

Untersuchungen zur Rolle von Aktin und Aktin-regulierenden Proteinen während der Infektion mit Mykobakterien im *Dictyostelium*-Modellsystem

DISSERTATION

zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
am Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von
Margot Kolonko
aus Dirschau (Polen)

Hamburg, 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. I. BRUCHHAUS
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor. Dr. E. TANNICH
Tag der Disputation: 30. August 2013

Hamburg, den 11. September 2013



Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Die Betreuung der vorliegenden Dissertation wurde von Frau Dr. Monica Hagedorn übernommen. Die experimentellen Arbeiten wurden von Mai 2010 bis März 2013 in der Arbeitsgruppe Zellbiologie am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg durchgeführt.

Erstgutachter der Dissertation: Prof. Dr. Egbert Tannich

Zweitgutachterin der Dissertation: Prof. Dr. Iris Bruchhaus

INHALTSVERZEICHNIS

I ZUSAMMENFASSUNG	V
II ABSTRACT	VI
III ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 TUBERKULOSE	1
1.2 DER LEBENSZYKLUS VON <i>M. TUBERCULOSIS</i>	2
1.3 INFektionsVERLAUF VON <i>M. TUBERCULOSIS</i> IN MAKROPHAGEN	4
1.3.1 PHAGOZYTOSE UND PHAGOSOMENREIFUNG IN MAKROPHAGEN	5
1.3.2 DIE ETABLIERUNG DER <i>M. TUBERCULOSIS</i> -VAKUOLE IN MAKROPHAGEN	6
1.3.3 MYKOBAKTERIELLE INHIBITOREN DER PHAGOSOMENREIFUNG	7
1.4 DAS <i>DICTYOSTELIUM-M. MARINUM</i> -INFektionsMODELL	8
1.4.1 <i>MYCOBACTERIUM MARINUM</i>	8
1.4.2 DER MODELLORGANISMUS <i>DICTYOSTELIUM</i>	10
1.4.3 PHAGOZYTOSE UND PHAGOSOMENREIFUNG IN <i>DICTYOSTELIUM</i>	11
1.4.4 INFektionsVERLAUF VON <i>M. MARINUM</i> IN <i>DICTYOSTELIUM</i>	12
1.5 ROLLE VON AKTIN IN DER INFektion MIT MYKOBAKTERIEN	14
1.6 DER <i>NUCLEATION-PROMOTING</i> -FAKTOR WASH	14
1.7 ZIELSETZUNG	16
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 MATERIAL	17
2.1.1 GERÄTE	17
2.1.2 VERBRAUCHSMATERIAL	18
2.1.3 CHEMIKALIEN	19
2.1.4 LÖSUNGEN, PUFFER UND MEDIEN	20
2.1.5 SOFTWARE	21
2.2 ORGANISMEN UND KULTIVIERUNG	21
2.2.1 <i>DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM</i>	23
2.2.2 BV-2-ZELLEN	24
2.2.3 RAW-B-ZELLEN	25

2.2.4 <i>MYCOBACTERIUM MARINUM</i>	25
2.2.5 <i>MYCOBACTERIUM SMEGMATIS</i>	26
2.2.6 <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	27
2.3 INFESTIONEN	27
2.3.1 INFESTION VON <i>Dictyostelium</i> -ZELLEN MIT <i>M. MARINUM</i>	27
2.3.2 INFESTION VON BV-2-ZELLEN MIT <i>M. MARINUM</i>	29
2.3.3 INFESTION VON RAW-B-ZELLEN MIT <i>M. TUBERCULOSIS</i>	30
2.4 BELADEN INFESTIRTER BV-2- UND RAW-B-ZELLEN MIT LYSOTRACKER	30
2.5 EXPOSITION IN LATRUNCULINA (LATA)-HALTIGEM MEDIUM	31
2.5.1 EXPOSITION INFESTIRTER <i>Dictyostelium</i> -ZELLEN IN LATA-HALTIGEM MEDIUM	31
2.5.2 EXPOSITION INFESTIRTER BV-2- UND RAW-B-ZELLEN IN LATA-HALTIGEM MEDIUM	31
2.6 INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ-ANALYSE	32
2.6.1 FIXIERUNG INFESTIRTER ZELLEN	32
2.6.2 VERWENDETE ANTIKÖRPER UND PHALLOIDIN	32
2.6.3 IMMUNFLUORESCENZ-FÄRBUNG	33
2.6.4 WEITFELD-FLUORESCENZMIKROSKOPIE	34
2.6.5 KONFOKALE LASER-SCANNING-MIKROSKOPIE (PUNKTSCANNER)	35
2.6.6 BILDBEARBEITUNG UND -ANALYSE	36
2.6.7 QUANTIFIZIERUNGS-EXPERIMENTE	36
2.7 LEBENDZELL-MIKROSKOPIE VON <i>Dictyostelium</i>	37
2.7.1 MIKROSKOPIE INFESTIRTER Ax2-ZELLEN NACH BELADEN MIT NEUTRALROT	37
2.7.2 MIKROSKOPIE INFESTIRTER Ax2-VATM-GFP-ZELLEN	38
2.8 MESSUNG KOLONIEBILDENDER EINHEITEN (KBE)	39
2.8.1 MESSUNG DER IN <i>Dictyostelium</i> GEWACHSENEN MYKOBAKTERIEN	39
2.8.2 MESSUNG DER IM ZELLFREIEN MEDIUM GEWACHSENEN MYKOBAKTERIEN	40
2.9 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSEN	40
3 ERGEBNISSE	43
3.1 AKTIN LOKALISIERT AM FRÜHEN <i>M. MARINUM</i>-KOMPARTIMENT IN <i>Dictyostelium</i>	43
3.2 DIE ROLLE DES NUKLEATIONSFAKTORS WASH AN DER <i>M. MARINUM</i>-VAKUOLE	45
3.2.1 WASH INITIIERT DIE POLYMERISATION DES AKTINS AM <i>M. MARINUM</i> -KOMPARTIMENT	45
3.2.2 WASH STIMULIERT DAS RECYCLING DER V-ATPASE AM <i>M. MARINUM</i> -KOMPARTIMENT	48
3.3 DIE ROLLE DES AKTINS AM FRÜHEN <i>M. MARINUM</i>-KOMPARTIMENT	51
3.3.1 DEPOLYMERISATION DES AKTINS MITTELS DES VMC-FUSIONSPROTEINS FÜHRT ZUR AKKUMULATION DER V-ATPASE	51
3.3.2 DEPOLYMERISATION DES AKTINS MITTELS LATA FÜHRT ZUR AKKUMULATION DER V-ATPASE	53

3.4 CHARAKTERISIERUNG DER AKKUMULATION DER V-ATPASE AN DER <i>M. MARINUM</i>-VAKUOLE	56
3.4.1 DAS ANGEREICHETERTE VATA STAMMT VON LYSOSOMEN.....	56
3.4.2 DIE ANREICHERUNG DER V-ATPASE AM KOMPARTIMENT ERFOLGT SYNCHRON.....	58
3.5 APATHOGENE UND AVIRULENTE MYKOBAKTERIEN ZEIGEN KEINE ÄNDERUNGEN DER VAKUOLEN NACH DEPOLYMERISATION DES AKTINS	60
3.6 LANGZEITFOLGEN DER DEPOLYMERISATION DES AKTINS AM FRÜHEN <i>M. MARINUM</i>-KOMPARTIMENT	62
3.6.1 DEPOLYMERISATION DES AKTINS FÜHRT ZUR AZIDIFIZIERUNG DES KOMPARTIMENTS.....	62
3.6.2 DEPOLYMERISATION DES AKTINS FÜHRT ZUR REDUKTION DER BAKTERIENZAHLEN.....	63
3.6.3 WASH TRÄGT ZUR AUSBREITUNG DER INFektion VON <i>M. MARINUM</i> IN <i>DICTYOSTELIUM</i> BEI	67
3.7 INFektion MURINER PHAGOZYTEN MIT <i>M. MARINUM</i> UND <i>M. TUBERCULOSIS</i>	71
3.7.1 AKTIN UND WASH LOKALISIEREN AN DEN FRÜHEN KOMPARTIMENTEN VON <i>M. MARINUM</i> UND <i>M. TUBERCULOSIS</i> IN MURINEN PHAGOZYTEN	72
3.7.2 DEPOLYMERISATION DES AKTINS FÜHRT ZUR AZIDIFIZIERUNG DER VAKUOLEN VON <i>M. MARINUM</i> UND <i>M. TUBERCULOSIS</i>	73
3.7.3 DEPOLYMERISATION DES AKTINS FÖRDERT DIE ANREICHERUNG VON LAMP-1 AM <i>M. TUBERCULOSIS</i> -KOMPARTIMENT	75
4 DISKUSSION	78
4.1 MODELLSYSTEME ZUR UNTERSUCHUNG DER INFektion MIT MYKOBAKTERIEN.....	78
4.2 METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG DER ROLLE VON AKTIN AM KOMPARTIMENT	80
4.3 FOLGEN DER DEPOLYMERISATION DES AKTINS AM FRÜHEN MYKOBAKTERIELLEN KOMPARTIMENT	83
4.4 MÖGLICHE WIRKUNGSMECHANISMEN VON WASH UND AKTIN AM MYKOBAKTERIELLEN KOMPARTIMENT	89
IV LITERATURVERZEICHNIS.....	V
V. DANKSAGUNG	XIV
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	XV

I Zusammenfassung

Die Tuberkulose ist eine Infektionskrankheit, die jährlich nahezu zwei Millionen Tote fordert. Sie wird durch *Mycobacterium tuberculosis* verursacht, welches von alveolaren Makrophagen über Phagozytose aufgenommen wird. *M. tuberculosis* ist in der Lage, die Reifung seines Phagosoms zu inhibieren und eine Replikationsnische in den Makrophagen zu etablieren. Um die molekularen Mechanismen dieser frühen und sehr entscheidenden Infektionsphase zu verstehen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Phagozyten-basiertes System, das *Dictyostelium discoideum*-*Mycobacterium marinum*-Modellsystem verwendet.

