

**Aus dem Bereich Theoretische Medizin und Biowissenschaften Fachrichtung  
Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Zentrum für Infektionskrankheiten der  
medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg (Saar)**

**Der Einfluss des multifunktionalen extrazellulären  
Adhäsionsproteins (Eap) von *Staphylococcus aureus* auf  
die Morphologie und Funktion von eukaryotischen Zellen**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes**

**2019**

**Vorgelegt von Janina Eisenbeis**

**geb. am 28.02.1985 in Homburg/Saar**

### Erklärung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Zeitraum von Mai 2012 bis September 2017 am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Abbildungen und Text dieser Dissertation finden sich in Teilen auch in den unten aufgeführten Publikationen wieder. Eine vollständige Publikationsübersicht der Autorin findet sich im Abschnitt: **Publikationen, Kongressbeiträge und Forschungspreis.**

Stapels, D.A., Ramyar, K.X., Bischoff, M., von Kockritz-Blickwede, M., Milder, F.J., Ruyken, M., **Eisenbeis, J.**, McWhorter, W.J., Herrmann, M., van Kessel, K.P., Geisbrecht, B.V., Rooijackers, S.H., 2014. *Staphylococcus aureus* secretes a unique class of neutrophil serine protease inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 111, 13187-13192.

**Eisenbeis, J.**, Peisker, H., Backes, C.S., Bur, S., Holters, S., Thewes, N., Greiner, M., Junker, C., Schwarz, E.C., Hoth, M., Junker, K., Preissner, K.T., Jacobs, K., Herrmann, M., Bischoff, M., 2017. The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* acts as a proliferation and migration repressing factor that alters the cell morphology of keratinocytes. **International journal of medical microbiology: IJMM** 307, 116-125.

**Eisenbeis, J.**, Saffarzadeh, M., Peisker, H., Jung, P., Thewes, N., Preissner, K.T., Herrmann, M., Molle, V., Geisbrecht, B.V., Jacobs, K., Bischoff, M., 2018. The *Staphylococcus aureus* Extracellular Adherence Protein Eap Is a DNA Binding Protein Capable of Blocking Neutrophil Extracellular Trap Formation. **Frontiers in cellular and infection microbiology** 8, 235.

Die Autorin dieser Dissertationsschrift ist Erstautorin, gezielte Erstautorin, oder Co-Autorin der aufgeführten Publikationen. Alle in dieser Arbeit gezeigten, bereits in den Publikationen veröffentlichten Abbildungen, sind in der Bildunterschrift entsprechend gekennzeichnet. Die in den Artikeln und dieser Arbeit gezeigten Daten am Rasterkraftmikroskop (AFM) wurden durch die Autorin vorbereitet und statistisch ausgewertet, jedoch im Rahmen dieses Projekts von H. Peisker (IMMH) gemessen.

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Erklärung .....</b>	<b>I</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>XV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XVIII</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>XXI</b>
<b>Summary .....</b>	<b>XXIII</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1 Der Keim <i>Staphylococcus aureus</i> .....	- 1 -
1.2 <i>S. aureus</i> als Pathogen .....	- 3 -
1.3 Die Etablierung einer Infektion durch <i>S. aureus</i> .....	- 5 -
1.4 Immunevasionsmechanismen von <i>S. aureus</i> .....	- 7 -
1.5 Das Extrazelluläre Adhäsionsprotein (Eap) .....	- 13 -
1.5.1 Die Struktur von Eap .....	- 14 -
1.5.2 Die Regulation von Eap .....	- 16 -
1.5.3 Eap als Adhäsın .....	- 18 -
1.5.4 Eap als Invasin .....	- 20 -
1.5.5 Eap als Immunmodulator .....	- 20 -
1.5.6 <i>S. aureus</i> und Eap im Kontext chronischer Wunden .....	- 24 -
1.5.7 Der Prozess der Wundheilung .....	- 26 -
1.5.8 Eap im Zusammenhang mit Biofilmbildung in chronischen Wunden .....	- 29 -
1.5.9 Eap als potentielles Therapeutikum .....	- 30 -
1.6 Das Blasenkarzinom als Modellsystem .....	- 33 -
1.7 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit .....	- 33 -
<b>2. Material .....</b>	<b>- 36 -</b>
2.1 Verwendete Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien .....	- 36 -
2.1.1 Bakterienstämme .....	- 36 -

2.1.2 Eukaryotische Zelllinien .....	- 36 -
2.2 Nährmedien und Kulturzusätze.....	- 38 -
2.2.1 Nährmedien zur Anzucht von Bakterien .....	- 38 -
2.2.2 Flüssigmedien zur Anzucht eukaryotischer Zelllinien .....	- 38 -
2.2.3 Zusätze für Zellkultur-basierte Assays .....	- 39 -
2.3 Puffer und Lösungen .....	- 39 -
2.4 Oligonukleotide (Primer) .....	- 44 -
2.5 DNA-Quellen .....	- 45 -
2.6 AFM-Verbrauchsmaterial .....	- 45 -
2.7 Enzyme .....	- 45 -
2.8 Reaktionssysteme (Kits) .....	- 46 -
2.9 Laborgeräte .....	- 47 -
2.10 Software .....	- 48 -
2.11 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	- 49 -
<b>3. Methoden .....</b>	<b>- 50 -</b>
3.1 Grundlegenden zellbiologische Methoden .....	- 50 -
3.1.1 Kultur von Bakterien.....	- 50 -
3.1.1.1 Kryokonservierung von <i>S. aureus</i> .....	- 50 -
3.1.1.2 Bestimmung von optischen Dichten (ODs).....	- 50 -
3.1.1.3 Bestimmung von Kolonie bildenden Einheiten (KbE).....	- 51 -
3.1.1.4 Wachstumskurve .....	- 51 -
3.1.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen .....	- 51 -
3.1.2.1 Subkultivierung (Splitten) .....	- 51 -
3.1.2.2 Trypanblaufärbung und Einstellung definierter Zellzahlen .....	- 52 -
3.1.2.3 Kryokonservierung eukaryotischer Zelllinien .....	- 53 -
3.1.2.4 Inkulturnahme kryokonservierter Zellen.....	- 53 -
3.1.2.5 Testung auf Mykoplasmen .....	- 53 -
3.2 Aufreinigung des Eap aus dem <i>S. aureus</i> Stamm Newman T.F.....	- 55 -
3.2.1 Gewinnung des Proteins aus bakterieller Kultur.....	- 55 -
3.2.2 Aufkonzentration und Umpufferung von Eap.....	- 57 -

3.2.3	Testung auf Endotoxin mittels Limulus-Amoebocyten-Lysat Test (LAL) .....	- 58 -
3.2.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels BCA-Test .....	- 59 -
3.2.5	Proteinase K (PK)-Verdau von Eap.....	- 60 -
3.3	Semi-quantitative Bestimmung der <i>in vitro</i> Produktion des Eap .....	- 60 -
3.4	DNA-basierte Methoden .....	- 61 -
3.4.1	Isolierung genomischer DNA aus <i>S. aureus</i> .....	- 61 -
3.4.2	Konzentrationsbestimmung von DNA (Nanodrop).....	- 61 -
3.4.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	- 62 -
3.4.4	Agarosegel Elektrophorese (AGE) .....	- 63 -
3.5	Eap-DNA-Assays.....	- 63 -
3.5.1	Eap-DNA-Bindung .....	- 63 -
3.5.2	Restriktionsverdau des Plasmids pBR322 zur Testung des Einflusses der Endkonfiguration von DNA-Fragmenten auf die Eap-Bindung .....	- 63 -
3.5.3	Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkoholfällung.....	- 64 -
3.5.4	DNase Agar zur Testung auf Desoxyribonukleaseaktivität (DNase) .....	- 65 -
3.6	Herstellung einer <i>nuc1/nuc2</i> und <i>eap</i> -defizienten Mutante von <i>S. aureus</i> Newman- 65 -	- 65 -
3.6.1	Phagentransduktion .....	- 65 -
3.6.2	Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR, engl. "real-time quantitative PCR").....	- 67 -
3.6.2.1	Gewinnung der Gesamt-Zell-RNA aus <i>S. aureus</i> .....	- 67 -
3.6.2.2	Reverse Transkription .....	- 68 -
3.6.2.3	Die quantitative Echtzeit-PCR (engl. "real-time PCR") .....	- 69 -
3.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) .....	- 71 -
3.6.4	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen.....	- 72 -
3.6.5	Elektrotransferverfahren von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran ("Western Blot").....	- 73 -
3.7	Zellkulturbasierte Assays .....	- 74 -
3.7.1	Testung der Proliferationsrate mittels BrdU-Assay .....	- 74 -
3.7.2	Testung der Stoffwechselrate mittels MTT-Assay .....	- 76 -
3.7.3	Zellen in Echtzeiterfassung mit dem RTCA-Assay (E-Plate) .....	- 77 -

3.7.4 Untersuchungen zu Auswirkungen von Eap auf die Morphologie von Keratinozyten (HaCaT) im "Cell Observer" (CO)-System .....	- 77 -
3.8.4.1 Transfektion der HaCaT Zellen mit dem pmax-Lifeact-mEGFP Plasmid (Nucleofection®).....	- 78 -
3.8.4.2 Assay zur Beobachtung von zellmorphologischen Veränderungen im "Cell Observer" (CO)-System.....	- 78 -
3.7.5 Migrationsassays .....	- 79 -
3.7.5.1 Ibidi-Assay .....	- 79 -
3.7.5.2 Oris-Migrationsassay .....	- 80 -
3.7.5.3 Zellmobilitätsassay.....	- 80 -
3.7.6 Untersuchung des Eap-Effekts auf die Apoptose und Nekrose von Zellen.....	- 81 -
3.7.7 Betrachtung der Sphäroidbildung.....	- 82 -
3.7.8 AlphaLISA® SureFire® Ultra™ HV p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) Assay.....	- 82 -
3.8 Rasterkraftmessungen mittels "Atomic force microscopy" AFM .....	- 84 -
3.8.1 Messungen der Topographischen Eigenschaften lebendender Zellen .....	- 84 -
3.8.2 Messungen der Adhäsionskraft von Zellen mittels FluidFM.....	- 85 -
3.8.3 Messung von DNA und Proteinen .....	- 85 -
3.9 Statistische Auswertung und graphische Darstellung.....	- 86 -
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>- 87 -</b>
4.1 Wachstumsverhalten und Transkriptionsanalysen der <i>eap</i> -Homologen von <i>S. aureus</i> Newman T.F. in THB .....	- 87 -
4.1.1 Wachstumskurve von <i>S. aureus</i> Newman T.F. in Todd Hewitt Broth (THB) ....	- 87 -
4.1.2 Transkriptionsanalysen von <i>eap</i> , <i>eapH1</i> und <i>eapH2</i> in THB .....	- 88 -
4.2 Der Einfluss des extrazellulären Adhärenzproteins (Eap) auf zelluläre Vorgänge der Wundheilung .....	- 90 -
4.2.1 Der Einfluss von Eap auf die Proliferation und den Metabolismus am Wundschluss beteiligter Zelltypen.....	- 90 -
4.2.1.1 Der Einfluss von Eap auf die Proliferation und den Metabolismus der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT .....	- 91 -
4.2.1.2 Der Einfluss von Eap auf die Proliferation und den Metabolismus von Endothelzellen (EA.hy926) .....	- 92 -

4.2.1.3 Der Einfluss von Eap auf die Proliferation und den Metabolismus der Fibroblastenzelllinie BJ .....	- 94 -
4.2.2 Der Einfluss von Eap auf die frühe und späte Apoptose .....	- 95 -
4.2.2.1 Der Einfluss von Eap auf die frühe und späte Apoptose/Nekrose von HaCaT-Zellen.....	- 96 -
4.2.1.2 Der Einfluss von Eap auf die frühe und späte Apoptose/Nekrose von Endothelzellen (EA.hy926) .....	- 97 -
4.2.3 Der Einfluss von Eap auf die Morphologie von Keratinozyten (HaCaT).....	- 98 -
4.2.3.1 Erkenntnisse im Echtzeit-Zell-Darstellungssystem (RTCA engl. "real time cell analyzer" System).....	- 98 -
4.2.3.2 Erkenntnisse im Zellobservierungssystem (CO engl. "Cell Observer") .....	- 99 -
4.2.3.3 Erkenntnisse mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM engl. "atomic force microscope").....	- 101 -
4.2.3.4 Erkenntnisse über die Adhäsionskraft der Zellen mittels Mikrofluidik-kombinierten Rasterkraftmikroskop (FluidFM engl. "fluid force microscope") .....	- 103 -
4.2.4 Der Einfluss von Eap auf die Migration von Zellen im Lückenschluss-Assay. -	104 -
4.2.4.1 Der Einfluss von Eap auf die Migration von Keratinozyten (HaCaT).....	- 105 -
4.2.4.2 Der Einfluss von Eap auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy926) ..	- 109 -
4.2.4.3 Der Einfluss von Eap auf die Migration von Fibroblasten (BJ) .....	- 110 -
4.2.5 Der Einfluss von Eap auf die Mobilität von Keratinozyten (HaCaT) auf Einzelzellniveau .....	- 111 -
4.3 <i>In vitro</i> Produktion von Eap.....	- 112 -
4.4 Die Interaktion von Eap mit DNA .....	- 115 -
4.4.1 Nachweis der Eap-DNA Interaktion mittels Agarosegelelektrophorese .....	- 115 -
4.4.2 Nachweis der Eap-DNA Interaktion mittels AFM .....	- 117 -
4.4.3 Überprüfung des Einflusses der endständigen Konfiguration der DNA-Fragmente auf die Eap-Bindungseffizienz .....	- 118 -
4.4.4 Untersuchung einer möglichen intrinsischen DNase Aktivität von Eap mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkoholfällung und Agarosegelelektrophorese.....	- 120 -
4.4.5 Generierung einer $\Delta$ eap Mutante aus dem nukleasemutanten Stamm M0746N1 ( <i>S. aureus</i> Newman <i>nuc1nuc2</i> ) mittels Phagentransduktion .....	- 121 -
4.4.5.1 Überprüfung der <i>eap</i> -Deletion mittels qPCR und Western Blot .....	- 121 -

4.4.6 Untersuchung einer möglichen intrinsischen DNase Aktivität von Eap mittels DNase-Test-Agar.....	- 122 -
4.5 Die Auswirkungen von Eap als proliferations- und migrationshemmendes Agens auf Blasen tumorzellen .....	- 124 -
4.5.1 Der Einfluss von Eap auf die Proliferation und den Metabolismus der nicht-invasiven Blasenkrebszelllinien RT-112 und 5637 .....	- 124 -
4.5.2 Der Einfluss von Eap auf die frühe und späte Apoptose der Blasenkrebszelllinien RT-112 und 5637.....	- 127 -
4.5.3 Der Einfluss von Eap auf die Migration der Blasenkrebszelllinien RT-112 und 5637 im Lückenschluss-Assay.....	- 128 -
4.5.4 Der Einfluss von Eap auf die Morphologie der Blasenkrebszelllinie RT-112, dargestellt mittels AFM .....	- 130 -
4.5.5 Der Einfluss von Eap auf die Bildung von Sphäroiden der nicht-invasiven Blasenkrebszelllinien RT-112 und 5637.....	- 132 -
4.5.6 Der Einfluss von Eap auf die wachstumsfaktorinduzierte Phosphorylierung von Erk1/2 der Blasenkrebszelllinien RT-112 und 5637.....	- 134 -
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>- 138 -</b>
5.1 Das Wachstumsverhalten von <i>S. aureus</i> Newman T.F. in THB und die wachstumsphasenabhängige Transkription von <i>eap</i> , <i>eapH1</i> und <i>eapH2</i> in diesem Medium .....	- 138 -
5.2 Der Einfluss von Eap auf zelluläre Mechanismen der Wundheilung.....	- 143 -
5.3 Die Sezernierung von Eap <i>in vitro</i> .....	- 153 -
5.4 Eap interagiert mit DNA und bildet damit die Grundlage für weitere Immunmanipulationen .....	- 156 -
5.5 Eap ein proliferations- und migrationshemmendes Agens als potentielles Krebstherapeutikum .....	- 160 -
5. 6 Schlussfolgerung und Ausblick .....	- 166 -
<b>6. Literatur.....</b>	<b>- 170 -</b>
<b>Publikationen, Kongressbeiträge und Forschungspreis.....</b>	<b>- 190 -</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

Für Bezeichnungen, mit auch im Deutschen gebräuchlichen englischen Varianten wie "DNA", wurde neben der deutschsprachigen Übersetzung, auch der englische Volltext angegeben. Ebenso wurde, wenn keine gängige deutschsprachige Formulierung existiert, unter "Volltext" nur die ausgeschriebene, englische Bezeichnung erfasst. Die aufgelisteten Abkürzungen entsprechen den in dieser Arbeit verwendeten Kürzeln.

<b>Abkürzung</b>	<b>Volltext</b>
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ad</b>	adde (auffüllen bis)
<b>ADAM10</b>	engl. "a disintegrin and metalloprotease 10"
<b>agr</b>	engl. "accessory gene regulator"
<b>AK</b>	Antikörper
<b>allg.</b>	allgemein
<b>AMPs</b>	antimikrobielle Peptide
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>APC</b>	Antigen-präsentierende Zelle, engl. "antigen presenting cell"
<b>AS</b>	Aminosäuren
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>AW</b>	Alternativer Weg der Komplementaktivierung
<b>BAP</b>	engl. "biofilm associated protein"
<b>BCA</b>	Bicinchoninsäure, engl. "bicinchoninic acid"
<b>BHI</b>	engl. "Brain Heart Infusion"
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BrdU</b>	Bromodesoxyuridin
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>C1-C9</b>	Komplementfaktoren, engl. "complement factors"
<b>CA</b>	In der Gesellschaft erworben, engl. "community-acquired"
<b>CaM</b>	engl. "calcium-modulated protein"
<b>cDNA</b>	Komplementäre DNA, engl. "complementary DNA"
<b>CH<sub>3</sub></b>	Methylgruppe

<b>CHIPS</b>	Chemotaxis inhibierendes Protein von <i>S. aureus</i> , engl. "chemotaxis inhibitory protein of <i>S. aureus</i> "
<b>CifA/B</b>	Klumpungsfaktoren A und B, engl. "clumping factors A/B"
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>Coa</b>	Koagulase, engl. "Coagulase"
<b>Ct-Wert</b>	engl. "cycle threshold"
<b>D</b>	Dicke
<b>d</b>	Tag (e)
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	im Rahmen dieser Arbeit: deionisiertes Wasser (<18 MΩ.cm, bei 25°C)
<b>dlt</b>	Operon in der Biosynthese von D-alanyl-Lipoteichonsäuren, engl. "d-Alanyl carrier protein ligase"
<b>DMF</b>	Dimethylformamid
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure, engl. "desoxy ribonucleic acid"
<b>DNase I</b>	Desoxyribonuklease I
<b>dNTP</b>	Desoxynukleosidtriphosphat
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EAE</b>	experimentelle autoimmunvermittelte Enzephalomyelitis
<b>Eap</b>	Extrazelluläres Adhäsionsprotein
<b>EapH1, EapH2</b>	Eap-Homologe 1 und 2
<b>ECL</b>	engl. "enhanced chemiluminescence"
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>eDNA</b>	Extrazelluläre DNA
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure, engl. "Ethylenediaminetetraacetic acid"
<b>Efb</b>	extrazelluläres Fibrinogen-bindendes Protein
<b>EGF</b>	Epithelialer Wachstumsfaktor, engl. "epithelial growth factor"
<b>engl.</b>	englisch

<b>Erk</b>	extrazellulär regulierte Kinasen, engl. "Extracellular signal-regulated kinases"
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>EZM</b>	Extrazelluläre Matrix
<b>FACS</b>	Durchflusszytometrie; engl. "fluorescence activated cell sorting"
<b>Fc</b>	kristallisierbares Fragment Fc (engl. "crystallisable fragment"), Teil der konstanten Domäne von Antikörpern
<b>FGF</b>	Fibroblasten Wachstumsfaktor, engl. "fibroblast growth factor"
<b>Fn</b>	Fibronektin
<b>FnBPA/B</b>	Fibronektinbindeproteine A/B
<b>FKS</b>	Fötales Kälberserum
<b>FPLC</b>	Flüssigchromatographie; engl. "fast protein liquid chromatography"
<b>Fur</b>	engl. "Ferric uptake regulator"
<b>g</b>	Gramm
<b>GDP</b>	Guanosindiphosphat
<b>Ggf.</b>	Gegebenenfalls
<b>GRB2</b>	Wachstumsfaktor rezeptorgebundenen Protein 2, engl. "Growth factor receptor-bound protein 2"
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>h</b>	Stunde
<b>HA</b>	Im Krankenhaus erworben, engl. "hospital-acquired"
<b>Hla</b>	Toxin A, $\alpha$ -Toxin
<b>HMGB1</b>	engl. "High-Mobility-Group-Protein B1"
<b>HRP</b>	Meerrettichperoxidase, engl. "horseradish peroxidase"
<i>ica</i>	engl. "intercellular adhesion"
<b>ICAM-1</b>	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1, engl. "intercellular adhesion molecule 1"
<b>i.d.R</b>	In der Regel

<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IMMH</b>	Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene
<b>KbE</b>	Kolonie-bildende Einheiten
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>KGF</b>	Keratinocyten Wachstumsfaktor
<b>KuU</b>	Kunitz unit
<b>KW</b>	Klassischer Weg der Komplementaktivierung
<b>l</b>	Liter
<b>LA</b>	Nutztier-assoziiert, engl. "livestock associated"
<b>LAL</b>	Limulus Amöbozyten Lysat
<b>LB</b>	Lennox Broth
<b>LD</b>	Ladepuffer
<b>LFA-1</b>	engl. "lymphocyte function-associated antigen 1"
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>LPXTG</b>	Leucin-Prolin-X-Threonin-Glycin-Sequenz
<b>Lsg.</b>	Lösung
<b>LW</b>	Lektin Weg der Komplementaktivierung
<b>M</b>	Mol pro Liter
<b>Map</b>	MHC Klasse II analoges Protein, alternativer Name für Eap
<b>MASP</b>	MBL-assoziierte Serinprotease
<b>MBB</b>	engl. ""Modified Basic Broth"
<b>MBL</b>	Mannose-bindende Lektin
<b>mg</b>	Milligramm
<b><i>mecA</i></b>	Gen kodierend für PBP2A
<b>MEK</b>	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
<b>MHC</b>	Haupthistokompatibilitätskomplex, engl. "major histocompatibility complex"
<b>min</b>	Minute
<b>mk-IgG</b>	Monoklonaler Antikörper des Isotyps IgG
<b>ml</b>	Milliliter

<b>mM</b>	Millimol pro Liter
<b>MMPs</b>	Matrixmetalloproteinasen
<b>MRSA</b>	Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i>
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid
<b>MVA</b>	"modifizierte Vaccinia Ankara"
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>n.a.</b>	nicht auswertbar
<b>NB</b>	engl. "Nutrient Broth"
<b>NE</b>	Neutrophile Elastase
<b>NEAA</b>	Nicht-essentielle Aminosäuren; engl. "non-essential amino acids"
<b>NETs</b>	engl. "Neutrophil extracellular traps"
<b>NF-κB</b>	engl. "Nuklear Factor κB"
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>nm</b>	Nanometer
<b>N/m</b>	Newtonmeter
<b>nN</b>	Nanonewton
<b>Nptase</b>	Neutral Phosphatase
<b>NSPs</b>	Neutrophile Serinproteasen
<b>Nuc</b>	Nuklease, engl. "nuclease"
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>ONPG</b>	o-Nitrophenyl-β-Galactosidase
<b>OPN</b>	Osteopontin
<b>OTS</b>	Octadecyltrichlorosilan
<b>p70</b>	kationisches 70 kDa-großes Protein, alternativer Name für Eap
<b>PAMP</b>	engl. "pathogen-associated molecular pattern"
<b>PBMCs</b>	engl. "Peripheral Blood Mononuclear Cells"
<b>PBP2A</b>	Penicillin-bindendes Protein 2A
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Saline, engl. "phosphate buffered saline"
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion; engl. "polymerase chain reaction"

<b>PDGF</b>	engl. "Plateled Derived Growth Factor"
<b>PIA</b>	interzelluläres Polysaccharid-Adhäsion
<b>PK</b>	Proteinase K
<b>pk-IgG</b>	Polyklonaler Antikörper des Isotyps IgG
<b>pN</b>	Piconewton
<b>PRR</b>	engl. "pattern recognition receptors"
<b>PS</b>	Phosphatidylserin
<b>PSMs</b>	Phenol-lösliche Moduline, engl. "phenol-soluble modulins"
<b>PVL</b>	Panton-Valentine Leukocidin
<b>qPCR</b>	quantitative Echtzeit-PCR, engl. "quantitative real-time PCR"
<b>Raf</b>	engl. "rapidly accelerated fibrosarcoma"
<b>Ras</b>	engl. "rat sarkoma G-Protein"
<b>RNA</b>	Ribonucleinsäure; engl. "ribonucleic acid"
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute; engl. "rounds per minute"
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>RZK</b>	Rezeptortyrosinkinase
<b>S.</b>	<i>Staphylococcus</i>
<b>S. aureus</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>SAB</b>	<i>S. aureus</i> Bakteriämie
<b>sae</b>	engl. "SA exoprotein expression"
<b>SAK</b>	Staphylokinase
<b>SarA</b>	engl. "staphylococcal accessory regulator A"
<b>Sas</b>	engl. " <i>Staphylococcus aureus</i> surface protein"
<b>SCIN</b>	Staphylokokkus Komplement Inhibitor, engl. "staphylococcal complement inhibitor"
<b>SCV</b>	engl. "small colony variant"
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulphat, engl. "sodium dodecyl sulfate"
<b>SDS-PAGE</b>	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

<b>SEB</b>	Staphylokokken Enterotoxin B
<b>sec</b>	Sekunde
<b>SERAM</b>	engl. "secretable expanded repertoire adhesive molecule"
<b>Si</b>	Silizium
<b>sMAP</b>	kleines MBL-bindendes Protein, engl. "small MBL-associated protein"
<b>s.o.</b>	siehe oben
<b>SOS</b>	engl. "son of sevenless"
<b>Spa</b>	Protein A
<b>SSI</b>	engl. "surgical site infections"
<b>s.u.</b>	siehe unten
<b>T</b>	Tween 20
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA
<b>TBS</b>	Tris gepufferte Saline, engl. "Tris buffered saline"
<b>TCC</b>	engl. "Transitional cell carcinoma"
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylendiamin
<b>TF</b>	engl. "Tissue Factor"
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ , engl. "Transforming Growth Factor $\beta$ "
<b>TH</b>	T-Helferzelle
<b>TLR9</b>	engl. "Toll-like receptor 9"
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor $\alpha$
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>TSB</b>	Trypton-Soja-Medium, engl. "Trypticase soy broth"
<b>TSS</b>	Toxisches Schocksyndrom
<b>TSST-1</b>	Toxic-Schock-Syndrom-Toxin-1
<b>üN</b>	Über Nacht
<b>ÜK</b>	Übernachtkultur
<b>uPAR</b>	Urokinase Plasminogen Aktivator-Rezeptor
<b>VEGF</b>	engl. "vascular endothelial growth factors"
<b>vWF</b>	von-Willebrand-Faktor

<b>Wt</b>	Wildtyp
<b>WTA</b>	Wandteichonsäuren, engl. "wall teichoic acid"
<b>x g</b>	Vielfaches der Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem
<b>ZO</b>	Zelloberfläche
<b>z.T.</b>	zum Teil
<b>Δ</b>	Delta, bezeichnet eine Deletion
<b>μl</b>	Mikroliter
<b>μm</b>	Mikrometer
<b>μM</b>	Mikromolar
<b>σB, SigB</b>	Alternativer Sigmafaktor B

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen (SEM) von <i>S. aureus</i> Zellen .....	1
Abb. 1.2 Übersicht über die Gruppen von Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i> .....	6
Abb. 1.3: Die drei Wege der Komplementaktivierung.....	9
Abb. 1.4: Aufbau des modularen Proteins Eap.....	16
Abb. 1.5: Darstellung des Wundheilungsverlaufs.....	27
Abb. 3.1: Prinzip der BCA-Reaktion.....	59
Abb. 3.2: Prinzip der BrdU-basierten Proliferationsmessung.....	75
Abb. 3.3: Prinzip des MTT-Assays.....	76
Abb. 3.4: Darstellung des Testprinzips des AlphaLISA® SureFire® Ultra™ HV Assay.....	83
Abb. 4.1: Bestimmung des Wachstumsverhaltens von <i>S. aureus</i> Newman T.F. in THB über einen Zeitraum von 12 h.....	87

Abb. 4.2: Bestimmung der Transkriptionsrate von eap und den Homologen eapH1 und eapH2 mittels qPCR.....	89
Abb. 4.3: Der proliferationshemmende Einfluss von Eap auf Keratinozyten (HaCaT).....	92
Abb. 4.4: Der proliferationshemmende Einfluss von Eap auf Endothelzellen (EA.hy926).....	93
Abb. 4.5: Der proliferationshemmende Einfluss von Eap auf die Fibroblastenzelllinie BJ.....	94
Abb. 4.6: Der Einfluss von Eap auf die frühe und späte Apoptose/Nekrose von Keratinozyten (HaCaT).....	96
Abb. 4.7: Der Einfluss von Eap auf die frühe und späte Apoptose/Nekrose von Endothelzellen (EA.hy926).....	97
Abb. 4.8: Zellindex-Kinetik aus RTCA-Impedanzmessung der Keratinozytenzelllinie HaCaT.....	99
Abb. 4.9: Der Einfluss von Eap auf die Morphologie von HaCaT-Zellen dargestellt im CO-System.....	100
Abb. 4.10: Rasterkraftmikroskopische (AFM) Abbildung von Keratinozyten unter Eap-Einfluss.....	102
Abb. 4.11: Messung der Adhäsionskraft von Keratinozyten an das Substrat mittels Mikrofluidik-kombinierter Rasterkraftmikroskopie (FluidFM).....	104
Abb. 4.12: Der Einfluss von Eap auf die Migration von Keratinozyten im ibidi-Assay.....	106
Abb. 4.13: Exemplarische Aufnahme des Oris-Assays mit einer Luftblase.....	107
Abb. 4.14: Der Einfluss von Eap auf die Migration von Keratinozyten im Oris-Assay.....	108
Abb. 4.15: Der Einfluss von Eap auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy926) im Oris-Assay.....	109
Abb. 4.16: Der Einfluss von Eap auf die Migration der Fibroblastenzelllinie BJ im Oris-Assay.....	110
Abb. 4.16C: Ausschnitt aus einer Aufnahme des EnSight™ eines Oris-Migrationsassays mit BJ Zellen.....	111
Abb. 4.17: Der Einfluss von Eap auf die Mobilität individueller HaCaT-Zellen, dargestellt im CO-System.....	112

Abb. 4.18: Wachstumsphasen abhängige Sezernierung von Eap in TSB <i>in vitro</i> .....	114
Abb. 4.19: Eap Sezernierung in der exponentiellen Phase in RPMI1640.....	115
Abb. 4.20: Eap interagiert mit DNA in konzentrationsabhängiger Weise.....	116
Abb. 4.21: Die Bindung von Eap an DNA wird durch die Konformation der DNA beeinflusst.....	117
Abb. 4.22: Eap bindet mit gleicher Effizienz an "blunt", oder "sticky"-Enden von Restriktionsfragmenten.....	118
Abb. 4.23: Verkürzung von DNA-Strängen durch Eap über die Zeit.....	119
Abb. 4.24: Phenol-Chloroform-Isoamylalkoholfällung von Eap-DNA-Reaktionen indiziert keinen DNA-Abbau durch Eap.....	120
Abb. 4.25: Western Blot mit Überständen von <i>S. aureus</i> Newman M0746N1 (Newman <i>nuc1nuc2</i> ) und der durch Phagentransduktion erzeugten <i>eap</i> -Mutante.....	122
Abb. 4.26: Nukleaseaktivität von <i>S. aureus</i> Newman T.F. und <i>nuc1nuc2</i> -, sowie <i>eap</i> -defizienter Mutanten auf DNase-Test-Agar.....	123
Abb. 4.27: Der Proliferationshemmende Einfluss von Eap auf die Blasenkarzinomzelllinie RT-112.....	123
Abb. 4.28: Der Einfluss von Eap auf die Proliferation der Blasenkarzinomzelllinie 5637.....	126
Abb. 4.29: Der Einfluss von Eap auf die frühe und späte Apoptose/Nekrose der Blasenkarzinomzelllinie RT-112.....	127
Abb. 4.30: Der Einfluss von Eap auf die frühe und späte Apoptose/Nekrose der Blasenkarzinomzelllinie 5637.....	128
Abb. 4.31: Der Einfluss von Eap auf die Migration der Zelllinie RT-112 im Oris-Assay.....	129
Abb. 4.32: Der Einfluss von Eap auf die Migration der Zelllinie 5637 im Oris-Assay.....	130
Abb. 4.33: AFM-Abbildung der Blasenkarzinomzelllinie RT-112 unter Eap-Einfluss.....	132
Abb. 4.34: Die Auswirkung einer Eap-Behandlung auf die Entwicklung von Sphäroiden der Zelllinie RT-112.....	134

Abb. 4.35: Die Auswirkung einer Eap-Behandlung auf die Entwicklung von Sphäroiden der Zelllinie 5637.....135

Abb. 4.36: Der Effekt von Eap auf die wachstumsfaktorabhängige Phosphorylierung von ERK1/2 in der Zelllinie RT-112.....137

Abb. 4.37: Der Effekt von Eap auf die wachstumsfaktorabhängige Phosphorylierung von ERK1/2 in der Zelllinie 5637.....138

Abb. 5.1: Der Migrationsprozess von Keratinozyten.....150

Abb. 5.2: Die "Mitogen aktivierte Protein Kinase/extrazellulär regulierte Kinase (MAPK/Erk) Signalkaskade".....151

Abb. 5.3: Die Hauptmechanismen der Biofilmbildung von *S. aureus*.....157

Abb. 5.4: Zelluläre Parallelen zwischen einem Tumor und einer Wunde der Haut.....164

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 2.1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.....36

Tab. 2.2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete eukaryotische Zelllinien.....37

Tab. 2.3: Verwendete Flüssignährmedien für bakterielle Kulturen.....38

Tab. 2.4: Verwendete Nährmedien für die Kultivierung eukaryotischer Zelllinien.....38-39

Tab. 2.5: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Zusätze für Assays mit eukaryotischen Zellen.....39

Tab. 2.6: Verwendeter Puffer zum Waschen von pro- und eukaryotischen Zellen.....39-40

Tab. 2.7: Verwendete Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese.....40

Tab. 2.8: Verwendete Puffer und Lösungen für SDS-Gelelektrophorese.....40-41

Tab. 2.9: Verwendete Puffer, Lösungen und Antikörperseren für Western Blots.....42

Tab. 2.10: Verwendete Lösungen für MTT-Assays.....42

Tab. 2.11: Verwendete Medien, Puffer und Lösungen für die native Aufreinigung von Eap.....43

Tab. 2.12: Verwendete Medien, Puffer und Lösungen für die Phagentransduktion.....	43-44
Tab. 2.13: In dieser Arbeit verwendete Oliganukleotid-Primer.....	44-45
Tab 2.14: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Enzyme.....	45
Tab 2.15: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Kits.....	46
Tab 2.16: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Laborgeräte.....	47-48
Tab. 2.17: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Softwareprogramme.....	48-49
Tab. 3.1: Mastermix des Mycoplasmen-PCR-Detektions Kit Venor® GeM exemplarisch für eine Probe.....	54
Tab. 3.2: PCR-Programm für das Mycoplasmen-PCR-Detektions Kit Venor® GeM.....	54
Tab. 3.3: Zusammensetzung (Mastermix) für die Vervielfältigung eines 1,4 kb DNA-Abschnitts der bakteriellen DNA von <i>S. aureus</i> .....	62
Tab. 3.4: Für die Vervielfältigung eines 1,4 kb DNA-Abschnitts der bakteriellen DNA von <i>S. aureus</i> verwendetes PCR-Programm.....	62
Tab. 3.5: Reaktionsgemisch für den Restriktionsverdau des Plasmids pBR322.....	64
Tab. 3.6: Mastermix für den Umschreibungsprozess von RNA in cDNA.....	69
Tab. 3.7: PCR-Bedingungen für die Umschreibung von RNA in cDNA.....	69
Tab. 3.8: Zusammensetzung für einen qPCR-Ansatz exemplarisch für eine Probe.....	70
Tab. 3.9: qPCR-Programm im ABI PRISM 7000 Thermocycler.....	70
Tab. 3.10: Pipettierschema exemplarisch für je ein Trenn- und Sammelgel.....	72
Tab. 7.1: Auflistung der in den BrdU-Assays mit HaCaT Zellen gemessenen Absorptionen.....	201
Tab. 7.2: Auflistung der in den MTT-Assays mit HaCaT Zellen gemessenen Absorptionen.....	202
Tab. 7.3: Auflistung der in den BrdU-Assays mit EA.hy926 Zellen gemessenen Absorptionen.....	202
Tab. 7.4: Auflistung der in den MTT-Assays mit EA.hy926 Zellen gemessenen Absorptionen.....	203

Tab. 7.5: Auflistung der in den BrdU-Assays mit BJ Zellen gemessenen Absorptionen.....	203
Tab. 7.6: Auflistung der in den MTT-Assays mit BJ Zellen gemessenen Absorptionen.....	204
Tab. 7.7: Auflistung der in den BrdU-Assays mit RT-112 Zellen gemessenen Absorptionen .....	204
Tab. 7.8: Auflistung der in den MTT-Assays mit RT-112 Zellen gemessenen Absorptionen .....	205
Tab. 7.9: Auflistung der in den BrdU-Assays mit 5637 Zellen gemessenen Absorptionen.....	205
Tab. 7.10: Auflistung der in den MTT-Assays mit 5637 Zellen gemessenen Absorptionen .....	206
Tab. 7.11-7.16: Ermittelte Werte für den Lückenschluss im ibidi-Assay mit HaCaT Zellen .....	206-209
Tab. 7.17-21: Ermittelte Werte für den Lückenschluss im Oris-Assay mit HaCaT Zellen .....	210-212
Tab. 7.21-25: Ermittelte Werte für den Lückenschluss im Oris-Assay mit EA.hy926 Zellen .....	213-215
Tab. 7.25-29: Ermittelte Werte für den Lückenschluss im Oris-Assay mit BJ Zellen....	215-216
Tab. 7.30-34: Ermittelte Werte für den Lückenschluss im Oris-Assay mit der Blasenkrebszelllinie RT-112.....	217-219
Tab. 7.35-39: Ermittelte Werte für den Lückenschluss im Oris-Assay mit der Blasenkrebszelllinie 5637.....	219-222

### Zusammenfassung

*Staphylococcus aureus* ist eines der bedeutendsten Pathogene unserer Zeit und ein Hauptverursacher chronischer Wundinfektionen. Der Grund, warum dieses, normalerweise kommensalisch auf Schleimhäuten vorkommende, Bakterium einen so erfolgreichen opportunistischen Erreger darstellt, ist sein umfangreiches Arsenal aus zusammenwirkenden Virulenzfaktoren. Diese helfen dem Keim, durch Bindung an Wirtsstrukturen eine Infektion zu etablieren und diese durch Modulation des Immunsystems aufrechtzuerhalten. Einer dieser Faktoren ist das zu der Gruppe der SERAM (engl. "secretable expanded repertoire adhesive molecules") zählende, von *S. aureus* in das extrazelluläre Milieu sekretierte extrazelluläre Adhäsionsprotein (Eap). In früheren wissenschaftlichen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass Eap zum Erhalt tief eindringender, nicht-heilender Wunden beiträgt, indem es die Einwanderung und Proliferation von Immunzellen hemmt und durch diese biochemische Barriere die Bereinigung der sich in der Wunde vermehrenden Bakterien vermindert. Zudem inhibiert das in tiefen Wunden stark durch *S. aureus* exprimierte Protein die Neovaskularisierung des neu gebildeten Gewebes und unterbindet dadurch den Stofftransport dieses Wundgebiets, was in einem verzögerten Wundschluss resultiert. In meiner Arbeit wird mit Hilfe verschiedener Methoden gezeigt, dass Eap auf drei der wichtigsten, an der Wundheilung beteiligten Zelltypen - Keratinozyten, Endothelzellen und Fibroblasten - einen direkten proliferations- und migrationshemmenden Einfluss zeigt. Dies könnte in nativen Wunden dazu führen, dass es zu einer verminderten Ausbildung einer neuen extrazellulären Matrix durch Fibroblasten, einer eingeschränkten Bildung eines neuen Gefäßsystems durch Endothelzellen und zu einer deutlichen Verzögerung der abschließenden Überhäutung der Wunde durch Keratinozyten kommt. Ein Teil dieses Effekts besteht in der bereits in früheren Studien beschriebenen Unterbrechung der Signaltransduktion über die Mitogen-aktivierte Kinase-Kaskade (MAPKK), welche Zellfunktionen wie Zellvermehrung und Bewegung reguliert. Meine Arbeit zeigt jedoch auch, dass Eap die Morphologie und Adhäsion von Zellen am Substrat beeinflussen kann. Mit Eap behandelte Keratinozyten verändern ihre Form von elongiert-keilförmig zu rund, werden dabei flacher und zeigen eine verminderte, zelluläre Steifigkeit. Diese Änderungen gehen mit einer verminderten zellulären Mobilität und Teilungsfähigkeit einher und tragen so vermutlich zum Erhalt der chronischen Wunden bei. In einem zweiten Teil dieser Arbeit wird ein bis dato vollkommen neuer Aspekt der adhäsiven Fähigkeiten von Eap beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass das stark kationische Adhäsionsprotein in der Lage ist, DNA zu binden und diese zu aggregieren. Eap kann dabei jedoch nur an lineare DNA-Moleküle, nicht jedoch an zirkuläre Strukturen, wie Plasmide binden. Die Spezies aus der die DNA stammt, scheint dabei keine Rolle zu spielen. Ebenso wenig, wie die endständige Konfiguration mit "sticky", oder "blunt"-Enden der DNA-Moleküle. Diese Fähigkeit ist als weitere

immunmodulatorische Fähigkeit dieses Proteins anzusehen, die dem Keim hilft, den aus dekondensiertem Chromatin bestehenden NETs (engl. "Neutrophil extrazellular traps") neutrophiler Granulozyten zu entkommen. Zusammen mit der bereits beschriebenen Inhibition der neutrophilen Serinproteasen, ist Eap damit in der Lage, diesen bedeutenden angeborenen Immunmechanismus auf verschiedenen Ebenen zu adressieren und *S. aureus* damit den Erhalt der Infektion zu ermöglichen.

In einem dritten Forschungsschwerpunkt wird gezeigt, ob die zuvor beschriebenen anti-proliferativen und migrationshemmenden Eigenschaften von Eap das Protein zu einem potentiellen Kandidaten für ein Krebstherapeutikum machen. Mit der Blase als von außen zugängliches System, das keinen intravenösen Zugang erfordert, wurde hier im Hinblick auf eine zukünftige Anwendbarkeit das Blasenkarzinom gewählt. Urothelkarzinome stellen die fünfthäufigste Krebsart der westlichen Welt dar und betreffen in über 90% aller Fälle die Blase. Es entspricht der etablierten Vorgehensweise, nach der operativen Tumorresektion die Blase mit Chemotherapeutika zu spülen. Dabei wird davon ausgegangen, dass in der Blase zirkulierende Tumorzellen innerhalb der ersten drei post-operativen Tage dazu in der Lage sind, an das beschädigte Blasenepithel zu re-adhären und so neue Tumorherde zu entfachen. Da die etablierten Therapeutika stark variierende Effektivitäten aufweisen, ist die Entwicklung neuer, effektiverer Agenzien nach wie vor von größter Bedeutung. Die von mir gewonnenen Erkenntnisse zu den Blasenkrebslinien RT-112 und 5637 zeigen, dass Eap auch bei diesen Zellen die Fähigkeit zur Migration und Proliferation beeinträchtigt. Mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (AFM, "atomic force microscope") konnten für RT-112 Zellen zudem ähnliche, morphologische Effekte wie bei Keratinozyten beobachtet werden. Zusätzlich konnte mittels eines Antikörper-basierten Immunfluoreszenzassays (AlphaLisa) eine Eap induzierte Inhibition der MAPKK und einiger nachfolgender Zellfunktionen (Proliferation, Mobilität, Morphologie) in RT-112 Zellen nachgewiesen werden, wie sie bereits für Keratinozyten und Endothelzellen bekannt war.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse betonen erneut die Multifunktionalität des initial als Adhäsion beschriebenen Immunmodulators Eap. Seine Eigenschaften, die Teilung und Mobilität von Zellen verschiedener Abstammung zu beeinflussen, machen es zudem zu einem vielversprechenden Kandidaten zur Etablierung neuer antikanzerogener Therapien.

### Summary

*Staphylococcus aureus* is one of the most important pathogens of our time and a major cause of chronic wound infections. One reason why this commensal bacterium, which usually persists on mucous membranes, represents such a successful opportunistic pathogen, is its extensive armamentarium of virulence factors. These factors contribute to the establishment of infections by binding to host structures and to its perpetuation by modulating the host immune system. One of these factors is the "extracellular adherence protein" (Eap), which belongs to the secreted expanded repertoire adhesive molecules (SERAM). Earlier work showed that Eap contributes to the maintenance of wounds by inhibiting the immigration and proliferation of immune cells, thereby reducing the clearance of bacteria in the wounded tissue. This protein, which is strongly expressed in deep-seated wounds, also inhibits the neovascularization of the newly formed tissue and thereby prevents the transport of nutrients into the wound area, resulting in a delayed wound closure. My thesis shows with the aid of different assays, that Eap has a direct proliferation- and migration-inhibiting influence on three of the most important cell types which are related to wound healing - keratinocytes, endothelial cells and fibroblasts. We hypothesize that in native wounds, these effects could have inhibiting impacts on the formation of a new extracellular matrix by fibroblasts, the formation of a new vascular system by endothelial cells and the final coverage of the wound by keratinocytes. At least part of this effect is mediated by the Eap-driven attenuation of the "mitogen-activated kinase cascade" (MAPKK) signal transduction pathway, which is known to regulate cell functions such as proliferation and movement. The present work also shows that Eap affects the morphology and adhesion properties of host cells to its substrate. Eap-treated keratinocytes change their shape from elongated-wedge-shaped to round cells, and this morphological change is accompanied by a flattening of the cell and a diminished cellular stiffness. These changes probably contribute to the marked reduction of cellular mobility and the ability to divide, thereby contributing to the preservation of chronic wounds.

In a second part of my thesis, a completely new aspect of Eap's adhesive capabilities is described. It was shown that the cationic protein is able to bind to DNA and to aggregate it. Eap thereby only binds to linear DNA-molecules, but not to circular structures like plasmids. The species origin of the DNA, as well as the terminal configuration like "sticky", or "blunt" does not seem to matter in this background. This ability is considered to be a new immunomodulatory mechanism that contributes to the bacterium's ability to escape from entrapment by "neutrophil extracellular traps" (NETs), consisting of decondensed chromatin that is excreted by neutrophil granulocytes upon stimulation by a number of internal and external signals. This observation demonstrates that Eap, together with the previously

described inhibition of neutrophil serine proteases, is able to modulate this important innate immune mechanism by various means, and thereby enables *S. aureus* to maintain the infection.

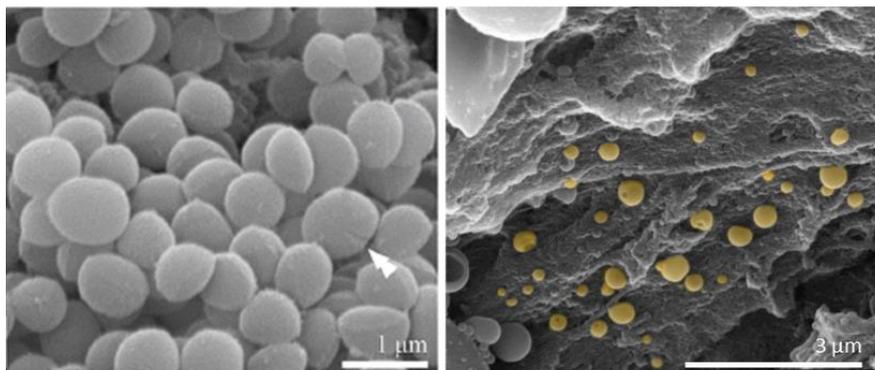
A third focus of my thesis was to verify, if the afore mentioned anti-proliferative and anti-migration properties of Eap qualify this protein to become a potential candidate for new cancer therapeutic agents. With the bladder as an externally accessible system that does not require intravenous access, bladder cancer was chosen as a suitable target. Urothelial carcinomas are the fifth most common cancer forms of the western hemisphere, and affect the bladder in over 90% of all cases. The currently used operative procedure includes rinsing of the bladder with chemotherapeutic agents after surgical tumor resection. This procedure is based on the assumption that the resection process induces a certain release of tumor cells, which are subsequently circulating in the bladder and may re-adhere to the damaged bladder epithelium within the first three post-operative days leading in new tumor foci. Since all currently established therapeutics are afflicted by largely varying efficiencies, the development of new agents and/or adjuvant strategies is of high-ranking importance. My findings obtained for the bladder cancer lines RT-112 and 5637 demonstrate that Eap also impairs the migration and proliferation abilities of these cancer cell types. Atomic force microscope (AFM) studies confirmed that Eap also exerts a morphological effect on RT-112 cells similar to the one seen with keratinocytes. An antibody-based immunofluorescence assay (AlphaLisa) allowed to detect an Eap-dependent inhibition of MAPKK and all its subsequent functions, in line with previous findings made with keratinocytes and endothelial cells.

The findings of my thesis emphasize the role of Eap as immunomodulator, which was initially described as an adhesin. Its ability to influence the proliferation and mobility of various cell types including tumor cells support the idea that Eap might constitute a promising candidate for the establishment of new anti-cancer therapies.

## 1. Einleitung

### 1.1 Der Keim *Staphylococcus aureus*

Seit dem klassischen Zeitalter der Mikrobiologie (von 1860 bis 1910), als es dank einfacher Mikroskope erstmals gelang zu beweisen, dass Krankheiten nicht etwa durch "schlechte Dünste" (Miasmen) ausgelöst werden, sondern auf mikroskopisch kleine Lebewesen (Bakterien und Pilze) zurückzuführen sind, hat sich die medizinische Forschung rasant weiterentwickelt. In diesen frühesten Tagen der medizinischen Mikrobiologie war es Robert Koch, der erstmals beschrieb, dass sich eine spezifische Art von Bakterien dafür verantwortlich zeigt, eine ganz bestimmte Krankheit auszulösen (Koch'sche Postulate). Seither wurde eine Vielzahl von bakteriellen Krankheitserregern identifiziert und wissenschaftlich beschrieben. Koch war es auch, der 1878 Staphylokokken als Erreger von Wundinfektionen erkannte. Die Erstbenennung der Gattung *Staphylococcus* erfolgte bereits 1880 durch Louis Pasteur. Mit der Namenswahl bezog er sich auf den Umstand, dass diese Bakterien meist weintraubenähnliche Haufen bilden (griech. *staphyle* = Traube; *kokkos* = Kern). Inzwischen wurden fast 50 Arten innerhalb dieser Gattung beschrieben und erst in neuerer Zeit (Euzéby, 2010) hat man sie in eine eigene phylogenetische Familie der *Staphylococcaceae* eingeordnet. Staphylokokken sind zwischen 0,5 und 1,5 µm große (Monteiro *et al.*, 2015), unbewegliche, nicht sporulierende, gram-positve Bakterien, welche fakultativ anaerob bei einem Temperaturoptimum von 30-37°C gedeihen (Köhler *et al.*, 2001).



**Abb. 1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen (SEM) von *S. aureus* Zellen: Links) der weiße Pfeil markiert die Teilungsfurche sich teilender Zellen (Matijasevic *et al.*, 2016). Rechts) *S. aureus* (golden nachkoloriert) auf der Oberfläche eines orthopädischen Titanimplantats, nach 28 Tagen im Mausinfektionsmodell (Heim *et al.*, 2014).**

Der heute bekannteste Vertreter dieser Gattung, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), wurde unter diesem Namen erstmals 1884 von Friedrich Julius Rosenbach klassifiziert. Der Artnamen leitet sich vom Griechischen *aureus* ab, was sinngemäß "der Goldene" bedeutet

und sich auf das charakteristische orange-goldene Erscheinungsbild der Einzelkolonien auf gängigen Agarnährböden bezieht (Bronner *et al.*, 2004; Vos *et al.*, 2009). Die goldene Pigmentierung entsteht durch das Carotinoid Staphyloxanthin, welches antioxidativ wirkt und das Bakterium vor Abwehrmechanismen des Wirtes schützt (Liu *et al.*, 2005).

Innerhalb der Gattung der Staphylokokken wird zwischen Koagulase-positiven, zu denen auch *S. aureus* gehört, und Koagulase-negativen Spezies unterschieden. In einem "Clumping-Test" verbindet sich das von den Bakterien sezernierte Enzym Koagulase (Coa) mit Prothrombin zu einem aktiven Staphthrombin-Komplex. Dieser katalysiert die Vernetzung von Fibrinogen zu Fibrin, welches dann von den Adhäsionsfaktoren ClfA und B (engl. "clumping factor"), auf der Oberfläche der Staphylokokken gebunden wird. Die so entstehende Fibrinhülle dient dem Bakterium als ein Schutzmechanismus gegenüber Angriffen durch Phagozyten (Köhler *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2010).

Für die weitere Unterscheidung innerhalb der Koagulase-positiven Staphylokokken Spezies kann dann ein ONPG-Test (*o*-Nitrophenyl- $\beta$ -Galactosidase-Test) auf  $\beta$ -Galactosidase Aktivität zu Rate gezogen werden (Roberson *et al.*, 1992). Von den Koagulase-positiven Staphylokokken Spezies spielt jedoch nur *S. aureus* eine entscheidende Rolle als menschliches Pathogen, während die übrigen Arten für diesen Wirt weitestgehend apathogen sind, bzw. nur unter besonderen Bedingungen zu Erkrankungen führen (Deurenberg & Stobberingh, 2008). Als bedeutender, humapathogener Keim stellt *S.aureus* das Thema der vorliegenden Dissertation dar.

*S. aureus* ist ein normaler Besiedlungskeim warmblütiger Wirbeltiere mit einer weiten Verbreitung unter verschiedenen Spezies. Hauptsächlich kommt es in den Nasenvorhöfen und im Rachenraum vor, jedoch zählen auch alle anderen Weichgewebe, sowie die Haut als gängige Siedlungsgebiete. Etwa 30% der menschlichen Bevölkerung ist dauerhaft Träger von *S. aureus* (Wertheim *et al.*, 2005). Da es sich bei *S. aureus* um einen opportunistischen Keim handelt, bleibt die Besiedlung üblicherweise symptomlos. Allerdings treten Infektionen regelmäßig auf und werden durch Faktoren wie Hautläsionen, postoperative Wunden, im Körper verbleibende Medizinprodukte oder Immunsuppression begünstigt. Das Bakterium gilt als häufigster Auslöser für nosokomiale (im Krankenhaus erworben, HA, engl. "hospital-acquired") und in der Gesellschaft erworbene (CA, engl. "community-acquired") Bakteriämien (Wertheim *et al.*, 2005; Boucher, 2010). Ein beachtliches Reservoir, vor allem auch an Antibiotika-resistenten Stämmen, stellen auch die etablierten Massentierzuchten dar. *S. aureus* kolonisiert neben dem Menschen auch Nutztiere (LA, engl. "livestock associated") und es gilt als gesichert, dass eine Übertragung zwischen Mensch und Tier in beide Richtungen vorkommt (Stefani *et al.*, 2012).

### 1.2 *S. aureus* als Pathogen

*S. aureus* ist mit 26% der nosokomial erworbenen Infektionen einer der bedeutendsten Erreger unserer Zeit (Weis *et al.*, 2015). Aufgrund der dabei mit dem Keim verbundenen hohen Sterberaten von bis zu 40% (Weis *et al.*, 2015) rückte dieser in den vergangenen Jahrzehnten immer stärker in den Fokus des medialen Interesses. Reißerisch als "Killerkeim" bezeichnet, ist es jedoch nicht von der Hand zu weisen, dass *S. aureus* die Hauptursache für Haut- und Weichteilinfektionen weltweit darstellt (Moet *et al.*, 2007). Durch seine Fähigkeit, längere Zeit auf abiotischen Flächen zu überleben, ist der Keim in Krankenhäusern und Pflegeeinrichtungen nur schwer auszumerzen. Hinzu kommt, dass 90% des Pflegepersonals unbemerkt als Träger des Erregers fungieren, wodurch es zu Übertragungen auf andere Patienten kommen kann (Weis *et al.*, 2015). Bekannt ist zudem, dass eine Besiedlung des Patienten selbst ein Risikofaktor für die Generierung einer *S. aureus* Bakteriämie (SAB) darstellt, da die meisten nosokomialen Infektionen dem endogenen Erregerreservoir entspringen (Wenzel & Perl, 1995; von Eiff *et al.*, 2001; Safdar & Bradley, 2008; Weidenmaier *et al.*, 2012). *S. aureus* ist einer der häufigsten Gründe für bei chirurgischen Eingriffen erworbene Infektionen (SSI engl. "surgical site infections") (Humphreys, 2012). Als weitere Risikofaktoren gelten Lebererkrankungen, die ebenfalls mit einem geschwächten Immunsystem assoziiert sind (Weis *et al.*, 2015). Ist der Erreger erst in den Körper des Patienten gelangt und konnte dort eine Infektion etablieren, kann eine Vielzahl verschiedener Krankheitsbilder die Folge sein. Neben Infektionen der Haut wie Furunkel, Abszesse und oberflächlicher, sowie tiefer Wunden, können sich schwere Erkrankungen durch septische Absiedlungen wie Osteomyelitis, Endokarditis und Gelenkempyeme etablieren (Li *et al.*, 2000; Ryan & Ray, 2004; Tong *et al.*, 2015). Häufig auftretende Rezidive erschweren zusätzlich die Therapie von SABs (Weis *et al.*, 2015). Ein weiteres Risiko stellen spezifische, durch den Keim sezernierte Toxine dar, die zu verschiedenen Krankheitsbildern führen können. So rufen etwa das Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1 (TSST-1) das Toxische Schocksyndrom (TSS), Exfoliativtoxine das "Staphylococcal Scalded Skin Syndrom", sowie die durch kontaminierende Keime gebildeten und dadurch in der Nahrung enthaltenen Enterotoxine (A-G) Lebensmittelintoxikationen hervor (Lowy, 1998; Dinges *et al.*, 2000; Le Loir *et al.*, 2003; Ortega *et al.*, 2010). *S. aureus* gilt zudem als ein Hauptverursacher nichtheilender, chronischer Wunden (Madsen *et al.*, 1996; Bunikowski *et al.*, 2000; Grimble *et al.*, 2001; Talan *et al.*, 2011). Auch hier scheint der Patient als Träger den Hauptrisikofaktor einer Wundinfektion darzustellen (Kalmeijer *et al.*, 2000). Die Etablierung dieser Infektionen ist eng mit der Fähigkeit von Staphylokokken zur Biofilmbildung verknüpft (O'Gara, 2007; Schierle *et al.*, 2009; Gurjala *et al.*, 2011). Biofilme sind Lebensgemeinschaften von Mikroorganismen, die sich an Grenzflächen (biotisch, oder abiotisch) bilden und in eine Schicht aus extrazellulären, polymeren Substanzen, die sowohl

vom Bakterium wie Wirt stammen können, eingebettet sind. Diese Gemeinschaften zeichnen sich meist durch eine gesteigerte Widerstandsfähigkeit gegenüber den Abwehrmechanismen des Wirtes, wie die Phagozytose durch Neutrophile und die Wirkung antimikrobieller Peptide (AMPs) (Vuong *et al.*, 2002), sowie Antibiotika und Bioziden aus (Conlon, 2014). Dies beruht offenbar darauf, dass sich innerhalb der Lebensgemeinschaft des Biofilms Subpopulationen von Bakterien mit sehr geringer Stoffwechselrate ausbilden (Persistenzellen), die dadurch unempfindlicher gegenüber Antibiotikatherapien sind (Conlon, 2014; Conlon *et al.*, 2015). Auch SSIs sind häufig mit Biofilmen assoziiert. Hierbei heften sich die Bakterien beispielsweise an Medizinprodukte wie Katheter oder Implantate an, was durch die schnelle Anlagerung von Wirtsmatrixproteinen an das abiotische Material erleichtert wird (Otto, 2013; Percival *et al.*, 2015a; Percival *et al.*, 2015b; Percival *et al.*, 2015c). Auch in bis zu 80% der akuten wie chronischen Wunden, die mit *S. aureus* infiziert sind, bilden sich Biofilme aus und verzögern die Wundheilung (O'Gara, 2007; Percival & Cutting, 2009; Thomson, 2011; Percival *et al.*, 2012b; Percival *et al.*, 2015a).

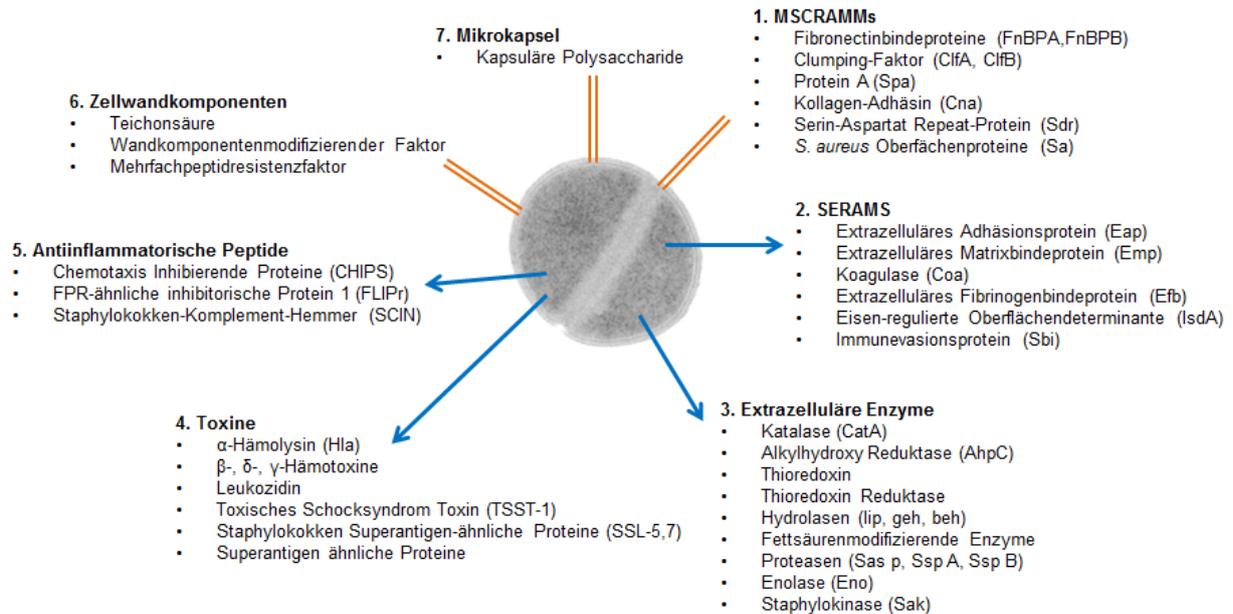
Die Behandlung etablierter Infektionen wird häufig, durch die über die letzten Jahrzehnte vermehrt auftretenden Resistenzen gegen gängige Antibiotika, maßgeblich erschwert. Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA), die erstmals 1963 beschrieben wurden (Jevons *et al.*, 1963), sind hier von besonderer Bedeutung. Die betreffenden Stämme sezernieren ein alternatives Penicillin-Bindeprotein (PBP2a), das eine bis zu 1000-fach geringere Affinität als gegenüber Penicillin aufweist, verglichen mit den normalen, chromosomal kodierten PBPs. Dadurch ergibt sich eine Resistenz gegenüber Methicillin/Oxacillin und allen weiteren  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (Boucher & Corey, 2008). Die Behandlung von MRSA-Bakteriämien kann durch das Auftreten weiterer Antibiotikaresistenzen, wie gegen Aminoglykoside (wie Gentamicin), Fluorchinolone (wie Ciprofloxacin), oder Glycopeptid-Antibiotika (wie Vancomycin), zusätzlich erschwert werden, wobei letztere Antibiotikagruppe bis dato als meist verwandte Standardtherapie gegen MRSA Infektionen gilt (Liu *et al.*, 2011; Weis *et al.*, 2015). In Deutschland zeigte sich ab den 1990er Jahren zunächst ein stetiger Anstieg des MRSA-Anteils, bei untersuchten *S. aureus* Isolaten. Dieser erreichte 2006 über 20% (KISS, engl. "Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System"). Jedoch ist seitdem ein leichter Abwärtstrend festzustellen, wonach zwischen 2006 und 2017 die Anzahl der Patienten mit MRSA pro 100 Patienten (Inzidenz) von 0,27 auf 0,1 gesunken ist (KISS; (Maechler *et al.*, 2017)). Diese Erkenntnisse spiegeln sich auch in den Daten des "European Antimicrobial Resistance Surveillance Networks" (EARS-Net) wieder. Diese erfassen eine rückläufige Methicillin-Resistenz-Rate bei *S. aureus* aus Blutkulturen von 12,9% im Jahr 2014 auf 10,3% im Jahr 2016. Ähnliche Trends sind auch in anderen europäischen Ländern zu beobachten, wobei jedoch deutliche Streuung der MRSA-Raten zwischen den Ländern vorliegt. So liegen diese in den Niederlanden, Norwegen und Dänemark bei unter 1%, während die Raten in

Rumänien, Portugal, Griechenland, Malta und Zypern im Jahr 2015 weiter zwischen 35% und 50% liegen (Epidemiologisches Bulletin des Robert Koch Instituts, Februar 2018). Neben den fallenden MRSA-Raten, ist jedoch weiterhin ein Anstieg der Resistenzen gegen Antibiotikaklassen zu beobachten. So ist z.B., laut RKI, die Rate von MRSA, die zusätzlich eine Resistenz gegenüber Tetracyclin aufweisen, von 7,4% in 2012 auf 13,5% in 2016 angestiegen. Die zunehmenden Resistenzen gegen verfügbare Antibiotika erschweren immer mehr die Therapie erworbener *S. aureus* Infektionen.

### 1.3 Die Etablierung einer Infektion durch *S. aureus*

*S. aureus* ist ein Keim, der unter verschiedensten Bedingungen, sowohl in der Umwelt, als auch kommensalisch und als opportunistisches Pathogen warmblütiger Wirbeltiere, überleben kann. Ein Aspekt für den Erfolg und die Vielseitigkeit von *S. aureus* ist sein umfangreiches Virulon, in dem eine vielfältige Anzahl akzessorischer Gene zusammengefasst werden, die für eine große Bandbreite verschiedener Virulenzfaktoren kodieren. Diese Proteine besitzen unterschiedlichste Funktionen, helfen dem Keim jedoch alle dabei, in einen Wirtsorganismus einzudringen, sich dort anzusiedeln, eine Infektion zu etablieren und diese zu erhalten (Archer, 1998). Eine Reihe dieser Virulenzfaktoren vermitteln unter anderem die Adhäsion an abiotische Oberflächen, sowie Wirtsstrukturen, die Invasion in Zellen, die Modulation der Wirtsabwehr und den Erwerb von Nährstoffen (Novick, 2003; Cheung *et al.*, 2004; Chavakis *et al.*, 2007). Aufgrund ihrer Hauptfunktionen, ihres Aufbaus, oder ihres Expressionsmusters werden die Virulenzfaktoren allgemein in übergeordnete Gruppen eingeteilt (siehe Abb. 1.3).

In der Frühphase einer Infektion spielen vor allem Adhäsionsfaktoren eine bedeutende Rolle, da sie dem Keim helfen, eine Infektion im Wirtsorganismus zu etablieren und zu erhalten. Neben CflA/B gehören die Fibronektinbindeproteine FnBPA und B zu den am besten beschriebenen Adhäsionsfaktoren von *S. aureus*. Diese modular aufgebauten Proteine wurden erstmals im Stamm Newman beschrieben (Froman *et al.*, 1987), werden jedoch von nahezu allen bis dato untersuchten *S. aureus* Stämmen gebildet (Minhas *et al.*, 1995; Smeltzer *et al.*, 1997; Peacock *et al.*, 2000; Rice *et al.*, 2001; Mongodin *et al.*, 2002). Neben der erstbeschriebenen und namensgebenden Funktion der Anbindung an Fibronektin und somit an einen bedeutenden Bestandteil der extrazellulären Matrix (EZM), wurde für die FnBPs inzwischen weitere Interaktionspartner auf Seiten des Wirtes, wie Fibrinogen, beschrieben (Wann *et al.*, 2000).



**Abb. 1.2: Übersicht über die Gruppen der Virulenzfaktoren von *S. aureus* und prominenter Vertreter. Blaue Pfeile symbolisieren sekretierte Faktoren, orange Doppellinien stehen für Zellwandgebundene Faktoren (nach Chavakis *et al.*, 2007).**

In späteren Phasen der Erkrankung werden eher Invasine benötigt, die dem Bakterium helfen, die notwendigen Ressourcen aus dem umgebenden Milieu zu akquirieren (Hecker *et al.*, 2010). Ein Beispiel hierfür ist das Hämolysin  $\alpha$ , oder  $\alpha$ -Toxin (Hla). Dieses wird als hydrophiles Monomer von *S. aureus* sezerniert und bildet nach Anbindung an ADAM10 (engl. "a disintegrin and metalloprotease 10") in der Zellmembran von eukaryotischen Zellen Heptamere Strukturen aus (Berube & Bubeck Wardenburg, 2013). Diese wirken als Poren, durch die unkontrolliert  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen in die Zelle einströmen können, wodurch die osmotische Regulation der Zelle gestört wird. Dies induziert die Nekrose der Zelle, wobei es schließlich zur Zellyse kommt (Berube & Bubeck Wardenburg, 2013). Werden Erythrozyten auf diesem Weg lysiert, wird das in ihnen enthaltene Hämoglobin frei, dessen Eisenanteil eine obligate Wachstumsgrundlage für das Bakterium darstellt. Auf gängigen Blutagar Nährmedien, für die i.d.R. Schafsblut verwendet wird, lässt sich die Aktivität des Hla anhand des klaren  $\beta$ -Hämolyse-Hofs erkennen, der die Bakterienkolonie umgibt (Gouaux, 1997).

Neben der Ansiedelung und dem Erwerb von Nährstoffen ist es für jeden in einem Wirt lebenden Organismus von größter Bedeutung, sich dauerhaft zu etablieren und zu vermehren. Dies setzt voraus, dem wirtseigenen Immunsystem so effektiv wie möglich entgegenzuwirken. In Rahmen dieses evolutionären Wettrüstens hat *S. aureus* zahlreiche Immunevasionsmechanismen hervorgebracht, die das Immunsystem des Wirts auf verschiedensten Ebenen adressiert.

### 1.4 Immunevasionsmechanismen von *S. aureus*

Das Immunsystem verfügt über ein hohes Maß an Komplexität, welche es dem Organismus ermöglicht, eingedrungene Fremdkörper auf vielfältige Weise unschädlich zu machen bzw. zu tilgen. Diese Komplexität liefert Pathogenen jedoch auch zahlreiche Möglichkeiten zur Modulation. Höheren Wirbeltiere besitzen ein angeborenes Immunsystem, welches unspezifisch alles attackiert und beseitigt, was als „fremd“ erkannt wird. Daneben existiert das adaptive Immunsystem, dass sich erst im Laufe des Lebens entwickelt. Es agiert mit spezifischen, im Blutplasma gelösten Antikörpern sowie Komplementfaktoren gegen eindringende Pathogene (Alberts, 2002). Das angeborene Immunsystem besteht zum einen aus körperinternen Proteinkaskaden und spezialisierten Zelltypen, zum anderen jedoch auch aus den äußeren Barrieren des Körpers, der Haut und den Schleimhäuten (Dingermann & Zündorf, 2013).

Können jedoch, wie im Falle einer Verletzung, die ersten Barrieren des Körpers von Pathogenen überwunden werden, kommen zunächst die körperinternen Mechanismen der angeborenen Immunabwehr zum Einsatz. Diese beruhen hauptsächlich auf der Phagozytose von eingedrungenen Keimen durch bestimmte Typen von Leukozyten. Den größten Anteil stellen hierbei neutrophile Granulozyten (Neutrophile, 60-70%), die im Blut patrouillieren und im Falle einer Entzündung chemotaktisch an den Ort des Geschehens dirigiert werden (Alberts, 2002). Dort können sie durch amöboide Fortbewegung (Extravasation) durch die Kapillarwände in das infizierte Gewebe einwandern und die Erreger durch Phagozytose eliminieren. Des Weiteren verfügen Neutrophile über einen Mechanismus, der als NETose bezeichnet wird. Dabei setzen sie eine Matrix aus dekondensiertem Chromatin und adhären Granula-Proteinen frei, die wie ein Netz fungiert, um Pathogene einzufangen (NETs engl. "Neutrophil extracellular traps"). Dieser Vorgang verhindert im Blutstrom die weitere Verbreitung der Pathogene durch Bildung von Mikrothromben, in denen die Bakterien gefangen sind. Die Bakterien können durch die an der Chromatinmatrix gebundenen antimikrobiellen Peptide und Proteasen abgetötet, oder von Fresszellen aufgenommen und verdaut werden (Brinkmann *et al.*, 2004; Papayannopoulos & Zychlinsky, 2009). Die Granula-Proteine entstammen den azurophilen  $\alpha$ -Granula und beinhalten große Mengen an verschiedenen Neutrophilen Serinproteasen (NSPs), welche spezifisch gegen Substrate wie Wirtsfaktoren (Chemokine, Rezeptoren) oder bakterielle Virulenzfaktoren gerichtet sind, oder die bakterielle Zelle direkt angreifen (Brinkmann *et al.*, 2004; Jann *et al.*, 2009; von Kockritz-Blickwede & Nizet, 2009; Berends *et al.*, 2010; Pilsczek *et al.*, 2010).

Nach den Neutrophilen stellen die langlebigen Makrophagen den nächstgrößten Anteil der Leukozyten dar (5%). Makrophagen tragen auf ihrer Zelloberfläche

Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, engl. "pattern recognition receptors") (Kumar *et al.*, 2011). Kommen diese in Kontakt mit spezifischen "Pathogen-assoziierten molekularen Mustern" (PAMPs, engl. "pathogen-associated molecular pattern"), initiiert dies eine "Aktivierung" der Makrophagen (Kumar *et al.*, 2011). Ein anderer Weg der Aktivierung, kann auch durch von anderen Immunzellen ausgeschüttete Zytokine erfolgen (Mosser & Edwards, 2008). Erkennen Makrophagen ein Pathogen, wird dieses phagozytiert und intrazellulär lysiert. Aktivierte Makrophagen schütten zudem ihrerseits Botenstoffe, wie den Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) oder die Interleukine IL-1 $\beta$  und IL-6 aus (Mosser & Edwards, 2008). Diese wirken chemotaktisch und locken wiederum Neutrophile, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und weitere Makrophagen aus dem Blut an, die sich an der Eliminierung der Pathogene beteiligen (Ricklin *et al.*, 2010).

Neben den zellulären Komponenten existiert ein ausgeklügeltes System aus Proteinaktivierungskaskaden, das Komplementsystem, welches die zelluläre Immunantwort ergänzt. An diesem Kaskadensystem sind mehr als 30 Proteine beteiligt, die als Aktivatoren und Regulatoren fungieren. Die involvierten Komplementfaktoren (C1-C9) sind inaktive Zymogene, die nacheinander proteolytisch gespalten und dadurch aktiviert werden, wodurch es zu einer Amplifikation der primären Effekte kommt (Foster, 2005; Ricklin *et al.*, 2010; Dingermann & Zündorf, 2013). Das Komplementsystem kann auf drei verschiedene Wege aktiviert werden, die in Abb. 1.4 detailliert dargestellt sind.

Zentrales Ereignis aller drei Varianten der Komplementfixierungskaskade ist die Bildung einer C3-Konvertase (Ricklin *et al.*, 2016). Die Spaltung von C3 hat zum einen die Opsonierung (C3b) und Phagozytose der Pathogene, zum anderen die Bildung eines C5-Konvertase-Komplexes zur Folge. Gespaltenes C5 fördert als Chemokin (C5a) schließlich die Einwanderung von Leukozyten (Foster, 2005; Dingermann & Zündorf, 2013).

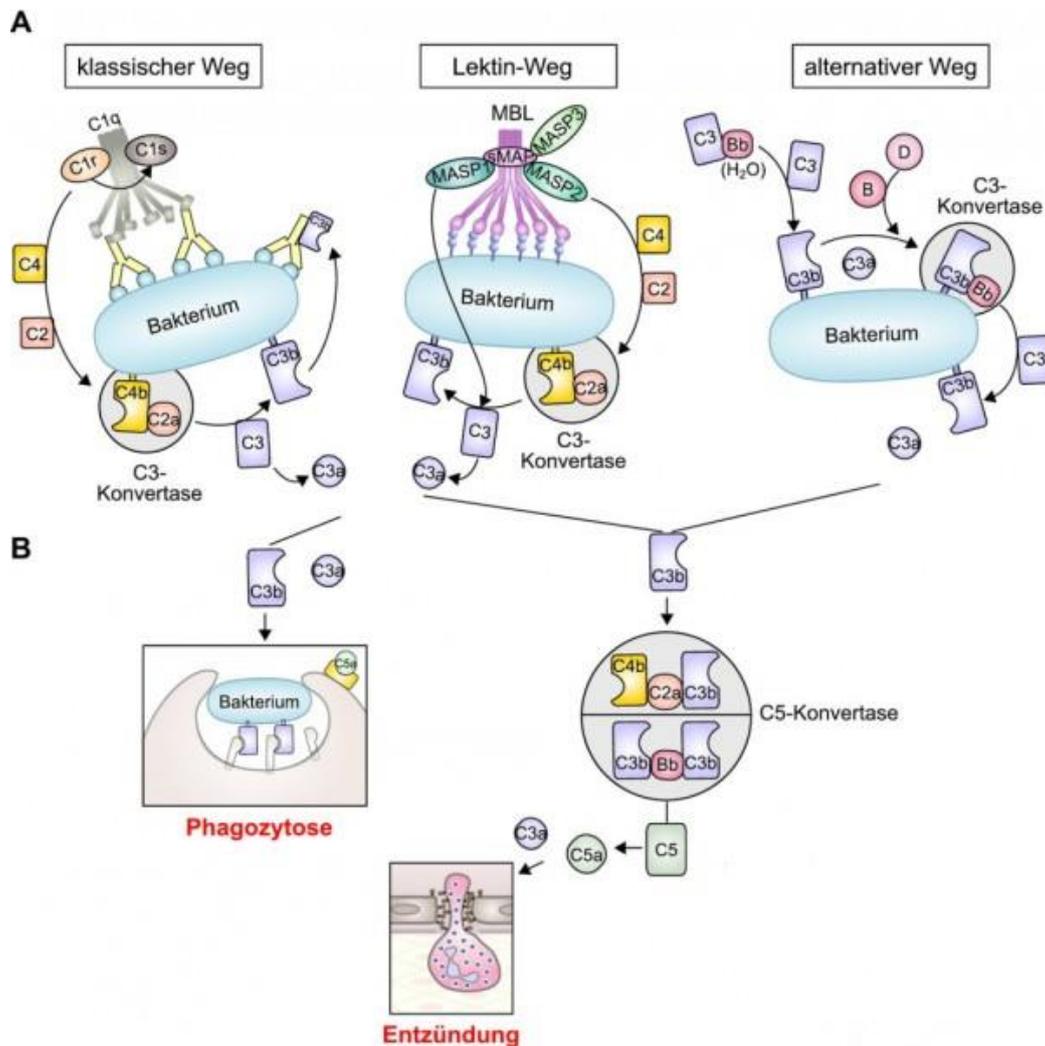


Abb. 1.3: Die drei Wege der Komplementaktivierung: Der zuerst beschriebene "klassische Weg" (KW) wird durch einen Komplex von Antigen und Antikörper aktiviert, der sich auf der bakteriellen Oberfläche bildet. Dieser wird dann vom Komplementfaktor C1 (bestehend aus C1q und je zwei C1r und C1s) erkannt. Nach Bindung von C1 an die Antikörper kommt es zu einer Aktivierung des proteolytischen Parts C1r, dieser spaltet und aktiviert C1s und dieser in der Folge die C4 und C2. Es entstehen die Fragmente C4b und C2a. Diese bilden gemeinsam die C3-Konvertase, die den Komplementfaktor C3 spaltet. C3b-Fragmente opsonieren das Bakterium und machen es für die Phagozytose durch Fresszellen attraktiv. C3a-Fragmente werden freigesetzt und dienen als Signalmoleküle, welche chemotaktisch Neutrophile und Makrophagen anlocken. Der "Lektin-Weg" (LW) wird Mannose-bindende Lektin (MBL) induziert. Dieses fließt im Blutstrom und bindet bei Kontakt an Komponenten der bakteriellen Oberfläche, wie Teichonsäuren, oder Kapselbestandteile. MBL bildet mit den drei MBL-assoziierten Serinproteasen MASP1- 3 und dem kleinen MBL-bindenden Protein (sMAP) einen Komplex, der die weitere Aktivierung der Komplementkaskade initiiert. MASP2 spaltet C4 und C2, was zur Bildung der C3-Konvertase und zur Spaltung von C3 führt. MASP-1 ist in der Lage C3 direkt zu spalten. Im Verlauf des "alternativen Wegs" (AW) bindet ein Bruchstück von Faktor B (Bb) an an das hydrolysierte C3 und spaltet dieses. Dabei entsteht das Fragment C3b, welches an den Faktor Bb bindet, der durch Faktor D gespalten wird. Der Komplex C3bBb-Komplex ist die C3-Konvertase des alternativen Wegs. Neben seiner Funktion als Opsonin komplexiert C3b mit der C3-Konvertase (LW), oder Bb (AW) zur C5-Konvertase, die den Komplementfaktor C5 hydrolysiert. Die kleinen Fragmente C5a und C3a stellen Entzündungsmediatoren (Anaphylatoxine) dar, diese locken Phagozyten an und leiten eine Entzündungsreaktion ein. Da die Komplementfaktoren ständig im Blutstrom zirkulieren, weswegen sie auch als Teil der humoralen Immunantwort gelten, können sie eingedrungene Pathogen schon innerhalb weniger Stunden adressieren und eliminieren und so ggf. einer Infektion vorbeugen (Abbildung aus Dingermann & Zündorf, 2013).

Das adaptive Immunsystem baut auf dem angeborenen System auf, entwickelt sich im Laufe des Lebens und adressiert Pathogene in hochspezifischer Weise (Alberts, 2002). Auch in diesem System spielen zelluläre Komponenten eine zentrale Rolle. Nehmen dendritische Zellen, Makrophagen, oder B-Zellen Antigene auf, werden diese intrazellulär lysiert. Bruchstücke der verdauten Proteine werden mit MHC-Klasse II Molekülen (engl. "major histocompatibility complex") gekoppelt und dieser Komplex anschließend vesikulär in die Zellperipherie transportiert und in die Zellmembran integriert. Die so markierte Zelle wird als antigenpräsentierende Zelle (APC; engl. "antigen presenting cell") bezeichnet (Ricklin *et al.*, 2010; Dingermann & Zündorf, 2013). Das MHC-II-Molekül präsentiert das Antigenfragment nach außen, wo T-Helferzellen über ihre T-Zellrezeptoren daran binden und dadurch aktiviert werden können. In Abhängigkeit von den durch die APC ausgeschütteten Zytokine entwickelt sich aus den T-Zellen TH1-Zellen (IL-12), oder TH2 Zellen (IL-4) (Ricklin *et al.*, 2010; Dingermann & Zündorf, 2013). TH1-Zellen sind hauptsächlich für die Rekrutierung von Makrophagen verantwortlich, während TH2-Zellen die Differenzierung von B-Zellen auslösen. Die angelockten B-Zellen können über die B-Zell-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche das MHC II-präsentierte Antigen ebenfalls erkennen. Dies führt zum einen auch hier zur Phagozytose, Lyse und Oberflächenpräsentation von Antigenfragmenten über MHC II, zum anderen werden die aktivierten B-Zellen durch die von TH1-Zellen ausgeschütteten Zytokine (IL-4, IL-5 und IL-10) zur Differenzierung angeregt (Dingermann & Zündorf, 2013). Es entwickeln sich B-Gedächtniszellen, die bei erneutem Antigenkontakt aktiv werden und Plasmazellen, die spezifische, gegen das Antigen gerichtete, Antikörper produzieren. Binden Antikörper an ein Pathogen und opsonieren dessen Oberfläche, kommt es außerdem zur Komplementaktivierung über den KW (Ricklin *et al.*, 2010; Dingermann & Zündorf, 2013). Angeborenes und adaptives Immunsystem sind also direkt miteinander verknüpft und es kommt zu einer Amplifikation der Wirkung.

