodurch er an der Aufrechterhaltung der Avaskularität der Kornea mitwirkt ³⁷.

Als Ko- Rezeptor von TLR2 ³¹ sammelt er LTA (Lipoteichonsäure), eine Membrankomponente von *Staph. aureus*, auf der Zelloberfläche und präsentiert diese anschließend an TLR2. Dies führt nach Auslösung einer Signalkaskade zur Aktivierung von NF-κB und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine ³⁵.

In dieser Arbeit wurden die Augen von CD36^{-/-} Knockout Mäusen, TSP-1^{-/-}, TLR2^{-/-} Knockout Mäusen sowie C57BL/6 WT Mäusen im Alter von 2-25 Monaten mit Hilfe einer Spaltlampe oder *ex vivo* untersucht. Nur die Augen der CD36^{-/-} Knockout Mäuse zeigten Pathologien der Kornea. Diese wurden abhängig vom Phänotyp in drei verschiedene Kategorien unterteilt. Kategorie I: Augen, deren Korneae keine Auffälligkeiten zeigten, Kategorie II: Korneae mit einer zentralen ovalen Trübung, aber noch sichtbarer Iris, Kategorie III: Augen, deren Korneae Neovaskularisation zeigten und deren Iris aufgrund einer starken, großen Trübung nicht mehr sichtbar war. Im Alter von 16 Monaten zeigten 100% der CD36^{-/-} Knockout Mäuse einen Defekt der Kornea, während die Augen der Kontrollgruppe, unabhängig vom Alter, keine Auffälligkeiten aufwiesen.

Mit Hilfe von Gram - Färbungen, Quantifizierung der Bakterienmenge und Identifizierung des Bakteriums wurde der Beweis erbracht, dass es sich bei den Korneopathologien der Kategorie III um eine bakterielle Keratitis, ausgelöst durch *Staphylococcus xylosus* handelt, ein Bakterium, das in der Standortflora von Mäusen zu finden ist ⁵⁰.

Das Epithel der Kornea hat die Aufgabe, den Organismus vor der äußeren Umwelt zu schützen. Es wurde bereits gezeigt, dass CD36 eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere und in der Reparatur des Epithels nach Verletzung spielt^{51, 52}. Die spontane Entstehung der zentralen Defekte in CD36^{-/-} Knockout Mäusen der Kategorie II und die Neovaskularisation in Mäuseaugen der Kategorie III könnte auf die Zerstörung der epithelialen Barriere zurückzuführen sein, welche sie anfälliger für die Entstehung bakterieller Infektionen macht.

Die epitheliale Barriere wird von Tight Junctions, der superfizialen Schicht des Epithels, gebildet und verhindert die Invasion von Bakterien¹⁷. In den Augen von CD36^{-/-} Knockout Mäusen der Kategorien II und III konnte mit Hilfe einer Oberflächen-Biotinylierungs- Methode (LC- Biotin) die Zerstörung dieser epithelialen Barriere nachgewiesen werden^{50, 53-55}.

Zusätzlich zu dem Verlust der Tight Junctions konnte man eine Ablösung des basalen Epithels von der Basalmembran erkennen.

Auch die Integrität der Muzinschicht in CD36^{-/-} Knockout Mäusen wurde getestet. Hierzu wurden die Korneae *in vivo* mit Rose Bengal gefärbt. Dieser Farbstoff färbt Bereiche, in denen die Muzinschicht defekt ist. Positive Färbung zeigt sich in den Kategorien II und III.

In histologischen Färbungen konnte man in Korneae der Kategorie II infiltrierende Zellen genau unterhalb des Defekts erkennen. Diese wurden mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbung als Makrophagen identifiziert.

Des Weiteren wurden *ex vivo* Experimente mit FITC- konjugiertem *Staph. aureus* durchgeführt, die zeigten, dass Bakterien leichter an Korneae mit Pathologien der Kategorie II und III binden. Augen der Kategorie I und auch die WT- Kontrollen zeigten keine erhöhte Bindungs-Affinität.

Nach Auswertung der Ergebnisse der durchgeführten Experimente kann der Defekt der Kategorie II in CD36^{-/-} Knockout Mäusen definiert werden als ein Bereich mit (i) defekter Muzinschicht, (ii) Verlust der Tight Junctions, (iii) Ablösung einzelner Zellen von der Basalmembran und einer (iv) leichten Makrophageninfiltration in das Stroma. Dies führt zu einer erhöhten Affinität von CD36^{-/-} Knockout Mäusen zu Bakterien, was sie anfälliger für bakterielle Infektionen macht.