Ein wichtiges Ereignis in der mykobakteriellen Infektion von Makrophagen ist der Ausschluss der vakuolaren Protonenpumpe (V-ATPase) aus der Membran des Kompartiments. Dadurch verhindern die Bakterien die Ansäuerung ihrer Vakuole und die damit einhergehenden bakteriziden Bedingungen. Vor Kurzem wurde der Aktin-*Nucleation-Promoting*-Faktor WASH an Endosomen identifiziert, wo er das Recycling der V-ATPase vermittelt. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass WASH an die Vakuole von *M. marinum* rekrutiert wird, wo es die Polymerisation von Aktinfilamenten initiiert. Die Deletion von WASH bzw. die Depolymerisation von Aktin an der mykobakteriellen Vakuole führte zu einer Änderung der Proteinzusammensetzung der Membran. Während die Assoziation mit dem Kompartiment-Markerprotein p80, einem putativen Kupfertransporter, abnahm, akkumulierte zeitgleich die V-ATPase. Infolgedessen wurden die Vakuolen angesäuert. Diese Beobachtungen waren auf die frühe Phase der Infektion beschränkt und erforderten das Vorhandensein des *Region-of-Difference-1*-Genlokus, der für Pathogenitätsfaktoren kodiert. Um die Langzeiteffekte der Akkumulation der V-ATPase am *M. marinum*-Kompartiment zu untersuchen, wurde die bakterielle Proliferation gemessen und der Infektionsverlauf mithilfe eines durchflusszytometrischen Ansatzes verfolgt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Depolymerisation des Aktins ein reduziertes Wachstum von *M. marinum* in *Dictyostelium* zur Folge hat und die Deletion von WASH zu einer reduzierten Zell-zu-Zell-Transmission der Bakterien führt.

Die im *Dictyostelium*-Modell gemachten Beobachtungen konnten in murinen Phagozyten rekapituliert werden. Dazu wurden diese mit *M. marinum* bzw. mit dem Humanpathogen *M. tuberculosis* infiziert. Auch hier führte die Depolymerisation des Aktins zu einem Anstieg der Anzahl azider Kompartimente. Darüber hinaus wurde eine Akkumulation des lysosomalen Proteins LAMP-1 an den Vakuolen von *M. tuberculosis* beobachtet.

Zusammenfassend betrachtet zeigt die vorliegende Studie einen neuen molekularen Mechanismus der Etablierung und Aufrechterhaltung der Replikationsnische durch pathogene Mykobakterien. Dabei regulieren WASH und das davon generierte Aktin die Fusions- und Abschnürungsprozesse am mykobakteriellen Kompartiment und tragen damit zum Ausschluss lysosomaler Proteine bei. Eine weiterführende Untersuchung dieser Wirt-Pathogen-Interaktion würde helfen, die Virulenz und Persistenz von *M. tuberculosis* zu verstehen.

II Abstract

Tuberculosis is an infectious disease that accounts for nearly two million deaths per year. It is caused by *Mycobacterium tuberculosis*, which is taken up by human alveolar macrophages and establishes its replication niche within these cells by circumventing the phagosomal maturation process. The molecular mechanisms of mycobacteria mediated phagosome maturation arrest still remain elusive. Therefore, to improve our understanding of these very early but crucial events, mycobacterial infection has been extensively followed at the cellular level by using the *Dictyostelium discoideum*-*Mycobacterium marinum* model system.

The hallmark of mycobacterial phagosome maturation arrest is the exclusion of the proton pumping V-ATPase from the compartment membrane. In this way mycobacteria prevent their vacuole from turning acidic and bactericidal. Recently, the actin nucleation promoting factor WASH has been shown to cause V-ATPase retrieval from endosomes. The present study reveals that WASH is also recruited and retained at the *M. marinum* vacuole where it polymerizes actin. The deletion of WASH or the depolymerization of actin at the compartment led to severe remodeling of the mycobacterial vacuole. These changes included the decreased presence of the compartment marker protein p80, a putative copper transporter, and the accumulation of the V-ATPase. Live cell imaging under actin depolymerizing conditions confirmed the fusion of V-ATPase positive lysosomes with the mycobacterial compartments and subsequent acidification. Intriguingly, these remodeling processes were restricted to the early phase of the infection and were dependent on bacterial virulence factors such as the *Region of Difference 1* (RD1) locus. To elucidate the long-term effects of the V-ATPase accumulation, bacterial proliferation was measured by counting colony-forming units and applying quantitative FACS analyses. These approaches showed that growth of *M. marinum* was reduced under actin depolymerizing conditions and that the deletion of WASH decreased cell-to-cell transmission of bacteria.

Most importantly, the key observations in the *Dictyostelium* model were recapitulated using murine phagocytes infected with either *M. marinum* or the human pathogen *M. tuberculosis*. For both pathogens the depolymerization of actin led to an increased acidification of the mycobacterial vacuoles. Moreover, the *M. tuberculosis* compartment accumulated the lysosomal protein LAMP-1.

Taken together this study highlights a new molecular mechanism by which mycobacterial pathogens establish and maintain phagosomal maturation arrest. It proposes that WASH-driven actin is a key player in the controlled fusion and fission events at the mycobacterial compartment thereby preventing accumulation of lysosomal proteins. Shedding light on this host-pathogen crosstalk will help to understand mycobacterial persistence and virulence in humans.

III Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
ARP2/3	<i>Actin Related Protein 2/3</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
CO₂	Kohlendioxid
d	Tag
d. h.	das heißt
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
et al	und andere (<i>et alii</i>)
evtl.	eventuell
FACS	Durchflusszytometer (<i>Fluorescence-Activated Cell Sorter</i>)
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
hpi	Stunden nach Infektion (<i>hours post infection</i>)
i. d. R.	in der Regel
IFN	Interferon
KBE	Koloniebildende Einheiten
KV	Kontraktile Vakuole
l	Liter
LAMP	<i>Lysosome-Associated Membrane Protein</i>
LatA	LatrunculinA
LT	Lysotracker
M	Molar (Mol pro Liter)
max.	maximal
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter

mm	Millimeter
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
mpi	Minuten nach Infektion
ms	Millisekunden
msp	<i>macrophage strong promoter</i>
mV	Millivolt
n	Anzahl der Versuchsdurchführungen
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NPF	<i>Nucleation-Promoting-Faktor</i>
NR	Neutralrot
ns	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
p	Signifikanzwert (<i>probability</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RD1	<i>Region of Difference 1</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s. g.	so genannt
s. o.	siehe oben
TB	Tuberkulose
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
vgl.	vergleiche
WASH	<i>Wiskott-Aldrich-syndrome protein and SCAR Homolog</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organisation</i>)
xg	Gravitationsbeschleunigung
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Das Ziel der Untersuchung mußte zunächst auf den Nachweis von irgendwelchen, dem Körper fremdartigen, parasitischen Gebilden gerichtet sein, die möglicherweise als Krankheitsursache gedeutet werden konnten. Dieser Nachweis gelang auch in der Tat durch ein bestimmtes Färbungsverfahren, mit Hilfe dessen in allen tuberkulös veränderten Organen charakteristische, bis dahin nicht bekannte Bakterien zu finden waren.