*S. aureus* hat zahlreiche Strategien entwickelt, um sich vor dem Immunsystem des Wirts zu schützen (O'Gara, 2017; Goldmann & Medina, 2018; Horn *et al.*, 2018). Dafür bildet der Keim eine breite Palette von Virulenzfaktoren. Diese helfen *S. aureus* beim Erhalt einer Infektion, durch Modulation der Immunabwehr (O'Gara, 2017; Goldmann & Medina, 2018; Horn *et al.*, 2018). Viele dieser bakteriell sekretierten Faktoren greifen in den Ablauf des Komplementsystems ein, was eine verminderte Phagozytoserate Folge hat. Da C3 und C5 zentrale Faktoren der Kaskade sind, kommt es an diesen Schlüsselstellen häufig zu Eingriffen durch Virulenzfaktoren. Das sog. "extrazelluläre Fibrinogen bindende Protein" (Efb) ist ein sekretierter Virulenzfaktor, der an den Komplementfaktor C3 binden und seine Spaltung verhindern kann. Somit steht kein C3b zur Verfügung, um die bakterielle Oberfläche zu opsonieren und Immunzellen zu aktivieren (Lee *et al.*, 2004a; Lee *et al.*, 2004b; Hammel *et al.*, 2007b). Der "*Staphylococcus* Komplement Inhibitor" (SCIN) kann an

die C3 Convertase-Komplexe des KW, LW und AW auf der bakteriellen Oberfläche binden und so die Spaltung und Aktivierung von C3 verhindern (Rooijackers *et al.*, 2005; Rooijackers *et al.*, 2006). Die Staphylokinase (SAK) greift den bereits gebildeten Komplex aus C3b und IgG auf der bakteriellen Oberfläche an und spaltet ihn. Dadurch wird die Opsonierung des Pathogens und nachfolgend seine Erkennung und Eliminierung durch phagozytierende Zellen erschwert (Jin *et al.*, 2004; Rooijackers *et al.*, 2005; van Wamel *et al.*, 2006). Das "Chemotaxis inhibierende Protein von *S. aureus*" (CHIPS) bindet an den C5a-Rezeptor auf der Oberfläche von Neutrophilen und hemmt dadurch die Chemotaxis der Immunzellen (de Haas *et al.*, 2004; Haas *et al.*, 2004; Postma *et al.*, 2004; Rooijackers *et al.*, 2006). Neben dem Komplementsystem inhibieren Faktoren von *S. aureus* auch Effekte der erworbenen Immunabwehr. Das multifunktionale *S. aureus* Protein A (Spa) bindet an die schwere Kette (Fc) von IgG, was dazu führt, dass die Fc-Rezeptor vermittelte bakterielle Phagozytose verhindert wird. Zusätzlich wird auch die IgG vermittelte Aktivierung des KW reduziert (Cedergren *et al.*, 1993). Es wird jedoch nur ein Teil, des von *S. aureus* gebildeten Spa sezerniert. Ein größerer Anteil, wird direkt nach dem Export, durch die bakterielle Zellmembran mit dem Peptidoglycans der Bakterienzellwand verknüpft (siehe weiter unten, Beschreibung CWA Proteine) (Mazmanian *et al.*, 2002). Auch dieses zellwandgebundene Spa kann IgGs binden. Die spezifischen Domänen der IgGs zeigen dabei nach außen und es ergibt sich ein Mimikri-Effekt, durch den Immunzellen das Bakterium nicht mehr als fremd erkennen können (Patel *et al.*, 1987; Cedergren *et al.*, 1993). Die "Clumping"-Faktoren A und B (ClfA/B) binden, wie bereits beschrieben (siehe 1.1), Fibrinogen/Fibrin und hüllen die Bakterien in ein Netzwerk aus Fibrin(makro)molekülen. Dadurch wird den gegen das Pathogen gerichteten Opsoninen der Zugang zur Zelloberfläche erschwert (O'Brien *et al.*, 2002; Clarke & Foster, 2006). Die meisten klinischen Isolate von *S. aureus* besitzen zudem eine Mikrokapsel aus Polysacchariden, die ebenfalls anti-opsonisierend wirkt und so die Aufnahme des Bakteriums durch Neutrophile und Makrophagen vermindert (O'Riordan & Lee, 2004; Roghmann *et al.*, 2005). Neben den Effekten auf die Chemotaxis und die Phagozytose besitzen einige bakterielle Sekretionsprodukte eine unmittelbare zytotoxische Wirkung auf die Immunzellen. Toxine wie das bereits erwähnte Hla (siehe 1.3), bilden Poren in der Zellmembran und induzieren so die Zellyse (Menestrina *et al.*, 2003). Superantigene wie TSST-1 und Enterotoxine führen zu einer antigenunspezifischen T-Zellantwort. Das Superantigen erfüllt dabei eine Brückenfunktion zwischen MHC-II auf den APCs und T-Zellrezeptoren. Dadurch kommt es zu einer unverhältnismäßig starken T-Zellantwort. Diese hat einen unkontrollierten Zytokinausstoß zur Folge (Proft & Fraser, 2003). Durch die überregulierte, adaptive Immunantwort kann es zu Fieber und Hautreaktionen, jedoch auch zu schweren Organschäden kommen, die zum Tod führen können (siehe 1.2). Zusätzlich zu diesen Eingriffen in die Immunantwort hat *S. aureus* weitere effiziente Mechanismen

entwickelt, sich dem Immunsystem zu entziehen. Einer davon ist die Bildung der bereits beschriebenen Biofilme (siehe 1.2), die einen Schutz vor der Wirtsabwehr, sowie auch der etwaig eingesetzten Antibiotika darstellen. Einer der bedeutendsten Faktoren in diesem Zusammenhang ist das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsion (PIA, engl. "polysaccharide intercellular adhesin"), ein geladenes Homopolymer aus  $\beta$ -1,6-verknüpften N-acetylglucosaminen. PIA wurde als der "Kleber" beschrieben, welcher die Lagen des Biofilms zusammenhält (Vuong *et al.*, 2002).

Eine weitere, für viele Bakterienspezies beschriebene, Immunevasionsstrategie ist das Eindringen des Bakteriums in Wirtszellen. Obwohl *S. aureus* lange Zeit als extrazelluläres Pathogen betrachtet wurde (Lowy, 2000), gibt es seit geraumer Zeit eine Reihe an Publikationen, die seine Fähigkeit beschreiben, in Wirtszellen zu internalisieren und in diesen für Tage bis Wochen zu persistieren (rezensiert in (Sinha & Fraunholz, 2010; Josse *et al.*, 2017)). Als bedeutende Faktoren hierbei gelten die bereits erwähnten FnBPs (siehe 1.4). Über diese bindet *S. aureus* an Fibronectin, welches als Brückenmolekül fungiert, da es seinerseits an die Integrine der Wirtszelloberfläche bindet (Sinha *et al.*, 1999; Fowler *et al.*, 2000; Jett & Gilmore, 2002). Dadurch kommt es zur Clusterbildung der  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Integrine, wodurch intrazellulärer Signalkaskaden aktiviert werden, was in einer Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts resultiert (Sinha *et al.*, 1999; Josse *et al.*, 2017). Die Zelle bildet daraufhin Membranprotrusionen an der Aktivierungsstelle aus. Diese bilden einen mit Clathrin bedeckten Vesikel, der sich um das Bakterium (Zipper-Mechanismus) schließt und schließlich als Endosom ins Zytoplasma abgeschnürt wird (Agerer *et al.*, 2003; Agerer *et al.*, 2005; Sinha & Herrmann, 2005; Sinha & Fraunholz, 2010). Es konnte vielfach beschrieben werden, dass die Bakterien nach der Aufnahme dazu in der Lage sind, dem Phagosom zu entkommen und in der Wirtszelle zu persistieren (Qazi *et al.*, 2001). Intrazellulär sind die Pathogene sowohl vor dem Immunsystem des Wirtes (Chatterjee *et al.*, 2007), wie vor nicht zellgängigen Antibiotikatherapien geschützt (Sinha & Herrmann 2005). Die intrazelluläre Lokalisation wiederum fördert die Bildung sogenannter "Small Colony Variants" (SCV), die sich durch einen verminderten Stoffwechsel und eine geringe Expression von Virulenzfaktoren auszeichnen, um in den Wirtszellen "still" zu verbleiben (Sendi & Proctor, 2009; Tuchscherer *et al.*, 2010). Diese können jedoch zurück zur virulenten Ausgangsvariante revertieren und damit zur Lyse der Wirtszelle führen (Tuchscherer *et al.*, 2010; Tuchscherer *et al.*, 2011). Die Bildung von SCV ist vermutlich auch ursächlich für die Fähigkeit von *S. aureus*, Rezidive zu bilden (Proctor *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2016). Zwischen Ersterkrankung und den Rezidiven können Monate bis Jahre vergehen (Proctor *et al.*, 2006). Die FnBPs gehören ebenso wie ClfA, -B und Spa zu der Familie der MSCRAMMS (engl. "microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules"), die eine der vier Gruppen der oberflächenverankerten Adhäsionsfaktoren, der CWA Proteine (engl., "cell wall-anchored")

darstellen (Foster *et al.*, 2014). Diese sind kovalent mit der Peptidoglykanschicht der bakteriellen Zellwand verknüpft. Die Verankerung erfolgt über eine charakteristische C-terminale LPXTG-(Leucin-Prolin-X-Threonin-Glycin) Sequenz. Dieses LPXTG-Motiv wird von der membrangebundenen Transpeptidase Sortase A erkannt (Heilmann, 2011), welche das LPXTG-Motiv zwischen den Aminosäuren Threonin und Glycin schneidet und anschließend die Carboxylgruppe des Threonins mit einer Aminogruppe der Peptidseitenketten des Peptidoglykans verknüpft (Mazmanian *et al.*, 1999; Mazmanian *et al.*, 2002; Marraffini *et al.*, 2006).

Neben zellwandgebundenen Adhäsionsfaktoren besitzt *S. aureus* eine Gruppe von sekretierten Faktoren, die nicht-kovalent an die bakterielle Zelloberfläche zurückgebunden werden. Diese Faktoren werden in der Familie der SERAMs (engl. "secretable expanded repertoire adhesive molecules") zusammengefasst, zu denen neben den bereits beschriebenen Coa und Efb auch das Extrazelluläre Matrixbindeprotein (Emp) gehören (Chavakis *et al.*, 2005; Chavakis *et al.*, 2007). Der neben der Koagulase bekannteste und bestuntersuchte Vertreter dieser Gruppe ist jedoch das "extrazelluläre Adhäsionsprotein" (auch "extrazelluläres Adhärenzprotein") Eap. Wie im Folgenden beschrieben wird, ist Eap ein multifunktionaler Virulenzfaktor, der Anteil an zahlreichen der bislang beschriebenen Eigenschaften hat, die *S. aureus* zu einem so erfolgreichen fakultativen Pathogen machen.

### 1.5 Das Extrazelluläre Adhäsionsprotein (Eap)

Eap wurde zu Beginn der 90er Jahre, unabhängig voneinander, von mehreren Forschungsgruppen beschrieben. So identifizierten Yousif *et al.*, ein stark kationisches 70 kDa-großes Protein (p70) aus dem *S. aureus* Stamm Wood 46, das eine hohe Affinität zur glomerulären Basalmembran von Ratten aufwies (Yousif *et al.*, 1991). Ein Jahr später veröffentlichten Bodén und Flock einen Artikel zu einem etwa 60 kDa-großen Protein mit Fibrinogen-bindenden Eigenschaften (Boden & Flock, 1992). McGavin *et al.* charakterisierten dieses Protein weiter, welches sie als Oberflächenprotein mit Bindungsaffinität zu verschiedenen Komponenten der Extrazellulären Matrix (EZM) wie Sialoprotein, Fibrinogen und Fibronectin beschrieben (McGavin *et al.*, 1993). Dieses Protein konnte in verschiedenen *S. aureus* Stämmen identifiziert werden und obwohl es vergleichbare Bindungseigenschaften aufwies, variierte seine Größe stammspezifisch (Boden & Flock, 1992; McGavin *et al.*, 1993). Palma und Kollegen untersuchten das Protein im Hintergrund des *S. aureus* Stamms Newman weiter und beschrieben zahlreiche Bindungspartner auf Seiten des Wirtes, woraufhin erstmals der Name "extrazelluläres Adhäsionsprotein" (Eap) gewählt wurde (Palma *et al.*, 1999). Unabhängig davon beschrieben

Jonsson *et al.* 1995 im *S. aureus* Stamm FDA574 ein aus 689 Aminosäuren (AS) bestehendes Protein, welches modular aus sechs 110 AS-großen Domänen aufgebaut war. Diese wiederum enthielten 31 AS-große Subdomänen, die starke Strukturhomologien zur N-terminalen  $\beta$ -Kette von Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II Proteinen zeigten. Aufgrund dieser Homologien wurde von den Autoren dieser Studie für das Protein der Name "MHC Klasse II analoges Protein" (Map) gewählt (Jonsson *et al.*, 1995). Spätere Sequenzanalysen konnten zeigen, dass es sich bei p70, Eap und Map um ein und dasselbe Protein handelt, obwohl die C-terminale Domain im Fall des Map-Proteins fehlt. Diese verkürzte Variante des Proteins ist auf die Insertion einer zusätzlichen Base in die Poly-A Domäne zurückzuführen, was eine verfrühte Termination der Translation zur Folge hat. Die Bezeichnung Eap setzte sich letztlich für das Protein durch, dessen stammspezifische Größenvariationen in der variierenden Anzahl der etwa 110 AS-großen EAP-Domänen begründet werden konnten, aus denen das Protein aufgebaut ist (Hussain *et al.*, 2001b). Die vergleichenden PCR-Studien verschiedener *S. aureus*-Stämme brachten hervor, dass 97,9% aller untersuchten Stämme das *eap* Gen besitzen und eine hohe Sequenzhomologie vorliegt (Hussain *et al.*, 2001a). Diese hohe Konservierung spricht dafür, dass Eap als Virulenzfaktor von großer Bedeutung für diese Spezies ist. Jedoch konnte das Protein in anderen, zum Teil nah verwandten Staphylokokken-Spezies, wie *Staphylococcus epidermidis* nicht nachgewiesen werden (Hussain *et al.*, 2001a). Die Größe des Proteins variiert stammspezifisch durch den Aufbau aus drei bis sechs EAP-Domänen, die sich zusätzlich aufgrund ihrer Sequenz in fünf Subtypen unterscheiden lassen (Rajbhandari, 2011). Aufgrund der hochkonservierten Verbreitung von Eap bei *S. aureus* wurde der Nachweis des *eap*-Gens mittels PCR sogar als spezifisch-diagnostische Werkzeug für den Nachweis dieses Pathogens vorgeschlagen (Hussain *et al.*, 2008b).

### 1.5.1 Die Struktur von Eap

Wie bereits erwähnt, besitzt Eap einen modularen Aufbau, der auf repetitiven EAP-Domänen mit den Größen 93-110 kDa basiert. Diese sind über kurze, kationische Linkerregionen mit einer Länge von 10-14 AS miteinander verknüpft (Hammel *et al.*, 2007a). N-terminal besitzt Eap eine etwa 30 AS-lange Signalsequenz, die für die Sezernierung des Proteins in das umgebende Milieu von Bedeutung ist. Darauf folgt eine 19 AS-lange Sequenz mit bislang ungeklärter Funktion (Hussain *et al.*, 2001b). Anschließend reihen sich die EAP-Domänen an, welche deutliche Sequenzhomologien zu der C-terminalen Domäne bakterieller Superantigene (wie TSST) und dem Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) besitzen (Geisbrecht *et al.*, 2005), ohne dass das Protein jedoch als Superantigen/Enterotoxin wirkt (Jahreis *et al.*, 1995; Haggart *et al.*, 2010). Kristallstrukturanalysen zeigten, dass die

Domänen räumlich gesehen aus einer vierfachgedrehten  $\alpha$ -Helix bestehen, welche diagonal einem fünfsträngigen  $\beta$ -Faltblatt aufliegt. Dieses gemischte  $\beta$ -Faltblatt beinhaltet zwischen den Strängen 5 und 6 eine ausgeprägte Loopregion, denen Geisbrecht und Kollegen aufgrund von Sequenz- und Strukturanalysen eine mögliche Funktion bei der Interaktion von Eap und anderen Proteinen zuordneten (Geisbrecht *et al.*, 2005). Die aufeinanderfolgenden EAP-Domänen ergeben ein röhrenförmiges Protein, dass aufgrund eines Knicks zwischen den Domänen 2 und 3 eine konkave Raumform annimmt (Hammel *et al.*, 2007a). Bei der Untersuchung, welches die maßgeblich funktionalen Bereiche von Eap sind, wurde bereits gezeigt, dass eine Zweidomänvariante, bestehend aus den Domänen 3 und 4, für manche Eap-Funktionen ausreichend ist (Hussain *et al.*, 2008a; Binsker *et al.*, 2018; Palankar *et al.*, 2018). Jedoch zeigte das Volllängenprotein oft stärkere Effekte (Hussain *et al.*, 2008a; Binsker *et al.*, 2018). Hussein und Kollegen konnten anhand der Eap-vermittelten Adhäsion von *S. aureus* an seine Wirtszellen, sowie der Agglutinationsfähigkeit der Bakterien untereinander zeigen, dass die Volllängenvariante von Eap des Stammes Newman (fünf EAP-Domänen) die beste Adhäsionsfähigkeit/Agglutinationsfähigkeit im Vergleich zu verkürzten Eap-Konstrukten aufwies. Zwar konnten auch Varianten die aus den Domänen 1-3 oder 3-4 bestanden eine gewisse Adhäsion vermitteln, jedoch nicht im gleichen Ausmaß wie das Volllängenprotein. Einzelne Eap-Domänen waren hingegen nicht in der Lage, die Adhäsion von *S. aureus* an die Wirtszellen, oder eine Agglutination der Bakterien untereinander zu vermitteln (Hussain *et al.*, 2008a; Rajbhandari, 2011).

Neben *eap* selbst besitzt *S. aureus* Gene für zwei weitere Eap-Homologe. Diese kodieren für die Proteine EapH1 (~12 kDa) und EapH2 (~13 kDa). Die Struktur der Homologe gleicht der einer einzelnen EAP-Domäne (Geisbrecht *et al.*, 2005) (siehe Abb. 1.4). Dabei zeigen die Homologe untereinander eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von 47%. Die Homologie der Aminosäuresequenz im Vergleich zu der zweiten EAP-Domäne des Volllängenproteins entsprechen 35% für EapH1 und 42% bei EapH2 (Geisbrecht *et al.*, 2005). Die Gene der drei sog. EAP-Domän-Proteine (EAPs) liegen über das Genom von *S. aureus* verteilt (Stapels *et al.*, 2014) und neben *eap* selbst, tragen alle bisher ausgewerteten *S. aureus* Genome auch *eapH2* und alle bis auf ein Genom *eapH1* (Elshina *et al.*, 2018). Auf die bisher bekannten Funktionen von EapH1 und EapH2 wird in Abschnitt 1.5.5 näher eingegangen.

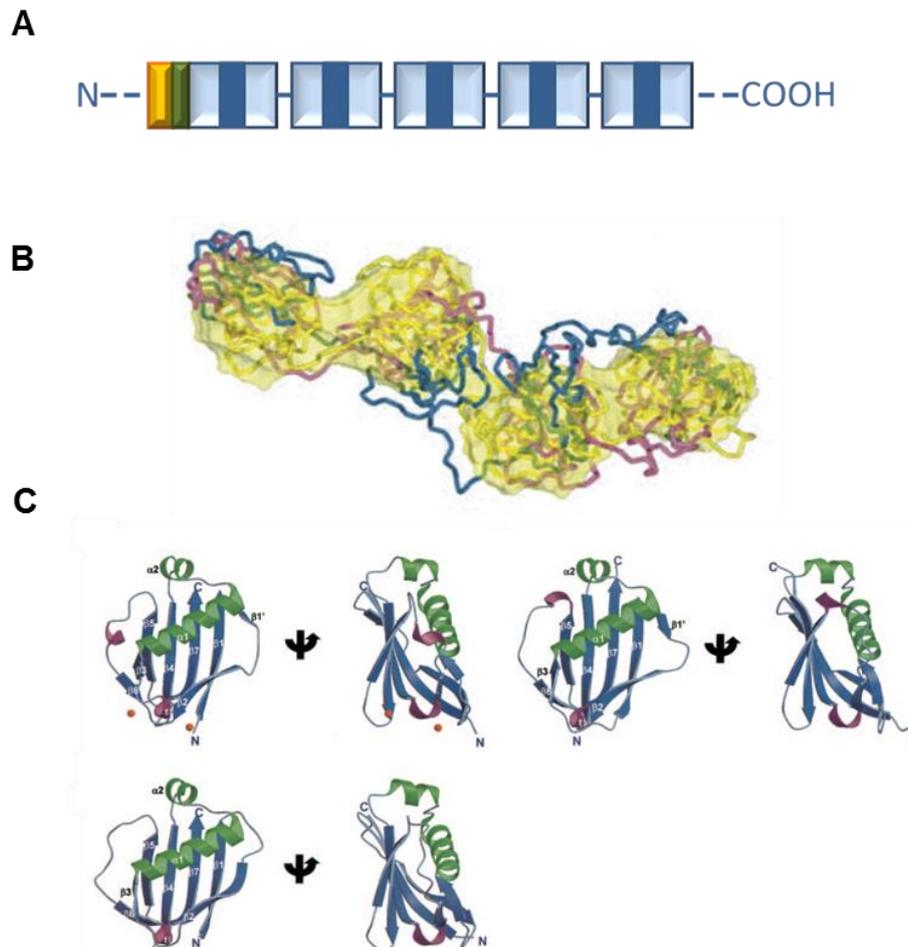


Abb. 1.4: Der Aufbau des modularen Proteins Eap A) Schematisch dargestellt ist der Aufbau von Eap aus dem Stamm Newman T.F., wie es für die Analysen in dieser Arbeit verwendet wurde, beginnend mit einer N-terminalen 30 AS-lange Signalsequenz (gelb), auf die eine Sequenz aus 19 AS mit bisher unbekannter Funktion (grün) folgt (Hussain et al., 2001). Darauf folgen die fünf stammspezifischen Wiederholungen der EAP-Domänen, welche durch kationische Linkersequenzen voneinander getrennt sind (Hammel et al., 2007). Die Domänen sind zwischen 93 und 110 AS lang und besitzen eine 31 AS-lange Subdomäne (dunkelblau) (erstellt nach Jonsson et al. 1995). B) Räumliche Vollständigendarstellung des aus vier EAP-Domänen bestehenden Eap des Mu50-Stamms. *Ab initio* Modell (hellgelb) zusammengesetzt aus überlagerten Darstellungen von aus drei unabhängigen Lösungen erstellten "best fit"-Modellen. Die Sekundärstrukturelemente der drei Modelle sind in blau, pink und gelb hervorgehoben (aus Hammel et al., 2007). C) Dreidimensionale Kristallstruktur der EAP2-Domäne (unten), des Eap aus dem *S. aureus* Stamm Mu50, welche eine in sich vierfach verdrehte  $\alpha$ -Helix (grün) zeigt, die sich über ein fünfsträngiges  $\beta$ -Faltblatt (blau) legt (rechts um  $90^\circ$  gedreht). Darüber sind vergleichend die Kristallstrukturen der Eap-Homologe, EapH1 (links) und EapH2 (rechts) dargestellt (aus Geisbrecht et al., 2005).

### 1.5.2 Die Regulation von Eap

Die Expression von Eap wird von mehreren globalen Regulationssystemen beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass die Regulatoren *sae*, *agr* und SarA die Expression von Eap positiv beeinflussen (Dunman et al., 2001; Harraghy et al., 2003; Harraghy et al., 2005). Der

alternative Sigma-Faktor  $\sigma^B$  scheint keinen direkten Einfluss auf die Expression von Eap zu zeigen (Harraghy *et al.*, 2005), beeinflusst jedoch neben SarA (positive Regulation), auch andere globale Regulationssysteme (Bischoff *et al.*, 2004; Pane-Farre *et al.*, 2006; Depke *et al.*, 2012). Im Fall des *agr*-Systems scheint  $\sigma^B$  antagonistisch zu wirken (Bischoff *et al.*, 2001). Dadurch werden von *agr* positiv regulierte Faktoren, durch  $\sigma^B$  indirekt negativ beeinflusst. So werden vor allem Adhäsine durch  $\sigma^B$  positiv reguliert und Exotproteine/Toxine reprimiert (Bischoff *et al.*, 2001; Bischoff *et al.*, 2004).

Das globale Regulationssystem *sae* scheint für die *eap*-Expression von größter Bedeutung zu sein, da sie in *sae*-Mutanten nahezu vollständig ausbleibt, während in *agr*- und *sarA*-Mutanten die Expression nur um das drei bis Fünffache reduziert ist (Harraghy *et al.*, 2005). Da das *agr*-System und SarA dafür bekannt sind, *sae* positiv zu regulieren, könnte dies auch einen indirekten Effekt von *agr* und SarA auf die *eap*-Expression darstellen. In verschiedenen Studien wurde die Transkriptionsrate von *eap* mittels quantitativer Echtzeit-PCR untersucht. Die Ergebnisse differieren, wobei sowohl die exponentielle Wachstumsphase (nach 4 h) (Harraghy *et al.*, 2005), als auch die stationäre Phase (nach 8 h) (Joost *et al.*, 2009), als Transkriptionshöhepunkt von *eap* ermittelt wurden. Diese abweichenden Ergebnisse beruhen eventuell darauf, dass verschiedene Kulturmedien verwendet wurden und die Transkriptionsrate in einer starken Abhängigkeit von den herrschenden Kultivierungsbedingungen steht (Kawasaki, 2008). Glukose zeigt dabei eine reprimierende Wirkung auf die *eap*-Expression, wobei dies vermutlich an der Repression von *sae* liegt. Es konnte gezeigt werden, dass die bakterielle Verstoffwechslung von Glucose unter *in vitro* Bedingungen über die Zeit zu einer Ansäuerung des Mediums führt (Novick & Jiang, 2003; Harraghy *et al.*, 2005) und eine derartige pH-Verschiebung zu Veränderungen in der Genexpression führt (Weinrick *et al.*, 2004).

Wann und unter welchen Bedingungen die Eap-Homologe transkribiert/exprimiert werden ist bis dato nur wenig untersucht. Microarray-Analysen weisen darauf hin, dass die Expression der drei Eap-Proteine im Infektionsverlauf unterschiedlich verläuft, wodurch eine gestaffelte Funktion gewährleistet werden könnte. Die Eap- und EapH1-Expression wird unter anderem durch Exposition zu Neutrophilen Granula-Komponenten induziert (Palazzolo-Ballance *et al.*, 2008), während EapH2 offenbar anders reguliert wird (Stapels *et al.*, 2014). Die Transkription von *eapH1* scheint des Weiteren vom alternativen Sigmafaktor  $\sigma^B$  beeinflusst zu werden (Bischoff *et al.*, 2004), der insbesondere für das intrazelluläre Überleben von *S. aureus* in nicht-professionellen phagozytotischen Wirtszellen von Bedeutung ist (Tuchscherer *et al.*, 2015) aber auch durch unterschiedliche Stresssignale aktiviert wird (Chan *et al.*, 1998).

### 1.5.3 Eap als Adhäsion

Die früheste und daher namensgebende Funktion von Eap ist die Vermittlung der Adhäsion des Bakteriums an Wirtsstrukturen. Es konnte für Eap ein sehr weitgefächertes Bindungsspektrum an zahlreiche Proteine der extrazellulären Matrix (EZM), sowie diverse Plasmaproteine gezeigt werden (Palma *et al.*, 1999). Als Interaktionspartner wurden u.a. Fibrinogen, Fibronectin, Prothombin (Palma *et al.*, 1999), sowie Laminin, Kollagen, Knochensialoprotein, Elastin, Thrombospondin und Vitronectin identifiziert (McGavin *et al.*, 1993). Diese Vielzahl an Bindungspartnern spricht für Eap als ein sehr promiskuitives Adhäsionsprotein. Jedoch konnten Hansen *et al.* zeigen, dass Eap im Fall des Kollagens durchaus selektive Bindungseigenschaften aufweist (Hansen *et al.*, 2006). So bindet Eap zwar an die monomolekulare Form von Kollagen Typ I, IV und VI, jedoch nicht an Kollagen Typ II, trotz der hohen Sequenzhomologie der Kollagen Typen untereinander. Dies verdeutlicht, dass Eap zwar ein breites, jedoch nicht gänzlich unspezifisches Bindungsspektrum aufweist. Ebenfalls einen großen Einfluss zeigt die Komplexierung der Bindungspartner. So kann Eap zwar neben den monomolekularen Formen auch Suprastrukturen, wie die Netzwerke der Basalmembranen und Mikrofibrillen binden, die Kollagen Typ IV, VI oder Fibronectin enthalten, jedoch nicht an Kollagen, welches in fibrillären Bündeln zusammengefasst ist (Hansen *et al.*, 2006). Kommt es zum Verdau dieser fibrillären Strukturen durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), wie Kollagenasen und Gelatinasen, werden die Bindungsstellen für Eap frei und es kann zu einer Interaktion kommen. Da MMPs im Rahmen einer Entzündungsreaktion ausgeschüttet werden (Nissinen & Kahari, 2014), um zerstörte Matrixbestandteile zu degradieren, vermitteln solche Lokalisationen daher bevorzugte Eap vermittelte Anhaftungsstellen für *S. aureus*. Die Bakterien binden dadurch vermindert an intakte, fibrilläre Oberflächen, wo die Pathogene einer Beseitigung durch Immunzellen stärker ausgeliefert sind. Dies wird als zusätzlicher Schutz vor dem Immunsystem des Wirtes betrachtet (Hansen *et al.*, 2006).

Die vielfältigen Bindungspartner für Eap auf Seiten des Wirtes dienen bei einer Adhäsion des Bakteriums als wichtige Kontaktstellen, bei denen Eap als Brückenmolekül zwischen Bakterium und Wirtsstruktur fungiert. Auf diese Weise werden die spezifischen Interaktionen zwischen Bakterium und Wirtszelle erhöht (Kreikemeyer *et al.*, 2002). Es wurde zudem postuliert, dass die Interaktion von Eap mit der Zelloberfläche darauf beruht, dass Eap ein stark kationisches Protein ist, während eukaryote Zelloberflächen negative Ladungen aufweisen (Hansen *et al.*, 2006). Um jedoch eine derartige Brücke schlagen zu können, muss Eap in der Lage sein, auch an die bakterielle Zelloberfläche zurückzubinden. Palma *et al.* zeigten, dass unter *in vitro* Kultivierungsbedingungen der größte Anteil des Proteins mit 70% in den Überstand sezerniert wird, jedoch ein Anteil von 30% an die Zellwand gebunden

vorliegt (Palma *et al.*, 1999). Da Eap kein LPXTG-Motiv besitzt, welches für CWAs typisch ist und der Verankerung dieser Proteingruppe in der bakteriellen Zellwand dient, wird es als SERAM angesehen und bindet auf anderem Wege an die bakterielle Zellwand zurück. Als ein möglicher Partner zur Rückbindung wurde die Neutrale Phosphatase (Nptase) identifiziert (Flock & Flock, 2001). Kreikemeyer *et al.* identifizierten zudem im Stamm Phillips zwei weitere, nicht näher charakterisierte Proteine von 50 und 82 kDa Größe als Bindungspartner von Eap (Kreikemeyer *et al.*, 2002). Als weitere mögliche Bindungspartner können Wandteichonsäuren (WTAs) vermutet werden, die einen entscheidenden Einfluss auf die erfolgreiche Besiedelung des Wirtes durch *S. aureus* haben (Weidenmaier *et al.*, 2005). Tatsächlich ist die Rückbindung von Eap an die bakterielle Zellwand abhängig von der D-Alanylierung der Teichonsäuren. Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass Eap nicht an die Oberfläche einer *dlt*-Mutante bindet, möglicherweise aufgrund veränderter elektrostatischer Interaktionen (Vuong *et al.*, 2002). Eap als stark kationisches Protein könnte dabei an eine oder mehrere der polyanionischen, langkettigen und deutlich anionisch geladenen Wandteichonsäuren binden (Gunaratnam, 2016). Da die Bindungskapazität der Bakterienoberfläche mit bis zu 50.000 Eap-Molekülen sehr hoch ist, spricht auch dies eher für eine unspezifische, ladungsbedingte Rückbindung (Flock & Flock, 2001). Neben der Bindung an Wirtsstrukturen und die Bakterienoberfläche neigt Eap außerdem zu Selbstaggregation. Dieser Umstand verstärkt möglicherweise zusätzlich die Brückenbildung von Pathogen zu Substrat (Palma *et al.*, 1999). So wurde postuliert, dass Eap die Adhäsion an Katheter und Implantate vermittelt, indem es entweder direkt an die abiotische Oberfläche, oder an Plasmaproteine bindet, welche diese bereits bedecken. Durch Selbstaggregation und Rückbindung an die bakterielle Oberfläche kann Eap somit zu SSI beitragen (Palma *et al.*, 1999; Kreikemeyer *et al.*, 2002).

Da *S. aureus* verschiedene Typen von Adhäsinen besitzt, können sich deren Effekte gegenseitig maskieren. Daher tritt die Bedeutung von Eap als Adhäsionsprotein vor Allem dann deutlich hervor, wenn andere Adhäsionsfaktoren durch Mutation verlorengegangen sind. Im Fall des *S. aureus* Stamms Newman sind z.B. die FnBPs aufgrund eines mutationsbedingten Verlusts des LPXTG-Motifs unfunktional, da sie von der Sortase A nicht mehr in der bakteriellen Zellwand verankert werden können (Grundmeier *et al.*, 2004). Dieser Stamm ist im Gegenzug ein hochpotenter Eap-Produzent (Hussain *et al.*, 2001a; Schafer *et al.*, 2009). Vor diesem Hintergrund konnte gezeigt werden, dass Eap hier den Funktionsverlust der FnBPs zu kompensieren vermag (Kreikemeyer *et al.*, 2002). Erst wenn in diesem Stamm auch *eap* mutiert vorliegt, wie im Stamm mA12, geht das Adhäsionsvermögen signifikant zurück (Hussain *et al.*, 2002; Haggart *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse lassen sich im Stammhintergrund von SA113 ergänzen, dessen isogene *eap*-Mutante keinen eindeutigen Rückgang des Adhäsionsvermögens aufweist, da vermutlich die

CWA Proteine für den Funktionserhalt ausreichend sind (Bur *et al.*, 2013). Dass *S. aureus* mehrere Adhäsine besitzt, die ihren Funktionsverlust gegenseitig kompensieren können, ist ein bedeutendes Indiz für die große Bedeutung dieser Faktoren, welche die initiale Anbindung des Pathogens an Wirtsstrukturen vermitteln und damit den initialen Schritt der Besiedelung einleiten.

### 1.5.4 Eap als Invasin

Neben seiner primär beschriebenen Funktion als Adhäsine gibt es inzwischen mehrere Studien, die Eap als bedeutendes Invasin beschreiben. Damit hilft es dem Keim, in Wirtszellen zu internalisieren, um dort zu persistieren. So konnten Hagggar *et al.* bereits die verstärkte Aufnahme von *S. aureus* in Endothelzellen auf Eap zurückführen (Hagggar *et al.*, 2003). Bur *et al.*, zeigten dies außerdem für Keratinozyten, konnten den Vorgang näher beschreiben und feststellen, dass die Eap induzierte Internalisierung auch unabhängig vom Vorhandensein der zellwandgebundenen CWAs erfolgt (Bur *et al.*, 2013). So wird durch extern zugegebenes Eap die Aufnahme von *S. aureus* in die Keratinozyten in Eap-Dosis- und Zeit-abhängiger Weise erhöht. Interessanter Weise gilt dies ebenfalls für andere, nicht invasive Bakterienarten wie *S. carnosus*, *S. epidermidis* und *E. coli* (Hagggar *et al.*, 2003; Bur *et al.*, 2013). Dies zeigt, dass die Eap-induzierte Internalisierung kein *S. aureus* spezifischer Vorgang ist, sondern, dass Eap die Maschinerie der eukaryoten Zelle beeinflusst, sodass diese Partikel aus dem Außenmilieu unselektiv aufnimmt. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass Eap auch die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten, abiotischen Mikropartikeln in Endothelzellen induziert (Joost *et al.*, 2011). Die Internalisierung kann durch vorherige Behandlung der Bakterien mit exogenem Eap (Hagggar *et al.*, 2003), oder der eukaryoten Zellen verstärkt werden (Bur *et al.*, 2013). Dies spricht dafür, dass der Eap-Effekt direkt auf die Maschinerie der eukaryoten Zelle wirkt und nicht nur an einer erhöhten Adhäsion der Bakterien/Partikel an der Wirtszelle liegt. Der Mechanismus, der diesem Effekt zugrunde liegt, wurde noch nicht aufgeklärt, jedoch wurde spekuliert, dass es sich um einen ähnlichen Vorgang handelt, wie er für die FnBPs beschrieben wurde (siehe 1.4).

### 1.5.5 Eap als Immunmodulator

Neben seinen beschriebenen Qualitäten als Adhäsine und Invasin konnten für Eap inzwischen auch zahlreiche immunmodulatorische Funktionen aufgedeckt werden. So verhindert Eap offenbar das Einwandern von Leukozyten aus dem Blutstrom in den entzündlichen Bereich infizierter Gewebe (Chavakis *et al.*, 2002). Eap bindet hierbei direkt an das

Zelladhäsionsmolekül ICAM-1 des Endothels und an das Fibrinogen und Vitronektin der EZM. Dadurch wird verhindert, dass die Leukozyten über die auf ihrer Oberfläche präsentierten  $\beta$ 2-Integrine und den "Urokinase Plasminogen Aktivator-Rezeptor" (uPAR) an ihre Bindungspartner ICAM-1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1), Fibrinogen (interagiert mit  $\beta$ 2-Integrinen) und Vitronektin (interagiert mit uPAR) adhären können. Dies unterbindet das so genannte "Leukozyten-Rollen", einem der ersten Schritte der Extravasation der Leukozyten in den Infektionsherd. Auf einem ähnlichen Weg inhibiert Eap die Bindung von Neutrophilen an stimulierte Endothelzellen und damit deren transendotheliale Migration (Hagggar *et al.*, 2004). Die die Entzündung verursachenden Pathogene können daher nur in stark reduziertem Umfang durch diese Immunzellen phagozytiert und damit abgetötet werden. Dies kann zur Ausbildung chronischer Krankheitsbilder, wie Arthritiden führen (Chavakis *et al.*, 2002). Auch Athanasopoulos *et al.*, zeigten eine verminderte Einwanderung von Immunzellen (Neutrophile und Makrophagen) in einen durch *S. aureus* infizierten Wundbereich in Abhängigkeit von Eap (Athanasopoulos *et al.*, 2006). Sie ermittelten zudem eine verminderte Leukozytenaktivierung, dargestellt durch geringere Expression des NF- $\kappa$ B (engl. "Nuklear Factor  $\kappa$ B") und des TFs (engl., "Tissue Factor") (Athanasopoulos *et al.*, 2006). Einen weiteren Eingriff in die Maschinerie des Wirtsimmunsystems beschrieben Hagger und Kollegen (Hagggar *et al.*, 2005), als sie den Einfluss von Eap auf die T-Zellproliferation beschrieben. Eap zeigte hierbei einen konzentrationsabhängigen Effekt auf aus PBMCs (engl. "Peripheral Blood Mononuclear Cells") aufgereinigten T-Zellen. In geringen Dosen ( $\leq 9 \mu\text{g/ml}$ ) stimulierte Eap MHC-Klasse II abhängig die Proliferation der PBMCs, wobei ICAM-1 offenbar als Co-Stimulator wirkte, während höhere Konzentrationen ( $\geq 27 \mu\text{g/ml}$ ) die Apoptose von T- und B-Zellen auslöste, sowie die Proliferation bereits stimulierter Zellen inhibierte. Ein stimulierender Effekt geringerer Eap-Mengen konnte auch bereits von Jahreis *et al.* 1995 beobachtet werden, welche eine Interleukin-2 (IL-2)-Induktion durch geringe Eap (p70)-Dosen beobachten konnten, was zu einer verstärkten Leukozyten-Proliferation führte, da IL-2 in einem "feedback-loop" die Proliferation dieses Zelltyps anregt (Jahreis *et al.*, 1995). Allerdings stimulierte p70 die Proliferation bis zu einer Konzentration von  $15 \mu\text{g/ml}$ , während nachfolgende Studien zu dem Schluss kamen, dass solch hohe Eap-Dosen in der Regel proliferationshemmend wirken (Hagggar *et al.*, 2005; Hussain *et al.*, 2008a). Neben IL-2 konnte auch für die Ausschüttung von IL-4 und IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ) aus TH2-Lymphozyten sowie IL-6 und TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) aus Monozyten und Makrophagen eine Induktion durch Eap gezeigt werden (Jahreis *et al.*, 1995; Scriba *et al.*, 2008). Auch dieser Effekt scheint über die Eap-ICAM-1-Interaktion induziert zu werden (Scriba *et al.*, 2008). Eap wirkt also immunmodulatorisch sowohl inhibierend, da IL-4 als anti-inflammatorisch betrachtet wird und es die Leukozytendiapedese hemmt, als auch aktivierend, über die Modulation der IL-2, IL-6 und TNF- $\alpha$  Ausschüttung. Die gesteigerte

Ausschüttung von TNF- $\alpha$  hat jedoch auch positive Effekte für den Keim. Es induziert unter anderem die Expression einer Reihe von Rezeptoren auf der Zelloberfläche von eukaryoten Zellen, so auch von gVlqR/p33, der als Rezeptor für Protein A gilt (Nguyen *et al.*, 2000). Dadurch kann *S. aureus* vermehrt an die Wirtszelloberfläche binden (Peerschke *et al.*, 2006; Sethi *et al.*, 2011; Edwards *et al.*, 2012). Eap zeigt zudem einen direkten Apoptose auslösenden Effekt auf T-Zellen (Lee *et al.*, 2002). Dadurch kommt es zu einer Verschiebung der Immunantwort von einer zellulären (TH1-Lymphozyten basierten) hin zu einer humoralen (TH2-Lymphozyten basierten) Immunantwort. Dies begünstigt die Etablierung von Langzeitbesiedlungen und damit chronische Infektionen durch *S. aureus* (Lee *et al.*, 2002). Auch hier scheint die Eap-ICAM-1 Interaktion eine zentrale Rolle zu spielen, da ICAM-1 auf APC an der Interaktion zwischen T-Zellen und APC beteiligt ist (Dang *et al.*, 1990; Hogg *et al.*, 1991) und Eap dies durch Bindung an ICAM-1 inhibieren kann (Harraghy *et al.*, 2003).

Ein weiterer immunmodulierender Eap-Effekt konnte für die Aktivierung von Thrombozyten gezeigt werden (Bertling *et al.*, 2012). Zum einen induziert Eap die Aktivierung von Thrombozyten über die auf der Plättchenoberfläche befindlichen Thiol-Isomerasen. Dies löst die Adhäsion, Aggregation, Sekretion der Granula und die Bildung von Thrombin auf der Thrombozytenoberfläche aus. Zum anderen vermittelt Eap die Aktivierung des Integrins GPIIb/IIIa, was wiederum zur verstärkten Bindung von Plasmaproteinen (wie Fibrinogen und dem von-Willebrand-Faktor (vWF)) an die Plättchen führt, und damit ebenfalls zu Aggregation und Aktivierung beiträgt. Alle Plättchen-aktivierenden Funktionen scheinen auf den hydrophoben Eigenschaften von Eap zu beruhen, die eine Mimikri der so genannten "misfolded proteins" erzeugen, welche als Plättchenaktivatoren beschrieben sind (Herczenik *et al.*, 2007; Bertling *et al.*, 2012). Für die Aktivierung der Thrombozyten ist offenbar nicht das Volllängen-Eap notwendig, sondern es scheinen die Tandem-Wiederholungen 3 und 4 ausschlaggebend zu sein (Binsker *et al.*, 2018; Palankar *et al.*, 2018). Jedoch konnte, wie in vorrausgegangenen Studien zu anderen Eap-Effekten, eine verstärkte Wirkung des Gesamtproteins gezeigt werden (Hussain *et al.*, 2008a). Die Eap-bedingte Aktivierung der Plättchen geht mit massiven morphologischen Veränderungen, durch Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts und einem Anstieg der P-Selektin-Expression auf der Plättchenoberfläche einher (Bertling *et al.*, 2012). Diese dienen als Rezeptoren für Adhäsions- und Klumpungsproteine auf der Plättchenoberfläche (Hartwig, 1992). Aktivierte Thrombozyten adhärieren an das subendotheliale Gewebe und beginnen zu akkumulieren. Dadurch entstehen weitere Adhärenzflächen für *S. aureus* und dies kann die Ausbildung von Biofilmen und somit den Erhalt von Infektionen begünstigen (Fitzgerald *et al.*, 2006).

Erste Hinweise auf die zellregulatorischen Geschehnisse, die grundlegend für all diese Eap-Effekte sind, lieferten Sobke *et al.*, als sie zeigen konnten, dass Eap mit der Map-Kinase-

Kaskade (Ras–Raf–MEK–Erk) von Endothelzellen interagiert und dadurch die Erk-Phosphorylierung inhibiert. Der Eingriff in die Kaskade scheint hierbei oberhalb von Ras zu erfolgen. Da zahlreiche zelluläre Funktionen, wie Proliferation und Migration eukaryonter Zellen, durch diese Signalkaskade adressiert werden, gibt dies erste Einblicke auf die molekulare Wirkweise von Eap (Sobke *et al.*, 2006).

Die Erkenntnisse an Thrombozyten legen außerdem nahe, dass Eap über einen noch nicht näher beschriebenen Mechanismus den intrazellulären Kalziumeinstrom ( $\text{Ca}^{2+}$ ) in das Zytosol aktiviert (Binsker *et al.*, 2018). Ausschlaggebend hierfür scheinen die Domänen D3 und D4 zu sein (Palankar *et al.*, 2018). Die durch die nachfolgende Induktion von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signalkaskaden kommt es zur Aktivierung der Zelle (Clapham, 2007). Im Fall von Thrombozyten führt dies zu der Veränderung der Zellform und Induktion der Akkumulation (Stalker *et al.*, 2012).

Erst in neuerer Zeit wurden weitere bemerkenswerte immunmodulatorische Eigenschaften von EAPs beschrieben. Staples *et al.* zeigten erstmals 2014, dass Eap und seine beiden Strukturhomologe EapH1 und EapH2 in der Lage sind die neutrophilen Serinproteasen (NSPs) zu hemmen (Stapels *et al.*, 2014). NSPs werden nach Aktivierung der Neutrophilen, aus den  $\alpha$ -Granula, in das extrazelluläre Milieu entlassen. Sie können auf manche Spezies bakterizid wirken, jedoch auch bakterielle Virulenzfaktoren proteolytisch unschädlich machen. Die EAPs stellen spezifische NSP-Inhibitoren dar, die die Neutrophile Elastase, Cathepsin G und Proteinase 3 hemmen, indem sie nicht-kovalent an deren aktives Zentrum binden und so die Zugänglichkeit für das Substrat verhindern (Stapels *et al.*, 2014). Des Weiteren konnte eine Inhibition der phylogenetisch mit den NSPs verwandten Mastzell-Chymase nachgewiesen werden (Stapels *et al.*, 2018). Interessanterweise kann die NSP4 nur durch Eap, jedoch nicht durch die Homologe inhibiert werden (Stapels *et al.*, 2018). Für die Eap-Homologe ist dies die erste bisher beschriebene Funktion. Auf ähnliche Weise üben auch einzelne EAP-Domänen von Eap einen NSP-inhibitorischen Effekt aus. Für einzelne EAP-Domänen wurde bislang lediglich ein proliferationsmodulierender Effekt auf PBMCs gezeigt (Hussain *et al.*, 2008a). Konzentrationen von bis zu 9-27  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (je nach EAP-Domäne) stimulierten dabei die Proliferation, höhere Konzentrationen zeigten hingegen inhibitorische Effekte. Einzige Ausnahme bildete die EAP-Domäne 1, die auch bei der höchsten, getesteten Konzentration von 81  $\mu\text{g}/\text{ml}$  noch einen stimulierenden Effekt zeigte (Hussain *et al.*, 2008a). Die Inhibition der NSPs stellt für den Keim einen Schutz der eigenen, in das Wirtsmilieu abgegebenen Virulenzfaktoren (z.B. CHIPS, SCIN-A) dar und trägt damit zur Etablierung und dem Erhalt der Infektion bei (Stapels *et al.*, 2018). Zudem konnte gezeigt werden, dass für die inhibitorische Bindung von EapH1 und EapH2 an Neutrophile Elastase unterschiedliche Proteinregionen verantwortlich sind (Stapels *et al.*, 2018). Dass EapH1 und

EapH2 trotz ihrer Homologie, insbesondere in Hinblick auf ihre Tertiärstruktur (Geisbrecht *et al.*, 2005), strukturell unterschiedliche Bindungen eingehen können und die Bindungen sehr spezifisch sind, spricht dafür, dass durch die drei EAPs auch noch weitere Proteasen gehemmt werden könnten (Stapels *et al.*, 2018).

Eap kann also über verschiedenste Wirkmechanismen in die zelluläre Immunantwort eingreifen. Durch Woehl und Kollegen wurde des Weiteren beschrieben, dass Eap auch Einfluss auf den komplementären Teil des Immunsystems zeigt (Woehl *et al.*, 2014). Dieses System besteht, wie zuvor beschrieben (siehe 1.4), aus verschiedenen humoralen Faktoren mit großem Einfluss auf die Immunabwehr und dient in erster Linie der Opsonierung von Pathogenen und dem chemotaktischen Dirigieren von Immunzellen. Den drei Aktivierungskaskaden des KW, LW und AW ist dabei gemein, dass es an einem Punkt zur Spaltung des Faktors C3 auf der bakteriellen Oberfläche kommt (Foster, 2005). Eap ist in der Lage, den KW und den LW zu hemmen, indem es an C4b bindet, dadurch die Anbindung von C2 verhindert und damit die Bildung der Konvertase inhibiert (Woehl *et al.*, 2014). Da der AW hauptsächlich abläuft, indem das C3-Spaltprodukt C3b einen Komplex mit dem Faktor Bb bildet, hat die Inhibition des KW und des LW indirekt auch Einfluss auf den AW, der normalerweise zur Selbstampfizierung der Komplementreaktion beiträgt. Alle in der Komplementkaskade nach der Spaltung und Aktivierung von C3 erfolgenden Vorgänge werden daher durch Eap beeinflusst. Für die Bindung an C4b scheinen die EAP-Domänen 3 und 4 maßgeblich zu sein. Wie bei den meisten anderen Eap-Funktionen auch, ist eine Einzeldomäne nicht funktional und nur ein Eap-Derivat, welches mindestens die EAP-Domänen 3 und 4 enthält, kann in relevantem Maße an C4b binden. Diese beiden Domänen wurden daher näher charakterisiert (Woehl *et al.*, 2016; Herrera & Ploscuriu, 2018) und ihre Bindestelle scheint auf neun Lysinen und deren positive Ladung an spezifischen Positionen des Proteins zu beruhen. Eine Mutation dieser Lysine führt daher zu einer deutlich verminderten Bindungsaffinität an C4b (Woehl *et al.*, 2017).

Die hier unter 1.5.5 dargestellten immunmodulierenden Aktivitäten des Eap unterstreichen den multifunktionalen Charakter dieses Proteins, welches Anteil an zahlreichen Prozessen im Ablauf einer durch *S. aureus* hervorgerufenen Infektion hat.

### 1.5.6 *S. aureus* und Eap im Kontext chronischer Wunden

Multiple zelluläre Mechanismen von Einzelzellen und Zellverbänden sind notwendig, um eine Wunde sauber und effizient zu verschließen (siehe 1.5.7). Aufgrund dieser Komplexität des Systems kann es an vielen Stellen zu Störungen und Deregulationen kommen. Akute - oft

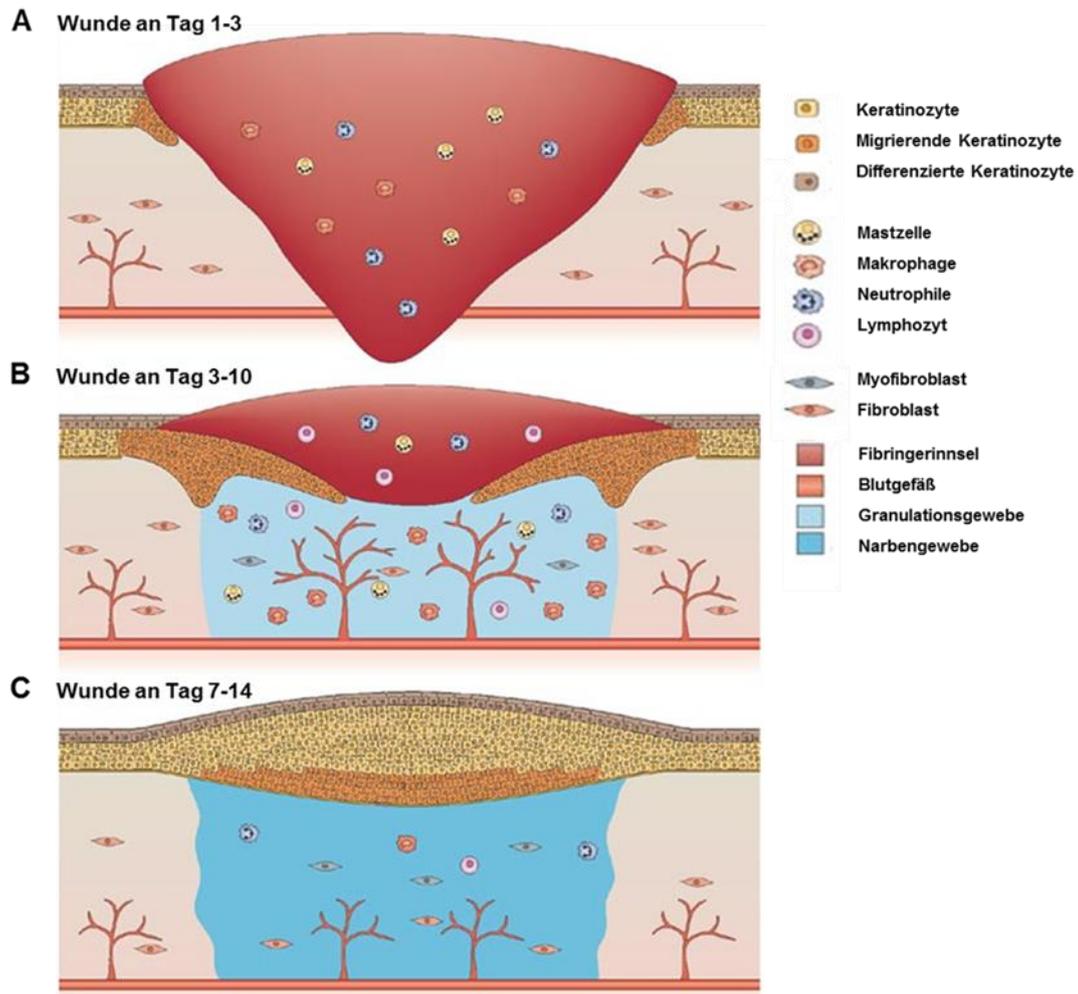
flache - Wunden heilen meist ohne größere medizinische Eingriffe. Treten jedoch Dysregulationen inflammatorischer Prozesse auf, können sich chronische Wunden mit stark verzögerter Heilungsprognose entwickeln (Tarnuzzer & Schultz, 1996). Zahlreiche Studien beschreiben die Besiedlung mit Mikroorganismen als Hauptrisikofaktor für die Entwicklung chronischer Wunden. Obwohl zahlreiche bakterielle Spezies für die Etablierung von Wundinfekten verantwortlich sein können (Gjodsbol *et al.*, 2006), gilt *S. aureus* immer noch als ein Hauptverursacher nicht-heilender Wunden (Madsen *et al.*, 1996; Grimbale *et al.*, 2001; O'Gara, 2007; Fazli *et al.*, 2009; Kooistra-Smid *et al.*, 2009; Thomson, 2011; Percival *et al.*, 2012a; Percival *et al.*, 2015a).

Es wurde auch beschrieben, dass Eap einen direkten Einfluss auf Wundheilungsprozesse im Mausmodell zeigt. So konnten Athanopoulos und Kollegen zeigen, dass mit Eap-exprimierenden *S. aureus* Zellen infizierte Wunden sich deutlich langsamer schlossen als solche, die mit einem *eap*-defizienten *S. aureus* Stamm infiziert wurden (Athanopoulos *et al.*, 2006). Den gleichen Effekt konnte auch aufgereinigtes Eap alleine hervorrufen, das in die Wunde appliziert wurde, was die Rolle des Proteins in diesem Kontext unterstreicht. Der verminderte Wundschluss ging mit einer geringeren Einwanderung von Immunzellen und einer gehemmten Neovaskularisierung im Wundbereich einher. Endothelzellen, welche die Basis der neuen Blutgefäße bilden, werden offenbar direkt durch Eap in ihrer Proliferation und Migration beeinflusst (Athanopoulos *et al.*, 2006; Sobke *et al.*, 2006). Wie bereits beschrieben, hemmt Eap unter anderem die Leukodiapedese, dadurch werden am Infektionsort deutlich weniger proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet, was die Chemotaxis der an der Wundheilung beteiligten Zellen negativ beeinflusst (Chavakis *et al.*, 2002; Hagggar *et al.*, 2004; Athanopoulos *et al.*, 2006). Eap scheint auch in genuinen, menschlichen Wunden eine Rolle zu spielen. *S. aureus*-Stämme, welche direkt aus infizierten Wunden gewonnen wurden weisen eine bis zu 100-fach höhere *eap*-Transkription *in vivo* auf, als ihre *in vitro* Kulturen. Außerdem ist die *eap*-Transkription in tiefen mit *S. aureus* infizierten Wunden signifikant höher als in oberflächlichen Wunden (Joost *et al.*, 2009). Ein Indiz für die Schwere einer durch *S. aureus* induzierten Infektion ist am Titer der gegen Eap gerichteten Antikörper abzulesen, der mit dem Schweregrad und der Dauer der Infektion korreliert (Joost *et al.*, 2011). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass gesunde Probanden, genauso wie Patienten mit akuter *S. aureus*-Infektion, Antikörper gegen Eap besaßen. Dies verdeutlicht, wie allgegenwärtig die transiente *S. aureus*-Besiedlung in der Gesellschaft ist und dass Eap offenbar *in vivo* stets exprimiert wird (Joost *et al.*, 2011). Eap scheint also auf verschiedenen Ebenen einen deutlichen Einfluss auf die Wundheilung zu zeigen, und um dies besser interpretieren zu können, wird im Folgenden der normale Ablauf des Wundheilungsprozesses beschrieben.

### 1.5.7 Der Prozess der Wundheilung

Die Heilung von Wunden ist ein komplexer und vielschichtiger Prozess, der das Zusammenwirken verschiedener Zelltypen und zellulärer Prozesse voraussetzt. Um die Vorgänge einfacher zu beschreiben, wurden sie in die Phasen - Exsudation, Granulation und Differenzierung - eingeteilt, die jedoch zeitweise parallel verlaufen.

Im Rahmen der Exsudationsphase erfolgt zunächst die Hämostase, wobei die Gefäße kontrahieren, um den Blutfluß zu reduzieren. Thrombozyten können sich aufgrund der herabgesetzten Flusseigenschaften im Wundbereich an Kollagenfasern des umliegenden Bindegewebes anheften, das durch die Verletzung offen liegt und beginnen zu akkumulieren (Sandeman *et al.*, 2000). Durch die Adhäsion an das subendotheliale Gewebe werden die Blutplättchen aktiviert und schütten Chemokine aus, wodurch sie weitere Thrombozyten über Chemotaxis anlocken (Werner & Grose, 2003) und zudem eine Vasokonstriktion erzeugen um weiteren Blutverlust zu verhindern. Die Thrombozyten selbst, sowie durch die Verwundung aktivierte Endothelzellen, schütten Gerinnungsfaktoren - wie das die Thrombozytenadhäsion initizierende Glykoprotein "von Willebrandfaktor" (vWF) -, sowie Fibronectin und Laminin aus, welche eine Verbindung zwischen den Thrombozyten und den Kollagenfasern vermitteln (Sandeman *et al.*, 2000). Die aktivierten Blutplättchen verändern außerdem ihre Form von linsen- zu kugelförmig und bilden zahlreiche Pseudopodien aus, um eine Vernetzung untereinander zu generieren. Zugleich steigt die Anzahl der Rezeptoren für Adhäsions- und Klumpungsproteine auf der Plättchenoberfläche (Hartwig, 1992), was zu der Bildung des weißen Thrombus führt, der zunächst die Wunde verschließt. Dieser Vorgang dauert meist nur wenige Minuten. Neben den Chemokinen werden in dieser ersten Phase auch Wachstumsfaktoren, wie der plättchenaktivierende Faktor (PAF), ausgeschüttet, welche die plasmatische Gerinnung induzieren. Das freigesetzte Fibronectin und Thrombospondin, sowie Fibrinogen aus dem Blutplasma binden hierbei an die Zellmembran der Plättchen. Das normalerweise als Proteinkomplex im Blut vorliegende Fibrinogen wird, durch das nach einer Aktivierungskaskade aktive Thrombin, zunächst zu Monomeren katalytisch abgebaut. Diese lagern sich spontan zu langfaserigem Fibrin zusammen. Durch den aktivierten Gerinnungsfaktor XIII werden die Fibrinfäden schließlich durch kovalente Bindungen zu einem stabilen Netzwerk verknüpft. Da sich in diesem Netz auch rote Blutkörperchen verfangen, wird hierbei von einem „roten Thrombus“ gesprochen (Gawaz *et al.*, 2005; Nieswandt *et al.*, 2009). Erst wenn die Verwundung auf diese Weise geschlossen ist, beginnt die eigentliche Wundheilung (siehe Abb. 1.5), in deren Verlauf der gebildete Thrombus nach und nach wieder abgebaut wird.



**Abb. 1.5: Darstellung des Wundheilungsverlaufs: A) Die Inflamationsphase beginnt direkt nach der Verletzung und dauert im normalen Heilungsverlauf etwa ein bis drei Tage an. Zunächst erfolgt die Hämostase der Wunde durch einen Wundpfropf aus Fibrin. Anschließend wandern Immunzellen in das Wundbett ein, um Gewebetrümmern und eindringende Pathogene zu beseitigen. Zudem beginnen Fibroblasten und Keratinozyten einzuwandern und zu proliferieren. B) Nach etwa drei Tagen beginnt die Reepithelialisierung. Die eingewanderten Fibroblasten haben begonnen, eine neue EZM zu bilden. Die Keratinozyten im Bereich des Wundrandes proliferieren stark und migrieren auf der neuen EZM in Richtung der Wundmitte. Endothelzellen proliferieren ebenfalls und beginnen neue Blutgefäße zu bilden (Neovaskularisierung). Das so entstandene Gewebe wird auch als Granulationsgewebe bezeichnet. C) In der Reifungsphase wird schließlich die Wunde endgültig geschlossen, das Granulationsgewebe wird zu Narbengewebe umgebildet. Die EZM hat ihre normale Struktur wiedererlangt, neue Gefäße sind ausgereift und somit ist die Reepithelialisierung vollendet (Verändert nach Schäfer & Werner, 2008).**

Durch Ausschüttung von Histamin im Wundbereich kommt es im weiteren Verlauf zu einer Vasodilatation und einer gesteigerten Kapillarpermeabilität. Dies führt zu einer gesteigerten Absonderung von Blutplasma in das Interstitium, wodurch sich der  $\text{CO}_2$ -Druck erhöht und eine Hypoxie entsteht, was zu einer Azidose im Wundbereich führt. Durch den Flüssigkeitseinstrom entsteht zudem ein Ödem, in dem toxische Zerfallsprodukte verdünnt und proliferative Vorgänge gefördert werden. Durch die höhere Gefäßdurchlässigkeit wird

zudem die Leukodiapedese erleichtert (Santoro & Gaudino, 2005; Schafer & Werner, 2008). Diese Migration der Leukozyten erfolgt ebenfalls entlang eines chemotaktischen Gradienten. Neutrophile gehören zu den ersten Zellen, die in die Wunde einwandern. Sie entlassen ihre  $\alpha$ -Granula. Die enthaltenen Enzyme lysieren abgestorbenes Gewebe und bilden reaktive Sauerstoffspezies ("oxidative Burst"). Dadurch werden Pathogene abgetötet, Enzyme inaktiviert, jedoch auch körpereigene Zellen geschädigt und lysiert (Greenhalgh, 1998). Im Anschluss phagozytieren die Neutrophile entstandene Zelltrümmer und tote Bakterien. Ebenfalls aus den  $\alpha$ -Granula freigewordene Chemokine locken weitere Immunzellen in den Wundbereich. Die eingewanderten Monozyten differenzieren zu Makrophagen, diese phagozytieren entstandene Zelltrümmer, abgestorbene Granulozyten, sowie Pathogene und bewirken so eine Reinigung der Wunde (Martin & Leibovich, 2005). Sie produzieren außerdem Wachstumsfaktoren und Zytokine. Diese induzieren die Proliferation und die gerichtete Migration von weiteren an der Wundheilung beteiligter Zelltypen, wie Fibroblasten, Endothelzellen und Keratinozyten und leiten damit die weiteren Phasen der Wundheilung ein (Santoro & Gaudino, 2005).

Die zweite, zum Teil parallel verlaufende Wundheilungsphase wird auch als "Granulationsphase" bezeichnet. Die für diese Phase bedeutendsten Zellen sind Fibroblasten. Diese werden zu Beginn der Granulationsphase durch die von Makrophagen sezernierten Wachstumsfaktoren (wie FGF, TGF- $\beta$  und PDGF) aktiviert und wandern, geleitet durch den Zytokingradienten, in den Wundbereich ein. Auf ihrem Weg proliferieren sie und sezernieren eine neue EZM aus dicht miteinander vernetzten Kollagenfasern, sowie Glykoproteinen wie Fibronectin, welche nachfolgenden Zellpopulationen als Migrationsgrundlage dient (Stadelmann *et al.*, 1998; Werner & Grose, 2003). Um die dreidimensionale Struktur der EZM zu gewährleisten, stellen Ankerproteine wie Fibronectin Querverbindungen her. Im gesunden Zustand dienen diese den Zellen eines Gewebes als Verbindung zu der EZM, an die sie über in der Zellmembran befindliche Integrine binden. Müssen Zellen, wie im Falle einer Verletzung, migrieren, zeigen Integrine offenbar eine transiente Affinitätsänderung zu ihren Rezeptoren (von hoch- zu niederaffin und zurück), um den Gewebeverband an den notwendigen Stellen zu lockern und die Transmigration von den an der Wundheilung beteiligten Zellen zu gewährleisten (Mahrle *et al.*, 1994). Neben den Fibroblasten spielen in der Granulationsphase auch die Endothelzellen eine bedeutende Rolle, die von Gefäßen im Bereich des Wundrandes aus mit der Neovaskularisierung beginnen. Neben FGF ist hierbei der "Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor" (VEGF) für die Proliferation und die beginnende Organisation der Endothelzellen zu röhrenförmigen Strukturen verantwortlich. Diese bilden dann die, für diese Phase der Heilung namensgebenden, granulären Kapillarstrukturen (Stadelmann *et al.*, 1998).

In der "Differenzierungsphase" kommt es zunächst zu einer Umwandlung der Fibroblasten in Myofibroblasten. Diese kontrahieren, wodurch die Wundränder näher aneinander gelangen und so die Reepithelialisierung erleichtert wird. Keratinozyten sind im Wundheilungsprozess jene Zellen, welche letztlich zur erneuten Überhäutung des Wundbereichs führen und damit die Schutzbarriere gegen äußere Umwelteinflüsse wieder herstellen. Nachdem durch die Verwundung verursachten Wegfall der Kontaktinhibition werden die am Wundrand gelegenen Keratinozyten zur Proliferation und Migration angeregt (Witte & Barbul, 2002). Während der Epithelisation migrieren Keratinozyten chemotaktisch geleitet, vom intakten Epithelgewebe des Wundrands und von Haarwurzelscheiden ausgehend, über das neu gebildete Granulationsgewebe, in den Wundbereich ein. Dabei proliferieren die Zellen. An ihrem Bestimmungsort angekommen, differenzieren sie aus, um am Ende des Heilungsprozesses die mehrschichtige Barriere der Epidermis wieder herzustellen (Martin, 1997; Singer & Clark, 1999).

### 1.5.8 Eap im Zusammenhang mit Biofilmbildung in chronischen Wunden

Im Rahmen einer Infektion können sich auf Wirtsgewebe, oder im Wirt befindlichen Medizinalprodukten Biofilme ausbilden (James *et al.*, 2008; Scali & Kunitomo, 2013). Wie bereits beschrieben (siehe 1.3 und 1.5.2), ist die Ausbildung von Biofilmen eine bedeutende Komponente bei der Etablierung chronischer Wundinfekte (O'Gara, 2007; Percival & Cutting, 2009; Thomson, 2011; Percival *et al.*, 2012a; Percival *et al.*, 2015a; Percival *et al.*, 2015b). Eine Studie an Patienten mit chronischen, nicht-heilenden Wunden konnte verdeutlichen, dass sich in 50% der Fälle ein Biofilm ausgebildet hatte (James *et al.*, 2008). In murinen Wundmodellssystemen konnte das Verständnis im Hinblick darauf erweitert werden. So wurde die Ausbildung von Biofilmen mit einem verzögerten Wundschluss, durch Beeinträchtigung der Granulationsprozesse und einer geminderten Reepithelialisierung, in Zusammenhang gebracht (Schierle *et al.*, 2009; Gurjala *et al.*, 2011). Der initiale Schritt der Biofilmbildung ist die Adhäsion an das unterliegende Substrat, sei es eine Polymeroberfläche, oder Wirtsgewebestrukturen (Heilmann, 2011). Daraufhin erfolgt die Vermehrung und Akkumulation der Bakterien zu mehrlagigen Zellschichten. Dazu ist es nötig, dass die Bakterien zunächst interzellulär adhären. Es wird schließlich eine Glycocalyx gebildet, die in der Regel aus Exopolysacchariden (vor allem PIA), extrazellulärer DNA (eDNA) und Adhäsionsproteinen besteht (Mack *et al.*, 2004).

Auch für Eap wurden Funktionen im Zusammenhang der Biofilmbildung beschrieben (Johnson *et al.*, 2008; Thomson, 2011; Speziale *et al.*, 2014). Unter Bedingungen, bei denen für die Keime ein Mangel an bioverfügbarem Eisen herrscht (wie es *in vivo* meist der Fall ist),

scheint Eap von essentieller Bedeutung zur Etablierung von Biofilmen zu sein. Die Regulation von *eap* erfolgt unter diesen Bedingungen sowohl durch *sae*, *agr* und SarA, als auch durch das *ica*-Operon (engl. "intercellular adhesion"), welches auch für die Expression von PIA verantwortlich ist, und dem globalen Regulator Fur (engl. "Ferric uptake regulator") (Johnson *et al.*, 2008). Thompson und Kollegen kamen in ihren Untersuchungen zu dem Schluss, dass sowohl Eap, als auch sein beschriebener Rückbindungspartner auf der bakteriellen Oberfläche, die Nptase, für die Biofilmbildung in Anwesenheit von Serum notwendig sind. Sie hypothesierten, dass Eap hier an Serumproteine wie Fibronektin und Fibrinogen und über Nptase an die Bakterienoberfläche zurückbindet, was zu einer komplexen Akkumulation der Bakterien und schließlich zur Biofilmbildung beitragen kann (Thomson, 2011).

Interessanterweise ist für *S. epidermidis* beschrieben worden, dass aktivierte Thrombozyten, die an mit Plasmaproteinen bedeckte Polymeroberflächen binden, die Adhäsion und Biofilmbildung der Bakterien vermitteln können (Wang *et al.*, 1993). Für *S. aureus* ist schon länger bekannt, dass die Aggregation von Blutplättchen ein essentieller Schritt, bei der Etablierung einer infektiösen Endokarditis, also der Bildung eines Biofilms auf der Oberfläche einer Herzklappe, ist (Bayer *et al.*, 1995). Im Fall von Eap, scheint dieses in der Lage zu sein, diese Effekte durch die Aktivierung der Plättchen und das anschließende Adhärenzen an diese zu potenzieren (Herczenik *et al.*, 2007; Bertling *et al.*, 2012).

### 1.5.9 Eap als potentielles Therapeutikum

Aufgrund seiner zahlreichen immunmodulatorischen Eigenschaften kam immer wieder der Gedanke auf, dass Eap ein potentielles Therapeutikum von Autoimmunerkrankungen darstellen könnte. So postulierten Chavakis *et al.*, (Chavakis *et al.*, 2002), dass aufgereinigtes Eap als Basis zur Entwicklung therapeutisch wirksamer Peptide dienen könnte. Auf die gleiche Weise, auf die Eap die Leukodiapedese inhibiert, könnte Eap die unregulierte Adhäsion verschiedenster krankheitsassoziiierter Zellen (Leukozyten, flottierenden Tumorzellen und/oder Endothelzellen) an ICAM-1 als Bindungspartner hemmen. Von Eap abgeleitete Proteine/Peptide könnten auf ähnliche Weise wirken und so bei Erkrankungen Anwendung finden, für deren Verlauf die Interaktion von invasiven Zellen mit ICAM-1 auf Geweben von Bedeutung ist. Der Metastasierung, invasiver Tumore könnte auf diese Weise entgegengewirkt werden. Ebenso wäre es denkbar die antiinflammatorischen Eigenschaften von Eap zu nutzen, um Erkrankungen, wie Artherosklerose, Autoimmunenzephalitis und rheumatische Arthritis die durch eine Fehl-

bzw. Überstimulation des Immunsystems entstehen, abzuschwächen oder aufzuhalten (Chavakis *et al.*, 2002; Chavakis *et al.*, 2007).

Experimentell wurden das antiinflammatorische Potential erstmals von Xie und Kollegen dargestellt (Xie *et al.*, 2006). Sie zeigten, dass Eap die Entstehung der experimentellen autoimmunvermittelten Enzephalomyelits (EAE) verhindern kann (Xie *et al.*, 2006). Hierbei handelt es sich um eine der Multiplen Sklerose ähnliche, entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), bei der körpereigene T-Zellen die Myelinscheiden der Nervenzellen attackieren und zerstören. Die Einwanderung der Immunzellen in Gewebe erfordert, wie bereits beschrieben, die Interaktion der auf ihrer Oberfläche befindlichen Integrine mit dem, auf den Endothelzellen präsentierten, ICAM-1. Da Eap in der Lage ist, durch Bindung an ICAM-1 diese Interaktion und damit die Leukozytendiapedese zu inhibieren, verhindert es die Entstehung der EAE, oder kann eine bereits etablierte Entzündung zurückdrängen und die klinischen Symptome fast komplett aufheben (Xie *et al.*, 2006).

Der therapeutische Nutzen von Eap bei der EAE wurde des Weiteren von Kumar und Kollegen (Kumar *et al.*, 2015) erhärtet. So beobachteten diese Autoren in einem EAE-Modell in Ratten, dass eine während der subklinischen Phase der Erkrankung eingeleitete lokale *S. aureus*-Infektion zwar zu einer gesteigerten Proliferation der T- und B-Zellen und zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine führte, jedoch die Entwicklung der klinischen EAE vollständig unterdrückt wurde. Dieser Effekt erschien direkt Eap-abhängig zu sein (Kumar *et al.*, 2015).

Ähnliche Eap-Effekte zeigten sich auch in einem Mausmodell der Psoriasis, einer T-Zell-vermittelten, autoimmunen Entzündung der Haut. Auch hier konnte Eap durch seine Bindung an ICAM-1 die Interaktion mit dem T-Zelloberflächenrezeptor LFA-1 (engl., "lymphocyte function-associated antigen 1") unterbinden und damit die Einwanderung der T-Zellen in den entzündlichen Bereich reduzieren. Dies resultierte letztlich in der Aussetzung der Erkrankung (Wang *et al.*, 2010).

Wie bereits beschrieben konnten Stapels *et al.*, (Stapels *et al.*, 2014; Stapels *et al.*, 2016; Stapels *et al.*, 2018) zeigen, dass EAP Proteine die Wirkung von NSPs hemmen können, um die *S. aureus*-eigenen Virulenzfaktoren vor dem Verdau zu schützen. Es ist bekannt, dass NSPs eine bedeutende Rolle in einer Vielzahl von Krankheiten zukommt, die auf einer Missregulation von Entzündungsprozessen beruhen (Korkmaz *et al.*, 2010). Dazu gehören zystische Fibrose, Emphyseme, rheumatische Arthritis und chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen (Korkmaz *et al.*, 2010). Daher kamen auch Stapels und Kollegen zu dem Schluss, dass die EAPs, die Grundlage für die Entwicklung neuer Therapeutika für Autoimmunerkrankungen darstellen könnten (Stapels *et al.*, 2014). Ein bedeutender Part

vieler Autoimmunerkrankungen stellt auch eine Überaktivierung des Komplementsystems dar (Ricklin & Lambris, 2013). Daher gelangten auch auch Woehl *et al.*, (Woehl *et al.*, 2014) zu der Überzeugung, dass Eap als Inhibitor des KW und LW, der Komplementkaskade ein Ausgangspunkt zur Generierung neuer Therapeutika sein könnten. Allerdings betonten sie in diesem Zusammenhang auch, dass es unerlässlich sei, die für die Eap-Effekte verantwortlichen Bereiche des Proteins zu identifizieren. Auf dieser Grundlage könnten kleine, synthetische, therapeutisch wirksame Peptide hergestellt werden (Peptidomimetiks), welche nicht die immunogenen Eigenschaften des Gesamtproteins zeigen (Woehl *et al.*, 2014).

Eine andere mögliche Verwendung von Eap untersuchten Schneider *et al.*, die zeigen konnten, dass die Bildung von Knochenmetastasen in einem Maus-Brustkrebsmodell durch Eap gemindert wurden (Schneider *et al.*, 2007). Metastasen sind der Hauptgrund für letal verlaufende Brustkrebserkrankungen (Kamby, 1990) und in mehr als 50% entwickeln sich Knochenmetastasen (Plunkett *et al.*, 2000). Die Krebszellen wandern aus dem Brustgewebe aus und nutzen dazu die EZM des Knochens als Migrationsuntergrund. Die Interaktion wird auf der einen Seite von dem  $\alpha\beta 3$ -Integrin der Krebszelloberfläche (Felding-Habermann *et al.*, 2001; Felding-Habermann, 2003) und auf Seiten der Knochen-EZM durch Knochenmatrixproteine wie Osteopontin (OPN) vermittelt (Takayama *et al.*, 2005). OPN ist ein sezerniertes, Chemokin-ähnliches, Protein mit einer Protease-hypersensitiven Seite, die durch Thrombin, oder MMPs geschnitten werden kann. Es entsteht ein N-terminales, ca. 40 kDa schweres Fragment mit einer exponierten  $\alpha\beta 3$ -Integrin-Bindungsstelle, was die pro-adhäsiven und pro-migratorischen Eigenschaften von OPN potenziert. Eap ist in der Lage, sowohl an das Volllängenprotein, vor allem aber an das aktive 40 kDa Spaltprodukt zu binden und dadurch die Interaktion der Integrine auf den migrierenden Brustkrebszellen und ihrem OPN-Widerpart der EZM zu verhindern (Schneider *et al.*, 2007). Im Mausbrustkrebsmodell entstehen durch Eap-Behandlung deutlich weniger Knochenmetastasen. Zudem bleiben unter Eap-Gabe gebildeten Metastasen kleiner und erzeugen weniger schwere Knochenläsionen. Es ist bekannt, dass OPN in einer autokrinen und parakrinen Weise das Überleben und die Proliferation metastasierender Tumorzellen erhöhen kann und durch die Aktivierung dafür zuständiger Signalkaskaden innerhalb der Tumorzellen zusätzlich einen Apoptoseschutz vermittelt (Das *et al.*, 2004; Rangaswami *et al.*, 2006). Daher wurde spekuliert, dass Eap auch auf die der OPN- $\alpha\beta 3$ -Integrin-Interaktion nachfolgenden Ereignisse der Tumorgenese einen Einfluss zeigen könnte (Schneider *et al.*, 2007).

### 1.6 Das Blasenkarzinom als Modellsystem

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse von Schneider *et al.* (Schneider *et al.*, 2007) wurde bislang keine weiteren Tumormodelle auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Eap hin untersucht. Im Hinblick auf eine mögliche Anwendbarkeit von Eap als Therapeutikum wurde daher im Zusammenhang meiner Forschungsarbeit das Blasenkarzinom als Modellsystem gewählt. Die Blase gilt als "offenes System", die über Katheter erreichbar ist, wodurch die Gabe von Therapeutika nicht intravenös erfolgen muss. Urothelkarzinome stellen die fünfthäufigste Tumorerkrankung der westlichen Welt dar und betreffen in über 90% der Fälle auch die Blase. Noch immer versterben jährlich etwa 130.000 Menschen an dieser Tumorart (Parkin *et al.*, 2001). Eines der größten Probleme in der Behandlung dieser Krebsform ist die hohe Rückfallrate nach operativer Tumorentfernung, von näherungsweise 40% (Davies, 1992). Es wird davon ausgegangen, dass bei der Resektion abgelöste, im Lumen der Blase flottierende Tumorzellen dazu in der Lage sind, an der geschädigten Blasenwand zu re-adhären und neue Tumorherde zu generieren. Um dieser Problematik entgegen zu wirken, entspricht es der Standardtherapie, nach der Tumorresektion die Blase des Patienten mit Chemotherapeutika – wie etwa dem Proliferationshemmstoff Mitomycin C- zu spülen (Soloway, 1980; Pan *et al.*, 1989). Der Erfolg dieser Therapie schwankt jedoch, je nach Studie, von nur etwa 9% bis hin zu fast 50% (Bohle & Bock, 2004). Eine Ursache hierfür mag die stark variierende Ausbildung von Rezeptorproteinen der Familie der Integrine auf der Zelloberfläche der Tumorzellen darstellen. Treten Integrine mit ihren Bindungspartnern in Kontakt, werden Signale ausgelöst, welche die Sensivität der Tumorzellen gegenüber Mitomycin-C herabsetzt. Hohe Integrinkonzentrationen auf Tumorzellen führen daher dazu, dass Mitomycin-C weniger wirksam ist (Pan *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012). Aufgrund der hohen Rezidivraten und der variablen Wirksamkeit etablierter Chemotherapeutika (Bohle & Bock, 2004) bleibt auch in heutiger Zeit die Entwicklung neuer Strategien und innovativer Therapieformen für diese Krebserkrankung ein hochrelevantes Forschungsfeld.

### 1.7 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Wie in den vorigen Kapiteln dargestellt, ist Eap ein multifunktionales Werkzeug des klinisch bedeutenden Infektionserregers *S. aureus*. Seine Auswirkungen auf die Adhäsion und Internalisierung helfen dem Keim bei der Etablierung der Infektion, seine immunmodulatorischen Fähigkeiten tragen zu deren Erhalt bei. Eine besonders prominente Rolle scheint Eap im Zusammenhang chronischer Wunden zuzukommen (Athanasopoulos *et al.*, 2006). Die verminderte Proliferation und Migration von Immunzellen und Endothelzellen während der Heilung basiert vermutlich teilweise auf der beschriebenen Hemmung der

Ras/Raf/MEK/Erk-Signalkaskade (Sobke *et al.*, 2006). Zudem scheint Eap auch bei der Ausbildung von Biofilmen eine Rolle zu spielen (Johnson *et al.*, 2008; Thomson, 2011), die ebenfalls zu einer verminderten Wundheilung beitragen. Die vielfältigen Wirkungsweisen des Proteins machen es zu einem interessanten Forschungsobjekt, sodass in den vergangenen Jahren zahlreiche weitere, infektionsrelevante Aspekte von Eap aufgeklärt werden konnten. Mehrere Studien kamen zu dem Schluss, dass Eap ein großes Potential als Basis zur Entwicklung möglicher neuer Therapeutika zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen, oder Krebs darstellen könnte. Trotz des bereits weitgefächerten Wissens über Eap, bleiben bisher jedoch noch viele Fragestellungen unbeantwortet. Diese Arbeit befasst sich daher mit fünf Aspekten, die bisher noch unzureichend adressiert wurden.

Über die beiden Eap-Homologe EapH1 und EapH2 ist bislang noch sehr wenig in der Literatur beschrieben. In einer Kooperation mit der AG Rooijackers (Utrecht, Niederlande) sollte daher die Expression und Funktion der Homologe näher charakterisiert werden. Zunächst sollten dafür Wachstumskurven von *S. aureus* Newman T.F. in dem für die NSP Studien verwendeten Medium "Todd Hewitt Broth" (THB) bestimmt werden (Staples *et al.*, 2014). Im Anschluss sollte die wachstumsphasenabhängige Transkription von *eap*, *eapH1* und *eapH2* mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR, engl. "real-time quantitative PCR") ermittelt werden.