Die Defekte der Muzinschicht (i) führen dazu, dass Bakterien an die Korneaoberfläche binden können. Aufgrund des Verlusts der Tight Junctions (ii)

können diese Bakterien dann infiltrieren. Wahrscheinlich liegt ein Defekt der Zell-Adhäsion (iii) der Entstehung milder Korneadefekte zugrunde. Zellen, welche den Kontakt zu der Basalmembran verlieren, gehen durch Apoptose zugrunde^{45, 56, 57}. Die primäre Entstehung des Korneadefektes könnte auch auf die Makrophageninfiltration (iv) zurückzuführen sein. Infiltrierende Makrophagen sezernieren Matrix- Metalloproteinasen (MMP), die EZM (Extrazellulärmatrix) und Integrine verdauen⁵⁸. MMP sezernierende Makrophagen könnten zur Ablösung des Korneaepithels (iii) und zum Verlust der epithelialen Tight Junctions führen.

Im Gegensatz zu Augen der Kategorie II ist in der Kategorie III starke Neovaskularisationen zu erkennen. Dies ist wahrscheinlich nicht wie von Mwaikambo et al.³⁷ angenommen, auf die Interaktion zwischen CD36 und TSP-1 als antiangiogenetischer Faktor zurückzuführen, sondern vielmehr als sekundäre Antwort auf die Zerstörung der epithelialen Barriere und Infiltration von Bakterien ins Stroma zu sehen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Korneopathologien in CD36^{-/-} Knockout Mäusen unabhängig von TSP-1 entstehen, da TSP-1^{-/-} Knockout Mäuse keine Korneadefekte entwickeln.

Eine weitere mögliche Erklärung für die Entstehung bakterieller Keratitis in CD36^{-/-} Knockout Mäusen könnte ein Defekt des angeborenen Immunsystems sein. Die Zusammenarbeit von CD36 und TLR2 wurde schon mehrfach beschrieben^{31, 34}. CD36 sammelt als Ko- Rezeptor Liganden an der Oberfläche oder internalisiert *Staph. aureus* und präsentiert diese anschließend TLR2. Diese Liganden-Präsentation führt zur Aktivierung von Makrophagen^{31, 34}.

Allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass TLR2^{-/-} Knockout Mäuse keine Korneopathologien entwickeln. Die Entstehung der bakteriellen Keratitis ist daher eher auf einen Zusammenbruch der epithelialen Barriere zurückzuführen als auf einen Defekt im Immunsystem.

Auch die Rolle des Rezeptors in der Zellmigration und Adhäsion könnte eine Möglichkeit darstellen, die Entstehung bakterieller Keratitiden in CD36^{-/-} Knockout Mäusen zu erklären. Um die epitheliale Barriere aufrechtzuerhalten, muss das Epithel als zusammenhängende Schicht migrieren³⁹. Verschiedene Studien gehen davon aus, dass CD36 essentiell für die Adhäsion und Migration des Korneaepithels

ist^{40-43, 49}. Ein Fehlen des CD36 Rezeptors würde somit zum Verlust dieser Barriere führen und die Entstehung bakterieller Keratitiden günstig beeinflussen.

Obwohl CD36^{-/-} Knockout Mäusen der Rezeptor von Geburt an fehlt, entwickeln sie erst mit zunehmendem Alter einen Defekt der zentralen Kornea, welcher sich dann zu einer bakteriellen Keratitis entwickelt.

Altersabhängigen Veränderungen der Kornea wie z.B. (i) gesteigerte Zell- Alterung, (ii) erhöhte epitheliale Permeabilität, (iii) verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen und (iv) verminderte epitheliale Adhäsion an die Basallamina⁵⁹ könnten im Zusammenhang mit einer verminderten Effizienz von Kompensationsmechanismen stehen, so dass sich Kornea- Pathologien in CD36^{-/-} Knockout Mäusen erst im Alter zeigen. Sie entstehen in der zentralen Kornea, weil dort der Einfluss von Umweltfaktoren am größten ist.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD36^{-/-} Knockout Mäuse im Laufe ihres Lebens spontan einen Defekt der Kornea entwickeln. Dies geschieht unabhängig von TLR2, womit Defekte des angeborenen Immunsystems als mögliche Ursache ausgeschlossen werden können. Als Erklärung für die Entstehung der Defekte könnten in das korneale Stroma infiltrierende- und MMP sezernierende Makrophagen genannt werden, welche möglicherweise zu der Ablösung von Zellen von der Basalmembran führen. Dies führt zu Einleitung der Apoptose und Verlust epithelialer Tight Junctions. Auch die neu entdeckte Rolle des CD36 Rezeptors in Adhäsion und Migration könnte zu der Entstehung eines Korneadefektes der Kategorie II beitragen. Aufgrund einer defekten Muzinschicht in dem Bereich des Defekts können Bakterien binden und dann durch die zerstörten Tight Junctions infiltrieren, so dass sich eine bakterielle Keratitis entwickelt, die mit einer Neovaskularisation der Kornea vergesellschaftet ist.