Auszug aus „Die Ätiologie der Tuberkulose“ von Dr. Robert Koch, Berlin 24.03.1882; Quelle: RKI

1.1 Tuberkulose

In der berühmt gewordenen Rede von Robert Koch über die „Ätiologie der Tuberkulose“ wurde der ursächliche Erreger *Mycobacterium tuberculosis* zum ersten Mal beschrieben. Der Vortrag galt als historisches Ereignis, das den Charakter der Tuberkulose als einheitliche Infektionskrankheit manifestierte. In der Tat war zunächst das Anfärben dieser unbekannten Mikroorganismen eine absolute Herausforderung, jedoch dringend erforderlich für ihren Nachweis. Mykobakterien sind von einer wachsartigen Zellwand umgeben, welche die Bakterien besonders widerstandsfähig gegenüber äußeren Einflüssen macht, so auch Toxinen und Antibiotika. Eine weitere Herausforderung lag darin, die Bakterien auf Nährböden zu kultivieren. Der komplexe Aufbau der Zellwand bedingt eine lange Generationszeit von *M. tuberculosis*, sodass die Bakterien erst nach 4-6 Wochen zu sichtbaren Kolonien auf Kulturplatten anwachsen. Somit machte sich Robert Koch nicht nur um seine besondere Beobachtungsgabe, sondern auch um eine außergewöhnliche Geduld verdient.

Über 130 Jahre sind nun seit der Erstbeschreibung von *M. tuberculosis* vergangen und noch immer gibt es keine alternative Behandlungsmöglichkeit der Tuberkulose außer einer langwierigen Kombinationstherapie aus vier verschiedenen Antibiotika (Zumla et al 2013). Trotz der gegebenen Heilungsmöglichkeit ist nach Schätzungen der WHO (*World Health Organisation*) ein Drittel der Weltbevölkerung mit *M. tuberculosis* infiziert. Was bedingt nun diesen enormen Erfolg des Pathogens? Zunächst ist die aerogene Übertragung des Bakteriums von Mensch zu Mensch in Form kleinster Tröpfchen des Bronchialsekrets sehr effizient. Vor allem in Entwicklungsländern, in denen die medizinische Versorgung nicht flächendeckend gewährleistet ist und unzureichende Hygienemaßnahmen vorherrschen,

erkranken Menschen an der Tuberkulose. Außerdem begünstigt eine vorhandene Infektion mit HIV die Koinfektion mit *M. tuberculosis*, wobei letztere die häufigste Todesursache von HIV-Patienten ist (Getahun et al 2010, Pawlowski et al 2012). Besonders betroffen davon sind Menschen, die südlich der Sahara leben (Lalloo & Pillay 2008). Doch die Tuberkulose bleibt nicht nur ein Problem der Dritten Welt. Die WHO berichtet von einer 100-fachen Zunahme der Fallrate von Infektion mit multiresistenten *M. tuberculosis*-Stämmen seit 2005 im Raum Osteuropa, Russland, China und Indien (WHO, 2011). Diese Stämme tragen eine Resistenz gegen zwei der potentesten Erstrang-Medikamente. Eine weitere Besonderheit von *M. tuberculosis* ist, dass es in den Organen des Menschen persistieren kann, ohne eine Immunantwort hervorzurufen und zur Ausbildung von Krankheitssymptomen zu führen. Nur etwa 5-10% der infizierten Menschen entwickeln im Laufe ihres Lebens eine aktive und somit infektiöse Form der Krankheit, gegen die es derzeit keine wirksamen Impfstoffe gibt. Der Anfang des 20. Jahrhunderts entwickelte Impfstamm Bacillus Calmette-Guérin (BCG) aus *M. bovis* (Calmette 1931) schützt lediglich Kinder vor schweren Formen der Tuberkulose, wie Meningitis und Miliartuberkulose (Trunz et al 2006). Ein wesentlicher Fortschritt wurde jedoch in der Diagnose einer Infektion mit *M. tuberculosis* erzielt. Mit dem GeneXpert MTB/RIF-Test, einem automatisierten Real-Time-PCR-basierten Verfahren, kann eine Infektion mit *M. tuberculosis* innerhalb von nur zwei Stunden diagnostiziert werden (Boehme et al 2010).

Nicht zuletzt ist *M. tuberculosis* perfekt auf seinen Wirt, den Menschen, angepasst. Aktuelle Studien belegen sogar eine Wirt-Pathogen-Koevolution der humanen Tuberkulose (Gagneux 2012). *M. tuberculosis* und *M. africanum* sind obligat humanpathogen und es ist kein anderes Reservoir dieser beiden Arten außerhalb des Menschen bekannt (Gagneux 2012). Dieser besonderen Anpassung an den Wirt liegt die Evolution effizienter Manipulationsmechanismen durch das Pathogen zugrunde. Diese Mechanismen schließen sowohl die zelluläre als auch die histologische Ebene ein und werden im nachfolgenden Kapitel vorgestellt.

1.2 Der Lebenszyklus von *M. tuberculosis*

Die ersten Immunzellen, auf die *M. tuberculosis* in den Alveoli der Lunge auftrifft, sind die dort ansässigen Makrophagen (Bermudez & Goodman 1996). Die Bakterien werden von diesen zunächst phagozytiert jedoch nicht degradiert, da die Phagosomenreifung durch das Pathogen inhibiert wird (Sturgill-Koszycki et al 1994, Vergne et al 2005). Diese Phase ist von

einer exponentiellen Replikation der Bakterien innerhalb der Makrophagen gekennzeichnet (Cardona et al 2003, Cardona et al 2000). Grundsätzlich kann die Infektion auf zwei unterschiedliche Arten verlaufen. Bei der offenen Tuberkulose gelangen die Bakterien nach der Vermehrungsphase über die Nekrose ihrer Wirtszellen und des umliegenden Gewebes wieder in die Atemwege. Durch das Husten der infizierten Person werden die Bakterien wieder in Form von Aerosolen in die Luft entlassen. Bei der Entwicklung einer latenten Infektion hingegen werden die Bakterien in ihrer Ausbreitung gehindert. Sie werden dazu in lokal eingegrenzten Bereichen, den Granulomen, zurückgehalten. Eine latente Infektion kann wieder zu einer offenen Form der Tuberkulose reaktiviert werden (Russell et al 2009).

A. Infektion mit *M. tuberculosis*

B. Ausbildung einer latenten Infektion

C. Reaktivierung einer latenten Infektion

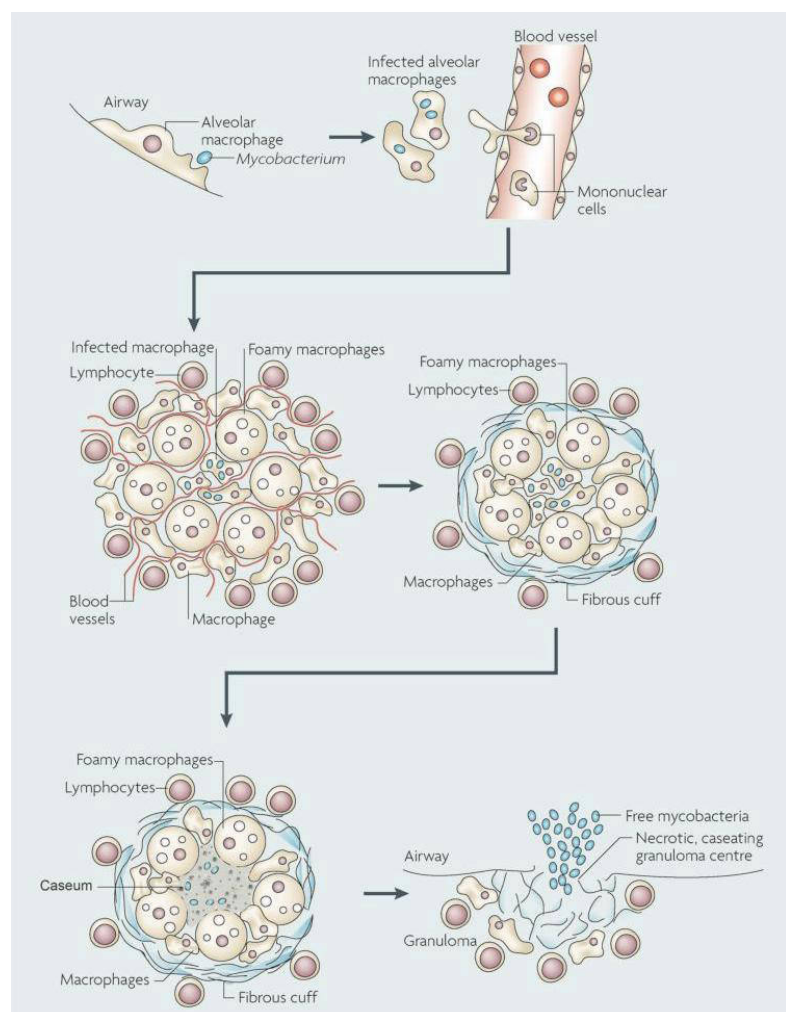


Abbildung 1.1: Lebenszyklus von *M. tuberculosis*.