Was sind die genauen Auswirkungen des Proteins auf die an der Wundheilung beteiligten Zelltypen? In diesem Zusammenhang sollen die Effekte von Eap auf drei der wichtigsten Zelltypen, als "Hauptdarsteller der Wundheilung", die Keratinozyten, Endothelzellen und Fibroblasten, mittels verschiedener biochemischer und mikroskopiebasierter Assays untersucht werden. Ein besonderes Augenmerk wird auf die Proliferation und Migration der Zelltypen gelegt, die grundlegend für den erfolgreichen Verschluss einer Wunde sind.

In der Mehrzahl der vorangegangenen Studien wurden die Effekte von Eap auf Zellen mit relativ hohen Eap-Konzentrationen induziert (20-200 µg/ml). Zwar wurde bereits gezeigt, dass die Transkriptionsraten von *eap* in nativen Wunden sehr hoch sind (Joost *et al.*, 2009), jedoch wurden noch keine Expressionsstudien von Eap über die Zeit durchgeführt. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit erstmals ermittelt werden, wie hoch die Expressions- und Sekretionsraten von Eap *in vitro* sind. Dies ermöglicht Rückschlüsse darauf, ob an Infektionsstellen tatsächlich Eap Konzentrationen erreicht werden können, die für die beobachteten zellulären Effekte ausreichen.

Es wurde bereits beschrieben, dass Eap in Lösung eine langgestreckte Struktur aufweist und mehrere exponierte Bindungsstellen präsentiert, welche die Interaktion mit einer großen Bandbreite an Liganden vermitteln. Zudem besitzt das Protein eine stark kationische Ladung in neutralen Lösungen. Es ist daher möglich, dass Eap auch dazu in der Lage ist, mit negativ geladenen Molekülen wie DNA zu interagieren. Dies könnte einen Einfluss auf die Ausbildung von Biofilmen, deren Matrix zu einem wesentlichen Anteil aus eDNA besteht, zeigen. Weiterhin könnte es bei der Defensive gegen die NETs der Neutrophilen eine Rolle spielen. Mittels molekularbiologischer und rasterkraftmikroskopischer Untersuchungen sollen mögliche Interaktionen von Eap mit DNA untersucht und charakterisiert werden.

In Anlehnung an die Arbeit von Schneider und Kollegen (Schneider *et al.*, 2007) und aufgrund seiner auch im Rahmen dieser Arbeit festgestellten proliferationshemmenden Eigenschaften sollen die Fähigkeiten von Eap, als anti-kanzerogene Substanz zu wirken, weiter untersucht werden. Mittels Zellkultur-basierter, biochemischer und mikroskopiebasierter Assays sollen hier die Auswirkungen von Eap auf die nichtinvasiven Blasenkrebszelllinien RT-112 und 5637 im 2D- und an Sphäroiden als einfachem 3D-Modell untersucht werden.

## 2. Material

### 2.1 Verwendete Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien

#### 2.1.1 Bakterienstämme

Die während dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Der Stamm Newman *nuc1nuc2Δeap* wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Phagentransduktion in den Stamm M0746N1 (Kaito *et al.*, 2011) generiert.

Tab. 2.1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz/ Quelle
<b>Newman T.F.</b>	Wildtyp, Laborstamm (ATCC 25904) Koagulase+, Hochdosisproduzent von Eap	(Duthie, 1952)
<b>AH12</b>	$\Delta eap$ Derivat von <i>S. aureus</i> Newman	(Hussain <i>et al.</i> , 2002)
<b>USA 300 Isolat 923</b>	Wildtyp, CA-MRSA, Koagulase+	(Montgomery <i>et al.</i> , 2008)
<b>HOM319</b>	$\Delta eap$ Derivat von <i>S. aureus</i> 923	(Eisenbeis <i>et al.</i> , 2017)
<b>M0746N1</b>	<i>nuc1nuc2</i> Derivat von <i>S. aureus</i> Newman	(Kaito <i>et al.</i> , 2011)
<b>Newman <i>nuc1nuc2Δeap</i></b>	<i>nuc1nuc2Δeap</i> Derivat von <i>S. aureus</i> Newman im Rahmen dieser Arbeit durch Phagentransduktion in M0746N1 generiert	diese Arbeit

#### 2.1.2 Eukaryotische Zelllinien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zelllinien sind in Tab. 2.2 aufgeführt und beschrieben.

Die spontan immortalisierte, humane Keratinozyten-Zelllinie HaCaT (Boukamp *et al.*, 1988) wurde vom deutschen Krebsforschungszentrum (Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Die humane Endothelzelllinie EA.hy926 und die humane Fibroblastenzelllinie BJ wurden von ATCC® bezogen.

Die Harnblasenkarzinomzelllinien RT-112 und 5637 wurden uns von der Forschungsabteilung der Klinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums Homburg zur Verfügung gestellt und wurden in (Baumgart *et al.*, 2017) näher beschrieben.

**Tab. 2.2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete eukaryotische Zelllinien**

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
BJ (ATCC® CRL2522™)	Menschliche Fibroblastenzelllinie aus der Vorhaut eines Neugeborenen; für BJ ist eine längere Lebenszeit beschrieben, verglichen mit anderen Fibroblastenlinien	(Bodnar <i>et al.</i> , 1998)
EA.hy926 (ATCC® CRL2922™)	Endotheliale humane Zellen, immortalisiert durch die Fusion von primären humanen Nabelschnurzellen mit Zellen der humanen Karzinom-Zelllinie A549/8	(Edgell <i>et al.</i> , 1983)
HaCaT	Spontan immortalisierte, humane, epidermale Keratinozyten aus der Rückenhaut eines 62 jährigen Patienten	(Boukamp <i>et al.</i> , 1988)
RT-112 (DSMZ Nr. ACC 418)	Harnblasenkarzinomzelllinie, 1973 aus einem mäßig differenzierten, unbehandelten TCC* einer Patientin unbekanntes Alters isoliert. Das Wachstum ist wenig invasiv, die Zellen besitzen eine epitheliale Morphologie	(Baumgart <i>et al.</i> , 2017)
5637 (DSMZ Nr. ACC 35)	Harnblasenkarzinomzelllinie, 1974 aus einem mäßig differenzierten TCC* (G2) eines 68-jährigen Patienten isoliert. Das Wachstum ist wenig invasiv, die Zellen besitzen eine epitheliale Morphologie.	(Baumgart <i>et al.</i> , 2017)

\* TCC, engl. „Transitional cell carcinoma“

## 2.2 Nährmedien und Kulturzusätze

### 2.2.1 Nährmedien zur Anzucht von Bakterien

#### Flüssigmedien

Die Medien wurden als Fertigmischung von den Herstellern bezogen, nach Herstellerangaben mit MilliQ-H<sub>2</sub>O angesetzt und bei 120°C autoklaviert.

**Tab 2.3: Verwendete Flüssignährmedien für bakterielle Kulturen**

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
Lennox Broth (LB)	20 g auf 1 l MilliQ-H <sub>2</sub> O, pH 7,0 einstellen	Difco®, BD, Heidelberg
Todd Hewitt Broth (THB)	37 g auf 1 l MilliQ-H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich®, Steinheim
Trypticase Soy Broth (TSB)	30 g auf 1 l MilliQ-H <sub>2</sub> O	Bacto®, BD, Heidelberg

#### Festmedien

Zur Anzucht von Bakterien auf Festmedium wurde 5% Schafsblut in Trypticase Soy Agar II (TSA) verwendet, der direkt gebrauchsfertig vom Hersteller (Becton Dickinson, Heidelberg) bezogen wurden.

Zum Nachweis der Expression von DNase wurde BD DNase Test Agar verwendet (Becton Dickinson, Heidelberg).

### 2.2.2 Flüssigmedien zur Anzucht eukaryotischer Zelllinien

Die Medien zur Anzucht eukaryotischer Zelllinien wurden als Basismedien gebrauchsfertig von den Herstellern bezogen (siehe Tab. 2.4) und mit 10% FKS (Fötales Kälberserum Gold PAA, Cölbel) supplementiert. Das Basalmedium MCDB135 zur Anzucht von Keratinozyten (HaCaT) wurde zusätzlich mit 1% NEAA (Nicht essentielle Aminosäuren, Gibco® Invitrogen, Darmstadt) versetzt.

**Tab. 2.4: Verwendete Nährmedien für die Kultivierung eukaryotischer Zelllinien**

Medium	Verwendung in dieser Arbeit	Hersteller
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Anzucht von EA.hy926	Gibco®, Invitrogen, Darmstadt

MEM (Modified Essential Medium)	Anzucht von BJ	Gibco®, Invitrogen, Darmstadt
MDCB153 Basal Medium	Anzucht von HaCaT	Biochrom AG, Berlin
RPMI1640	Anzucht von RT-112 und 5637	Gibco®, Invitrogen, Darmstadt

### 2.2.3 Zusätze für Zellkultur-basierte Assays

Tab. 2.5: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Zusätze für Assays mit eukaryotischen Zellen

Zusatz	Hersteller
Aphidicolin	Calbiochem, Darmstadt
EGF (epidermal growth factor)	Peptotech GmbH, Hamburg
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	Sigma-Aldrich®, Steinheim
Staurosporin (Stock: 0,214 mM in DMSO)	Sigma-Aldrich®, Steinheim

### 2.3 Puffer und Lösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen sind in den folgenden Tabellen aufgelistet. MilliQ-H<sub>2</sub>O bezeichnet hier das zum Ansetzen der Lösungen verwendete MilliQ-Wasser, aus der Filteranlage. Sofern die Lösung selbst angesetzt wurde, ist das Rezept angegeben, bei gebrauchsfertigen Lösungen der Hersteller. Die verwendeten selbstangestellten Lösungen wurden vor der Verwendung gegebenenfalls autoklaviert. Die meisten Lösungen wurden bei Raumtemperatur gelagert, andere Lagerbedingungen sind angegeben.

Tab. 2.6: Verwendeter Puffer zum Waschen von pro- und eukaryotischen Zellen

Puffer	Zusammensetzung	Menge
PBS (Phosphat gepufferte Saline)	NaCl	80 g
	KCl	2 g
10x Stocklösung	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	14,2 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,7 g
	ad 1 l MilliQ-H <sub>2</sub> O, pH 7,3, autoklavieren	

1x Arbeitslösung	Stocklösung 1:10 in MilliQ-H <sub>2</sub> O verdünnen, pH 7,3 einstellen, autoklavieren	
------------------	---	--

Tab. 2.7: Verwendete Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese

Lösung/Puffer	Zusammensetzung	Menge/Hersteller
Größenstandard 1kb	25 µl GeneRuler 1 kb DNA Ladder (-20 C) 183,25 µl MilliQ-H <sub>2</sub> O 41,75 µl 6 x LD mit Sybr Gold 4°C	ThermoFisher Scientific, Karlsruhe
6x Ladebuffer	1 ml DNA Gel Loading Dye (6 x, -20°C) 10 µl 100 x Sybr Gold 4°C	ThermoFisher Scientific, Karlsruhe
100x Sybr Gold	99 µl DMSO 1 µl SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (10.000 x konzentriert in DMSO, -20°C) 4°C	ThermoFisher Scientific, Karlsruhe
TBE-Puffer 10x Stocklösung  0,5x Arbeitslösung	Tris H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> EDTA Ad 1 l MilliQ-H <sub>2</sub> O, pH 8,0 einstellen Stocklösung 1:20 in MilliQ-H <sub>2</sub> O verdünnen	103 g 55 g 9,3 g

Tab. 2.8: Verwendete Puffer und Lösungen für SDS-Gelelektrophorese

Lösung/Puffer	Zusammensetzung	Menge/Hersteller
APS	10% Ammoniumpersulfat in MilliQ-H <sub>2</sub> O, -20°C	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Größenstandard	10-180 kDa Standard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder), -20°C	Fermentas

Coomassie-Färbelösung	MilliQ-H <sub>2</sub> O Coomassie Serva Blue R Ethanol abs. (vergällt) 99,5% Essigsäure Über Faltenfilter filtrieren	225 ml 1 g 225 ml 50 ml
Entfärber-Lösung für Coomassie	Ethanol abs. (vergällt) 99,5% Essigsäure ad 1 l MilliQ-H <sub>2</sub> O	200 ml 100 ml
Isopropanol		VWR, Darmstadt
4x Ladepuffer	1 M Tris/HCl pH 6,8 87% Glyzin Bromphenolblau-Natriumsalz SDS (Natriumdodecylsulfat) 1 M DTT (Dithiothreitol) ad 10 ml MilliQ-H <sub>2</sub> O	5 ml 4 ml 10 mg 0,5 g 400 µl
Lösung A	30% Acrylamid; 0,8% Bisacrylamid, 4°C	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Lösung B	Tris/HCl SDS ad 500 ml MilliQ-H <sub>2</sub> O, pH 8,8 einstellen	118,2 g 2 g
Lösung C	Tris/HCl SDS ad 500 ml MilliQ-H <sub>2</sub> O, pH 8,8 einstellen	39,4 g 2 g
SDS-Laufpuffer 5x Stocklösung  1x Arbeitslösung	Glyzin SDS Tris-Base ad 1 l MilliQ-H <sub>2</sub> O Stocklösung 1:5 in MilliQ-H <sub>2</sub> O verdünnen	14,4 g 1 g 3 g
TEMED	0,1% N,N,N',N'-Tetramethyldiamin, 4°C	Sigma-Aldrich®, Steinheim

Tab. 2.9: Verwendete Puffer, Lösungen und Antikörperseren für Western Blots

Lösung/Puffer/Seren	Zusammensetzung	Menge/Hersteller
Blockpuffer	3% Magermilchpulver (w/v) in TBS/T	3 g 100 ml TBS/T
Blotpuffer für Western Blots	Tris-Base Glyzin Methanol ad 2 l MilliQ-H <sub>2</sub> O	4,85 g 22,5 g 400 ml
ECL™ Western Blotting Reagent		GE Healthcare, Frankfurt
Primärer Antikörper: α-Eap Polyklonal aus Kaninchen	1:2000 verd. in Blockpuffer	Schubert, Gießen
Sekundärer Antikörper: Ziege-α-Kaninchen-HRP	Meerrettichperoxidase(HRP)-gekoppelt 1:3000 verd. in Blockpuffer	Bio-Rad, München
10x TBS-Puffer	Tris NaCl KCl ad 1 l MilliQ-H <sub>2</sub> O, pH 7,4 einstellen	30 g 80 g 2 g
TBS/T	TBS-Puffer 1:10 in MilliQ-H <sub>2</sub> O verdünnen, 0,1% Tween20	1 l 1x TBS 1 ml Tween20

Tab. 2.10: Verwendete Lösungen für MTT-Assays

Lösung	Zusammensetzung	Menge
MTT-Lösung	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) 1x PBS	100 mg 40 ml
Lyselösung	Natriumdodecylsulfat-Lsg. (SDS) 30% in MilliQ-H <sub>2</sub> O Dimethylformamid (DMF) Essigsäure 100% pH 4,7 einstellen, im Dunkeln aufbewahren	100ml 50 ml 2,6 ml

Tab. 2.11 Verwendete Medien, Puffer und Lösungen für die native Aufreinigung von Eap aus *S.aureus* Stamm Newman

Medium/Lösung/Puffer	Zusammensetzung	Menge
10 mM EDTA-Lösung	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) ad 1 l MilliQ-H <sub>2</sub> O	3,72 g
1 M LiCl-Lösung	LiCl ad 2 l MilliQ-H <sub>2</sub> O, pH 5,4 - 5,6 einstellen, autoklavieren	42,39 g
MBB-Medium	Pepton Hefeextrakt NaCl K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ad 2 l MilliQ-H <sub>2</sub> O, pH 7,0 einstellen, autoklavieren	20 g 10 g 10 g 2 g
2% NaHCO <sub>3</sub>	NaHCO <sub>3</sub> ad 800 ml MilliQ-H <sub>2</sub> O	16 g
Puffer A	Trizma Tris/HCl NaCl ad 1 l MilliQ-H <sub>2</sub> O, pH 8,2	3,32 g 3,4 g 17,53 g
Puffer B	Trizma Tris/HCl NaCl ad 1 l MilliQ-H <sub>2</sub> O, pH 8,2	3,32 g 3,4 g 58,44 g

Tab. 2.12: Verwendete Medien, Puffer und Lösungen für die Phagentransduktion der Deletion von *eap* in den Stamm M0746N1

Medium/Lösung/Puffer	Zusammensetzung	Menge/Hersteller
1 M CaCl <sub>2</sub> -Lösung	CaCl <sub>2</sub> ad 100 ml MilliQ-H <sub>2</sub> O, autoklavieren	11,1 g
5 mM CaCl <sub>2</sub> -Lösung	1 M CaCl <sub>2</sub> -Lsg. 1:200 in MilliQ-H <sub>2</sub> O, autoklavieren	
Erythromycin-Stammlsg.	10 mg/ml (100% EtOH), -20°C 1:500 eingesetzt (20 µg/ml)	Fluka, Buchs, Schweiz
LB-Softy	LB-L Agar	6 g

	Ad 1l dH <sub>2</sub> O, autoklavieren	
Phagenpuffer	LB-L 1 M CaCl <sub>2</sub>	100 ml 0,5 ml

## 2.4 Oligonukleotide (Primer)

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tab. 2.13 aufgeführt. Die MBH-Primer wurden vom Hersteller Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg) bezogen.

Die Lifeact Primer dienen der Ligation der DNA Sequenz des Lifeact Peptids in eine modifizierte Variante des pmaxGFP®-Plasmids (Lonza) (Martin *et al.*, 2005). Uns wurde das gebrauchsfertige Plasmid von dem Institut für Biophysik AG Hoth, Homburg zur Verfügung gestellt.

Die Primer MBH492/493 wurden in der Polymerase Kettenreaktion (PCR) eingesetzt, um das in den Eap-DNA-Assays verwendete 1,4 kb-Fragment zu amplifizieren (siehe 3.5.3). In den quantitativen Real-Time PCRs (qPCRs) wurden die Primer RT-HOM 101/102 verwendet um die *eap*-Transkription nachzuweisen. Die Primerpaare RT-HOM 55/56 und RT-HOM 57/58 dienen dem Transkriptionsnachweis der *eap*-Homologe *eapH1* und *eapH2* und RT-HOM 33/34 dient dem Nachweis der Transkription des Haushaltsgens *gyrB* (siehe 3.7.2). Die Primer wurden zunächst nach Herstellerangaben mit H<sub>2</sub>O LiChrosolv® (Merck, Darmstadt) auf eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt und bei -20°C gelagert.

(+) und (-) bezeichnen, ob es sich um einen „forward“, oder „reverse“ Primer handelt.

**Tab. 2.13: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotid-Primer**

Primer	Sequenz
MBH492 (+)	5'-CCTGAACAACCTGATGAGCC-3'
MBH493 (-)	5'-ACCCTATTTTTTCGCCAAGCC-3'
RT-HOM 33 (+)	5'-GACTGATGCCGATGTGGA-3'
RT-HOM 34 (-)	5'-AACGGTGGCTGTGCAATA-3'
RT-HOM 55 (+)	5'-CTAAAGAAAAATGACGACGCTAAAAA-3'
RT-HOM 56 (-)	5'-TGTTTGATTGTACTIONGGATCAATTGA-3'
RT-HOM 57 (+)	5'-CAACGACTGGCGCTACTGTG-3'
RT-HOM 58 (-)	5'-CCTTTTCTGCTGCAGATACCTCAT-3'

RT-HOM 101 (+)	5'-AAGCGTCTGCCGCAGCTA-3'
RT-HOM 102 (-)	5'-TGCATATGGAACATGGACTTTAGAA-3'
Lifect (+)	5'-CGCCACCATGGGCGTGGCCGACCTGATCAAGAAG- TTCGAGAGCATCAGCAAGGAGGAG-3'
Lifect (-)	5'-CTCCTCCTTGCTGATGCTCTC- GAACTTCTTGATCAGGTCGGCCACGCCCATGGTGGCG-3'

## 2.5 DNA-Quellen

Die für die Eap-DNA-Bindungsversuche verwendeten DNA-Varianten, wie das Plasmid pBR322 (N3033L),  $\lambda$ -Phagen-DANN und gescherte Heringsperma-DNA wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

## 2.6 AFM-Verbrauchsmaterial

Die für die AFM Messungen an Zellen verwendeten Cantilever wurden von der Firma Bruker (Santa Barbara, USA) bezogen, die Zellkulturschalen mit Glasboden (FluoroDish™) von World Precision Instruments, Inc. (Sarasota, USA). Die Cantilever für das FluidFM wurden von Cytosurge AG (Glattbrugg, Schweiz) bezogen. Die für das "DNA-Combing" verwendeten Silizium-Plättchen wurden von Siltronic AG (Burghausen) bezogen.

## 2.7 Enzyme

Tab 2.14: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>Bam</i> HI FastDigest *	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
DNase I	Quiagen, Hilden
<i>Eco</i> RI FastDigest *	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Proteinase K	Quiagen, Hilden
<i>Pst</i> I FastDigest *	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
RNaseOUT®	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Taq DNA-Polymerase	MP Biomedicals, Eschwege
Tryp-LE® Express	Invitrogen, Darmstadt

\* FastDigest Buffer (10x)

## 2.8 Reaktionssysteme (Kits)

Tab 2.15: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Kits

Reaktionssystem	Hersteller
AlphaLISA® SureFire® Ultra™ HV p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) Assay	PerkinElmer, Rodgau Jügesheim
Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit V	Lonza, Basel, Schweiz
Aptotic/Necrotic Cells Detection Kit	PromoKine, PromoCell GmbH, Heidelberg
BCA™-Proteindetektionskit	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche, Mannheim
Culture-Inserts 2 Well for self-insertion	ibidi GmbH, Planegg
DNase detection kit	Jena Biosciences, Jena
ECL™ Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Frankfurt
E-Plate 96	ACEA Biosciences Inc., San Diego, USA
FastStart High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Limulus Amoebocyte Lysate QCL-1000™	Lonza, Basel, Schweiz
Maxwell®16 Buccal Swab DNA Purification Kit	Promega, Madison, USA
Mycoplasmen-PCR-Detektions Kit Venor® GeM	Minerva Biolabs, Berlin
MycoAlert Assay Control Set	Lonza, Basel, Schweiz
NucleoSpin® RNA II Mini Kit	Machery-Nagel, Düren
Oris™ Assembly Kits for Cell Migration Assay	Platypus Technologies, Madison, USA
Power SYBR® Green Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
QiaQuick® PCR Purification Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Turbo-DNA free™	Ambion, Woodward Austin, USA

## 2.9 Laborgeräte

Tab 2.16: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller
ABI PRISM 7000	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Absaugstation	Laboport Knf, Freiburg
Bioscope Catalyst AFM	Bruker, Santa Barbara, USA
Canto II Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
CellCounterTC20	Bio-Rad, München
Cell Observer	Zeiss, Wetzlar
Colony Counter acoLyte	Synbiosis, Cambridge, UK
DFC420 CCD Kamera	Leica, Wetzlar
DMI4000B Fluoreszenzmikroskop	Leica, Wetzlar
Elektrophorese-Kammer für Agarosegele	von Keutz Labortechnik, Reiskirchen
Elektrophorese-Kammer für SDS-Page	von Keutz Labortechnik, Reiskirchen
Ensign™ Multimode Plate Reader	Perkin Elmer, Rodgau Jügesheim
Elektrophoresis Power supply	Bio-Rad, München
Eppendorf Research Fix® Pipettensatz	Eppendorf, Hamburg
FastPrep-24™ 5G Ribolyser	MP Biomedicals, Eschwege
Filter 38HE	Zeiss, Wetzlar
Flex-Fluidics AFM	Nanosurf GmbH, Langen
Fluar 20x/0.75 Objektiv	Zeiss, Wetzlar
FluidFM technology	Cytosurge AG, Glattbrugg, Schweiz
FPLC Flüssigchromatographie BioLogic DuoFlow	Bio-Rad, München
GeneAmp PCR 9700 Thermocycler	Applied Biosystems, Darmstadt
GeneQuant pro 1300 Spectrophotometer	Biochrom, Berlin
GFL 1004 Wasserbad	GFL, Burgwedel
Hera Safe II Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
HeraCell150i Inkubator (Bakterien)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Heraeus B5042E (Inkubator eukaryotische Zellen)	Willi Fischer KG Laboratoriumsbedarf, Frankfurt
Labsonic 1510 Ultraschallsonde	B.Braun Melsung AG, Melsung
Magnetrührer	IKA, Staufen
Maxwell® MDx 16	Promega, Madison, USA

Mettler AE100 Feinwaage	Mettler, Gießen
MilliQ™ Synthesis A10	Millipore, Billerica, USA
MM-92B xyz-Achsen Manipulator	Narashige Gruppe, Tokyo, Japan
Molecular Imager ChemiDoc XRS System	Bio-Rad, München
Mono S™ 5/50 GL	GE Healthcare, Frankfurt
Multitron Schüttelinkubator	Infors, Bottmingen, Schweiz
Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Nukleofector™ Device II	Lonza, Basel, Schweiz
PHM220 pH-Meter	Radiometer Meterlab, Meckenheim
PIPETBOY acu 2	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
xCELLigence real-time cell analyzer system	ACEA Biosciences Inc., San Diego, USA
Thermoblock comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Darmstadt
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfercell	Bio-Rad, München
Standard Analog Shaker	VWR International, Radnor, USA
Stuart Rotator SB3	Bibby Scientific Ltd, Staffordshire, UK
SUNRISEplate reader	TECAN, Crailsheim
TECAN infinite M200 Platerader	TECAN, Crailsheim
Transferpette™ S	Brand Laborbedarf GmbH + CO KG, Wertheim
Varioklav (Autoklav)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Vortexmixer VV3	VWR, Darmstadt
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Sigma 4K15	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode

## 2.10 Software

Tab. 2.17: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Softwareprogramme

Software	Hersteller/Quelle
ABI PRISM® 7000 SDS 1.2.3	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
AxioVision Software V 4.8.3	Zeiss, Wetzlar
CellQuest Pro®	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSDIVA™ Software V6.1.3	Becton Dickinson, Heidelberg

GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Gwyddion Software V 2.36	Open source: <a href="http://www.gwyddion.net">www.gwyddion.net</a>
ImageJ V 1.49	Open source: <a href="https://imagej.net/Downloads">https://imagej.net/Downloads</a>
ImageLab V 4.0.1	Bio-Rad, München
Kaleido V 2.0	Perkin Elmer, Rodgau Jügesheim
Magellan V 5.03	TECAN, Crailsheim
Nanodrop 2000 operation software V 1.6	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Nanoscope Analysis V 1.4	Bruker (Santa Barbara, USA)
Office® 2010/2011	Microsoft, Redmond, USA
RTCA V 2.0	ACEA Biosciences Inc., San Diego, USA
SPIP Software	Image Metrology, Hørsholm, Dänemark

### 2.11 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle übrigen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammten von den folgenden Herstellern: Applichem (Darmstadt), BioRad (München), Carl-Roth GmbH (Karlsruhe), Eppendorf (Hamburg), Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz), MAST Diagnostica (Reinfeld), MBI Fermentas (Vilnius, Litauen), Merck KG (Darmstadt), Merck Millipore (Billerica, USA), Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen), Serva Feinbiochemie GmbH & Co (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Steinheim).

Die verwendeten Einweg-Kunststoffwaren wurden von den folgenden Herstellern bezogen: Greiner (Frickenhäuser), Eppendorf (Hamburg), MP Biomedicals (Eschwege), Nalge Nunc International (Rochester, USA), Sarstedt, (Nümbrecht), Sigma-Aldrich, (Steinheim) oder TTP-AG (Trasadingen, Schweiz).

Die Glaswaren stammten von VWR Internanional GmbH (Darmstadt) und Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt).

### 3. Methoden

#### 3.1 Grundlegenden zellbiologische Methoden

##### 3.1.1 Kultur von Bakterien

Zur Kultivierung auf Festmedien wurde *S. aureus* aus Kryokulturen, mittels Drei-Ösen-Ausstrich, mit einer sterilen Einmalimpföse auf Blutplatten (TSA mit 5% Schafsblut, BD Heidelberg) ausgestrichen und über Nacht (üN) bei 37°C in einem Hereaus B5042E Inkubator (Willi Fischer KG, Frankfurt) bebrütet. Die Lagerung der Platten erfolgte in der Zwischenzeit bei 4°C im Kühlschrank. Die Anzucht in Flüssigmedium erfolgte üblicherweise in TSB Medium bei 37°C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 150 rpm. Es wurde hierfür abends eine Einzelkolonie, mittels einer sterilen Einmalimpföse gepickt und in das Medium eingerührt. Für Übernachtkulturen im Rahmen von Standardexperimenten wurden üblicherweise 10 ml Medium in einem 100 ml Glaskolben, oder 3 ml in einem Reagenzglas beimpft. Um eine Vorkultur zu generieren wurde eine Übernachtkultur angesetzt und daraus die Vorkultur mit einer optischen Dichte bei 600 nm ( $A_{600}$ ) von 0,05 beimpft (GeneQuant pro 1300 Spectrophotometer, Biochrom, Berlin). Hauptkulturen wurden ebenfalls auf eine definierte optische Dichte eingestellt aus einer Vorkultur, oder direkt aus der Übernachtkultur, angesetzt. Diese variiert jedoch Versuchsabhängig und wird unter den einzelnen Versuchsdurchführungen beschrieben.

##### 3.1.1.1 Kryokonservierung von *S. aureus*

Zur dauerhaften Lagerung von *S. aureus* wurden Kryokulturen hergestellt. Dazu wurden Übernachtkulturen (siehe 3.1.1) angesetzt und am Folgetag 1,5 ml dieser Kultur mit 500 µl Kryokonservierungsmedium (60% Glycerin, 40% LB) in einem 2 ml Reaktionsgefäß vermischt, intensiv gevortext und in ein Nunc® Cryo Tube (Nalge Nunc International, Rochester, USA) überführt. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

##### 3.1.1.2 Bestimmung von optischen Dichten (ODs)

Um die optische Dichte von bakteriellen Kulturen zu ermitteln, wurde in Küvetten mit 1 ml Volumen eine 1:50 Verdünnung für Übernachtkulturen und 1:10, oder 1:20 Verdünnungen für Hauptkulturen im verwendeten Kulturmedium erstellt und gegen das Medium als Nullwert im Photometer (GeneQuant pro 1300 Spectrophotometer, Biochrom, Berlin) bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $A_{600}$ ) gemessen.

### 3.1.1.3 Bestimmung von Kolonie bildenden Einheiten (KbE)

Die KbE wurden ermittelt, indem von den Bakteriensuspensionen Verdünnungsreihen in 1x PBS erzeugt wurden. Zuvor wurde die Bakteriensuspension bei 50 W für 15 s sonifiziert (Labsonic 1510 Ultraschallsonde, B. Braun Melsung AG, Melsung), um etwaige bakterielle Aggregate aufzulösen und Bakterien zu vereinzeln. Anschließend wurden 100 µl der Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  bis  $10^{-6}$  auf Blutagarplatten (TSA mit 5% Schafsblut, BD Heidelberg), ausplattiert und die gewachsenen Kolonien am nächsten Tag maschinell ausgezählt (Colony Counter acoLyte, Synbiosis, Cambridge, UK). Die KbE konnten so unter Einbeziehung der Verdünnungsfaktoren ermittelt werden.

### 3.1.1.4 Wachstumskurve

In der AG des IMMH werden für die Anzucht von *S. aureus* normalerweise die Wachstumsmedien Trypticase Soy Broth (TSB), oder Lennox Broth (Lennox) verwendet. Da die Studien zu der Transkription der eap-Homolge eapH1 und eapH2, im Vergleich zu eap, jedoch im Rahmen einer Kooperation mit der AG Rooijackers (Utrecht, Niederlande) durchgeführt wurden, wurde dafür das dort verwendete Medium Todd Hewitt Broth (THB) verwendet.

Um das Wachstumsverhalten von *S. aureus* Newman T.F. in Todd Hewitt Broth (THB) zu charakterisieren, wurden Wachstumskurven über den Verlauf von 12 h bestimmt. Hierzu wurde zunächst eine Übernachtskultur hergestellt (3 ml THB, 37°C, 150 rpm). Am Folgetag wurde eine Hauptkultur generiert, mit einer Startkonzentration von  $A_{600} = 0,05$  (25 ml THB, 37°C, 150 rpm). Die Bestimmung der  $A_{600}$  erfolgte stündlich mit steigenden Verdünnungen in 1x PBS (1-3 h 1:10, 4-7 h 1:20, 8-12 h 1:50). Als Referenz der Messung diente 1x PBS mit THB (1:10, 1:20, 1:50). Die Bestimmung der Wachstumskurven erfolgte auf diese Weise aus sieben unabhängigen Kulturen. Parallel wurden nach 3, 5, 8 und 12 h Proben aus der Kultur entnommen und für eine nachfolgende qPCR aufbereitet (siehe 3.7.2). Die gemessenen  $A_{600}$  wurden gemittelt und in Excel gegen die Zeit aufgetragen.

### 3.1.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

#### 3.1.2.1 Subkultivierung (Splitten)

Die Kultivierung aller verwendeten Zelllinien erfolgte in Kulturschalen mit 95 mm Durchmesser (TPP-AG, Trasadingen, Schweiz). Das Splitten der Zellen erfolgte regelmäßig

bei Erreichen von konfluenter, bzw. subkonfluenter Bewachsung des Schalenbodens (80-90% Konfluenz). Nach dem Absaugen des Zellkulturmediums wurden die Zellen zunächst mit 5 ml 1x PBS je Schale gespült, um tote Zellen und Medienrückstände zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit 1 ml, auf 37°C vorgewärmter Trypsin-Lösung (Tryp-LE® Express, Invitrogen, Darmstadt) je Schale bedeckt und für ca. 15 min im Brutschrank inkubiert. Das Verdauungsenzym Trypsin baut hierbei die extrazellulären Proteine ab, welche die Zellen am Schalenboden und unter einander verankern und ermöglicht so das Ablösen und eine Vereinzelnung der Zellen. Leichtes Klopfen an den Schalenrand erleichterte abschließend das vollständige Ablösen der Zellen. Die Verdaureaktion des Tryp-LE® wurde durch Zugabe von Vollmedium abgestoppt. Je nach Zelllinie wurden anhand von Erfahrungswerten von dieser Zellsuspension Verdünnungen von 1:5 und 1:20 mit vorgewärmten, frischem Vollmedium hergestellt und 10 ml dieser Gemische in neue Schalen ausgesät. Die Zellen wurden im HeraCell150i Inkubator (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe) bei 37°C und 5% CO<sup>2</sup> kultiviert. Wurden die Zellen für einen nachfolgenden Versuch gesplittet, so wurde mittels Trypanblaufärbung zunächst die Zellzahl bestimmt und dann eine definierte Zellzahl eingestellt.

#### 3.1.2.2 Trypanblaufärbung und Einstellung definierter Zellzahlen

Die Zellen wurden wie oben geschrieben gesplittet und nach dem Abstoppen des Tryp-LE®-Verdaus, mit Vollmedium, wurde die Zellsuspension in ein steriles 50 ml Falcon überführt. Je 10 µl dieser Zellsuspension wurde in einem frischen 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 10 µl Trypanblau (BioRad, München) durch mehrmaliges Pipettieren vermischt und davon 10 µl mit Hilfe des Zellzählgeräts (CellCounter TC20 BioRad, München) in Bezug auf die Lebendzellzahl und die Viabilität untersucht. Die Grundlage dieser Bestimmung basiert auf dem Umstand, dass Trypanblau die Zellmembranen gesunder Zellen nicht durchdringen kann, während die Membranen geschädigter bzw. toter Zellen durchlässig für den Farbstoff werden. Dieser reichert sich daraufhin im Zellplasma an und lässt die Zellen blau erscheinen. Die Messung wurde stets als Doppelbestimmung durchgeführt. Eine Zellkultur wurde als vital gewertet wenn die Viabilität über 90% lag, bei geringeren Werten wurde die Kultur nicht für Versuche genutzt.

Zur Einstellung definierter Zellzahlen wurde die Zelldichte der vorliegenden Zellsuspension bestimmt und dann errechnet, wieviel Suspension für den Erhalt der gewünschten Zellzahl benötigt wurde. Diese Menge wurde für 5 min bei 1400 x g und RT abzentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg), um die Zellen zu sedimentieren. Das erhaltene Zellpellet wurde im ermittelten Volumen Zellkulturmedium aufgenommen. Dieser

Zwischenschritt diente hauptsächlich der Entfernung des zum Vereinzeln der Zellen verwendeten Trypsins.

### 3.1.2.3 Kryokonservierung eukaryotischer Zelllinien

Zur dauerhaften Konservierung der verwendeten Zelllinien wurden Kryokulturen in flüssigem Stickstoff angelegt. Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben gesplittet, die Zellzahl ermittelt, auf  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt und in vorgekühltem Einfriermedium aufgenommen (Vollmedium mit 30% FKS und 10% DMSO). Die Suspension wurde dann je 1 ml in ebenfalls vorgekühlte Kryoreaktionsgefäße (Cryotubes, Nalge Nunc International, Rochester, USA) überführt, in Styroporständer mit Deckel verpackt und in der  $-70^\circ\text{C}$ -Kühltruhe über Nacht eingefroren. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO, sowie die im Styropor erfolgende, langsame Abkühlung sollten, während des Einfriervorgangs, die Bildung von Eiskristallen und die damit verbundene Zerstörung der Zellen verhindern. Am Folgetag wurden die Tubes in den Flüssigstickstofftank zur dauerhaften Aufbewahrung überführt.

### 3.1.2.4 Inkulturnahme kryokonservierter Zellen

Um eingefrorene Zellen erneut in Kultur zu nehmen, wurden zunächst drei Kulturschalen mit dem entsprechenden Kulturmedium (Vollmedium) befüllt (10 ml je Schale) und im Brutschrank auf  $37^\circ\text{C}$  vorgewärmt. Dann wurde das Kryoreaktionsgefäß dem Stickstofftank entnommen und die Zellsuspension im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut.

Die Zellsuspension wurde dann, zu je 330  $\mu\text{l}$ , auf die drei vorbereiteten Schalen verteilt und im Brutschrank inkubiert. Nach 3-6 d wurden die Zellen erstmals gesplittet und wie gewohnt weiterkultiviert.

### 3.1.2.5 Testung auf Mykoplasmen

#### Mykoplasmen-PCR

Die in Kultur befindlichen Zelllinien wurden regelmäßig auf eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen getestet. Zu Beginn der hier vorgestellten Arbeit wurde das VenorGeM-Mykoplasmen-Detektionskit von Minerva-Biolabs (Berlin) verwendet. Die Methode beruht auf der Vervielfältigung der 16S rRNA Region des Mykoplasmen-genoms mittels der im Kit enthaltenen RandomPrimer unter den empfohlenen PCR-Bedingungen (siehe Tab 3.1). Als

Probe diente Zellkulturüberstand und es wurde stets eine im Kit enthaltene Positivkontrolle, sowie autoklaviertes MilliQ-H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle, mitgeführt. Die Durchführung des Tests folgte den Herstellerangaben entsprechend. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist in Tabelle 3.2 dargestellt. Die PCR folgte in ihren Grundlagen dem in 3.5.3 beschriebenen Prozess.

**Tab. 3.1: Mastermix des Mycoplasmen-PCR-Detektions Kit Venor® GeM exemplarisch für eine Probe**

Komponente	Menge [µl]
10x Reaction buffer	2,5
Primer/Nucleotide Mix	2,5
Internal Control	2,5
Polymerase (5 U/µl)	0,2
Template (Probe, Positiv- oder Negativkontrolle)	2
dH <sub>2</sub> O	15,3

**Tab. 3.2: PCR-Programm für das Mycoplasmen-PCR-Detektions Kit Venor® GeM folgend den Empfehlungen des Herstellers**

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
Denaturierung und Aktivierung	94	2 min	1
Denaturierung	94	30 s	39
Annealing	55	30 s	39
Elongation	72	30 s	39
Finale Extension	72	7 min	1
Kühlung	4	∞	∞

Das generierte PCR-Produkt ist 267 bp groß und wurde mittels eines 2%igen Agarosegels (2 g Agarose in 100 ml TAE gelöst) nachgewiesen. Zur Sichtbarmachung der Banden diente der mit SYBR® Gold (Fisher Scientific) versetzter Ladepuffer (6x DNA Ladder Dye, Fermentas, Waltham, USA). SYBR® Gold ist ein hoch sensitiver DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, dessen Fluoreszenzintensität unter UV-Licht durch den Einbau in Nukleinsäuren um mehr als das 1000-fache erhöht wird. Dadurch konnten Banden in Agarosegelen sehr sensitiv sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation erfolgte am GelDocXR+ Geldokumentationssystem (Bio-Rad).

Seit 05/2016 wurde in der Arbeitsgruppe auf den MycoAlert Test von Lonza (Basel, Schweiz) umgestellt.

## MycoAlert™

Dieses Mykoplasmen Detektions-Kit weist selektiv die Aktivität einer Bandbreite von mykoplasmaalen Enzymen nach. Der Test beruht darauf, dass Mykoplasmen aus der Probe lysiert werden, wodurch die nachzuweisenden Enzyme frei werden und mit dem MycoAlert™ Substrat reagieren können. Das Substrat katalysiert dabei die Umsetzung von ADP zu ATP. Das ATP wiederum dient als Katalysator der Umsetzung von Luziferin zu Oxyluziferin, durch die in der MycoAlert™ Reagenz enthaltene Luziferase. Dabei wird Licht emittiert, dessen Intensität proportional zu der ATP-Konzentration ist (siehe Formel). Durch messen des ATPs vor (A) und nach (B) der Zugabe des Substrats kann so eine Aussage über die Anwesenheit von Mykoplasmen gemacht werden. Sind Mykoplasmen vorhanden, steigt die indirekt gemessene ATP-Konzentration durch das zugegebene Substrat zwischen den Messungen an. Die Ratio zwischen den Messungen (B/A) ist daher ein Indiz für das Vorhandensein, oder Fehlen von Mykoplasmen.



Um den Test durchzuführen, wurde Zellkulturüberstand verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers und die Messung der Lumineszenz erfolgte am EnSight™ Plattenlesegerät (PerkinElmer, Rodgau Jügesheim).

## 3.2 Aufreinigung des Eap aus dem *S. aureus* Stamm Newman T.F.

### 3.2.1 Gewinnung des Proteins aus bakterieller Kultur

Um aufgereinigtes Eap für die Versuchsreihen zu erhalten, wurde das Protein wie von (Athanasopoulos *et al.*, 2006) beschrieben nativ aus dem *S. aureus* Stamm Newman T.F. (Duthie, 1952) aufgereinigt. Dieser Stamm trägt eine Mutation innerhalb des *sae*-Regulationssystems, wodurch dieses permanent aktiv ist. Da die Expression von Eap durch *sae* positiv reguliert wird, produziert Newman T.F. eine deutlich höhere Eap-Konzentration als andere *S. aureus* Stämme (Joost *et al.*, 2009) und eignet sich damit besonders gut, um Eap nativ in größeren Mengen aufzureinigen. Innerhalb des IMMH wird seit einigen Jahren die *sigB* Mutante von Newman T.F. zur Aufreinigung von Eap verwendet. Diese produziert noch größere Eap-Mengen, als der Newman T.F. Wildtyp. Dies liegt womöglich daran, dass für  $\delta^B$  beschrieben wurde, dass es zum Teil antagonistisch zu *agr* fungiert (Bischoff *et al.*, 2001). Da die *eap*-Expression durch *agr* positiv reguliert wird, ist die Eap-Produktion daher in einer *sigB*-Mutante höher. Das von Newman T.F. gebildete Eap setzt sich aus fünf EAP-

Domänen zusammen, besteht aus 584 AS und besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 65,6 kDa.

Die Aufreinigung des in dieser Studie verwendeten Eap wurde zum Teil selbst durchgeführt, zum Teil von Karin Hilgert (IMMH) nach routinemäßiger Aufreinigung zur Verfügung gestellt.

Es wurde zunächst eine 20 ml Übernachtskultur von *S. aureus* Newman T.F.  $\Delta sigB$  in MBB-Medium generiert, aus der dann am Folgetag 500 ml MBB-Medium mit der Übernachtskultur 1:100 beimpft wurde. Dieser Schritt wurde üblicherweise in einem 4-fachen Ansatz durchgeführt. Die Kulturen wurden üN bei 37°C und 150 rpm bebrütet und am Folgetag 15 min, bei 4°C und 5525 x g pelletiert. Die Pellets wurden durch Resuspendieren in 150 ml 1x PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Um die bakteriellen Oberflächenproteine zu erhalten, wurden die Zellpellets in je 60 ml 1 M LiCl (pH 5,4 – 5,6) resuspendiert und in einem 1 l Kolben für 2 Stunden, bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Um die zellulären Anteile abzutrennen, erfolgten weitere Zentrifugationsschritte für 15 min, bei 4°C und 5000 x g, solange bis der Überstand klar wurde. Anschließend wurde der Überstand durch Filter mit 0,2 µm Porengröße (Filtropur S, Sarstedt, Nümbrecht) sterilfiltriert.

Parallel zu diesen Schritten wurden sechs ca. 20 cm lange Dialyseschläuche der Größe 10 (Kleinfeld Labortechnik, 12-14000 Dalton) vorbereitet. Die Schläuche wurden vor Benutzung zunächst gerollt und für 10 Minuten in 800 ml 2% NaHCO<sub>3</sub> mit 1 mM EDTA (pH 8.0) gekocht und dann mit MilliQ-H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden die Schläuche für 10 Minuten in 800 ml 1 mM EDTA (pH 8.0) gekocht und erneut mit MilliQ-H<sub>2</sub>O gewaschen. Die so vorbereiteten Schläuche konnten bis zur Verwendung mit Flüssigkeit überschichtet bei 4°C aufbewahrt werden.

Die per LiCl-Fällung generierten Proteingemische wurden in die vorbereiteten Dialyseschläuche gefüllt, diese mit Klammern verschlossen und anschließend etwa 45 min und bei 4°C, unter Rühren gegen 3 l 1x PBS mit 100 mM NaCl dialysiert. Dieser Schritt wurde anschließend mit 1x PBS wiederholt. Die Dialyse diente einer ersten Aufreinigung, da die Dialyseschläuche aufgrund ihrer Porengröße Proteine mit einer Größe von > 12 kDa zurückhalten, während kleinere Proteine, Peptide und andere niedermolekulare Bestandteile des Überstandes ausgewaschen werden.

Um die Proteinlösung anschließend durch Flüssigkeitsverlust aufzukonzentrieren, wurden die Dialyseschläuche mit PEG8000 (Polyethylenglykol) bestreut und 2-4 h bei 4°C gelagert. Die konzentrierten Proben wurden anschließend zusammengeführt (~210-250 ml).

Um aus dem Dialysekonzentrat Eap zu erhalten, erfolgte die weitere Aufreinigung mittels FPLC (engl. "Fast protein liquid chromatography", BioLogic DuoFlow, Bio-Rad). Die dabei

verwendete Säule (Mono S 5/50 GL, GE Healthcare) funktioniert über Kationenaustauschchromatographie. Kationisch geladene Proteine wie Eap binden hierbei an die anionisch geladenen Sulfonat-Gruppen der Säulenmatrix, während anionische Proteine nicht binden und ausgewaschen werden. Die gebundenen Proteine können dann mittels eines Hochsalzpuffers (300 mM NaCl) von der Säule eluiert werden. Dieser Elutionspuffer wird in linear ansteigender Konzentration (1-300 mM NaCl) über die Säule geleitet und die Proteine eluieren basierend auf ihren unterschiedlichen Ladungs- und Bindungseigenschaften bei spezifischen Salzkonzentrationen, wobei die positiven Ionen des Puffers die Proteine von ihren Bindungsstellen an der Matrix verdrängen. Die Proteinlösung wurde in Fraktionen von etwa 2 ml aufgefangen und die einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE (siehe 3.7.3) und Coomassie-Färbung (siehe 3.7.4) auf die in diesen Fraktionen enthaltenen Proteine hin überprüft. Nur die Fraktionen mit einer nahezu reinen Eap-Bande (Reinheitsgehalt > 90%), die durch eine mitgeführte Eap-Kontrollprobe identifiziert werden konnte, wurden zusammengeführt und direkt aufkonzentriert. Fraktionen die zwar viel Eap enthielten, jedoch auch andere Bandenmuster aufwiesen, wurden ebenfalls vereinigt, jedoch einer weiteren Aufreinigung mittels FPLC unterzogen. Die so aufgereinigten Eap-Proben wurden nachfolgend mittels Membranfiltrerröhrchen (Pall Macrosep Advance Centrifugal Device 30 K MWCO PN: MAP030C37) aufkonzentriert und in 1x PBS umgepuffert (siehe 3.3.2). Abschließend wurden die Eap-Proben auf Endotoxin-Kontaminationen getestet (siehe 3.3.3) und die Proteinkonzentration sowohl mittels NanoDrop (siehe 3.5.2), als auch im BCA Protein Assay bestimmt (siehe 3.2.4). Fertig aufgereinigtes Eap wurde mit 1x PBS auf eine Konzentration von 2 mg/ml eingestellt und zur Langzeitlagerung bei -80°C, angebrochene Proben für kurze Lagerzeiten bei 4°C aufbewahrt.

#### 3.2.2 Aufkonzentration und Umpufferung von Eap

Die Aufkonzentration basiert darauf dass, ähnlich wie bei den verwendeten Dialyseschläuchen, die Membran der Centricons eine Porengröße aufweist, die Proteine > 30 kDa zurückhalten. Zunächst wurde das Probenreservoir (Pall-Einheit) zweifach mit 1x PBS gewaschen um Glycerinreste zu entfernen. Dazu wurden 20 ml 1x PBS eingefüllt und das Centricon 5 min bei 4000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die Proteinlösung (max. 20 ml) in das Probenreservoir gefüllt und die Centricons bei 4°C und 3800 x g so lange zentrifugiert, bis das Probenvolumen auf ca. 1/10 des Ursprungsvolumens eingeeengt wurde. Um das Protein umzupuffern, wurde die eingeengte Proteinlösung mit 1x PBS auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt und dann erneut auf 1/10 eingeeengt. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Das umgepufferte Protein wurde erneut mit 0,2 µm Filtern (Sarstedt,

Nümbrecht) sterilfiltriert und anschließend nur noch unter sterilen Bedingungen weiterverwendet.

#### 3.2.3 Testung auf Endotoxin mittels Limulus-Amoebocyten-Lysat Test (LAL)

Endotoxine sind Lipopolysaccharide (LPS) und struktureller Bestandteil der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien und Cyanobakterien. Reinigt man Proteine aus diesen Bakterien auf, so werden auch LPS bei der Zellyse frei. Ebenso ist LPS in Leitungswasser, aber auch als potentielle Kontamination auf Plastikwaren wie Eppendorfgläser oder Pipettenspitzen zu finden (Roslansky *et al.*, 1991; Guentzel, 1996). Da schon geringste Mengen dieser Lipopolysaccharide (im pg/ml Bereich) bei eukaryotischen Zellen eine Reihe von Signalwegen beeinflussen, Immunreaktionen, sowie Apoptose auslösen können, ist es wichtig, die LPS-Konzentration in Proteinproben gering zu halten. LPS muss hierbei soweit reduziert werden, dass ausgeschlossen werden kann, dass die in Zellkultur basierten Assays beobachteten Effekte auf LPS-Kontaminationen zurück zu führen sind.

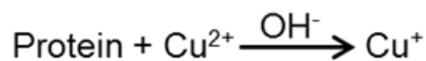
Da das im IMMH verwendete FPLC-System in der Vergangenheit auch verwendet wurde, um heterolog produzierte Proteine aus dem gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* aufzureinigen, müssen alle Proben, welche die FPLC durchlaufen, auf Kontaminationen mit LPS geprüft werden. Hierzu wurde ein so genannter Limulus-Amöbozyten-Lysat, kurz LAL-Assay (QCL-1000 Kit, Lonza, Basel, Schweiz) verwendet. Dieser Test basiert auf der Interaktion von Endotoxinen mit dem aus in Pfeilschwanzkrebsen vorkommenden, Amoebocyten gewonnenes Proenzym "Faktor C" (Iwanaga, 2007). Ist LPS in einer Probe enthalten, kann dieses die proteolytische Aktivität des Faktor C aktivieren. Das aktivierte Proenzym ist dann in der Lage, das zugefügte Farbsubstrat P-Nitroalanin zu spalten, was zu einer gelben Farbreaktion führt. Die Intensität der Farbreaktion kann dann bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen und mit einer Standardkurve (0,2-1 Endotoxin-Einheiten/ml) abgeglichen werden um die Endotoxinkonzentration der Probe zu ermitteln. Die Durchführung des Assays folgte den Herstellerangaben, die Messung der Farbintensität und der Abgleich mit der Standardkurve erfolgte mittels des GeneQuant pro 1300 Spektrophotometers (Biochrom, Berlin). Eap-Fractionen wurden dann für nachfolgende Studien verwendet, wenn die LPS-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des LAL-Tests lag (< 0,2 Endotoxin-Einheiten/ml).

### 3.2.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels BCA-Test

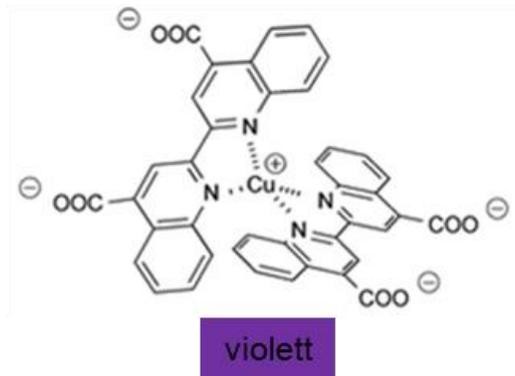
Um die Konzentration des nativ aufgereinigten Eap zu bestimmen, wurde ein sogenannter Bicinchoninsäure (BCA)-Test durchgeführt (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe).

Das Prinzip der Messung beruht auf der Biuret Reaktion, bei der die durch Peptidbindungen ablaufende Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  in alkalischem Medium detektiert wird. Das gebildete  $\text{Cu}^+$  bildet mit der Bicinchoninsäure (BCA) einen wasserlöslichen, violetten Komplex. Dieser violette Farbkomplex entsteht durch eine hochspezifische Chelatreaktion von einem  $\text{Cu}^+$  mit zwei BCA-Molekülen (siehe Abb. 3.1). Die Proteinkonzentration ist hierbei proportional zu der bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessenen Farbintensität des violetten BCA-Kupfer-Komplexes und kann anhand einer mitgeführten Rinderserumalbumin (BSA)-Standardkurve (20-2000  $\mu\text{g}$  Protein pro ml) spektrophotometrisch bestimmt werden.

#### Schritt 1



#### Schritt 2



**Abb. 3.1: Prinzip der BCA-Reaktion.  $\text{Cu}^{2+}$  wird durch die Peptidbindungen des Proteins zu  $\text{Cu}^+$  reduziert und bildet dann mit zwei Molekülen der Bicinchoninsäure einen wasserlöslichen, violetten Komplex.**

Im Rahmen der Untersuchung des Eap-Effekts auf die Phosphorylierung von p-Erk1/2 wurde ebenfalls ein BCA-Assay mit den Zelllysaten durchgeführt, um die Ergebnisse aus dem Phosphorylierungsassay (siehe 3.8.8) auf den Gesamtproteingehalt der Probe normalisieren zu können. Die Proben der Standardkurve wurden hierbei ebenfalls mit Lysepuffer angesetzt, um die Vergleichbarkeit mit den Zellyseproben zu gewährleisten.

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels BCA erfolgte bis 2017 mit Hilfe des GeneQuant pro 1300 Spektrophotometers (Biochrom, Berlin) in 1 ml Küvetten. 2017 wurde auf die effizientere Testversion im 96-Well Format umgestellt, die im EnSight™ Plattenlesegerät (PerkinElmer, Rodgau Jügesheim) gemessen wurde. Die Ermittlung der

Proteinkonzentrationen anhand der Standardkurve erfolgte mittels einer 4-Parameterlogistik der GraphPad Prism6 Software. Die Durchführung des Assays folgte den Herstellerangaben.

#### 3.2.5 Proteinase K (PK)-Verdau von Eap

In den nachfolgend beschriebenen Zellkultur-basierten Assays wurde neben der Eap-freien Kontrolle stets auch eine weitere Kontrolle mit PK verdautem Eap mitgeführt. Dies diente der Sicherstellung, dass die beobachteten Effekte tatsächlich auf die Wirkung des Eap-Proteins zurückzuführen sind und nicht etwa auf aus dem Aufreinigungsprozess mitgeführten sonstigen Bestandteilen. Eap wurde hierfür mit 50 µg/ml PK versetzt (Stock: 20 mg/ml) und der Ansatz für 15 min bei 55°C, der Optimaltemperatur des Enzyms, auf einem Heizblock inkubiert. Die anschließende Inaktivierung der PK erfolgte für 15 min bei 97°C (Ebeling *et al.*, 1974).

In den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen wurde mit PK verdautes Eap verwendet, das einer ursprünglichen Konzentration von 40 µg/ml entsprochen hätte. Dabei handelt es sich, um die in den Versuchen getestete Höchstdosis von Eap. In dieser Arbeit, wird Proteinase K verdautes Eap daher als 40<sup>PK</sup> bezeichnet.

#### 3.3 Semi-quantitative Bestimmung der *in vitro* Produktion des Eap

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass in tiefen, durch *S. aureus* infizierten, Wunden sehr viel mehr *eap*-Transkript hergestellt wird als in oberflächlichen Wunden (Joost *et al.*, 2009). Es wurde jedoch noch nie bestimmt, wieviel Eap *in vitro* von *S. aureus* produziert wird.

Um dies zu untersuchen, wurden die Stämme Newman T.F. (Duthie, 1952) und das USA 300 Isolat 923 (Montgomery *et al.*, 2008) auf ihre Eap Sezernierung hin untersucht. Zunächst wurden Übernachtskulturen der Stämme Newman T.F. und 923, sowie ihrer jeweiligen *eap*-Mutanten AH12 (Newman  $\Delta eap$  (Hussain *et al.*, 2002)) und HOM319 (923  $\Delta eap$  (Eisenbeis *et al.*, 2017)) angesetzt (siehe 3.1.1). Am Folgetag wurden frische TSB-Kulturen (Medium zu Flachenvolumen 1:10) mit einer  $A_{600}$  von 0,05 beimpft und bei 37°C und 225 rpm kultiviert. Nach 2 h (exponentielle Phase), sowie 5 h (postexponentielle Phase) Inkubation wurden die Kulturen abzentrifugiert (5 min, 8000 x g). Die Überstände der  $\Delta eap$  Mutanten wurden durch einen 0,2 µm Filter (Sarstedt, Nümbrecht) sterilfiltriert und als Spendermedium für die Wildtypstämme verwendet. Dieses Vorgehen ermöglichte die Eap-Sekretion pro Stunde in verschiedenen Wachstumsphasen (exponentiell/postexponentiell) unter realistischen

Bedingungen zu untersuchen, da kein frisches TSB, sondern Spendermedium ohne Eap, jedoch mit für die Wachstumsphase spezifischem Nährstoffgehalt und pH-Wert verwendet wurde. Mit den Pellets der Wildtypstämme und dem vorgewärmten Spendermedium wurde eine  $A_{600}$  von 1 eingestellt und die Kulturen eine weitere Stunde bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Mit den erhaltenen Kulturen wurde zum einen die KbE (siehe 3.1.1.3) bestimmt. Zum anderen wurde der Überstand mittels SDS-Page (siehe 3.7.3) und Western Blot (siehe 3.7.5) auf den Eap-Gehalt hin untersucht. Die Intensitäten der Eap-Banden wurde mittels der ImageLab Software 4.0.1 (Bio-Rad, München) densitometrisch bestimmt und auf die aus den KbE ermittelten bakteriellen Zellzahlen relativiert.

Um sich der Situation im eukaryotischen Wirt anzunähern, wurde die Eap-Sekretion pro Stunde zudem in RPMI 1640 (Gibco, ThermoFisher, Dreieich), einem Nährmedium für Säugerzellen, untersucht. Die Übernachtskulturen von Newman T.F., 923, AH12, und HOM319 wurden abzentrifugiert (5 min, 8000 x g), die Pellets in RPMI1640 resuspendiert und mit diesem Medium gewaschen, um Überreste des Übernachtskulturüberstandes zu entfernen und dann eine 10 ml Kultur mit vorgewärmtem RPMI 1640 mit einer  $A_{600}$  von 0,1 beimpft (Medium zu Flachenvolumen 1:10). Die Kulturen wurden für 3 h bei 37°C und 225 rpm inkubiert und dann die Eap-Sekretion wie oben beschrieben mittels Western Blot (siehe 3.7.5) und KbE (siehe 3.1.1.3)-Bestimmung ermittelt.

### 3.4 DNA-basierte Methoden

#### 3.4.1 Isolierung genomischer DNA aus *S. aureus*

Um genomische DNA als Template für nachfolgende PCRs zu erhalten, wurden zunächst Übernachtskulturen von *S. aureus* angesetzt (siehe 3.1.1). Die Aufreinigung am Folgetag erfolgte mittels des Maxwell®16 Buccal Swab DNA Aufreinigungs-Kits und des Maxwell® MDx 16 Instrumentes (Promega Madison, USA), nach Angaben des Herstellers.

#### 3.4.2 Konzentrationsbestimmung von DNA (Nanodrop)

Die Bestimmung von DNA Konzentrationen erfolgte mittels des Nanodrop 2000 UV Spektrometers und der Nanodrop Operation software v1.6 (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe) durch Messung von 1,5 µl Probe gegen Wasser bei 260/280 nm.

### 3.4.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

In den im Folgenden beschriebenen Eap-DNA Versuchen wurde ein 1,4 kb-DNA-Fragment aus *S. aureus* Newman T.F. verwendet. Um eine Vervielfältigung des 1,4 kb-DNA-Fragments zu ermöglichen, wurde unter Zuhilfenahme des Primerpaares MBH492 (5'-CCTGAACAACCTGATGAGCC-3') und MBH493 (5'-ACCCTATTTTTTCGCCAAGCC-3') eine Polymerase Kettenreaktion durchgeführt und die aufgereinigte DNA aus *S. aureus* Newman T.F. (siehe 3.5.1) als Template eingesetzt. Zunächst wurde mittels des FastStart High Fidelity PCR Systems (Roche, Basel, Schweiz) ein Mastermix erstellt, dann erfolgte die Zugabe von der DNA und eines im Kit enthaltenen Gemischs aus TaqPolymerase und "proofreading"-Enzym. Die genaue Zusammensetzung des Mix ist in Tabelle 3.3 dargestellt. Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler des Typs GeneAmp PCR 9700 (Applied Biosystems, Darmstadt) unter den in Tab. 3.4 dargestellten Bedingungen. Im Anschluss an die PCR wurde das Produkt mittels des QiaQuick® PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

**Tab. 3.3: Zusammensetzung (Mastermix) für die Vervielfältigung eines 1,4 kb DNA-Abschnitts der bakteriellen DNA von *S. aureus* mittels des FastStart High Fidelity PCR Systems exemplarisch für eine Probe**

Komponente	Menge [µl]
10x PCR reaction buffer	5
PCR Grade Nucleotide Mix	1,25
Forward Primer MBH 492	5
Reverse Primer MBH 493	5
FastStart Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,25
Template	1
dH <sub>2</sub> O	32,5

**Tab. 3.4: Für die Vervielfältigung eines 1,4 kb DNA-Abschnitts der bakteriellen DNA von *S. aureus* verwendetes PCR-Programm mittels des FastStart High Fidelity PCR Systems folgend den Empfehlungen des Herstellers**

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
Denaturierung und Aktivierung	95	5 min	1
Denaturierung	95	30 s	35
Annealing	55	30 s	35
Elongation	72	1,5 min	35
Finale Extension	72	7 min	1
Kühlung	4	∞	∞

### 3.4.4 Agarosegel Elektrophorese (AGE)

Um die Ergebnisse aus den Eap-DNA-Bindungsassays und der Mycoplasmen-PCR zu analysieren wurden AGEs durchgeführt.

Für die DNA-Eap Assays wurde ein 0,8% Agarosegel in 0,5x TBE-Puffer durch Aufkochen hergestellt (Biozym, Oldendorf). Die Proben wurden mit 6x Ladepuffer vermischt, der mit SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe) im Verhältnis 10.000:1 versetzt wurden, um die DNA-Banden später unter UV-Licht sichtbar machen zu können. Es wurde hierfür die Gesamtprobe mit 6x Ladepuffer vermischt und auf das Agarosegel geladen. Als Größenstandard wurde ein ebenfalls mit SYBR® Gold versetzte 1kb DNA-Marker (Invitrogen, Darmstadt) mitgeführt. Die AGE erfolgte in einer Elektrophorese-Kammer von Keutz Labortechnik (Reiskirchen) in 0,5x TBE-Puffer und bei einer Spannung von 100 V für ca. 30 min. Als Spannungsgeber diente dabei ein Elektrophoresis Power Supply (Bio-Rad, München). Die Auswertung der Gele erfolgte mittels des Gel Doc XR+ Geldokumentationssystems (Bio-Rad, München).

Für die Auswertung der Mycoplasmen PCR wurden 2% Agarosegele verwendet und es wurden stets 5 µl PCR-Produkt mit 1µl 6x Ladepuffer vermischt aufgetragen, ansonsten folgte die Durchführung der oben beschriebenen.

## 3.5 Eap-DNA-Assays

### 3.5.1 Eap-DNA-Bindung

Die Fähigkeiten von Eap, an DNA zu binden und diese zu verdauen, wurden untersucht, indem 50 ng des 1,4 kb-DNA-Fragments (siehe 3.5.2) mit steigenden Konzentrationen von Eap (0, 1, 5, 10, 20 und 40 µg/ml) in einem Gesamtvolumen von 20 µl (eingestellt mit 1x PBS) für 5 min inkubiert wurden. Anschließend wurden die Proben mit 4 µl 6x Ladepuffer versetzt, auf ein 0,8% Agarosegel aufgetragen und wie unter 3.5.4 weiter verfahren. Die densitometrische Auswertung der Banden erfolgte mittels der ImageLab Software 4.0.1 (Bio-Rad, München).

### 3.5.2 Restriktionsverdau des Plasmids pBR322 zur Testung des Einflusses der Endkonfiguration von DNA-Fragmenten auf die Eap-Bindung

Um den Einfluss der Konfiguration der Enden der DNA-Fragmente auf die Bindungsfähigkeit von Eap zu untersuchen, wurden mittels spezifischer Restriktionsenzyme glatte "blunt"-

Enden, oder Enden mit Überhang ("sticky") hergestellt. Die Reaktionen wurden nach dem in Tab 3.5 dargestellten Mischverhältnis in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Der Verdau erfolgte für 20 min bei 37°C auf dem Heizblock. Es wurden Ansätze von je 3 µg Plasmid (1 mg/ml Stock) mit den Enzymen *EcoRV* (generiert "blunt" Enden), *PstI* (generiert "sticky" Enden mit einem 3'-Überhang), oder *BamHI* (generiert "sticky" Enden mit einem 5' Überhang) verdaut. Es ist laut Herstellerangaben davon auszugehen, dass 1 µl der verwendeten Enzyme, innerhalb von 5 min bei 37°C in der Lage sind, 1 µg Plasmid-DNA zu verdauen. Bei den gewählten Konzentrationen, sollte also bereits nach 7,5 min der Verdau erfolgt sein. Die bei 80°C für 5 min abgestoppten Reaktionsgemische wurden mit dem PCR-Purification Kit (Quiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Kontrolle der DNA-Konzentration erfolgte am Nanodrop (siehe 3.5.2). Je 200 ng der Restriktionsfragmente wurden für 15 min bei 37°C mit 40 µ/ml Eap in RPMI1640 inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 4 µl 6x Ladepuffer versetzt, auf ein 0,8% Agarosegel aufgetragen und wie unter 3.5.4 weiter verfahren.

**Tab 3.5 Reaktionsgemisch für den Restriktionsverdau des Plasmids pBR322**

Komponente	Menge [µl]
pBR322	3 (3 µg)
Restriktionsenzym	2 (1 µg Plasmid/1 µl Enzym/5 min Verdau)
FastDigest Puffer (10x)	5
Autoklaviertes MilliQ-H <sub>2</sub> O	40

### 3.5.3 Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkoholfällung

Um zu überprüfen, ob Eap nur an DNA bindet, oder ob auch eine intrinsische DNase-Aktivität vorliegt, wurde eine Extraktion durch Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkoholfällung vorgenommen. Es wurden 250 ng des 1,4 kb-DNA-Fragments (siehe 3.5.3) mit steigenden Konzentrationen von Eap (0,10, 20 und 40 µg/ml) für 30 min bei 37°C inkubiert. Dafür wurde ein Probenvolumen von 50 µl in RPMI ohne Phenolrot eingestellt. Als Kontrolle des Verdauvorgangs dienten Proben mit DNase I (1:1000 verd., Stock > 400 EU) die für 5, 15 oder 30 min bei 37°C verdaut wurden. Anschließend wurden die Ansätze mit 1:1 (v/v) Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol (25:24:1) (Roth, Roti-Phenol/Chloroform) versetzt, gevortext, 3 min auf Eis inkubiert und bei 4°C, 15 min bei 15000 x g abzentrifugiert. Durch den Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol wurde das enthaltene Protein gefällt und somit von der im Überstand befindlichen DNA abgetrennt. Vom erhaltenen Überstand wurden 20 µl mit 4 µl 6x LD versetzt und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 3.5.4). Die

densitometrische Auswertung der erhaltenen Banden erfolgte mittels der ImageLab Software 4.0.1 (Bio-Rad, München).

#### 3.5.4 DNase Agar zur Testung auf Desoxyribonukleaseaktivität (DNase)

Um die Fähigkeit von *S. aureus* Newman T.F. und den Mutantenstämmen Newman *nuc1nuc2* M0746N1 (Kaito *et al.*, 2011) und Newman *nuc1nuc2 $\Delta$ eap* (diese Arbeit) zum DNA-Abbau zu überprüfen, wurde des Weiteren der BD DNase Test Agar verwendet (Becton Dickinson, Heidelberg). Diese DNase Testmethode basiert darauf, dass der Agar hochmolekulare DNA enthält (2 mg/ml), welche durch DNase verdaut und damit depolymerisiert wird. Wachsen Organismen auf dem Nährmedium, die in der Lage sind, DNasen zu produzieren, wird die im Agar enthaltene DNA depolymerisiert. Zum Nachweis wird der Agar mit einer 0,1%igen Toluidinblau-Lösung (100 mg Toluidinblau in dH<sub>2</sub>O) überschichtet. Nimmt man die Lösung wieder ab, erscheinen Zonen, in denen die DNA abgebaut wurde pink und der restliche Agar blau. Dies beruht auf den metachromatischen Eigenschaften von Toluidinblau (weitere Erläuterung siehe auch 4.4.6). Im Versuchsablauf wurden Übernachtskulturen der zu testenden Stämme hergestellt, um am Folgetag eine Hauptkultur mit einer Start-OD von 0,05 herzustellen. Nach 6h Wachstum wurden aus dieser Kultur in 10er-Verdünnungsschritten Proben mit OD's von 0,05 - 0,0005 hergestellt und davon je 5  $\mu$ l auf den DNase Test Agar aufgetropft. Nach Bebrütung bei 37°C erfolgte am Folgetag die Färbung und die Auswertung mittels des acoLyte Koloniezählgeräts (Synbiosis, Cambridge, UK).

### 3.6 Herstellung einer *nuc1/nuc2* und *eap*-defizienten Mutante von *S. aureus* Newman

#### 3.6.1 Phagentransduktion

Unter Phagentransduktion versteht man die Übertragung von DNA zwischen Bakterien durch temperente Bakteriophagen.

Der Vorgang unterteilt sich dabei in zwei Schritte. Zunächst wird ein Bakterienstamm, der den DNA-Abschnitt von Interesse besitzt (Spender, Donor) mit einem spezifischen, temporäreren Bakteriophagen infiziert. Es werden hierzu lytische Phagen verwendet, die im Rahmen ihres Generationszyklus Bakterienzellen infizieren (Olson, 2016). Der Virus nutzt die bakterielle Zellmaschinerie zur Replikation und induziert schließlich die Lyse der Bakterienzelle. Die freiwerdenden, neu replizierten Phagen können dann erneut Bakterienzellen befallen. In einigen Fällen wird jedoch anstelle der Virus-DNA ein Stück der

bakteriellen DNA, oder eines Plasmids in die Virushülle (Kapsid) verpackt (Olson, 2016). Die so entstandenen Phagen sind trotzdem in der Lage neue Bakterien zu infizieren. Dadurch kann es über homologe Rekombination, zum Einbau der Bakterien-DNA aus dem Phagen in die DNA des neuinfizierten Empfängerbakteriums (Rezipient) kommen (zweiter Schritt). Im Virus mitgeführte Plasmid-DNA kann ebenso durch Rezirkularisierung neue, replizierende Plasmide bilden (Olson, 2016). Letztlich wird auf diesem Weg der Rezipient mit neuer, genetischer Information versehen. Im Laboralltag wird eine Selektion auf die gewünschte genetische Zusammensetzung durch Selektivmedien erreicht, wenn der zu übertragenden DNA zum Beispiel eine Resistenzkassette benachbart ist, die bei der Transduktion mit übertragen wurde. Es wurde hier der Bakteriophage  $\phi 85$  verwendet, ein zu den Caudovirales zählendes dsDNA (doppelsträngiges) Virus.

#### Schritt 1: Infektion des Donors und Herstellung des Phagenlysats

Als Donor diente der Stamm AH12 (Newman  $\Delta eap$  (Hussain *et al.*, 2002)) bei dem das *eap*-Gen durch eine Erythromycin-Resistenzkassette ersetzt wurde. Es wurden 20 ml LB mit AH12 beimpft und über Nacht bei 37°C und 150 rpm heranwachsen lassen. Am Folgetag wurden der Kultur 100  $\mu$ l 1 M  $CaCl_2$ -Lösung zugegeben. Die verwendete Phagensuspension wurde generiert, in dem das Phagenlysats (zur Verfügung gestellt von Bischoff M., IMMh) in den Verdünnungsstufen  $10^{-1}$ - $10^{-7}$  in Phagenpuffer (5 mM  $CaCl_2$  in LB) verdünnt wurde. Von der bakteriellen Übernachtskultur wurden je 300  $\mu$ l in eines von 6 sterilen Glasröhrchen überführt und mit 100  $\mu$ l Phagensuspension der erstellten Verdünnungen vermischt. Die Ansätze wurden 15 min bei RT inkubiert und anschließend mit 4 ml auf 50°C erwärmten LB-Softy mit 5 mM  $CaCl_2$  vermischt und auf eine Blutagarplatte gegossen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet und am Folgetag auf Bakterienlyse überprüft. Eine bräunliche Färbung des Blutagars zeigte hierbei Bakterienwachstum an, während Aufklärung des LB-Softys als Indiz für Bakterienlyse gewertet wurde. Verwendet wurde nach Möglichkeit die Platte mit einer Braunfärbung bei gleichzeitig konfluenter Lyse. Es wurden 2 ml Phagenpuffer zugegeben und der Softagar (transparente Schicht) mit einem sterilen Glasspatel abgeschabt und in ein 5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Agar wurde gevortext und dann für 10 min bei 9000 rpm zentrifugiert. Der erhaltene Überstand enthält die Phagen und wurde durch einen 0,2  $\mu$ m Filter (Sarstedt, Nümbrecht) sterilfiltriert. Die Lagerung des erzeugten Phagenlysats erfolgt bei 4°C und ist dabei für Jahre haltbar.

#### Schritt 2: Transduktion des Rezipienten

Der verwendete Empfängerstamm ist das *S. aureus* Newman Derivat M0746N1 (Kaito *et al.*, 2011), einer Mutante der die beiden Nukleasen *nuc1* und *nuc2* fehlen. Vor diesem Stammhintergrund lässt sich die potentielle Auswirkung einer *eap* Mutation auf die Fähigkeit

zum Nukleaseverdau direkt erfassen. Von diesem Stamm wurde, wie im ersten Schritt beschrieben, eine Übernachtskultur hergestellt. Am Folgetag wurden von dem in Schritt 1 erzeugten Phagenlysat Verdünnungen, in den Verdünnungsstufen  $10^{-1}$ - $10^{-3}$  in Phagenpuffer hergestellt. Von der bakteriellen Übernachtskultur des Empfängerstamms wurden je 300  $\mu$ l in eines von drei sterilen Glasröhrchen überführt und mit je 100  $\mu$ l Phagensuspension der erstellten Verdünnungen vermischt. Nach den 15 min Inkubation bei RT wurde je 4 ml 50°C warmer LB-Softy ohne Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  zugegeben und das Gemisch auf LB-Platten mit 5  $\mu$ g/ml Erythromycin gegossen. Die Platten wurden für 24-48 h bei 37°C bebrütet. Erzeugte Transduktanten konnten dadurch selektiert werden, dass nur Bakterien mit durch die Transduktion übertragener Resistenzkassette gegen Erythromycin auf dem Selektionsmedium wachsen konnten. Eine Überprüfung auf die erfolgreiche Deletion erfolgte zum einen auf der Transkriptionsebene (mittels Real-Time-PCR (siehe 3.7.2) und *eap*-spezifischen Primern) und zum anderen auf der Proteinebene (mittels Western-Blot und einem spezifischen gegen Eap gerichteten Antikörper) (siehe 3.7.5).

#### 3.6.2 Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR, engl. "real-time quantitative PCR")

Für alle in diesem Rahmen durchgeführten Arbeiten galt es, die Einschleppung von RNAsen zu vermeiden. Der verwendete Arbeitsplatz, Pipetten und Ständer wurden initial mit RNase-Exitus Plus™ gereinigt. Es wurde als RNase frei beschriebene Plastikware verwendet. Verwendete Lösungen und Puffer wurden mit  $\text{H}_2\text{O}$  LiChrosolv® (Merck Millipore, Billerica, USA) bzw. Ethanol absolut (GC-grade) angesetzt. Alle Arbeitsschritte bis zur Umschreibung in cDNA wurden auf Eis durchgeführt.

##### 3.6.2.1 Gewinnung der Gesamt-Zell-RNA aus *S. aureus*

Um die bakterielle RNA zu gewinnen, wurden zunächst Übernachtskulturen, wie unter 3.1.1 beschrieben, angeimpft.

Für die Überprüfung der erfolgreichen Generierung einer *nuc1/nuc2* und *eap*-defizienten Mutante von *S. aureus* Newman wurden hierfür 3 ml TSB beimpft und bei 37°C, 150 rpm üN inkubiert. Aus diesen wurde am Folgetag Hauptkulturen 1:100 beimpft (3 ml TSB, 37°C, 150 rpm) und für 3 h inkubiert. Nach 3 h wurde die  $A_{600}$  der Kulturen bestimmt und je 1 ml mit einer  $A_{600}$  von 2 mit 1x PBS eingestellt und für 15 min, bei 16.000 x g und 4°C abzentrifugiert.

Um die Transkriptionsrate von *eap* und den Homologen *eapH1* und *eapH2* zu ermitteln, wurden 3 ml THB beimpft und bei 37°C, 150 rpm üN inkubiert. Aus diesen wurde am Folgetag Hauptkulturen  $A_{600}$  von 0,05 beimpft (25 ml THB, 37°C, 150 rpm) und nach je 3 h, 5 h, 8 h und 12 h Proben entnommen. Dazu wurde die  $A_{600}$  der Kulturen bestimmt und je 1 ml mit einer  $A_{600}$  von 2 mit 1x PBS eingestellt und für 15 min, bei 16.000 x g und 4°C abzentrifugiert.

Die nachfolgenden Schritte erfolgten für alle qPCR in gleicher Weise.

Die entstehenden Pellets wurden in je 100 µl TE-Puffer resuspendiert und die Gewinnung der Gesamt-RNA erfolgte mittels des NucleoSpin® RNA II Mini Kits von Machery Nagel (Hoerd, Frankreich) nach Herstellerangaben. Zum Aufschluss der Staphylokokken wurde diese mit dem im Kit enthaltenen Lysepuffer auf die Lysing Matrix B (MP Biomedicals, Eschwege) gegeben. Mit den darin enthaltenen Glaspartikeln konnten die Zellen im Ribolyser (FastPrep-24™5G, MP Biomedicals, Eschwege) mechanisch aufgeschlossen werden. Mit dem erhaltenen Lysat wurde die Aufreinigung fortgesetzt. Die Nukleinsäuren wurden hierfür an die im Kit enthaltene Säulenmatrix gebunden, die DNA mittels DNase verdaut und die RNA nach drei Waschschritten mit den im Kit enthaltenen Puffern mit RNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration der RNA wurde wie unter 3.5.2 beschrieben mittels Nanodrop gemessen.

Um sicherzustellen, dass keine DNA in der Probe mehr enthalten ist, wurde zusätzlich zu dem im Kit vorgesehenen Verdau ein zweiter DNA-Verdau mit Hilfe des Turbo-DNA free™ Kits von Ambion (Woodward Austin, USA) durchgeführt. Es wurden je 10 µg Probe in den Verdau eingebracht und die Durchführung folgte den Herstellerangaben.

#### 3.6.2.2 Reverse Transkription

Nach einer erneuten Konzentrationsmessung am Nanodrop (siehe 3.5.2) erfolgte die Umschreibung der RNA in cDNA mittels des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits von Applied Biosystems (Darmstadt). Es wurden je 15 µl Mastermix (siehe Tab. 3.6) mit 6-9 µl Nuklease-freiem Wasser und 6-9 µl (150 ng) Probe vermischt und in einen Umschreibungsprozess eingesetzt. Um einen zusätzlichen Schutz vor Nukleasen zu bieten, wurde dem PCR-Ansatz RNaseOUT® der Firma Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe) zugefügt.

Tab. 3.6: Mastermix für den Umschreibungsprozess von RNA in cDNA mittels des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit exemplarisch für eine Probe

Komponente	Menge [ $\mu$ l]
10x High Capacity RT buffer	3
dNTP Mix (100 mM)	1,2
10x High Capacity Random Primer Mix	3
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,5
RNaseOut™ (2 u/ $\mu$ l)	0,38
DEPC H <sub>2</sub> O	6

Die Umschreibungsbedingungen im Thermocycler (Thermocycler GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Darmstadt) folgten dem in Tab. 3.7 dargestellten Programm.

Tab. 3.7: PCR-Bedingungen für die Umschreibung von RNA in cDNA mittels reverse Transkriptase

Schritt	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer	Zyklen
Annealing	25	10 min	1
Reverse Transkription	37	120 min	1
Denaturierung	85	5 s	1
Kühlung	4	$\infty$	$\infty$

Nach der erfolgten Umschreibung wurde die Konzentration der cDNA mit DEPC Wasser auf 1 ng/ $\mu$ l eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}$ C weggefroren.

### 3.3.2.3 Die quantitative Echtzeit-PCR (engl. "real-time PCR")

Eine quantitative real-time PCR (qPCR) dient dazu, die Transkriptionsrate bestimmter Gene zu einer definierten Zeit und unter definierten Bedingungen zu bestimmen. Die Vervielfältigung des Transkripts folgt dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion und verläuft nach Überschreiten eines Schwellenwertes exponentiell. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Sybr Green I, der Bestandteil des Power SYBR® Green PCR Master Mix von Applied Biosystems ist. SYBR Green I ist ein DNA-Interkalator, der an doppelsträngige DNA bindet, indem er zwischen den Basenpaaren inseriert (Zipper *et al.*, 2004). Der DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\max} = 494$  nm und emittiert grünes Licht bei  $\lambda_{\max} = 521$  nm. Die Fluoreszenz wird während jedem PCR-Zyklus simultan gemessen und nimmt dabei proportional mit der Menge der Amplifikate zu. In Tab. 3.7 ist beispielhaft ein qPCR-Ansatz für eine Probe dargestellt. Es wurde stets 2,5 ng cDNA als Template eingesetzt. Die für *eap*

spezifischen Primer wurden in einem zuvor optimierten Verhältnis von 300/300 nM verwendet. Die Zusammensetzung der Mixes für einen PCR-Ansatz ist in Tab. 3.8 dargestellt.

**Tab. 3.8: Zusammensetzung für einen qPCR-Ansatz exemplarisch für eine Probe**

Komponente	Menge [ $\mu$ l]
Power SYBR® Green PCR Master Mix 2x	12,5
Forward Primer (300 nM)	1,5
Reverse Primer (300 nM)	1,5
Template (1ng/ $\mu$ l cDNA)	2,5
Li®Chroslov Wasser	7

Die qPCR-Läufe erfolgten in einem ABI PRISM 7000 Thermocycler von Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe) und folgten dem in Tab. 3.9 dargestellten Programm.