Diese Arbeit beschreibt eine neue Funktion von CD36 in der Aufrechterhaltung der Kornea- Epithel- Barriere gegen bakterielle Infektionen.

Zusätzlich ist dies der erste Bericht über spontane bakterielle Keratitis in Mäusen, wodurch erstmals die frühen Stadien der Entstehung dieser Infektionskrankheit *in vivo* studiert werden können.

4. Literaturverzeichnis

1. Alexandrakis G, Alfonso EC, Miller D. Shifting trends in bacterial keratitis in south Florida and emerging resistance to fluoroquinolones. *Ophthalmology* 2000;107:1497-1502.
2. Sun X, Deng S, Li R, et al. Distribution and shifting trends of bacterial keratitis in north China (1989-98). *Br J Ophthalmol* 2004;88:165-166.
3. Kumar A, Zhang J, Yu FS. Innate immune response of corneal epithelial cells to *Staphylococcus aureus* infection: role of peptidoglycan in stimulating proinflammatory cytokine secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:3513-3522.
4. Wang AG, Wu CC, Liu JH. Bacterial corneal ulcer: a multivariate study. *Ophthalmologica* 1998;212:126-132.
5. Cruz OA, Sabir SM, Capo H, Alfonso EC. Microbial keratitis in childhood. *Ophthalmology* 1993;100:192-196.
6. Hume EB, Cole N, Khan S, et al. A *Staphylococcus aureus* mouse keratitis topical infection model: cytokine balance in different strains of mice. *Immunol Cell Biol* 2005;83:294-300.
7. Asbell P, Stenson S. Ulcerative keratitis. Survey of 30 years' laboratory experience. *Arch Ophthalmol* 1982;100:77-80.
8. Gudmundsson OG, Ormerod LD, Kenyon KR, et al. Factors influencing predilection and outcome in bacterial keratitis. *Cornea* 1989;8:115-121.
9. Yi X, Wang Y, Yu FS. Corneal epithelial tight junctions and their response to lipopolysaccharide challenge. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:4093-4100.
10. Ricciuto J, Heimer SR, Gilmore MS, Argueso P. Cell surface O-glycans limit *Staphylococcus aureus* adherence to corneal epithelial cells. *Infect Immun* 2008;76:5215-5220.
11. Nagase N, Sasaki A, Yamashita K, et al. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *J Vet Med Sci* 2002;64:245-250.
12. Chusid MJ, Davis SD. Experimental bacterial keratitis in neutropenic guinea pigs: polymorphonuclear leukocytes in corneal host defense. *Infect Immun* 1979;24:948-952.
13. Hume EB, Dajcs JJ, Moreau JM, Sloop GD, Willcox MD, O'Callaghan RJ. *Staphylococcus* corneal virulence in a new topical model of infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2904-2908.
14. Zieske JD, Higashijima SC, Spurr-Michaud SJ, Gipson IK. Biosynthetic responses of the rabbit cornea to a keratectomy wound. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:1668-1677.
15. Sloop GD, Moreau JM, Conerly LL, Dajcs JJ, O'Callaghan RJ. Acute inflammation of the eyelid and cornea in *Staphylococcus* keratitis in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:385-391.
16. Gipson IK. Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res* 2004;78:379-388.
17. Huang AJ, Tseng SC, Kenyon KR. Paracellular permeability of corneal and conjunctival epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:684-689.
18. Sugrue SP, Zieske JD. ZO1 in corneal epithelium: association to the zonula occludens and adherens junctions. *Exp Eye Res* 1997;64:11-20.
19. Rodrigues MM, Rowden G, Hackett J, Bakos I. Langerhans cells in the normal conjunctiva and peripheral cornea of selected species. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;21:759-765.
20. Klotz SA, Penn CC, Negvesky GJ, Butrus SI. Fungal and parasitic infections of the eye. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:662-685.