(A) *M. tuberculosis* gelangt in feinsten Flüssigkeitströpfchen in die Lungenbläschen. Die Bakterien werden dort von alveolären Makrophagen phagozytiert jedoch nicht abgetötet. Durch die Initiation einer proinflammatorischen Reaktion gelangen die infizierten Makrophagen ins umliegende Lungengewebe. Diese frühe Phase ist durch die Replikation von *M. tuberculosis* in den Makrophagen gekennzeichnet. (B) Zur gleichen Zeit werden T-Zellen und mononukleäre Immunzellen an den Infektionsort rekrutiert. Letztere bilden die Matrix für die sich ausbildenden Granulome. Die Granulome werden nach außen von einer fibrösen Schicht umhüllt. Dabei werden T-Zellen und Blutgefäße aus dem Granulom ausgeschlossen und die Infektion tritt in die latente Phase über. Das Innere der

Granulome ist mit infizierten oder bereits lysierten Makrophagen sowie fettreichen Makrophagen (*Foamy macrophages*) gefüllt. **(C)** Die Granulome und das umliegende Lungengewebe werden nekrotisch aufgelöst. Dadurch gelangt der verflüssigte Inhalt der Granulome (*Caesum*) in die Atemwege und wird ausgehustet. Quelle: Russell et al 2009, Nature Immunology.

In der initialen Phase der Granulom-Ausbildung produzieren Makrophagen und T-Zellen das Zytokin TNF α , welches die Rekrutierung weiterer Immunzellen bewirkt (Roach et al 2002). Diese wiederum sezernieren IFN γ , das für die Aktivierung der infizierten Makrophagen notwendig ist (Flesch & Kaufmann 1987). Auf diesem Wege wird die Progression der Infektion kontrolliert und das Bakterienwachstum reduziert (Russell et al 2009, Schaible et al 1998, Via et al 1998). Um dieser ausgeprägten Immunantwort auszuweichen, initiiert *M. tuberculosis* die Abkapselung des Infektionsortes (Flynn & Chan 2005). So kommt es zur Ausbildung einer fibrinösen Schicht, welche die infizierten Makrophagen von den umliegenden Immunzellen und den Blutgefäßen abtrennt (Russell et al 2009). Die eingeschlossenen Makrophagen liegen in unterschiedlichen Formen vor. Neben infizierten und nekrotischen Zellen kommen auch s. g. *Foamy macrophages* vor, die eine deutliche Fettanreicherung aufweisen (Caceres et al 2009, Russell et al 2009). Zu diesem Zeitpunkt ist der Übergang zu einer latenten Infektion vollzogen. Diese wird in ca. 90% aller Fälle bis ans Lebensende der infizierten Person aufrechterhalten, ohne dass diese jemals erkrankt. Eine latente Infektion kann jedoch auch zu einer offenen Tuberkulose reaktiviert werden. Dabei verflüssigt sich das Innere der Granulome und durch Nekrose des umliegenden Gewebes gelangen infektiöse Bakterien in die Atemwege, von wo aus sie wieder aus dem Körper austreten (Kaplan et al 2003).

Grundsätzlich ist die pulmonale Tuberkulose die häufigste Form der Krankheit. Bei ca. 15% aller erstmalig als Tuberkulose-positiv diagnostizierten Patienten wurde jedoch eine extra-pulmonale Form der Krankheit festgestellt (WHO, 2012). In den meisten dieser Fälle manifestiert sich die Infektion in Lymphknoten, in Knochen oder im Gehirn in Form einer Meningitis (Golden & Vikram 2005). In allen Geweben ist die Ausbildung der Granulome vergleichbar mit der in der Lunge und in allen Fällen sind Makrophagen die wichtigsten Wirtszellen der Mykobakterien.

1.3 Infektionsverlauf von *M. tuberculosis* in Makrophagen

Die erfolgreiche Etablierung einer Infektion mit *M. tuberculosis* hängt von der initialen Interaktion der Bakterien mit alveolaren Makrophagen ab. *M. tuberculosis* nutzt zunächst die

Phagozytose dazu aus, um von den Makrophagen aufgenommen zu werden. Sobald es in einer Vakuole vorliegt, inhibiert *M. tuberculosis* die Mechanismen der Phagosomenreifung und etabliert seine Replikationsnische (Hestvik et al 2005). Die wichtigsten Ereignisse der Phagozytose und Phagosomenreifung werden im Abschnitt 1.3.1 am Beispiel eines Latex-Bead-Phagosoms vorgestellt. Im Vergleich dazu werden im Abschnitt 1.3.2 und 1.3.3 die Ereignisse am Kompartiment von *M. tuberculosis* sowie die mykobakteriellen Effektoren der Phagosomenmanipulation vorgestellt.

1.3.1 Phagozytose und Phagosomenreifung in Makrophagen

Makrophagen, die professionellen Fresszellen des Körpers, verfügen über eine Reihe von Mechanismen, mithilfe derer sie pathogene und apathogene Mikroorganismen sowie toxische, partikuläre Stoffe erfolgreich eliminieren können. Diese Mechanismen werden unter dem Begriff der Phagosomenreifung zusammengefasst. Initiiert wird die Phagozytose durch die Aktivierung von Phagozytose-spezifischen Rezeptoren, die in der Membran der Zelle lokalisiert sind (Flannagan et al 2012, Underhill & Gantner 2004). Es kommt zur Ausbildung eines Phagosoms, einer sehr dynamischen Struktur, die über Fusions- und Abschnürungsprozesse mit dem endolysosomalen Netzwerk der Zelle interagiert (Desjardins 1995). Die Spezifität dieser Prozesse wird durch insgesamt 20 Phagosom-assoziierte Rab GTPasen gewährleistet, den Regulatoren der Phagosomenreifung (Pfeffer 2013). Zunächst kommt es zu einer Fusion des Phagosoms mit frühen Endosomen und zu der Anreicherung von Rab5 in der Membran des Phagosoms. Rab5 wiederum begünstigt weitere Fusionsereignisse mit frühen Endosomen und führt zur Anreicherung und Aktivierung von Rab7 (Vieira et al 2003). Die Konversion von Rab5 zu Rab7 am Phagosom ist ein entscheidendes Ereignis in der Phagosomenreifung, da es die Fusion mit Lysosomen einleitet (Fairn & Grinstein 2012, Harrison et al 2003, Johansson et al 2007). Zur gleichen Zeit akkumulieren auch *Lysosome-Associated-Membrane-Proteine* (LAMP) in der Membran des Phagosoms. LAMP-1 und LAMP-2 sind die abundantesten lysosomalen Proteine (Eskelinen et al 2003). Sie vermitteln den Transport des Phagosoms entlang von Mikrotubulifilamenten zur Zellmitte und begünstigen weitere Fusionsereignisse mit Lysosomen (Huynh et al 2007). Die Prozessierung des Phagosoms ist begleitet von einem stetigen Abfall des pH-Wertes. Während frühe Endosomen einen pH-Wert von 6,1-6,8 haben, beträgt der pH-Wert später Endosomen 4,8-6,0 und der der Lysosomen nur noch 4,5 (Maxfield & Yamashiro 1987). Eine Ansäuerung des Phagosoms bewirkt die Aktivierung der

angereicherten Hydrolasen wie z. B. Cathepsin (Yates et al 2005) und erfolgt durch die Akkumulation der vakuolaren Protonen-ATPase (V-ATPase). Die V-ATPase ist ein Multiprotein-Komplex, der aus der peripheren Untereinheit V_1 und der transmembranen Untereinheit V_0 besteht (Ohkuma et al 1982). Dabei hydrolysiert V_1 ATP und nutzt die daraus gewonnene Energie, um Protonen über die Untereinheit V_0 ins Innere der Vakuole zu pumpen (Stevens & Forgac 1997). So wandelt sich ein Phagosom letztlich in ein Phagolysosom, eine terminale Vakuole des endozytischen Prozesses. In ihm werden Mikroorganismen abgetötet, Makromoleküle degradiert und die gewonnenen Komponenten dem Stoffwechsel der Zelle zugeführt.