**Tab. 3.9: qPCR-Programm im ABI PRISM 7000 Thermocycler**

Schritt	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	10 min	1
Denaturierung	95	15 s	40
Annealing und Elongation	60	1 min	40
Schmelzkurve Schritt 1	95	15 s	1
Schmelzkurve Schritt 2	60	20 s	1
Schmelzkurve Schritt 3	95	15 s	1
Kühlung	4	$\infty$	$\infty$

Um nach dem abgeschlossenen Lauf die Homogenität des Amplifikates zu prüfen und eventuelle Verunreinigungen zu detektieren, wurden die Schmelzkurven des PCR-Laufs verglichen. Die mitgeführten Kontrollproben mit Wasser, anstelle von Templat, dienten dazu, Verunreinigungen in den Komponenten der PCR-Reaktion und eine Dimerisierung der verwendeten Primer auszuschließen. Die Auswertung der qPCR erfolgte durch Ermittlung des  $C_T$ -Wertes (engl. "cycle treshold"). Der  $C_T$ -Wert bezeichnet dabei den qPCR Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal während der exponentiellen Vervielfältigung eines Amplifikats einen definierten Schwellenwert überschreitet. Der Zeitpunkt, an dem dieser Wert überschritten wird, spiegelt die Ausgangsmenge des Transkripts wieder, da bei großen Ausgangsmengen der Zielstruktur der  $C_T$ -Werte früh erreicht wird, bei geringen Mengen Templat später. Um mögliche Transkriptionsunterschiede zu normalisieren, wurde die Expression der in dieser Arbeit untersuchten Zielgene in Relation zur der des konstitutiv

exprimierten Haushaltsgens *gyrB* gemessen, welches für die Topoisomerase II codiert. Dafür wurde der  $C_T$ -Wert des Haushaltsgens vom  $C_T$ -Wert des Zielgens subtrahiert ( $\Delta C_T$ ). Anschließend wurde der  $\Delta C_T$  in die Gleichung  $2^{-\Delta C_T}$  eingesetzt. Auf diese Weise konnte die  $n$ -fache Veränderung der Expression des Zielgens relativ zum Haushaltsgen ermittelt werden.

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

Das SDS-Page (engl. "sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis") ist eine, auf dem von Ulrich K. Laemmli (Laemmli, 1970) entwickelten Verfahren basierende, Methode zur Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts. Die Proteine erfahren dabei mehrere Schritte der Vorbereitung, wobei sie zunächst durch Erhitzen (5 min bei 95°C) denaturiert werden. Hinzu kommt, dass der verwendete Probenpuffer das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) enthält. SDS besitzt eine langkettige Alkylgruppe (C12) und kann die hydrophoben Aminosäurereste von Proteinen binden. Ein SDS-Molekül bindet dabei je zwei Aminosäuren, was zu einer konstant negativen Ladungsverteilung führt und die Eigenladung der Proteine maskiert. Dies erlaubt es, dass die Proteine im späteren Auftrennungsverfahren im elektrischen Gleichspannungsfeld, unabhängig von ihren eigentlichen isoelektrischen Eigenschaften, in Richtung Anode wandern. Da SDS eine negative Ladung besitzt, kommt es intermolekular außerdem zu Abstoßungseffekten, was in Kombination mit der zuvor durch Kochen erfolgten Denaturierung zu einer Linearisierung der Proteine führt. Da SDS dazu neigt, in wässriger Lösung Mizellen zu bilden, erhalten die Proteine eine ellipsoide Form. Dies ermöglicht, dass sie durch die Poren eines Polyacrylamid Gels wandern und ihre Laufgeschwindigkeit lediglich durch ihre Masse bestimmt wird (Weber & Osborn, 1969). Größere Proteine wandern dabei langsamer, da sie durch die Poren des Gels stärker beeinträchtigt werden, was letztlich zur Größenauftrennung führt.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten SDS-Gele waren diskontinuierliche Polyacrylamidgele. Diese bestehen aus einem längeren, höher prozentigen Trenngel mit höherem pH-Wert, welches mit einem kurzen Sammelgel mit niedrigerer Acrylamidkonzentration und geringerem pH-Wert überschichtet wurde. Die Proteine wandern zunächst zügig durch das Sammelgel mit seinen größeren Poren und dem neutralen pH. Der pH-Unterschied zwischen Sammel- und Trenngel führt dann zu einer Aufkonzentration an der Gelgrenze. Dies ermöglicht, dass alle Proteine eines Gemisches gleichzeitig in das Trenngel eindringen und dort anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden. Die Verwendung diskontinuierlicher Gele hat sich als vorteilhaft erwiesen, da so die

Trennschärfe der Gele erhöht werden kann. Die Generierung der Gele erfolgte immer nach dem Schema, dass zunächst alle Zutaten für Sammel- und Trenngel in eigene Reaktionsgefäße vorbereitend zusammen pipettiert wurden (Zusammensetzung siehe Tab. 3.10). In die fertig zusammengebaute Apparatur wurde dann zunächst das Trenngel zwischen die durch Platzhalter getrennten Glasplatten gegossen. Das mit dem Polymerisationsinitiator Ammoniumpersulfat (APS) und dem Polymerisationskatalysator N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) versetzte Gel konnte ca. 20 min auspolymerisieren. Um eine glatte Geloberfläche zu erhalten, wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständigem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol vollständig abgezogen und etwaige Reste mit Filterpapier aufgesaugt. Dann wurde das Sammelgel mit APS und TEMED versetzt, über das Trenngel gegossen und ein Spacer eingesetzt um die entsprechenden Ladetaschen zu erzeugen. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels (ca. 20 min) wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt und mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Nach dem vorsichtigen Entfernen des Spacers wurden die Ladetaschen mit Puffer gespült und nachfolgend die aufzutrennenden Proben in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Die eigentliche Elektrophorese erfolgte schließlich bei einer konstanten Stromstärke von 110 V über ca. 1,5 h. Um die spätere Größenbestimmung der Proteine zu ermöglichen, wurde stets ein 10-180 kDa Standard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, Waltham, USA) mit aufgetragen.

**Tab. 3.10: Pipettierschema exemplarisch für je ein Trenn- und Sammelgel. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Lösungen ist unter 2.3 Tab. 2.8 aufgeführt.**

Lösung	Trenngel	Sammelgel
Lösung A	2,5 ml	0,75 ml
Lösung B	1,9 ml	-
Lösung C	-	1 ml
dH <sub>2</sub> O	3,2 ml	2,4 ml
APS	75 µl	42 µl
TEMED	6,23 µl	3,4 µl

### 3.6.4 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Um Proteine sichtbar zu machen, die in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden, wurden die Gele in einer Coomassie-Brillant-Blau-Lösung (Coomassie) gefärbt (Bennett & Scott, 1971). Coomassie ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der sich an die basischen Aminosäurereste der in

den Proteinen enthaltenen Aminosäuren, Lysin und Arginin, anlagert und diese damit anfärbt.

Die SDS-Gele wurden hierfür für 30 min in der Färbelösung auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Gele mittels Entfärberlösung wieder entfärbt, wobei die an die Proteine gebundenen Coomassie-Moleküle nicht ausgewaschen werden. Die Proteinbanden treten dadurch deutlich blau getönt gegen den durchsichtigen Gel-Hintergrund hervor. Die Entfärberlösung wird zunächst etwa alle 10-20 Minuten gewechselt und schließlich über Nacht auf den Gelen belassen. Die Entfärbeprozedur wird solange fortgesetzt, bis der Hintergrund komplett entfärbt und die Proteinbanden klar erkennbar sind. Durch Filtern der Entfärbelösung durch Aktivkohle kann diese mehrfach verwendet werden.

#### **3.6.5 Elektrotansferverfahren von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran ("Western Blot")**

Um eine immunhistochemische Detektion der im SDS-Page aufgetrennten Proteine zu ermöglichen, wurden diese in einem als "Western Blot" bekannten Verfahren von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham™Protran™ 0,45 µm NC, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) übertragen (geblottet). Beim Blotten wird ein senkrecht zum Gel wirkender Stromfluss angelegt, sodass die Proteine auf die Membran übertragen werden. Die mit SDS beladenen und dadurch negativ geladenen Proteine wandern hierbei zur Anode. Die Immobilisierung der Proteine erfolgt dann durch ionische und polare Wechselwirkungen an der Membran. Das zuvor im SDS-Page erzeugte Auftrennungsmuster der Proteine bleibt dabei vollständig erhalten (Southern, 1975; Renart *et al.*, 1979). Die verwendete Methode folgte einem *Semi-Dry-Blotverfahren* (Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell, Bio-Rad), wobei die verwendeten Membranen und Filter (3 MM CHR, Whatman™, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) zunächst für ca. 10 min in Blotpuffer initialisiert wurden, um den Stromfluss im System zu gewährleisten. Das SDS-Gel wurde blasenfrei auf die Membran aufgelegt. Je zwei mit Blotpuffer getränkte Filter unterhalb der Membran und über dem Gel dienten der Leitung des Stromflusses (Sandwich-Verfahren). Die Prozedur erfolgte stets über eine Dauer von 1:10 h und mit einer Stromstärke von 55 mA je Blot. Um unspezifische Bindungen der Membran abzusättigen, wurde der Blot anschließend in einer Blockierungslösung (TBS/T) mit 5% Magermilch inkubiert (1 h, RT, schüttelnd). Die anschließende Inkubation mit dem für das zu untersuchende Protein spezifischen Antikörper erfolgte über Nacht, wippend bei 4°C. Am Folgetag wurde der Blot zunächst drei Mal für je 20 min mit TBS/T gewaschen, um ungebundenen Primärantikörper zu entfernen. Im Anschluss wurde jeder Blot für mindestens eine Stunde bei RT schüttelnd mit einem passenden Meerrettich-Peroxidase (HRP)

gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Dreimaliges Waschen (20 min) entfernte auch hier im Anschluss ungebundene Antikörper Rückstände.

Die Detektion erfolgte durch Zugabe von 1 ml ECL-Lösung (1:1 Luminolreagenz und oxidierende Reagenz; Western Lightning® Plus-ECL, PerkinElmer, Rodgau Jügesheim). Die oxidierende Reagenz besteht aus Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Natronlauge (NaOH) und dient als Aktivator der Reaktion. In Anwesenheit eines Katalysators wie Eisenverbindungen wird das Peroxid unter Bildung von Sauerstoff und Wasser zersetzt. Manche Enzyme (wie hier HRP) können ebenso als Katalysatoren der Reaktion dienen.

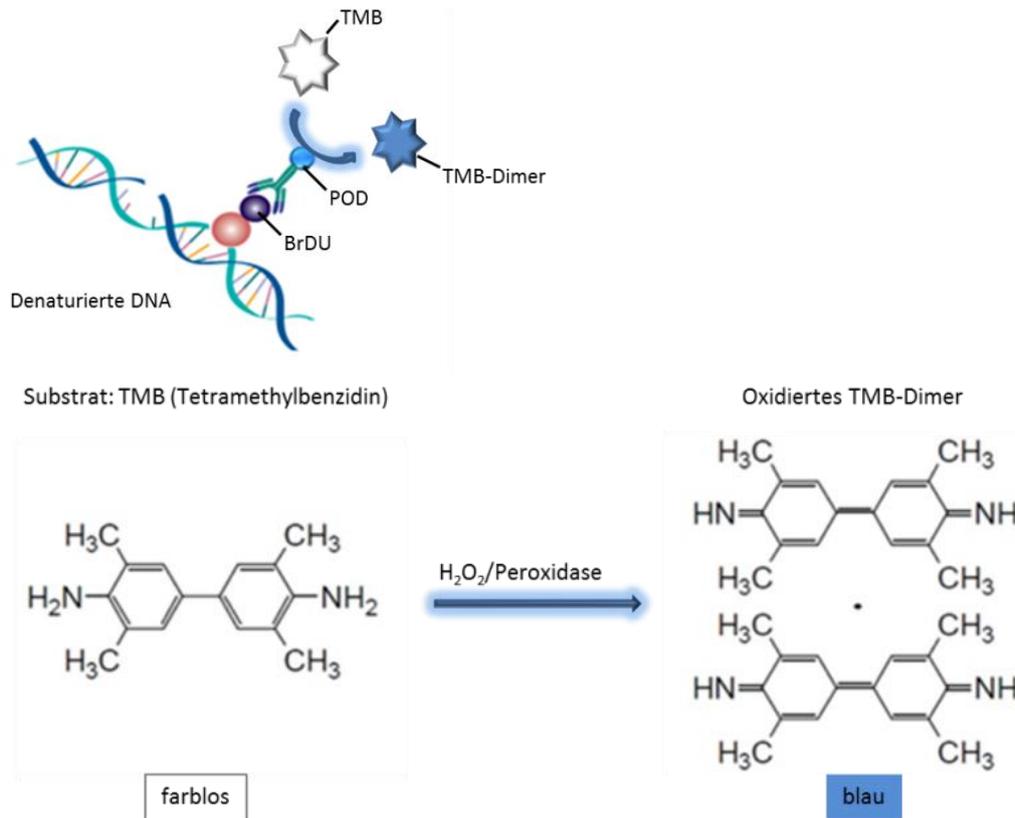
Reagiert Luminol mit NaOH, wird ein Dianion gebildet, welches mit dem aus der Katalyse des  $H_2O_2$  freiwerdenden Sauerstoff reagiert. Das Produkt dieser Reaktion ist ein organisches Peroxid, welches energiereich, aber sehr instabil ist (Triplett-Zustand). Durch den Übergang des Elektrons aus dem angeregten in den Singulett-Grundzustand wird ein Photon im blauen Bereich des Lichtspektrums emittiert (Chemilumineszenz).

Die Detektion der entstehenden Lumineszenz wurde mittels des Molecular Imager ChemiDoc™ XRS System (Bio-Rad, München) dokumentiert. Die Intensität der erhaltenen Banden konnte im Anschluss semiquantitativ, densitometrisch mit Hilfe der ImageLab Software 4.0.1 (Bio-Rad, München) ermittelt werden.

### **3.7 Zellkulturbasierte Assays**

#### **3.7.1 Testung der Proliferationsrate mittels BrdU-Assay**

Um die Proliferationsrate von Zellen zu bestimmen, wurde das BrdU-Kit von Roche (Basel, Schweiz) verwendet und der Assay nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Methode basiert darauf, dass zu proliferierenden Zellen 5-bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) zugegeben wird. BrdU ist ein Thymidin-Analogon, welches in der S-Phase in die neusynthetisierte DNA sich teilender Zellen eingebaut wird. Die Zellen werden zu einem definierten Zeitpunkt fixiert, die DNA denaturiert und das BrdU mittels eines spezifischen Antikörpers detektiert. Der Antikörper ist Peroxidase gekoppelt, wodurch das zugefügte farblose Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem blauen Produkt (oxidiertes TMB-Dimer) umgesetzt wird. Das Ausmaß der Farbreaktion ist dabei proportional zum Einbau des BrdU und damit zur neusynthetisierten DNA. Dies spiegelt wiederum die Proliferationsrate wider (Abb. 3.2).

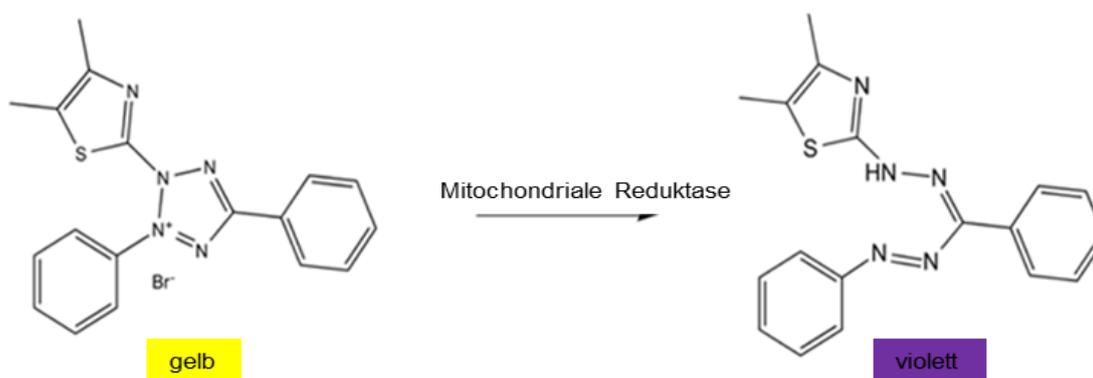


**Abb. 3.2: Prinzip der BrdU-basierten Proliferationsmessung.** Das Thymidinanalogon 5-bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) inkorporiert in die während der Proliferation neu synthetisierte DNA und kann nach der Denaturierung der DNA mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Dieser ist mit Peroxidase gekoppelt, welche ein zugegebenes farbloses TMB-Substrat in ein blaues Produkt umsetzt.

Es wurde eine Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt (siehe 3.1.2.2) und davon je  $100 \mu\text{l}$  in die Wells einer transparenten 96-Well-Platte ausgesät. Die zu untersuchenden Konzentrationen von Eap (0, 5, 10, 20,  $40 \mu\text{g/ml}$  natives Eap, sowie ProteinaseK verdautes Eap ( $40 \mu\text{g/ml} = 40^{\text{PK}}$ )) wurden direkt zu den frisch ausgesäten Zellen gegeben. Die Well-Platte wurde dann über 72 h im Brutschrank inkubiert. Um einen Randeffekt zu vermeiden, wurden stets die äußersten Wells der Platte mit  $100 \mu\text{l}$  autoklaviertem MilliQ- $\text{H}_2\text{O}$  befüllt. Nach Ablauf der 72 h wurde in jedes Well  $10 \mu\text{l}$  der BrdU-Lösung (BrdU 1:100 in sterilem Medium) zugegeben und der Versuchsansätze erneut für 24 h im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen für 30 min bei RT mit der im Kit enthaltenen Fixier- und Denaturierungslösung (FixDenat) fixiert und denaturiert. Nach Abnahme der FixDenat wurde der Peroxidase-gekoppelte Antikörper zugegeben und die Zellen für 90 min bei RT inkubiert. Nach drei Waschschritten mit je  $300 \mu\text{l}$   $1 \times$  PBS wurden  $100 \mu\text{l}$  Substratlösung zugegeben und der Ansatz für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Detektion der Farbreaktion erfolgte am TECAN infinite M200 Platereader (TECAN, Crailsheim).

### 3.7.2 Testung der Stoffwechselrate mittels MTT-Assay

Die MTT-Assays wurden als weiterer Versuchsansatz zur Darstellung der Proliferationsrate durchgeführt. Dieser Test stellt im eigentlichen Sinne das Maß der Glykolyserate und darüber die Viabilität von Zellen in Kultur dar. Er wird aber auch regelmäßig als Proliferationsassay verwendet (Mosmann, 1983; Cory *et al.*, 1991; Bernas & Dobrucki, 2002). MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) ist ein wasserlöslicher, gelber Farbstoff (Tetrazoliumsalz, Sigma-Aldrich, Steinheim), der in Anwesenheit vitaler, Stoffwechsel betreibender Zellen sowohl durch die pyridinhaltigen Reduktionsäquivalente NADH und NADPH, als auch durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen in ein wasserunlösliches, violettes Formazan reduziert wird (Abb. 3.3). Die Intensität des Farbumschlags ist daher Maß für die Stoffwechselleistung und deswegen für die Viabilität der vorhandenen Zellen. Dies stellt damit ein indirektes Maß der Proliferation dar, da mehr vitale Zellen in diesem Fall auf mehr Proliferation schließen lassen (Mosmann, 1983; Cory *et al.*, 1991; Bernas & Dobrucki, 2002).



**Abb. 3.3: Prinzip des MTT-Assays.** Die Aktivität mitochondrialer Reduktasen reduziert das gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid MTT zu einem violetten Formazan.

Für diesen Assay wurde eine Zellzahl von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt (siehe 3.1.2.2) und je 100  $\mu$ l in die Wells einer transparenten 96-Well-Platte ausgesät. Die zu untersuchenden Konzentrationen von Eap (0, 5, 10, 20, 40  $\mu$ g/ml natives Eap, sowie Proteinase K verdautes Eap (40<sup>PK</sup>)) wurden direkt zu den frisch ausgesäten Zellen gegeben. Die Well-Platte wurde dann über 96 h im Brutschrank inkubiert. Um einen Randeffekt zu vermeiden, wurden stets die äußersten Wells der Platte mit 100  $\mu$ l autoklaviertem MilliQ-H<sub>2</sub>O befüllt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde in jedes Well 100  $\mu$ l auf 37°C vorgewärmte MTT-Lösung hinzu pipettiert und der Versuchsansatz für weitere 2 h im Brutschrank weiter inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die 200  $\mu$ l Überstand von den Zellen abgenommen und je 100  $\mu$ l Extraktionsreagenz pro Well zugegeben. Die Extraktion erfolgte über 1-2 h auf dem Orbitalschüttler (Standard Analog Shaker, VWR International, Radnor, USA) im Dunkeln.

Durch leichtes Klopfen an den Plattenrand wurde sichergestellt, dass sich der Farbstoff gleichmäßig in den Wells verteilt. Die Absorptionsmessung erfolgte am ELISA-Reader (SUNRISEplate reader und Magellan V5.03 software, TECAN, Crailsheim) bei 492 gegen 620 nm.

#### 3.7.3 Zellen in Echtzeiterfassung mit dem RTCA-Assay (E-Plate)

Um die Kinetik des Effekts von Eap auf die Zellproliferation näher zu untersuchen, wurde ein so genanntes xCELLigence RTCA (engl. "real-time cell analyzer") System genutzt. Dieses System basiert auf Well-Plates, deren Boden mit Goldmikroelektroden besetzt ist (E-Plates) (Roshan Moniri *et al.*, 2015). Wachsen Zellen auf den Elektroden fest, steigt die elektrische Impedanz zwischen Elektrode und umgebenden Medium. Dieser Anstieg ist proportional zu der mit Zellen bewachsenen Fläche des Well-Bodens und wird als Zellindex bezeichnet. Der Anstieg des Zellindex bildet, unter der Annahme, dass sich die Zellgröße der proliferierenden Zellen nicht maßgeblich verändert, daher die Wachstumsrate der Zellen im Well ab. Untersucht wurde in diesem Assay die Proliferation von HaCaT Zellen. Es wurde eine Zellzahl von  $1 \times 10^4$  Zellen je Well als optimale Zellzahl für den Beginn des Experiments ermittelt. Zunächst wurden 50  $\mu$ l Vollmedium in die Wells der 96-Well E-Plate (ACEA Biosciences Inc., San Diego, USA) gegeben und Impedanz des Hintergrunds zu bestimmen. Die Zellen wurden anschließend in weiteren 50  $\mu$ l Vollmedium ausgesät und für 24 h anwachsen lassen. Dann erfolgte die Zugabe von weiteren 50  $\mu$ l Vollmedium, welches die auf 150  $\mu$ l kalkulierten Eap-Konzentrationen enthielt (0, 40  $\mu$ g/ml). Die Proliferation/Veränderung der Zellgröße der Zellen wurde durch das System für weitere 72 h als Anstieg der Impedanz detektiert und als Zellindex dargestellt (RTCA 2.0 Software, ACEA Biosciences Inc., San Diego, USA).

#### 3.7.4 Untersuchungen zu Auswirkungen von Eap auf die Morphologie von Keratinozyten (HaCaT) im "Cell Observer" (CO)-System

Um die Auswirkungen von Eap auf die Morphologie von Keratinozyten zu untersuchen, wurden HaCaT Zellen mit einem pmax-Lifeact-mEGFP Plasmid transfiziert. So konnten zelluläre Veränderungen über die Darstellung des Aktinzytoskeletts besser dargestellt werden. Der hierfür verwendete Vektor kodiert für Lifeact, ein Peptid, das vom Abp140 Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* abgeleitet ist. Dieses Protein ist in der Lage, F-Aktin *in vivo* zu binden, ohne Funktionseinschränkungen der Aktindynamik zu verursachen (Riedl *et al.*, 2008; Riedl *et al.*, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass die ersten 17 Aminosäuren des

Abp140 ausreichen, um die F-Aktinbindung zu vermitteln (Riedl *et al.*, 2008). Aufgrund der Tatsache, dass Apb140 in *S. cerevisiae* und nah verwandten Spezies hochkonserviert ist, jedoch in höheren Eukaryoten keine homologen Sequenzen vorkommen, macht es unwahrscheinlich, dass es zu Kompetitionen mit endogenen Proteinen kommt. Zur Visualisierung des F-Aktinskeletts wurde Lifeact C-terminal mit GFP fusioniert (Riedl *et al.*, 2008). Dazu wurde die DNA Sequenz (Primer siehe Tab. 2.13) des Lifeact Peptids in eine modifizierte Variante des pmaxGFP®-Plasmids (Lonza) in einen Leseramen mit der monomeren Variante von EGFP ligiert (Martin *et al.*, 2005). Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Lifeact-Plasmid wurde von der AG Hoth (CIPMM) zur Verfügung gestellt.

#### **3.8.4.1 Transfektion der HaCaT Zellen mit dem pmax-Lifeact-mEGFP Plasmid (Nucleofection®)**

Es wurde das Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit V von Lonza (Basel, Schweiz) verwendet um HaCaT Zellen zu transfizieren. Die Zellen wurden wie zuvor trypsiniert, die Zellzahl bestimmt und  $2,5 \times 10^6$  Zellen bei 90 x g bei RT über 10 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 100 µl Nucleofector® Lösung resuspendiert und mit 1 µg pmax-Lifeact-mEGFP Plasmid (Stock 0,5 µg/ml) versetzt. Die Zellsuspension wurde in eine Transfektionscuvette übertragen und die Transfektion im Nucleofector™ Device II (Lonza, Basel, Schweiz) mittels des Programms U-020 durchgeführt. Anschließend wurde vorsichtig 500 µl auf 37°C vorgewärmtes Vollmedium zugegeben und die Zellen tropfenweise auf die vorbereiteten Glasdeckgläschen (Ø 25 mm, 1.5, Kindler) ausgesät. Die sterilgebackenen Deckgläschen wurden zuvor mit einer sterilen Pinzette vorsichtig in 6-Well-Platten ausgelegt und mit 3 ml auf 37°C angewärmtem Vollmedium überschichtet. Vor Versuchsbeginn konnten die Zellen mindestens über Nacht auf den Deckgläschen anwachsen. Genutzt wurden die Zellen maximal bis 48 h nach der Transfektion. Es wurden, wie vom Hersteller prognostiziert, Transfektionseffizienzen von ca. 40% erreicht. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit V, sowie das Nucleofector™ Device II für die Transfektion der Keratinozyten, wurde von der AG Hoth (CIPMM) zur Verfügung gestellt.

#### **3.8.4.2 Assay zur Beobachtung von zellmorphologischen Veränderungen im "Cell Observer" (CO)-System**

Die Deckgläschen mit den 24-48 h zuvor transfizierten Zellen wurden vorsichtig in den Haltering des Cell Observer (Zeiss, Wetzlar) Systems eingespannt, mit 1x PBS gespült und dann mit frischem, vorgewärmten, serumfreien Medium überschichtet. Das Medium wurde

mit 7 µg/ml des Proliferationshemmstoffs Aphidicolin supplementiert, um die Proliferation der Zellen zu inhibieren. Aphidicolin setzt die DNA-Polymerasen  $\alpha$  und  $\delta$  außer Funktion (Ikegami *et al.*, 1978; Goscin & Byrnes, 1982) und hemmt damit die Replikation der DNA. Dadurch verbleiben die Zellen in der frühen S-Phase. Aphidicolin dient in Zellkulturen als Zytostatikum, um Zellen zu synchronisieren, oder die Proliferation zu inhibieren. Im Versuchsverlauf erfolgte zum gleichen Zeitpunkt wie die Zugabe von Aphidicolin auch die Supplementation mit 40 µg/ml Eap in den Eap-behandelten Ansätzen. Die Zellen wurden im Cell Observer System unter gleichbleibenden Bedingungen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zu Beginn des Versuchs wurden Zellen mit gesundem Erscheinungsbild und gutem GFP-Signal ausgewählt und über die Gesamtdauer von 15 h überwacht. Die morphologischen Veränderungen der Zellen wurden mittels eines Fluar 20x/0.75 Objektivs mit 2,5-facher Verstärkung softwaregesteuert dokumentiert. Die Häufigkeit der Aufnahmeintervalle wurde auf 20 min festgelegt. Die Bilder wurden stets im Hellfeldkanal mittels Halogenlampe und die GFP-Fluoreszenz mittels LED (470 nm) und dem Filter 38HE (Zeiss, Wetzlar) aufgenommen. Die morphologischen Veränderungen wurden als Änderung der Längen/Breiten-Ratio dargestellt. Die Ausmessung der Zellen erfolgte mittels der ImageJ Software V1.49. Die Messungen am CO erfolgten unter Anleitung von C. Backes in der AG Hoth (CIPMM).

#### 3.7.5 Migrationsassays

##### 3.7.5.1 Ibidi-Assay

Um den Einfluss von Eap auf die Migrationsfähigkeit von Zellen zu prüfen, wurden Lückenschluss-Assays mittels Ibidi-Zellkultureinsätzen durchgeführt. Dabei wurden die selbsthaftenden Silikoneinsätze mittels einer sterilen Pinzette in 24-Well-Platten mittig positioniert. Anschließend wurden HaCaT Zellen mit einer Zellzahl von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml um den Einsatz herum ausgesät. Am Folgetag wurde der Einsatz entfernt und die Zellen vorsichtig mit 1x PBS gespült, um nichtadhärente Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Medium ohne FKS, jedoch mit 7 µg/ml Aphidicolin und 200 ng/ml EGF (engl. "epithelial growth factor") überschichtet. Der Proliferationshemmstoff Aphidicolin gewährleistet, dass der beobachtete Lückenschluss einzig auf Migration und nicht auf Proliferation der Zellen beruht. Das enthaltene EGF induzierte die Migration der Zellen. Den Zellen wurden zudem verschiedene Eap-Konzentrationen (0, 5, 10, 20 und 40 µg/ml) zugefügt. PK verdautes Eap (40<sup>PK</sup>) diente als zweite Kontrolle. Direkt zu Beginn des Assays wurde von den Lücken ein Lichtbild mit einem 10x Objektiv (DMI4000 B, Leica, Wetzlar, Germany) generiert (Zeitpunkt t<sub>0</sub>) und die Well-Platte dann für 16 h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde erneut eine Aufnahme der Lücke gemacht (t<sub>16</sub>). Die

Lücken zu den Zeitpunkten t<sub>0</sub> und t<sub>16</sub> wurden mittels ImageJ 1.49 Software ausgemessen und die Relation zueinander bestimmt, um die Effizienz des Lückenschluss zu ermitteln.

#### 3.7.5.2 Oris-Migrationsassay

2017 wurde vom bisher verwendeten Ibidi-Stempel basierten Migrationsassay auf den Oris™ Migrationsassay von Platypus Technologies (Madison, USA) umgestellt. Da dieser Assay im 96-Well Format durchgeführt wird, können bei geringerem Verbrauch von Agenzien zeitgleich mehr Ansätze untersucht werden. Zudem ermöglicht die Verwendung des EnSight™ Plattenlesegeräts eine automatisierte Auswertung. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Stempel wurden mit einer sterilen Pinzette in eine 96-Well-Platte mit schwarzem Rand und karem Boden (Nalge Nunc International, Rochester, USA) eingesetzt. Die Zellen wurden wie in 3.1.2.2 beschrieben und auf eine definierte Zellzahl in Mangelmedium (1% FKS) eingestellt, um die Zellen zu hungern. Bei HaCaT, EA.hy926 und BJ wurde eine Zellzahl von  $4,5 \times 10^5$  Zellen/ml und bei RT-112 und 5637 aufgrund der höheren Proliferationsrate eine Zellzahl von  $3,5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Von diesen Zellsuspensionen wurden 100 µl je Well um den Stempel ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am Folgetag wurden die Stempel mit dem im Kit enthaltenen Spatel gezogen, wodurch eine definierte, runde Lücke im Zellrasen frei wurde. Das Mangelmedium wurde abgesaugt, die Zellen mit 100 µl 1x PBS je Well gespült und dann mit FKS-supplementiertem Vollmedium überschichtet. Die im Vollmedium enthaltenen Wachstumsfaktoren (aus den 10% FKS) induzierten die Migration der Zellen. Dem Medium wurde Aphidicolin (7 µg/ml) zugesetzt um die Proliferation zu unterdrücken und sicherzustellen, dass die beobachteten Effekte auf Migrationsereignissen beruhen. Den Versuchsansätzen wurden zudem steigende Eap-Kontrationen (5, 10, 40 [µg/ml]) zugegeben, PK-Eap (40<sup>PK</sup>) diente als zweite Kontrolle. Die gezogenen Stempel wurden über Nacht in 70% EtOH eingelegt, autoklaviert und wiederverwendet. Die Messung der Migration erfolgte nach definierten Zeiten (HaCaT, EA.hy926 und BJ t<sub>48</sub>, RT-112 und 5637 t<sub>24</sub>) im EnSight™ Plattenlesegerät (PerkinElmer, Rodgau Jügesheim). Die Auswertung wurde mittels der Kaleido Software V2.0 (PerkinElmer, Rodgau Jügesheim) durchgeführt, welche die Konfluenz der in die Lücke migrierten Zellen bestimmte.

#### 3.7.5.3 Zellmobilitätsassay

Um den Einfluss von Eap auf die Mobilität von Zellen auf Einzelzellebene zu betrachten, wurden, wie in den vorangegangenen Morphologie-Assays, pmax-Lifeact-mEGFP Plasmid

transfizierte HaCaT Zellen genutzt (siehe 3.8.4.1). Die Deckgläschen mit den transfizierten Zellen wurden in das CO-System (Zeiss, Wetzlar) eingespannt. Die Zellen wurden mit 1x PBS gespült und dann mit frischem, auf 37°C vorgewärmtem, serumfreiem Medium mit 7 µg/ml Aphidicolin überschichtet. Die Eap behandelten Zellen wurden zudem mit 40 µg/ml Eap über 16 h präinkubiert. Am Folgetag wurde das Medium zusätzlich mit 200 ng/ml EGF versetzt, um die Migration der Zellen zu induzieren. Die Mobilität der Zellen wurde mittels des Fluar 20x/0.75 Objektivs über einen Zeitraum von 15 h beobachtet und in Aufnahmeintervallen von 5 min dokumentiert. Die Bilder wurden stets im Hellfeldkanal mittels Halogenlampe und die GFP-Fluoreszenz mittels LED (470 nm) und dem Filter 38HE (Zeiss, Wetzlar) aufgenommen. Die Ausmessung der Länge der Migrationswege von Einzelzellen erfolgte manuell mit Hilfe der AxioVision Software 4.8.3 (Zeiss, Wetzlar). Die Messungen am CO erfolgten unter Anleitung von C. Backes in der AG Hoth (CIPMM).

#### 3.7.6 Untersuchung des Eap-Effekts auf die Apoptose und Nekrose von Zellen

Um zu prüfen, ob die Eap-Effekte auf die Proliferation, Stoffwechselrate und Migration möglicherweise nur in einer Zytotoxizität des Eap begründet sind, wurde die Apoptose und Nekrose der untersuchten Zelllinien unter Eap-Einfluß mittels des Apoptotic/Necrotic Cells Detection Kit (PromoKine, PromoCell GmbH, Heidelberg) analysiert. Dazu wurden an Tag 1 die Zellen der verschiedenen Zelllinien mit einer Zellzahl von  $3,5 \times 10^5$  in 24 Well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht mit Eap inkubiert (0, 40, 40<sup>PK</sup>). Die zweite Negativkontrolle (40<sup>PK</sup>) wurde nicht in allen Versuchsdurchläufen mitgeführt, da die Probenmenge durch das System und die Versuchsdurchführung (die Messung muss innerhalb einer Stunde nach Färbung erfolgen) begrenzt war. In den mitgeführten Ansätzen zeigte 40<sup>PK</sup> jedoch keine Unterschiede zu der Kontrollsituation ohne Eap. Am Folgetag wurden die Zellrasen mit 1x PBS gewaschen, abtrypsiniert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (1400 x g, 3 min) wurde das Zellpellet erneut mit 1x PBS gewaschen und nachfolgend abzentrifugiert (1400 x g, 3 min). Die sedimentierten Zellen wurden dann in 100 µl 1x Bindepuffer (1:5 mit autoklaviertem MilliQ-H<sub>2</sub>O verdünnte Stocklösung) aufgenommen. Es wurden je Ansatz 3 µl FITC-Annexin V und 3 µl Ethidium Homodimer III (EthD-III) zugegeben und die Ansätze für 15 min im Dunkeln inkubiert. Nach Abschluss der Färbung wurden weitere 400 µl Bindepuffer je Ansatz zugegeben und die Proben in FACS-Röhrchen überführt. Die Proben wurden innerhalb einer Stunde am Durchflusszytometer (FACS, engl. „fluorescence-activated cell sorting“) gemessen (Canto II, Becton Dickinson, Heidelberg). Die abschließende Auswertung erfolgte mittels der FACSDIVA™ Software V6.1.3 (Becton Dickinson, Heidelberg). Die Zellen in früher Apoptose wurden lediglich Annexin V, nekrotische Zellen lediglich EthD-IIIgefärbt, während

spätapoptotische Zellen sowohl Annexin V, als auch EthD-III positiv waren. Dies basiert auf der unterschiedlichen Wirkweise der Markersubstanzen. Der gerichtete Zelltod (Apoptose) ist mit zahlreichen aktiven und geregelten Abläufen und strukturellen Veränderungen in der Zelle verbunden. Eine davon ist die Translokation des Phosphatidylserins (PS) vom Innern der Zelle an deren Außenseite. Annexin V bindet an PS und kann dieses markieren. Die Kopplung mit dem Fluorescein FITC (Fluorescein Isothiocyanat) ermöglicht die Detektion durch Fluoreszenzmessung mit einer Anregung bei 492 nm und einer Emission bei 514 nm. Nekrotische Zellen hingegen verlieren ihre Membranintegrität. Das normalerweise nicht membrangängige EthD-III kann daher nur in solche Zellen eindringen, wo es irreversibel an die DNA bindet. Durch Anregung bei 528 nm fluoresziert EthD-III intensiv im roten Spektrum (617 nm). Intakte, gesunde Zellen zeigen nur eine geringe Eigenfluoreszenz und können daher gut von nekrotischen und apoptotischen Zellen unterschieden werden. Als Positivkontrolle zum Generieren des Auswertungsprogramms diente Staurosporin (2,5 µg/ml), ein Indolcabazol des Actinobakteriums *Streptomyces staurosporeus*, das als Kinasehemmer zum Arrest des Zellzyklus und zu einer Induktion der Apoptose über Caspase 3 führt.

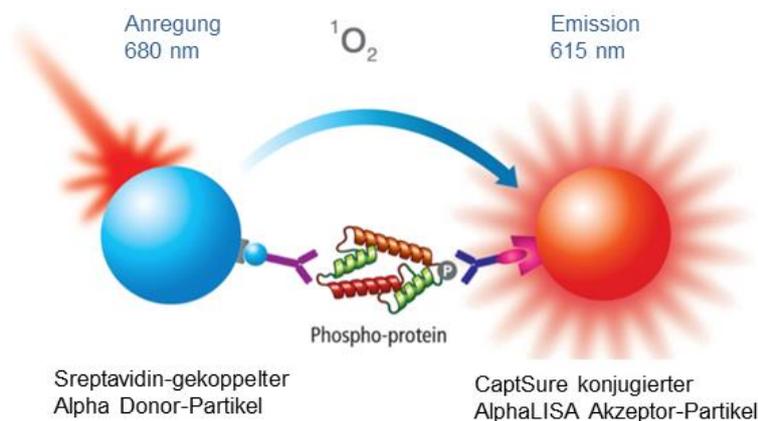
#### 3.7.7 Betrachtung der Sphäroidbildung

Um die Auswirkungen von Eap auf die Ausbildung und den Erhalt von Sphäroiden als einfaches *in vitro* 3D-Tumormodell zu untersuchen, wurden Zellen der urothelialen Blasenkarzinomzelllinien RT112 und 5637 mit einer Zellzahl von  $1,5 \times 10^5$  Zellen/ml zu je 100 µl in die Wells einer 96-Well Rundboden-Platte ausgesät. Die Oberfläche dieser Well-Platte ist so gestaltet, dass die darin wachsenden Zellen nicht an die Well-Oberfläche adhären können. Dies begünstigt die Aggregation der Zellen und so das Auswachsen von Sphäroiden, die sich am tiefsten Punkt des Wells wiederfinden. Das Wachstumsmedium wurde mit verschiedenen Eap-Konzentrationen (0, 10, 40, 40<sup>PK</sup> µg/ml) supplementiert. Die Dokumentation des Sphäroidwachstums erfolgte nach 72 h mittels des im EnSight™ Plattenlesegerät enthaltenen Bildsystems und die Auswertung der Sphäroidentwicklung (Ausdehnung) mit Hilfe von ImageJ V1.49.

#### 3.7.8 AlphaLISA® SureFire® Ultra™ HV p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) Assay

Um den Einfluss von Eap auf die Erk1/2-Phosphorylierung in den beiden untersuchten Blasenkarzinomzelllinien zu untersuchen, wurde ein AlphaLISA® SureFire® Ultra™ HV Assay (PerkinElmer, Rodgau Jügesheim) verwendet. Dieser dient der Erfassung des

Phosphorylierungsstatus der endogenen Erk1/2-Kinase (engl. "extracellular signal-regulated kinase 1 and 2") in zellulären Lysaten. Dies ermöglicht es, Substanzen auf ihren Einfluss auf die Signaltransduktion der Ras-Raf-MEK-Erk1/2 Signalkaskade oberhalb von Erk1/2 zu testen. Durch den Einsatz zweier Antikörper wird sowohl das an Thr202/Tyr204 phosphorylierte Erk1/2, als auch ein distales Epitop von Erk1/2 erkannt. Es werden zudem zwei Arten von Mikropartikeln verwendet. Die Akzeptor-Partikel sind mit dem sog. "CaptSure™" Agens gekoppelt, welches an den Antikörper bindet, der gegen das phosphorylierte Epitop gerichtet ist. Die Donor-Partikel sind mit Streptavidin gekoppelt und binden daher an den gegen das distale Erk1/2 Epitop gerichteten Antikörper, der biotinyliert ist. In Anwesenheit von phosphoryliertem Erk1/2 gelangen so die beiden Mikropartikelarten in räumliche Nähe zueinander. Der Donor-Partikel kann in einem geeigneten Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 680 nm angeregt werden und diese Anregung (das "Alpha Signal") auf den Akzeptor-Partikel übertragen, welcher dann bei 615 nm emittiert. Die Emission ist dabei proportional zur Menge an phosphoryliertem Erk1/2 (siehe Abb 3.5).



**Abb. 3.4:** Darstellung des Testprinzips des AlphaLISA® SureFire® Ultra™ HV Assay. Der Donor-Partikel ist Streptavidin gekoppelt und bindet an die Biotinylierung des Antikörpers, der gegen das distale Erk1/2 Epitop gerichtet ist. Der Akzeptor-Partikel bindet an den Antikörper welcher gegen das phosphorylierte Epitop von Erk1/2 gerichtet ist. Gelangen auf diese Weise die beiden Mikropartikelarten in räumliche Nähe zueinander, kann der bei 680 nm angeregte Donor die Anregung auf den Akzeptor übertragen, welcher dann bei 615 nm Licht emittiert.

Im Rahmen der Versuchsdurchführung wurden Blasenkarzinomzellen der Zelllinien RT112 und 5637 auf eine definierte Zellzahl von  $3 \times 10^5/\text{ml}$  eingestellt und davon 100  $\mu\text{l}$  je Well in eine 96-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht bebrütet und am Folgetag wurde das Vollmedium abgenommen und die Zellen für 4 Stunden in Medium ohne FKS gehungert. Anschließend wurde einem Teil der Zellen für eine Stunde Eap (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zugesetzt. Die Aktivierung der Signaltransduktionen erfolgte durch erneuten Austausch des Mangelmediums mit Vollmedium und die weitere Inkubation für 8 min. Für die anschließende Zelllyse wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und in 1x Zelllysepuffer auf dem

Orbitalschüttler für 10 min lysiert. Die Lysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C weggefroren. Die Durchführung des Assays erfolgte nach Herstellerangaben mit 30 µl Lysat in weißen 96-Well-Platten mit halber Fläche (engl. "half-area plates"). Die Auswertung erfolgte im EnSight™ Plattenlesegerät mittels der Kaleido Software V2.0 (PerkinElmer, Rodgau Jügesheim). Um die Proben auf die Gesamtproteinkonzentration normalisieren zu können, wurde zudem ein BCA-Assay durchgeführt (siehe 3.2.5).

### 3.8 Rasterkraftmessungen mittels "Atomic force microscopy" AFM

Die Rasterkraftmikroskopie ist ein Verfahren, das in der Mikrobiologie zunehmend an Bedeutung gewinnt. Da das System es ermöglicht, in wässrigem Milieu zu messen, können lebende Zellen in Medium auf ihre Eigenschaften hin untersucht werden. Die zugrundeliegende Technik basiert auf dem Prinzip eines Federbalkens (Cantilever), an dem eine sehr feine Messsonde (nur einige Nanometer im Durchmesser) befestigt wird. Wird die Sonde nun über eine Probe, wie etwa eine Zelle bewegt, so wird sie durch die Oberflächentopographie der Probe abgelenkt. Die Messbewegungen der Sonde werden durch einen Laser erfasst, der auf ihre Rückseite ausgerichtet ist. Durch Auslenkung der Sonde ändert sich der Reflexionswinkel des Lasers, was wiederum von einer segmentierten Photodiode erfasst und durch das System in ein dreidimensionales Bild umgewandelt wird. Neben der Topographie können auch zahlreiche andere Charakteristika der Probe mittels AFM untersucht werden, darunter die Steifigkeit und das Volumen (Dufrene, 2002; Pillet *et al.*, 2014; Dufrene, 2015).

#### 3.8.1 Messungen der Topographischen Eigenschaften lebender Zellen

Am Vortag des Versuchs wurden die verwendeten Zellen (HaCaT und RT112) gesplittet und  $5 \times 10^4$  Zellen in 3 ml Medium in Zellkulturschalen mit Glasboden (FluoroDish™, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, USA) ausgesät und über Nacht im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Die adhären Zellen wurden am Folgetag zwei Mal mit 1x PBS gewaschen und konnten dann unter dem Rasterkraftmikroskop (engl. "Atomic force microscope", AFM) positioniert und gemessen werden. Die Abbildung lebender Zellen erfolgte in 1x PBS Puffer bei 37°C. Es wurde dazu das Bioscope Catalyst-AFM (Bruker, Santa Barbara, USA) verwendet, das über eine beheizbare Probenhalterung verfügt. Der Scanbereich entsprach 140 µm. Die Messungen wurden im so genannten "PeakForceQNM®mode" durchgeführt, bei dem die Spitze oszillierend der Probe angenähert wird. Die Probe wird an ihrem Umkehrpunkt berührt und so lokalmechanische Eigenschaften

die Elastizität und Steifigkeit gemessen. Aus diesen Daten kann dann ein topographisches Bild erzeugt werden. Dafür wurde eine v-förmiger DNP-B Cantilever mit einer Federkonstante von  $k = 0.12 \text{ N/m}$  und einem Spitzenradius von  $35 \text{ nm}$  verwendet (Bruker, Santa Barbara, USA). Die Bilddaten (Auflösung von  $1024 \times 1024$  Bildpunkten) wurden mit einer Aufpresskraft von  $600 \text{ pN}$  während des dynamischen Modus und einer Messgeschwindigkeit von  $10 \text{ }\mu\text{m/s}$  generiert. Zur Ermittlung der Steifigkeit der Zellen wurden Elastizitätskarten (Oliver & Pharr, 1992) unter Anwendung des Kontaktmodells nach Sneddon (Sneddon, 1965) und Berücksichtigung von Indentationstiefen von  $50\text{-}100 \text{ nm}$  (Guz *et al.*, 2014) erstellt und mit Hilfe der Analysesoftware Nanoscope V 1.40 (Bruker, Santa Barbara, USA) ausgewertet. Die Messungen am AFM erfolgten durch Henrik Peisker (IMMH), Probenvorbereitung und Datenauswertung durch die Erstellerin dieser Arbeit.

#### 3.8.2 Messungen der Adhäsionskraft von Zellen mittels FluidFM

Das System des FluidFM kombiniert Rasterkraftmikroskopie mit Nanofluidik. Der grundlegende Aufbau entspricht dem bereits beschriebenen AFM, jedoch sind Messspitze und Cantilever hohl und es können über ein Pumpsystem kleinste Saugdrücke angelegt werden. Damit ist es möglich, einzelne Zellen anzusaugen und beispielsweise die Kraft zu messen, die nötig ist um die Zelle von ihrem Substrat abzulösen (Adhäsionskraft). Die Zellen wurden wie schon in 8.3.1 beschrieben ausgesät. Die Messungen erfolgten in  $1\times \text{PBS}$  mittels des Flex-Fluidics AFM (Nanosurf GmbH, Langen) und der FluidFM technology (Potthoff *et al.*, 2012) (Cytosurge AG, Glattbrugg, Schweiz). Die Aufpresskraft auf die Zellen betrug  $5 \text{ nN}$  und es wurde ein Saugdruck von  $-350 \text{ mbar}$  an die hohlen fluidFM Cantilever (Cytosurge AG;  $k = 2 \text{ N/m}$ , Spitzenöffnung =  $8 \text{ }\mu\text{m}$ ) angelegt und die Zellen mit einer Geschwindigkeit von  $1 \text{ }\mu\text{m/s}$  abgelöst. Aus den erhaltenen Daten wurde die Adhäsionskraft mittels der SPIP Software ermittelt (Image Metrology, Hørsholm, Dänemark). Die Messungen am AFM erfolgten durch Henrik Peisker (IMMH), Probenvorbereitung und Datenauswertung durch die Erstellerin dieser Arbeit.

#### 3.8.3 Messung von DNA und Proteinen

Um im sehr kleinen, nanomolaren Bereich die Interaktion von Eap und DNA darzustellen, wurden Silizium-Plättchen (Siltronic AG, Burghausen) als Substrat verwendet, da sie eine sehr geringe Rauigkeit ( $0,09 \text{ nm}$ ) und eine sehr gut definierte Oberflächenchemie besitzen. Die Si-Plättchen besitzen eine native Silikon-Oxid-Schicht ( $D = 1,7 \text{ nm}$ ) und wurden durch Anheftung eines Monolayer von  $\text{CH}_3$ -terminierten Octadecyltrichlorosilan(OTS)-Molekülen

nach einem Standardprotokoll (Lessel *et al.*, 2015) hydrophobisiert. In einem als "DNA-Combing" bezeichneten Verfahren wurde nachfolgend DNA gerichtet auf die Oberfläche der Si-Plättchen aufgebracht. Hierzu wurden die hydrophoben Si-Plättchen in eine PBS/DNA-Lösung (100 ng/ml DNA in 1x PBS) getaucht und etwa 5 min inkubiert. Die DNA-Stränge in der Lösung, binden in pH-abhängiger Weise über eines, oder beide ihrer Enden an die chemisch modifizierte, hydrophobe Oberfläche (Allemand *et al.*, 1997). Die Si-Plättchen wurden dann langsam und bei konstanter Geschwindigkeit ( $v = 300 \mu\text{m/s}$ ) mittels eines motorisierten xyz-Achsen Manipulators (MM-92B, Narashige Gruppe, Tokyo, Japan) aus der Flüssigkeit gezogen. Die Zugkraft der Oberflächenspannung zieht die adhärenierte DNA auf der Si-Oberfläche in eine elongierte, gleichmäßige und parallele Form ( $\sim 2 \text{ kb}/800 \text{ nm}$ ). Die DNA ist nach diesem Prozess irreversibel auf der Oberfläche fixiert.

Die Messung am AFM erfolgte an der Luft mittels des Bioscope Catalyst (Bruker, Santa Barbara, USA) im ScanAsyst®-Modus. Es wurden ScanAsyst-Air Cantilever mit einer Federkonstante von  $0,5 \text{ N/m}$  (Bruker, Karlsruhe) verwendet und die angewandte Messgeschwindigkeit betrug  $< 5 \mu\text{m/s}$ . Die Bildbearbeitung und die Ausmessung der DNA-Stranglängen erfolgte mit Hilfe der frei verfügbaren Gwyddion Software (Version 2.36). Die Messungen am AFM erfolgten durch Henrik Peisker (IMMH). Die Vervielfältigung der verwendeten DNA (PCR) und der Restriktionsverdau der DNA-Fragmente erfolgte durch die Erstellerin dieser Arbeit.

#### 3.9 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Die Bearbeitung der Daten erfolgte zunächst in Excel (Microsoft Office 2010), hiermit erfolgte auch die Darstellung der RTCA-Daten.

Die statistische Auswertung der Daten und die graphische Darstellung erfolgte mittels der GraphPad Prism Software Version 6.01 unter Verwendung des Mann Whitney-U-Tests für ungepaarte, unparametrische Daten und des  $t$ -Test für ungepaarte Daten.  $p$ -Werte unter 0,05 wurden als signifikant (\*), unter 0,01 als sehr signifikant (\*\*) und unter 0,001 als hochsignifikant gewertet (\*\*\*).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Wachstumsverhalten und Transkriptionsanalysen der *eap*-Homologen von *S. aureus* Newman T.F. in THB

Als ein erstes Teilprojekt dieser Arbeit, wurde im Rahmen einer Kooperation mit der AG Rooijackers (Utrecht, Niederlande), das Wachstumsverhalten von *S. aureus* Newman T.F. in THB bestimmt und die Transkriptionsrate von *eap* und seinen Homologen *eapH1* und *eapH2* zu definierten Zeitpunkten mittels qPCR untersucht.

#### 4.1.1 Wachstumskurve von *S. aureus* Newman T.F. in Todd Hewitt Broth (THB)

Das *in vitro* Wachstumsverhalten von *S. aureus* Newman T.F. in THB unter aeroben Schüttelbedingungen (150 rpm) und 37°C wurde über einen Zeitraum von 12 h bestimmt (siehe auch 3.1.1.4). Die stündliche Messung der Absorption bei 600 nm ( $A_{600}$ ) erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten (1-12 h, siehe Abb. 4.1).

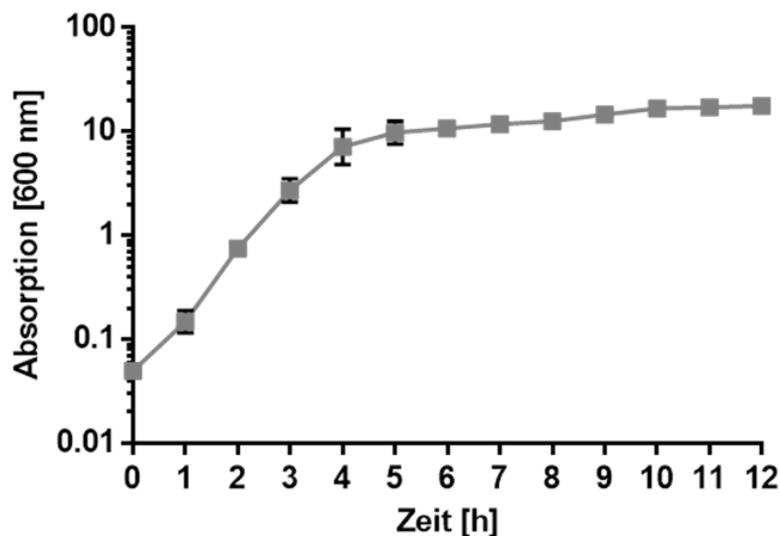


Abb. 4.1: Bestimmung des Wachstumsverhaltens von *S. aureus* Newman T.F. in THB über einen Zeitraum von 12 h, bei 37°C und 150 rpm. Das Wachstum wurde durch Probenentnahme zu den angegebenen Zeitpunkten und Messung der Absorption bei 600 nm ( $A_{600}$ ) bestimmt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) von 7 unabhängigen Experimenten.

Die Wachstumskurve zeigt in einem Zeitrahmen von 2,5-3 h eine Phase exponentiellen Wachstums. Zwischen 4 und 10 h nach Animpfen wies die Kultur dann ein postexponentielles Wachstum auf (Übergangsphase bei ca. 4 bis 5 h), bei der noch geraume Zeit ein moderater Zuwachs der  $A_{600}$  zu verzeichnen war. Nach 10 h trat das Keimwachstum

in die Stationäre Phase ein. Insgesamt wurden in THB nach 10-12 h vergleichsweise hohe  $A_{600}$  Werten von 16-18 erreicht.

### 4.1.2 Transkriptionsanalysen von *eap*, *eapH1* und *eapH2* in THB

Es wurden Transkriptionsanalysen von *eap* und der beiden *eap*-Homologe *eapH1* und *eapH2* mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) durchgeführt. Die Anzucht der Bakterien (*S. aureus* Newman T.F.) erfolgte in THB, dem für die weiterführenden Studien verwendeten Medium der AG Rooijackers (Utrecht, Niederlande). Aus der Kultur wurden in der exponentiellen Phase (3 h), der Übergangsphase (5 h), der postexponentiellen Phase (8 h) und in der stationären Phase (12 h) Proben entnommen und, wie in 3.6.2.1 + 3.6.2.2 beschrieben, für die qPCR vorbereitet. Die qPCR wurde wie in 3.6.2.3 beschrieben durchgeführt und der  $2^{-\Delta CT}$ -Wert ermittelt. Die Ergebnisse wurden auf die Werte des weitestgehend konstitutiv exprimierten Haushaltsgens *gyrB* relativiert (siehe Abb. 4.2). Es ergab sich für *eap* und *eapH2* ein Muster, das die höchste Transkriptionsrate in der postexponentiellen, für *eapH1* in der stationären Wachstumsphase andeutet.

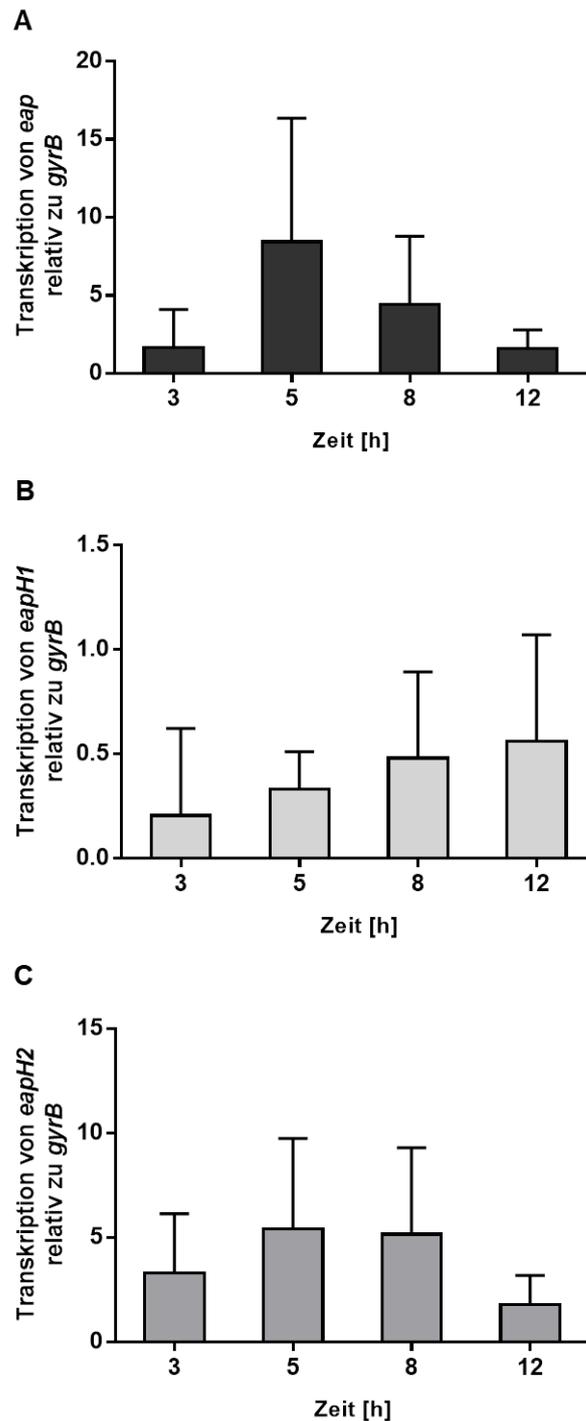


Abb. 4.2: Die Transkriptionsrate von *eap* und den Homologen *eapH1* und *eapH2* wurde mittels qPCR bestimmt und Relation zur der des Haushaltgens *gyrB* gesetzt. Die Anzucht von *S. aureus* Newman T.F. erfolgte in THB und die Probenahme erfolgte nach 3, 5, 8 und 12 h. Die qPCRs wurden je in Doppelansätzen mit der generierten cDNA durchgeführt und deren Mittelwerte in die Auswertung einbezogen. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus acht unabhängigen bakteriellen Kulturen.

### 4.2 Der Einfluss des extrazellulären Adhärenzproteins (Eap) auf zelluläre Vorgänge der Wundheilung

Es konnte in der Vergangenheit bereits in einem Wundmodell der Maus gezeigt werden, dass exogen zugefügtes Eap den Wundschluss verzögert (Athanasopoulos *et al.*, 2006). Die Autoren beobachteten in dieser Studie ebenfalls, dass Wunden, die mit Zellen einer *S. aureus*  $\Delta eap$  Mutante infiziert wurden, signifikant schneller verheilten als Wunden, die mit Eap produzierenden wildtypischen Bakterien infiziert wurden. Des Weiteren konnten die Autoren zeigen, dass Eap einen hemmenden Einfluss auf die Neovaskularisation in einem Matrigel basierten Assay im Mausmodell zeigt. Es wird hierbei ein mit Wachstumsfaktoren versetzter Gelpfropf subcutan appliziert und erfasst in welchem Maß die auswachsenden vaskulären Strukturen ihn über die Zeit infiltrieren. Die Quantifizierung erfolgt durch die rötliche Verfärbung des Gels, hervorgerufen durch die einwandernden Endothelzellen. Eap inhibiert die Infiltration, was womöglich auf einer reduzierten Proliferation der Endothelzellen beruht (Athanasopoulos *et al.*, 2006).

Um die Hintergründe dieses Phänomens näher zu beleuchten, wurde hier der Einfluss von Eap auf die drei Zelltypen -Keratinocyten, Endothelzellen und Fibroblasten- untersucht, die maßgeblich verantwortlich für den strukturierten und erfolgreichen Schluss einer kutanen Wunde sind.

#### 4.2.1 Der Einfluss von Eap auf die Proliferation und den Metabolismus am Wundschluss beteiligter Zelltypen

Es konnte in vorangegangenen Studien bereits ein proliferationshemmender Effekt auf verschiedene Zelltypen, wie die aus der menschlichen Nabelschnur isolierten, primären Endothelzellen (HUVEC, engl. *human umbilical vein endothelial cells*) (Athanasopoulos *et al.*, 2006), sowie T-Zellen und B-Zellen nachgewiesen werden (Jahreis *et al.*, 1995; Chavakis *et al.*, 2005; Haggart *et al.*, 2005). Es sollte in Anlehnung dazu der Effekt von Eap auf die Proliferation der an der Wundheilung maßgeblich beteiligten Zelltypen -Keratinocyten, Endothelzellen und Fibroblasten- untersucht werden.

Um den Einfluss von Eap auf die Zellvermehrung zu untersuchen, wurde ein Assay verwendet, der auf Basis der Inkorporation des Thymidinanalogons BrdU (5-bromo-2'-Deoxyuridin) in die neusynthetisierte DNA während der Zellteilung, die Proliferation quantifizierbar macht. Die untersuchten Zellen, deren Proliferation mit FKS induziert wurde, wurden, wie in (3.7.1) beschrieben, mit steigenden Eap Konzentrationen behandelt, der

Proliferationsassay nach Herstellerangaben durchgeführt und im EnSight™ Plattenlesegerät ausgewertet.

Um einen zweiten Nachweis für den Proliferationshemmenden Effekt von Eap auf die an der Wundheilung beteiligten Zelltypen zu erhalten wurde zusätzlich ein MTT-Test durchgeführt. Dieser Assay basiert auf der metabolischen Umsetzung des gelben Tetrazoliumsalzes MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid) durch mitochondriale Reduktasen in ein violettes Formazan. Der Test ermittelt daher eigentlich die Stoffwechselrate und somit die Viabilität der untersuchten Zellen, wird aber vielfach auch als indirekter Nachweis für die Proliferationsrate genutzt (Mosmann, 1983; Cory *et al.*, 1991; Bernas & Dobrucki, 2002).

Da die Proliferation (Einbau von BrdU in die DNA), sowie die Stoffwechsellistung (Umsatz von MTT) stets in Relation zur Kontrolle (ohne Eap) angegeben ist, sind im Apendix die ermittelten Werte tabellarisch dargestellt.

### **4.2.1.1 Der Einfluss von Eap auf die Proliferation und den Metabolismus der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT**

Keratinozyten stellen den Zelltyp dar, der letztlich den Schluss der Wunde gewährleistet. Sie wachsen hierfür von den Wundrändern her und aus der Tiefe der Wunde ein, was sowohl auf Proliferations- als auch Migrationsereignissen basiert. Am Ende schließt sich die Wunde und die erneute Überhäutung stellt die Barriere zwischen Organismus und Umwelt wieder her.

In beiden Assays (BrdU und MTT) konnte ein deutlicher, konzentrationsabhängiger Effekt von Eap auf die Proliferation bzw. die Vitalität der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT gezeigt werden, der ab einer Konzentration von 20 µg/ml im Vergleich zu einer Eap-freien Kontrolle signifikant wurde (siehe Abb 4.3). Als weitere Kontrolle, wurde Proteinase K verdautes Eap (40<sup>PK</sup>) verwendet (siehe 3.2.5). Es zeigte sich kein Unterschied zwischen 40<sup>PK</sup> und den Proben, ohne Eap.

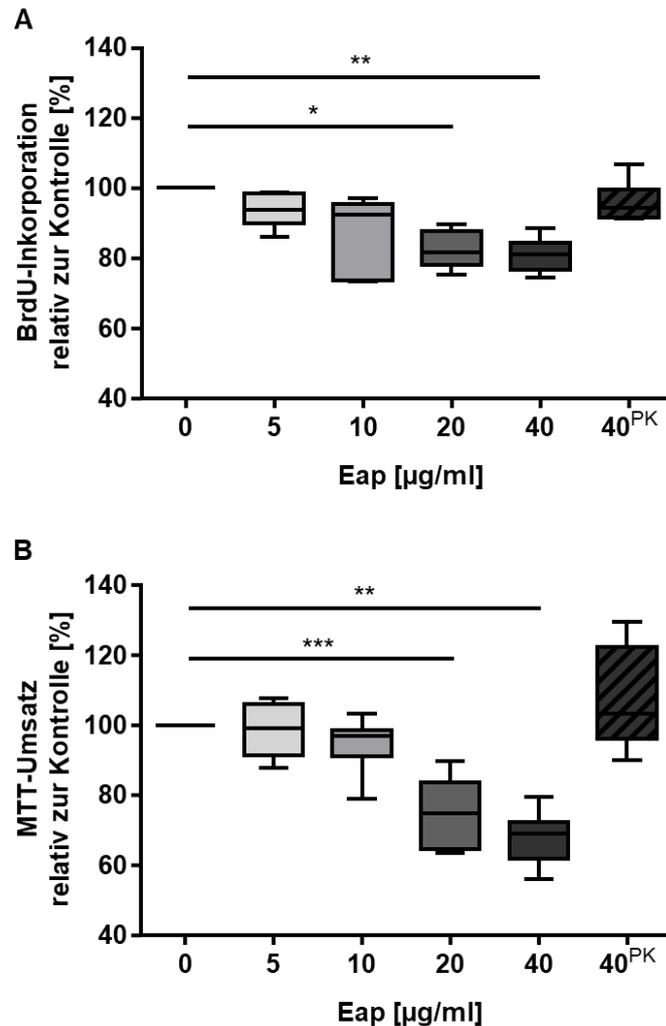


Abb. 4.3: Der proliferationshemmende Einfluss von Eap auf Keratinozyten (HaCaT). HaCaT Zellen (BrdU:  $1 \times 10^5$  Zellen/ml; MTT:  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml) wurden in MCDB-Vollmedium (MCDB153, 10% FKS, 1% MEM-NEAA) in 96-Well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen Eap (5-40 µg/ml; Boxen in Graustufen) über 72 h inkubiert und dann A) der BrdU-Assay nach Herstellerangaben, oder B) der MTT-Assay, wie in den Methoden beschrieben, durchgeführt. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden auf die Eap-freie Kontrolle normalisiert. Proteinase K verdautes Eap (40<sup>PK</sup>) diente als weitere Kontrolle (gestreifte Box). Die dargestellten Daten entstammen sechs (BrdU-Assay), bzw. acht (MTT-Assay) unabhängigen biologischen Experimenten, die jeweils in technischen Triplikaten durchgeführt wurden; Boxen: Median mit Interquartilsabstand, Antennen (engl. "whisker"): kleinster bzw. größte Datenwerte der jeweiligen Datensätze. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney-U-Test (Abbildung verändert aus Eisenbeis *et al.*, 2017).

#### 4.2.1.2 Der Einfluss von Eap auf die Proliferation und den Metabolismus von Endothelzellen (EA.hy926)

Endothelzellen sind im Prozess der Wundheilung am Wiederaufbau des Blutgefäßsystems beteiligt (Neovaskularisation). Sie bilden dabei die Innenwände der tubulären Gefäßstrukturen. Es konnte bereits in vorangegangenen Studien ein Einfluss von Eap auf die

Neovaskularisation *in vivo* im Mausmodell (Athanasopoulos *et al.*, 2006) und die Proliferation von HUVEC Zellen (Sobke *et al.*, 2006) gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der direkte Einfluss von Eap auf die Proliferation der Endothelzelllinie EA.hy926 untersucht. Es ergab sich eine Tendenz, die der Situation bei HaCaT Zellen ähnelt, jedoch zeigte sich bei den EA.hy926 (ATCC® CRL2922™)-Zellen lediglich eine signifikante Verminderung der Proliferation (Abb. 4.4A) bei einer Konzentration von 40 µg/ml.

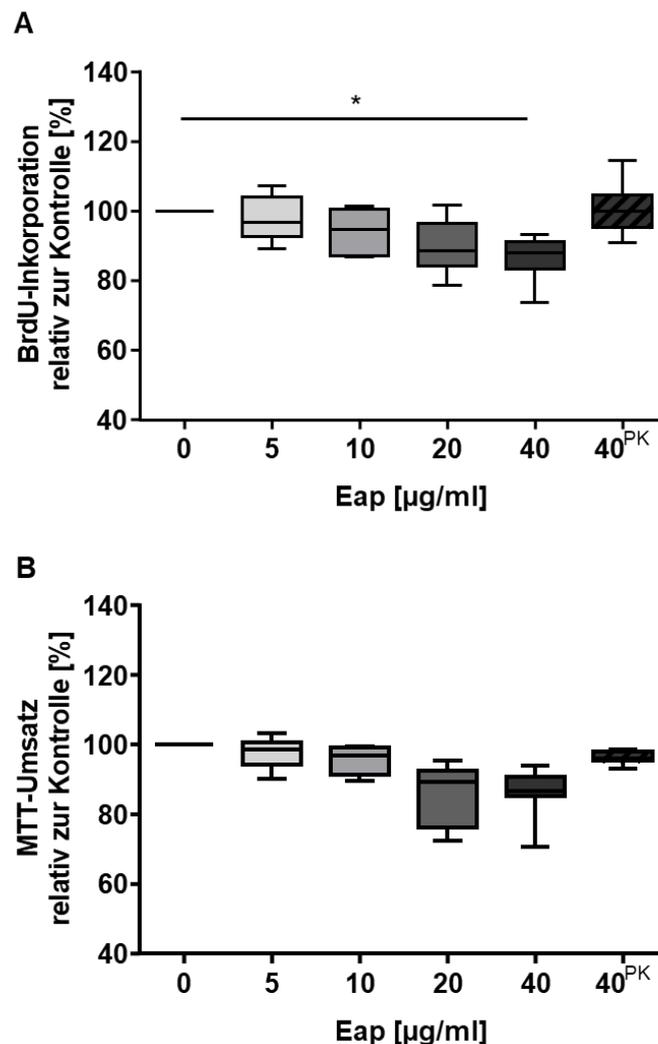


Abb. 4.4: Der Proliferationshemmende Einfluss von Eap auf Endothelzellen (EA.hy926). Die Endothelzellen (BrdU:  $1 \times 10^5$  Zellen/ml; MTT:  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml) wurden in DMEM mit 10% FKS in 96-Well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden in Anwesenheit der dargestellten Eap-Konzentrationen (5-40 µg/ml; Boxen in Graustufen) über 72 h inkubiert worauf A) ein BrdU-Assay nach Herstellerangaben, oder B) ein MTT-Assay, wie in den Methoden beschrieben, folgte. Die erhaltenen Absorbationswerte wurden auf die Eap-freie Kontrolle normalisiert. Proteinase K verdautes Eap (40<sup>PK</sup>) diente als weitere Kontrolle (gestreifte Box). Die Versuche wurden in sechs (BrdU-Assay), bzw. acht (MTT-Assay) unabhängigen biologischen Experimenten, mit jeweils drei technischen Replikaten, durchgeführt; Boxen: Median mit Interquartilsabstand, Antennen (engl. "whisker"): kleinster bzw. größte Datenwerte der jeweiligen Datensätze. \*  $p < 0,05$ ; die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney-U-Test (Abbildung verändert aus Eisenbeis *et al.*, 2017).

#### 4.2.1.3 Der Einfluss von Eap auf die Proliferation und den Metabolismus der Fibroblastenzelllinie BJ

Im Rahmen der Wundheilung sind Fibroblasten die Zellen, die über Sezernierung verschiedener Faktoren die extrazelluläre Matrix generieren, über die andere Zelltypen in die Wunde einwandern können. Zusätzlich schütten sie Zytokine aus, die als Lockstoffe für andere Zelltypen wirken und diese somit in den Wundbereich dirigieren.

Die Erkenntnisse aus den BrdU-Assays decken sich für die aus die juvenilen Vorhäuten gewonnene Fibroblastenzelllinie BJ (ATCC® CRL2522™) mit denen für Endothelzellen (siehe Abb. 4.5).

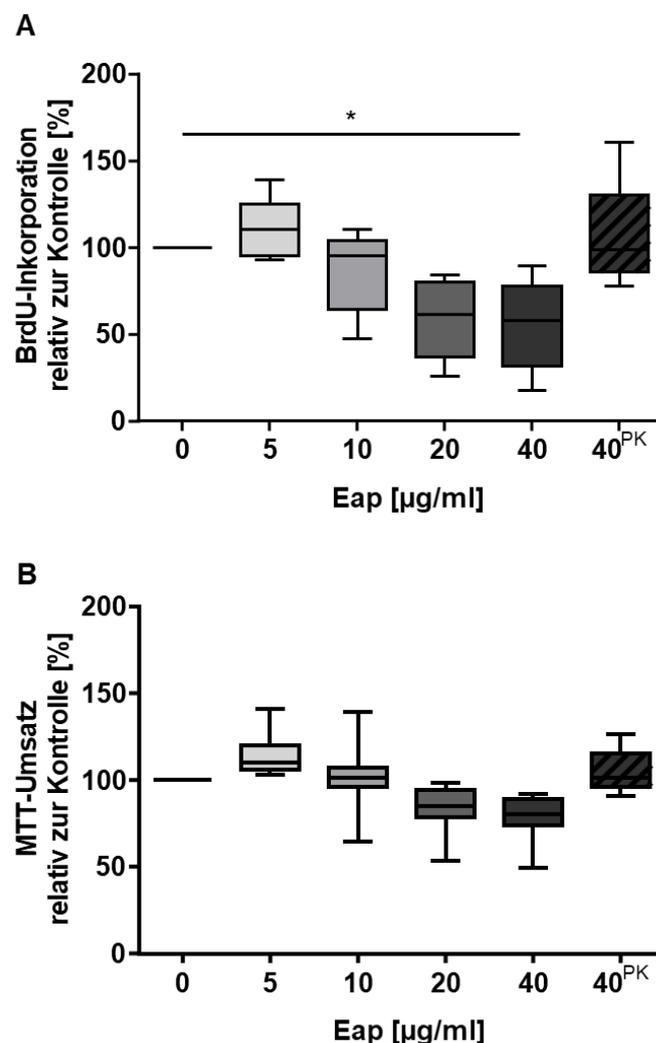


Abb. 4.5: Der proliferationshemmende Einfluss von Eap auf die Fibroblastenzelllinie BJ. Die Zellen (BrdU:  $1 \times 10^5$  Zellen/ml; MTT:  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml) wurden in MEM mit 10% FKS in 96-Well-Platten in Anwesenheit der dargestellten Eap-Konzentrationen (5-40 µg/ml; Boxen in Graustufen) über 72 h inkubiert, worauf A) ein BrdU-Assay nach Herstellerangaben, oder B) ein MTT-Assay, wie in den Methoden beschrieben folgte. Die erhaltenen Absorbationswerte wurden auf die Eap-freie Kontrolle normalisiert. Proteinase K verdautes Eap (40<sup>PK</sup>) diente als weitere Kontrolle (gestreifte Box). Die Versuche wurden in fünf (BrdU-Assay), bzw. acht (MTT-Assay) unabhängigen biologischen Experimenten mit technischen Triplikaten durchgeführt; Boxen:

**Median mit Interquartilsabstand, Antennen (engl. "whisker"):** kleinster bzw. größte Datenwerte der jeweiligen Datensätze. \*  $p < 0,05$ ; die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (Abbildung verändert aus Eisenbeis *et al.*, 2017).

Es konnte in den BrdU-Proliferationsassays eine konzentrationsabhängige Verminderung der Proliferation aller drei untersuchten Zelltypen festgestellt werden, die im Vergleich zur unbehandelten Kontrollsituation bereits bei einer Konzentration von 5 µg/ml als Tendenz erkennbar war und bei einer Konzentration von 20 - 40 µg/ml signifikant wurde.

Die Ergebnisse des MTT-Assays spiegeln im weitesten Sinne die Befunde aus den BrdU-Assays wieder, jedoch fällt der Unterschied zwischen Eap-behandelten und nicht behandelten Zellen weniger deutlicher aus. Dies könnte darin begründet liegen, dass dieser Test weniger sensitiv ist, als der BrdU-Assay.

### 4.2.2 Der Einfluss von Eap auf die frühe und späte Apoptose

Der zuvor in den BrdU und MTT-Assays beobachtete reprimierende Effekt von Eap auf die Proliferationsraten und die Vitalität der verschiedenen Zelltypen könnte auch dahingehend interpretiert werden, dass Eap einen toxischen Effekt auf diese Zelltypen ausübt. Aus der bisherigen Literatur sind zu diesem Thema gehen jedoch widersprüchliche Befunde hervor. So weißt eine früher Studie von Lee und Kollegen (Lee *et al.*, 2002) darauf hin, dass Eap einen Apoptose-induzierenden Effekt auf T-Zellen ausübt. In früheren Untersuchungen des IMMH hingegen konnte kein signifikanter Einfluss von Eap auf die Apoptose- und Nekroserate von Keratinozyten nachgewiesen werden (Bur *et al.*, 2013). Um zu untersuchen, ob die in dieser Studie beobachteten Effekte vor allem auf den proliferationshemmenden Effekt von Eap und nicht auf eine etwaige Zytotoxizität zurückzuführen sind, wurde ein Apoptose/Nekrose-Assay der Firma PromoCell GmbH (Heidelberg) durchgeführt und mittels Durchflusszytometrie (FACS) ausgewertet (siehe auch 3.7.6). Zum Einsatz kamen dabei die Reagenzien Annexin V, das mit dem Fluorophor FITC, gekoppelt wurde, sowie das Ethidium Homodimer III (EthD-III). Zellen in früher Apoptose werden in diesem Assay lediglich Annexin V gefärbt. Nekrotische Zellen, deren Zellmembranintegrität durch nicht-apoptotische Prozesse gestört werden, werden lediglich mit EthD-III gefärbt, während spät-apoptotische Zellen sowohl Annexin V als auch EthD-III positiv werden. Intakte, gesunde Zellen zeigen nur eine geringe Eigenfluoreszenz und können daher gut von nekrotischen und apoptotischen Zellen unterschieden werden.

#### 4.2.2.1 Der Einfluss von Eap auf die frühe und späte Apoptose/Nekrose von HaCaT-Zellen

Es wurden Zellen mit einer Konzentration von  $3,5 \times 10^5$  in 24 Well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht mit Eap inkubiert (0, 40,  $40^{\text{PK}}$   $\mu\text{g/ml}$ ), am Folgetag erfolgte die Färbung mit Annexin V und EthD-III und die FACS-Analyse. Anders als in früheren Versuchen, in denen für Keratinozyten kein Apoptose- und Nekrose-induzierender Effekt von Eap beobachtet werden konnte (Bur *et al.*, 2013), zeigte sich im Rahmen dieser Versuche eine signifikante Erhöhung der EthD-III (0,33% Anstieg; Kontrolle:  $0,42 \pm 0,075\%$ ; Eap<sup>40</sup>:  $0,75 \pm 0,16\%$ ) und der Annexin V + EthD-III positiven Zellen (5,97% Anstieg; Kontrolle:  $2,78 \pm 0,075\%$ ; Eap<sup>40</sup>:  $8,75 \pm 2,85\%$ ), in den Eap behandelten Proben, wenn auch auf prozentual niedrigem Niveau (siehe Abb. 4.6). Für die frühe Apoptose zeigte sich auch in dieser Studie kein Eap-Effekt bei Keratinozyten. Die mit PK-Eap behandelten Zellen wurden, aufgrund der durch die Methode beschränkten Probenmenge (Messzeitrahmen von einer Stunde nach Färbung/Dauer der Messung am FACS), nicht in allen Ansätzen mitgeführt. Die gemessenen  $40^{\text{PK}}$ -Proben (mind. vier Ansätze je Zelllinie) zeigten jedoch keine Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle und wurden daher nicht dargestellt.

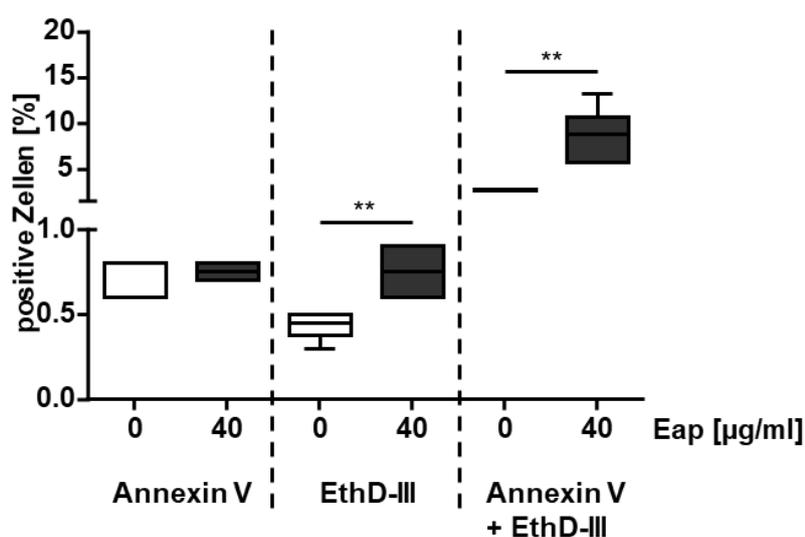


Abb. 4.6: Der Einfluss von Eap auf die frühe und späte Apoptose/Nekrose von Keratinozyten (HaCaT). Die Zellen wurden mit (40  $\mu\text{g/ml}$ , dunkelgraue Boxen), oder ohne Eap (weiße Boxen) in MCDB-Vollmedium (MCDB153, 10% FKS, 1% MEM-NEAA) in 24-Well-Platten über Nacht inkubiert. Am Folgetag erfolgte die Färbung mit Annexin V und EthD-III, sowie die Durchflusszytometrie am FACS. Die Versuche erfolgten in sechs unabhängigen biologischen Experimenten; Boxen: Median mit Interquartilsabstand, Antennen (engl. "whisker"): kleinster bzw. größte Datenwerte der jeweiligen Datensätze. \*\*  $p < 0,01$ ; die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney-U-Test.

#### 4.2.1.2 Der Einfluss von Eap auf die frühe und späte Apoptose/Nekrose von Endothelzellen (EA.hy926)

Ein möglicher Apoptose- und Nekrose-auslösender Effekt von Eap auf die Endothelzelllinie EA.hy926 wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals untersucht. Die Arbeitsschritte entsprachen den in 3.7.6 beschriebenen und deckten sich mit der Vorgehensweise bei den untersuchten Keratinozyten. Ebenso wie bei den HaCaT Zellen zeigte sich kein Einfluss von Eap auf die frühe Apoptose der EA.hy926 Zellen. Lediglich bei der späten Apoptose zeigte sich ein signifikanter Wert mit 1,7% Anstieg unter Eap-Einfluss (Kontrolle:  $1,23 \pm 0,4\%$ ; Eap<sup>40</sup>:  $2,93 \pm 1,82\%$ ), wobei auch die Annexin V + EthD-III positiven Zellen eine Tendenz (Kontrolle:  $6,18 \pm 1,94\%$ ; Eap<sup>40</sup>:  $8,18 \pm 2,14\%$ ) erkennen lassen (siehe Abb. 4.5). Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen den unbehandelten und der Eap<sup>PK</sup>-behandelten Proben.