21. Merindano Ma.D. CJ, Canals M., Potau J.M., Ruano D. A comparative study of Bowman's layer in some mammals: Relationships with other constituent corneal structures. *European Journal of Anatomy* 2002;6:133-139.
22. Mantelli F, Argueso P. Functions of ocular surface mucins in health and disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8:477-483.
23. Friedlaender MH. *Allergy and Immunology of the Eye*. New York: Raven Press; 1993.
24. Kenyon KR. *Morphology and pathologic response o corneal and conjunctival disease*. Boston: Little, Brown & Co; 1994.
25. Chusid MJ, Davis S.D. Pathogenesis of corneal and conjuncctival infections., *Infections of the eye*. Boston: Little, Brown & Co; 1986.
26. Krieger M. The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr Opin Lipidol* 1997;8:275-280.
27. Pluddemann A, Neyen C, Gordon S. Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods* 2007;43:207-217.
28. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:333-337.
29. Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, Jamieson GA. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* 1992;80:1105-1115.
30. Puente Navazo MD DL, Ninio E, McGregor JL. Identification on human CD36 of a domain (155-183) implicated in binding oxidized low-density lipoproteins (Ox-LDL). 1996;16:1033-1039.
31. Stuart LM, Deng J, Silver JM, et al. Response to Staphylococcus aureus requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol* 2005;170:477-485.
32. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 2001;108:785-791.
33. Savill J, Hogg N, Ren Y, Haslett C. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest* 1992;90:1513-1522.
34. Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 2005;433:523-527.
35. Triantafilou M, Gamper FG, Haston RM, et al. Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem* 2006;281:31002-31011.
36. Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999;401:811-815.
37. Mwaikambo BR, Sennlaub F, Ong H, Chemtob S, Hardy P. Activation of CD36 inhibits and induces regression of inflammatory corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4356-4364.
38. Asch AS, Barnwell J, Silverstein RL, Nachman RL. Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *J Clin Invest* 1987;79:1054-1061.
39. Zelenka PS, Arpitha P. Coordinating cell proliferation and migration in the lens and cornea. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19:113-124.
40. Thorne RF, Marshall JF, Shafren DR, Gibson PG, Hart IR, Burns GF. The integrins alpha3beta1 and alpha6beta1 physically and functionally associate with CD36 in

- human melanoma cells. Requirement for the extracellular domain OF CD36. *J Biol Chem* 2000;275:35264-35275.
41. Tandon NN, Kralisz U, Jamieson GA. Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J Biol Chem* 1989;264:7576-7583.
 42. Park YM, Febbraio M, Silverstein RL. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J Clin Invest* 2009;119:136-145.
 43. Barnwell JW, Asch AS, Nachman RL, Yamaya M, Aikawa M, Ingravallo P. A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Clin Invest* 1989;84:765-772.
 44. Maguen E, Zorapapel NC, Zieske JD, et al. Extracellular matrix and matrix metalloproteinase changes in human corneas after complicated laser-assisted in situ keratomileusis (LASIK). *Cornea* 2002;21:95-100.
 45. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994;124:619-626.
 46. O'Callaghan RJ. Role of exoproteins in bacterial keratitis: the Fourth Annual Thygeson Lecture, presented at the Ocular Microbiology and Immunology Group Meeting, November 7, 1998. *Cornea* 1999;18:532-537.
 47. Ko JA, Liu Y, Yanai R, Chikama T, Takezawa T, Nishida T. Upregulation of tight-junctional proteins in corneal epithelial cells by corneal fibroblasts in collagen vitrigel cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:113-119.
 48. Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. *N Engl J Med* 1998;339:520-532.
 49. Stuart LM, Bell SA, Stewart CR, et al. CD36 signals to the actin cytoskeleton and regulates microglial migration via a p130Cas complex. *J Biol Chem* 2007;282:27392-27401.
 50. Merzdorf CS, Chen YH, Goodenough DA. Formation of functional tight junctions in Xenopus embryos. *Dev Biol* 1998;195:187-203.
 51. Schmuth M, Ortegon AM, Mao-Qiang M, Elias PM, Feingold KR, Stahl A. Differential expression of fatty acid transport proteins in epidermis and skin appendages. *J Invest Dermatol* 2005;125:1174-1181.
 52. Harris IR, Farrell AM, Memon RA, Grunfeld C, Elias PM, Feingold KR. Expression and regulation of mRNA for putative fatty acid transport related proteins and fatty acyl CoA synthase in murine epidermis and cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1998;111:722-726.
 53. Xu KP, Li XF, Yu FS. Corneal organ culture model for assessing epithelial responses to surfactants. *Toxicol Sci* 2000;58:306-314.
 54. Hutcheon AE, Sippel KC, Zieske JD. Examination of the restoration of epithelial barrier function following superficial keratectomy. *Exp Eye Res* 2007;84:32-38.
 55. Chen Y, Merzdorf C, Paul DL, Goodenough DA. COOH terminus of occludin is required for tight junction barrier function in early Xenopus embryos. *J Cell Biol* 1997;138:891-899.
 56. Grossmann J. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis* 2002;7:247-260.
 57. Valentijn AJ, Zouq N, Gilmore AP. Anoikis. *Biochem Soc Trans* 2004;32:421-425.
 58. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827-839.
 59. Chang SW, Hu FR. Changes in corneal autofluorescence and corneal epithelial barrier function with aging. *Cornea* 1993;12:493-499.

5. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....
Datum

.....
Unterschrift

6. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Klocke

Vorname: Julia Babette

Geburtsdatum/ -ort: 05.02.1984 in Berlin

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schullaufbahn

| | |
|-------------|--|
| 1990 - 2000 | Grundschule und Gymnasium in Kaltenkirchen |
| 2000 - 2001 | Austauschjahr an der Spencerport High School USA |
| 2001 - 2003 | Elsensee- Gymnasium, Quickborn |
| | Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife |

Studium

| | |
|-------------------|--|
| 10/2003 - 06/2011 | Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig |
| 03/2006 | Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung: befriedigend |
| 04/2011 | Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung: befriedigend |

Dissertation

An der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde, Universität Leipzig

Thema: Spontane bakterielle Keratitis in CD36^{-/-} Knockout- Mäusen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. P. Wiedemann und Frau M. Gregory- Ksander, Ph.D.

Praktisches Jahr

| | | |
|----------------|--|----------|
| Innere Medizin | Nephrologie am Klinikum St. Georg Leipzig | 2 Monate |
| | Kardiologie am Klinikum St. Georg Leipzig | 2 Monate |
| Chirurgie | Herzzentrum Leipzig | 2 Monate |
| | Traumatologie am Uniklinikum Leipzig | 2 Monate |
| Wahlfach | Gynäkologie am Kantonsspital Münsterlingen | 4 Monate |

Famulaturen

02/2005 Gynäkologie, Frauenklinik Leipzig
08/2007 Innere Medizin, Uniklinik Leipzig
08/2009 Praxisfamulatur Gynäkologie, Leipzig
09/2009 Innere Medizin, Arnsberg

Wissenschaftliche Arbeit

10/2007 - 09/2008 Forschungsaufenthalt am Schepens Eye Research Institute,
Harvard Medical School, Boston, USA

Publikation

Klocke J, Barcia RN, Heimer S, Cario E, Zieske J, Gilmore MS, Ksander BR, Gregory MS (2011): Spontaneous bacterial keratitis in CD36 knockout mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 5;52(1):256-63

Abstracts

M.S. Gregory, J. Klocke, R. Barcia, S. Heimer, J. Zieske, M.S. Gilmore, B.R. Ksander (2009): CD36 is a Critical Component of the Corneal Epithelial Barrier to Infection. ARVO Annual Meeting, Fort Lauderdale, FL

Posterpräsentation

Julia Klocke, Rita N. Barcia, Susan Heimer, Caroline Hackett, Michael S. Gilmore, Bruce R. Ksander, Meredith S. Gregory (2008): Spontaneous bacterial keratitis in CD36KO mice. Update on Ophthalmology, Department of Ophthalmology, Harvard medical school.

Leipzig, den

.....

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. P. Wiedemann für die freundliche Betreuung meiner Doktorarbeit und für die Unterstützung bei der Durchführung der Promotion in Leipzig.

Frau Dr. M. Gregory- Ksander möchte ich danken für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die exzellente Betreuung während der Arbeit an dem experimentellen Teil meiner Dissertation während meines Auslandsaufenthaltes am Schepens Eye Research Institutes in Boston, MA.

Auch Prof. Dr. A. Reichenbach gilt mein Dank, der mich in seiner Funktion als Promotionsbeauftragter bei all meinen Fragen und Problemen mit Rat und Tat unterstützt hat.

Zuletzt möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei meiner Familie, Freunden, meinem Freund Mark und vor allem bei meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung während der gesamten Studienzeit von ganzem Herzen zu bedanken.