1.3.2 Die Etablierung der *M. tuberculosis*-Vakuole in Makrophagen

Makrophagen sind in der Lage, über den in ihrer Zellmembran lokalisierten C-Typ Lektin-Rezeptor *Mincle* *M. tuberculosis* zu erkennen. *Mincle* bindet dabei das abundante Zellwandlipid Trehalose-6,6-dimycolate (TDM), einen bekannten Virulenzfaktor pathogener Mykobakterien (Matsunaga & Moody 2009). Durch diese Bindung wird bereits eine *M. tuberculosis*-spezifische Interaktion mit den Wirtszellen eingeleitet und die Makrophagen aktiviert (Miyake et al 2013). Wie und ob *M. tuberculosis* die nachgeschaltete Signalkaskade zur Etablierung seiner Replikationsnische nutzt, ist jedoch noch unbekannt (Lang 2013). Nach Aufnahme der Bakterien durch die Zellen fusioniert die *M. tuberculosis*-Vakuole mit frühen Endosomen (He et al 2012, Sturgill-Koszycki et al 1996). Somit reichert sich Rab5 (Fratti et al 2001, Kelley & Schorey 2003, Via et al 1997) in der Membran des Kompartiments an. Die für die Phagosomenreifung erforderliche Konversion von Rab5 zu Rab7 findet an der *M. tuberculosis*-Vakuole allerdings nicht statt (Via et al 1997). Aufgrund des Fehlens von Rab7 ist die Fusion des Kompartiments mit späten Endosomen und nachfolgend mit Lysosomen inhibiert. Somit reichern sich lysosomale Hydrolasen wie Cathepsin und Lysosom-assoziierte Proteine wie LAMP nicht an der Vakuole von *M. tuberculosis* an (Clemens & Horwitz 1995). Auch die Anreicherung der V-ATPase und somit eine Azidifizierung des Kompartiments ist unterbunden (Sturgill-Koszycki et al 1994). So verbleiben die Bakterien in einer nahezu neutralen Vakuole mit einem pH-Wert von 6,4 (Pethe et al 2004, Schaible et al 1998, Sturgill-Koszycki et al 1994, Yates et al 2005). In Abbildung 2.1 sind die grundlegenden Unterschiede zwischen der Prozessierung eines Latex-Bead-haltigen Phagosoms und den Vorgängen am *M. tuberculosis*-Kompartiment grafisch zusammengefasst.

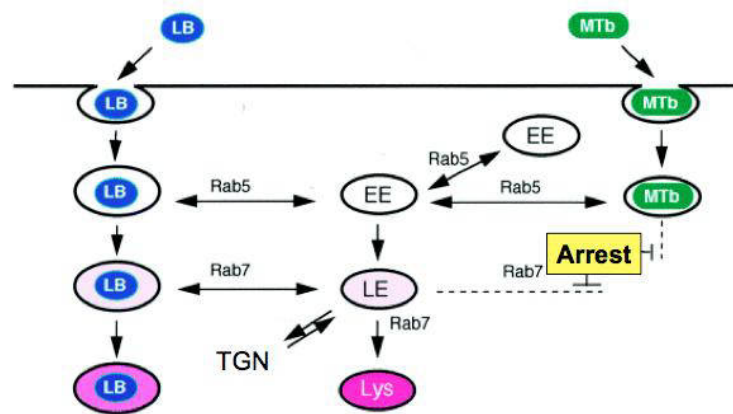


Abbildung 1.2: *M. tuberculosis* inhibiert die Phagosomenreifung in Makrophagen.

Ein Phagosom, das ein Latex-Bead (LB, blau) enthält, fusioniert mit frühen Endosomen (EE, *early endosome*) und akkumuliert Rab5 in seiner Membran. Durch die Fusion mit späten Endosomen (LE, *late endosome*) reichert sich Rab7 am Phagosom an. Der pH-Wert des Phagosoms nimmt dabei stetig ab (dargestellt durch die Farbabstufungen rosa und pink). Nach der Aufnahme von *M. tuberculosis* durch die Zelle (MTb, grün) reichert sich Rab5 durch die Fusion mit frühen Endosomen (EE) am mykobakteriellen Kompartiment an. Die Fusion von späten Endosomen (LE) mit der Vakuole von *M. tuberculosis* ist inhibiert. Es reichert sich somit kein Rab7 in der Membran des Kompartiments an und die *M. tuberculosis*-Vakuole wird nicht azidifiziert. (Lys = Lysosom). Quelle: verändert nach Deretic & Fratti 1999, Molecular Microbiology.

1.3.3 Mykobakterielle Inhibitoren der Phagosomenreifung

Mykobakterien verfügen über eine Reihe von Effektoren, die mit den Wirtszellproteinen interagieren und so die Reifung ihrer Vakuole inhibieren. Einer dieser Faktoren ist die mykobakterielle Protein-Tyrosin-Phosphatase A (ptpA), die daran beteiligt ist, die V-ATPase aus der Membran des Kompartiments auszuschließen (Wong et al 2011). Sie ist mitverantwortlich für die Etablierung der Replikationsvakuole und die Ausbildung von Granulomen (Bach et al 2008). PtpA wird ins Zytosol der Wirtszelle sezerniert (Bach et al 2008, Bach et al 2006) und bindet dort die zytosolische Untereinheit H der V-ATPase, die in der Membran von Lysosomen lokalisiert ist (Wong et al 2011). Als Folge davon dephosphoryliert ptpA die Untereinheit VPS33B des HOPS-Komplexes (*Homotypic vacuole fusion and vacuole Protein Sorting*), in der Membran des Kompartiments (Wong et al 2011). Der HOPS-Komplex spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation von endosomalen Fusionsereignissen (Huizing et al 2001). Seine ptpA-vermittelte Inaktivierung in der Membran des mykobakteriellen Kompartiments führt zu einer Inhibition der Fusion des letzteren mit späten Endosomen und Lysosomen (Bach et al 2008). So trägt dieser Inhibitor-Mechanismus ebenfalls zum Ausschluss von Rab7 aus der Membran der mykobakteriellen Vakuole bei (He et al 2012). Darüber hinaus spielen die Lipide der mykobakteriellen Zellwand eine wichtige Rolle bei der Inhibition der Phagosomenreifung (Neyrolles & Guilhot

2011). Lipoarabinomannan (LAM), ein Lipoglykan und Hauptbestandteil der Zellwand, interkaliert in die Membran des mykobakteriellen Kompartiments und verändert dadurch dessen Fusionseigenschaften (Welin et al 2008). Darüber hinaus interferiert es mit der Anreicherung lysosomaler Proteine vom trans-Golgi-Netzwerk und trägt so zur Aufrechterhaltung der Replikationsnische bei (Fratti et al 2003). Trehalosedimykolat (TDM) hingegen verzögert die Anreicherung der V-ATPase an der *M. tuberculosis*-Vakuole (Axelrod et al 2008). Alle beschriebenen Effektoren nehmen direkt oder indirekt Einfluss auf die Fusionsereignisse an dem Kompartiment. Damit verdeutlicht sich die Tatsache, dass die Regulation dieser Prozesse essentiell ist für die erfolgreiche Etablierung und Aufrechterhaltung der Replikationsnische und somit auch für eine erfolgreiche Infektion von *M. tuberculosis*.

1.4 Das *Dictyostelium-M. marinum*-Infektionsmodell

Da die Tuberkulose eine Krankheit ist, die durch ein strikt humanpathogenes Bakterium verursacht wird, bleibt ihre Erforschung aus ethischen Gründen auf abgeleitete Infektionsmodelle beschränkt (Pozos & Ramakrishnan 2004). Das am häufigsten verwendete Modell, welches hauptsächlich der Untersuchung des Krankheitsverlaufs und der protektiven Immunabwehr-Mechanismen dient, ist das Maus-Modell (Orme 2003). Um jedoch zu verstehen, wie *M. tuberculosis* die alveolaren Makrophagen infiziert und seine Replikationsvakuole in ihnen etabliert, werden zellbasierte Infektionsmodelle herangezogen. In diesem Abschnitt wird das *Dictyostelium-Mycobacterium-marinum*-Modellsystem vorgestellt, das sich insbesondere durch seine einfache genetische und biochemische Manipulierbarkeit auszeichnet.

1.4.1 *Mycobacterium marinum*

Mycobacterium marinum ist ein naher Verwandter von *M. tuberculosis* und wurde erstmalig 1926 von Aronson aus der Leber und Milz von Fischen isoliert (Aronson 1927). Grundsätzlich ist *M. marinum* ein Pathogen von poikilothermen Tieren, weist daneben aber auch ein aquatisches Vorkommen auf (Leoni et al 1999, Slosarek et al 1994). Da es hauptsächlich bei Temperaturen von 25-35 °C und kaum noch bei 37 °C wächst (Clark & Shepard 1963, Leoni et al 1999), ist *M. marinum* in Bezug auf den Menschen ein opportunistisches Pathogen

(Parent et al 1995). Es parasitiert vor allem kühlere Bereiche des Körpers, wie z. B. die Haut. Mehrere phylogenetische Studien haben gezeigt, dass *M. marinum* besonders nah mit *Mycobacterium ulcerans* verwandt ist und dass die genomischen Nukleotidsequenzen beider Organismen zu 97% miteinander übereinstimmen (Stinear et al 2000, Tonjum et al 1998). In Bezug auf den *M. tuberculosis*-Komplex, der die Arten *M. tuberculosis*, *M. microti* und *M. bovis* umfasst, zeigt *M. marinum* eine 85%-ige Identität der genomischen Nukleotidsequenzen (Gey van Pittius et al 2006).