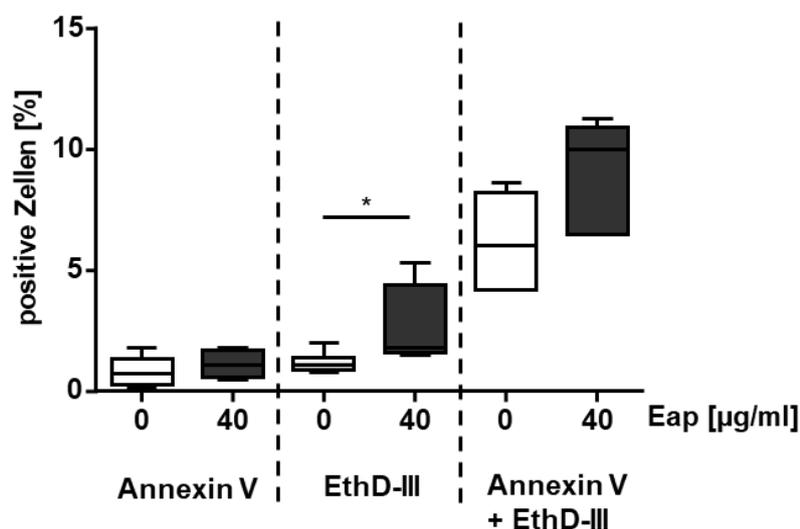


Abb. 4.7: Der Einfluss von Eap auf die frühe und späte Apoptose/Nekrose von Endothelzellen (EA.hy926). Die Zellen wurden mit (40 µg/ml, dunkelgraue Boxen), oder ohne Eap (weiße Boxen) in DMEM mit 10% FKS in 24-Well-Platten über Nacht inkubiert. Am Folgetag erfolgte die Färbung mit Annexin V und EthD-III, sowie die Durchflusszytometrie am FACS. Die Versuche erfolgten in sechs unabhängigen biologischen Experimenten; Boxen: Median mit Interquartilsabstand, Antennen (engl. "whisker"): kleinster bzw. größte Datenwerte der jeweiligen Datensätze. \*  $p < 0,05$ ; die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney-U-Test.

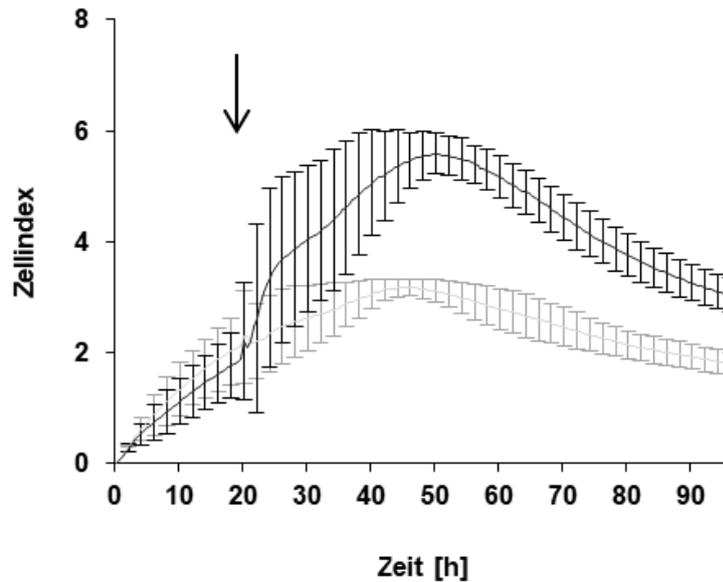
Zusammenfassend ist über den zytotoxischen Effekt von Eap auf die untersuchten Keratinozyten und Endothelzellen zu sagen, dass sich für HaCaT Zellen ein Anstieg der Nekrose von 0,3% (\*\*) der untersuchten Population (Kontrolle:  $0,45 \pm 0,008\%$ ; Eap<sup>40</sup>:  $0,75 \pm 0,16\%$ ) und für EA.hy 1,7% (\*\*; Kontrolle:  $1,23 \pm 0,4\%$ ; Eap<sup>40</sup>:  $2,93 \pm 1,82\%$ ), im Vergleich zur Kontrollprobe ohne Eap ergab. Zudem zeigte sich ein Eap-Einfluss, auf den Anteil an gemessenen Zellen, die spätapoptotisch und damit sowohl Annexin V, als auch EthD-III positiv waren. Für HaCaT ergab dies eine Steigerung von 5,97% (\*\*; Kontrolle:  $2,78 \pm$

0,075%; Eap<sup>40</sup>:  $8,75 \pm 2,85\%$ ), für EA.hy926 um 2,78% (n.s.; Kontrolle:  $6,18 \pm 1,94\%$ ; Eap<sup>40</sup>:  $\mu\text{g/ml}$  Eap:  $8,18 \pm 2,14\%$ ). im Vergleich zur Kontrolle. Die frühe Apoptose zeigte im hier verwendeten Assay, bei den untersuchten Keratinozyten und Endothelzellen, keine signifikanten Unterschiede von Eap-behandelten, zu unbehandelten Zellen.

### 4.2.3 Der Einfluss von Eap auf die Morphologie von Keratinozyten (HaCaT)

#### 4.2.3.1 Erkenntnisse im Echtzeit-Zell-Darstellungssystem (RTCA engl. "real time cell analyzer" System)

Das RTCA-System liefert die Möglichkeit, Zellfunktionen wie Proliferation oder Migration in Echtzeit zu betrachten. Um eine Kinetik des proliferationshemmenden Effekts von Eap zu erfassen, wurde das xCELLigence RTCA-System von Roche und dafür vorgesehene 96-Well-Platten (E-Plates) verwendet (siehe 3.7.3). Der Boden dieser Platten ist mit einer Lage aus Goldmikroelektroden bedeckt, welche Veränderungen der Impedanz zwischen Elektrode und umgebenden Medium detektieren können. Solche Impedanzänderungen entstehen zum Beispiel durch Zellen, die auf den Elektroden adhären und proliferieren. Je höher die Zellzahl, desto stärker ist der Anstieg der Impedanz, der als Zellindex angegeben wird (Roshan Moniri *et al.*, 2015). Die Impedanz steigt jedoch auch an, wenn Einzelzellen durch morphologische Veränderungen eine größere Fläche der Mikroelektroden bedeckten (Yu *et al.*, 2006; Abassi *et al.*, 2009; Irelan *et al.*, 2011; Limame *et al.*, 2012). Die Interpretation des Zellindexes sollte daher nur in Kombination mit weiteren Proliferationsassays erfolgen. In diesem Assay zeigte sich nach Eap Zugabe ein deutlicher Anstieg des Zellindexes (Abb. 4.8).



**Abb. 4.8: Zellindex-Kinetik aus RTCA-Impedanzmessungen der Keratinozytenzelllinie HaCaT. Die Zellen wurden in die Wells einer 96-Well E-Plate in MCDB-Vollmedium ausgesät. Nach einer 24-stündigen Anwachsphase wurden die Zellen mit frischem Medium mit (40 µg/ml, dunkelgraue Linie), oder ohne Eap (hellgraue Linie) supplementiert (der senkrechte Pfeil indiziert den Zeitpunkt der Zugabe). Die Veränderungen der Impedanz wurden über einen Gesamtzeitraum von 96 h gemessen. Die dargestellten Daten repräsentieren den MW mit SD von drei unabhängigen biologischen Experimenten, die jeweils in technischen Triplikaten durchgeführt wurden (Abbildung verändert aus Eisenbeis *et al.*, 2017).**

In Anbetracht der BrdU- und MTT-Befunde lassen diese Daten darauf schließen, dass HaCaT Zellen unter Eap-Einfluss (40 µg/ml) mit morphologischen Änderungen reagieren, die zu einer größeren Zellfläche führen.

#### 4.2.3.2 Erkenntnisse im Zellobservierungssystem (CO engl. "Cell Observer")

Um die Hypothese zu überprüfen, dass die im RTCA-System beobachteten Effekte auf Veränderungen der Zellmorphologie basieren, wurden HaCaT-Zellen im CO-System beobachtet (in Zusammenarbeit mit Christian Backes, CIPMM). Die Zellen wurden zur besseren Visualisierung und Darstellung von zytoskelettalen Veränderungen mit einem Plasmid transfiziert (siehe 3.7.4), das den Aktinmarker Lifeact trägt. Lifeact ist ein 17-Aminosäuren großes Peptid, das an filamentöses Aktin bindet und verwendet werden kann, um in lebenden eukaryoten Zellen das Aktinzyskelett fluoreszenzbasiert anzufärben (Riedl *et al.*, 2008). Die transfizierten Zellen wurden in Vollmedium dünn auf Glasplättchen ausgesät und für 16-24h anwachsen lassen. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und dann in das CO-System eingebracht. Das System erlaubt die Beobachtung definierter Positionen von Zellen über längere Zeiträume, wobei durch Begasung (5% CO<sub>2</sub>) und Temperaturstabilisierung (37°C) optimale Umgebungsbedingungen gewährleistet sind. Es wurden Zellen mit stabilem Fluoreszenzsignal ausgewählt und ihre Positionen im System

hinterlegt. Der Beobachtungszeitraum wurde auf 14 h mit einer Bildaufnahmesequenz von 2 h festgelegt. Die Zugabe des Eap (40 µg/ml) erfolgte zu Beginn der Messung im CO. Die Auswertung der Bilddaten erfolgte im Anschluss durch Messung des Längen/Breiten-Verhältnis mittels der ImageJ Software. Die Zellen zeigten zum Startzeitpunkt eine für Keratinozyten typische keilförmig-trapezoide Form, mit einem Längen/Breiten-Verhältnis von  $2,34 \pm 0,75$ . Während die unbehandelten Zellen diese Form über die Zeit beibehielten (Längen/Breiten-Verhältnis von  $2,0 \pm 0,54$  nach 14 h), veränderte sich die Morphologie der Eap-behandelten Zellen über die Zeit von trapezoid zu einem mehr abgerundeten Erscheinungsbild. Die Längen/Breiten-Ratio der Eap-behandelten Zellen entsprach nach 14 h einem Wert von  $1,41 \pm 0,39$ , wobei ein Wert von 1,0 der absolut runden Form entspricht.

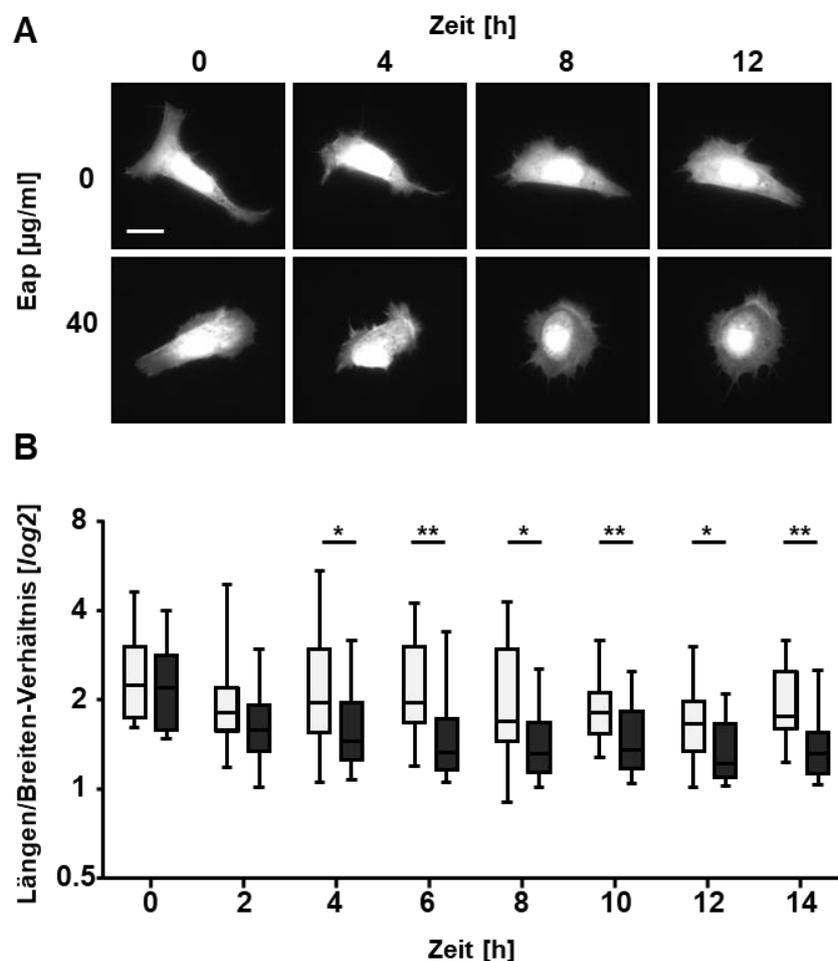


Abb. 4.9: Der Einfluss von Eap auf die Morphologie von HaCaT Zellen dargestellt im CO-System. Lifeact-transfizierte Keratinozyten wurden lückenhaft auf Glasplättchen ausgesät und über Nacht in Vollmedium kultiviert. Am Versuchstag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in das System eingebracht. Die morphologischen Veränderungen der Zellen wurden in zweistündigen Intervallen über einen Zeitraum von 14 h fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert. A) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Eap-behandelter (40) und unbehandelter (0) HaCaT Zellen zu definierten Zeitpunkten (0, 4, 8 und 12h); Maßstabsbalken = 20 µm. B) Veränderung des Längen/Breiten-Verhältnis von Eap-behandelten (dunkelgraue Boxen) und unbehandelten (lichtgraue Boxen) HaCaT Zellen über die Zeit. Die Messungen erfolgten an 20 individuellen Zellen pro Gruppe; Boxen: Median mit

**Interquartilsabstand, Antennen (engl. whisker): kleinster bzw. größte Datenwerte der jeweiligen Datensätze. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ; die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney-U-Test (Abbildung verändert aus Eisenbeis *et al.*, 2017).**

### 4.2.3.3 Erkenntnisse mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM engl. "atomic force microscope")

Um einen detaillierteren Einblick in die Morphologieveränderungen der Zellen unter Eap-Einfluss zu erlangen, wurde das Rasterkraftmikroskop (AFM) verwendet (in Zusammenarbeit mit Henrik Peisker, IMMH). Dies bietet im Vergleich zur konventionellen Lichtmikroskopie (Mikrometer-Maßstab) eine deutlich höhere Auflösung im Nanometer-Bereich. Da das System wenig stör anfällig durch das umgebende Medium ist, können auch lebende Zellen in Nährmedien oder Pufferlösungen gemessen werden (Dufrene, 2002; Pillet *et al.*, 2014; Dufrene, 2015), während dies bei der ebenfalls hochauflösenden Elektronenmikroskopie nicht möglich ist (Allison *et al.*, 2010).

Um Strukturen abzubilden, kann die Messsonde, welche nur wenige Nanometer fein ist, über eine Probe (z.B. eine Zelle) geführt werden und rastert diese in invertierender Weise Linie für Linie ab. Die durch die Topologie der Probe hervorgerufenen Ablenkungen der Messsonde werden von einem Laser erfasst, welcher auf die Rückseite der Sonde ausgerichtet ist und je nach Auslenkung der Sonde in anderem Winkel reflektiert wird. Diese Abweichungen werden wiederum von einer Fotodiode erfasst und können durch das System als dreidimensionales Bild der Oberflächenstruktur wiedergegeben werden.

Die Zellen wurden dünn in speziellen Zellkulturschalen (FluoroDish™), mit Glasboden, ausgebracht und am Folgetag am AFM gemessen (siehe 3.8.1).

Der hier verwendete "Tapping-Modus" erstellt ein Bild, indem die Sonde nicht direkt auf die Probe, sondern in ihre unmittelbare Nähe gebracht wird. Durch die Annäherung der Sonde an die Oberfläche der Probe kommt es zu Kraft-Wechselwirkungen, wodurch die Sondenspitze abgelenkt wird. Die Schwingungsamplitude der Sonde ändert sich hierbei mit der Oberflächentopographie der Probe (Pillet *et al.*, 2014).

Um die die Probe weiter zu charakterisieren, wurden Kraft-Distanz-Messungen durchgeführt. So lässt sich durch In-Kontakt-Treten der Zelloberfläche und der Sondenspitze die Elastizität der Probe in Abhängigkeit der Eindringtiefe der Sondenspitze messen (Dufrene, 2002).

Durch die Kombination der bildgebenden Rasterkraftmikroskopie mit den Kraft-Distanz-messungen ist es möglich, Elastizitätskarten zu erstellen, wodurch gleichzeitig das Höhenprofil der Probe dargestellt wird.

In dem hier angewendeten, sogenannten PeakForceQNM®-Modus, können sowohl die Topologie, als auch lokale, mechanische Eigenschaften wie die Elastizität von Zellen gemessen werden (Berquand, 2011; Heu *et al.*, 2012). Es wurden die morphologischen

Einflüsse von Eap auf die Höhe und Topographie, die von den Zellen abgedeckte Fläche, das Zellvolumen und die Steifigkeit von HaCaT-Zellen gemessen. Alle Effekte erwiesen sich als sehr signifikant, was bedeutet, dass Eap großen Einfluss auf die strukturelle Integrität von Zellen zeigt.

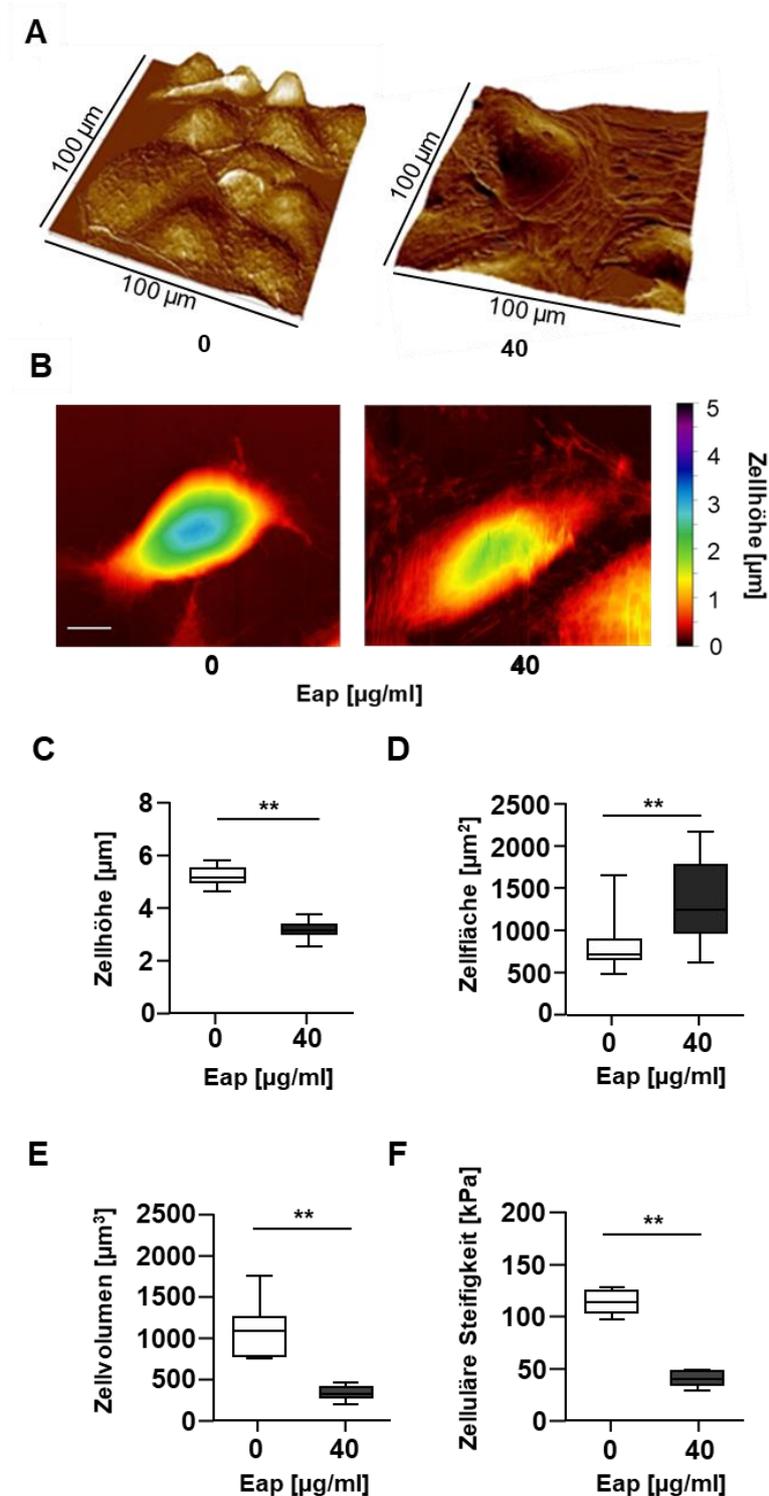


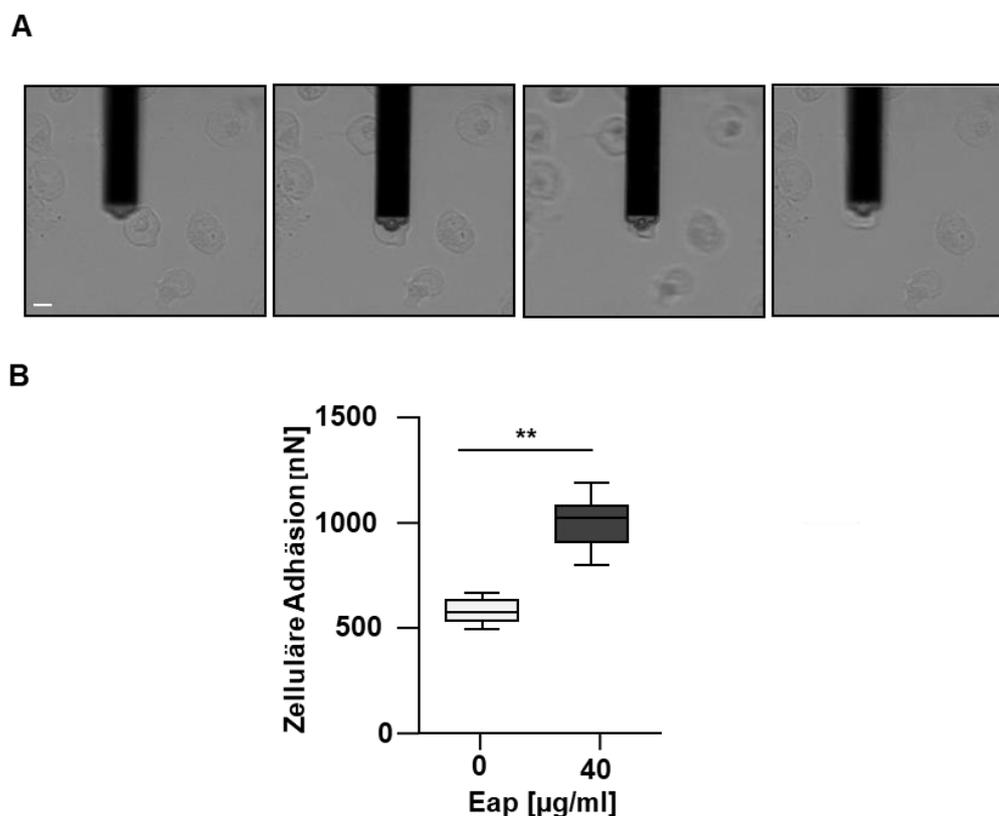
Abb. 4.10: Rasterkraftmikroskopische (AFM) Abbildung von Keratinozyten unter Eap-Einfluss. HaCaT Zellen wurden nicht-konfluent in Kulturschalen mit Glasboden ausgesät und 24 h in Abwesenheit, oder Anwesenheit von Eap (40  $\mu\text{g/ml}$ ) in Vollmedium kultiviert und anschließend

in 1x PBS gewaschen. Darauf erfolgte die Messung am AFM im dynamischen Modus. Die Bilddaten wurden im dynamischen Modus mit einer Aufpresskraft von 600 pN und einer Messgeschwindigkeit von 10  $\mu\text{m/s}$  generiert. A) Topografie von links unbehandelten (0) und rechts Eap-behandelten (40) HaCaT Zellen, abgebildet im Tapping-Modus des AFM. B) Höhenprofile unbehandelter (0) und Eap-behandelten (40) HaCaT Zellen, dargestellt in Spektralfarben; Maßstabsbalken = 10  $\mu\text{m}$ . C) Darstellung der Zellhöhe unbehandelter und Eap-behandelter HaCaT Zellen. C) Abbildung der Fläche, welche unbehandelte und Eap-behandelte HaCaT Zellen einnehmen. D) Vergleich der Zellvolumina unbehandelter und Eap-behandelter HaCaT Zellen. E) Elastizitätsverteilung (zelluläre Steifigkeit) unbehandelter und Eap-behandelter HaCaT-Zellen. Die in B-E dargestellten Daten entsprechen den  $\text{MW} \pm \text{SD}$  von 12 individuellen Zellen pro Messgruppe, gemessen in vier unabhängigen Experimenten; \*\*  $p < 0,01$ ; die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney-U-Test (Abbildung verändert aus Eisenbeis *et al.*, 2017).

Für Keratinozyten konnten nach Behandlung mit Eap (40  $\mu\text{g/ml}$ ) AFM-basiert deutliche morphologische Veränderungen festgestellt werden (Abb. 4.10). In Hinblick auf die Topographie der Zellen wurde beobachtet, dass sich Eap behandelte Zellen (rechts) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (links) optisch abflachen und nur noch der Nukleus prominent hervortritt (Abb. 4.10A). Dies stellt sich auch im Höhenprofil (Abb. 4.10B) und in der quantitativen Auswertung der Zellhöhe (Abb. 4.10C) dar. Die Fläche, welche die einzelne Zelle auf dem Substrat einnimmt, nimmt dabei unter Eap-Gabe signifikant zu (Abb. 4.10D), was sich mit den Erkenntnissen aus dem RTCA-System deckt (siehe 4.2.3.1). Es konnte hier zudem gezeigt werden, dass Eap-behandelte HaCaT-Zellen signifikant an Volumen (Abb. 4.10E) und zellulärer Steifigkeit verlieren (Abb. 4.10F).

### 4.2.3.4 Erkenntnisse über die Adhäsionskraft der Zellen mittels Mikrofluidik-kombinierten Rasterkraftmikroskop (FluidFM engl. "fluid force microscope")

Um zu ermitteln, ob die veränderte Morphologie, vor Allem die vergrößerte Adhäsionsfläche der Zellen, auch einen Einfluss auf die Kraft hat, mit der die Zellen an das Substrat binden, wurde ein Mikrofluidik-kombiniertes Rasterkraftmikroskop (FluidFM) verwendet (in Zusammenarbeit mit Henrik Peisker, IMMH). Dieses System ermöglicht es, mittels hohler Cantilever, an die ein Unterdruck angelegt werden kann, Einzelzellen anzusaugen. Mit Hilfe nachfolgender Kraftspektroskopie kann dann die Kraft gemessen werden, die nötig ist, die Zelle vom Untergrund abzulösen (siehe 3.8.2). Hierzu wurden die zu untersuchenden Keratinozyten (HaCaT) zuerst mit dem Cantilever mit einer Aufpresskraft von 5 nN in Kontakt gebracht. Dann wurde die Zelle durch Ansaugen von Flüssigkeit mit einem Unterdruck von -350 mbar an den Cantilever angesaugt und im Anschluss der Cantilever mit einer Geschwindigkeit von 1  $\mu\text{m/s}$  angehoben. Die dabei entstehende Auslenkung des Cantilevers (Rückstellkraft) lässt dabei Rückschlüsse zu, welche Kräfte benötigt werden, um die Zelle vom Substrat zu lösen. In Abb. 4.11A wird der Vorgang lichtmikroskopisch gezeigt und in Abb. 4.11B die ermittelten Kräfte dargestellt.



**Abb.4.11: Messung der Adhäsionskraft von Keratinozyten an das Substrat mittels Mikrofluidik-kombinierter Rasterkraftmikroskopie (FluidFM). HaCaT-Zellen wurden nicht-konfluent in Kulturschalen mit Glasboden ausgesät und 24 h in Ab- oder Anwesenheit von Eap (40 µg/ml) in Vollmedium kultiviert. Am Folgetag wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, daraufhin erfolgte die Messung am Flex-Fluidics AFM mittels hohlen fluidFM Cantilevern. Gemessen wurde die Kraft, die nötig war, um eine Zelle vom Untergrund abzulösen. A) Lichtmikroskopische Darstellung (100x) des Versuchsvorgangs. Von links nach rechts: Der Cantilever wurde über einer Zelle justiert, mit der Zelle in Kontakt gebracht, es wurde ein Unterdruck angelgt (-350 mbar) und der Cantilever schließlich mit bestehendem Unterdruck zurückgezogen. Die Rückstellkraft des Cantilevers wurde gemessen und entspricht der Adhäsionskraft der Zelle an das Substrat; Maßstabsbalken = 20 µm. B) Rückstellkraft um unbehandelte, oder Eap-behandelte HaCaT-Zellen vom Untergrund abzulösen. Die dargestellten Daten entsprechen den MW ± SD von 12 individuellen Zellen pro Messgruppe, gemessen in vier unabhängigen Experimenten; \*\*  $p < 0,01$ ; die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney-U-Test (Abbildung verändert aus Eisenbeis *et al.*, 2017).**

Es zeigte anhand der FluidFM-Messungen, für HaCaT-Zellen, unter Behandlung mit Eap eine signifikante Erhöhung der Adhäsionskraft an das Substrat.

#### 4.2.4 Der Einfluss von Eap auf die Migration von Zellen im Lückenschluss-Assay

Es ergaben sich Erkenntnisse, die im RTCA-, CO-System und am AFM/FluidFM gesammelt wurden, dass Eap einen deutlichen Einfluss auf die Zellmorphologie und die Anheftung an das Substrat hat. Dies führte zu der Frage, ob dieser Umstand neben der Hemmung der

Proliferation auch andere Zellfunktionen beeinflusst. Für einen erfolgreichen Wundschluss ist neben der Zellvermehrung die Migration der Zellen in die Wundstelle eine der wichtigsten Parameter. Fibroblasten kommt hier die Funktion zu, eine Matrix (EZM) zu sezernieren, auf der folgende Zellen (Keratinozyten und Mastzellen) in das Wundbett migrieren können. Da Keratinozyten für den eigentlichen Verschluss der Wunde verantwortlich sind, wurde der Fokus zunächst auf diesen Zelltyp ausgerichtet.

Um den Einfluss von Eap auf die zelluläre Fähigkeit zur Migration zu untersuchen, wurde zunächst ein klassischer Lückenschluß-Assay durchgeführt (Jameson *et al.*, 2013). Hier diente ein Silikoneinsatz in der Well-Platte als Platzhalter, um den herum Zellen ausgesät wurden. Am Folgetag konnte der Einsatz aus dem entstandenen Rasen adhärenter Zellen entfernt und so ein Freiraum gebildet werden, in den die adhärennten Zellen einwandern können. Um die Migration zu stimulieren, wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen (um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen) und im Anschluss mit frischem Medium supplementiert, das migrationsstimulierende Faktoren enthielt. Um auszuschließen, dass die Zellen proliferieren und man einen Proliferationseffekt, welcher den der Migration überlagern könnte, mit misst, wurde dem Medium außerdem der Proliferationshemmstoff Aphidicolin zugesetzt. Das tetracyclische Diterpen Aphidicolin ist ein selektiver Inhibitor der DNA-Polymerasen  $\alpha$  und  $\delta$ , wodurch die DNA-Replikation und damit die Zellteilung gehemmt wird (Krokan *et al.*, 1981). Die in Zytostase befindlichen Zellen werden so zum einen synchronisiert, zum anderen kann dadurch der Lückenschluss ausschließlich durch Migration erfolgen.

Da der Lückenschluss stets in relation zur Kontrolle (ohne Eap) angegeben ist, sind im Apendix die ermittelten Werte tabellarisch dargestellt.

### 4.2.4.1 Der Einfluss von Eap auf die Migration von Keratinozyten (HaCaT)

Der zuerst verwendete Lückenschluss-Assay nutzte ibidi-Inserts und wurde mit EGF (200ng/ml) induzierten Keratinozyten (HaCaT) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch den Vergleich der zu Beginn des Assays vorhandenen Lücke im Zellrasen mit der Situation nach 16 h (Abb.4.12).

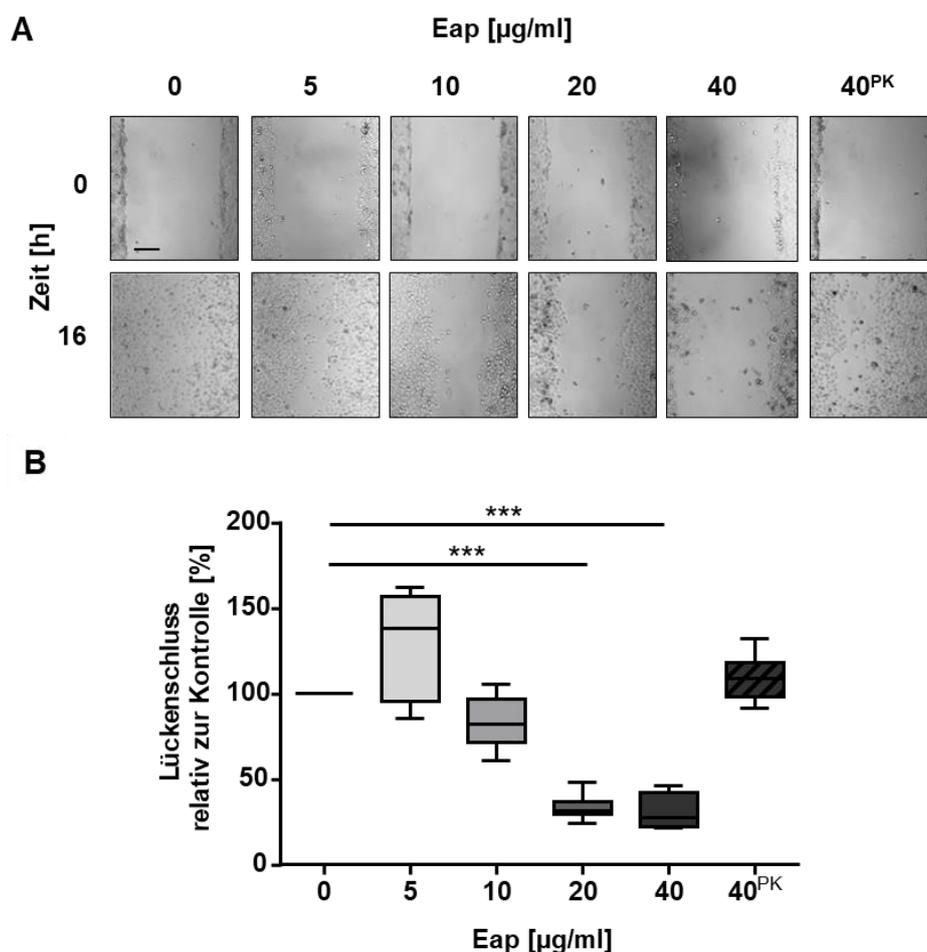
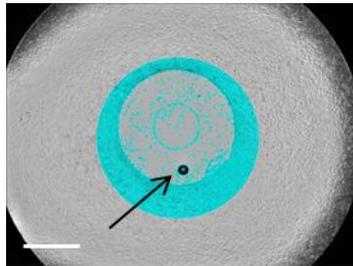


Abb. 4.12: Der Einfluss von Eap auf die Migration von Keratinozyten im ibidi-Assay. HaCaT Zellen wurden konfluent um einen in der 24-Well-Platte positionierten ibidi-Silikoneinsatz ausgesät. Am Folgetag wurde der Stempel entfernt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit frischem Medium beschichtet, das den Proliferationshemmstoff Aphidicolin (7  $\mu\text{g/ml}$ ), den migrationsinduzierenden Wachstumsfaktor EGF (200 ng/ml) und Eap in den dargestellten Konzentrationen (0- 40  $\mu\text{g/ml}$ ) enthielt. PK behandeltes Eap diente als zusätzliche Kontrolle. Die Zellen wurden unter diesen Bedingungen für weitere 16 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. A) Vergleich repräsentativer, lichtmikroskopischer Aufnahmen (100x) unmittelbar nach Entfernung des Einsatzes (0h) und am Ende des Versuchs (16h). Maßstabsbalken = 100  $\mu\text{m}$ . B) Migration der HaCaT Zellen quantifiziert als Lückenschluss relativ zur Kontrolle in %, zum Ende des Versuchs nach 16 h. Die Daten stammen aus acht unabhängigen, biologischen Replikaten; Boxen: Median mit Interquartilsabstand, Antennen (engl. "whisker"): kleinster bzw. größte Datenwerte der jeweiligen Datensätze. \*\*\*  $p < 0,001$ ; die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney-U-Test der Kontrolle (0  $\mu\text{g/ml}$  Eap) gegen die jeweilige Eap-behandelte Probe. (Abbildung verändert aus Eisenbeis *et al.*, 2017).

In der Kontrollsituation ohne Eap konnte dabei beobachtet werden, dass die Zellen in die Lücke wandern und den betrachteten Lückenabschnitt, in der vorgegebenen Zeit, nahezu vollständig ausfüllen konnten ( $78,2 \pm 5,9\%$ ). Die mit Eap behandelten Zellen büßten hingegen in konzentrationsabhängiger Weise ihre Migrationsfähigkeit ein. Ab einer Eap-Konzentration von 20  $\mu\text{g/ml}$  wurde dieser Effekt signifikant, während jedoch bereits bei der niedrigsten Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  eine eindeutige Tendenz zu erkennen war. Die mitgeführte zweite Kontrolle mit PK-verdautem Eap (40<sup>PK</sup>) zeigte sich vergleichbar mit der Kontrolle ohne Eap.

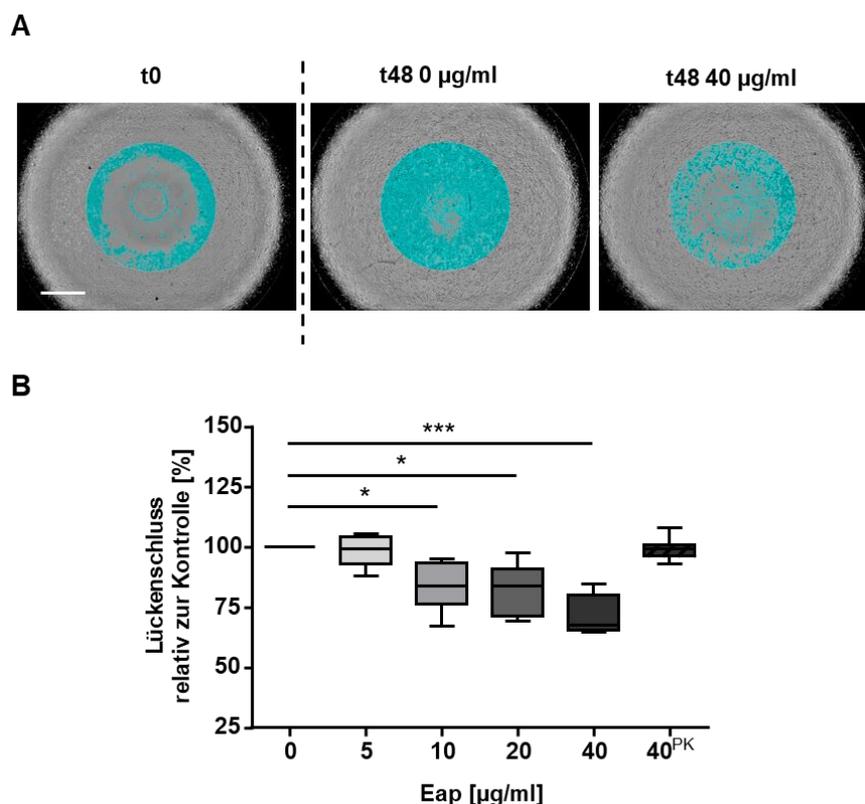
Im weiteren Verlauf der Studien konnte auf einen neuen Migrationsassay im 96-Well-Format umgestellt werden. Dieser "Oris-Assay" (siehe 3.7.5.2) nutzt runde Stempelsätze und kann automatisiert im Plattenlesegerät EnSight™ ausgewertet werden. Bestimmt wird die Konfluenz in der Lücke zu Beginn der Messung ( $t_0$ ) und zu einem zuvor evaluierten Endpunkt ( $t_{\text{Ende}} = 48 \text{ h}$ ). Die Differenz aus diesen Messwerten ergab den erfolgten Lückenschluss in %.

Nach dem ziehen der Stempel entstanden in manchen Ansätzen kleine Luftblasen, die von der Kaleido-Software des EnSight™ Plattenlesegeräts mitgemessen wurden. Da dies ein wiederkehrender Fehler war und die Luftblase nur ca. 5% der Auswertungsfläche ausmachte, wurde der Fehler als Teil des Versuchsansatzes akzeptiert.



**Abb. 4.13:** Dargestellt ist eine exemplarische Aufnahme mit einer Luftblase (oberhalb des Pfeils), die durch das ziehen des Stempels entstanden ist. In türkis dargestellt ist die von der EnSight™ Software ausgewertete Konfluenz im Auswertungsareal; Maßstabsbalken = 100  $\mu\text{m}$ .

Die Zellen wurden in einem Mangelmedium (Zellkulturmedium mit 1% FKS) ausgesät und über Nacht gehungert. Als Migrationsstimulus diente in diesem Assay Vollmedium (Zellkulturmedium mit 10% FKS). Um wie im ibidi-Assay die Proliferation zu unterdrücken, wurde dem Medium Aphidicolin zugesetzt (7  $\mu\text{g/ml}$ ), sodass nur der Migrationseffekt ohne verfälschende Proliferationsereignisse betrachtet werden konnte (Abb. 4.14).



**Abb. 4.14:** Der Einfluss von Eap auf die Migration von Keratinozyten im Oris-Assay. HaCaT Zellen wurden in Mangelmedium (MCDB153, 1% FKS, 1% MEM-NEAA) konfluent um den in einer schwarzen 96-Well-Platte mit klarem Boden platzierten Oris-Silikonstempel ausgesät. Am Folgetag wurden die Stempel entfernt und es erfolgte die Messung des t0-Zustands im EnSight™ Plattenlesegerät. Das Mangelmedium wurde gegen Vollmedium ausgetauscht, um die Migration zu induzieren. Das Medium enthielt den Proliferationshemmstoff Aphidicolin (7 µg/ml) und Eap in den dargestellten Konzentrationen (0- 40 µg/ml). PK behandeltes Eap diente als zusätzliche Kontrolle. Die Zellen wurden unter diesen Bedingungen für weitere 48 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. A) Vergleich repräsentativer, ausgewerteter, lichtmikroskopischer Aufnahmen des EnSight™ von einer durch die Ziehung des Stempels entstandene Lücke zum Zeitpunkt t0 (links) und der unbehandelten Kontrolle (mittig) im Vergleich zur Situation mit der höchsten Eap-Konzentration (rechts) nach 48 h. In türkis dargestellt ist die von der EnSight™ Software ausgewertete Konfluenz im Auswertungsareal; Maßstabsbalken = 100 µm. B) Migration der HaCaT Zellen quantifiziert als Konfluenz in der Lücke in % in Relation zur Kontrolle ohne Eap (100%). Die Werte wurden ermittelt aus der Konfluenz zum Ende des Versuchs nach 48 h in Relation zur Konfluenz zum Startzeitpunkt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von technischen Duplikaten aus acht unabhängigen, biologischen Replikaten. Boxen: Median mit Interquartilsabstand, Antennen (engl. "whisker"): kleinster bzw. größte Datenwerte der jeweiligen Datensätze. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney-U-Test der Kontrolle (0 µg/ml Eap) gegen die jeweilige Eap-behandelte Probe.

Für die Keratinozyten ergab sich hier, im Unterschied zum ibidi-Assay, bereits ab einer Eap Konzentration von 10 µg/ml eine signifikante Migrationshemmung, bei einer Konzentration von 40 µg/ml wurde der Effekt hochsignifikant.

## 4.2.4.2 Der Einfluss von Eap auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy926)

Zwar konnte bereits von Athanasopoulos und Kollegen (Athanasopoulos *et al.*, 2006) gezeigt werden, dass Eap die Einwanderung von Endothelzellen in Matrigel in der Maus *in vivo* inhibiert, jedoch wurde dies noch nie *in vitro* gezeigt. Hier wurde die Migration der Endothelzelllinie EA.hy926 im Oris-Assay, anlehnend an das Vorgehen bei Keratinozyten, untersucht. Es ergab sich, wie auch bei Keratinozyten, ein hemmender Effekt von Eap auf die Migration von Endothelzellen, der jedoch erst ab einer Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$  signifikant wurde (Abb. 4.15).

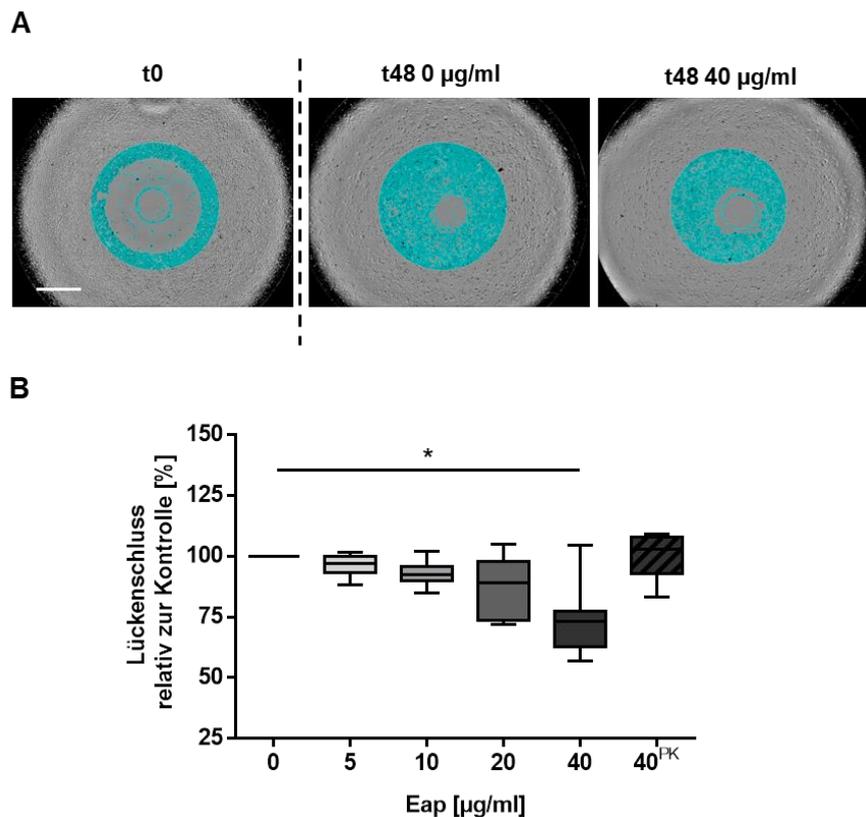


Abb. 4.15: Der Einfluss von Eap auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy926) im Oris-Assay. Die Zellen wurden in DMEM mit 1% FKS konfluent um den in einer schwarzen 96-Well-Platte mit klarem Boden eingesetzten Oris-Stempel ausgesät. Am Folgetag wurden die Stempel gezogen und es erfolgte die t0-Messung im EnSight Plattenlesegerät. Durch Austausch des Mediums gegen Vollmedium wurde die Migration induziert, durch das enthaltene Aphidicolin (7  $\mu\text{g/ml}$ ) die Proliferation inhibiert. Untersucht wurde der Effekt von Eap in den dargestellten Konzentrationen (0- 40  $\mu\text{g/ml}$ ). PK behandeltes Eap diente als zusätzliche Kontrolle. Die Zellen wurden unter diesen Bedingungen für weitere 48 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. A) Vergleich repräsentativer, ausgewerteter, lichtmikroskopischer Aufnahmen des EnSight™ von einer durch die Ziehung des Stemples entstandene Lücke zum Zeitpunkt t0 (links) und der unbehandelten Kontrolle (mittig) im Vergleich zur Situation mit der höchsten Eap-Konzentration (rechts) nach 48 h. In türkis dargestellt ist die von der EnSight™ Software ausgewertete Konfluenz im Auswertungsareal; Maßstabsbalken = 100  $\mu\text{m}$ . B) Migration der EA.hy926 Zellen quantifiziert als Konfluenz in der Lücke in % in Relation zur Kontrolle ohne Eap (100%). Die Werte wurden ermittelt aus der Konfluenz zum Ende des Versuchs nach 48 h in Relation zur Konfluenz zum Startzeitpunkt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von technischen Duplikaten aus acht unabhängigen, biologischen Replikaten. Boxen: Median mit Interquartilsabstand, Antennen (engl. "whisker"): kleinster bzw. größte Datenwerte der

jeweiligen Datensätze. \*  $p < 0,05$ ; die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney-U-Test der Kontrolle (0  $\mu\text{g/ml}$  Eap) gegen die jeweilige Eap-behandelte Probe.

#### 4.2.4.3 Der Einfluss von Eap auf die Migration von Fibroblasten (BJ)

Lediglich die Fibroblastenzelllinie BJ zeigte differente Ergebnisse von allen im Migrationsassay untersuchten Zelllinien (siehe Abb 4.16). Hier zeigte sich zum einen ein uneinheitlicheres Migrationsverhalten zwischen den Versuchstagen. Zudem migrierten die BJ generell weniger in die Lücke. Visuell scheint sich eine Tendenz abzuzeichnen, wonach geringere Eap-Konzentrationen (5-10  $\mu\text{g/ml}$ ) die Migration negativ beeinflussen, höhere Eap-Konzentrationen (20-40  $\mu\text{g/ml}$ ) sie eventuell sogar fördern. Jedoch ist die Streuung sehr groß und es konnte für keine der getesteten Bedingungen eine Signifikanz ermittelt werden.

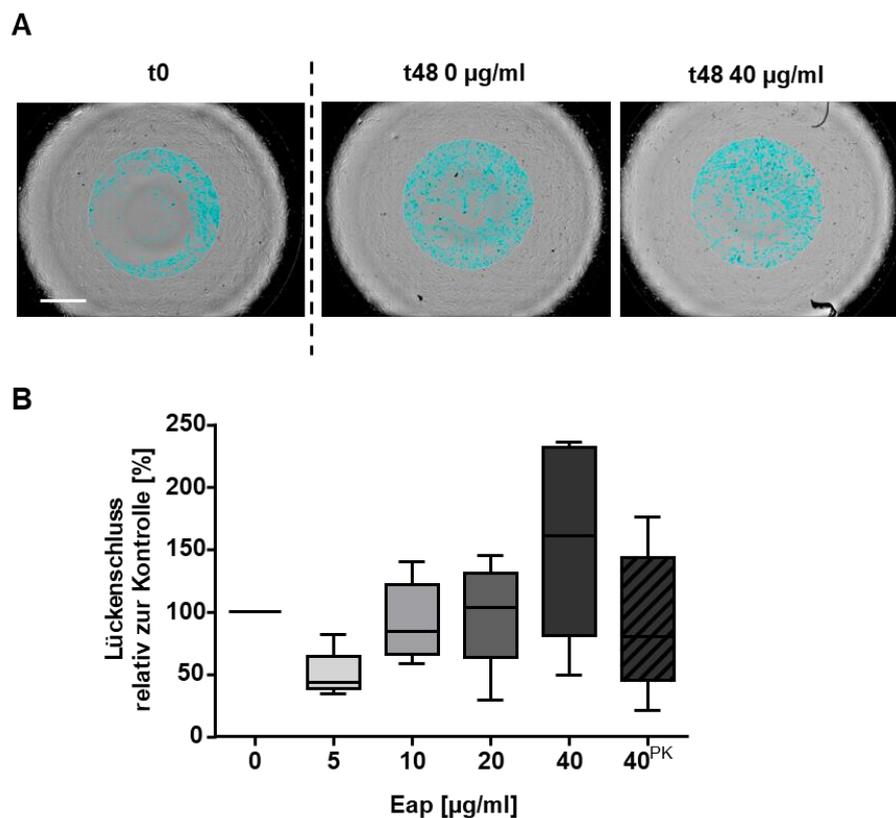
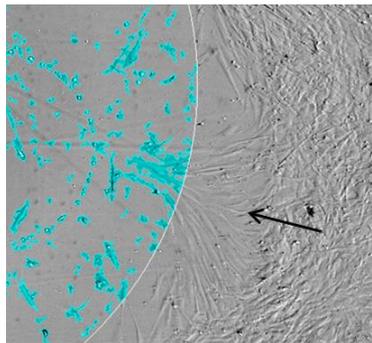


Abb. 4.16: Der Einfluss von Eap auf die Migration der Fibroblastenzelllinie BJ im Oris-Assay. Die Zellen wurden in Mangelmedium (MEM mit 1 % FKS) konfluent um den, in einer schwarzen 96-Well-Platte mit klarem Boden, platzierten Oris-Silikonstempel ausgesät. Am Folgetag wurden die Stempel gezogen und es erfolgte die t0-Messung im EnSight™-Plattenlesegerät. Mit Vollmedium wurde die Migration induziert, durch das enthaltene Aphidicolin (7  $\mu\text{g/ml}$ ) die Proliferation inhibiert. Untersucht wurde der Effekt von Eap in den dargestellten Konzentrationen (0- 40  $\mu\text{g/ml}$ ). Eap<sup>PK</sup> diente als zusätzliche Kontrolle. Die Zellen wurden unter diesen Bedingungen für weitere 48 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. A) Vergleich repräsentativer, ausgewerteter, lichtmikroskopischer Aufnahmen des EnSight™ von einer durch die Ziehung des Stemples entstandene Lücke zum Zeitpunkt t0 (links) und der unbehandelten Kontrolle (mittig) im Vergleich zur Situation mit der höchsten Eap-

Konzentration (rechts) nach 48 h. In türkis dargestellt ist die von der EnSight™ Software ausgewertete Konfluenz im Auswertungsareal; Maßstabsbalken = 100 µm. B) Migration der BJ-Zellen quantifiziert als Konfluenz in der Lücke in % in Relation zur Kontrolle ohne Eap (100%). Die Werte wurden ermittelt aus der Konfluenz zum Ende des Versuchs nach 48 h in Relation zur Konfluenz zum Startzeitpunkt. Die Daten repräsentieren die Werte aus fünf unabhängigen, biologischen Replikaten. Boxen: Median mit Interquartilsabstand, Antennen (engl. "whisker"): kleinster bzw. größte Datenwerte der jeweiligen Datensätze. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney-U-Test der Kontrolle (0 µg/ml Eap) gegen die jeweilige Eap-behandelte Probe.

Die Ergebnisse der Migrationsassays die mit der Fibroblastenzelllinie BJ durchgeführt wurden, entsprechen nicht denen der übrigen untersuchten Zelllinien. Da sich die BJ Zellen auch schlecht vermehren ließen, mit abnehmenden Zellzahlen über die Passagen, konnten insgesamt nur fünf Wiederholungen, ohne Duplikate durchgeführt werden. Insgesamt wuchsen die BJ Zellen auch ohne Eap-Behandlung nur sehr lückenhaft und langsam in die Lücke ein. Jedoch entspricht die Morphologie der verwendeten BJ der typischen, langgestreckten Form migrierender Fibroblasten (siehe Abb. 4.16C). Die von den anderen Zelllinien abweichenden Ergebnisse scheinen also durch die Art des Assays begründet zu sein (siehe Diskussion unter 5.2).



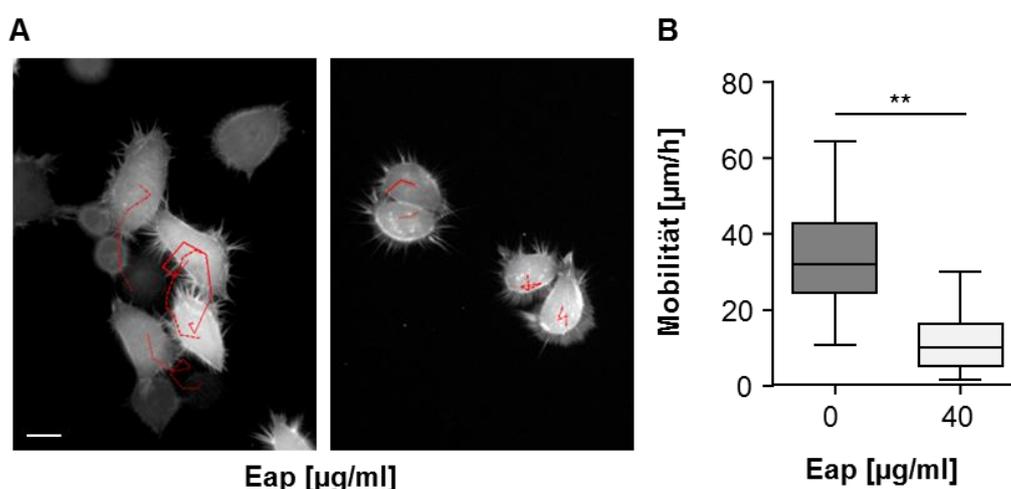
**Abb. 4.16C: Ausschnitt aus einer Aufnahme des EnSight™ eines Oris-Migrationsassays mit BJ Zellen. Zu erkennen ist die typische, elongierte Form migrierender Fibroblasten, die sich in die durch den Oris-Stempel entstandene Lücke schieben (Pfeil).**

### 4.2.5 Der Einfluss von Eap auf die Mobilität von Keratinozyten (HaCaT) auf Einzelzellniveau

Um das Migrationsverhalten und die Migrationsgeschwindigkeit von HaCaT Zellen auf Einzelzellniveau untersuchen zu können, wurden erneut Lifeact-transfizierte HaCaT verwendet und mit Hilfe des CO-Systems beobachtet (in Zusammenarbeit mit Christian Backes, AG Hoth, CIPMM). Die dünn auf Glasplättchen ausgesäten Zellen wurden über Nacht anwachsen lassen. Am Folgetag der Transfektion wurde das Vollmedium gegen MCDB ohne FKS ausgetauscht, um die Zellen zu hungern und bei der Hälfte der Ansätze mit Eap (40 µg/ml) versetzt. Unter diesen Konditionen wurden die Zellen erneut über Nacht

inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und das Glasplättchen in das CO-System eingespannt. Die Zellen wurden mit frischem MCDB-Medium ohne FKS supplementiert. Das Medium enthielt jedoch 200 ng/ml EGF, um die Migration zu induzieren und 7 µg/ml Aphidicolin um die Proliferation zu hemmen, sodass ausschließlich Migrationsereignisse beobachtet werden konnten. Als Messzeitraum wurden 150 min mit einer Bildintervallrate von 5 min gewählt. Die Auswertung der Migrationswege der Einzelzellen wurden mittels der AxioVision Software 4.8.3.0 (Zeiss) manuell bestimmt.

In diesem Assay zeigte sich eine hochsignifikante Reduzierung der durchschnittlichen Mobilität von 30 µm/s bei unbehandelten Zellen zu 10 µm/s unter Eap-Behandlung (Abb. 4.17).



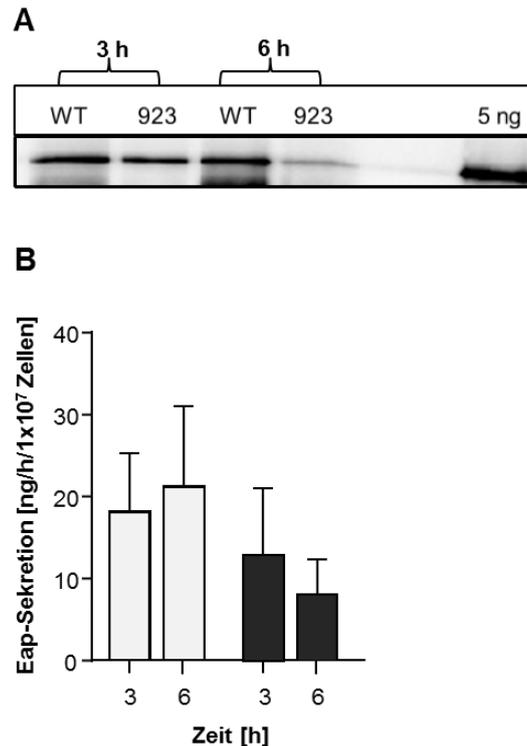
**Abb. 4.17:** Der Einfluss von Eap auf die Mobilität individueller HaCaT Zellen, dargestellt im CO-System. Lifeact-transfizierte HaCaT Zellen wurden lückenhaft auf Glasplättchen ausgesät und konnten über Nacht in Vollmedium anwachsen. Am Folgetag wurden die Zellen mit Mangelmedium und 0, oder 40 µg/ml Eap überschichtet und über Nacht gehungert. Am Messtag wurde die Zellen mit PBS gewaschen, in das CO-System eingebracht und mit Medium supplementiert, das mit 7 µg/ml Aphidicolin und 200 ng/ml EGF versetzt wurde. Die Migrationsbewegungen der Zellen wurden in fünfminütigen Intervallen über einen Zeitraum von 150 min fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und mit der AxioVision Software 4.8.3.0 ausgewertet. A) Repräsentative Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Eap-behandelter (40) und unbehandelter (0) EGF-stimulierter HaCaT Zellen, die gemessenen Migrationswege sind in rot dargestellt; Maßstabsbalken = 20 µm. B) Quantifizierung der zellulären Mobilität Eap-behandelter (lichtgraue Boxen) und unbehandelter (dunkelgraue Boxen) HaCaT Zellen in µm/s. Die Daten repräsentieren die Migrationswege von 200 Einzelzellen je Versuchsgruppe, bestimmt in 3 unabhängigen Experimenten; Boxen: Median mit Interquartilsabstand, Antennen (engl. "whisker"): kleinster bzw. größte Datenwerte der jeweiligen Datensätze. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney-U-Test; \*\*  $p < 0,01$  (Abbildung verändert aus Eisenbeis *et al.*, 2017).

### 4.3 *In vitro* Produktion von Eap

In vorangegangenen Studien, wurde beits die *eap*-Transkription von *S. aureus* in verschiedenen Nährmedien untersucht (Kawasaki, 2008). Es wurden ausserdem gezeigt,

dass die Transkription von *eap* in tiefen *S. aureus* infizierten Wunden hoch ist (Joost *et al.*, 2009). Zudem konnte, mittels Western Blot gezeigt werden, dass Eap in Wunden im Mausmodell exprimiert wird (Athanasopoulos *et al.*, 2006). Bislang ist jedoch nichts über die *in vitro* Produktion von Eap bekannt. Um diese Frage zu adressieren, wurde zum einen der *S. aureus* Stamm Newman T.F. verwendet, der aufgrund einer Mutation des *sae* Regulationssystems eine Überproduktion von Eap aufweist (Adhikari & Novick, 2008; Geiger *et al.*, 2008; Schafer *et al.*, 2009). Zum anderen wurde der *S. aureus* Stamm 923 untersucht, ein USA300 Isolat (Montgomery *et al.*, 2008). Die Anzucht der Bakterien erfolgte in dem klassischen Nährmedium TSB (engl. "tryptic soy growth") und es wurden die Eap-Produktion in der exponentiellen (2-3 h Wachstum in TSB) und der post-exponentiellen Wachstumsphase (5-6 h Wachstum in TSB) untersucht. Die durch Western-Blot und densitometrische Auswertung bestimmten Sekretionsraten von Eap (siehe 3.6.5) wurden auf eine bakterielle Zellzahl von  $1 \times 10^7$  KbE normiert (siehe 3.1.1.3), eine Zellzahl, die für *S. aureus* infizierte Wunden und Nierenabszesse nach 3-4 Tagen Infektion beschrieben wurde (McLoughlin *et al.*, 2006; Weidenmaier *et al.*, 2010; Yoong & Pier, 2010; Holtfreter *et al.*, 2013; McVicker *et al.*, 2014).

Frühere Transkriptionsstudien beobachteten in diesem Wachstumsmedium eine verstärkte *eap* Transkription in der postexponentiellen Phase (Joost *et al.*, 2009), die hier gewonnenen Ergebnisse auf Proteinebene signalisieren jedoch eine eher Wachstumsphasen-unabhängigen Expression von Eap in TSB (Abb. 4.18). Im Fall von Newman T.F. entsprach dies  $18 \pm 7$  ng/h/ $1 \times 10^7$  Zellen in der exponentielle Phase und  $21 \pm 10$  ng/h/ $1 \times 10^7$  Zellen, was nur einen leichten Anstieg widerspiegelt, während sich im Fall von 923 mit  $13 \pm 8$  ng/h/ $1 \times 10^7$  Zellen in der exponentiellen und  $8 \pm 4$  ng/h/ $1 \times 10^7$  Zellen sogar eine leichte Abnahme über die Zeit zeigte (weitere Diskussion der Ergebnisse unter 5.3).



**Abb. 4.18: Wachstumsphasen-abhängige Sezernierung von Eap in TSB *in vitro*.** Bakterien der *S. aureus* Stämme Newman T.F. und 923 und ihrer jeweiligen  $\Delta eap$  Derivate AH12 und HOM319 wurden über 2 h (exponentielle Phase) und 5 h (post-exponentielle Phase) bei 37°C und 225 rpm in TSB angezüchtet. Zu den beschriebenen Zeitpunkten wurden die Kulturen abzentrifugiert. Die Kulturüberstände der  $\Delta eap$  Derivate wurden sterilfiltriert, um ein Spendermedium zu erhalten, das der entsprechenden Wachstumsphase entspricht. Die Wildtypkulturen wurden im vorgewärmten Spendermedium der jeweiligen  $\Delta eap$  Mutante resuspendiert und erneut für 1 h bei 37°C und 225 rpm kultiviert und anschließend nach Entnahme einer Probe zur KbE Bestimmung abzentrifugiert. Der Eap-Gehalt des Zellkulturüberstands wurde mittels Western Blot ermittelt, die Bandenintensität densitometrisch bestimmt und die exprimierte Proteinmenge mittels mitgeführter Referenzbanden errechnet. A) Repräsentativer Blot mit 5 ng Eap als Kontrolle. B) Darstellung der densitometrisch ausgewerteten Daten aus 5 unabhängigen Experimenten; die Fehlerbalken zeigen die SD (Abbildung verändert aus Eisenbeis *et al.*, 2017).

Um den realen Bedingungen *in vivo* näher zu kommen, wurde zudem, bei sonst gleichem Versuchsaufbau, ein Wachstumsmedium für Säugerzellen, RPMI 1640, zur Anzucht der Bakterien verwendet. Es wurde zuvor gezeigt, dass *S. aureus* in der Lage ist darin zu gedeihen (Schmitt *et al.*, 2012). Die geringe Eisen- und hohe Aminosäurenkonzentration des Mediums spiegeln eher die *in vivo* Situation *S. aureus* infizierter Wunden wieder, die eine hohe Eap-Expression induziert. In Übereinstimmung hierzu konnte bei Wachstum in RPMI 1640 eine deutlich stärkere Eap Sezernierung in das umgebende Medium detektiert werden (Abb. 4.19). Die Bakterien des Stamms Newman T.F. sezernierten in der exponentiellen Phase (3-4 h Wachstum in RPMI 1640)  $396 \pm 361$  ng/h/1 x 10<sup>7</sup> Zellen, im Fall von Isolat 923  $206 \pm 106$  ng/h/1 x 10<sup>7</sup> Zellen.

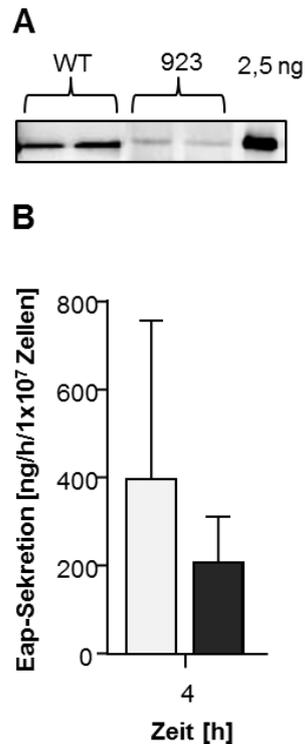


Abb. 4.19: Eap Sezernierung in der exponentiellen Phase in RPMI 1640. Zellen der *S. aureus* Stämme Newman T.F. und 923 und ihrer jeweiligen  $\Delta eap$  Derivate AH12 und HOM319 wurden über 3 h (exponentielle Phase) bei 37°C und 225 rpm in RPMI 1640 angezchtet. Nach 3 h wurden die Kulturen abzentrifugiert. Die Kulturüberstände der  $\Delta eap$  Derivate wurden sterilfiltriert, um ein wachstumsphasenspezifisches Spendermedium zu erhalten. Die Wildtypkulturen wurden im vorgewärmten Spendermedium der jeweiligen  $\Delta eap$  Mutante resuspendiert und erneut für 1h bei 37°C und 225 rpm kultiviert und anschließend nach Entnahme einer Probe zur KbE Bestimmung abzentrifugiert. Der Eap-Gehalt des Zellkulturüberstands wurde mittels Western Blot analysiert, die Bandenintensität densitometrisch bestimmt und die exprimierte Proteinmenge mittels mitgeführter Referenzbanden ermittelt. A) Repräsentativer Blot: Auf das für den Blot verwendete Gel wurden je zwei Proben von Newman T.F. und 923 aufgetragen. Reines Eap (2,5 ng) diente als Referenz. B) Darstellung der densitometrisch ausgewerteten Daten aus 5 unabhängigen Experimenten; die Fehlerbalken zeigen die SD (Abbildung verändert aus Eisenbeis *et al.*, 2017).

#### 4.4 Die Interaktion von Eap mit DNA

##### 4.4.1 Nachweis der Eap-DNA Interaktion mittels Agarosegelelektrophorese

Eap ist ein Protein mit einem sehr breiten Spektrum an potentiellen Bindungspartnern. Es konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass Eap mit zahlreichen Zellmatrixkomponenten, Plasmaproteinen und zellulären Oberflächenrezeptoren interagiert (McGavin *et al.*, 1993; Palma *et al.*, 1999; Hansen *et al.*, 2006). Basierend auf dieser weitgefächerten Bindungskapazität und aufgrund der Tatsache, dass Eap eine stark kationische Ladung in isotoner Lösung aufweist (pI = 9,93 bei pH 7,2), wurde hier hypothetisiert, dass es auch an (poly-)anionische Moleküle wie DNA binden kann. Um dies zu überprüfen, wurde mittels PCR ein 1.4-kbp DNA-Fragment generiert (siehe 3.4.1 - 3.5.1) und dann je 50 ng dieses

Amplifikats mit steigenden Eap-Konzentrationen (0, 1, 5, 10, 20 und 40  $\mu\text{g/ml}$ ) für 5 min bei 37°C in PBS inkubiert. Die Reaktion wurde mit Ladepuffer versetzt, auf ein Agarosegel geladen und eine Gelelektrophorese durchgeführt (siehe Abb. 4.20).

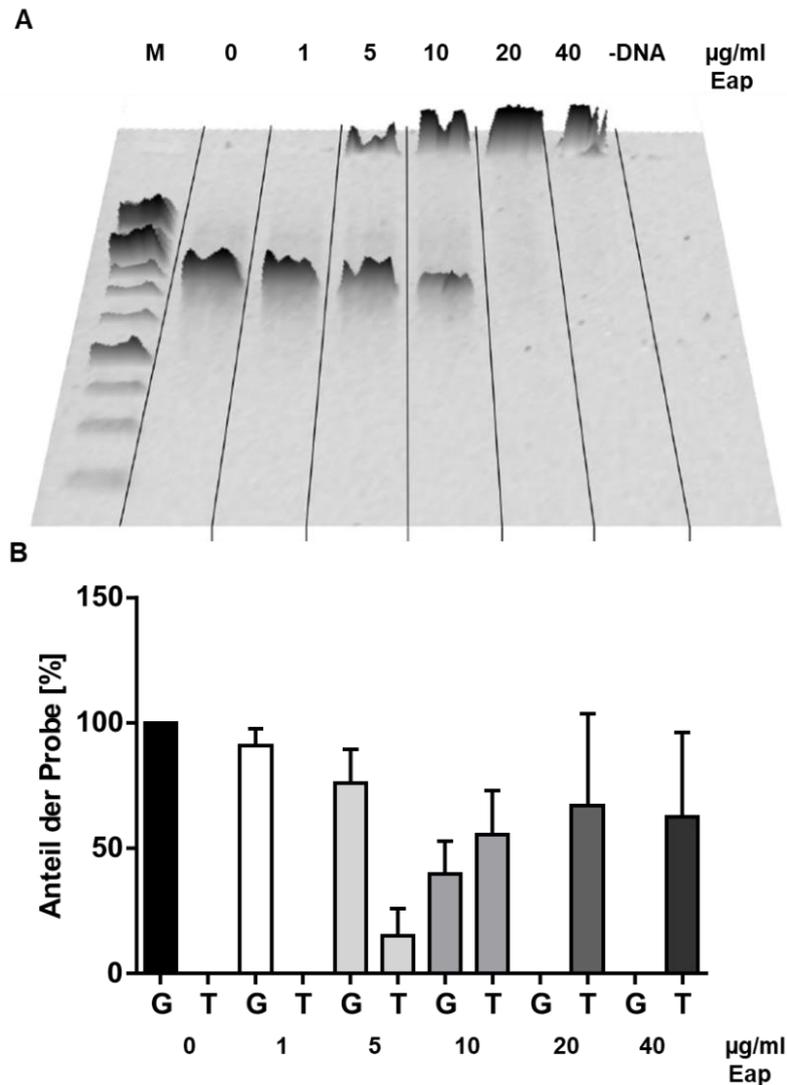


Abb. 4.20: Eap interagiert mit DNA in konzentrationsabhängiger Weise. Je 50 ng eines 1,4 kb PCR-Amplifikats wurden für 5 min bei 37°C in PBS mit steigenden Eap-Konzentrationen inkubiert und dann mit Ladepuffer versetzt auf ein Agarosegel geladen. A) Das dargestellte Gel ist repräsentativ für fünf unabhängige Experimente. B) Die Bandenintensitäten wurden semi-quantitativ mittels der ImageLab-Software ausgewertet. Dargestellt ist der Prozentsatz an DNA, der als Bande in das Gel eingelaufen ist (G) und der in der Tasche (T) verblieben ist, bezogen auf die Eap-Konzentration (1-40  $\mu\text{g/ml}$ ), mit der die Probe inkubiert wurde. Die Kontrolle (0  $\mu\text{g/ml}$  Eap) wurde als 100% gewertet und die Eap-inkubierten Proben dazu in Relation gesetzt. Die Daten entstammen fünf unabhängigen Wiederholungen; die Fehlerbalken zeigen die SD (Abbildung verändert aus Eisenbeis *et al.*, 2017).

Diese Versuche erbrachten, dass mit steigender Eap-Konzentration immer weniger DNA in das Gel einzuwandern vermochte. Gleichzeitig erschien ein deutlich zunehmendes SYBRgold-Signal in den entsprechenden Taschen. Dies lässt darauf schließen, dass Eap an DNA zu binden vermag und diese durch Bildung von großen Aggregaten am Einwandern in das Gel hindert. Ab einer Konzentration von 20  $\mu\text{g/ml}$  wurde die DNA vollständig am

Einwandern gehindert. Gleichzeitig zeigte sich bei den höheren Eap Konzentrationen ( $\geq 20 \mu\text{g/ml}$ ) tendenziell eine Abnahme des SYBRgold-Signals (siehe auch Diskussion unter 5.4).

#### 4.4.2 Nachweis der Eap-DNA Interaktion mittels AFM

In Zusammenarbeit mit Henrik Peisker (IMMH, UdS), der die rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen durchführte, wurde nachfolgend untersucht, ob Ursprung (Spezies) und Zustand der DNA (linear und zirkulär), einen Einfluss auf das Bindeverhalten von Eap ausüben. Hierzu wurde Eap zuerst mit DNA verschiedenen Ursprungs (synthetisches PCR-Fragment hergestellt siehe 3.5.3,  $\lambda$ -DNA, aus *Escherichia coli* gewonnenen Plasmid-DNA und gescheerte Heringssperma-DNA) inkubiert. Die Proben wurden anschließend, wie in 3.9.3 beschrieben an OTS-Silikonplättchen gebunden ("DNA-Combing") und mittels AFM das Höhenprofil bestimmt (siehe Abb. 4.21).

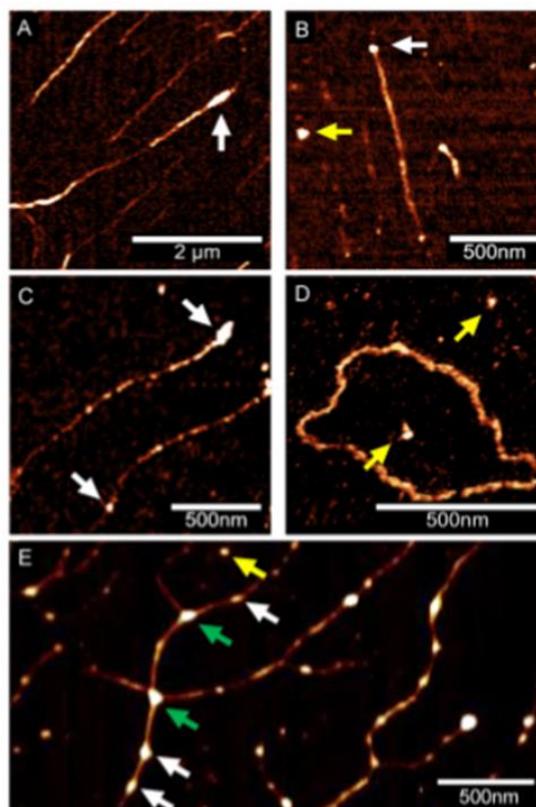


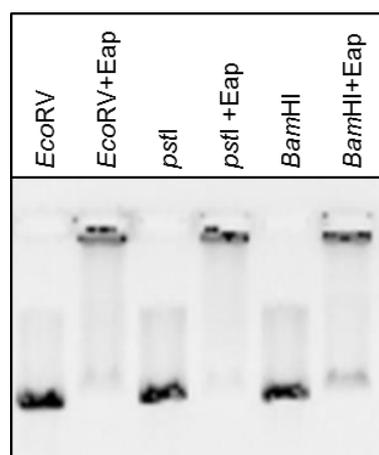
Abb. 4.21: Die Bindung von Eap an DNA wird durch die Konformation der DNA beeinflusst. DNA von verschiedenen Quellen ( $100 \text{ ng/ml}$ ) wurde mit Eap ( $0.5 \mu\text{g/ml}$ ) inkubiert und dann mittels "DNA-Combing" an eine Silikon-OTS-Oberfläche gebunden. Von den so präparierten Proben, wurde mittels AFM ein Höhenprofil erstellt. A) Phage lambda DNA. B) 1.4 kb PCR DNA-Produkt von *S. aureus* DNA. C) PstI-verdautes pBR322 Plasmid D) Zirkuläres pBR322 isoliert aus *E. coli* DH5 $\alpha$ . E) Gescherte Heringssperma-DNA. Gezeigt ist die Adhäsion von Eap Molekülen an die DNA (weiße Pfeile), Silikon-OTS-Plättchen (gelbe Pfeile), oder quervernetzte DNA (grüne Pfeile). Die linearen DNA-Moleküle in (A–C) und (E) wurden mittels der "DNA-

**Combing"-Methode auf die Silikon-OTS-Träger aufgebracht. Die Bilder sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche (Abb. aus Eisenbeis *et al.*, 2018).**

Diese Versuche zeigten, dass Eap mit hoher Regelmäßigkeit und nahezu ausschließlich an den Enden der linearisiert vorliegenden DNA-Proben (1,4 kb PCR-Fragment,  $\lambda$ -DNA,) zu finden war, eine Eap-Bindung an zirkuläre Plasmid-DNA jedoch so gut wie nicht detektierbar war. Einzig bei der gescheerten Heringssperma-DNA wurde sowohl an den Enden, als auch innerhalb der DNA mutmaßliche Eap-Signale detektiert (Eisenbeis *et al.*, 2018).

#### 4.4.3 Überprüfung des Einflusses der endständigen Konfiguration der DNA-Fragmente auf die Eap-Bindungseffizienz

Um die Beobachtung, dass Eap bevorzugt an die Enden linearer DNA bindet, weiter zu untermauern und um den Einfluss der Konfiguration der Enden der DNA-Fragmente auf die Bindungsfähigkeit von Eap zu untersuchen wurden mittels Restriktionsenzymen glatte "blunt"-Enden, oder Enden mit Überhang ("sticky") hergestellt. Je 3  $\mu$ g des Plasmids wurden für 20 min bei 37°C mit den Enzymen *EcoRV* (generiert "blunt" Enden), *PstI* (generiert "sticky" Enden mit einem 3'-Überhang), oder *BamHI* (generiert "sticky" Enden mit einem 5' Überhang) verdaut (siehe 3.5.2; alle 3 Restriktionsenzyme schneiden in pBR322 exakt 1x). Die bei 80°C abgestoppten Reaktionsgemische wurden mit dem PCR-Purification Kit (Quiagen) aufgereinigt. Die Kontrolle der DNA-Konzentration erfolgte am Nanodrop (siehe 3.5.2). Je 200 ng der Restriktionsfragmente wurden für 15 min bei 37°C mit Eap inkubiert und dann mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 4.22).

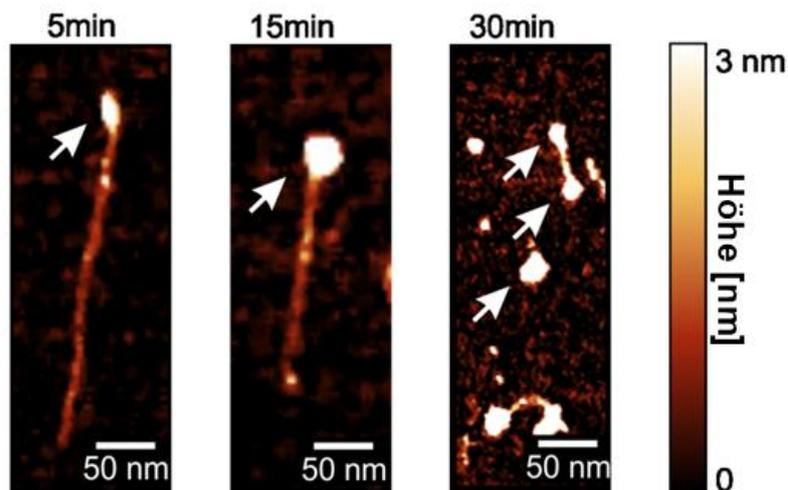


**Abb. 4.22: Eap bindet mit gleicher Effizienz an "blunt", oder "sticky"-Enden von Restriktionsfragmenten. Je 200 ng des mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* (generiert "blunt" Enden), *PstI* (generiert "sticky" Enden mit einem 3'-Überhang), oder *BamHI* (generiert "sticky" Enden mit einem 5' Überhang) verdauten Pasmids pBR322 wurden für 15 min bei 37°C mit oder ohne Eap (40  $\mu$ g/ml) inkubiert und das Reaktionsgemisch anschließend gelelektrophoretisch**

in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt. Das dargestellte Gel ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Es zeigte sich, dass Eap in seiner Bindungseffizienz nicht durch die Art der Konfiguration der Enden der DNA-Fragmente beeinflusst wird. Dies spricht für eine eher unspezifische Art der Bindung. Wie schon zuvor für das PCR-Fragment beobachtet, konnte auch hier gezeigt werden, dass Eap (40 µg/ml) das Einwandern der linearisierten Plasmid-DNA, ungeachtet der Natur der DNA-Enden, nahezu komplett zu unterbinden vermochte.

Um zu klären, ob Eap über die Zeit einen Effekt auf die DNA ausübt, wurde in einem nächsten Schritt das 1,4 kb große PCR-Fragment mit Eap (0,5 µg/ml) in PBS inkubiert und zu definierten Zeitpunkten Proben entnommen, die per "Combing-Technik" (siehe 3.9.3) auf eine Octadecyltrichlorsilan (OTS)-beschichtete Silikonoberfläche aufgebracht wurden. Dies führt dazu, dass die DNA-Fragmente in einer hochgeordneten Weise auf der Oberfläche ausgebreitet werden. Nachfolgend wurden die DNA-Eap-Komplexe mittels AFM gemessen, um ihr Höhenprofil zu bestimmen (Abb. 4.23).



**Abb. 4.23:** Verkürzung von DNA-Strängen durch Eap über die Zeit. Die mit Eap inkubierte DNA wurde nach den angezeigten Zeitpunkten auf eine OTS-beschichtete Siliziumoberfläche aufgebracht und mittels AFM gemessen. Die Pfeile markieren das an dem DNA-Strang gebundene Eap; Maßstabsbalken = 50 nm (Abbildung verändert aus Eisenbeis *et al.*, 2018).

Wie zuvor schon beobachtet, wurde auch in diesen Experimenten ein bevorzugtes Binden von Eap an den Enden der linearisierten DNA beobachtet. Interessanterweise zeigte sich hierbei über die Zeit eine klare Verkürzung der DNA. Gleichzeitig konnte in den länger mit Eap koinkubierten DNA Proben eine Höhen- wie Weitenzunahme der endständigen Eap-DNA Aggregate beobachtet werden. Beide Beobachtungen können dahingehend interpretiert werden, dass Eap DNA über die Zeit zu aggregieren vermag. Ebenso könnten sie aber auch als ein Hinweis dafür gewertet werden, dass Eap eine intrinsische DNase-Aktivität gegenüber linearisierter DNA aufweist. Letztere Hypothese wird auch durch die in Abb.

4.20B zeigten Befunde unterstützt, dass bei hohen Eap Konzentrationen weniger SYBRgold Signal in den AGEs beobachtet wurden.