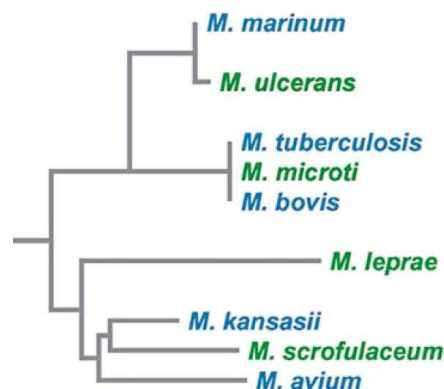


Abbildung 1.3: Phylogenetische Klassifikation ausgewählter Mykobakterien-Arten auf Grundlage der 16 S rRNA Sequenz. Quelle: verändert nach Stamm & Brown 2004, Microbes and Infection.

M. marinum entwickelt in den jeweiligen Wirten eine systemische granulomatöse Entzündung, die histologisch große Ähnlichkeit mit den *M. tuberculosis*-Granulomen hat (Pozos & Ramakrishnan 2004, Swaim et al 2006). Darüber hinaus kodieren beide Mykobakterien-Arten für das ESX-1-Sekretionssystem, mithilfe dessen sie Effektormoleküle durch die hydrophobe, impermeable Zellwand in das Zytosol der Wirtszelle transportieren können. In beiden Organismen führt die Deletion der darin enthaltenen Pathogenitätsinsel *region of difference 1* (RD1) zum Verlust der Virulenz (Gao et al 2004). Die Deletion von RD1 in *M. marinum* kann über die Insertion der selbigen aus *M. tuberculosis* komplementiert werden (Gao et al 2004). Gleiche Transkomplementationsstudien wurden auch für Gene durchgeführt, die für Proteine kodieren, die an der Synthese der mykobakteriellen Zellwand beteiligt sind (Gao et al 2003). Außerdem verfügen beide Organismen über den gleichen zentralen Virulenzmechanismus, die Inhibition der Phagosomenreifung. Sowohl *M. tuberculosis* als auch *M. marinum* schließen die V-ATPase und CathepsinD aus ihrem Kompartiment aus (El-Etr et al 2001, Hagedorn & Soldati 2007, Sturgill-Koszycki et al 1994) und residieren in nahezu neutralen Vakuolen (Dionne et al 2003, Gao et al 2003). Aufgrund dieser Ähnlichkeiten in den grundlegenden Mechanismen der Wirtszellmanipulation und der

allgemeinen Pathologie ist *M. marinum* ein adäquates Modell zur Untersuchung der Pathogenität von *M. tuberculosis* (Berg & Ramakrishnan 2012, Stamm & Brown 2004, Stinear et al 2008).

1.4.2 Der Modellorganismus *Dictyostelium*

Die Amöbe *Dictyostelium discoideum* ist ein ubiquitär, zumeist in Waldböden gemäßigter Klimazonen vorkommender, einzelliger Organismus. Als professioneller Phagozyt lebt *Dictyostelium* seit jeher von der Aufnahme und der endozytischen Prozessierung verschiedenartiger Mikroorganismen (Cosson & Soldati 2008). Somit sind in *Dictyostelium* die Mechanismen zur Bereitstellung von Makromolekülen für den eigenen Metabolismus und Abwehrmechanismen als Schutz vor pathogenen Mikroorganismen eng aneinander gekoppelt (Cosson & Soldati 2008, Greub & Raoult 2004). In seiner stammesgeschichtlichen Entwicklung (Abb. 1.4), die noch vor dem Ursprung des Tier- und Pflanzenreichs begann (Eichinger et al 2005), fand die Koevolution der bakteriellen Pathogenität sowie der entsprechenden Wirtszell-Abwehrmechanismen statt und ist bis heute konserviert (Greub & Raoult 2004). So ist anzunehmen, dass Bakterien während der Infektion humaner Phagozyten auf dieselben grundlegenden Mechanismen zurückgreifen, die sie in der Interaktion mit einzelligen Amöben entwickelt haben (Cosson & Soldati 2008).

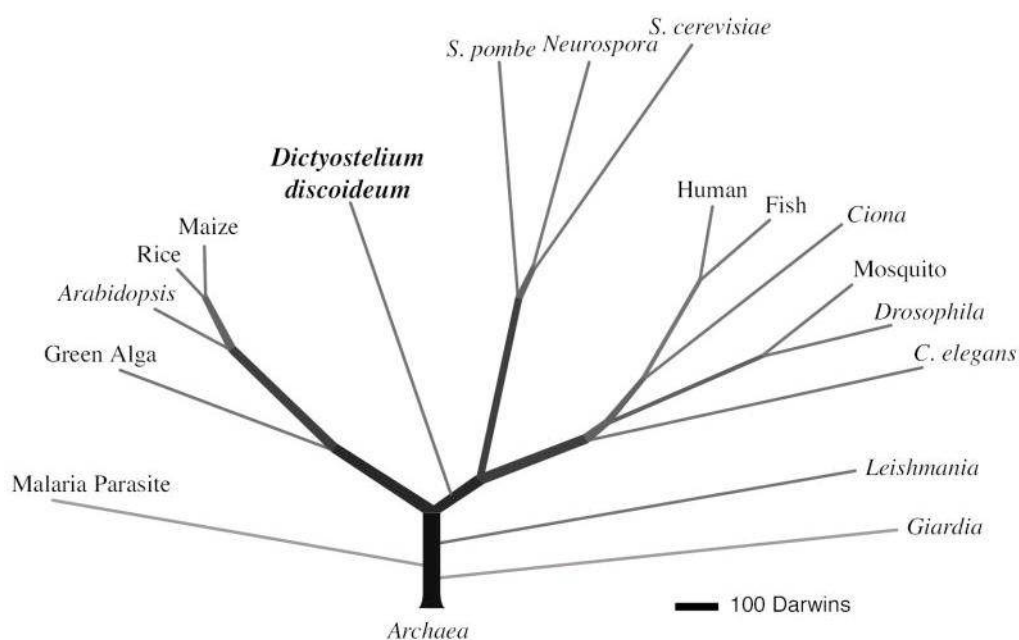


Abbildung 1.4: Phylogenetische Einordnung ausgewählter Modellorganismen und des Menschen auf Grundlage des Proteoms. Quelle: Eichinger et al 2005, Nature.

Zusätzlich zum evolutiven Aspekt sind die experimentellen Vorteile von *Dictyostelium* ein entscheidender Grund, warum sich die Amöbe als Modellorganismus durchgesetzt hat. Die Zellen können sowohl axenisch als auch auf Bakterienrasen bei Raumtemperatur kultiviert werden. Darüber hinaus wächst *Dictyostelium* in einer Flüssig-Massenkultur zu einer großen Zellzahl an. Diese ist eine optimale Grundlage für biochemische Versuche. Aufgrund ihres annotierten haploiden Genoms ist die Generierung von Deletionsmutanten besonders einfach und eine funktionale Analyse nahezu eines jeden Genprodukts möglich (Eichinger et al 2005, Noegel & Schleicher 2000).

Neben den klassischen Themen, die v. a. die Zellmotilität und Chemotaxis (King & Insall 2009), die Zytokinese (Robinson & Spudich 2004) sowie die Phagozytose betreffen (Maniak 2002, Maniak 2003), wurde *Dictyostelium* in den letzten zehn Jahren zunehmend als Modellorganismus zur Untersuchung der Interaktionen mit unterschiedlichen Pathogenen herangezogen (Bozzaro & Eichinger 2011, Clarke 2010, Steinert 2011). Hier fokussierten sich die Arbeiten hauptsächlich auf Bakterien, die schwerwiegende Infektionskrankheiten beim Menschen verursachen wie z. B. *Legionella* (Bozzaro et al 2013), *Pseudomonas* (Alibaud et al 2008), *Salmonella* (Sillo et al 2011) oder *Mycobacterium* (Hagedorn et al 2009, Hagedorn & Soldati 2007, Solomon et al 2003).

1.4.3 Phagozytose und Phagosomenreifung in *Dictyostelium*

Hinsichtlich der Phagozytose und der endolysosomalen Fusionsereignisse, die zur Ausbildung eines Phagolysosoms führen, weist *Dictyostelium* viele Übereinstimmungen mit humanen Phagozyten auf (Boulais et al 2010, Maniak 2002). Sofort nach Ausbildung eines Phagosoms fusioniert dieses mit frühen Endosomen und es kommt zur Anreicherung des putativen Kupfertransporters p80 (Ravanel et al 2001) sowie der V-ATPase (Clarke et al 2002). Während der pH-Wert des Phagosoms kontinuierlich abgesenkt wird, kommt es zur Fusion mit Lysosomen unter der Bildung eines Phagolysosoms. Die darin angereicherten lysosomalen Proteasen leiten die digestive Phase ein. Beendet wird diese Phase durch die Abführung der V-ATPase und der lysosomalen Proteine unter der Bildung eines reneutralisierten Postlysosoms (Carnell et al 2011, Clarke et al 2010). Die Ausbildung von Postlysosomen ist kennzeichnend für *Dictyostelium* und findet in humanen Phagozyten nicht statt (Huotari & Helenius 2011). Die Postlysosomen zeichnen sich durch eine Anreicherung des Membran-assoziierten Proteins Vacuolin aus (Carnell et al 2011). Dieses ist

möglicherweise an der Einleitung der Exozytose beteiligt, bei der der unverdaute Inhalt des Phagosoms an das extrazelluläre Milieu abgegeben wird (Lee & Knecht 2002). Die Exozytose schließt den endosomalen Transit ab (Jenne et al 1998, Lee & Knecht 2002). Im Falle eines Latex-Bead-haltigen Phagosoms dauert dieser etwa 90-120 min (Clarke et al 2010).