#### 4.4.4 Untersuchung einer möglichen intrinsischen DNase Aktivität von Eap mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkoholfällung und Agarosegelelektrophorese

Um zu überprüfen, ob Eap auch eine intrinsische DNase-Aktivität besitzt und DNA abbaut, wurden im Rahmen dieser Dissertation zwei verschiedene DNase-Assays verwendet. Als ersten Ansatz zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkoholfällung im Anschluss an die Inkubation von Eap und DNA durchgeführt. Hierzu wurden 250 ng des 1,4 kb PCR DNA-Fragments mit steigenden Konzentrationen von Eap (10, 20 und 40 µg/ml) für 30 min bei 37°C in RPMI ohne Phenolrot inkubiert (siehe 3.5.3). Als Kontrolle des Verdauvorgangs dienten Proben, die für 5, 15 oder 30 min mit DNase I verdaut wurden. Ferner wurde ein Ansatz ohne Proteinzugabe (K) mitgeführt. Anschließend wurden die Proteine (Eap oder DNase I) mittels Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol aus den Proben gefällt. Die im Überstand verbliebene DNA konnte dann mittels AGE aufgetrennt werden (Abb. 4.24).

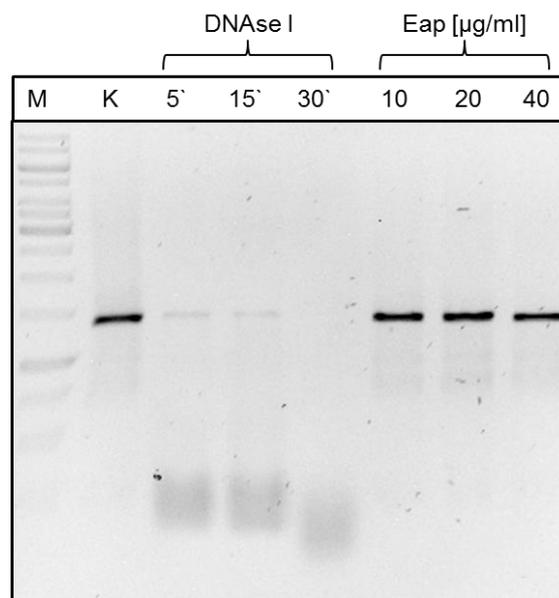


Abb. 4.24: Phenol-Chloroform-Isoamylalkoholfällung von Eap-DNA-Reaktionen indiziert keinen DNA-Abbau durch Eap. Je 250 ng des 1,4 kb PCR-Amplifikats wurden für 30 min bei 37°C in 50 µl RPMI mit steigenden Eap-Konzentrationen (0,10, 20, 40 µg/ml) inkubiert. Als Kontrolle dienten Proben mit DNase I, die für 5, 15 oder 30 min verdaut wurden, sowie ein Ansatz ohne Proteinzugabe (K). Es folgte eine Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkoholfällung und 20 µl des erhaltenen Überstands, der die DNA enthält, wurden mit Ladepuffer versetzt auf ein Agarosegel geladen. Das dargestellte Gel ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente (Abbildung verändert aus Eisenbeis *et al.*, 2018).

In den DNase I-Kontrollen sieht man, wie erwartet, einen deutlichen Abbau-Effekt der DNA. Während nach 5 und 15 Minuten DNase I Inkubation nur noch eine schwache Bande des PCR-Produktes erkennbar war, so konnten nach 30 Minuten Koinkubation mit DNase I nur noch Abbauprodukte der DNA im unteren Bereich des Gels detektiert werden. In den Ansätzen mit Eap hingegen konnte kein relevanter Abbau der DNA festgestellt werden. Dies spricht dafür, dass Eap zwar an DNA binden und diese akkumulieren, sie jedoch nicht abbauen kann.

### **4.4.5 Generierung einer $\Delta$ eap Mutante aus dem nukleasemutanten Stamm M0746N1 (*S. aureus* Newman *nuc1nuc2*) mittels Phagentransduktion**

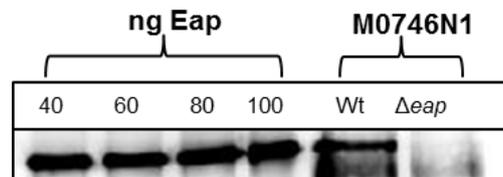
Um in einem weiteren Versuchsansatz zu überprüfen, ob Eap eine intrinsische DNase-Aktivität besitzt, sollte des Weiteren das phänotypische Verhalten von *S. aureus* Newman und seiner *eap* Mutante in einem Agarplatten-basierten DNase Assay untersucht werden. Da *S. aureus* dafür bekannt ist, *in vitro* wie *in vivo* zwei theromstabile Nukleasen (Nucl und NuclI) in das umgebende Milieu abzugeben (Tang *et al.*, 2008), war es hierzu notwendig, eine *S. aureus* Mutante zu generieren, der neben *eap* auch die für die Nukleasen kodierenden Gene *nuc1* und *nuc2* fehlen. Hierzu wurde mittels Phagentransduktion eine *eap* Mutante des Newman Derivats M0746N1 (Kaito *et al.*, 2011) hergestellt, das bereits für die beiden Nukleasen *nuc1* und *nuc2* defizient ist (siehe 3.6.1). So kann eine mögliche Nukleaseaktivität von Eap direkt sichtbar werden, ohne von den Aktivitäten der Nukleasen Nucl und NuclI überlagert zu werden. Als Donor für die Phagentransduktion diente die zuvor schon beschriebene *eap* Deletionsmutante AH12. Die Transduktanten wurden zunächst mittels Erythromycin-haltigem Agar vorselektiert. Die erfolgreiche Deletion von *eap* wurde jedoch auch auf Transkriptionsebene mittels qPCR und auf Translationsebene mittels Western Blot überprüft.

#### **4.4.5.1 Überprüfung der *eap*-Deletion mittels qPCR und Western Blot**

Die qPCR (siehe 3.6.2) ergab für den Ausgangsstamm *S. aureus* Newman M0746N1 (Newman *nuc1nuc2*) eine relative Genexpression von *eap* bezogen auf das Haushaltsgen *gyrB* von 1,87. Im Vergleich dazu verlief die Genexpression von *eap* bei der Transduktante im Bereich des Messhintergrunds.

Die Überprüfung des Transduktionserfolgs auf Translationsebene erfolgte mittels Western Blot (siehe 3.6.5). Dafür wurde 1 ml einer Übernachtkultur auf eine  $A_{600}$  von 1 eingestellt,

abzentrifugiert und 30 µl des Überstandes einer SDS-PAGE und einem nachfolgenden Western Blot mit primären Antikörpern gegen Eap unterzogen (α-Eap aus Kaninchen, polyklonal 1:2000). Die sekundäre AK-Bindung erfolgte mittels eines, gegen Kaninchen-AK gerichteten, HRP-gekoppelten AK aus der Ziege (1:3000). Die Abschließende Detektion erfolgte als Chemilumineszenzmessung, durch Zugabe von ECL Reagenz im ChemiDoc™ XRS System (Durchführung siehe 3.7.5).



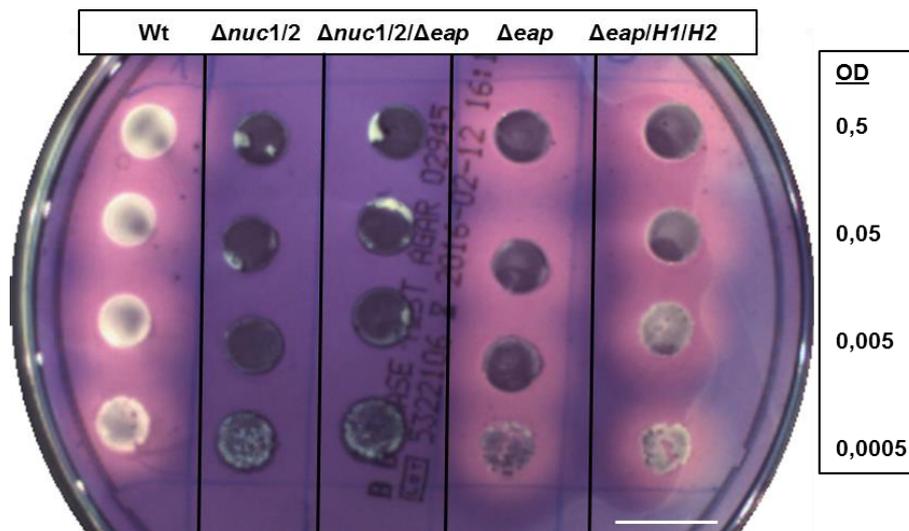
**Abb. 4.25:** Western Blot mit Überständen von *S. aureus* M0746N1 (Newman *nuc1 nuc2*) und der durch Phagentransduktion erzeugten M0746N1  $\Delta eap$ -Mutante. Je 30 µl Überstand einer auf  $A_{600}$  eingestellten Übernachtskultur wurde auf das SDS-PAGE aufgetragen. Aufgereinigtes Eap (40-100 ng) wurde zur Kontrolle mitgeführt. Nach dem Blotten auf eine Nitrozellulosemembran, erfolgte die Eap-Detektion mittels α-Eap aus Kaninchen (polyklonal 1:2000). Als sekundärer Antikörper diente ein HRP-gekoppelter Ziege-α-Kaninchen-AK (1:3000). Die Auswertung erfolgte durch Zugabe von ECL Reagenz und Messung der Chemilumineszenz im ChemiDoc™ XRS System.

In Abb. 4.25 lässt sich im Fall von M0746N1 (Newman *nuc1nuc2*) eine deutliche Eap-Bande erkennen, während bei der M0746N1  $\Delta eap$ -Mutante auf dieser Höhe keine Bande mehr detektierbar war.

#### 4.4.6 Untersuchung einer möglichen intrinsischen DNase Aktivität von Eap mittels DNase-Test-Agar

Um die Fähigkeit, DNA abzubauen direkt am lebenden Organismus zu überprüfen, wurden der *S. aureus* Stamm Newman T.F. (Wt) sowie dessen isogene Mutanten, denen die Gene für die Nukleasen *nuc1/2* und/oder *eap*, oder seiner Homologe (*eapH1*, *eapH2*) fehlten, auf DNase Test Agar von BD aufgeimpft. Von allen Stämmen wurde eine 6 h Kultur (postexponentielle Phase) verwendet und daraus eine Probe mit einer  $A_{600}$  von 0,5 sowie serielle 1:10 Verdünnungen bis 0,0005 hergestellt. Es wurden je 5 µl dieser Verdünnungen auf den DNase-Agar aufgetropft und über Nacht bei 37°C im Bakterienbrutschrank inkubiert. Am Folgetag wurde der Agar mit 0,1% Toluidinblau (TB) überschichtet (siehe Abb. 4.26). Diese Behandlung führt dazu, dass sich eine pinkfarbene Zone um die Kolonien mit DNase-Aktivität bildet. Dies beruht darauf, dass TB ein metachromatischer Farbstoff ist, welcher in wässriger Lösung ein Absorptionsmaximum von 625 nm besitzt. In Anwesenheit eines Polyanions wie Agar bilden sich Farbstoffaggregate und diese werden durch den Agar

absorbiert. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum hin zu einer geringeren Wellenlänge von 540 nm, was mit dem bloßen Auge pink erscheint. In Anwesenheit von DNA interkaliert TB zwischen den aufeinanderfolgenden Lagen der Basenpaare, was zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums hin zu einer höheren Wellenlänge im 600 nm Bereich führt und als dunkles Blau wahrgenommen wird. Da die Komplexe zwischen TB und Agar schwächer sind, als die zwischen TB und DNA, entsteht in Anwesenheit von Agar und DNA eine Blaufärbung. Bauen jedoch Nukleasen die im DNase-Agar enthaltene DNA (2 mg/ml) ab, zerfällt der TB-DNA-Komplex und es bildet sich erneut ein TB-Agar-Komplex, der als pinker Hof um die Kolonien sichtbar wird (Lachica *et al.*, 1971).



**Abb. 4.26: Nukleaseaktivität von *S. aureus* Newman T.F. und *nuc1/nuc2*-, sowie *eap*-defizienter Mutanten auf DNase-Test-Agar. Der Wildtyp, sowie die  $\Delta eap$  und  $\Delta eap/eapH1/eapH2$ -Mutanten zeigen bereits ab einer  $A_{600}$  von 0,0005 einen ausgeprägten Nukleasehof. Mutanten denen die Nukleasen 1/2 fehlen sind, unabhängig vom Vorhandensein von Eap nicht zum DNA-Abbau im DNase Test Agar fähig. Maßstabsbalken = 1 cm).**

Es ist deutlich erkennbar, dass sich im Falle des Wildtyps (Newman TF) bereits bei einer aufgetropften  $A_{600}$  von 0,0005 ein deutlicher Nuklease-Hof zeigt. Selbiges gilt für den *eap* defizienten Stamm HOM268 und den Stamm HOM269, dem neben *eap* auch die beiden *eap*-Homologe (*eapH1* und *eapH2*) fehlen. Alle drei Stämme besitzen die Gene für beide Nukleasen (*nuc1* und *nuc2*). Die *nuc1 nuc2* Mutante M0746N1 und die im Rahmen dieser Dissertation hergestellte *nuc1 nuc2 eap* Mutante zeigten jedoch keinerlei Degradationshöfe. Dies deutet darauf hin, dass Eap unter diesen Bedingungen keine Nukleaseaktivität besitzt und ohne *nuc1/2* keine Nukleaseaktivität detektierbar ist.

### 4.5 Die Auswirkungen von Eap als proliferations- und migrationshemmendes Agens auf Blasentumorzellen

Die proliferations- und migrationshemmenden Eigenschaften von Eap konnten, wie bereits erwähnt, für verschiedene Zelltypen in vorangegangenen Studien gezeigt werden (Jahreis *et al.*, 1995; Chavakis *et al.*, 2005; Hagggar *et al.*, 2005) und wurden auch für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Keratinozyten, Endothelzellen und Fibroblasten bestätigt. Dass diese Effekte Eap als potentielles Therapeutikum gegen Krebs interessant machen, untersuchten bereits Schneider und Kollegen (Schneider *et al.*, 2007). Diese Autoren konnten in einem Mausmodell zeigen, dass Eap einen Effekt auf die Migration/Streuung von Brustkrebszellen in Knochen und auf die Größe der Metastasen hat. In Anlehnung an diese Beobachtungen wurde in dieser Dissertation der Eap-Effekt auf zwei nichtinvasive Blasentumorzelllinien untersucht. Die Blase als offenes System wurde im Hinblick auf eine mögliche direkte Applizierbarkeit des Agens, ohne die Notwendigkeit einer intravenösen Gabe, gewählt. Beide Krebszelllinien, RT-112 und 5637, stammen aus einem mäßig differenzierten Karzinom und weisen eine epitheliale Morphologie auf (Baumgart *et al.*, 2017). Während die Zelllinie RT-112 dem Blasenkarzinom einer Patientin entstammen, wurden die 5637-Zellen aus dem Karzinom eines männlichen Patienten entnommen (Baumgart *et al.*, 2017).

#### 4.5.1 Der Einfluss von Eap auf die Proliferation und den Metabolismus der nicht-invasiven Blasenkrebszelllinien RT-112 und 5637

Die Durchführung der Assays erfolgte prinzipiell wie in 4.2.1 für HaCaT und EA.hy926-Zellen beschrieben. Es konnte ein deutlicher, konzentrationsabhängiger Effekt von Eap auf die Proliferation der beiden untersuchten Blasenkarzinomzelllinien RT-112 und 5637 gezeigt werden.

Im Fall von RT-112 wurde die Proliferation ab einer Konzentration von 20 µg/ml, die Stoffwechselleistung (MTT-Umsatz) ab 40 µg/ml, im Vergleich zu einer Eap-freien Kontrolle signifikant gemindert (siehe Abb. 4.27).

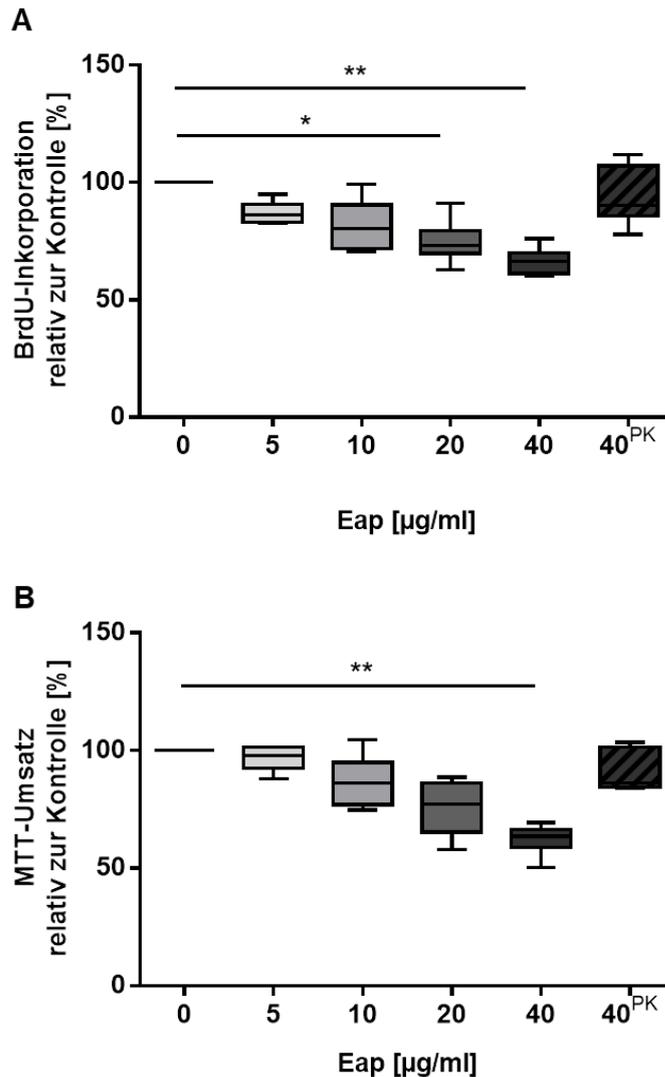


Abb. 4.27: Der proliferationshemmende Einfluss von Eap auf die Blasenkarzinomzelllinie RT-112. Die Krebszellen wurden in RPMI1640 mit 10% FKS in 96-Well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden in Anwesenheit der dargestellten Eap-Konzentrationen (5-40  $\mu\text{g/ml}$ ; Boxen in Graustufen) über 72 h inkubiert und anschließend A) ein BrdU-Assay nach Herstellerangaben, oder B) ein MTT-Assay, wie in den Methoden beschrieben, durchgeführt. Die erhaltenen Absorbationswerte wurden auf die Eap-freie Kontrolle normalisiert. Proteinase K verdautes und mit Hitze behandeltes Eap (40<sup>PK</sup>) diente als weitere Kontrolle (gestreifte Box). Die Versuche wurden in sechs unabhängigen biologischen Experimenten, mit jeweils drei technischen Replikaten durchgeführt; Boxen: Median mit Interquartilsabstand, Antennen (engl. "whisker"): kleinster bzw. größte Datenwerte der jeweiligen Datensätze. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ; die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney-U-Test.

Im Fall der Zelllinie 5637 konnte im BrdU-Assay bereits bei einer Menge von 10  $\mu\text{g/ml}$  Eap ein signifikanter Effekt auf die Proliferation nachgewiesen werden. Der Effekt auf den MTT-Umsatz wurde jedoch erst bei 40  $\mu\text{g/ml}$  Eap signifikant (siehe Abb. 4.28).

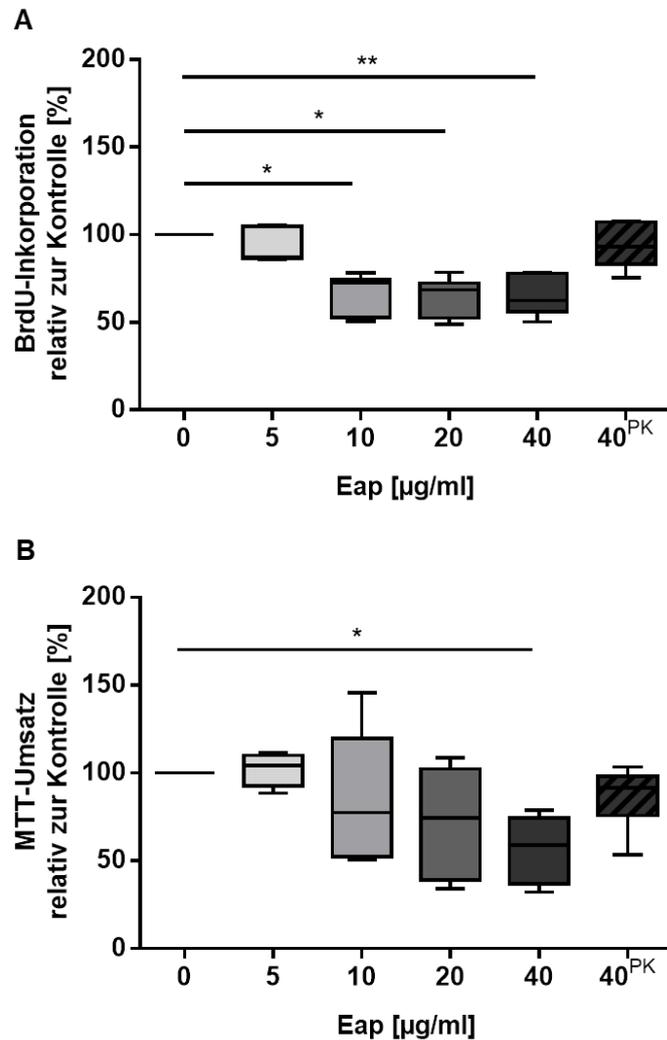
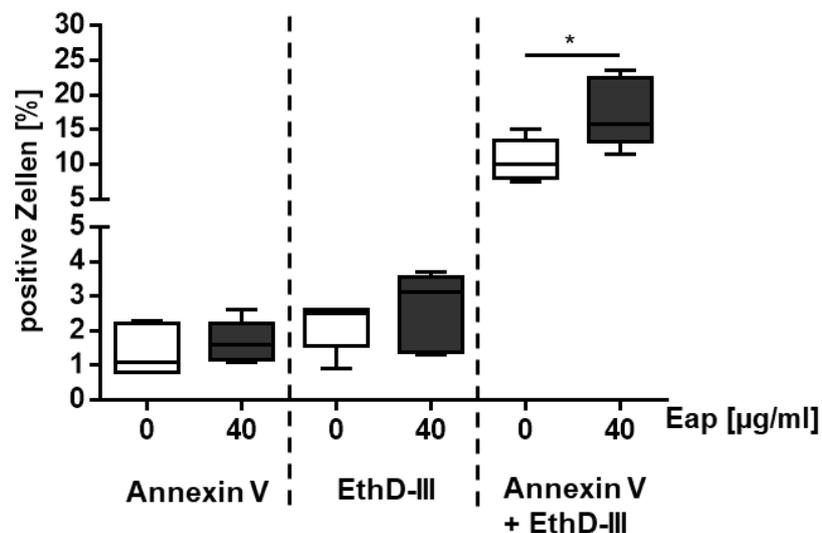


Abb. 4.28: Der Einfluss von Eap auf die Proliferation der Blasenkarzinomzelllinie 5637. Die Zellen wurden in RPMI1640 mit 10% FKS in 96-Well-Platten ausgesät und in Anwesenheit der Eap-Konzentrationen (5-40 µg/ml; Boxen in Graustufen) über 72 h inkubiert. Dann erfolgten A) ein BrdU-Assay und B) ein MTT-Assay. Die Absorptionswerte wurden auf die Kontrolle ohne normalisiert. Proteinase K verdautes und mit Hitze behandeltes Eap (40<sup>PK</sup>) diente als weitere Kontrolle (gestreifte Box). Die Versuche wurden in sechs unabhängigen biologischen Experimenten, mit jeweils drei technischen Replikaten durchgeführt; Boxen: Median mit Interquartilsabstand, Antennen (engl. "whisker"): kleinster bzw. größte Datenwerte der jeweiligen Datensätze. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ; die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney-U-Test.

In der Proteinase K verdauten und Hitze inaktivierten Eap Kontrolle konnte in keiner der Testsituationen ein Unterschied zu der entsprechenden Kontrolle ohne Eap festgestellt werden.

#### 4.5.2 Der Einfluss von Eap auf die frühe und späte Apoptose der Blasenkrebszelllinien RT-112 und 5637

Ebenso wie für die Keratinozyten und Endothelzellen (siehe 4.2.2) wurde auch für die Blasenkarzinomzellen überprüft, ob es sich bei den durch Eap-hervorgerufenen Effekten um eine echte Proliferationshemmung, oder lediglich einen zytotoxischen Effekt handelt. Im Fall der Zelllinie RT-112 wurde keine signifikante Nekrose ausgelöst (Kontrolle:  $1,97 \pm 0,8\%$ ; Eap<sup>40</sup>:  $2,6 \pm 1,12\%$ ), lediglich der Anteil an spätapoptotischen, Annexin V und EthD-III positiven Zellen erhöhte sich um 7,71% (Kontrolle:  $9,73 \pm 3,32\%$ ; Eap<sup>40</sup>:  $17,44 \pm 4,89\%$ ) (siehe Abb. 4.12).



**Abb. 4.29:** Der Einfluss von Eap auf die frühe und späte Apoptose/Nekrose der Blasenkarzinomzelllinie RT-112. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Eap (40 µg/ml, dunkelgraue Boxen), oder ohne Eap (weiße Boxen) in RPMI1640 mit 10% FKS in 24-Well-Platten über Nacht inkubiert. Am Folgetag erfolgte die Färbung mit Annexin V und EthD-III, sowie die Durchflusszytometrie am FACS. Die Versuche erfolgten in fünf unabhängigen biologischen Experimenten; Boxen: Median mit Interquartilsabstand, Antennen (engl. "whisker"): kleinster bzw. größte Datenwerte der jeweiligen Datensätze. \*  $p < 0,05$ ; die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

Die Ergebnisse, des zytotoxischen Effekts von Eap, auf die Karzinomzelllinie 5637 ähneln denen der Endothelzellen (EA.hy926) und zeigen lediglich einen signifikant erhöhten Anteil an nekrotischen Zellen in der Eap-behandelten Zellpopulation mit einem Anstieg von 1,44% (Kontrolle:  $0,58 \pm 0,25\%$ ; Eap<sup>40</sup>:  $2,02 \pm 0,73\%$ ), während beim Anteil spät-apoptotischer Zellen (Annexin V + EthD-III positive Zellen) lediglich eine tendenzielle Erhöhung in der Eap-behandelten Zellpopulation zu beobachten ist (Kontrolle:  $10,22 \pm 3,12\%$ ; Eap<sup>40</sup>:  $14,3 \pm 2,26\%$ ) (siehe Abb. 4.30).

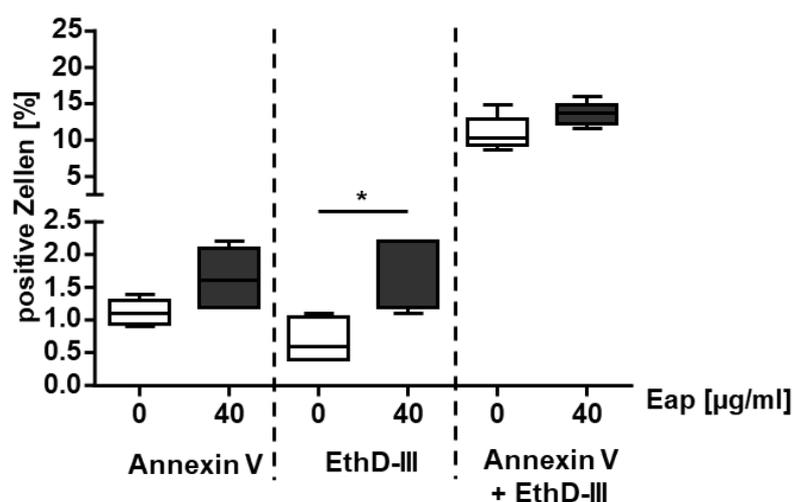


Abb. 4.30: Der Einfluss von Eap auf die frühe und späte Apoptose/Nekrose der Blasenkarzinomzelllinie 5637. Die Zellen wurden mit Eap (40 µg/ml, dunkelgraue Boxen), oder ohne Eap (weiße Boxen) in RPMI1640 mit 10% FKS in 24-Well-Platten über Nacht inkubiert. Am Folgetag erfolgte die Färbung mit Annexin V und EthD-III, sowie die Durchflusszytometrie am FACS. Die Versuche erfolgten in fünf unabhängigen biologischen Experimenten; Boxen: Median mit Interquartilsabstand, Antennen (engl. "whisker"): kleinster bzw. größte Datenwerte der jeweiligen Datensätze. \*  $p < 0,05$ ; die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

#### 4.5.3 Der Einfluss von Eap auf die Migration der Blasenkrebszelllinien RT-112 und 5637 im Lückenschluss-Assay

Die Erkenntnisse von (Schneider *et al.*, 2007) deuten darauf hin, dass Eap auch die Metastasierung von Tumoren unterdrücken kann. Um zu überprüfen, ob Eap auch auf die untersuchten Krebszellen einen migrationshemmenden Einfluss *in vitro* zeigt, wurden wie in 3.7.5.2 beschrieben, Oris-Assays mit beiden Zelllinien durchgeführt. Auch hier wurde mit Vollmedium induziert und Aphidicolin (7 µg/ml) verwendet, um die Proliferation zu unterdrücken und ausschließlich die Migrationsvorgänge darzustellen. Da die getesteten Krebszellen jedoch deutlich schneller migrierten, als die zuvor untersuchten Keratinozyten, Endothelzellen und Fibroblasten, wurden die Endpunktmessungen nach 24 h durchgeführt.

Im Fall der Zelllinie RT-112 zeigte sich bereits bei einer Konzentration von 5 µg/ml Eap eine erste Tendenz für einen migrationshemmenden Effekt. Ab einer Konzentration von 20 µg/ml wurde dieser Effekt signifikant und bei 40 µg/ml hochsignifikant (siehe Abb. 4.31).

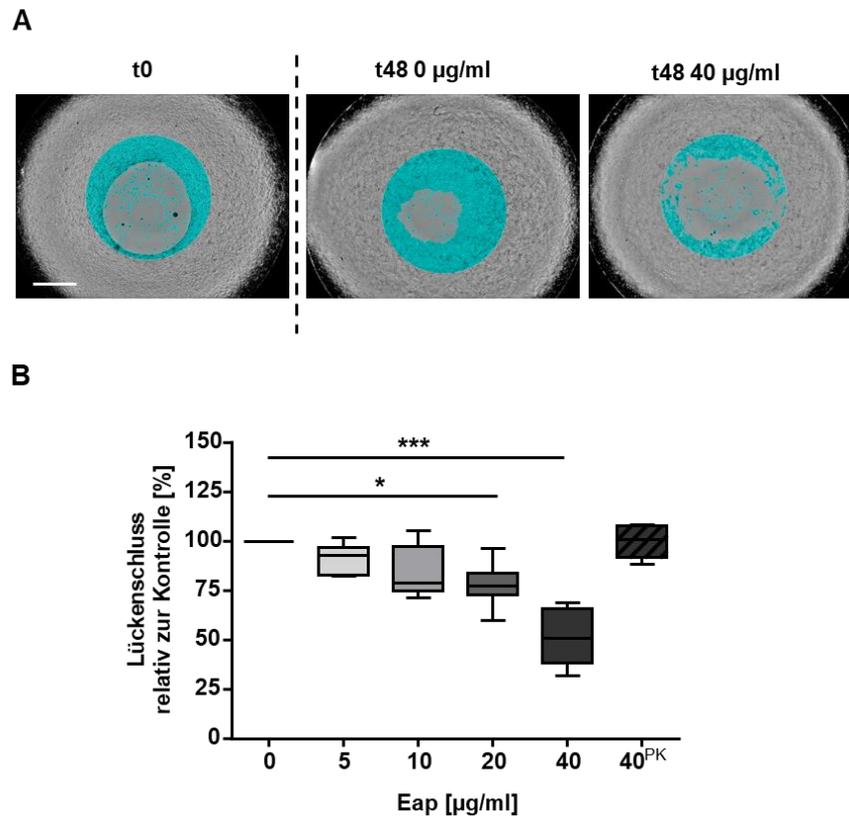


Abb. 4.31: Der Einfluss von Eap auf die Migration der Zelllinie RT-112 im Oris-Assay. Die Zellen wurden in RPMI1640 mit 1 % FKS konfluent um den, in einer schwarzen 96-Well-Platte mit klarem Boden platzierten, Oris-Silikonstempel ausgesät. Die Stempel wurden am folgenden Tag gezogen und es erfolgte die t0-Messung im Plattenlesegerät EnSight™. Durch Austausch des Mediums gegen Vollmedium wurde die Migration induziert, durch das enthaltene Aphidicolin (7 µg/ml) die Proliferation inhibiert. Untersucht wurde der Effekt von Eap in den dargestellten Konzentrationen (0- 40 µg/ml), mit Eap<sup>PK</sup> als zusätzlicher Kontrolle. Die Zellen wurden unter diesen Bedingungen für weitere 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. A) Vergleich repräsentativer, ausgewerteter, lichtmikroskopischer Aufnahmen des EnSight™ von einer durch die Ziehung des Stemples entstandene Lücke zum Zeitpunkt t0 (links) und der unbehandelten Kontrolle (mittig) im Vergleich zur Situation mit der höchsten Eap-Konzentration (rechts) nach 24 h. In türkis dargestellt ist die von der EnSight™ Software ausgewertete Konfluenz im Auswertungsareal; Maßstabsbalken = 100 µm. B) Migration der RT-112 Zellen quantifiziert als Konfluenz in der Lücke in % in Relation zur Kontrolle ohne Eap (100%). Die Werte wurden ermittelt aus der Konfluenz zum Ende des Versuchs nach 24 h in Relation zur Konfluenz zum Startzeitpunkt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von technischen Duplikaten aus acht unabhängigen, biologischen Replikaten. Boxen: Median mit Interquartilsabstand, Antennen (engl. "whisker"): kleinster bzw. größte Datenwerte der jeweiligen Datensätze. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney-U-Test der Kontrolle (0 µg/ml Eap) gegen die jeweilige Eap-behandelte Probe.

Die Ergebnisse für die Zelllinie 5637 ähneln denen von RT-112, mit signifikanten Werten ab einer Konzentration von 20 µg/ml und hochsignifikanten Werten bei 40 µg/ml hochsignifikant (siehe Abb. 4.32).

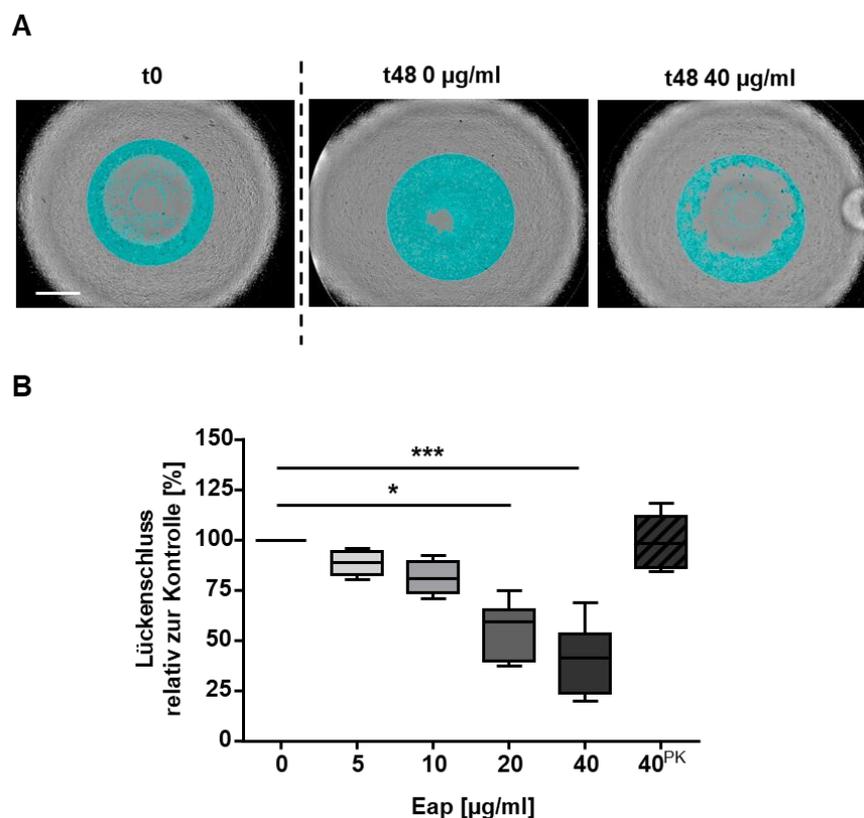
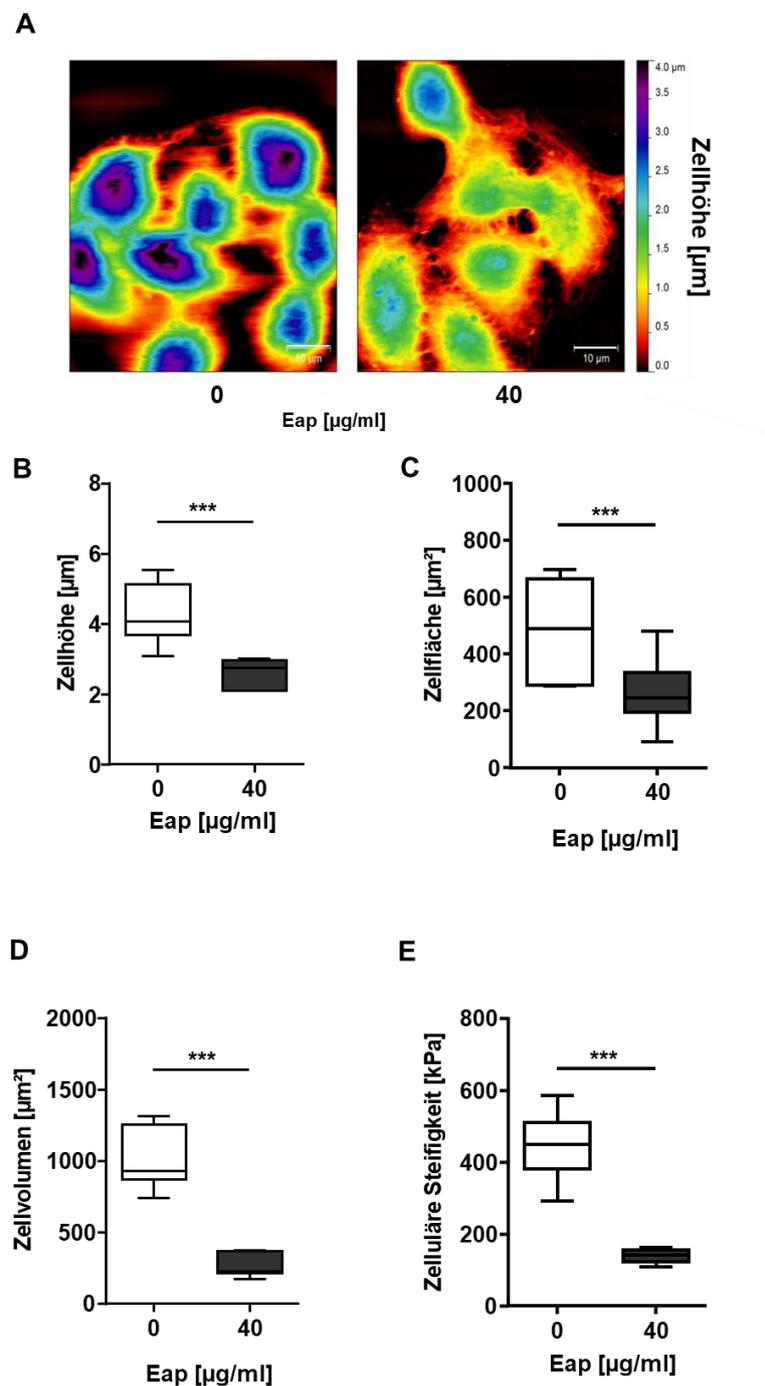


Abb. 4.32: Der Einfluss von Eap auf die Migration der Zelllinie 5637 im Oris-Assay. Die Zellen wurden in RPMI1640 mit 1 % FKS konfluent um den in einer schwarzen 96-Well-Platte mit klarem Boden eingesetzten Oris-Silikonstempel ausgesät. Am Folgetag wurden die Stempel gezogen und es erfolgte die t0-Messung im EnSight™. Die Migration wurde durch Vollmedium induziert, die Proliferation durch Aphidicolin (7 µg/ml) inhibiert. Es wurde der Effekt der dargestellten Eap-Konzentrationen (0- 40 µg/ml) untersucht. PK behandeltes Eap diente als zusätzliche Kontrolle. Die Zellen wurden für weitere 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. A) Vergleich repräsentativer, ausgewerteter, lichtmikroskopischer Aufnahmen des EnSight™ von einer durch die Ziehung des Stemples entstandene Lücke zum Zeitpunkt t0 (links) und der unbehandelten Kontrolle (mittig) im Vergleich zur Situation mit der höchsten Eap-Konzentration (rechts) nach 24 h. In türkis dargestellt ist die von der EnSight™ Software ausgewertete Konfluenz im Auswertungsareal; Maßstabsbalken = 100 µm. B) Migration der 5637 Zellen quantifiziert als Konfluenz in der Lücke in % in Relation zur Kontrolle ohne Eap (100%). Die Werte wurden ermittelt aus der Konfluenz zum Ende des Versuchs nach 24 h in Relation zur Konfluenz zum Startzeitpunkt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von technischen Duplikaten aus acht unabhängigen, biologischen Replikaten. Boxen: Median mit Interquartilsabstand, Antennen (engl. "whisker"): kleinster bzw. größte Datenwerte der jeweiligen Datensätze. \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001; die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney-U-Test der Kontrolle (0 µg/ml Eap) gegen die jeweilige Eap-behandelte Probe.

#### 4.5.4 Der Einfluss von Eap auf die Morphologie der Blasenkrebszelllinie RT-112, dargestellt mittels AFM

Für die Keratinozytenzelllinie HaCaT wurde bereits gezeigt, dass die Zellmorphologie unter Eap-Einfluss deutlichen Veränderungen unterworfen ist (siehe 4.2.3). Um Erkenntnisse darüber zu gewinnen, ob die an Krebszellen beobachteten Phänomene, ebenfalls mit

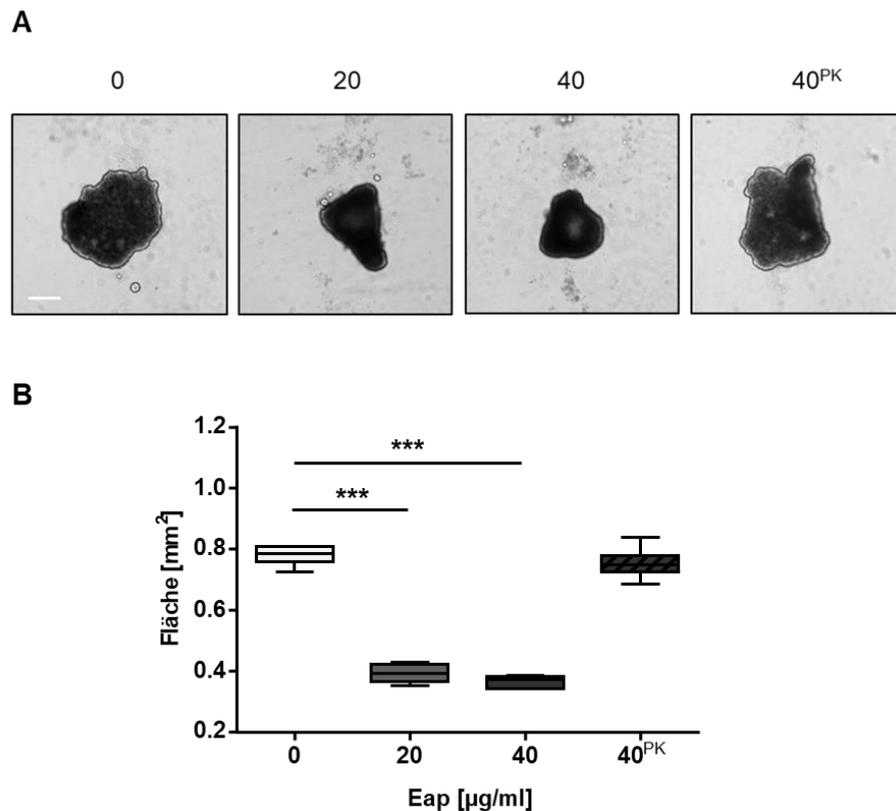
morphologischen Veränderung assoziiert sind, wurden in Zusammenarbeit mit Henrik Peisker (IMMH, UdS) AFM-Messungen mit der Zelllinie RT-112 durchgeführt, wie sie zuvor für HaCaT Zellen beschrieben wurden (siehe 4.2.3.3). Es ergaben sich hier hochsignifikante, die Morphologie der Zellen betreffende, Effekte für die gemessene Zellhöhe, das Volumen, die Steifigkeit und die Zellfläche (siehe Abb. 4.33). Wie zuvor schon bei den HaCaT Zellen beobachtet, wurden auch RT-112 Zellen in Anwesenheit von Eap flacher (Abb. 4.33B), weicher (Abb. 4.33E) und verloren an Volumen (Abb. 4.33D). Jedoch nahm bei diesem Zelltyp, konträr zu den Erkenntnissen bei Keratinozyten, auch die Zellfläche ab (Abb. 4.33C).



**Abb. 4.33: AFM-Abbildung der Blasenkarzinomzelllinie RT-112 unter Eap-Einfluss.** Die RT-112 Zellen wurden nicht-konfluent in Kulturschalen mit Glasboden ausgesät, 24 h in Abwesenheit, oder Anwesenheit von Eap (40 µg/ml) in Vollmedium kultiviert und anschließend mit PBS gewaschen. Darauf erfolgte die Messung am AFM im dynamischen Modus. Die Bilddaten wurden im dynamischen Modus mit einer Aufpresskraft von 600 pN und einer Messgeschwindigkeit von 10 µm/s aufgenommen. A) Höhenprofile unbehandelter (0) und Eap-behandelter (40) Zellen, dargestellt in Spektralfarben; Maßstabsbalken = 10 µm. B) Vergleich der Zellhöhe unbehandelter und Eap-behandelter RT-112 Zellen. C) Abbildung der Fläche, welche unbehandelte und Eap-behandelte RT-112 Zellen einnehmen. D) Vergleich der Zellvolumina unbehandelter und Eap-behandelter RT-112 Zellen. E) Elastizitätsverteilung (zelluläre Steifigkeit) unbehandelter und Eap-behandelter RT-112 Zellen. Die in B-E dargestellten Daten entsprechen 12 individuellen Zellen pro Messgruppe, gemessen in vier unabhängigen Experimenten; Boxen: Median mit Interquartilsabstand, Antennen (engl. "whisker"): kleinster bzw. größte Datenwerte der jeweiligen Datensätze. \*\*\*  $p < 0,001$ ; die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney-U-Test.

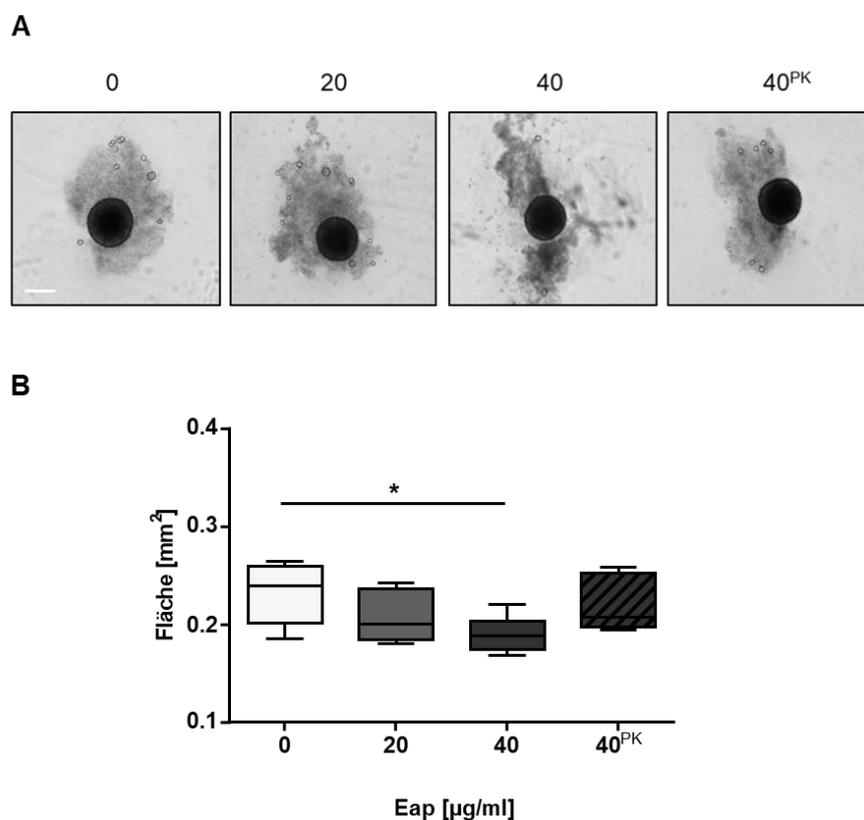
### 4.5.5 Der Einfluss von Eap auf die Bildung von Sphäroiden der nicht-invasiven Blasenkrebszelllinien RT-112 und 5637

Alle bisher beschriebenen Untersuchungen an den Blasenkarzinomzellen basieren auf einer 2D-Kultur. Da Tumore aber komplexe, dreidimensionale Strukturen darstellen, wurde der Effekt von Eap auch auf die Bildung von Sphäroiden, als einfachste 3D-Tumormodelle, untersucht. Die Zellen wurden hierzu in eine 96-Well Rundboden-Platte ausgesät, deren Oberfläche so gestaltet ist, dass die darin wachsenden Zellen nicht an die Well-Oberfläche adhären können. Dies begünstigt die Aggregation der Zellen und so das Auswachsen von Sphäroiden (siehe 3.7.7). Es wurde die Auswirkung von 20 und 40 µg/ml Eap auf die Sphäroidbildung untersucht, da diese Konzentrationen in allen vorangegangenen Untersuchungen Effekte hervorrufen konnten. PK verdautes Eap diente auch hier als weitere Kontrolle. Die Dokumentation des Sphäroidwachstums erfolgte nach 72 h mittels des EnSight™ Plattenlesegeräts und die Auswertung der Sphäroidentwicklung (Ausdehnung) mit Hilfe der Bildbearbeitungs- und Analysesoftware ImageJ (Version 1.49). Für die Zellen der Linie RT-112 ergaben sich bereits bei einer Konzentration von 20 µg/ml Eap sehr deutliche Effekte mit hochsignifikant kleineren Sphäroiden, (siehe Abb. 4.34).



**Abb. 4.34:** Die Auswirkung einer Eap-Behandlung auf die Entwicklung von Sphäroiden der Zelllinie RT-112. Die Krebszellen wurden in nichtadhäsiven Rundboden-Well-Platten ausgesät, in denen sich Sphäroide ausbilden. Das Wachstum erfolgte über 72 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Anwesenheit der dargestellten Eap-Konzentrationen (0, 20, 40, 40<sup>PK</sup> µg/ml). Die Dokumentation des Wachstums erfolgte automatisiert im EnSight™-Plattenlesegerät. Die Auswertung der Bilddaten erfolgte mit Hilfe der ImageJ-Software. **A)** Repräsentative Lichtmikroskopische Aufnahmen der Sphäroide nach 72 h unter Eap-Behandlung; Maßstabsbalken = 100 µm. **B)** Statistische Auswertung der ermittelten Ausdehnungen der Sphäroide unter Einfluss der dargestellten Eap-Konzentrationen (Boxen in Graustufen; 0, 20, 40, 40<sup>PK</sup> µg/ml). Die Daten entstammen 6 unabhängigen Experimenten; Boxen: Median mit Interquartilsabstand, Antennen (engl. "whisker"): kleinster bzw. größte Datenwerte der jeweiligen Datensätze. \*\*\* p < 0,001; die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney-U-Test.

Im Fall der Zelllinie 5637 waren diese Effekte deutlich geringer und rein optisch nicht klar erkennbar (Abb. 4.35A). Lediglich bei einer Konzentration von 40 µg/ml Eap konnte mithilfe der Bildanalysesoftware ImageJ auch für diese Zelllinie eine signifikante Größenminderung der Sphäroide ermittelt werden (siehe Abb. 4.35B).



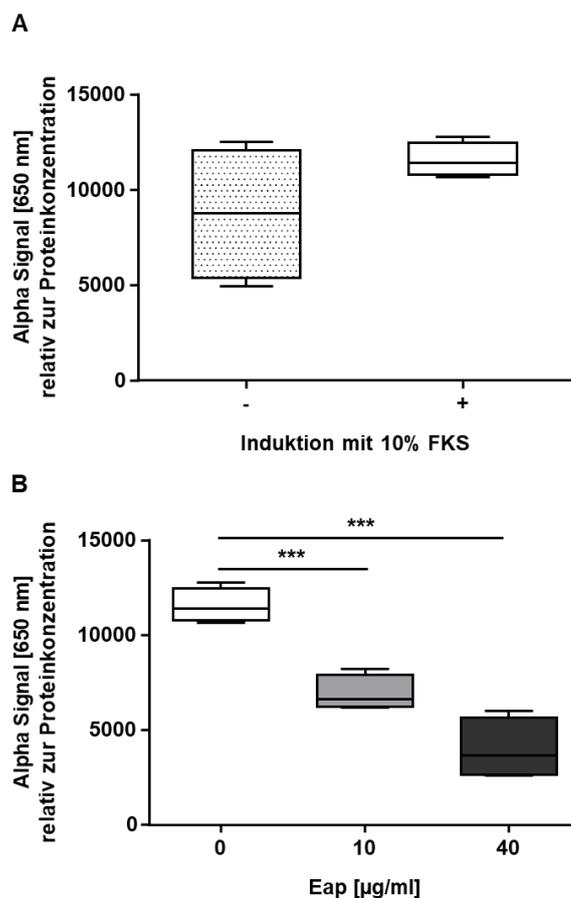
**Abb. 4.35:** Die Auswirkung einer Eap-Behandlung auf die Entwicklung von Sphäroiden der TCC-Zelllinie 5637. Die Krebszellen wurden in Rundboden-Well-Platten ausgesät in denen sich Sphäroide ausbilden. Das Wachstum erfolgte über 72 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Anwesenheit der dargestellten Eap-Konzentrationen (0, 20, 40, 40<sup>PK</sup> µg/ml). Die Dokumentation des Wachstums erfolgte automatisiert im EnSight™-Plattenlesegerät. Die Auswertung der Bilddaten erfolgte mit Hilfe der ImageJ-Software. A) Repräsentative Lichtmikroskopische Aufnahmen der Sphäroide nach 72 h unter Eap-Behandlung; Maßstabsbalken = 100 µm. B) Statistische Auswertung der ermittelten Ausdehnungen der Sphäroide unter Einfluss der dargestellten Eap-Konzentrationen (Boxen in Graustufen; 0, 20, 40, 40<sup>PK</sup> µg/ml). Die Daten entstammen 6 unabhängigen Experimenten; Boxen: Median mit Interquartilsabstand, Antennen (engl. "whisker"): kleinster bzw. größte Datenwerte der jeweiligen Datensätze; \*  $p < 0,05$ ; die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney-U-Test.

#### 4.5.6 Der Einfluss von Eap auf die wachstumsfaktorinduzierte Phosphorylierung von Erk1/2 der Blasenkrebszelllinien RT-112 und 5637

Es konnte bereits in vorangegangenen Studie gezeigt werden, dass Eap die die Ras/Raf/MEK/Erk-Signaltransduktion in Endothelzellen (Sobke *et al.*, 2006) und Keratinozyten (Eisenbeis *et al.*, 2017) inhibiert. Die Interaktion mit der Signalweiterleitung erfolgt offenbar auf Ebene von Ras und verhindert die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von Erk. In der Signaltransduktion nachfolgende Transkriptionsfaktoren werden

dadurch nicht aktiviert, wodurch die adressierten Zielgene nicht abgelesen werden können (Sobke *et al.*, 2006). Da viele der beschriebenen Eap-Effekte, wie die Hemmung der Proliferation und Migration, aber auch Veränderungen der Zellmorphologie, aus dieser Signaltransduktionshemmung resultieren können, wurde hier überprüft, ob dies auch auf die untersuchten Krebszellen zutrifft. Hierfür wurde der AlphaLISA® SureFire® Ultra™ HV Assay von PerkinElmer verwendet, um den Phosphorylierungsstatus der endogenen Erk1/2-Kinase unter Einfluss von Eap, im Vergleich zur unbehandelten Probe, zu erfassen. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in 3.7.8 beschrieben. Die gehungerten Zellen wurden dabei für eine Stunde mit Eap (40 µg/ml) inkubiert, oder unbehandelt belassen. Die Aktivierung der Signaltransduktionen erfolgte durch Austausch des Mangelmediums gegen Vollmedium für 8 min. Um die erfolgreiche Stimulation der Signaltransduktion darzustellen, wurden unstimulierte Zellen mitgeführt. Die am Ende der Versuchsdurchführung am EnSight™ Plattenlesegerät gemessene Emission (Alpha Signal 650 nm) ist proportional zur Menge an phosphoryliertem Erk1/2. Um eine Normalisierung der gemessenen Alpha Signale auf die Gesamtproteinmenge der Zelllysate zu ermöglichen, wurde ein BCA-Assay nach Herstellerangaben durchgeführt (siehe 3.2.4) und ebenfalls im EnSight™ ausgelesen.

Bei den Zellen der Zelllinie RT-112 führte die Zugabe von 10% FKS nur zu einer vergleichsweise schwachen Induktion der Phosphorylierung von Erk1/2, die sich im Vergleich zur FKS-freien Kontrolle nicht signifikant veränderte (Abb. 4.36A). Der zuvor schon für Keratinozyten wie Endothelzellen beobachtete reprimierende Einfluss von Eap auf die Erk1/2 Phosphorylierung ist jedoch vorhanden und wird bei RT-112 bereits bei 20 µg/ml hochsignifikant (Abb. 4.36B).



**Abb. 4.36:** Der Effekt von Eap auf die wachstumsfaktorabhängige Phosphorylierung von ERK1/2 in der Zelllinie RT-112. Die Zellen wurden nach vierstündigem Hungern durch die Zugabe von FKS (10%) im Vollmedium induziert. Nach 8 min wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Lysepuffer lysiert. Der Gehalt an phosphoryliertem ERK1/2 in den Zelllysaten wurde mit dem AlphaLISA® SureFire® Ultra™ HV Assay ermittelt und im EnSight™ ausgewertet. Die bei 650 nm gemessenen Alpha Signale wurden auf die im BCA-Assay ermittelten Gesamtproteinkonzentrationen normiert. **A)** Unterschiede zwischen nicht induzierten (gemusterte Box) und mit FKS induzierten (weiße Box) Zellen. **B)** Unterschiede zwischen FKS behandelten (weiße Box) und FKS + Eap-behandelten Zellen (20  $\mu\text{g/ml}$  = graue Box, 40  $\mu\text{g/ml}$  = dunkelgraue Box). Die Daten entstammen 4 unabhängigen Experimenten; Boxen: Median mit Interquartilsabstand, Antennen (engl. "whisker"): kleinster bzw. größte Datenwerte der jeweiligen Datensätze, \*\*\*  $p < 0,001$ ; die statistische Auswertung erfolgte mittels eines ungepaarten  $t$ -Tests.

Bei den 5637-Zellen konnte nach FKS-Zugabe eine massive Stimulation der Erk1/2 Phosphorylierung beobachtet werden (Abb. 4.37A). Der Eap-Effekt zeigte jedoch keine signifikante Reduktion der Erk-Phosphorylierung, obwohl eine eindeutige Tendenz zu erkennen war (Abb. 4.37B), Die mit 40  $\mu\text{g/ml}$  Eap-behandelten Zellen, zeigten eine Erk-Phosphorylierung, die teilweise nur noch etwa halb so hoch wie die FKS-stimulierte Kontrolle war, jedoch immer noch deutlich oberhalb der phosphorylierten Erk1/2 Signale der nicht

FKS-stimulierten Zellen lag. Dass die Ergebnisse nicht signifikant wurden, liegt vermutlich an der großen Streuung der Kontrollproben (siehe Abb. 4.37B).

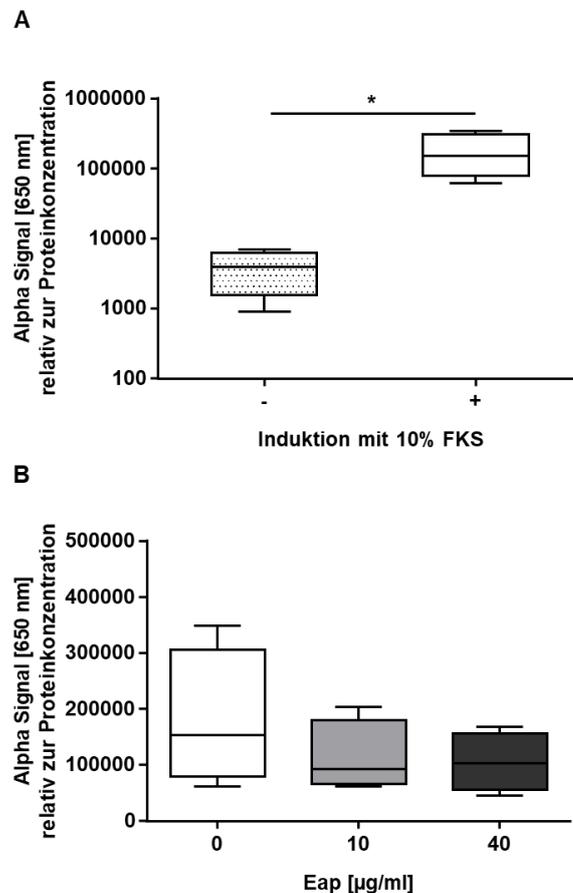


Abb. 4.37: Der Effekt von Eap auf die wachstumsfaktorabhängige Phosphorylierung von ERK1/2 in der Zelllinie 5637. Die Zellen wurden nach vierstündigem Hungern durch die Zugabe von FKS (10%) im Vollmedium induziert. Nach 8 min wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Lysepuffer lysiert. Der Gehalt an phosphoryliertem ERK1/2 in den Zelllysaten wurde mit dem AlphaLISA® SureFire® Ultra™ HV Assay ermittelt und im EnSight™ ausgewertet. Die bei 650 nm gemessenen Alpha Signale wurden auf die im BCA-Assay ermittelten Gesamtproteinkonzentrationen normiert. A) Unterschiede zwischen nicht induzierten (gemusterte Box) und mit FKS induzierten (weiße Box) Zellen. B) Unterschiede zwischen FKS behandelten (weiße Box) und FKS + Eap-behandelten Zellen (20 µg/ml = graue Box, 40 µg/ml = dunkelgraue Box). Die Daten entstammen 4 unabhängigen Experimenten; Boxen: Median mit Interquartilsabstand, Antennen (engl. "whisker"): kleinster bzw. größte Datenwerte der jeweiligen Datensätze, \*  $p < 0,05$ ; die statistische Auswertung erfolgte mittels eines ungepaarten t-Tests.

### 5. Diskussion

#### 5.1 Das Wachstumsverhalten von *S. aureus* Newman T.F. in THB und die wachstumsphasenabhängige Transkription von *eap*, *eapH1* und *eapH2* in diesem Medium

Über die Transkription, Expression und Funktion der beiden Eap-Homologe EapH1 und EapH2 ist bislang noch sehr wenig bekannt. In einer Kooperation mit der AG Rooijackers (Utrecht, Niederlande) wurden daher Transkriptionsanalysen mittel qPCR durchgeführt. Die Anzucht der Bakterien erfolgte im Rahmen dieses Teilprojekts in dem Komplexmedium THB. In einer Studie konnte bereits eine deutliche Erhöhung der Expression von Eap in THB im Vergleich zu anderen, gängigen, für die Anzucht von *S. aureus* verwendeten Nährmedien, wie TSB, MBB (engl. "Modified Basic Broth"), BHI (engl. "Brain Heart Infusion") und NB (engl. "Nutrient Broth") festgestellt werden (Kawasaki, 2008). Die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit bestimmten Wachstumsphasen, von *S. aureus* Newman T.F. in THB lassen sich anhand üblicher Muster einteilen. Die exponentielle Wachstumsphase dauert für etwa 2,5-3 h an. In dieser Zeit ist das Angebot der bevorzugten, energiereichen Nährstoffquelle, hier Glukose, ausreichend verfügbar (Somerville & Proctor, 2009). In dieser Phase wird die Verstoffwechslung weniger bevorzugter Kohlenstoffquellen durch die Kohlenstoffkatabolitrepression verhindert. Durch die aerobe Metabolisierung von Glukose kommt es zur Anreicherung von Azetat, wodurch über die Zeit der pH-Wert sinkt. Zwischen 4 und 5 h (Übergangsphase) erfolgt dann ein Übergang in die postexponentielle Wachstumsphase, in der die Konzentration der Glukose allmählich absinkt und das Populationswachstum limitiert. Zu diesem Zeitpunkt erreicht in vielen Medien der pH-Wert, durch die Azetatanreicherung, seinen tiefsten Wert von etwa 5-6 (Kawasaki, 2008; Kirch, 2014). In dieser Phase beginnen die Bakterien weniger bevorzugte Kohlenstoffquellen, wie das in der exponentiellen Phase gebildete Azetat, zu verstoffwechseln (Somerville & Proctor, 2009). Unter den untersuchten Bedingungen tritt die Kultur nach etwa 10 h in die Stationäre Phase ein, in der die Geschwindigkeit der Vermehrung und des Absterbens der Zellen ein Äquilibrium erreicht. Ein Übergang in die Absterbephase wird im untersuchten Zeitraum von 12 h nicht erreicht. Interessanter Weise wurden in THB, nach 10-12 h Wachstum vergleichsweise hohe  $A_{600}$  Werte von 16-18 erreicht. Dies liegt zum einen daran, dass THB ein sehr reichhaltiges Medium darstellt, das den Bakterien eine sehr gute Nährstoffversorgung gewährleistet. Eine weitere mögliche Erklärung für das Erreichen so hoher  $A_{600}$  Werte wäre ein früherer Übergang, jedoch ein längerer Verbleib der Kultur in der postexponentiellen Phase, in der weniger bevorzugte Substrate verstoffwechselt werden. Die von *S. aureus* bevorzugte Kohlenstoffquelle Glukose ist in THB mit 2 g/l in geringerer Menge vorhanden als beispielsweise dem im IMMH meist verwendeten, TSB (2,5 g/l). Damit wäre

die bevorzugte Energiequelle früher verbraucht. Die Menge der verfügbaren, bevorzugten Nährstoffe sinkt über die Zeit ab. Gleichzeitig akkumulieren zunehmend wachstumsinhibierende organische Säuren wie Azetat. Dadurch kommt es schließlich zum Eintritt in die post-exponentielle Wachstumsphase. Im Verlauf dieser Wachstumsphase wird die Repression des Citratzyklus aufgehoben. Über diesen können daraufhin alternative Kohlenstoffquellen wie das zuvor akkumulierte Azetat verstoffwechselt werden (rezensiert in (Somerville & Proctor, 2009)). Interessanter Weise wurde bereits gezeigt, dass in MBB Azetat während der exponentiellen Phase akkumuliert und während der postexponentiellen Phase vollständig aufgebraucht wird (Kawasaki, 2008). In den Medien BHI und TSB kam es bis zum Zeitpunkt von 6 h zu einer Anreicherung mit Azetat, das dann wiederum nach 10 h im Medium nicht mehr nachweisbar war. Im Gegensatz dazu kam es in THB zu einer kontinuierlichen Anreicherung von Azetat, das auch nach 24 h noch im Medium nachzuweisen war (Kawasaki, 2008). Dies würde bedeuten, dass den Bakterien das Sekundärmetabolit Azetat für einen deutlich längeren Zeitraum zur Verfügung stünde als in anderen Nährmedien. Dies würde eine Erklärung für das andauernde Wachstum liefern. In dieser Wachstumsphase werden außerdem auch vermehrt Kohlenstoffquellen wie Aminosäuren über den Citratzyklus verstoffwechselt, die in THB in sehr hohen Konzentrationen enthalten sind. Es käme dadurch zu einer Verschiebung der Wachstumsphasen, mit einer länger andauernden postexponentiellen Phase, bei der hohe  $A_{600}$  erreicht werden. Die Eigenschaften des Mediums geben auch Hinweise auf die im Verhältnis zu anderen Medien höhere Eap Expression. Möglicherweise ist auch hier die Anreicherung von Azetat für das veränderte Expressionsverhalten von *S. aureus* in THB verantwortlich. Es wurde gezeigt, dass die Ansäuerung von Medien Auswirkung auf die globale Genregulation von *S. aureus* hat (Weinrick *et al.*, 2004). Auch die Transkription des Regulatorsystems *sae* wird durch den saureren pH-Wert negativ beeinflusst. Da SaeRS maßgeblich für die *eap*-Regulation verantwortlich ist (Harraghy *et al.*, 2005), kommt es so auch zu einer Beeinträchtigung der Eap Expression. In den Messungen von Kawasaki (2008) sank der pH-Wert in THB nicht unter einen Wert von 6,5. Die Hemmung der von Weinrick *et al.* beschriebenen Genregulation erfolgte jedoch bei pH-Werten von 5,5. Ähnliche Beobachtungen, wie für *sae*, wurden auch für das *eap* ebenfalls positiv regulierende *agr*-System gemacht. Eine Minderung des pH-Wertes auf 5,5 führte auch hier zu einer drastischen Repression der Transkription von *agr* (Regassa *et al.*, 1992). Ein pH-Wert von 6,5 führte jedoch nicht zu negativen Effekten. Es ist also wahrscheinlich, dass in THB die reprimierenden pH-Werte nicht erreicht werden. Warum trotz der bis 24 h + andauernden Verfügbarkeit von Azetat der pH-Wert nicht unter die reprimierende Grenze von 6,5 fällt ist nicht beschrieben. Es ist lediglich bekannt, dass der pH von THB initial mit  $7,8 \pm 0,2$  geringfügig höher ist als z.B. der von TSB ( $7,3 \pm 0,2$ ). Vielleicht werden dadurch unter

Einbeziehung der im Medium enthaltenen Puffersubstanzen der reprimierende pH-Wert von 5,5 später erreicht. Abschließend ist zu sagen, dass es sich bei THB um ein Komplexmedium handelt, dessen genaue Rezeptur nicht veröffentlicht ist. Die genauen Ursachen für das Wachstumsverhalten ließen sich also nur durch ausführliche, nachfolgende Untersuchungen klären, auf der im Rahmen dieser Arbeit jedoch kein Fokus gelegt wurde.

Die mittels qPCR untersuchte Transkription von *eap* ist unter den untersuchten Bedingungen in der postexponentiellen Wachstumsphase am höchsten. Dies stimmt mit zuvor beschriebenen Beobachtungen überein (Kawasaki, 2008; Joost *et al.*, 2009). Von den Homologen zeigt *eapH2* ein vergleichsweise ähnliches Transkriptionsmuster wie *eap*. Auch hier steigt die Transkriptionsrate zur postexponentiellen Wachstumsphase an, verbleibt dann jedoch etwa gleichbleibend hoch (5-8 h) und fällt zu der stationären Phase hin ab (12 h). Anders verhält es sich mit *eapH1*. Es lässt sich über die Zeit ein leichter Anstieg der Transkriptionsrate erkennen, mit dem höchsten Wert bei 12 h. Dies spricht am ehesten für eine konstitutive Expression. Es wird deutlich, dass *eap* von den drei untersuchten Genen unter den gegebenen Bedingungen die höchste Transkriptionsrate zeigt. Mit  $8,43 \pm 7,91$  Kopien/Kopie *gyrB* zum Zeitpunkt  $t_5$  ist diese ca. doppelt so hoch, verglichen mit *eapH2* ( $5,42 \pm 4,31$  Kopien/Kopie *gyrB*). Die Transkription von *eapH1* hingegen entspricht an ihrem höchsten Punkt nach 12h mit  $0,56 \pm 0,51$  Kopien/Kopie *gyrB* nur einem Fünftel der von *eap*.

Für die Eap-homologen Proteine EapH1 und EapH2 wurden bislang nur sehr wenige Funktionen nachgewiesen. Die ersten Effekte konnten Stapels und Kollegen (Stapels *et al.*, 2014) aufklären. Sie zeigten, dass die Homologe, genau wie Eap selbst, in der Lage sind, an das katalytische Zentrum von NSPs zu binden und so die Anbindung der Proteasen an Substrate zu verhindern. Diese Bindung der EAPs an NSPs ist nicht-kovalent, aber spezifisch. So hemmen die EAPs zwar die NSPs Neutrophile Elastase (NE), Cathepsin G und Proteinase 3 (Stapels *et al.*, 2014), sowie die phylogenetisch verwandte Mastzell Chymase (Stapels *et al.*, 2018), nicht jedoch die ebenfalls phylogenetisch verwandten Proteasen wie Plasmin, Plasmakallikrein und Thrombin (Stapels *et al.*, 2014). Interessanter Weise kann die Neutrophile Serinprotease 4 (NSP4) nur durch das Multidomänprotein Eap, jedoch nicht, durch die Homologe EapH1 und EapH2 gebunden und dadurch inhibiert werden (Stapels *et al.*, 2018). Dies mag daran liegen, dass mehr als eine EAP-Domäne für die Bindung an NSP4 nötig ist, oder die für die Interaktion mit NSP4 verantwortliche EAP Domäne des Vollängenproteins unterscheidet sich strukturell zu sehr von den Homologen. Neben der Spezifität der Bindungspartner ist inzwischen auch bekannt, dass verschiedene Kompartimente der EAPs mit den Proteasen interagierenden. Trotz der Sequenzhomologie von EapH1 und EapH2 binden sie mit verschiedenen Domänenbereichen an NE (Stapels *et al.*,

2018). Für EapH1 konnte inzwischen gezeigt werden, dass das Arginin 89 eine Schlüsselrolle für die Bindungsfähigkeit an NE spielt (Herdendorf & Geisbrecht, 2018). Die Hemmung der NSPs wirkt sich auf verschiedene Weise auf die Funktionalität der Pathogenabwehr aus. Neben ihren direkten Effekten auf manche Bakterienspezies, schneiden sie Virulenzfaktoren (Stapels *et al.*, 2018). Durch die Hemmung der NSPs ist *S. aureus* also in der Lage, die eigenen proteinogenen Virulenzfaktoren vor einer Degradation durch NSPs zu hemmen. Für CHIPS und SCIN-A konnte dies bereits gezeigt werden (Stapels *et al.*, 2018). Der "Staphylococcus Komplement Inhibitor" (SCIN) bindet die C3 Convertase-Komplexe auf bakteriellen Oberflächen und führt so zu einer Unterbrechung der Komplementkaskade. CHIPS hingegen hemmt die Chemotaxis von Neutrophilen Granulozyten. Durch die Hemmung der NSPs und den dadurch resultierenden Schutz der eigenen Virulenzfaktoren ist *S. aureus* also in der Lage, schwerwiegend in die Immunabwehr einzugreifen und die Dauer der Infektion zu verlängern (Stapels *et al.*, 2018). Bezeichnenderweise wird die Expression von CHIPS und SCIN-A im Infektionsverlauf, ebenso wie Eap, maßgeblich über das *sae* Regulationssystem kontrolliert (Rooijackers *et al.*, 2006). Dies spricht dafür, dass *S. aureus* Eap, unter anderem, quasi in einer "Bodyguard-Funktion" für andere Immunevasionsproteine mitliefert. Die Annahme, dass die EAPs in einer *S. aureus* Infektion von Bedeutung sind, wird auch dadurch unterstützt, dass alle drei Gene in deren Verlauf expremiert werden (Joost *et al.*, 2009; Date *et al.*, 2014). Auch die hohe Konservierung der Gene spricht dafür. In einem Set von 104 Genomen aus klinischen Isolaten und 170 in einer GenBank verfügbaren Genomsequenzen konnte *eap* und *eapH2* in allen, *eapH1* in allen bis auf einer Genomsequenz nachgewiesen werden (Elshina *et al.*, 2018). Der Grund, warum *S. aureus* gleich drei homologe NSP-Hemmer mit einer gewissen funktionellen Redundanz bildet, ist Teil des generellen Prinzips der Immunevasion von *S. aureus*. Zudem wurde bereits gezeigt, dass die Expression der EAPs unterschiedlich reguliert wird. So induzieren azurophile Granulabestandteile von Immunzellen beispielsweise die Transkription von *eap* und *eapH1* (Palazzolo-Ballance *et al.*, 2008), *eapH2* bleibt jedoch unbeeinflusst und wird offenbar anders reguliert (Palazzolo-Ballance *et al.*, 2008; Stapels *et al.*, 2014). Die unterschiedliche Expression der EAPs während einer Infektion ermöglicht es, ein breites Fenster zu erzeugen, um NSPs an unterschiedlichen Stellen des Körpers und zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion zu hemmen. Dies wird von den im Rahmen meiner Arbeit generierten Ergebnissen aus qPCR-Analysen gestützt, die eine unterschiedliches Transkriptionsmuster von *eap/eapH2* mit einem Höhepunkt in der postexponentiellen Phase und *eapH1* mit einer konstitutiven Expression zeigten. Dass alle drei gebildeten Proteine für eine erfolgreiche *S. aureus* Infektion von Bedeutung sein dürften, dafür sprechen Ergebnisse aus Mausexperimenten. Sowohl in einem Maus-Leberabszessmodell, als auch in einem Maus-Pneumoniemodell zeigte sich eine signifikant niedrigere Bakterienlast der

*ΔeapΔeapH1ΔeapH2*-Dreifachmutante im Vergleich zum Wildtyp. Im Fall der *Δeap*-Einfachmutante konnte zwar ebenfalls eine geringere Bakterienlast festgestellt werden, jedoch fällt dieser Effekt im Vergleich zur Dreifachmutante weniger deutlich aus und ist im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant (Stapels *et al.*, 2014; Stapels *et al.*, 2016). Dies spricht für einen synergistischen Effekt der drei EAPs. Im Rahmen neuester Forschungsarbeiten wurden Versuche angestellt, auf Basis der Eap-Homologe einen Impfstoff gegen *S.aureus* zu entwickeln (Elshina *et al.*, 2018). Es wurde ein Impfschema mit dem Adenovirus und dem Impfstamm "modifizierte Vaccinia Ankara" (MVA), die Expressionskassetten mit EapH1\_H2 trugen, als Vektoren entwickelt. Erstaunlicherweise kam es bei intramuskulär geimpften Mäusen nach *S. aureus* Infektion zu einer reduzierten Abszessbildung in der Niere, und eine intranasale Impfung führte bei einer signifikanten Anzahl an *S. aureus* besiedelten Mäusen zu einem Verlust der Besiedlung (Elshina *et al.*, 2018). Jedoch konnte im Maus-Pneumoniemodell kein vorteiliger Effekt einer vorangegangenen Impfung festgestellt werden (Elshina *et al.*, 2018). Es wurde in dieser Arbeit zudem kein Effekt von Impfungen mit "Eap" selbst beobachtet. Dies kann aber zum einen daran liegen, dass zur Herstellung der Vektorviren und eine einzelne EAP-Domäne (EAP5) verwendet wurde, zum anderen könnte die natürliche anti-Eap-Immunantwort stark genug sein, einen Impfeffekt zu maskieren. Da die Ergebnisse noch inkonsistent sind, ist weitere Arbeit in diese Richtung erforderlich. Jedoch ist die Generierung eines multivalenten Impfstoffs gegen *S. aureus* unter Einziehung der hochkonservierten Komponenten EapH1 und EapH2 denkbar.

Innerhalb des IMMH konnten erste Erkenntnisse zu einer weiteren Funktion der Eap-Homologe gewonnen werden. Es wurde hypothetisiert, dass diese, den Einzeldomänen von Eap ähnelnden Proteinen, einen modulierenden Einfluss auf die Rückbindung von Eap an die bakterielle Oberfläche zeigen könnten. Es wurde beschrieben, dass 70% des von *S. aureus* gebildeten Eap in das Außenmilieu sekretiert werden. Die restlichen 30% binden jedoch an die bakterielle Zelloberfläche zurück (Palma *et al.*, 1999). Die Rückbindung erfolgt über einen nach wie vor unbekanntem Mechanismus. Es wurden die Neutrale Phosphatase, zwei nicht näher charakterisierte Proteine, sowie Eap selbst als Rückbindungspartner identifiziert (Palma *et al.*, 1999; Flock & Flock, 2001; Hussain *et al.*, 2002; Kreikemeyer *et al.*, 2002). Durch die Strukturhomologie der Homologe zu den einzelnen EAP-Domänen von Eap ist es wahrscheinlich, dass die Homologe an dieselben Partner auf der bakteriellen Zelloberfläche binden wie Eap. Die Funktion der Homologe könnte daher möglicherweise einen Regulationsmechanismus für die Rückbindung von Eap darstellen. *S. aureus* würde durch das Besetzen der Bindungsstellen mit den Homologen auf der eigenen Oberfläche sicherstellen, dass nur ein gewisser Anteil an Eap zurückbindet und der größte Anteil des Proteins in das Außenmilieu abgegeben wird. Dadurch kann Eap viele seiner

immunmodulatorischen Effekte im Wirt hervorrufen (Athanasopoulos *et al.*, 2006; Scriba *et al.*, 2008). Erste Erkenntnisse unterstützen diese These, da Bakterien des *S. aureus* Stamms SA113, die eine Deletion der *eapH1* und *eapH2* Gene tragen, besser an auf einer mit Eap bedeckten Welloberfläche adhäreren können (Gunaratnam, 2016). Im Vergleich zum Wildtyp zeigt die Deletion von *eap* selbst hingegen kein signifikant verändertes Adhäsionsverhalten der Bakterien an immobilisiertes Eap. Dies stimmt mit einer früheren Beobachtung überein, dass auch der *S. aureus* Stamm Newman und eine Newman  $\Delta eap$ -Mutante keine signifikanten Unterschiede in ihrer Bindungsfähigkeit an immobilisiertes Eap aufwiesen (Hussain *et al.*, 2002). Dies deutet darauf hin, dass zwar die Eap-Homologe, nicht jedoch das endogene Eap eine Rolle bei der Adhäsion des Bakteriums an Eap-beschichtete Oberflächen spielt. Unterstützt wird unsere Hypothese auch durch Ergebnisse von Westernblot-Analysen, die demonstrieren, dass sich in den Überständen von *S. aureus* SA113 Kulturen mit Deletionen der Homologe deutlich weniger Eap findet als in denen des Wildtyps (Gunaratnam, 2016). Die Homologe können hier die Bindungsstellen auf der Bakterienoberfläche nicht besetzen und mehr Eap bindet an diese zurück. Im Umkehrschluss konnte in den Proben der aufbereiteten Bakterienpellets, der Homologmutanten, mehr Eap nachgewiesen werden. In Zellkulturversuchen konnte die These, dass die Eap-Homologe Modulatoren der Eap-Adhäsion sind, weiter gestützt werden. *S. aureus* Newman mit einer Deletion von *eap* binden signifikant schlechter an HaCaT Zellen, verglichen mit dem Wildtyp ((Biegel, 2014), eigene unpublizierte Daten). Sind jedoch lediglich die beiden Homologe deletiert, ergibt sich jedoch eine Tendenz für eine bessere Adhäsion. Für den Vorgang der Internalisierung wird dieser Effekt signifikant. Dies ist vermutlich darauf zurück zu führen, dass in Abwesenheit der Homologe mehr Eap an die bakterielle Oberfläche gebunden vorliegt und so die Brückenfunktion zwischen Bakterium und Wirtszelle verstärkt.

### 5.2 Der Einfluss von Eap auf zelluläre Mechanismen der Wundheilung

Die Heilung von Wunden ist ein komplexer und vielschichtiger Prozess, der das Zusammenwirken verschiedener Zelltypen und zellulärer Prozesse voraussetzt. Mechanismen wie Inflammation, Zellproliferation, Zellmigration, Neovaskularisation, die Ausbildung einer neuen extrazellulären Matrix und die Reifung, Differenzierung Remodellierung von Einzelzellen und Zellverbänden sind notwendig, um eine Wunde sauber zu verschließen. Aufgrund dieser Komplexität des Systems kann es an vielen Stellen zu Störungen und Missregulationen durch Pathogene kommen. Obwohl die genauen Mechanismen, durch welche die Mikroorganismen den Wundschluss inhibieren, noch nicht

ausreichend verstanden sind, deutet vieles darauf hin, dass sezernierte bakterielle Faktoren Einfluss auf die am Wundschluss beteiligten eukaryoten Zellpopulationen nehmen (James *et al.*, 2008; Percival & Cutting, 2009; Scali & Kunitomo, 2013). Studien, welche diese Interaktionen zwischen bakteriellen Sekretionsprodukten und den an der Wundheilung beteiligten Zelltypen adressieren, sind also von Bedeutung, um die Entstehung chronischer Wunden zu verstehen und Heilungsoptionen zu entwickeln.

Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass dem SERAM Eap aus *S. aureus* eine Rolle in der Wundheilung zukommt (siehe 1.5.8). Da in *S. aureus* infizierten Wunden eine bis zu 100-fach höhere *eap*-Transkription erreicht wird als in *in vitro* Flüssigkulturen und die *eap*-Transkription in tiefen Wunden im Vergleich zu oberflächlichen Wunden signifikant höher ist, spricht dies für eine Bedeutung von Eap im System chronischer Wunden (Joost *et al.*, 2009). Ein weiteres Indiz hierfür scheint zu sein, dass die Schwere der Infektion mit dem Titer der gegen Eap gerichteten Antikörper korreliert (Joost *et al.*, 2011). Auch konnte gezeigt werden, dass Eap die Heilung von Wunden direkt inhibiert. Wunden die im Mausmodell mit einer isogenen *eap*-Mutante infiziert wurden, heilten signifikant schneller, als die mit dem Wildtyp infizierten Wunden (Athanasopoulos *et al.*, 2006). Um den Effekt direkt Eap zuordnen zu können, wurden die Wundheilungs-Assays mit dem aufgereinigten Protein, in Abwesenheit von Bakterien, durchgeführt und dabei ähnliche Effekte beobachtet. Die Auswirkungen von Eap wurden jedoch darauf zurückgeführt, dass die Leukodiapedese in den Wundbereich gehemmt wird und es so nicht zur Phagozytose der infizierenden Bakterien kommen kann. Zudem schütten Immunzellen in den Wunden proinflammatorische Zytokine aus, die andere Zelltypen zur Proliferation und chemotaktisch dirigierten Migration in der Wunde anregen. Da durch Eap weniger Immunzellen in den Wundbereich einwandern, kommt es dadurch auch zu einer verminderten Aktivierung nachfolgender Heilungsprozesse wie der Aktivierung der Fibroblasten und damit den Einstieg in die Granulationsphase (Chavakis *et al.*, 2002; Hagggar *et al.*, 2004; Athanasopoulos *et al.*, 2006). Es konnten auch direkte Effekte auf die Proliferation von Zellen des Immunsystems, die an einer sauberen Wundheilung beteiligt sind, gezeigt werden. So wird die Vermehrung von T-Zellen und B-Zellen durch höhere Dosen von Eap ( $\geq 27 \mu\text{g/ml}$ ) inhibiert (Chavakis *et al.*, 2005; Hagggar *et al.*, 2005; Hussain *et al.*, 2008a). Lee und Kollegen konnten einen direkten, apoptoseauslösenden Effekt von Eap auf T-Zellen zeigen, und dass zusätzlich die Immunantwort von einer zellulären (TH1-Lymphozyten basierten) hin zu einer humoralen (TH2-Lymphozyten basierten) verschoben wurde, was die Etablierung von Langzeitbesiedlungen und damit chronischen Infektionen durch *S. aureus* begünstigt (Lee *et al.*, 2002). Eap induziert außerdem die Aktivierung von Thrombozyten (siehe 1.5.7) (Bertling *et al.*, 2012; Binsker *et al.*, 2018; Palankar *et al.*, 2018). Die aktivierten Thrombozyten adhärieren an das subendotheliale Gewebe, sowie aneinander und bilden damit weitere

Adhärenzflächen für *S. aureus*. Dies begünstigt die Ausbildung von Biofilmen und somit den Erhalt von Infektionen (Fitzgerald *et al.*, 2006; Bertling *et al.*, 2012). Schließlich konnte für Eap auch ein Effekt gezeigt werden, der die Proliferation und Migration von Endothelzellen beeinflusst. Da Endothelzellen die Grundlage für die röhrenförmigen Strukturen von Blutgefäßen bilden, hemmt Eap so direkt die Neovaskularisierung im Wundbereich. Dies führte zu einem signifikant um 40-50% verminderten Blutfluss im Bereich der Wunde (Athanasopoulos *et al.*, 2006). Im Heilungsverlauf führt dies zu einer unzureichenden Nährstoffversorgung und zu einer verminderten Mikrofluidik im Wundbereich. Es ist naheliegend, zu vermuten, dass sich die Effekte von Eap nicht auf die bereits beschriebenen begrenzen, sondern dass auch andere, an der Wundheilung beteiligte, Zelltypen durch Eap beeinflusst werden.

Unter diesem Gesichtspunkt wurden die Auswirkungen von Eap auf drei der im Hinblick auf eine geordnete Reepithelisation bedeutendsten Zelltypen - Fibroblasten, Endothelzellen und Keratinozyten - untersucht. Im Fokus standen dabei wichtige, zelluläre Prozesse wie Proliferation, Viabilität und Migration.

Der Effekt von Eap auf die Proliferation der hier untersuchten Zelllinien wurde mittels eines BrdU-Assays determiniert und, um diese Erkenntnisse zu vertiefen, wurde zusätzlich ein MTT-Assay zur Determinierung der Stoffwechselleistung durchgeführt.

Im Rahmen meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass die Proliferation und die metabolische Leistung aller untersuchten Zelllinien konzentrationsabhängig durch Eap beeinträchtigt werden. Während bei geringeren Eap-Konzentrationen (5-10 µg/ml) bereits eine Tendenz zu erkennen war, wurden die Effekte bei 20-40 µg/ml bei HaCaT sowohl im BrdU-Assay, wie auch im MTT-Assay signifikant. Der Effekt auf EA.hy926 und BJ Zellen war weniger deutlich. Bei beiden Zelllinien waren nur die BrdU-Ansätze mit 40 µg/ml signifikant, obwohl auch hier bei den anderen Konzentrationen eine Tendenz zu erkennen war. Die geringsten Auswirkungen hat Eap auf die Proliferation der Fibroblasten. Jedoch wurde in vorangegangenen Studien gezeigt, dass sich das Proliferationsverhalten von Fibroblasten aus Zellkultur deutlich von dem aus älteren Wunden gewonnener Fibroblasten unterscheidet. Dabei entsprechen die *in vitro* Fibroblasten in ihrem Phänotyp und ihrer Proliferationsrate am ehesten denen einer frischen Wunde. Das Wundmilieu bewirkt, dass sich der Phänotyp von Fibroblasten hin zu einer maximale Kollagensynthese und Kontraktilität verschiebt, während die Proliferation stark herunterreguliert wird (Regan *et al.*, 1991). Da Eap vor allem in späten, chronischen Wunden gebildet wird, sind die Erkenntnisse zur Proliferation von *in vitro* kultivierten Fibroblasten nur bedingt übertragbar. Weitere Untersuchungen mit aus Wunden gewonnenen Fibroblasten können in Zukunft dieses Bild komplettieren. Da Eap außerdem Einfluß auf die zytoskelettale Maschinerie von Zellen hat (siehe unten), ist es zudem

interessant, den Einfluss auf die Kontraktilität von Fibroblasten zu untersuchen, die notwendig ist, um über den Zusammenzug der Wundränder einen Wundverschluss zu erreichen.

Als Gegenprobe zu dem BrdU-Assay wurde ein Test durchgeführt, der es ermöglicht, apoptotische und nekrotische Zellen von der gesunden Zellpopulation zu unterscheiden. Es wurde bereits in früheren Arbeiten für Keratinozyten (HaCaT) beschrieben (Bur *et al.*, 2013), dass der Eap-Effekt ein proliferationshemmender Effekt und keine Nekrose-, oder Apoptose induzierender Effekt ist. Die späte Apoptose/Nekrose wurde in diesen Untersuchungen in Vollmedium um nur etwa 2,6% der Gesamtpopulation gesteigert, die frühe Apoptose erhöhte sich nicht. Dies bleibt deutlich unter der ermittelten Proliferationshemmung von etwa 18,2% durch eine Eap-Konzentration von 20 µg/ml. Auch unter den im Rahmen dieser Arbeit getesteten Bedingungen konnte bei keiner der untersuchten Zelllinien ein Einfluss auf die frühe Apoptoserate der Zellen beobachtet werden. Jedoch ließ sich, wie auch in den vorangegangenen Studien ein Anstieg in der späten Apoptose/Nekrose verzeichnen. Es wurde lediglich die höchste Eap-Konzentration von 40 µg/ml untersucht. Für HaCaT Zellen ergab sich durch Eap ein signifikanter Anstieg der Nekrose von 0,3% (Kontrolle:  $0,42 \pm 0,075\%$ ; Eap<sup>40</sup>:  $0,75 \pm 0,16\%$ ). Für EA.hy926 ergab sich ein Anstieg um 1,7% bei einem Verhältnis der nekrotischen Zellen in der Kontrolle ( $1,23 \pm 0,4\%$ ), zu den Eap-behandelten Zellpopulationen ( $2,93 \pm 1,82\%$ ). Es konnte jedoch festgestellt werden das unter Eap-Einfluss ein größerer Anteil der gemessenen Zellen sowohl Annexin V, als auch EthD-III positiv, also spätapoptotisch, waren. Für HaCaT ergab dies unter Eap-Einfluss einen signifikanten Unterschied von  $8,75 \pm 2,85\%$  im Vergleich zu den  $2,78 \pm 0,075\%$  der Kontrolle. Dies entspricht einem Anstieg von 5,97%. Für EA.hy926 ergab sich kein signifikanter Anstieg der spätapoptotischen Zellen. Der erhöhte Anteil nekrotischer/spätapoptotischer Zellen ist möglicherweise durch die Art der Durchführung des Assays begründet, die eine Trypsinbehandlung der Zellen voraussetzt. Zellen unter Protease-Stress können leicht geschädigt werden. Da Zellen unter Eap Einfluss morphologische Veränderungen zeigen (s.u., Zellen werden weicher und verlieren an Volumen), ist es möglich, dass sie bei der Protease Behandlung stärker beeinträchtigt werden. Eine weitere Erklärung könnte darin liegen, dass Zellen unter Eap-Einfluss eine verstärkte Pinozytose zeigen (eigene unpublizierte Daten). Dadurch würde die Aufnahme der verwendeten Farbstoffe erhöht. Im Fall des EthD-III wäre dies detektierbar und würde die Ergebnisse verfälschen. Im Fall des Annexin V ist jedoch für die Farbreaktion eine, während der Apoptose stattfindende Umstrukturierung der Membran notwendig. Um dies weiter zu differenzieren, kann zukünftig mit einem Assay gearbeitet werden, der die Aktivität von Caspasen (als Apoptosemarker) aufzeigt. Trotz dieser Effekte ist die gesamte Erhöhung apoptotischer/spätapoptotischer/nekrotischer Zellen mit 6,33% relativ zur Kontrolle

(Kontrolle:  $2,78 \pm 0,075$ ; Eap<sup>40</sup>:  $8,75 \pm 2,85$ ) bei HaCaT und bei Ea.hy mit 5,46% (Kontrolle:  $9,14 \pm 2,91$ ; Eap<sup>40</sup>:  $14,6 \pm 4,76\%$ ) deutlich geringer, als die Minderung ihrer Proliferation (HaCaT  $19,07 \pm 4,98\%$ ; EA.hy  $13,22 \pm 6,78\%$ ). Damit ist auch in der hier vorliegenden Studie eher von einem proliferationshemmenden Einfluss durch Eap auszugehen.

Um die Kinetik des proliferationshemmenden Effekts näher zu untersuchen, wurde das xCELLigence RTCA (engl. "real-time cell analyzer")-System genutzt. Bemerkenswerterweise konnte unter dem Einfluss von 40 µg/ml Eap eine signifikant höhere Impedanz verglichen mit der Kontrolle (0 µg/ml Eap), gemessen werden, was den Erkenntnissen aus den BrdU- und MTT-Assays zu widersprechen scheint. Als Erklärung könnten zellmorphologische Veränderungen der Eap-behandelten Zellen dienen. Derartige Veränderungen können dazu führen, dass die einzelnen Zellen eine größere Fläche einnehmen, wodurch ebenfalls die Impedanz steigt (Yu *et al.*, 2006; Abassi *et al.*, 2009; Irelan *et al.*, 2011; Limame *et al.*, 2012). Da dieser Befund die RTCA -Ergebnisse in einem anderen Blickwinkel erscheinen lässt, wurden weiterführende Analysen der morphologischen Veränderungen durchgeführt.

Es wurden hierzu mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops (AFM) topographische Höhenprofile und Steifigkeitsmessungen Eap-behandelter (40 µg/ml) und unbehandelter HaCaT Zellen gemessen. Es ergaben sich signifikante Unterschiede für alle gemessenen Parameter. Mit Eap inkubierte Zellen erscheinen flacher strukturiert, mit einem deutlich hervortretenden Nukleus. Gleichzeitig bedecken sie eine größere Oberfläche, was den Erkenntnissen aus der RTCA-Messung entspricht. Dabei werden die Zellen jedoch zudem deutlich weicher und verlieren an Volumen. Unter Verwendung des FluidFM-Systems konnte außerdem gezeigt werden, dass diese Zellen deutlich stärker an die Oberfläche der Zellkulturschale haften. Die Adhäsion Eap-behandelter Zellen war mit etwa 1000 nN fast doppelt so hoch, verglichen mit den unbehandelten Zellen.

Um die Kinetik der morphologischen Veränderungen besser zu erfassen, wurden HaCaT Zellen mit einem Lifeact-Plasmid transfiziert und in einem Cell Observer-System über 14 h beobachtet. Durch das Lifeact konnten neben der grundlegenden Veränderung der Zellform, auch Veränderungen in der Struktur des Aktinzytoskeletts erfasst werden. Alle, für die Analyse verwendeten, Zellen besaßen zu Beginn des Experiments die für Keratinozyten typische länglich-trapezoide Zellform mit einer Längen/Breiten-Ration von  $2,34 \pm 0,75$ . Über die Zeit änderte sich dies bei der unbehandelten Kontrollgruppe nicht wesentlich ( $2,0 \pm 0,54$ ), während mit Eap-behandelte Zellen begannen, mehr und mehr einen runden-sternförmigen Phänotyp anzunehmen ( $1,41 \pm 0,39$ ). Die morphologischen Veränderungen der mit Eap inkubierten Zellen setzten bereits innerhalb der ersten 20 min des Experiments ein. Die zunehmende Abrundung der Zellen wurde in der Längen/Breiten-Ratio nach 4 h signifikant.

Visuell ergab sich zudem der Eindruck, das neben der Veränderung der Zellform, auch das Aktinzytoskelett der Eap-behandelten Zellen diffuser zu werden schien.

Es erscheint denkbar, dass Zellen die derart drastische, morphologische Veränderungen durchmachen und stark an den Untergrund anheften, in ihrer Fähigkeit zur Migration beeinträchtigt sind. Um zu überprüfen, ob dies auch für die hier untersuchten Zelltypen zutreffend ist, wurde in einem klassischen Lückenschluss-Assay mittels Kultur-Inserts die Migrationsrate Eap-behandelter Zellen untersucht (Jameson *et al.*, 2013). Die Proliferation der Zellen wurde stets durch die Zugabe des DNA-Polymerase-Inhibitors Aphidicolin unterdrückt, um auszuschließen, dass proliferative Vorgänge die Ergebnisse verfälschen können. Die ersten Untersuchungen wurden mit Ibidi-Einsätzen an KGF-stimulierten Keratinozyten durchgeführt (siehe 4.2.4.1). Spätere Studien mittels des Oris-Assays an FKS stimulierten Zellen (HaCaT, EA.hy926 und BJ) konnten automatisiert im EnSight™ System ausgelesen werden. Es konnte für HaCaT Zellen in beiden Assay-Varianten und für EA.hy926 im Oris-Assay eine signifikante Verminderung der Migrationsfähigkeit unter Eap-Einfluss gezeigt werden. Erste Tendenzen, für einen migrationsinhibierenden Effekt von Eap, bei Keratinozyten zeigten sich bereits bei einer Eap Konzentration von 5 µg/ml und wurde bei einer Konzentration von 10 µg/ml (Oris), bzw. 20 µg/ml (ibidi) signifikant. EA.hy926 zeigten erst bei einer Konzentration von 40 µg/ml eine signifikante Migrationsminderung. Einzig die Fibroblastenzelllinie BJ zeigte im Migrationsassay abweichende Ergebnisse. Hier macht es den Eindruck, als würden geringere Eap-Konzentrationen (5 und 10 µg/ml) die Migration inhibieren, während höhere (20 und 40 µg/ml) die Migration zu fördern scheinen. Allerdings wurde keiner dieser Effekte statistisch signifikant. Zudem variieren die Ergebnisse bei dieser Zelllinie deutlich stärker, als bei allen anderen getesteten Zellarten (siehe auch die Blasenkrebszelllinien RT-112 und 5637). Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Art des Assays zur Erfassung der Migration von Fibroblasten nicht geeignet ist. Dieser Zelltyp wandert *in vivo* im Wundheilungsverlauf entlang eines Zytokingradienten auf einer zuvor während der Hämostase gebildeten Fibrinmatrix in das Wundgebiet ein (siehe Beschreibung der Wundheilung unter 1.6.3.5). In dem durchgeführten Migrationsassay ist weder die Fibrinmatrix als Migrationsgrundlage, noch der beschriebene Zytokingradient zur Direktion der Wanderung gegeben. Dies könnte die beobachteten variierenden Ergebnisse erklären, bei denen die Fibroblasten im Beobachtungszeitraum zum Teil in die Lücke und wieder heraus migriert sind, da ihnen die chemotaktische Leitung an einen Zielort fehlte.

Um die Mobilität und Migrationsgeschwindigkeit von Einzelzellen zu erfassen, wurde erneut das C O-System genutzt. Die zuvor gehungerten, Lifeact-transfizierten HaCaT-Zellen wurden mit der Zugabe von EGF zur Migration angeregt. Die mit 40 µg/ml Eap (über Nacht) inkubierten Zellen zeigten im Beobachtungszeitraum von 150 min nicht nur die bereits

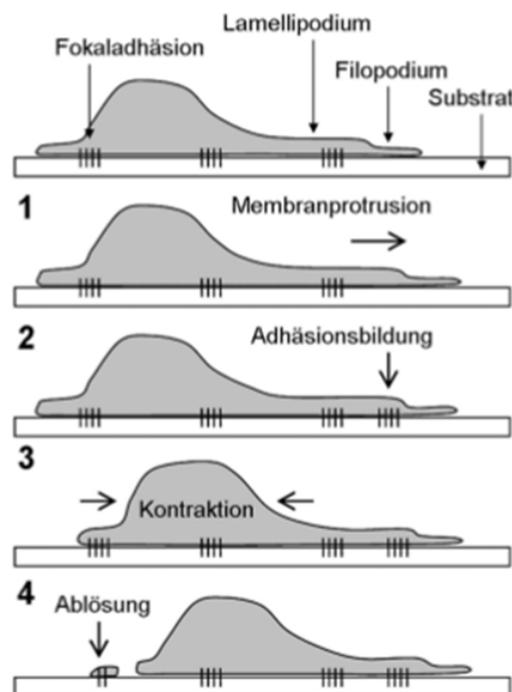
bekannte morphologische Abrundung, sondern auch eine hochsignifikant verminderte Mobilität von nur noch durchschnittlich 10  $\mu\text{m}/\text{h}$  im Vergleich zu den etwa 30  $\mu\text{m}/\text{h}$  der unbehandelten Zellen. Die Bewegungen der Eap-beeinflussten Zellen zeigten außerdem eine kreisende Form, bei der sich häufig zwei nah beieinander liegende Zellen umeinander drehten.

Eine Ursache für den Verlust der Migrationsfähigkeit der Zellen könnte auch darin bestehen, dass das in der Lösung enthaltene Eap den Untergrund dekoriert. Dadurch werden neue Bindungsstellen für andere Adhäsionsmoleküle, wie Vitronectin, ICAM-1 und Laminin bereitgestellt, wodurch die Zelle an Ort und Stelle verankert wird.

Ein weiterer bedeutender Umstand ist der Effekt von Eap auf die Morphologie der untersuchten Zellen. Die Migration der Keratinozyten wird durch mehrere zellmorphologische Veränderungen gewährleistet. Im Verlauf der Wundheilung (siehe auch 1.5.7) müssen, damit die Zellen aus dem Gewebeverband auswandern können, zunächst die desmosomalen und hemidesmosomalen Verbindungen abgebaut, welche die Zellen untereinander und mit der Basalmembran verankern (Santoro & Gaudino, 2005). Ebenso werden die "gap junctions" abgebaut, die im gesunden Gewebe die direkte zytoplasmatische Kommunikation der Keratinozyten gewährleisten. Wandernde Keratinozyten nehmen eine längliche und abgeflachte Form an und bilden in Migrationsrichtung eine Zellfront mit einem so genannten Leitsaum aus (Lorentz & Longaker, 2008). Dieser besteht aus einem breiten Lamellopodium und vielen vorgeschobenen feinen Filopodien. Die Ausbildung dieser Strukturen erfolgt durch aktive Aktinproliferation in Richtung der Zellbewegung (Le Clainche & Carlier, 2008). Um die Zelle auf dem Substrat zu verankern werden neue Fokalkontakte ausgebildet. Dies geschieht durch den Kontakt der auf dem Lamellopodium präsentierten Integrine mit Bestandteilen der EZM am anterioren Pol der Zelle (Santoro & Gaudino, 2005). Gleichzeitig werden alte Adhäsionen am posterioren Ende der Zelle abgelöst (siehe Abb. 5.1). Durch die Kontraktion des Aktinzytoskeletts wird die anterior durch Fokalkontakte fixierte Zelle vorwärtsgezogen (Santoro & Gaudino, 2005; Li *et al.*, 2007; Reinke & Sorg, 2012). Die Keratinozytenmigration erfolgt sowohl auf Einzelzellbasis, als auch in Form einer sich vorschiebenden Epithelzunge (Bartkova *et al.*, 2003). Begegnen sich schließlich die Epithelzellen der gegenüberliegenden Wundränder, kommt es erneut zur so genannten Kontaktinhibition (Lorentz & Longaker, 2008). Die Filopodien der sich berührenden Zellen bilden sich durch Abbau des Aktinzytoskeletts zurück. An ihrer Stelle bilden sich neue Desmosomen aus, welche die Zellen miteinander verbinden, sowie "Tight junctions" um zelluläre Kommunikation erneut zu gewährleisten. Von den Keratinozyten sezerniertes Kollagen, Laminin, Fibronectin und saure Proteoglykane bilden die neue Basalmembran, an die neue Hemidesmosomen geknüpft

werden können. Damit ist die erneute Überhäutung der Wunde abgeschlossen und die Keratinozyten nehmen ihre ursprüngliche Form wieder an.

Die Polarisation der Zelle ist dabei eine grundlegende Voraussetzung für die zelluläre Migration und wird durch Signalkaskaden gewährleistet, die von den in der Wunde sezernierten Wachstumsfaktoren induziert werden. Die Mitglieder der Familie der kleinen GTP-bindenden Proteine (Rho-GTPasen) sind ein wichtiger Teil der Signalkaskaden und innerhalb der Zelle räumlich und zeitlich getrennt voneinander aktiv. Sie wirken zum Teil antagonistisch, um die Vorgänge der Zellmigration zu koordinieren (Etienne-Manneville, 2008; Machacek *et al.*, 2009). Neben der Zellmigration ist die Polarisation der Zelle auch eine grundlegende Voraussetzung für die Proliferationsfähigkeit.



**Abb. 5.1:** Der Migrationsprozess von Keratinozyten: Die migrierende Keratinozyte (hier seitlich dargestellt) bildet einen Leitsaum mit einem breiten Lamellipodium und vielen, feinen Filopodien in Migrationsrichtung aus. Die Anheftung der Zelle an das Substrat wird hierbei durch Fokaladhäsionen gewährleistet. Der Prozess der Migration wird in vier Einzelschritte unterteilt, die sich in einem Kreislauf wiederholen. 1) Durch Aktinpolymerisation werden Membranprotrusionen in Migrationsrichtung vorgeschoben. 2) Innerhalb dieser Vorstülpungen werden neue Fokalkontakte aufgebaut und die Zelle damit in Migrationsrichtung verankert. 3) Durch Kontraktion des Aktinzytoskeletts wird die Zelle in Wanderungsrichtung vorwärtsgezogen. 4) Am posterioren Pol der Zelle werden zugleich alte Fokaladhäsionen abgebaut, damit sich die Zelle vorwärtsbewegen kann (nach Schäfer & Werner, 2008).

Es konnte bereits in Studien unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Eap die Signalweiterleitung über die Map-Kinase-Kaskade (MAPKK) (siehe Abb. 5.2) von durch Wachstumsfaktoren stimulierten Zellen inhibiert (Sobke *et al.*, 2006; Eisenbeis *et al.*, 2017). Da diese Signalkaskade Gene adressiert, die für Proliferation und Migration von Zellen

verantwortlich sind (Chen & Thorner, 2007), könnten viele der hier beobachteten Effekte auch durch eine Blockierung der MAPKK verursacht werden. Diese Beeinflussung ist wahrscheinlich ein wichtiger Aspekt des Eap-Effekts auf eukaryotische Zellen.

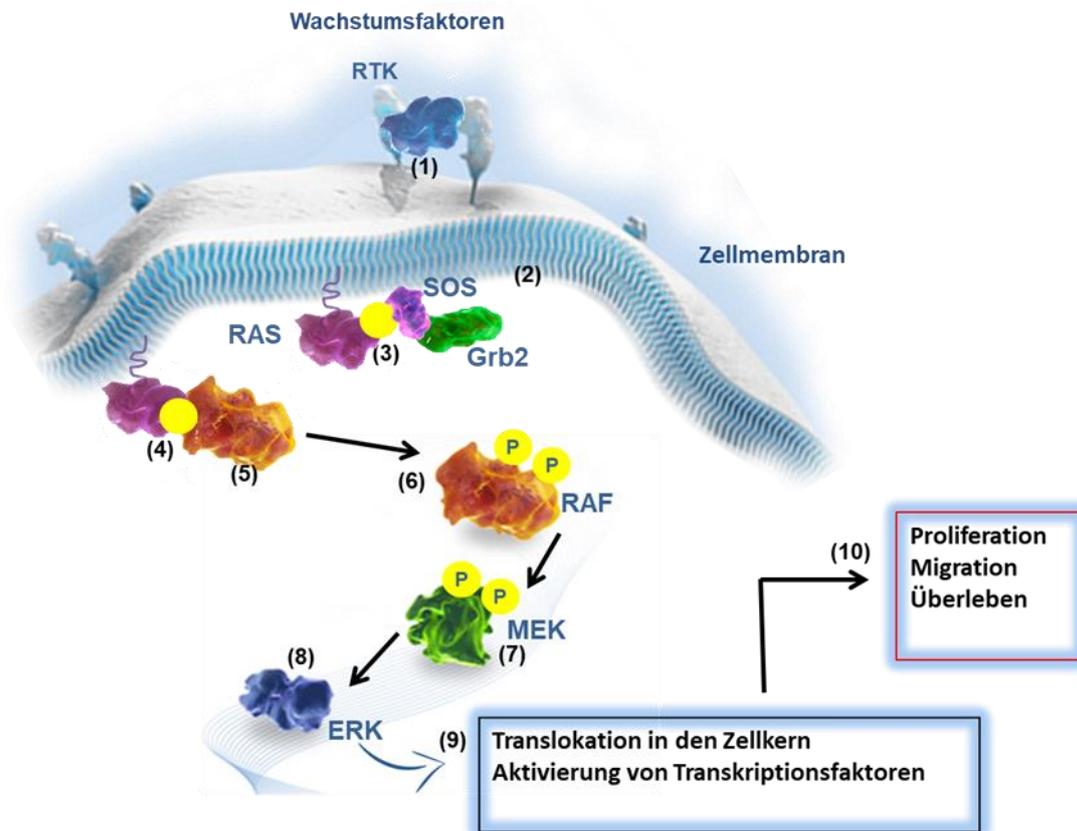


Abb. 5.2: Die "Mitogen aktivierte Protein Kinase/extrazellulär regulierte Kinase (MAPK/Erk) Signalkaskade": 1) Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen (RZK) auf der Zellmembran durch Wachstumsfaktoren. Die Tyrosin-Kinaseaktivität des zytoplasmatischen Abschnittes des Rezeptors führt daraufhin zu einer Autophosphorylierung spezifischer Tyrosinreste der intrazellulären Rezeptordomäne. 2) Dadurch entsteht eine Bindungsstelle für das Adapterprotein Wachstumsfaktor receptorgebundene Protein 2 (GRB2). Durch dessen Bindung an den aktivierten Rezeptor wird der Guanin Nucleotid-Austausch-Faktor SOS (engl. "son of sevenless") zur Plasmamembran rekrutiert. 3) SOS bindet daraufhin membrangebundene Ras-Proteine, die an der inneren Oberfläche der Membran verankert sind, und stimuliert durch eine Phosphatübertragung an Guanosindiphosphat (GDP) zu einem aktiven Guanosintriphosphat (GTP) die Bildung eines Ras-GTP-Komplex. 4) Aktives GTP-gebundenes Ras (engl. "rat sarkoma G-Protein") bewirkt Konformationsänderungen von Raf (engl. "rapidly accelerated fibrosarcoma"), die dessen Dimerisierung und Rekrutierung vom Zytosol zur Plasmamembran ermöglichen. 5) Die Ras-vermittelte Rekrutierung von Raf zur Membran begünstigt Phosphorylierungsänderungen bei Raf, die dessen Serin-/Threoninkinasedomäne aktivieren. 6) Aktiviertes Raf phosphoryliert und aktiviert die dualspezifischen "Mitogen aktivierten Proteinkinasen" MEK1 und MEK2. 7) Aktiviertes MEK1 und MEK2 aktivieren die "extrazellulär regulierten Kinasen" Erk1/2. 8) Aktiviertes Erk wandert daraufhin in den Nukleus ein, wo es durch Phosphorylierung diverse Transkriptionsfaktoren aktivieren kann. 9) Diese Transkriptionsfaktoren wiederum sind an der Genexpression ganz bestimmter Gensequenzen beteiligt und beeinflussen so Zellfunktionen, 10) wie Proliferation, Migration und Viabilität (nach Chen & Thorener 2007; Abbildung verändert aus der Präsentation "der MAPK-Signalweg" von Roche 2016).

Mit dem Hintergrundwissen, dass Eap die MAPKK unterbricht, stellt sich die Frage, ob Eap auch in der Lage ist mit anderen Signalkaskaden zu interagieren, welche Zellfunktionen wie Proliferation, Migration, oder Morphologie beeinflussen. Ein potentieller Kandidat hierfür wäre die PI3K/AKT/mTOR-Kaskade. Um dies in Zukunft zu untersuchen wurden bereits weitere AlphaLisa-Kits (pAkt (Thr 308); Perkin Elmer, Rodgau Jügesheim) bestellt. Zukünftige Versuche werden adressieren, ob Eap mit dieser Signalkaskade interagiert.

Neben dem Prinzip der zellulären Signalweiterleitung, die auf einer Phosphorylierungskaskade beruhen, wie die hier näher besprochene MAPKK, stellt die Kalziumsignaltransduktion ein weiteres universelles Werkzeug der Informationsübertragung dar (Clapham, 2007). Kalziumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) sind durch ihre positive Ladung in der Lage, an eine Vielzahl von zytosolischen Proteinen zu binden und dadurch deren Konformation und Aktivität zu beeinflussen. Da eine erhöhte Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$  im Zytosol zu einer zytotoxische Phosphatpräzipitation, sowie Proteinaggregationen führen kann, erfolgt eine Kompartimentierung des bivalenten Ions. ATP-abhängige Pumpen sorgen für den Abtransport von  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle heraus oder in Speicherstätten, wie das endoplasmatische Retikulum (ER) und Mitochondrien (Clapham, 2007). Daneben existieren in der Zellmembran ATP-unabhängige Ionentransporter, die als weiterer Mechanismus zur Eliminierung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytoplasma dienen (Blaustein *et al.*, 2002). Kommt es durch äußere Signaleinwirkung zu einer Öffnung der Kalziumkanäle und einem nachfolgenden Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem extrazellulären Raum oder dem ER, dient  $\text{Ca}^{2+}$ , durch seine Auswirkungen auf  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine als bedeutender sekundärer Botenstoff der Signalweiterleitung. Eines der wichtigsten, wenn auch bei Weitem nicht das einzige, Effektmolekül der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalkaskade ist das ubiquitär vorkommende Calmodulin (CaM, engl. "calcium-modulated protein") (Cheung, 1980). Durch Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  ändert es seine Konformation von globulär zu hantelförmig und es kommt zu einer Exponierung von hydrophoben Oberflächen. CaM kann in dieser Form mit zahlreichen weiteren Proteinen interagieren und diese aktivieren. CaM stellt also eine Schnittstelle zwischen dem initialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal und der Aktivierung von Phosphorylierungskaskaden dar (Clapham, 2007). Am Ende der Signaltransduktion werden zahlreiche zelluläre Effekte beeinflusst, darunter auch die Proliferation, das Überleben und die Mobilität von Zellen. Da in neuester Zeit gezeigt werden konnte, dass Eap über einen bislang unbekanntem Mechanismus, den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in Thrombozyten induziert (Binsker *et al.*, 2018; Palankar *et al.*, 2018), kommt es vermutlich auch hier zu einem Einfluss auf Kalzium-basierte Signalkaskaden. Geklärt ist bislang nur, dass die Eap Domänen D3 und D4 über eine spezifische Interaktion zu einer schnellen Aktivierung der Thrombozyten führt (Palankar *et al.*, 2018). Sollte Eap auch bei anderen Zelltypen als Thrombozyten in der Lage sein die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung zu

induzieren, könnte dies ein weiteres Indiz für die beobachteten Eap-Effekte auf Proliferation und Migration von Zellen sein. Dies sollte in weiterführenden Studien untersucht werden.

Schließlich könnte auch ein Einfluss auf die Ras/Raf/Rho-Signalkaskade bestehen, wodurch es den Zellen nicht länger möglich wäre, die für Migration und Proliferation nötige Polarität aufrecht zu erhalten (Etienne-Manneville, 2008; Machacek *et al.*, 2009). Auch diese Fragestellung muss in Zukunft noch näher adressiert werden.

Neueste Erkenntnisse der Arbeitsgruppe, zum Einfluss von Eap auf die Zellpolarität, deuten darauf hin, dass Eap dazu führt, dass die eukaryote Zelle in alle Richtungen eine Vielzahl von Filopodien ausbildet, jedoch nicht den für die gerichtete Zellbewegung benötigten Leitsaum. Dies deutet daraufhin, dass Eap zumindest in gewissem Maß Einfluss auf die Motorproteine der Zelle nimmt. Zudem gibt es Indizien, dass die Zellen unter Eap-Einfluss vermehrte Fokalkontakte unter dem Zellkörper ausbilden, was die stark erhöhte Adhäsion an den Untergrund und die verminderte Beweglichkeit erklären könnte. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung müssen erfolgen, um die molekularen Mechanismen dieser Effekte näher aufzuklären. Neben dem hier untersuchten Effekt auf die Reepithelialisierung der Wunde, beeinflussen die Auswirkungen von Eap auf die Keratinozyten zudem zusätzlich direkt die Regulation der Immunantwort auf *S. aureus* (Bitschar *et al.*, 2017). Als Zellen der obersten Hautschicht kommt den Keratinozyten eine Schlüsselrolle in der Erkennung pathogener Organismen und der nachfolgenden Aktivierung der Immunantwort zu (Bitschar *et al.*, 2017). Auf ihrer Oberfläche präsentieren Keratinozyten verschiedene PRR-Rezeptoren (engl. "pattern recognition receptors"), die in der Lage sind bakterielle Bestandteile zu erkennen (Pasparakis *et al.*, 2014). In der Folge einer solchen Aktivierung produzieren und sezernieren Keratinozyten eine Palette von Zytokinen und dirigieren damit Immunzellen an den Eintrittsort der Pathogene (Miller & Modlin, 2007; Nestle *et al.*, 2009; Di Meglio *et al.*, 2011). Zusätzlich produzieren die stimulierten Keratinozyten antimikrobielle Peptide, die direkt gegen eine Vielzahl pathogener Mikroorganismen wirken können. Interessanter Weise hemmen TH2-Zytokine die Produktion von AMPs (Schitteck, 2011). Da Eap die Immunantwort in Richtung TH2 verschiebt (Lee *et al.*, 2002), hat es dadurch direkten Einfluss auf die Wirkweise von Keratinozyten als unspezifische Immunzellen. Die genauen regulatorischen Zusammenhänge müssen jedoch auch hier in Zukunft noch näher erfasst werden.

### 5.3 Die Sezernierung von Eap *in vitro*

Die in dieser Arbeit beobachteten Effekte auf eukaryotische Zellen zeigen meist nur signifikante Werte bei höheren Eap-Konzentrationen von 20-40 µg/ml. Auch die in den

letzten Jahren durchgeführten Studien zu Eap wurden häufig mit relativ hohen Konzentrationen durchgeführt. So führt eine Konzentration von  $\geq 27 \mu\text{g/ml}$  Eap zu einer verminderten T-Zell-Proliferation (Haggart *et al.*, 2005) und eine Konzentration von  $200 \mu\text{g/ml}$  wurde als Apoptose-induzierend bewertet (Lee *et al.*, 2002). Es ist bis dato unklar, ob derart hohe Konzentrationen in einem von *S. aureus* infizierten Gewebe erreicht werden können. Dies ist auch unter dem Gesichtspunkt von Bedeutung, dass in jedem bislang untersuchten Probanden Antikörper gegen Eap nachgewiesen werden konnten (Joost *et al.*, 2011). Die Antikörper können Eap binden und so in seiner Funktion inhibieren und würden gleichzeitig den Abbau des Proteins initiieren. Andererseits konnte durch Transkriptionsanalysen bereits nachgewiesen werden, dass die *eap*-Transkription in tiefen Wunden, mit einer 100-fachen Rate im Vergleich zu Flüssigkulturen, sehr hoch ist (Joost *et al.*, 2009). Ähnliches konnte für die chronische Phase von Osteomyelitis gezeigt werden (Szafranska *et al.*, 2014). Auf Ebene der Sekretion ins Umgebungsmilieu konnten Athanasopoulos *et al.* bereits mittels Western Blot Eap aus *S. aureus* infizierten Wunden nachweisen (Athanasopoulos *et al.*, 2006). Um die Eap-Akkumulation in chronischen, mit *S. aureus* infizierten Wunden und Abszessen näher zu untersuchen, wurde die Eap-Sekretion in der exponentiellen Wachstumsphase nach 2-3 h Wachstum und der post-exponentiellen Wachstumsphase, nach 5-6 h Wachstum in TSB erfasst. Es wurde dafür zum einen der Laborstamm Newman (Duthie, 1952) analysiert, der aufgrund einer Mutation innerhalb des *sae*-Lokus konstitutiv Eap exprimiert (Adhikari & Novick, 2008; Geiger *et al.*, 2008; Schafer *et al.*, 2009). Da *sae* als Zweikomponentensystem die Expression von *eap* positiv reguliert (Harraghy *et al.*, 2005), produziert *S. aureus* Newman signifikant höhere Eap-Mengen, als andere *S. aureus* Stämme (Hussain *et al.*, 2001a; Schafer *et al.*, 2009). Diese Eigenschaften des *sae* Lokus, des Newman Stamms, wurden kürzlich damit erklärt, dass eine AS-Substitution in der Rezeptorkinase SaeS innerhalb der ersten transmembranen Helix vorliegt. Dies könnte die  $\alpha$ -Helix in dieser Region in ein  $\beta$ -Faltblatt konvertieren. Das hätte dann wiederum maßgebliche Effekte auf die Sagnaleigenschaften des Proteins (Adhikari & Novick, 2008).

Des Weiteren wurde die Eap Sekretion vom Stamm 923 untersucht, einem klinischen Isolat vom Typ USA300, einer hochvirulenten CA-MRSA Linie, welche häufig mit schweren Haut- und Lungenerkrankungen assoziiert ist (Montgomery *et al.*, 2008; Strauss & Stegger, 2017).

Die ermittelte Eap-Expression wurde auf eine bakterielle Zellzahl von  $1 \cdot 10^7$  KBE normalisiert, die typische bakterielle Keimzahl infizierter Wunden und Nierenabszesse an Tag 3-4 der Infektion (McLoughlin *et al.*, 2006; Weidenmaier *et al.*, 2010; Yoong & Pier, 2010; Holtfreter *et al.*, 2013; McVicker *et al.*, 2014). Früher durchgeführte Analysen zeigten einen Anstieg der Transkriptionsrate von *eap* in der post-exponentiellen Wachstumsphase (Joost *et al.*, 2009). Die im Rahmen meiner Arbeit durchgeführten semi-quantitativen Sekretionsanalysen von Eap

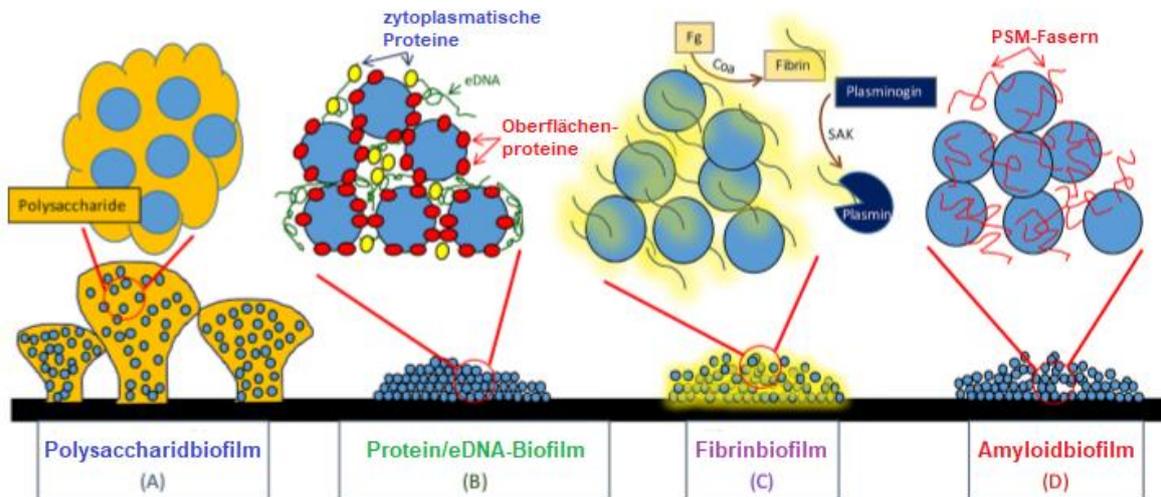
in TSB zeigten eine weitestgehend Wachstumsphasen unabhängige Akkumulation von  $18 \pm 7$  ng/h/ $1 \cdot 10^7$  Zellen in der exponentiellen und  $21 \pm 10$  ng/h/ $1 \cdot 10^7$  Zellen in der post-exponentiellen Phase bei Newman und  $13 \pm 8$  ng/h/ $1 \cdot 10^7$  in der exponentiellen und  $8 \pm 4$  ng/h/ $1 \cdot 10^7$  in der post-exponentiellen Phase bei den USA300 Kulturüberständen. Die Konzentrationen von Eap sind also bei beiden untersuchten Stämmen in der exponentiellen Wachstumsphase geringfügig höher, verglichen mit der post-exponentiellen Phase. Dies könnte möglicherweise auch daran liegen, dass Eap ab einer gewissen Konzentration in Lösung beginnt, Aggregate zu bilden und an die Gefäßwände zu binden, wodurch es für die Analyse verlorengelht. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass Proteasen, die von *S. aureus* ebenfalls in späteren Wachstumsphasen verstärkt gebildet werden (Novick, 2003), das produzierte Eap in der Lösung degradieren. Das würde bedeuten, dass die Bildung von Eap über die Zeit zwar ansteigt, die Eap Menge im Überstand jedoch nicht zunimmt. Dies könnte möglicherweise durch die Zugabe von Proteasinhhibitoren, in das Wachstumsmedium, in weiteren Versuchsansätzen überprüft werden.

Um die Situation von *in vivo* Kulturen näher zu beleuchten, wurde die Sekretionsanalysen zudem in dem für eukaryotische Zellkulturen gebräuchlichen Medium RPMI 1640 durchgeführt. *S. aureus* ist in der Lage, in diesem Medium, das reich an Aminosäuren ist, aber einen sehr geringen Eisengehalt besitzt, zu wachsen (Schmitt *et al.*, 2012). Da in TSB in der exponentiellen Wachstumsphase die höheren Eap-Konzentrationen detektiert wurden, wurden genau diese Phase (3- 4 h Wachstum) analysiert. Es ergaben sich Werte von  $396 \pm 361$  ng/h/ $1 \cdot 10^7$  Zellen für den Stamm Newman und  $206 \pm 106$  ng/h/ $1 \cdot 10^7$  Zellen für den Stamm USA300. Eap erreicht also mehr als zehnfach höhere Werte in den Kulturüberständen beider Stämme in RPMI 1640 Medium, im Vergleich zu TSB. Eap wird in Eisenmangelkonditionen, wie sie in diesem Medium vorherrschen, verstärkt exprimiert (Johnson *et al.*, 2008). Auch infizierte Wunden stellen ein Milieu mit reduzierter Eisenverfügbarkeit dar und es wurde gezeigt, dass unter diesen Konditionen die Bildung von Biofilmen induziert wird (Johnson *et al.*, 2008). Eap scheint dabei für den Aufbau des Biofilms von Bedeutung zu sein und wird unter diesen Umständen durch den globalen Regulator Fur, sowie das *ica*-Operon positiv reguliert (Johnson *et al.*, 2008). Es wurde für Eap außerdem eine Rolle für die Entwicklung von Abszessen nachgewiesen (Cheng *et al.*, 2009). Da sowohl Abszesse, als auch tiefe Wunden Orte mit sehr geringer Mikrofluidität und hohen bakteriellen Zellzahlen darstellen, ist es also durchaus denkbar, dass sich Eap in einer solchen Umgebung verstärkt akkumulieren kann. Geschieht dies über mehrere Stunden bis Tage, können sich Eap-Konzentrationen anreichern, welche Werte erreichen, die auch für die Proliferations- und Migrationshemmenden Effekte ausreichend sein können.

### 5.4 Eap interagiert mit DNA und bildet damit die Grundlage für weitere Immunmanipulationen

Wie bereits beschrieben, ist Eap ein Protein mit einem breiten Spektrum an Interaktionspartnern auf Seiten des Wirtsorganismus. Es vermittelt die Bindung an zahlreiche Zellmatrixbestandteile, Plasmaproteine und Komponenten der extrazellulären Matrix (McGavin *et al.*, 1993; Palma *et al.*, 1999; Hansen *et al.*, 2006), aber auch an abiotische Strukturen, wie Katheter und Implantate (Palma *et al.*, 1999; Kreikemeyer *et al.*, 2002). Da Eap außerdem über die Neutrale Phosphatase und weitere Partner, wie etwa die WTAs (Flock & Flock, 2001; Kreikemeyer *et al.*, 2002; Vuong *et al.*, 2002) zu bis annähernd 30% an die bakterielle Zellwand von *S. aureus* zurückbinden kann (Palma *et al.*, 1999), wurde es mit einer Brückenfunktion zwischen Pathogen und Wirtsoberfläche beschrieben (Kreikemeyer *et al.*, 2002). Da Eap ein stark kationisches Protein ist ( $pI = 9,93$  bei einem pH von 7,2) wurde zudem angenommen, dass die Interaktion an die negativ geladene eukaryote Zelloberfläche ladungsbedingt ist (Hansen *et al.*, 2006). Aufgrund dieser vielfältigen Bindungseigenschaften und der Ladungseigenschaften wurde im Rahmen meiner Arbeit überprüft, ob Eap an ein poly-anionisches Molekül, wie es die DNA darstellt, binden kann. Extrazelluläre DNA (eDNA) spielt insbesondere bei bakteriellen Wundinfektionen eine entscheidende Rolle. Es wurde zudem gezeigt, dass eDNA eine maßgebliche Komponente bakterieller Biofilme ist (Whitchurch *et al.*, 2002; Mann *et al.*, 2009). Der Biofilm besteht dabei meist aus einer mehrlagigen Struktur, in der die Bakterien in einer Matrix aus dem interzellulären Polysaccharid-Adhäsin (PIA) und durch Autolyse der Bakterien freigewordene eDNA mit assoziierten Proteinen eingebettet vorliegt (O'Gara, 2007; Payne & Boles, 2016). Dabei überwiegen je nach Spezies, Stammhintergrund, oder Wachstumsbedingungen gewisse Komponenten, wodurch verschiedene Formen von Biofilmen hervorgebracht werden. Diese Formen können zudem während der Reifung des Biofilms teilweise ineinander übergehen (siehe Abb 5.3). Es wurde bereits für mehrere Proteine von *S. aureus*, wie das Oberflächenadhäsins Bap (engl. "biofilm associated protein"), Protein A, die Oberflächenproteine SasC und G, die Fibronectinbindeproteine und die Klumpungsfaktoren A und B eine Rolle in der Biofilmbildung nachgewiesen (rezensiert in (Zapotoczna *et al.*, 2016)). Die Phenol-löslichen Moduline (PSMs) - kleine Peptid-Toxine - können zu amyloiden Strukturen aggregieren, welche die Biofilmbildung fördern (Zapotoczna *et al.*, 2016). Eine bedeutende Rolle in der Bildung Fibrin-basierter Biofilme spielt dabei die Koagulase (Coa). Diese bindet das wirtseigene Prothrombin, wodurch ein aktiver Staphylothrombin-Komplex entsteht, der monomeres Fibrinogen in selbst-polymerisierendes, unlösliches Fibrin umwandelt. Dieses Fibrinnetzwerk bildet dann das Gerüst des reifenden Biofilms. Auch für Eap wurde bereits eine Rolle in der Bildung und dem Erhalt von Biofilmen unter Bedingungen mit eingeschränkter Eisenverfügbarkeit (Johnson *et al.*, 2008), oder in

Anwesenheit von Serum durch die Bindung an Fibrinogen und Fibronectin (Thomson, 2011) nachgewiesen. Ob Eap jedoch auch eine Bindung an die eDNA-Komponenten des Biofilms vermitteln kann, wurde bislang noch nicht untersucht.



**Abb. 5.3** Die Hauptmechanismen der Biofilmbildung von *S. aureus* A) Biofilme vom Polysaccharid-Typ basieren auf der Expression von PIA durch das *icaADBC*-Operon und ist typisch für Methicillin-sensible *S. aureus* Isolate B) Oberflächenproteine wie BAP, die FnBPs und SasG vermitteln einen direkten Zell-Zell-Kontakt während der Akkumulation des Biofilms. Zytoplasmatische Proteine und eDNA, die in Folge einer Autolyse freierwerden stellen ebenfalls Komponenten der Biofilmmatrix dar. C) Koagulase-vermittelte Umwandlung von Fibrinogen (Fg) in Fibrin, welches als Biofilm-Gerüst dient. Dieses kann nach Staphylokinase-vermittelter Aktivierung von Plasminogen durch das produzierte Plasmin wieder aufgelöst werden. D) Phenol-löslichen Moduline (PSMs) aggregieren zu amyloiden Strukturen, welche die Biofilmbildung fördern (verändert nach Zapotoczna et al., 2016).

Um die mögliche Interaktion zwischen Eap und DNA zu untersuchen, wurden Aliquots (50 ng) eines 1,4 kb DNA-Fragments mit steigenden Konzentrationen von Eap (1, 5, 10, 20, 40 µg/ml) inkubiert und die Probe anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 4.4.1). Hierbei konnte zunächst beobachtet werden, dass die Banden der mit SYBR® Gold angefärbten DNA Eap-konzentrationsabhängig schwächer detektierbar wurden. Gleichzeitig zeigte sich jedoch ein stärker werdendes SYBR® Gold-Signal in den Taschen des Sammelgels. Ab einer Konzentration von 20 µg/ml Eap wurde die DNA-Probe offenbar vollständig in den Sammelgel-Taschen zurück gehalten. Vermutlich bindet Eap an die DNA und aggregiert diese. Das führt zur Ausbildung großer Eap-DNA-Aggregate, die nicht in die Matrix des Gels einwandern können. Die densitometrische Auswertung der SYBR® Gold-Signale in den Banden und Taschen des Gels vermitteln zudem den Eindruck, dass ab einer Konzentration von 20 µg/ml Eap ein Teil der DNA verloren geht. Dies könnte für eine geringe intrinsische DNase-Aktivität von Eap sprechen, dass mit den beiden bekannten *S. aureus* Nukleasen Nuc 1 und 2 zudem eine erstaunliche Thermostabilität gemein hat (eigene,

unpublizierte Daten). Um diese Hypothese zu prüfen, wurde zum einen ein AFM basierter Versuchsansatz verfolgt, bei diesem wurde Eap (0,5 µg/ml) mit dem 1,4 kb DNA-Fragment (100 ng/ml) in PBS bei 37°C für verschiedene Zeiten inkubiert und dann mittels DNA-Combing auf eine OTS Silikon-Oberfläche aufgebracht (siehe 3.8.3). Die so präparierte Probe konnte am AFM gemessen und ihr Höhen- und Längenprofil ausgewertet werden. Es zeigte sich, dass Eap offenbar an die Enden der DNA-Stränge gebunden vorlag (siehe 4.4.2). Im AGE-basierten Versuchsansatz, konnte bestätigt werden, dass die endständige Bindung von Eap an die DNA unabhängig davon war, ob ein "blunt"(*EcoRV*-Verdau)-, oder "sticky"- Ende mit einem 3'-Überhang (*PstI*-Verdau), oder 5'-Überhang (*BamHI*-Verdau) vorlag (pBR322-Plasmid-Verdau, siehe 4.4.3). Mittels AFM-basierter Aufnahmen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Herkunft (DNA des Lambda Phagen, DNA aus Heringssperma, Plasmid-DNA aus *E. coli*, *S. aureus* PCR-Produkt) keine Rolle auf die Bindungsfähigkeit von Eap zeigt, sehr wohl jedoch die Form der DNA. So konnte Eap zwar, endständig, an alle linear vorliegenden DNA-Proben, jedoch nicht an geschlossene Plasmide binden. Als einzige Ausnahme, von der Regel stellte von den getesteten Proben nur die Heringssperma-DNA dar. Hier konnte eine Eap-Bindung an weiteren Positionen der Moleküle gezeigt werden. Es wurde daher hypothetisiert, dass die Bindung an die Heringssperma-DNA an Positionen mit durch den Schervorgang entstandenen Strangbrüchen erfolgte. Zudem konnte beobachtet werden, dass Eap DNA-Stränge quervernetzt, was ebenfalls die Erkenntnis unterstützt, dass Eap zur Aggregation der DNA beiträgt (Eisenbeis *et al.*, 2018). Als weitere AFM-basierte Erkenntnis stellte sich eine kontinuierliche Verkürzung linearer DNA über die Zeit dar, was zunächst ebenfalls für eine DNase-Aktivität von Eap spricht (siehe 4.4.2). Um diesen Befund weiter zu untersuchen, wurden wie im ersten Versuchsansatz, Proben des 1,4 kb DNA-Fragments mit steigenden Konzentrationen von Eap (10, 20 und 40 µg/ml) inkubiert. Zur nötigen Versorgung mit Kofaktoren wurden diese Versuche in RPMI1640-Medium durchgeführt. Als Kontrolle der Enzymaktivität diente die DNase I (0,4 mKuU; Quiagen, Hilden). Zur Trennung der Proteine von der verdauten DNA wurden die Proben einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Fällung unterzogen. Die im AGE aufgetrennten Proben zeigten weder eine Abschwächung, noch eine Verschiebung der Banden der mit Eap behandelten Proben, welche auf einen Nukleinsäure-Abbau hindeuten würden (siehe 4.4.4). In der Kontrolle mit DNase I konnte hingegen ein zeitabhängiger Abbau der DNA beobachtet werden. Zusätzlich wurde in der Arbeitsgruppe ein Fluoreszenz-basierter DNase-Aktivitäts-Assay (Jena Biosciences, Jena) durchgeführt (Eisenbeis *et al.*, 2018). Getestet wurde Eap (40 µg/ml) aus verschiedenen Aufreinigungsprozessen (aus Newman, dem Nuklease-defizienten Stamm M0746N1 und heterolog aus *E. coli*), DNase I diente auch hier als Positivkontrolle (0,3 und 2 mKuU). Es konnte für keine der Eap-Aufreinigungen ein signifikanter Anstieg des DNA-Abbaus in

diesem Assay nachgewiesen werden, während die Proben der Positivkontrolle (DNase) wie erwartet einen zeit- und konzentrationsabhängigen Anstieg in der Fluoreszenz (Maß des DNA-Abbaus) zeigten. Auch diese Befunde sprechen gegen eine Nukleaseaktivität von Eap. Anhand dieses Hintergrunds wurden die Höhenprofile der AFM-Messungen erneut betrachtet und die Abmessungen der endständig an die DNA gebundenen Eap-Moleküle ausgemessen. Es ergab sich eine Zunahme der Höhe des endständigen Bereichs über die Zeit, was dafür spricht, dass Eap die DNA nicht degradiert, sondern akkumuliert (Eisenbeis *et al.*, 2018). Der Verlust der SYBR<sup>®</sup> Gold-Signale in initialen Versuch ist also viel eher damit zu erklären, dass die durch Eap akkumulierte DNA über Eap an die Wände des Reaktionsgefäßes gebunden wird und dadurch für die weitere Untersuchung verloren geht. Dieser Effekt ist ebenfalls von der Eap-Konzentration abhängig. Um weiter auszuschließen, dass es sich bei dem Eap-Effekt um eine Degradation der DNA handelt, wurde mittels Phagentransduktion eine Deletionsmutante des *S. aureus* Stamms Newman generiert. Verwendet wurde hierfür eine Deletionsmutante, der bereits die beiden Nukleasen Nuc I und Nuc II fehlen (M0746N1; (Kaito *et al.*, 2011)). Eine mögliche Nukleaseaktivität von Eap würde so nicht von den Aktivitäten der Nukleasen I und II überlagert werden. Die Dreifachmutante (Nukleasen und Eap) wurde zusammen mit der Nukleasemutante, einer reinen *eap*-Mutante, einer Mutante der neben *eap* auch die Homologe *eapH1* und *eapH2* fehlen und dem Wildtyp auf DNase-Agar (Becton Dickinson, Heidelberg) auf ihre Fähigkeit zum Nukleinsäureabbau getestet. Der Wildtyp, die *eap*-Mutante und die *eap/eapH1/eapH2*-Mutante zeigten typische Höfe, die auf Nukleaseaktivität hinweisen. Die Nuklease-Mutante und die Nuklease/Eap-Mutante zeigten keinerlei Degradationshöfe was dafür spricht, dass Eap keine Nukleaseaktivität besitzt und ohne *nuc1/2* keine Nukleaseaktivität detektierbar ist. All diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass Eap ausschließlich an DNA bindet und akkumuliert, jedoch nicht in der Lage ist DNA abzubauen.

Erste Hinweise einer Funktion dieser Fähigkeit zur DNA-Aggregation im biologischen System konnten an den durch Neutrophile gebildeten NETs (engl. "neutrophil extracellular traps") gezeigt werden. Eap selbst ist nicht in der Lage, die Bildung von NETs auszulösen. Induziert man jedoch die Bildung von NETs mittels Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA), Lipopolysacchariden (LPS), oder Stickoxid (NO), so ist Eap in der Lage, die Ausbildung von NETs zu verhindern. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig, wobei bei einer Eap-Konzentration von 10 µg/ml nach drei Stunden Koinkubation keine NETs mehr zu erkennen sind. Da Eap nicht in der Lage ist, die DNA der NETs zu degradieren und mit der Abnahme der NETs gleichzeitig ein Anstieg der Fluoreszenz eines anti-DNA/Histin H1-Antikörpers auf der Zelloberfläche (ZO) der Neutrophilen zu beobachten ist, spricht dies dafür, dass Eap die DNA akkumuliert und auf der ZO bindet (Saffarzadeh, 2011; Eisenbeis *et al.*, 2018). Eap ist nicht nur in der Lage, die Bildung von NETs zu verhindern, sondern auch bereits gebildete

NETs zu degradieren (Saffarzadeh, 2011; Eisenbeis *et al.*, 2018). *S. aureus* sekretiert zwei hitzestabile Nukleasen (Nuc1 und Nuc2; (Tang *et al.*, 2008)), die ebenso wie Eap durch das Genregulationssystem SaeRS reguliert und in der post-exponentiellen Phase des Wachstums exprimiert werden (Harraghy *et al.*, 2005; Olson *et al.*, 2013). Für diese Nukleasen wurde bereits gezeigt, dass sie in der Lage sind, NETs zu degradieren (Berends *et al.*, 2010). Um sicher zu stellen, dass hier also tatsächlich ein Eap-Effekt vorliegt, wurden alle Versuche auch mit Eap-Proben aus einem Aufreinigungsprozess aus der Nuklease-Mutante M0746N1 durchgeführt (Saffarzadeh, 2011; Eisenbeis *et al.*, 2018). Es kann also zusammengefasst werden, dass Eap *S. aureus* auf komplexe Weise vor dem Einfangen und der Degradierung durch NETs schützt. Zum einen inhibiert es die Neutrophilen Serinproteasen, was für *S. aureus* einen Schutz der eigenen Virulenzfaktoren darstellt, die von den Serinproteasen adressiert werden (Stapels *et al.*, 2016). Zum anderen verhindert es das Einfangen im Blutstrom zirkulierender Bakterien in NETs durch die hier beschriebene DNA-Aggregation. Dies schützt *S. aureus* vor der Inkludierung in Mikrothrombi und der Degradation in der Leber und trägt zum Erhalt von Infektionen bei. Ein weiterer Angriffspunkt von Eap zur Inhibition der NETose könnte auch in diesem Zusammenhang die MAP-Kinase-Kaskade sein, da deren Aktivierung für die Ausbildung von NETs essentiell ist (Hakkim *et al.*, 2011). Inwiefern Eap die MAPKK von Neutrophilen beeinflusst, muss in weiterführenden Studien aufgeklärt werden.

### **5.5 Eap ein proliferations- und migrationshemmendes Agens als potentielles Krebstherapeutikum**

Bereits in vorangegangenen Studien rückte Eap aufgrund seiner anti-proliferativen und anti-migrativen Eigenschaften als mögliches Cancerostatikum in der Fokus des wissenschaftlichen Interesses (Schneider *et al.*, 2007). So bildeten sich im Mausmodell unter Eap-Gabe signifikant weniger Knochenmetastasen durch streuende Brustkrebszellen als in der Kontrollgruppe. Zudem blieben die Metastasen kleiner und verursachten weniger ausgeprägte Knochenläsionen. Die Ursache dieser Effekte wurde darin begründet, dass Eap an das Osteopontin (OPN) der Knochenmatrix bindet und so die Interaktion mit den auf der Oberfläche der Krebszellen präsentierten Integrinen unterbindet. Dadurch wird die Migration der Zellen über die EZM inhibiert (Schneider *et al.*, 2007). Da die Interaktion von OPN und Integrinen zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden führt, die dann Tumorzellen vor Apoptose schützen und gleichzeitig die Proliferation anregen (Das *et al.*, 2004; Rangaswami *et al.*, 2006), könnte Eap auch hier einen negativen Einfluss auf das Tumorwachstum und die Metastasierung zeigen.

Trotz dieser vielversprechenden Vorarbeit wurde jedoch noch nie ein direkter Effekt von Eap auf Tumorzellen untersucht. Die bereits beschriebenen anti-proliferativen und anti-migrativen Eigenschaften machen Eap jedoch zu einem potentiellen Agens zur Adressierung von Krebszellen, auch vor anderem Hintergrund als dem bereits publizierten (Schneider *et al.*, 2007). Als erstes Organ-System wurde dafür die Blase gewählt, da diese ein offen zugängliches Organ darstellt. Dies ist für eine spätere Anwendbarkeit von Bedeutung, da die Gabe von Eap als Therapeutikum so direkt und nicht intravenös erfolgen könnte. Zudem sind in der gesunden Blase die Zellen der Blasenwand als Schutz vor der schädigenden Wirkung der im Urin enthaltenen Harnsäure, von der sog. der Blasenmucosa, einer Schicht aus sezernierten Schleimstoffen, bedeckt. Die Zellen von Blasentumoren besitzen jedoch keine derartige Schutzschicht, sodass Eap nur auf diese direkten Einfluss hätte. Gesunde Blasenwandzellen würden hingegen nicht durch die Eap-Effekte beeinflusst werden.

Für die im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen wurden die Blasenkarzinomzelllinien RT-112 und 5637 verwendet. Es konnte mittels BrdU- und MTT-Assays gezeigt werden, dass Eap sowohl die Proliferation als den Metabolismus beider Zelllinien signifikant beeinträchtigt (siehe 4.5.1). Dies erfolgt jedoch, ebenso wie bei Keratinozyten und Endothelzellen ohne einen deutlichen chemotoxischen Effekt. Im Versuch erhöhte sich bei der Zelllinie RT-112 lediglich die späte Apoptose um 7,71% (Kontrolle:  $9,73 \pm 3,32\%$ ; Eap<sup>40</sup>:  $17,44 \pm 4,89\%$ ), bei 5637 die Nekrose um 1,44% (Kontrolle:  $0,58 \pm 0,25\%$ ; Eap<sup>40</sup>:  $2,02 \pm 0,73\%$ ) (siehe 4.5.2). Im Oris-Migrationsassay zeigen beide Krebszelllinien Migrationsbeeinträchtigungen (siehe 4.5.3). Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig und wird ab 20 µg/ml signifikant, wobei sich jedoch bereits ab 5 µg/ml eine Tendenz erkennen lässt. Um zu überprüfen, ob auch hier morphologische Veränderungen zugrunde liegen wurden von den RT-112 Zellen AFM-Messungen durchgeführt (siehe 4.5.4). Es ergaben sich ähnliche Effekte in Bezug auf eine durch Eap hochsignifikant abnehmende Höhe, Steifigkeit und Volumen der Zellen. Im Gegensatz zu den Keratinozyten nahm jedoch auch die vom Zellkörper bedeckte Fläche signifikant ab. Um sich der *in vivo* Situation anzunähern, wurden des Weiteren die Ausbildung und das Wachstum von Sphäroiden, als einfaches 3D-Tumormodell, unter Eap-Einfluss untersucht (siehe 4.5.5). Es ergab sich bei beiden Zelllinien ein signifikanter Effekt, wobei dieser für RT-112 deutlich drastischer ausfiel und bereits ab einer Konzentration von 20 µg/ml hochsignifikant wurde. Bei einer Konzentration von 40 µg/ml waren die Sphäroide an Tag vier weniger als halb so groß, verglichen mit den unbehandelten Sphäroiden. Abschließend wurde überprüft, ob auch in den untersuchten Karzinomzellen die Signaltransduktion über die Map-Kinase-Kaskade durch Eap beeinträchtigt wird, wie es zuvor bereits für Endothelzellen und Keratinozyten beschrieben wurde (Sobke *et al.*, 2006; Eisenbeis *et al.*, 2017). Dies würde einen Teil der beobachteten

Effekte auf Proliferation und Migration begründen. Es konnte hier detektiert werden, dass die Phosphorylierung von Erk nach Induktion der gehungerten Zellen mit FKS unter Eap-Einfluss bei RT-112 signifikant inhibiert wird (siehe 4.5.6). Dieser Effekt wird hier bereits bei einer Eap-Konzentration von 10 µg/ml hochsignifikant. Interessanterweise ist in dieser Zelllinie nur ein geringer Einfluss durch die Induktion mit FKS auf die gehungerten Zellen zu beobachten. Dies spricht dafür, dass diese Zelllinie eine Mutation innerhalb der Signalkaskade der MAPKK besitzt und diese konstitutiv, auch ohne äußere Induktion aktiv ist. Das Eap in der Lage ist, die ERK-Phosphorylierung in dieser Zelllinie um fast 50% zu reduzieren, ist ein zusätzliches, deutliches Indiz für die Interaktion mit dieser Signalkaskade. Im Fall der Zelllinie 5637 wurde der Eap-Effekt auf die Erk-Phosphorylierung nicht signifikant. Jedoch ist eine dahingehende Tendenz erkennbar.

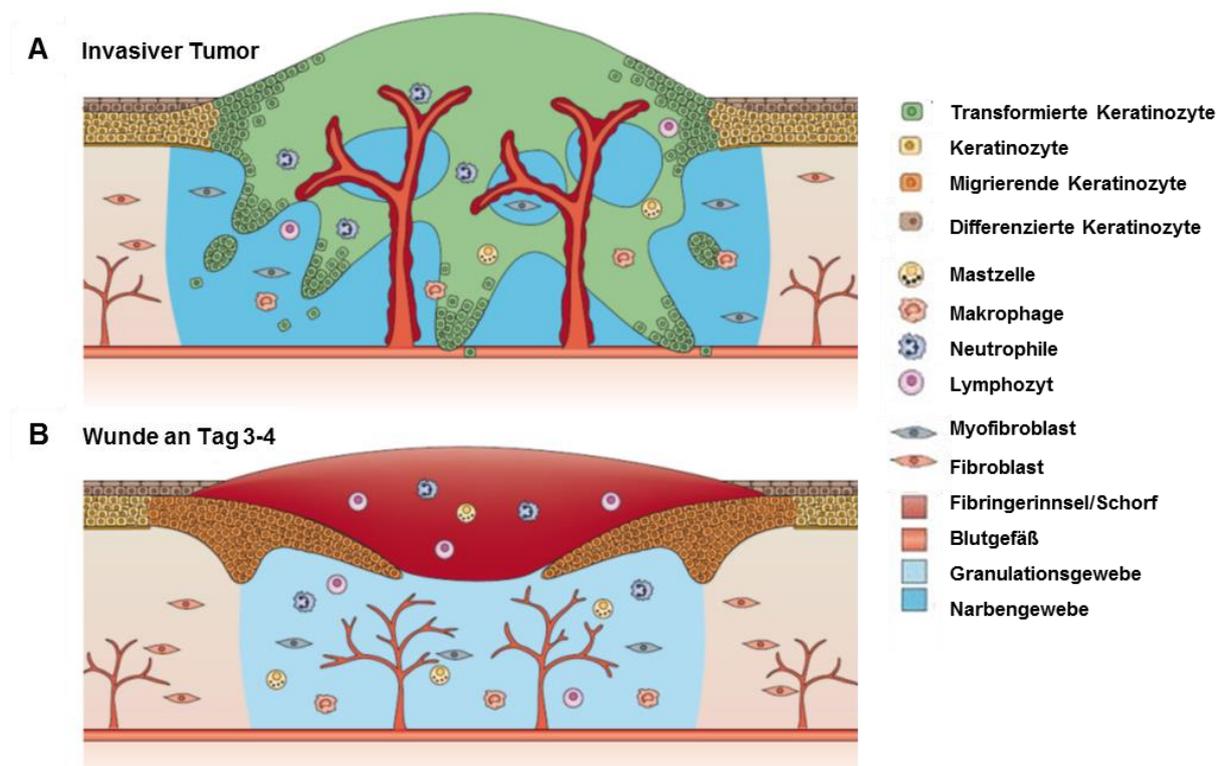
Insgesamt deuten diese Erkenntnisse darauf hin, dass es sich bei Eap um einen *in vitro* potenten Hemmstoff der Proliferation und Migration der untersuchten Blasenkarzinomzelllinien RT-112 und 5637 handelt. Wie sich die Wirkungsweise *in vivo* darstellt, muss in weiterführenden Studien (z.B. Mausmodell) untersucht werden. Bereits 1972 wurde die Entstehung von Tumoren von Sir Alexander Haddow als „mögliches Überheilen“ beschrieben (rezensiert in (Schafer & Werner, 2008)). Seither wurde die These von Tumoren als „überheilende Wunden“ in zahlreichen zellulären und molekularen Studien verifiziert. Es wird beschrieben, dass der wachsende Tumor die Phasen aller Wundheilungsstadien durchläuft, jedoch in einer exaltierten und verlängerten Form. Aufgrund der bereits gewonnenen Erkenntnisse zur Rolle von Eap in chronischen Wunden (Chavakis *et al.*, 2002; Haggart *et al.*, 2005; Athanasopoulos *et al.*, 2006; Eisenbeis *et al.*, 2017) ist jedoch die Hypothese zu stellen, dass Eap multifunktional auf das Auswachsen von Tumoren einwirkt. Die dramatischste und augenscheinlichste Parallele zwischen Wundschluss und Karzinogenese zeigt sich zur Differenzierungsphase der Wundheilung. In dieser Phase hyperprolifrieren die Keratinozyten des Wundrandes und wandern in den Wundbereich ein um die Re-Epithelisierung zu erreichen. In Tumoren kommt es zu einem irreversiblen Verlust der Differenzierungsfähigkeit und der Proliferationskontrolle der Zellen (siehe Abb. 5.4) (rezensiert in (Schafer & Werner, 2008)). Dies wurde hier mittels epidermaler Tumore beschrieben, trifft jedoch in ähnlicher Form auf zahlreiche weitere Krebsarten zu. Die Überproliferation wird in vielen Tumoren durch eine andauernde Überaktivierung der MAP-Kinase-Kaskade verursacht. Der Ras/BRAF/MEK/Erk-Signalweg gilt bei etwa 30% aller Tumorarten als mutiert (Garnett & Marais, 2004). Im Fall von Blasen Tumoren erfolgt die Modulation auf Höhe des Ras (Dhillon *et al.*, 2007; Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011). Durch die erfolgende, fehlregulierte Erk-Aktivierung wird neben der Proliferation auch die Migration, das Überleben und die Invasion von Einzelzellen, sowie Metastasen begünstigt. Eap könnte

hier aufgrund seiner proliferations- und migrationshemmenden Eigenschaften der Karzinogenese entgegenwirken, wobei ein Teil des Effekts auf die Inhibition der Map-Signaltransduktion zurückzuführen wäre, mit der es vermutlich auf Höhe des Ras interagiert (Sobke *et al.*, 2006).

Genauso wie in heilenden Wunden spielt eine Fibrinmatrix auch in der Reifung von Tumoren eine Rolle. Diese Matrix bildet das Gerüst für die proliferierenden und migrierenden Zellen (rezensiert in (Schafer & Werner, 2008)). Durch die Interaktion mit der Matrix könnte Eap Bindungsstellen migrierender Zellen maskieren und so den Aufbau der Tumorstruktur behindern.

Ein bedeutender Schritt in der Tumorgenese - ebenso wie der Wundheilung - ist die Neovaskularisierung des Gewebes. Wachsende Tumore zeigen aufgrund ihrer hohen Proliferationsrate einen gesteigerten Nährstoffbedarf. Dies macht die Ausbildung neuer Blutgefäße in auswachsenden Tumoren ab einer Größe von 2 mm im Durchmesser essentiell. Dieser Vorgang steht unter der Kontrolle von VEGFs (engl. „Vascular endothelial growth factors“) (Carmeliet, 2003). Es konnte bereits im Mausmodell gezeigt werden, dass Eap die Ausbildung neuer Gefäßstrukturen und das Einwandern von Endothelzellen in ein VEGF getränktes Matrigel inhibieren kann (Athanasopoulos *et al.*, 2006). Ähnliche Effekte sind auch für auswachsende Tumor-assoziierte Blutgefäße zu erwarten.

Im Wundheilungsvorgang ermöglichen zu Myofibroblasten differenzierte Fibroblasten den Schluß der Wunde, dadurch dass sie durch kontraktile Vorgänge die Wundränder näher zusammen führen. In auswachsenden Tumoren liegt eine große Anzahl von Fibroblasten und Myofibroblasten vor, welche die Ausbildung einer Bindegewebsstruktur einleiten. Diese stellt eine bedeutende Komponente des Tumor-Stromas dar (rezensiert in (Schafer & Werner, 2008)). Da Eap einen proliferationshemmenden Effekt auf die Fibroblastenzelllinie BJ zeigt, könnte so auch die Bildung eines reifen Tumor-Stromas beeinflusst sein. Inwieweit auch die Morphologie und Kontraktilität von Fibroblasten durch Eap beeinflusst wird, muss in weiteren Untersuchungen adressiert werden.



**Abb. 5.4: Zelluläre Parallelen zwischen einem Tumor und einer Wunde der Haut. Schematische Darstellung eines epithelialen Tumors A) und einer Wunde der Haut in der Phase der Gewebsneubildung 3-10 Tage nach Verwundung B). Zu bemerken ist, dass beide Arten von Gewebe durch das Vorhandensein eines Fibringerinnsels, Immunzellen (Neutrophile, Makrophagen, Mastzellen und Lymphozyten), neu gebildete Blutgefäße und eine große Anzahl von Fibroblasten und Myofibroblasten gekennzeichnet sind. Dies sind Komponenten des Granulationsgewebes von Wunden und ähneln sehr stark dem Stroma von Tumoren. Zusätzlich kommen migrierende und proliferierende Keratinozyten sowohl in Wunden, als auch in Tumoren vor. Der Hauptunterschied zwischen Tumoren und Wunden besteht im invasiven Wachstum der transformierten Keratinozyten, welche den Tumor ausfüllen (verändert nach Schäfer & Werner, 2008).**

Auch die in dieser Arbeit beschriebenen immunmodulatorischen Eigenschaften von Eap tragen zu einer möglichen krebshemmenden Wirksamkeit bei. Es wurde inzwischen in mehreren Studien beschrieben, dass die Bildung von NETs nach einer operativen Tumorsektion die Wahrscheinlichkeit der Metastasierung zirkulierender Tumorzellen um ein Vielfaches erhöht (Tohme *et al.*, 2016). Neutrophile werden in der Folge von chirurgischem Stress aktiviert und bilden eine Verbindung zwischen der folgenden Entzündungsreaktion und einer Krebsprogression. Dies beruht offenbar zum einen auf der Ausbildung von NETs. Diese scheinen flottierenden Tumorzellen einzufangen, zu komplexieren und an das Gewebe zu adhären, was ein Wiederaanwachsen des Tumors und die Bildung von Metastasen zur Folge hat. Des Weiteren werden bei der NET-Bildung Botenstoffe wie HMGB1 (engl. "High-Mobility-Group-Protein B1") frei, welche über den TLR9 (engl. "Toll-like receptor 9") auf der Tumorzelloberfläche Signalkaskaden induzieren, welche zur Förderung der Adhäsion, Proliferation, Migration und Invasion der Tumorzellen beitragen

(Tohme *et al.*, 2016). Metastasierende Tumore fördern dies über einen positiven "feed-back loop" selbst, da die in ihnen vorherrschenden hypoxischen Bedingungen die NET-Bildung auslösen. Für Lebertumore konnte bereits gezeigt werden, dass im Mausmodell die nachfolgende Behandlung nach Tumorresektion mit NET-degradierenden Substanzen wie DNase, oder Peptidylarginin-Deaminase zu einem deutlichen Rückgang von Metastasen führt (Tohme *et al.*, 2016). Ähnliches konnte für Lungentumore gezeigt werden (Cools-Lartigue *et al.*, 2013). Dieser Vorgang des Einfangens und Komplexierens der zirkulierenden Tumorzellen wird offenbar  $\beta$ 1-Integrine auf der Oberfläche von Tumorzellen und Neutrophilen vermittelt. Vermutet wird eine indirekte Interaktion der  $\beta$ 1-Untereinheiten über ein bislang unbekanntes Brückenmolekül (Najmeh *et al.*, 2017). Integrine sind auf der Oberfläche vieler Tumorzellen überexprimiert und vermitteln auch deren Adhäsion an die EZM (Mierke *et al.*, 2011; Mierke, 2013). Die Aktivierung der Integrine als Oberflächenrezeptoren vermittelt außerdem eine verstärkte zelluläre Steifigkeit und zytoskelettale Remodelierungsdynamik. Dies ermöglicht es Zellen, die nötigen kontraktile Kräfte zu erzeugen, die nötig sind, um die EZM zu überwinden und in Gewebe einzudringen (Mierke *et al.*, 2011; Mierke, 2013). Eap könnte hier zum einen eine Rolle spielen, in dem es die Bildung der NETs durch DNA-Kondensation verhindert. Zudem erfolgt ein Teil der durch TLR9 aktivierten Signaltransduktion über die MAP-Kinase-Kaskade und auch hier könnte Eap einwirken und die Aktivierung der Tumorzellen vermindern. Da Eap in der Lage ist, an Integrine zu binden (Chavakis *et al.*, 2002), könnte es die Integrin-vermittelten Vorgänge durch Bindung und Maskierung von Adhäsionsstellen unterbinden. Die Interaktion der  $\beta$ 1-Integrine auf Tumorzellen und Neutrophilen würden so vereitelt und die flottierenden Zellen könnten nicht zu neuen, kleinen wiederanwachsenden Tumorherden zusammengefügt werden. Außerdem wäre die Adhäsion an die EZM und die Gewebeinvasion beeinträchtigt. Ein weiterer Oberflächenfaktor, für den eine Rolle in der Migration und Invasion von Tumorzellen beschrieben wurde, ist ICAM-1. Dieses interagiert mit Fibrinogen und vermittelt so die Adhäsion und Migration von Tumorzellen auf Endothelzellschichten (Roche *et al.*, 2003; Laurent *et al.*, 2014). Vor allem in hochinvasiven Tumoren scheinen ICAM-1 auf der Zelloberfläche überrepräsentiert zu sein. Da Eap direkt an ICAM-1 binden kann (Chavakis *et al.*, 2002) wäre dies ein weiterer Angriffspunkt, um die Adhäsion, Migration und Invasion von Tumorzellen zu adressieren. Schließlich konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass in vielen Tumoren eine Aktivierung der Komplementkaskade vorliegt. Die durch den Tumor selbst induzierte Entzündungsreaktion ist ein vielstudierter Part der Tumorprogression (rezensiert in (Afshar-Kharghan, 2017)). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Komplements auf verschiedene Weise daran beteiligt ist und auf verschiedenen Ebenen der Kaskade stattfindet. Und obwohl der genaue Signalweg, der in die Komplementaktivierung in Tumoren involviert ist noch unklar ist, scheint jede der Komplementkaskaden in malignen

Tumoren aktiv zu sein (Pio *et al.*, 2013). Um den Effekt zu verstärken, sind Serinproteasen auf der Oberfläche von Krebszellen offenbar in der Lage C5 zu schneiden und so C5a, ohne vorherige Komplementaktivierung, zu generieren. So führt z.B. die Aktivierung von C5aR zu einer antiapoptotischen Antwort von Zellen und die Bindung von C5a an C5aR induziert die Proliferation von endothelialen und Darmkrebs- Zelllinien (rezensiert in (Afshar-Kharghan, 2017)). Die Aktivierung von C3aR hingegen spielt eine bedeutende Rolle in der Direktion einer kollektiven Zellmigration, sowie der epithelial-mesenchymalen Transition. Beides bedeutende Mechanismen in Metastasen (rezensiert in (Afshar-Kharghan, 2017)). Die Akkumulation von Membranangriffkomplexen in der Zellmembran fördert schließlich die Proliferation und Differenzierung, inhibiert Apoptose und beschützt die Zelle gegen komplementvermittelte Lyse. In diesem Zusammenhang konnte z. B. gezeigt werden, dass C3-defiziente Mäuse gegen die chemisch induzierte Karzinogenese in mesenchymalen und epithelialen Geweben geschützt waren (Coussens *et al.*, 2013). Durch seine Komplementinhibitorischen Eigenschaften (Woehl *et al.*, 2014), könnte Eap also auch auf diesen wichtigen Teil der Komplementaktivierung in der Tumorgenese einen hemmenden Einfluss zeigen.

Inwiefern Eap alle diese möglichen Interaktionen *in vivo* eingeht und welche Auswirkungen dies auf die Tumorprogression und Metastasierung zeigt, kann in Zukunft im Mausmodell untersucht werden.

### 5. 6 Schlussfolgerung und Ausblick

In einem ersten Teilprojekt dieser Arbeit sollte im Rahmen einer Kooperation mit der AG Rooijackers (Utrecht, Niederlande) die Expression von *eap* und seiner Homologe *eapH1* und *eapH2*, mittels qPCR, näher charakterisiert werden. Über die Funktion der beiden Homologen Proteine EapH1 und EapH2 ist bislang lediglich bekannt, dass sie eine immunmodulatorische Wirkung durch die spezifische Hemmung von Serinproteasen ausüben. Offenbar schafft sich *S. aureus* mit den EAPs einen Schutz vor dem Abbau der eigenen Virulenzfaktoren gegen den Verdau durch Proteasen. Neuere Studien beschäftigen sich mit den molekularen Grundlagen der Interaktion von EAPs und den Proteasen. Ob ein inhibierender Effekt auf weitere Proteasen als den bisher beschriebenen besteht, muss in nachfolgenden Untersuchungen aufgeklärt werden. Ein relativ neues Projekt fasst die Eap-Homologe als Kandidaten zur Entwicklung eines Impfstoffs gegen *S. aureus* ins Auge. Auch hier ist weitere Forschungsarbeit nötig, um zu klären, ob sich die Homologe zur Entwicklung eines Impfstoffs eignen. Ob es sich bei den Eap-Homologen zudem um Modulatoren der

Eap-Adhäsion handelt, wie erste Erkenntnisse des IMMH andeuten, müssen weitere Versuchsreihen abschließend klären.