1.4.4 Infektionsverlauf von *M. marinum* in *Dictyostelium*

Die Abfolge der Ereignisse an der Vakuole von *M. marinum* in *Dictyostelium* ist eine andere als die am Latex-Bead-haltigen Phagosom. Das Pathogen ist in der Lage, die Reifung seiner Vakuole zu inhibieren und etabliert ein Kompartiment, in dem es proliferieren kann (Hagedorn & Soldati 2007, Solomon et al 2003). Damit rekapituliert das *Dictyostelium-M. marinum*-Modellsystem die Infektion von *M. tuberculosis* in Makrophagen (s. Abschnitt 1.3.2). In Abb. 1.5 sind die wichtigsten Ereignisse des Infektionsablaufs schematisch zusammengefasst. Zunächst wird *M. marinum* über Phagozytose von der Zelle aufgenommen. Sobald das Bakterium internalisiert wurde, reichern sich die V-ATPase und der putative Kupfertransporter p80 in der Membran der mykobakteriellen Vakuole an. Anders als p80 wird Vata jedoch sofort wieder abgeführt (Hagedorn & Soldati 2007). Da die Fusion mit Lysosomen inhibiert ist, sind lysosomale Proteasen wie beispielsweise CathepsinD im Kompartiment nicht nachweisbar (Hagedorn & Soldati 2007). Ab etwa sechs Stunden nach Infektion akkumuliert das Membran-assoziierte Protein Vacuolin an der *M. marinum*-Vakuole, wo es für die Replikation der Bakterien erforderlich ist (Hagedorn & Soldati 2007). Es wird angenommen, dass, sobald die Replikationsphase abgeschlossen ist, die Membran des Kompartiments aufbricht und die Bakterien ins Zytosol entlassen werden. Dieser Vorgang ist kennzeichnend für *M. marinum* (Hagedorn & Soldati 2007, Smith et al 2008, Stamm et al 2003), für *M. tuberculosis* gilt er jedoch noch als umstritten (Welin & Lerm 2012). Der Infektionszyklus von *M. marinum* in *Dictyostelium* wird durch den Austritt des Bakteriums aus seiner Wirtszelle mithilfe einer Aktin-basierten Struktur, dem *Ejectosome*, abgeschlossen (Hagedorn et al 2009).

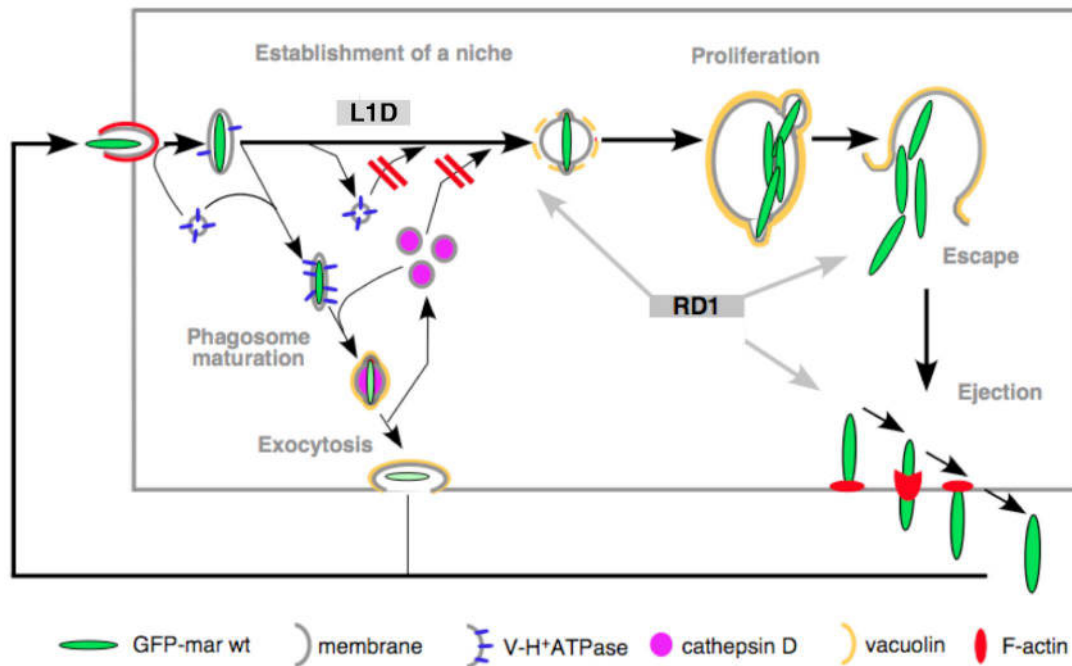


Abbildung 1.5: Infektionsverlauf von *M. marinum* in *Dictyostelium*.

M. marinum (GFP-mar wt) wird von der *Dictyostelium*-Zelle über Phagozytose aufgenommen. Während sich die V-ATPase transient in der Membran der Vakuole des Bakteriums anreichert, ist die Fusion mit Lysosomen inhibiert (*Establishment of a niche*). Des Weiteren akkumuliert Vacuolin an dem mykobakteriellen Kompartiment und leitet die Replikationsphase ein (*Proliferation*). Sobald sich die Bakterien vermehrt haben, gelangen sie ins Zytosol der Wirtszelle (*Escape*) und verlassen diese über eine Aktin-basierte Struktur (*Ejection*). Apathogene Mykobakterien wie *Mycobacterium smegmatis* und die avirulente Mutante *M. marinum* L1D sind nicht in der Lage, eine Replikationsvakuole zu etablieren. Ihre Phagosomen fusionieren mit V-ATPase-haltigen Endosomen und Lysosomen unter der Bildung von bakteriziden Phagolysosomen (*Phagosome maturation*). Die avirulente Mutante *M. marinum* Δ RD1 wird zwar nicht dem degenerativen Weg zugeführt, ist jedoch nicht in der Lage, zu replizieren und aus den Zellen auszutreten. Quelle: verändert nach Hagedorn et al 2009, Science.

Das apathogene Bakterium *M. smegmatis* und die avirulente *M. marinum*-Mutante L1D replizieren weder in *Dictyostelium* (Hagedorn & Soldati 2007, Solomon et al 2003) noch in murinen Makrophagen (Jordao et al 2008). L1D bezeichnet eine Mutation im Gen *mag24-1*, das infolge einer Insertion ausgeschaltet ist (Ramakrishnan et al 2000). *Mag24-1* ist Teil der *PE/PE-PGRS*-Gene, die für Glyzin-reiche Proteine mit unbekannter Funktion kodieren (Cole et al 1998). Es ist essentiell für die Inhibition der Phagosomenreife in *Dictyostelium* (Hagedorn & Soldati 2007) sowie für die Persistenz des Bakteriums in Granulomen von Zebrafischen (Ramakrishnan et al 2000). Die Deletionsmutante *M. marinum* Δ RD1 (vgl. Abschnitt 1.4.1) ist zwar in der Lage, die Fusion mit Lysosomen in *Dictyostelium* zu inhibieren, kann jedoch in ihrer Vakuole nicht replizieren und die Zellen über *Ejectosomes* verlassen (Hagedorn et al 2009). Es gibt Hinweise darauf, dass das im RD1-Lokus kodierte Protein ESAT-6 (*Early Secretory Antigenic Target 6*) membranolytische Aktivität hat und so die Translokation von *M. marinum* ins Zytosol ermöglicht (Gao et al 2004, Smith et al 2008). Sowohl in *Dictyostelium* als auch in anderen Phagozyten zeigen die Infektionsverläufe von

M. marinum und von den jeweiligen Mutanten eine grundlegende Übereinstimmung. Sie bestätigen damit den Modell-Charakter von *Dictyostelium*.