Eap ist ein wichtiger Bestandteil des Virulons von *S. aureus*, der auf verschiedene Weise zum Erhalt der Infektion und zur Ausbildung chronischer Wunden beiträgt. Initial vermittelt Eap die Adhäsion der Bakterien an eine Vielzahl von Wirtsstrukturen und trägt damit zur Etablierung einer Infektion bei (McGavin *et al.*, 1993; Palma *et al.*, 1999; Kreikemeyer *et al.*, 2002; Bur *et al.*, 2013). Die immunmodulatorischen Effekte welche das Einwandern von Immunzellen in den Wundbereich (Chavakis *et al.*, 2002; Haggar *et al.*, 2005; Athanasopoulos *et al.*, 2006) und die inhibierte Proliferation von T-Zellen und B-Zellen adressieren (Jahreis *et al.*, 1995; Chavakis *et al.*, 2005; Haggar *et al.*, 2005) führen zu einer geminerten Entfernung der Pathogene im infizierten Gewebe. Gleiches gilt für die Unterbindung der Komplementkaskade auf Höhe von C3 und der damit ausbleibenden Opsonierung der Keime und dem chemotaktischen Dirigieren von Immunzellen zum Entzündungsherd (Woehl *et al.*, 2014). Zusätzlich verursachen die Beeinflussung der Zytokinkanons im Wundbereich (Jahreis *et al.*, 2000; Scriba *et al.*, 2008), sowie der direkte Apoptose auslösenden Effekt auf T-Zellen (Lee *et al.*, 2002) eine Verschiebung der TH-Antwort von TH1 zu TH2. Dies hemmt wiederum auch die Ausschüttung antimikrobieller Peptide durch Keratinozyten und trägt zu einem chronischen Infektionsverlauf bei (Schitteck, 2011). Die Funktion von Eap als Invasin ermöglicht es *S. aureus* schließlich, intrazellulär zu persistieren und Rezidive auszulösen (Haggar *et al.*, 2003; Joost *et al.*, 2011; Bur *et al.*, 2013). Alle diese Erkenntnisse stehen in Einklang mit den in meiner Arbeit gewonnen Befunden, dass Eap durch Hemmung von Proliferation und Migration der an der Wundheilung beteiligten Zelltypen den Wundschluss vermindert und zu chronischem Erhalt von Infektionen beiträgt. Dies basiert vermutlich zum einen auf der Inhibition der MAPK und der daraus resultierenden verminderten Proliferation und Migration, sowie einer verfrühten Zelldifferenzierung (Sobke *et al.*, 2006; Eisenbeis *et al.*, 2017). Zum anderen jedoch auch auf den durch Eap verursachten morphologischen Veränderungen, wodurch die Zellpolarität und die Adhäsion an das Substrat beeinflusst und damit ebenso die Zellvermehrung und die Zell-Mobilität vermindert werden. Die genauen molekularen Grundlagen dieser morphologischen Effekte aufzuklären, ist die Grundlage einer nachfolgenden Studie im Rahmen dieses Projekts. Erste Indizien sprechen dafür, dass Zellen unter Eap-Einfluss ein verändertes Fokalkontaktmuster, sowie eine starke, über den gesamten Zellsaum verteilte Ausbildung von Filopodien zeigen (unpublizierte Daten Bahsu S., IMMH). Der resultierenden Effekt umfasst die verminderte Bereitstellung einer neuen EZM durch Fibroblasten, die gehemmte Neovaskularisation durch Endothelzellen (Athanasopoulos *et al.*, 2006; Eisenbeis *et al.*,

2017) und schließlich die ausbleibenden Re-Epithelialisation durch Kerationozyten (Eisenbeis *et al.*, 2017).

Die im Rahmen meiner Arbeit gewonnene Erkenntnis, dass Eap in der Lage ist, an DNA zu binden und diese zu akkumulieren, ist als eine völlig neue immunmodulatorische Eigenschaft von Eap zu sehen. Die daraus resultierende Degradation der NETs stellt in Kombination mit der Fähigkeit, die NSPs zu inhibieren, einen effektiven Schutz vor der Immobilisierung von *S. aureus* in Mikrothromben und den Abbau in der Leber dar (Eisenbeis *et al.*, 2018). Schließlich ist für Eap eine Rolle in der Bildung von Biofilmen unter Eisenmangelbedingungen, sowie in Anwesenheit von Serum beschrieben (Johnson *et al.*, 2008; Thomson, 2011) und die Fähigkeit an eDNA zu binden erscheint als eine essentielle Fähigkeit in der Komplexierung der Nukleinsäure-Protein-Matrix sich ausbildender Biofilmstrukturen (Zapotoczna *et al.*, 2016). Diese Biofilme stellen wiederum einen Immunevasionsmechanismus und eine Hauptkomponente chronischer Wundinfekte durch *S. aureus* dar (O'Gara, 2007; Percival & Cutting, 2009; Thomson, 2011; Percival *et al.*, 2012a; Percival *et al.*, 2015a; Percival *et al.*, 2015b). Die bereits erfolgten Translationsstudien aus tiefen, *S. aureus* infizierten Wunden (Joost *et al.*, 2009), sowie die in dieser Forschungsarbeit durchgeführten Expressionsstudien (Eisenbeis *et al.*, 2017) lassen darauf schließen, dass die für alle hier beschriebenen Eap-Effekte nötigen Konzentrationen *in vivo* zumindest in Bereichen mit geringer Mikrofluidik, wie sie in tiefen Wunden und Abszessen vorherrschen, erreicht werden können. Wie sich die Inhibition der NETose jedoch *in vivo* auswirkt und in welchem Ausmaß die Eap-DNA-Interaktion zum Aufbau Protein-basierter Biofilme beiträgt muss in nachfolgenden Studien überprüft werden. Denkbar wären auch von Eap abgeleitete Peptidomimetiks als Wirkstoff gegen die NETose in Betracht zu ziehen, die im Rahmen von überschießender Leukozyten-Aktivierung zu schweren Gewebeschäden führen kann. Dies steht im Einklang mit vorangegangenen Studien, die Eap aufgrund seiner immunmodulierenden Eigenschaften als einen Kandidaten zur Entwicklung einer Therapie für Autoimmunerkrankungen einstufen (Chavakis *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2006; Chavakis *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010; Stapels *et al.*, 2014; Woehl *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2015; Stapels *et al.*, 2016; Woehl *et al.*, 2017; Stapels *et al.*, 2018).

Die Funktion als proliferations- und migrationshemmendes Agens machen Eap zudem zu einem spannenden Kandidaten um bei Wachstum hypertropher Gewebe entgegenzuwirken. Die hier gewonnenen Erkenntnisse zu Blasenkarzinomzellen ermöglichen einen ersten Eindruck auf die zu erwartenden Effekte. Ähnliche Ergebnisse konnten innerhalb unserer Arbeitsgruppe auch für Hautkrebszellen erzielt werden (unpublizierte Daten Runge F., IMMh). Die Inhibition der MAPK-Kaskade, die hier für zwei Zelllinien gezeigt wurde, ist ein erster Hinweis für die molekularen Grundlagen der hemmenden Eigenschaften. Des

Weiteren scheinen auch bei Krebszellen, wie schon zuvor bei Keratinozyten beobachtet, morphologische Veränderungen durch Beeinflussung des Zytoskeletts stattzufinden. In wieweit alle diese Effekte *in vivo* zusammenwirken, muss in nachfolgenden Studien im Mausmodell geklärt werden. Hier könnte eine zusätzliche kanzerostatische Wirkung durch die Inhibition der NETose auftreten. Da Eap die Interaktion von Integrinen mit ihren Bindungspartnern maskieren kann (Chavakis *et al.*, 2002), könnte ein möglicher Einsatz in der Kombinationsgabe mit Medikamenten wie Mitomycin C bestehen, da so die Integrin vermittelte Chemotherapeutikaresistenz ausgesetzt werden könnte. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Eap die vermehrte Aufnahme von flüssigen und festen Substanzen aus dem Umgebungsmilieu induzieren kann ((Joost *et al.*, 2011); eigene, unpublizierte Daten). Es wäre daher ein additiver Effekt in Kombination mit etablierten, jedoch schwer zellgängigen Medikamenten - wie Mitomycin C - denkbar. Erste, vielversprechende Studien mit Eap gekoppelten Liposomen (Kooperation mit Menina S., HIPS) deuten darauf hin, dass die Entwicklung eines potenten Wirkstofftransportsystems möglich sein könnte.

## 6. Literatur

1. **Abassi, Y.A., Xi, B., Zhang, W., Ye, P., Kirstein, S.L., Gaylord, M.R., Feinstein, S.C., Wang, X., Xu, X.**, 2009. Kinetic cell-based morphological screening: prediction of mechanism of compound action and off-target effects. *Chemistry & biology* 16, 712-723.
2. **Adhikari, R.P., Novick, R.P.**, 2008. Regulatory organization of the staphylococcal *sae* locus. *Microbiology (Reading, England)* 154, 949-959.
3. **Afshar-Kharghan, V.**, 2017. The role of the complement system in cancer. *The Journal of clinical investigation* 127, 780-789.
4. **Agerer, F., Lux, S., Michel, A., Rohde, M., Ohlsen, K., Hauck, C.R.**, 2005. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalisation. *Journal of cell science* 118, 2189-2200.
5. **Agerer, F., Michel, A., Ohlsen, K., Hauck, C.R.**, 2003. Integrin-mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src family protein-tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry* 278, 42524-42531.
6. **Alberts, B.**, 2002. *Molecular biology of the cell*, Vol 4. Garland Science, New York.
7. **Allemand, J.F., Bensimon, D., Jullien, L., Bensimon, A., Croquette, V.**, 1997. pH-dependent specific binding and combing of DNA. *Biophysical journal* 73, 2064-2070.
8. **Allison, D.P., Mortensen, N.P., Sullivan, C.J., Doktycz, M.J.**, 2010. Atomic force microscopy of biological samples. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* 2, 618-634.
9. **Archer, G.L.**, 1998. *Staphylococcus aureus: a well-armed pathogen*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 26, 1179-1181.
10. **Athanasopoulos, A.N., Economopoulou, M., Orlova, V.V., Sobke, A., Schneider, D., Weber, H., Augustin, H.G., Eming, S.A., Schubert, U., Linn, T., Nawroth, P.P., Hussain, M., Hammes, H.P., Herrmann, M., Preissner, K.T., Chavakis, T.**, 2006. The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. *Blood* 107, 2720-2727.
11. **Bartkova, J., Gron, B., Dabelsteen, E., Bartek, J.**, 2003. Cell-cycle regulatory proteins in human wound healing. *Archives of oral biology* 48, 125-132.
12. **Baumgart, S., Holters, S., Ohlmann, C.H., Bohle, R., Stockle, M., Ostefeld, M.S., Dyrskjot, L., Junker, K., Heinzemann, J.**, 2017. Exosomes of invasive urothelial carcinoma cells are characterized by a specific miRNA expression signature. *Oncotarget* 8, 58278-58291.
13. **Bayer, A.S., Sullam, P.M., Ramos, M., Li, C., Cheung, A.L., Yeaman, M.R.**, 1995. *Staphylococcus aureus* induces platelet aggregation via a fibrinogen-dependent mechanism which is independent of principal platelet glycoprotein IIb/IIIa fibrinogen-binding domains. *Infection and immunity* 63, 3634-3641.
14. **Bennett, J., Scott, K.J.**, 1971. Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Analytical biochemistry* 43, 173-182.
15. **Berends, E.T., Horswill, A.R., Haste, N.M., Monestier, M., Nizet, V., von Kockritz-Blickwede, M.**, 2010. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *Journal of innate immunity* 2, 576-586.
16. **Bernas, T., Dobrucki, J.**, 2002. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry* 47, 236-242.
17. **Berquand, A.**, 2011. Quantitative Imaging of Living Biological Samples by PeakForce QNM Atomic Force Microscopy. Bruker Corporation Application Note AN135, 131-110.

18. **Bertling, A., Niemann, S., Hussain, M., Holbrook, L., Stanley, R.G., Brodde, M.F., Pohl, S., Schifferdecker, T., Roth, J., Jurk, K., Muller, A., Lahav, J., Peters, G., Heilmann, C., Gibbins, J.M., Kehrel, B.E.**, 2012. Staphylococcal extracellular adherence protein induces platelet activation by stimulation of thiol isomerases. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32, 1979-1990.
19. **Berube, B.J., Bubeck Wardenburg, J.**, 2013. Staphylococcus aureus alpha-toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins* 5, 1140-1166.
20. **Biegel, T.**, 2014. In vitro- und in vivo-Charakterisierung des extrazellulären Adhärenzproteins (Eap) und seiner Homologe in *Staphylococcus aureus*.
21. **Binsker, U., Palankar, R., Wesche, J., Kohler, T.P., Prucha, J., Burchhardt, G., Rohde, M., Schmidt, F., Broker, B.M., Mamat, U., Pane-Farre, J., Graf, A., Ebner, P., Greinacher, A., Hammerschmidt, S.**, 2018. Secreted Immunomodulatory Proteins of Staphylococcus aureus Activate Platelets and Induce Platelet Aggregation. *Thrombosis and haemostasis* 118, 745-757.
22. **Bischoff, M., Dunman, P., Kormanec, J., Macapagal, D., Murphy, E., Mounts, W., Berger-Bachi, B., Projan, S.**, 2004. Microarray-based analysis of the Staphylococcus aureus sigmaB regulon. *Journal of bacteriology* 186, 4085-4099.
23. **Bischoff, M., Entenza, J.M., Giachino, P.**, 2001. Influence of a functional sigB operon on the global regulators sar and agr in Staphylococcus aureus. *Journal of bacteriology* 183, 5171-5179.
24. **Bitschar, K., Wolz, C., Krismer, B., Peschel, A., Schittek, B.**, 2017. Keratinocytes as sensors and central players in the immune defense against Staphylococcus aureus in the skin. *Journal of dermatological science* 87, 215-220.
25. **Blaustein, M.P., Juhaszova, M., Golovina, V.A., Church, P.J., Stanley, E.F.**, 2002. Na/Ca exchanger and PMCA localization in neurons and astrocytes: functional implications. *Annals of the New York Academy of Sciences* 976, 356-366.
26. **Boden, M.K., Flock, J.I.**, 1992. Evidence for three different fibrinogen-binding proteins with unique properties from Staphylococcus aureus strain Newman. *Microbial pathogenesis* 12, 289-298.
27. **Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., Wright, W.E.**, 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science (New York, N.Y.)* 279, 349-352.
28. **Bohle, A., Bock, P.R.**, 2004. Intravesical bacille Calmette-Guerin versus mitomycin C in superficial bladder cancer: formal meta-analysis of comparative studies on tumor progression. *Urology* 63, 682-686; discussion 686-687.
29. **Boucher, H.W.**, 2010. Challenges in anti-infective development in the era of bad bugs, no drugs: a regulatory perspective using the example of bloodstream infection as an indication. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 50 Suppl 1, S4-9.
30. **Boucher, H.W., Corey, G.R.**, 2008. Epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 46 Suppl 5, S344-349.
31. **Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N.E.**, 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology* 106, 761-771.
32. **Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A.**, 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)* 303, 1532-1535.
33. **Bronner, S., Monteil, H., Prevost, G.**, 2004. Regulation of virulence determinants in Staphylococcus aureus: complexity and applications. *FEMS microbiology reviews* 28, 183-200.
34. **Bunikowski, R., Mielke, M.E., Skarabis, H., Worm, M., Anagnostopoulos, I., Kolde, G., Wahn, U., Renz, H.**, 2000. Evidence for a disease-promoting effect of Staphylococcus aureus-derived exotoxins in atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 105, 814-819.

35. **Bur, S., Preissner, K.T., Herrmann, M., Bischoff, M.**, 2013. The Staphylococcus aureus extracellular adherence protein promotes bacterial internalization by keratinocytes independent of fibronectin-binding proteins. *The Journal of investigative dermatology* 133, 2004-2012.
36. **Carmeliet, P.**, 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine* 9, 653-660.
37. **Cedergren, L., Andersson, R., Jansson, B., Uhlen, M., Nilsson, B.**, 1993. Mutational analysis of the interaction between staphylococcal protein A and human IgG1. *Protein engineering* 6, 441-448.
38. **Chan, P.F., Foster, S.J., Ingham, E., Clements, M.O.**, 1998. The Staphylococcus aureus alternative sigma factor sigmaB controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. *Journal of bacteriology* 180, 6082-6089.
39. **Chavakis, T., Hussain, M., Kanse, S.M., Peters, G., Bretzel, R.G., Flock, J.I., Herrmann, M., Preissner, K.T.**, 2002. Staphylococcus aureus extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nature medicine* 8, 687-693.
40. **Chavakis, T., Preissner, K.T., Herrmann, M.**, 2007. The anti-inflammatory activities of Staphylococcus aureus. *Trends in immunology* 28, 408-418.
41. **Chavakis, T., Wiechmann, K., Preissner, K.T., Herrmann, M.**, 2005. Staphylococcus aureus interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thrombosis and haemostasis* 94, 278-285.
42. **Chen, R.E., Thorner, J.**, 2007. Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta* 1773, 1311-1340.
43. **Cheng, A.G., Kim, H.K., Burts, M.L., Krausz, T., Schneewind, O., Missiakas, D.M.**, 2009. Genetic requirements for Staphylococcus aureus abscess formation and persistence in host tissues. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 3393-3404.
44. **Cheng, A.G., McAdow, M., Kim, H.K., Bae, T., Missiakas, D.M., Schneewind, O.**, 2010. Contribution of coagulases towards Staphylococcus aureus disease and protective immunity. *PLoS pathogens* 6, e1001036.
45. **Cheung, A.L., Bayer, A.S., Zhang, G., Gresham, H., Xiong, Y.Q.**, 2004. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in Staphylococcus aureus. *FEMS immunology and medical microbiology* 40, 1-9.
46. **Cheung, W.Y.**, 1980. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science (New York, N.Y.)* 207, 19-27.
47. **Clapham, D.E.**, 2007. Calcium signaling. *Cell* 131, 1047-1058.
48. **Clarke, S.R., Foster, S.J.**, 2006. Surface adhesins of Staphylococcus aureus. *Advances in microbial physiology* 51, 187-224.
49. **Conlon, B.P.**, 2014. Staphylococcus aureus chronic and relapsing infections: Evidence of a role for persister cells: An investigation of persister cells, their formation and their role in S. aureus disease. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 36, 991-996.
50. **Conlon, B.P., Rowe, S.E., Lewis, K.**, 2015. Persister cells in biofilm associated infections. *Advances in experimental medicine and biology* 831, 1-9.
51. **Cools-Lartigue, J., Spicer, J., McDonald, B., Gowing, S., Chow, S., Giannias, B., Bourdeau, F., Kubes, P., Ferri, L.**, 2013. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *The Journal of clinical investigation*.
52. **Cory, A.H., Owen, T.C., Barltrop, J.A., Cory, J.G.**, 1991. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer communications* 3, 207-212.
53. **Coussens, L.M., Zitvogel, L., Palucka, A.K.**, 2013. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science (New York, N.Y.)* 339, 286-291.

54. **Dang, L.H., Michalek, M.T., Takei, F., Benaceraff, B., Rock, K.L.**, 1990. Role of ICAM-1 in antigen presentation demonstrated by ICAM-1 defective mutants. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 144, 4082-4091.
55. **Das, R., Mahabeleshwar, G.H., Kundu, G.C.**, 2004. Osteopontin induces AP-1-mediated secretion of urokinase-type plasminogen activator through c-Src-dependent epidermal growth factor receptor transactivation in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 11051-11064.
56. **Date, S.V., Modrusan, Z., Lawrence, M., Morisaki, J.H., Toy, K., Shah, I.M., Kim, J., Park, S., Xu, M., Basuino, L., Chan, L., Zeitschel, D., Chambers, H.F., Tan, M.W., Brown, E.J., Diep, B.A., Hazenbos, W.L.**, 2014. Global gene expression of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 during human and mouse infection. *The Journal of infectious diseases* 209, 1542-1550.
57. **Davies, J.M.**, 1992. Occupational and environmental factors in bladder cancer. *Scientific Foundation of Urology*, 723-727.
58. **de Haas, C.J., Veldkamp, K.E., Peschel, A., Weerkamp, F., Van Wamel, W.J., Heezius, E.C., Poppelier, M.J., Van Kessel, K.P., van Strijp, J.A.**, 2004. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *The Journal of experimental medicine* 199, 687-695.
59. **Depke, M., Burian, M., Schafer, T., Broker, B.M., Ohlsen, K., Volker, U.**, 2012. The alternative sigma factor B modulates virulence gene expression in a murine *Staphylococcus aureus* infection model but does not influence kidney gene expression pattern of the host. *International journal of medical microbiology : IJMM* 302, 33-39.
60. **Deurenberg, R.H., Stobberingh, E.E.**, 2008. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 8, 747-763.
61. **Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., Kolch, W.**, 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279-3290.
62. **Di Meglio, P., Perera, G.K., Nestle, F.O.**, 2011. The multitasking organ: recent insights into skin immune function. *Immunity* 35, 857-869.
63. **Dingermann, T., Zündorf, I.**, 2013. Unser Immunsystem - Effiziente Arbeit im Verborgenen. *Deutsche ApothekerZeitung* 9.
64. **Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M.**, 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews* 13, 16-34, table of contents.
65. **Dufrene, Y.F.**, 2002. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *Journal of bacteriology* 184, 5205-5213.
66. **Dufrene, Y.F.**, 2015. Sticky microbes: forces in microbial cell adhesion. *Trends in microbiology* 23, 376-382.
67. **Dunman, P.M., Murphy, E., Haney, S., Palacios, D., Tucker-Kellogg, G., Wu, S., Brown, E.L., Zagursky, R.J., Shlaes, D., Projan, S.J.**, 2001. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the agr and/or sarA loci. *Journal of bacteriology* 183, 7341-7353.
68. **Duthie, E.S.**, 1952. Variation in the antigenic composition of staphylococcal coagulase. *Journal of general microbiology* 7, 320-326.
69. **Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H.D., Lang, H.**, 1974. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *European journal of biochemistry* 47, 91-97.
70. **Edgell, C.J., McDonald, C.C., Graham, J.B.**, 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 3734-3737.
71. **Edwards, A.M., Bowden, M.G., Brown, E.L., Laabei, M., Massey, R.C.**, 2012. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein triggers TNFalpha release, promoting attachment to endothelial cells via protein A. *PLoS one* 7, e43046.
72. **Eisenbeis, J., Peisker, H., Backes, C.S., Bur, S., Holters, S., Thewes, N., Greiner, M., Junker, C., Schwarz, E.C., Hoth, M., Junker, K., Preissner, K.T., Jacobs, K., Herrmann, M., Bischoff, M.**, 2017. The extracellular adherence protein (Eap) of

- Staphylococcus aureus acts as a proliferation and migration repressing factor that alters the cell morphology of keratinocytes. International journal of medical microbiology : IJMM 307, 116-125.
73. **Eisenbeis, J., Saffarzadeh, M., Peisker, H., Jung, P., Thewes, N., Preissner, K.T., Herrmann, M., Molle, V., Geisbrecht, B.V., Jacobs, K., Bischoff, M.,** 2018. The Staphylococcus aureus Extracellular Adherence Protein Eap Is a DNA Binding Protein Capable of Blocking Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 8, 235.
  74. **Elshina, E., Allen, E.R., Flaxman, A., van Diemen, P.M., Milicic, A., Rollier, C.S., Yamaguchi, Y., Wyllie, D.H.,** 2018. Vaccination with the Staphylococcus aureus secreted proteins EapH1 and EapH2 impacts both S. aureus carriage and invasive disease. *Vaccine*.
  75. **Etienne-Manneville, S.,** 2008. Polarity proteins in migration and invasion. *Oncogene* 27, 6970-6980.
  76. **Euzeby, J.,** 2010. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 60, 1009-1010.
  77. **Fazli, M., Bjarnsholt, T., Kirketerp-Moller, K., Jorgensen, B., Andersen, A.S., Krogfelt, K.A., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T.,** 2009. Nonrandom distribution of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus in chronic wounds. *Journal of clinical microbiology* 47, 4084-4089.
  78. **Felding-Habermann, B.,** 2003. Integrin adhesion receptors in tumor metastasis. *Clinical & experimental metastasis* 20, 203-213.
  79. **Felding-Habermann, B., O'Toole, T.E., Smith, J.W., Fransvea, E., Ruggeri, Z.M., Ginsberg, M.H., Hughes, P.E., Pampori, N., Shattil, S.J., Saven, A., Mueller, B.M.,** 2001. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 1853-1858.
  80. **Fitzgerald, J.R., Foster, T.J., Cox, D.,** 2006. The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nature reviews. Microbiology* 4, 445-457.
  81. **Flock, M., Flock, J.I.,** 2001. Rebinding of extracellular adherence protein Eap to Staphylococcus aureus can occur through a surface-bound neutral phosphatase. *Journal of bacteriology* 183, 3999-4003.
  82. **Foster, T.J.,** 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nature reviews. Microbiology* 3, 948-958.
  83. **Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K., Hook, M.,** 2014. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus. *Nature reviews. Microbiology* 12, 49-62.
  84. **Fowler, T., Wann, E.R., Joh, D., Johansson, S., Foster, T.J., Hook, M.,** 2000. Cellular invasion by Staphylococcus aureus involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *European journal of cell biology* 79, 672-679.
  85. **Froman, G., Switalski, L.M., Speziale, P., Hook, M.,** 1987. Isolation and characterization of a fibronectin receptor from Staphylococcus aureus. *The Journal of biological chemistry* 262, 6564-6571.
  86. **Garnett, M.J., Marais, R.,** 2004. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer cell* 6, 313-319.
  87. **Gawaz, M., Langer, H., May, A.E.,** 2005. Platelets in inflammation and atherogenesis. *The Journal of clinical investigation* 115, 3378-3384.
  88. **Geiger, T., Goerke, C., Mainiero, M., Kraus, D., Wolz, C.,** 2008. The virulence regulator Sae of Staphylococcus aureus: promoter activities and response to phagocytosis-related signals. *Journal of bacteriology* 190, 3419-3428.
  89. **Geisbrecht, B.V., Hamaoka, B.Y., Perman, B., Zemla, A., Leahy, D.J.,** 2005. The crystal structures of EAP domains from Staphylococcus aureus reveal an unexpected homology to bacterial superantigens. *The Journal of biological chemistry* 280, 17243-17250.

90. **Gjodsbol, K., Christensen, J.J., Karlsmark, T., Jorgensen, B., Klein, B.M., Krogfelt, K.A.**, 2006. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *International wound journal* 3, 225-231.
91. **Goldmann, O., Medina, E.**, 2018. Staphylococcus aureus strategies to evade the host acquired immune response. *International journal of medical microbiology : IJMM* 308, 625-630.
92. **Goscin, L.P., Byrnes, J.J.**, 1982. DNA polymerase delta: one polypeptide, two activities. *Biochemistry* 21, 2513-2518.
93. **Gouaux, E.**, 1997. Channel-forming toxins: tales of transformation. *Current opinion in structural biology* 7, 566-573.
94. **Greenhalgh, D.G.**, 1998. The role of apoptosis in wound healing. *The international journal of biochemistry & cell biology* 30, 1019-1030.
95. **Grimble, S.A., Magee, T.R., Galland, R.B.**, 2001. Methicillin resistant Staphylococcus aureus in patients undergoing major amputation. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 22, 215-218.
96. **Grundmeier, M., Hussain, M., Becker, P., Heilmann, C., Peters, G., Sinha, B.**, 2004. Truncation of fibronectin-binding proteins in Staphylococcus aureus strain Newman leads to deficient adherence and host cell invasion due to loss of the cell wall anchor function. *Infection and immunity* 72, 7155-7163.
97. **Guentzel, N.M.**, 1996. Chapter 26 Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, and Proteus, Vol 4. Univ of Texas Medical Branch, USA
98. **Gunaratnam, G.** 2016. Untersuchung von Rückbindungsmechanismen des extrazellulären Adhärenzproteins (Eap) an bakterielle Oberflächenstrukturen von *Staphylococcus aureus*.
99. **Gurjala, A.N., Geringer, M.R., Seth, A.K., Hong, S.J., Smeltzer, M.S., Galiano, R.D., Leung, K.P., Mustoe, T.A.**, 2011. Development of a novel, highly quantitative in vivo model for the study of biofilm-impaired cutaneous wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 19, 400-410.
100. **Guz, N., Dokukin, M., Kalaparthy, V., Sokolov, I.**, 2014. If cell mechanics can be described by elastic modulus: study of different models and probes used in indentation experiments. *Biophysical journal* 107, 564-575.
101. **Haas, P.J., de Haas, C.J., Kleibeuker, W., Poppelier, M.J., van Kessel, K.P., Kruijtzter, J.A., Liskamp, R.M., van Strijp, J.A.**, 2004. N-terminal residues of the chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus are essential for blocking formylated peptide receptor but not C5a receptor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 173, 5704-5711.
102. **Haggar, A., Ehrnfelt, C., Holgersson, J., Flock, J.I.**, 2004. The extracellular adherence protein from Staphylococcus aureus inhibits neutrophil binding to endothelial cells. *Infection and immunity* 72, 6164-6167.
103. **Haggar, A., Flock, J.I., Norrby-Teglund, A.**, 2010. Extracellular adherence protein (Eap) from Staphylococcus aureus does not function as a superantigen. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 16, 1155-1158.
104. **Haggar, A., Hussain, M., Lonnie, H., Herrmann, M., Norrby-Teglund, A., Flock, J.I.**, 2003. Extracellular adherence protein from Staphylococcus aureus enhances internalization into eukaryotic cells. *Infection and immunity* 71, 2310-2317.
105. **Haggar, A., Shannon, O., Norrby-Teglund, A., Flock, J.I.**, 2005. Dual effects of extracellular adherence protein from Staphylococcus aureus on peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of infectious diseases* 192, 210-217.
106. **Hakim, A., Fuchs, T.A., Martinez, N.E., Hess, S., Prinz, H., Zychlinsky, A., Waldmann, H.**, 2011. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nature chemical biology* 7, 75-77.
107. **Hammel, M., Nemecek, D., Keightley, J.A., Thomas, G.J., Jr., Geisbrecht, B.V.**, 2007a. The Staphylococcus aureus extracellular adherence protein (Eap) adopts an

- elongated but structured conformation in solution. *Protein science : a publication of the Protein Society* 16, 2605-2617.
108. **Hammel, M., Sfyroera, G., Ricklin, D., Magotti, P., Lambris, J.D., Geisbrecht, B.V.**, 2007b. A structural basis for complement inhibition by *Staphylococcus aureus*. *Nature immunology* 8, 430-437.
  109. **Hansen, U., Hussain, M., Villone, D., Herrmann, M., Robenek, H., Peters, G., Sinha, B., Bruckner, P.**, 2006. The anchorless adhesin Eap (extracellular adherence protein) from *Staphylococcus aureus* selectively recognizes extracellular matrix aggregates but binds promiscuously to monomeric matrix macromolecules. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 25, 252-260.
  110. **Harraghy, N., Hussain, M., Hagggar, A., Chavakis, T., Sinha, B., Herrmann, M., Flock, J.I.**, 2003. The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology (Reading, England)* 149, 2701-2707.
  111. **Harraghy, N., Kormanec, J., Wolz, C., Homerova, D., Goerke, C., Ohlsen, K., Qazi, S., Hill, P., Herrmann, M.**, 2005. sae is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp. *Microbiology (Reading, England)* 151, 1789-1800.
  112. **Hartwig, J.H.**, 1992. Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *The Journal of cell biology* 118, 1421-1442.
  113. **Hecker, M., Becher, D., Fuchs, S., Engelmann, S.**, 2010. A proteomic view of cell physiology and virulence of *Staphylococcus aureus*. *International journal of medical microbiology : IJMM* 300, 76-87.
  114. **Heilmann, C.**, 2011. Adhesion mechanisms of staphylococci. *Advances in experimental medicine and biology* 715, 105-123.
  115. **Heim, C.E., Vidlak, D., Scherr, T.D., Kozel, J.A., Holzapfel, M., Muirhead, D.E., Kielian, T.**, 2014. Myeloid-derived suppressor cells contribute to *Staphylococcus aureus* orthopedic biofilm infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192, 3778-3792.
  116. **Herczenik, E., Bouma, B., Korporaal, S.J., Strangi, R., Zeng, Q., Gros, P., Van Eck, M., Van Berkel, T.J., Gebbink, M.F., Akkerman, J.W.**, 2007. Activation of human platelets by misfolded proteins. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 1657-1665.
  117. **Herdendorf, T.J., Geisbrecht, B.V.**, 2018. Investigation of Human Neutrophil Elastase Inhibition by *Staphylococcus aureus* EapH1: The Key Role Played by Arginine 89. *Biochemistry*.
  118. **Herrera, A.I., Ploscaru, N.T.**, 2018. (1)H, (15)N, and (13)C resonance assignments of the third domain from the *S. aureus* innate immune evasion protein Eap. 12, 175-178.
  119. **Heu, C., Berquand, A., Elie-Caille, C., Nicod, L.**, 2012. Glyphosate-induced stiffening of HaCaT keratinocytes, a Peak Force Tapping study on living cells. *Journal of structural biology* 178, 1-7.
  120. **Hogg, N., Bates, P.A., Harvey, J.**, 1991. Structure and function of intercellular adhesion molecule-1. *Chemical immunology* 50, 98-115.
  121. **Holtfreter, S., Radcliff, F.J., Grumann, D., Read, H., Johnson, S., Monecke, S., Ritchie, S., Clow, F., Goerke, C., Broker, B.M., Fraser, J.D., Wiles, S.**, 2013. Characterization of a mouse-adapted *Staphylococcus aureus* strain. *PloS one* 8, e71142.
  122. **Horn, J., Stelzner, K., Rudel, T., Fraunholz, M.**, 2018. Inside job: *Staphylococcus aureus* host-pathogen interactions. *International journal of medical microbiology : IJMM* 308, 607-624.
  123. **Humphreys, H.**, 2012. *Staphylococcus aureus*: the enduring pathogen in surgery. *The surgeon : journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland* 10, 357-360.

124. **Hussain, M., Becker, K., von Eiff, C., Peters, G., Herrmann, M.**, 2001a. Analogs of Eap protein are conserved and prevalent in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 8, 1271-1276.
125. **Hussain, M., Becker, K., von Eiff, C., Schrenzel, J., Peters, G., Herrmann, M.**, 2001b. Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. *Journal of bacteriology* 183, 6778-6786.
126. **Hussain, M., Hagggar, A., Heilmann, C., Peters, G., Flock, J.I., Herrmann, M.**, 2002. Insertional inactivation of Eap in *Staphylococcus aureus* strain Newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts. *Infection and immunity* 70, 2933-2940.
127. **Hussain, M., Hagggar, A., Peters, G., Chhatwal, G.S., Herrmann, M., Flock, J.I., Sinha, B.**, 2008a. More than one tandem repeat domain of the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus* is required for aggregation, adherence, and host cell invasion but not for leukocyte activation. *Infection and immunity* 76, 5615-5623.
128. **Hussain, M., von Eiff, C., Sinha, B., Joost, I., Herrmann, M., Peters, G., Becker, K.**, 2008b. eap Gene as novel target for specific identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology* 46, 470-476.
129. **Ikegami, S., Taguchi, T., Ohashi, M., Oguro, M., Nagano, H., Mano, Y.**, 1978. Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase-alpha. *Nature* 275, 458-460.
130. **Irelan, J.T., Wu, M.J., Morgan, J., Ke, N., Xi, B., Wang, X., Xu, X., Abassi, Y.A.**, 2011. Rapid and quantitative assessment of cell quality, identity, and functionality for cell-based assays using real-time cellular analysis. *Journal of biomolecular screening* 16, 313-322.
131. **Iwanaga, S.**, 2007. Biochemical principle of Limulus test for detecting bacterial endotoxins. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* 83, 110-119.
132. **Jahreis, A., Beckheinrich, P., Haustein, U.F.**, 2000. Effects of two novel cationic staphylococcal proteins (NP-tase and p70) and enterotoxin B on IgE synthesis and interleukin-4 and interferon-gamma production in patients with atopic dermatitis. *The British journal of dermatology* 142, 680-687.
133. **Jahreis, A., Yousif, Y., Rump, J.A., Drager, R., Vogt, A., Peter, H.H., Schlesier, M.**, 1995. Two novel cationic staphylococcal proteins induce IL-2 secretion, proliferation and immunoglobulin synthesis in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of both healthy controls and patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clinical and experimental immunology* 100, 406-411.
134. **James, G.A., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, E., Secor, P., Sestrich, J., Costerton, J.W., Stewart, P.S.**, 2008. Biofilms in chronic wounds. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 16, 37-44.
135. **Jameson, K.L., Mazur, P.K., Zehnder, A.M., Zhang, J., Zarnegar, B., Sage, J., Khavari, P.A.**, 2013. IQGAP1 scaffold-kinase interaction blockade selectively targets RAS-MAP kinase-driven tumors. *Nature medicine* 19, 626-630.
136. **Jann, N.J., Schmalzer, M., Kristian, S.A., Radek, K.A., Gallo, R.L., Nizet, V., Peschel, A., Landmann, R.**, 2009. Neutrophil antimicrobial defense against *Staphylococcus aureus* is mediated by phagolysosomal but not extracellular trap-associated cathelicidin. *Journal of leukocyte biology* 86, 1159-1169.
137. **Jett, B.D., Gilmore, M.S.**, 2002. Internalization of *Staphylococcus aureus* by human corneal epithelial cells: role of bacterial fibronectin-binding protein and host cell factors. *Infection and immunity* 70, 4697-4700.
138. **Jevons, M.P., Coe, A.W., Parker, M.T.**, 1963. Methicillin resistance in staphylococci. *Lancet (London, England)* 1, 904-907.
139. **Jin, T., Bokarewa, M., Foster, T., Mitchell, J., Higgins, J., Tarkowski, A.**, 2004. *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a

- novel bacterial evasion mechanism. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 172, 1169-1176.
140. **Johnson, M., Cockayne, A., Morrissey, J.A.**, 2008. Iron-regulated biofilm formation in *Staphylococcus aureus* Newman requires *ica* and the secreted protein Emp. *Infection and immunity* 76, 1756-1765.
141. **Jonsson, K., McDevitt, D., McGavin, M.H., Patti, J.M., Hook, M.**, 1995. *Staphylococcus aureus* expresses a major histocompatibility complex class II analog. *The Journal of biological chemistry* 270, 21457-21460.
142. **Joost, I., Blass, D., Burian, M., Goerke, C., Wolz, C., von Muller, L., Becker, K., Preissner, K., Herrmann, M., Bischoff, M.**, 2009. Transcription analysis of the extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* in authentic human infection and in vitro. *The Journal of infectious diseases* 199, 1471-1478.
143. **Joost, I., Jacob, S., Utermohlen, O., Schubert, U., Patti, J.M., Ong, M.F., Gross, J., Justinger, C., Renno, J.H., Preissner, K.T., Bischoff, M., Herrmann, M.**, 2011. Antibody response to the extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* in healthy and infected individuals. *FEMS immunology and medical microbiology* 62, 23-31.
144. **Josse, J., Laurent, F., Diot, A.**, 2017. Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion: Fibronectin-Binding and Other Mechanisms. *Frontiers in microbiology* 8, 2433.
145. **Kaito, C., Hirano, T., Omae, Y., Sekimizu, K.**, 2011. Digestion of extracellular DNA is required for giant colony formation of *Staphylococcus aureus*. *Microbial pathogenesis* 51, 142-148.
146. **Kalmeijer, M.D., van Nieuwland-Bollen, E., Bogaers-Hofman, D., de Baere, G.A.**, 2000. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* is a major risk factor for surgical-site infections in orthopedic surgery. *Infection control and hospital epidemiology* 21, 319-323.
147. **Kamby, C.**, 1990. The pattern of metastases in human breast cancer: methodological aspects and influence of prognostic factors. *Cancer treatment reviews* 17, 37-61.
148. **Kawasaki, N.**, 2008. Einfluss verschiedener Nährmedien auf die Expression der Adhäsionsproteine Eap und Emp in *S. aureus*.
149. **Kim, N.H., Kang, Y.M., Han, W.D., Park, K.U., Park, K.H., Yoo, J.I., Lee, D.G., Park, C., Song, K.H., Kim, E.S., Park, S.W., Kim, N.J., Oh, M.D., Kim, H.B.**, 2016. Small-Colony Variants in Persistent and Recurrent *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)* 22, 538-544.
150. **Kirch, E.**, 2014. Die Bedeutung des Histidin-haltigen Phosphat-Träger-Proteins (HPr) für den Glucose-Import, den Kohlenstoffwechsel und die Biofilmbildung von *Staphylococcus aureus*.
151. **Köhler, W., Eggers., Fleischer., Marre., Pfister., Pulverer.**, 2001. *Medizinische Mikrobiologie*, Vol 8. Urban&Fischer.
152. **Kooistra-Smid, M., Nieuwenhuis, M., van Belkum, A., Verbrugh, H.**, 2009. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* burn wound colonization. *FEMS immunology and medical microbiology* 57, 1-13.
153. **Korkmaz, B., Horwitz, M.S., Jenne, D.E., Gauthier, F.**, 2010. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacological reviews* 62, 726-759.
154. **Kreikemeyer, B., McDevitt, D., Podbielski, A.**, 2002. The role of the map protein in *Staphylococcus aureus* matrix protein and eukaryotic cell adherence. *International journal of medical microbiology : IJMM* 292, 283-295.
155. **Krokan, H., Wist, E., Krokan, R.H.**, 1981. Aphidicolin inhibits DNA synthesis by DNA polymerase alpha and isolated nuclei by a similar mechanism. *Nucleic acids research* 9, 4709-4719.
156. **Kumar, H., Kawai, T., Akira, S.**, 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology* 30, 16-34.
157. **Kumar, P., Kretzschmar, B., Herold, S., Nau, R., Kreutzfeldt, M., Schutze, S., Bahr, M., Hein, K.**, 2015. Beneficial effect of chronic *Staphylococcus aureus* infection

- in a model of multiple sclerosis is mediated through the secretion of extracellular adherence protein. *Journal of neuroinflammation* 12, 22.
158. **Lachica, R.V., Genigeorgis, C., Hoeprich, P.D.**, 1971. Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Applied microbiology* 21, 585-587.
159. **Laemmli, U.K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
160. **Laurent, V.M., Duperray, A., Sundar Rajan, V., Verdier, C.**, 2014. Atomic force microscopy reveals a role for endothelial cell ICAM-1 expression in bladder cancer cell adherence. *PLoS one* 9, e98034.
161. **Le Clainche, C., Carlier, M.F.**, 2008. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiological reviews* 88, 489-513.
162. **Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M.**, 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and molecular research : GMR* 2, 63-76.
163. **Lee, L.Y., Hook, M., Haviland, D., Wetsel, R.A., Yonter, E.O., Syribeys, P., Vernachio, J., Brown, E.L.**, 2004a. Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. *The Journal of infectious diseases* 190, 571-579.
164. **Lee, L.Y., Liang, X., Hook, M., Brown, E.L.**, 2004b. Identification and characterization of the C3 binding domain of the *Staphylococcus aureus* extracellular fibrinogen-binding protein (Efb). *The Journal of biological chemistry* 279, 50710-50716.
165. **Lee, L.Y., Miyamoto, Y.J., McIntyre, B.W., Hook, M., McCrea, K.W., McDevitt, D., Brown, E.L.**, 2002. The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. *The Journal of clinical investigation* 110, 1461-1471.
166. **Lessel, M., Bäumchen, O., Klos, M., Hähl, H., Fetzer, R., Paulus, M., Seemann, R., Jacobs, K.**, 2015. Self-assembled silane monolayers: an efficient step-by-step recipe for high-quality, low energy surfaces. *Surf. Interface Anal.*, 47, 557–564.
167. **Li, J., Chen, J., Kirsner, R.**, 2007. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in dermatology* 25, 9-18.
168. **Li, J.S., Sexton, D.J., Mick, N., Nettles, R., Fowler, V.G., Jr., Ryan, T., Bashore, T., Corey, G.R.**, 2000. Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 30, 633-638.
169. **Limame, R., Wouters, A., Pauwels, B., Franssen, E., Peeters, M., Lardon, F., De Wever, O., Pauwels, P.**, 2012. Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PLoS one* 7, e46536.
170. **Liu, C., Bayer, A., Cosgrove, S.E., Daum, R.S., Fridkin, S.K., Gorwitz, R.J., Kaplan, S.L., Karchmer, A.W., Levine, D.P., Murray, B.E., M, J.R., Talan, D.A., Chambers, H.F.**, 2011. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 52, e18-55.
171. **Liu, G.Y., Essex, A., Buchanan, J.T., Datta, V., Hoffman, H.M., Bastian, J.F., Fierer, J., Nizet, V.**, 2005. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *The Journal of experimental medicine* 202, 209-215.
172. **Lorentz, H., Longaker, M.** 2008. Wounds: Biology, pathology and management., In: Norton, J., Barie, P., Bollinger, R., Chang, A., Lowry, S., Mulvihill, S., et al. (Eds.) *Surgery: Basic science and clinical evidence*. SpringerLink, New York, pp. 191–208.
173. **Lowy, F.D.**, 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *The New England journal of medicine* 339, 520-532.
174. **Lowy, F.D.**, 2000. Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? *Trends in microbiology* 8, 341-343.

175. **Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., Elliott, H., Pertz, O., Nalbant, P., Abell, A., Johnson, G.L., Hahn, K.M., Danuser, G.,** 2009. Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* 461, 99-103.
176. **Mack, D., Becker, P., Chatterjee, I., Dobinsky, S., Knobloch, J.K., Peters, G., Rohde, H., Herrmann, M.,** 2004. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *International journal of medical microbiology : IJMM* 294, 203-212.
177. **Madsen, S.M., Westh, H., Danielsen, L., Rosdahl, V.T.,** 1996. Bacterial colonization and healing of venous leg ulcers. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 104, 895-899.
178. **Maechler, F., Geffers, C., Schwab, F., Pena Diaz, L.A., Behnke, M., Gastmeier, P.,** 2017. [Development of antimicrobial resistance in Germany : What is the current situation?]. *Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin* 112, 186-191.
179. **Mahrle, G., Schulze, H.J., Krieg, T.,** 1994. Wundheilung — Wundverschluss: Theorie und Praxis, chirurgische und konservative Maßnahmen. Springer Berlin Heidelberg.
180. **Mann, E.E., Rice, K.C., Boles, B.R., Endres, J.L., Ranjit, D., Chandramohan, L., Tsang, L.H., Smeltzer, M.S., Horswill, A.R., Bayles, K.W.,** 2009. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS one* 4, e5822.
181. **Marraffini, L.A., Dedent, A.C., Schneewind, O.,** 2006. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 70, 192-221.
182. **Martin, B.R., Giepmans, B.N., Adams, S.R., Tsien, R.Y.,** 2005. Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity. *Nature biotechnology* 23, 1308-1314.
183. **Martin, P.,** 1997. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science (New York, N.Y.)* 276, 75-81.
184. **Martin, P., Leibovich, S.J.,** 2005. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends in cell biology* 15, 599-607.
185. **Matijasevic, D., Pantic, M., Raskovic, B., Pavlovic, V., Duvnjak, D., Sknepnek, A., Niksic, M.,** 2016. The Antibacterial Activity of *Coriolus versicolor* Methanol Extract and Its Effect on Ultrastructural Changes of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis. *Frontiers in microbiology* 7, 1226.
186. **Mazmanian, S.K., Liu, G., Ton-That, H., Schneewind, O.,** 1999. *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science (New York, N.Y.)* 285, 760-763.
187. **Mazmanian, S.K., Ton-That, H., Su, K., Schneewind, O.,** 2002. An iron-regulated sortase anchors a class of surface protein during *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 2293-2298.
188. **McGavin, M.H., Krajewska-Pietrasik, D., Ryden, C., Hook, M.,** 1993. Identification of a *Staphylococcus aureus* extracellular matrix-binding protein with broad specificity. *Infection and immunity* 61, 2479-2485.
189. **McLoughlin, R.M., Solinga, R.M., Rich, J., Zaleski, K.J., Cocchiari, J.L., Risley, A., Tzianabos, A.O., Lee, J.C.,** 2006. CD4+ T cells and CXC chemokines modulate the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* wound infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 10408-10413.
190. **McVicker, G., Prajsnar, T.K., Williams, A., Wagner, N.L., Boots, M., Renshaw, S.A., Foster, S.J.,** 2014. Clonal expansion during *Staphylococcus aureus* infection dynamics reveals the effect of antibiotic intervention. *PLoS pathogens* 10, e1003959.
191. **Menestrina, G., Dalla Serra, M., Comai, M., Coraiola, M., Viero, G., Werner, S., Colin, D.A., Monteil, H., Prevost, G.,** 2003. Ion channels and bacterial infection: the case of beta-barrel pore-forming protein toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEBS letters* 552, 54-60.

192. **Mierke, C.T.**, 2013. Phagocytized beads reduce the alpha5beta1 integrin facilitated invasiveness of cancer cells by regulating cellular stiffness. *Cell biochemistry and biophysics* 66, 599-622.
193. **Mierke, C.T., Frey, B., Fellner, M., Herrmann, M., Fabry, B.**, 2011. Integrin alpha5beta1 facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces. *Journal of cell science* 124, 369-383.
194. **Miller, L.S., Modlin, R.L.**, 2007. Human keratinocyte Toll-like receptors promote distinct immune responses. *The Journal of investigative dermatology* 127, 262-263.
195. **Minhas, T., Ludlam, H.A., Wilks, M., Tabaqchali, S.**, 1995. Detection by PCR and analysis of the distribution of a fibronectin-binding protein gene (fbn) among staphylococcal isolates. *Journal of medical microbiology* 42, 96-101.
196. **Moet, G.J., Jones, R.N., Biedenbach, D.J., Stilwell, M.G., Fritsche, T.R.**, 2007. Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2004). *Diagnostic microbiology and infectious disease* 57, 7-13.
197. **Mongodin, E., Bajolet, O., Cutrona, J., Bonnet, N., Dupuit, F., Puchelle, E., de Bentzmann, S.**, 2002. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium. *Infection and immunity* 70, 620-630.
198. **Monteiro, J.M., Fernandes, P.B., Vaz, F., Pereira, A.R., Tavares, A.C., Ferreira, M.T.**, 2015. Cell shape dynamics during the staphylococcal cell cycle. *6*, 8055.
199. **Montgomery, C.P., Boyle-Vavra, S., Adem, P.V., Lee, J.C., Husain, A.N., Clasen, J., Daum, R.S.**, 2008. Comparison of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pulsotypes USA300 and USA400 in a rat model of pneumonia. *The Journal of infectious diseases* 198, 561-570.
200. **Mosmann, T.**, 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65, 55-63.
201. **Mosser, D.M., Edwards, J.P.**, 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology* 8, 958-969.
202. **Najmeh, S., Cools-Lartigue, J., Rayes, R.F.**, 2017. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells via beta1-integrin mediated interactions. *140*, 2321-2330.
203. **Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.Z., Nickoloff, B.J.**, 2009. Skin immune sentinels in health and disease. *Nature reviews. Immunology* 9, 679-691.
204. **Nguyen, T., Ghebrehiwet, B., Peerschke, E.I.**, 2000. *Staphylococcus aureus* protein A recognizes platelet gC1qR/p33: a novel mechanism for staphylococcal interactions with platelets. *Infection and immunity* 68, 2061-2068.
205. **Nieswandt, B., Varga-Szabo, D., Elvers, M.**, 2009. Integrins in platelet activation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 7 Suppl 1, 206-209.
206. **Nissinen, L., Kahari, V.M.**, 2014. Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochimica et biophysica acta* 1840, 2571-2580.
207. **Novick, R.P.**, 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular microbiology* 48, 1429-1449.
208. **Novick, R.P., Jiang, D.**, 2003. The staphylococcal saeRS system coordinates environmental signals with agr quorum sensing. *Microbiology (Reading, England)* 149, 2709-2717.
209. **O'Brien, L., Kerrigan, S.W., Kaw, G., Hogan, M., Penades, J., Litt, D., Fitzgerald, D.J., Foster, T.J., Cox, D.**, 2002. Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. *Molecular microbiology* 44, 1033-1044.
210. **O'Gara, J.P.**, 2007. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters* 270, 179-188.

211. **O'Gara, J.P.**, 2017. Into the storm: Chasing the opportunistic pathogen *Staphylococcus aureus* from skin colonisation to life-threatening infections. *Environmental microbiology* 19, 3823-3833.
212. **O'Riordan, K., Lee, J.C.**, 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clinical microbiology reviews* 17, 218-234.
213. **Oliver, W.C., Pharr, G.M.**, 1992. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J. Mater. Res.*, 7 (1992), 1564-1583.
214. **Olson, M.E.**, 2016. Bacteriophage Transduction in *Staphylococcus aureus*. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1373, 69-74.
215. **Olson, M.E., Nygaard, T.K., Ackermann, L., Watkins, R.L., Zurek, O.W., Pallister, K.B., Griffith, S., Kiedrowski, M.R., Flack, C.E., Kavanaugh, J.S., Kreiswirth, B.N., Horswill, A.R., Voyich, J.M.**, 2013. *Staphylococcus aureus* nuclease is an SaeRS-dependent virulence factor. *Infection and immunity* 81, 1316-1324.
216. **Ortega, E., Abriouel, H., Lucas, R., Galvez, A.**, 2010. Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. *Toxins* 2, 2117-2131.
217. **Otto, M.**, 2013. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual review of medicine* 64, 175-188.
218. **Palankar, R., Binsker, U., Haracska, B., Wesche, J., Greinacher, A., Hammerschmidt, S.**, 2018. Interaction between the *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein Eap and its subdomains with platelets. *International journal of medical microbiology : IJMM* 308, 683-691.
219. **Palazzolo-Ballance, A.M., Reniere, M.L., Braughton, K.R., Sturdevant, D.E., Otto, M., Kreiswirth, B.N., Skaar, E.P., DeLeo, F.R.**, 2008. Neutrophil microbicides induce a pathogen survival response in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180, 500-509.
220. **Palma, M., Haggar, A., Flock, J.I.**, 1999. Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *Journal of bacteriology* 181, 2840-2845.
221. **Pan, C.W., Shen, Z.J., Wu, T.T., Tang, X.Y., Wang, M., Sun, J., Shao, Y.**, 2009. Cell adhesion to fibronectin induces mitomycin C resistance in bladder cancer cells. *BJU international* 104, 1774-1779.
222. **Pan, J.S., Slocum, H.K., Rustum, Y.M., Greco, W.R., Gaeta, J.F., Huben, R.P.**, 1989. Inhibition of implantation of murine bladder tumor by thiotepa in cauterized bladder. *The Journal of urology* 142, 1589-1593.
223. **Pane-Farre, J., Jonas, B., Forstner, K., Engelmann, S., Hecker, M.**, 2006. The sigmaB regulon in *Staphylococcus aureus* and its regulation. *International journal of medical microbiology : IJMM* 296, 237-258.
224. **Papayannopoulos, V., Zychlinsky, A.**, 2009. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends in immunology* 30, 513-521.
225. **Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P.**, 2001. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *International journal of cancer* 94, 153-156.
226. **Pasparakis, M., Haase, I., Nestle, F.O.**, 2014. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature reviews. Immunology* 14, 289-301.
227. **Patel, A.H., Nowlan, P., Weavers, E.D., Foster, T.**, 1987. Virulence of protein A-deficient and alpha-toxin-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele replacement. *Infection and immunity* 55, 3103-3110.
228. **Payne, D.E., Boles, B.R.**, 2016. Emerging interactions between matrix components during biofilm development. *Current genetics* 62, 137-141.
229. **Peacock, S.J., Day, N.P., Thomas, M.G., Berendt, A.R., Foster, T.J.**, 2000. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in *fnb* genes and adhesion to human fibronectin. *The Journal of infection* 41, 23-31.

230. **Peerschke, E.I., Bayer, A.S., Ghebrehiwet, B., Xiong, Y.Q.**, 2006. gC1qR/p33 blockade reduces *Staphylococcus aureus* colonization of target tissues in an animal model of infective endocarditis. *Infection and immunity* 74, 4418-4423.
231. **Percival, S.L., Cutting, K.F.**, 2009. Biofilms: possible strategies for suppression in chronic wounds. *Nursing standard (Royal College of Nursing (Great Britain) : 1987)* 23, 64, 66, 68 passim.
232. **Percival, S.L., Hill, K.E., Williams, D.W., Hooper, S.J., Thomas, D.W., Costerton, J.W.**, 2012a. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 20, 647-657.
233. **Percival, S.L., McCarty, S.M., Lipsky, B.**, 2015a. Biofilms and Wounds: An Overview of the Evidence. *Advances in wound care* 4, 373-381.
234. **Percival, S.L., Suleman, L., Vuotto, C., Donelli, G.**, 2015b. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *Journal of medical microbiology* 64, 323-334.
235. **Percival, S.L., Thomas, J., Linton, S., Okel, T., Corum, L., Slone, W.**, 2012b. The antimicrobial efficacy of silver on antibiotic-resistant bacteria isolated from burn wounds. *International wound journal* 9, 488-493.
236. **Percival, S.L., Vuotto, C., Donelli, G., Lipsky, B.A.**, 2015c. Biofilms and Wounds: An Identification Algorithm and Potential Treatment Options. *Advances in wound care* 4, 389-397.
237. **Pillet, F., Chopinet, L., Formosa, C., Dague, E.**, 2014. Atomic Force Microscopy and pharmacology: from microbiology to cancerology. *Biochimica et biophysica acta* 1840, 1028-1050.
238. **Pilsczek, F.H., Salina, D., Poon, K.K., Fahey, C., Yipp, B.G., Sibley, C.D., Robbins, S.M., Green, F.H., Surette, M.G., Sugai, M., Bowden, M.G., Hussain, M., Zhang, K., Kubes, P.**, 2010. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185, 7413-7425.
239. **Pio, R., Ajona, D., Lambris, J.D.**, 2013. Complement inhibition in cancer therapy. *Seminars in immunology* 25, 54-64.
240. **Plunkett, T.A., Smith, P., Rubens, R.D.**, 2000. Risk of complications from bone metastases in breast cancer. implications for management. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 36, 476-482.
241. **Postma, B., Poppelier, M.J., van Galen, J.C., Prossnitz, E.R., van Strijp, J.A., de Haas, C.J., van Kessel, K.P.**, 2004. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172, 6994-7001.
242. **Potthoff, E., Guillaume-Gentil, O., Ossola, D., Polesel-Maris, J., LeibundGut-Landmann, S., Zambelli, T., Vorholt, J.A.**, 2012. Rapid and serial quantification of adhesion forces of yeast and Mammalian cells. *PLoS one* 7, e52712.
243. **Proctor, R.A., van Langevelde, P., Kristjansson, M., Maslow, J.N., Arbeit, R.D.**, 1995. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 20, 95-102.
244. **Proctor, R.A., von Eiff, C., Kahl, B.C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M., Peters, G.**, 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nature reviews. Microbiology* 4, 295-305.
245. **Proft, T., Fraser, J.D.**, 2003. Bacterial superantigens. *Clinical and experimental immunology* 133, 299-306.
246. **Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., Bar-Sagi, D.**, 2011. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature reviews. Cancer* 11, 761-774.
247. **Qazi, S.N., Counil, E., Morrissey, J., Rees, C.E., Cockayne, A., Winzer, K., Chan, W.C., Williams, P., Hill, P.J.**, 2001. agr expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome. *Infection and immunity* 69, 7074-7082.

248. **Rajbhandari, R.** 2011. Studies on the role of the putative phosphorylation consensus sequence YXNX in the tandem repeat domains of the *Staphylococcus aureus* Mu50 Extracellular Adherence Protein (Eap).
249. **Rangaswami, H., Bulbule, A., Kundu, G.C.,** 2006. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. Trends in cell biology 16, 79-87.
250. **Regan, M.C., Kirk, S.J., Wasserkrug, H.L., Barbul, A.,** 1991. The wound environment as a regulator of fibroblast phenotype. The Journal of surgical research 50, 442-448.
251. **Regassa, L.B., Novick, R.P., Betley, M.J.,** 1992. Glucose and nonmaintained pH decrease expression of the accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. Infection and immunity 60, 3381-3388.
252. **Reinke, J.M., Sorg, H.,** 2012. Wound repair and regeneration. European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes 49, 35-43.
253. **Renart, J., Reiser, J., Stark, G.R.,** 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 76, 3116-3120.
254. **Rice, K., Huesca, M., Vaz, D., McGavin, M.J.,** 2001. Variance in fibronectin binding and fnb locus polymorphisms in *Staphylococcus aureus*: identification of antigenic variation in a fibronectin binding protein adhesin of the epidemic CMRSA-1 strain of methicillin-resistant *S. aureus*. Infection and immunity 69, 3791-3799.
255. **Ricklin, D., Hajshengallis, G., Yang, K., Lambris, J.D.,** 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. Nature immunology 11, 785-797.
256. **Ricklin, D., Lambris, J.D.,** 2013. Complement in immune and inflammatory disorders: therapeutic interventions. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 190, 3839-3847.
257. **Ricklin, D., Reis, E.S., Mastellos, D.C., Gros, P.,** 2016. Complement component C3 - The "Swiss Army Knife" of innate immunity and host defense. 274, 33-58.
258. **Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., Sixt, M., Wedlich-Soldner, R.,** 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. Nature methods 5, 605-607.
259. **Riedl, J., Flynn, K.C., Raducanu, A., Gartner, F., Beck, G., Bosl, M., Bradke, F., Massberg, S., Aszodi, A., Sixt, M., Wedlich-Soldner, R.,** 2010. Lifeact mice for studying F-actin dynamics. Nature methods 7, 168-169.
260. **Roberson, J.R., Fox, L.K., Hancock, D.D., Besser, T.E.,** 1992. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive staphylococci. Journal of clinical microbiology 30, 3217-3219.
261. **Roche, Y., Pasquier, D., Rambeaud, J.J., Seigneurin, D., Duperray, A.,** 2003. Fibrinogen mediates bladder cancer cell migration in an ICAM-1-dependent pathway. Thrombosis and haemostasis 89, 1089-1097.
262. **Roghmann, M., Taylor, K.L., Gupte, A., Zhan, M., Johnson, J.A., Cross, A., Edelman, R., Fattom, A.I.,** 2005. Epidemiology of capsular and surface polysaccharide in *Staphylococcus aureus* infections complicated by bacteraemia. The Journal of hospital infection 59, 27-32.
263. **Rooijackers, S.H., Ruyken, M., van Roon, J., van Kessel, K.P., van Strijp, J.A., van Wamel, W.J.,** 2006. Early expression of SCIN and CHIPS drives instant immune evasion by *Staphylococcus aureus*. Cellular microbiology 8, 1282-1293.
264. **Rooijackers, S.H., van Wamel, W.J., Ruyken, M., van Kessel, K.P., van Strijp, J.A.,** 2005. Anti-opsonic properties of staphylokinase. Microbes and infection 7, 476-484.
265. **Roshan Moniri, M., Young, A., Reinheimer, K., Rayat, J., Dai, L.J., Warnock, G.L.,** 2015. Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA). Cytotechnology 67, 379-386.

266. **Roslansky, P.F., Dawson, M.E., Novitsky, T.J.**, 1991. Plastics, endotoxins, and the Limulus amebocyte lysate test. *Journal of parenteral science and technology : a publication of the Parenteral Drug Association* 45, 83-87.
267. **Ryan, K., Ray, C.**, 2004. *Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases.*, Vol 4. McGraw Hill Publishers.
268. **Safdar, N., Bradley, E.A.**, 2008. The risk of infection after nasal colonization with *Staphylococcus aureus*. *The American journal of medicine* 121, 310-315.
269. **Saffarzadeh, M.**, 2011. The Role of Neutrophil Extracellular Traps in Lung Epithelial Cell Death.
270. **Sandeman, S.R., Allen, M.C., Liu, C., Faragher, R.G., Lloyd, A.W.**, 2000. Human keratocyte migration into collagen gels declines with in vitro ageing. *Mechanisms of ageing and development* 119, 149-157.
271. **Santoro, M.M., Gaudino, G.**, 2005. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Experimental cell research* 304, 274-286.
272. **Scali, C., Kunimoto, B.**, 2013. An update on chronic wounds and the role of biofilms. *Journal of cutaneous medicine and surgery* 17, 371-376.
273. **Schafer, D., Lam, T.T., Geiger, T., Mainiero, M., Engelmann, S., Hussain, M., Bosserhoff, A., Frosch, M., Bischoff, M., Wolz, C., Reidl, J., Sinha, B.**, 2009. A point mutation in the sensor histidine kinase SaeS of *Staphylococcus aureus* strain Newman alters the response to biocide exposure. *Journal of bacteriology* 191, 7306-7314.
274. **Schafer, M., Werner, S.**, 2008. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 628-638.
275. **Schierle, C.F., De la Garza, M., Mustoe, T.A., Galiano, R.D.**, 2009. Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 17, 354-359.
276. **Schitteck, B.**, 2011. The antimicrobial skin barrier in patients with atopic dermatitis. *Current problems in dermatology* 41, 54-67.
277. **Schmitt, J., Joost, I., Skaar, E.P., Herrmann, M., Bischoff, M.**, 2012. Haemin represses the haemolytic activity of *Staphylococcus aureus* in an Sae-dependent manner. *Microbiology (Reading, England)* 158, 2619-2631.
278. **Schneider, D., Liaw, L., Daniel, C., Athanasopoulos, A.N., Herrmann, M., Preissner, K.T., Nawroth, P.P., Chavakis, T.**, 2007. Inhibition of breast cancer cell adhesion and bone metastasis by the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and biophysical research communications* 357, 282-288.
279. **Scriba, T.J., Sierro, S., Brown, E.L., Phillips, R.E., Sewell, A.K., Massey, R.C.**, 2008. The *Staphylococcus aureus* Eap protein activates expression of proinflammatory cytokines. *Infection and immunity* 76, 2164-2168.
280. **Sendi, P., Proctor, R.A.**, 2009. *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends in microbiology* 17, 54-58.
281. **Sethi, S., Herrmann, M., Roller, J., von Muller, L., Peerschke, E.I., Ghebrehiwet, B., Bajric, I., Menger, M.D., Laschke, M.W.**, 2011. Blockade of gC1qR/p33, a receptor for C1q, inhibits adherence of *Staphylococcus aureus* to the microvascular endothelium. *Microvascular research* 82, 66-72.
282. **Singer, A.J., Clark, R.A.**, 1999. Cutaneous wound healing. *The New England journal of medicine* 341, 738-746.
283. **Sinha, B., Francois, P.P., Nusse, O., Foti, M., Hartford, O.M., Vaudaux, P., Foster, T.J., Lew, D.P., Herrmann, M., Krause, K.H.**, 1999. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cellular microbiology* 1, 101-117.
284. **Sinha, B., Fraunholz, M.**, 2010. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *International journal of medical microbiology : IJMM* 300, 170-175.

285. **Sinha, B., Herrmann, M.**, 2005. Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by *Staphylococcus aureus*. *Thrombosis and haemostasis* 94, 266-277.
286. **Smeltzer, M.S., Gillaspay, A.F., Pratt, F.L., Jr., Thames, M.D., landolo, J.J.**, 1997. Prevalence and chromosomal map location of *Staphylococcus aureus* adhesin genes. *Gene* 196, 249-259.
287. **Sneddon, I.N.**, 1965. The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *Int. J. Eng. Sci.*, 3, 47-57.
288. **Sobke, A.C., Selimovic, D., Orlova, V., Hassan, M., Chavakis, T., Athanasopoulos, A.N., Schubert, U., Hussain, M., Thiel, G., Preissner, K.T., Herrmann, M.**, 2006. The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* abrogates angiogenic responses of endothelial cells by blocking Ras activation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20, 2621-2623.
289. **Soloway, M.S.**, 1980. Rationale for intensive intravesical chemotherapy for superficial bladder cancer. *The Journal of urology* 123, 461-466.
290. **Somerville, G.A., Proctor, R.A.**, 2009. At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in *Staphylococci*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 73, 233-248.
291. **Southern, E.M.**, 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology* 98, 503-517.
292. **Speziale, P., Pietrocola, G., Foster, T.J., Geoghegan, J.A.**, 2014. Protein-based biofilm matrices in *Staphylococci*. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 4, 171.
293. **Stadelmann, W.K., Digenis, A.G., Tobin, G.R.**, 1998. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *American journal of surgery* 176, 26s-38s.
294. **Stalker, T.J., Newman, D.K., Ma, P., Wannemacher, K.M., Brass, L.F.**, 2012. Platelet signaling. *Handbook of experimental pharmacology*, 59-85.
295. **Stapels, D.A., Kuipers, A., von Kockritz-Blickwede, M., Ruyken, M., Tromp, A.T., Horsburgh, M.J., de Haas, C.J., van Strijp, J.A., van Kessel, K.P., Rooijackers, S.H.**, 2016. *Staphylococcus aureus* protects its immune-evasion proteins against degradation by neutrophil serine proteases. *Cellular microbiology* 18, 536-545.
296. **Stapels, D.A., Ramyar, K.X., Bischoff, M., von Kockritz-Blickwede, M., Milder, F.J., Ruyken, M., Eisenbeis, J., McWhorter, W.J., Herrmann, M., van Kessel, K.P., Geisbrecht, B.V., Rooijackers, S.H.**, 2014. *Staphylococcus aureus* secretes a unique class of neutrophil serine protease inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 13187-13192.
297. **Stapels, D.A.C., Woehl, J.L., Milder, F.J., Tromp, A.T., van Batenburg, A.A., de Graaf, W.C., Broll, S.C., White, N.M., Rooijackers, S.H.M., Geisbrecht, B.V.**, 2018. Evidence for multiple modes of neutrophil serine protease recognition by the EAP family of *Staphylococcal* innate immune evasion proteins. *Protein science : a publication of the Protein Society* 27, 509-522.
298. **Stefani, S., Chung, D.R., Lindsay, J.A., Friedrich, A.W., Kearns, A.M., Westh, H., Mackenzie, F.M.**, 2012. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International journal of antimicrobial agents* 39, 273-282.
299. **Strauss, L., Stegger, M.**, 2017. Origin, evolution, and global transmission of community-acquired *Staphylococcus aureus* ST8. 114, E10596-e10604.
300. **Szafranska, A.K., Oxley, A.P., Chaves-Moreno, D., Horst, S.A., Rosslenbroich, S., Peters, G., Goldmann, O., Rohde, M., Sinha, B., Pieper, D.H., Loffler, B., Jauregui, R., Wos-Oxley, M.L., Medina, E.**, 2014. High-resolution transcriptomic analysis of the adaptive response of *Staphylococcus aureus* during acute and chronic phases of osteomyelitis. *mBio* 5.
301. **Takayama, S., Ishii, S., Ikeda, T., Masamura, S., Doi, M., Kitajima, M.**, 2005. The relationship between bone metastasis from human breast cancer and integrin alpha(v)beta3 expression. *Anticancer research* 25, 79-83.

302. **Talan, D.A., Krishnadasan, A., Gorwitz, R.J., Fosheim, G.E., Limbago, B., Albrecht, V., Moran, G.J.**, 2011. Comparison of *Staphylococcus aureus* from skin and soft-tissue infections in US emergency department patients, 2004 and 2008. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 53, 144-149.
303. **Tang, J., Zhou, R., Shi, X., Kang, M., Wang, H., Chen, H.**, 2008. Two thermostable nucleases coexisted in *Staphylococcus aureus*: evidence from mutagenesis and in vitro expression. *FEMS microbiology letters* 284, 176-183.
304. **Tarnuzzer, R.W., Schultz, G.S.**, 1996. Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 4, 321-325.
305. **Thomson, C.H.**, 2011. Biofilms: do they affect wound healing? *International wound journal* 8, 63-67.
306. **Tohme, S., Yazdani, H.O., Al-Khafaji, A.B., Chidi, A.P., Loughran, P., Mowen, K., Wang, Y., Simmons, R.L., Huang, H., Tsung, A.**, 2016. Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress. *Cancer research* 76, 1367-1380.
307. **Tong, S.Y., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., Fowler, V.G., Jr.**, 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews* 28, 603-661.
308. **Tuscherr, L., Bischoff, M., Lattar, S.M., Noto Llana, M., Pfortner, H., Niemann, S., Geraci, J., Van de Vyver, H., Fraunholz, M.J., Cheung, A.L., Herrmann, M., Volker, U., Sordelli, D.O., Peters, G., Loffler, B.**, 2015. Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate *Staphylococcus aureus* Adaptation during Chronic Infections. *PLoS pathogens* 11, e1004870.
309. **Tuscherr, L., Heitmann, V., Hussain, M., Viemann, D., Roth, J., von Eiff, C., Peters, G., Becker, K., Loffler, B.**, 2010. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *The Journal of infectious diseases* 202, 1031-1040.
310. **Tuscherr, L., Medina, E., Hussain, M., Volker, W., Heitmann, V., Niemann, S., Holzinger, D., Roth, J., Proctor, R.A., Becker, K., Peters, G., Loffler, B.**, 2011. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO molecular medicine* 3, 129-141.
311. **van Wamel, W.J., Rooijackers, S.H., Ruyken, M., van Kessel, K.P., van Strijp, J.A.**, 2006. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *Journal of bacteriology* 188, 1310-1315.
312. **von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H., Peters, G.**, 2001. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *The New England journal of medicine* 344, 11-16.
313. **von Kockritz-Blickwede, M., Nizet, V.**, 2009. Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 87, 775-783.
314. **Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N., Ludwig, W., Rainey, F., Schleifer, K., Whitman, W.**, 2009. *Bergey's Manual of systematic bacteriology.*, 2016/07/04 Edition. SpringerLink.
315. **Vuong, C., Keller, D., Peschel, A., Otto, M.** 2002. Binding of the Map protein of *Staphylococcus aureus* Newman to the cell wall is dependent on the D-alanylation of teichoic acids. In 10th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections (Tsukuba, Japan, ISSI), 43.
316. **Wang, H., von Rohrscheidt, J., Roehrbein, J., Peters, T., Sindrilaru, A., Kess, D., Preissner, K.T., Scharffetter-Kochanek, K.**, 2010. Extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus* suppresses disease by inhibiting T-cell recruitment in a mouse model of psoriasis. *The Journal of investigative dermatology* 130, 743-754.

317. **Wang, I.W., Anderson, J.M., Marchant, R.E.**, 1993. Staphylococcus epidermidis adhesion to hydrophobic biomedical polymer is mediated by platelets. *The Journal of infectious diseases* 167, 329-336.
318. **Wann, E.R., Gurusiddappa, S., Hook, M.**, 2000. The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of Staphylococcus aureus is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *The Journal of biological chemistry* 275, 13863-13871.
319. **Weber, K., Osborn, M.**, 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of biological chemistry* 244, 4406-4412.
320. **Weidenmaier, C., Goerke, C., Wolz, C.**, 2012. Staphylococcus aureus determinants for nasal colonization. *Trends in microbiology* 20, 243-250.
321. **Weidenmaier, C., McLoughlin, R.M., Lee, J.C.**, 2010. The zwitterionic cell wall teichoic acid of Staphylococcus aureus provokes skin abscesses in mice by a novel CD4+ T-cell-dependent mechanism. *PloS one* 5, e13227.
322. **Weidenmaier, C., Peschel, A., Xiong, Y.Q., Kristian, S.A., Dietz, K., Yeaman, M.R., Bayer, A.S.**, 2005. Lack of wall teichoic acids in Staphylococcus aureus leads to reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of endocarditis. *The Journal of infectious diseases* 191, 1771-1777.
323. **Weinrick, B., Dunman, P.M., McAleese, F., Murphy, E., Projan, S.J., Fang, Y., Novick, R.P.**, 2004. Effect of mild acid on gene expression in Staphylococcus aureus. *Journal of bacteriology* 186, 8407-8423.
324. **Weis, S., Kaasch, A.J., Rieg, S., Loffler, B., Hagel, S., Forstner, C., Brunkhorst, F.M., Pletz, M.W.**, 2015. [Staphylococcus aureus bacteremia - a distinct entity]. *Deutsche medizinische Wochenschrift* (1946) 140, 982-989.
325. **Wenzel, R.P., Perl, T.M.**, 1995. The significance of nasal carriage of Staphylococcus aureus and the incidence of postoperative wound infection. *The Journal of hospital infection* 31, 13-24.
326. **Werner, S., Grose, R.**, 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews* 83, 835-870.
327. **Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., Nouwen, J.L.**, 2005. The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. *The Lancet. Infectious diseases* 5, 751-762.
328. **Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., Mattick, J.S.**, 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science (New York, N.Y.)* 295, 1487.
329. **Witte, M.B., Barbul, A.**, 2002. Role of nitric oxide in wound repair. *American journal of surgery* 183, 406-412.
330. **Woehl, J.L., Ramyar, K.X., Katz, B.B., Walker, J.K., Geisbrecht, B.V.**, 2017. The structural basis for inhibition of the classical and lectin complement pathways by S. aureus extracellular adherence protein. *Protein science : a publication of the Protein Society* 26, 1595-1608.
331. **Woehl, J.L., Stapels, D.A.C., Garcia, B.L., Ramyar, K.X., Keightley, A., Ruyken, M., Syriga, M., Sfyroera, G., Weber, A.B., Zolkiewski, M., Ricklin, D., Lambris, J.D., Rooijackers, S.H.M., Geisbrecht, B.V.**, 2014. The extracellular adherence protein from Staphylococcus aureus inhibits the classical and lectin pathways of complement by blocking formation of the C3 proconvertase. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 193, 6161-6171.
332. **Woehl, J.L., Takahashi, D., Herrera, A.I., Geisbrecht, B.V., Prakash, O.**, 2016. (1)H, (15)N, and (13)C resonance assignments of Staphylococcus aureus extracellular adherence protein domain 4. *10*, 301-305.
333. **Xie, C., Alcaide, P., Geisbrecht, B.V., Schneider, D., Herrmann, M., Preissner, K.T., Lusinskas, F.W., Chavakis, T.**, 2006. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by extracellular adherence protein of Staphylococcus aureus. *The Journal of experimental medicine* 203, 985-994.

334. **Yoong, P., Pier, G.B.**, 2010. Antibody-mediated enhancement of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 2241-2246.
335. **Yousif, Y., Mertz, A., Batsford, S., Vogt, A.**, 1991. Cationic staphylococcal antigens have high affinity for glomerular structures. Possible pathogenic role in glomerulonephritis. *Zbl Bakt Suppl* 21, 168–169.
336. **Yu, N., Atienza, J.M., Bernard, J., Blanc, S., Zhu, J., Wang, X., Xu, X., Abassi, Y.A.**, 2006. Real-time monitoring of morphological changes in living cells by electronic cell sensor arrays: an approach to study G protein-coupled receptors. *Analytical chemistry* 78, 35-43.
337. **Zapotoczna, M., O'Neill, E., O'Gara, J.P.**, 2016. Untangling the Diverse and Redundant Mechanisms of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *PLoS pathogens* 12, e1005671.
338. **Zhang, C.J., Shen, Z.J., Pan, C.W., Zhong, S., Li, T., Zhang, M.G.**, 2012. Engagement of integrin beta1 induces resistance of bladder cancer cells to mitomycin-C. *Urology* 79, 638-643.
339. **Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., Vitzthum, F.**, 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic acids research* 32, e103.

## Publikationen, Kongressbeiträge und Forschungspreis

### Publikationen die im Zeitrahmen der experimentellen Arbeiten im IMMH entstanden sind

**Eisenbeis, J.,\*** Saffarzadeh, M.,\* Peisker, H., Jung, P., Thewes, N., Preissner, K.T., Herrmann, M., Molle, V., Geisbrecht, B.V., Jacobs, K., Bischoff, M., 2018. The *Staphylococcus aureus* Extracellular Adherence Protein Eap Is a DNA Binding Protein Capable of Blocking Neutrophil Extracellular Trap Formation. **Frontiers in cellular and infection microbiology** 8, 235.

**Eisenbeis, J.,** Peisker, H., Backes, C.S., Bur, S., Holters, S., Thewes, N., Greiner, M., Junker, C., Schwarz, E.C., Hoth, M., Junker, K., Preissner, K.T., Jacobs, K., Herrmann, M., Bischoff, M., 2017. The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* acts as a proliferation and migration repressing factor that alters the cell morphology of keratinocytes. *International journal of medical microbiology: IJMM* 307, 116-125.

Gaupp, R., Wirf, J., Wonnemberg, B., Biegel, T., **Eisenbeis, J.,** Graham, J., Herrmann, M., Lee, C.Y., Beisswenger, C., Wolz, C., Tschernig, T., Bischoff, M., Somerville, G.A., 2016. RpiRc Is a Pleiotropic Effector of Virulence Determinant Synthesis and Attenuates Pathogenicity in *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity* 84, 2031-2041.

Stapels, D.A., Ramyar, K.X., Bischoff, M., von Kockritz-Blickwede, M., Milder, F.J., Ruyken, M., **Eisenbeis, J.,** McWhorter, W.J., Herrmann, M., van Kessel, K.P., Geisbrecht, B.V., Rooijackers, S.H., 2014. *Staphylococcus aureus* secretes a unique class of neutrophil serine protease inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 111, 13187-13192.

Hartmann, T., Baronian, G., Nippe, N., Voss, M., Schulthess, B., Wolz, C., **Eisenbeis, J.,** Schmidt-Hohagen, K., Gaupp, R., Sunderkotter, C., Beisswenger, C., Bals, R., Somerville, G.A., Herrmann, M., Molle, V., Bischoff, M., 2014. The catabolite control protein E (CcpE) affects virulence determinant production and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of biological chemistry* 289, 29701-29711.

### Vorträge auf Symposien und Konferenzen

**Eisenbeis, J.,** Peisker, H., Backes, C., Schwarz, E., Herrmann, M., Bischoff, M. Eap of *S. aureus* affects proliferation and migration of eukaryotic cells by altering the adhesive and

morphological properties of the host cell. Annual Conference of the Association of General and Applied Microbiology (VAAM). 13-16. März 2016, Jena.

**Eisenbeis, J.**, Hölter, S., Peisker, H., Herrmann, M., Stöckle, M., Bischoff, M., Junker K. Das extrazelluläre Adhärenzprotein Eap aus *Staphylococcus aureus*: Ein potentielles Therapeutikum für das Harnblasenkarzinom. 67ter Kongress der deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU). 23-26. September 2015, Hamburg.

**Eisenbeis, J.**, Hölter, S., Junker, K., Herrmann, M., Bischoff M. Das extrazelluläre Adhärenzprotein Eap aus *Staphylococcus aureus*: Ein potentielles Therapeutikum für das Harnblasenkarzinom. Urothelkarzinom Symposium. 19-20. Juni 2015, Wachenheim.

### Posterpräsentationen und publizierte Abstracts auf nationalen Konferenzen

**Eisenbeis, J.**, Peisker, H., Backes, C., Thewes, N., Greiner, M., Bur, S., Junker, K., Schwarz, E., Hoth, M., Jacobs, K., Bischoff M. Using atomic force microscopy and live cell imaging to unravel new functions of the extracellular adherence protein Eap of *Staphylococcus aureus*. Cell Physics Conference. 9-11. Oktober 2017, Saarbrücken.

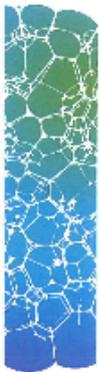
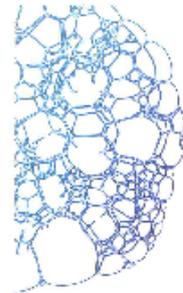
**Eisenbeis, J.**, Hölter, S., Peisker, H., Junker K., Herrmann, M., Bischoff M. The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus*: a proliferation and migration repressing factor as potential new cancer therapeutic agent. 67th Annual Conference of the German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM). 27.-30. September 2015, Münster.

**Eisenbeis, J.**, Bur, S., Greiner, M., Peisker, H., Heinzemann, J., Hölter, S., Junker, K., Schwarz, E., Zimmermann, R., Herrmann, M., Bischoff, M. Effect of the extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* on migration and proliferation of human keratinozytes. 66th Annual Conference of the German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM). 5-8. Oktober 2014, Dresden.

Bauer, C., Pappelbaum, K.I., **Eisenbeis, J.**, Herrmann, M., Schneider, S.W., Bischoff, M., Gorzelanny, C. The extracellular adherence protein Eap contributes to binding of *Staphylococcus aureus* to ultra large von Willebrand factor (ULVWF) fibers under high-shear-flow conditions. 66th Annual Conference of the German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM). 5-8. Oktober 2014, Dresden.

## Forschungspreis

Das Projekt: "Das extrazelluläre Adhäsionsprotein: Ein proliferations- und migrationshemmendes Agens als potentiell Blasenkrebstherapeutikum" wurde 2015 mit dem "verope AG Wissenschaftspreis" der "Freunde des UKS" ausgezeichnet.



Zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung am Universitätsklinikum des Saarlandes wird der

**verope AG Wissenschaftspreis  
in Höhe von 5.000 €**

an

**Diplom-Biologin  
Janina Eisenbeis**

für ihr Forschungsvorhaben

**„Das extrazelluläre Adhäsionsprotein:  
Ein proliferations- und migrationshemmendes Agens  
als potentiell neues Blasenkrebstherapeutikum“**  
verliehen.

Homburg, 24. Juni 2015



Prof. Dr. Bernhard Schick  
Vorsitzender des Vorstandes



Prof. Dr. Axel Mecklinger  
Vorsitzender des Fachbeirates