1.5 Rolle von Aktin in der Infektion mit Mykobakterien

Aktin ist das abundanteste Protein der eukaryotischen Zelle und in Form von Filamenten (F-Aktin) eine wichtige Komponente des Zytoskeletts. Umso weniger erstaunt es, dass Aktin auch in mehreren Phasen der Infektion mit Mykobakterien eine wichtige Rolle spielt. So reichert es sich beispielsweise deutlich bei der Phagozytose der Bakterien in der phagozytischen Tasche (*phagocytic cup*) an (Hagedorn et al 2009). Als Bestandteil des Zytoskeletts generiert es Kraft, die für die Internalisierung der Bakterien durch die Zelle benötigt wird (Insall & Machesky 2009). Aktin ist darüber hinaus der strukturgebende Anteil des *Ejectosomes*, über das pathogene Bakterien wie *M. tuberculosis* und *M. marinum* aus der *Dictyostelium*-Wirtszelle austreten können (Hagedorn et al 2009). Es ist noch unklar, ob und inwiefern die Bakterien den Mechanismus der Polymerisation des Aktins am Zellkortex für diesen Prozess nutzen (Hagedorn et al 2009). Arbeiten in murinen Makrophagen belegen jedoch deutlich, dass *M. marinum* das Wirtszellprotein für seine Zwecke verwendet. Sobald das Bakterium ins Zytosol der Zelle transloziert, polymerisiert es apikal an einer Seite die s. g. *actin tails* (Gouin et al 2005). Dabei handelt es sich um Kometenschweif-artige Aktinstrukturen, die die Bakterien im Zytosol vorwärtstreiben und möglicherweise die Zell-zu-Zell-Transmission begünstigen (Stamm et al 2003, Stamm et al 2005). In einer neueren Studie wurde ein Oberflächenprotein von *M. tuberculosis*, das HBHA (Heparin-bindendes Hämagglutinin), identifiziert, das die monomere Form von Aktin (G-Aktin) bindet (Esposito et al 2011). Dieses kann in Folge davon nicht zu der F-Form polymerisiert werden. Somit nimmt das Pathogen aktiv Einfluss auf die Reorganisation des Zytoskeletts der Wirtszelle (Esposito et al 2011, Menozzi et al 2006). Es wird vermutet, dass die Aktivität von HBHA die Motilität von *M. tuberculosis* im Zytosol begünstigt und das Pathogen über eine Zell-zu-Zell-Transmission in andere Organe gelangen kann (Esposito et al 2011).

1.6 Der *Nucleation-Promoting-Faktor* WASH

Neben der Rolle von Aktin als treibende Kraft für Prozesse wie Zellmotilität oder Phagozytose (Borisy & Svitkina 2000, Pollard & Borisy 2003) ist das Protein auch an

Fusions- und Abschnürungsprozessen an Endosomen beteiligt (Carnell et al 2011, Drengk et al 2003, Liebl & Griffiths 2009). Um diese spezifische Wirkungsweise von Aktin in der Zelle zu ermöglichen, muss die Polymerisation und Depolymerisation des Proteins zeitlich und lokal präzise reguliert werden. Diese Funktion wird von den *Nucleation-Promoting*-Faktoren (NPF) übernommen (Abb. 1.6). NPF binden und aktivieren über ihre konservierte CA-Domäne den generellen Polymerisationsinitiator-Komplex ARP2/3 (*Actin Related Protein 2/3*) und lokalisieren diesen an einem präexistierenden Aktinfilament. Darüber hinaus binden sie mithilfe der W-Domäne Aktinmonomere und führen diese dem ARP2/3-Komplex zu, von wo aus die Polymerisation der Filamente beginnt (Campellone & Welch 2010, Rotty et al 2013).

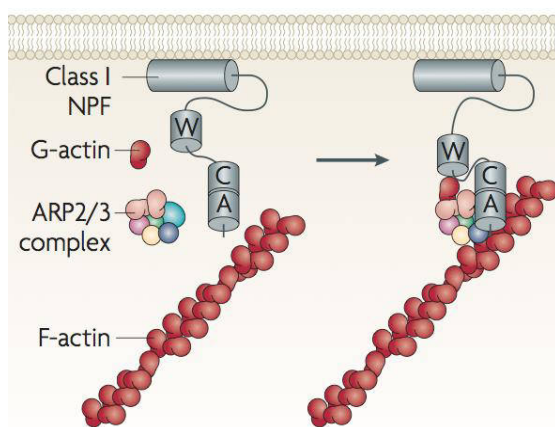


Abbildung 1.6: Wirkungsmechanismus von NPF. Der Membran-assoziierte NPF bindet und aktiviert über seine CA-Domäne den ARP2/3-Komplex. Anschließend führt es den ARP2/3-Komplex an ein präexistierendes Aktinfilament (*F-actin*) heran. Über die W-Domäne binden NPF Aktinmonomere (*G-actin*) und übertragen diese auf den ARP2/3-Komplex, von wo aus die Polymerisation der Aktinfilamente beginnt. Quelle: verändert nach Campellone & Welch 2010, Nature Reviews.

WASH (*Wiskott-Aldrich-syndrome protein and SCAR Homolog*) gehört zu einer von insgesamt vier Gruppen von NPF (Campellone & Welch 2010) und initiiert die Polymerisation von Aktin an Endosomen (Bear 2009). In *Dictyostelium*-Zellen spielt WASH an der Reneutralisierung der Lysosomen zu Postlysosomen eine Rolle (Abb. 1.7). Es akkumuliert an aziden Lysosomen und polymerisiert Aktin. Die dort vorhandene V-ATPase bindet das Aktin (Holliday et al 2000, Vitavska et al 2003) und wird in Form kleiner Vesikel von dem Lysosom abgeschnürt. Aktin bewirkt dabei möglicherweise die für die Verformung der Membran („Tubulation“) notwendige Kraft (Derivery et al 2009, Gomez & Billadeau 2009). Diese WASH-abhängigen Vesikelabschnürungen wurden auch in humanen Zellen beobachtet. Hier interagiert der NPF mit dem Retromer-Komplex (Derivery et al 2009, Gomez & Billadeau 2009, Harbour et al 2010, Hayes et al 2004) und ist an dem Proteintransport von frühen Endosomen zum trans-Golgi-Netzwerk beteiligt (Gomez & Billadeau 2009). Damit hat WASH und das davon generierte Aktin eine regulatorische Funktion bei der Sortierung von Proteinen im endolysosomalen Netzwerk.

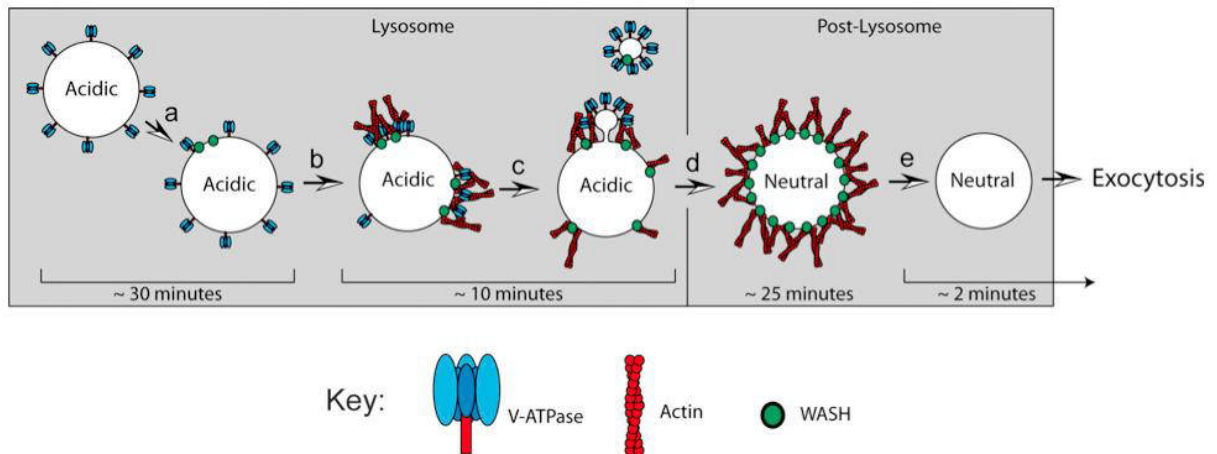


Abbildung 1.7: WASH leitet das Recycling der V-ATPase an Endosomen in *Dictyostelium* ein.

WASH akkumuliert in der Membran von V-ATPase-positiven Lysosomen und initiiert dort die Polymerisation von Aktin. Die V-ATPase bindet das so entstandene Aktin, welches die Ausstülpung und Abschnürung kleinster Vesikel, die mit der V-ATPase angereichert sind, bewirkt. Durch die Abführung der V-ATPase reneutralisiert das azide Lysosom zu einem Postlysosom. Dieses ist zunächst deutlich mit WASH und Aktin assoziiert. Sobald beide Proteine von dem Postlysosom dissoziiert sind, wird die Exozytose eingeleitet. Quelle: Carnell et al 2011, Journal of Cell Biology.

1.7 Zielsetzung

Da die Vorgänge am mykobakteriellen Kompartiment streng reguliert an den endosomalen Membrantransport der Wirtszelle gekoppelt bleiben, ist eine dortige Assoziation des *Nucleation-Promoting-Faktors* WASH denkbar. In der vorliegenden Arbeit sollte die Assoziation von WASH an der mykobakteriellen Vakuole in unterschiedlichen Phagozyten überprüft werden. Um die Rolle des NPFs und des davon generierten Aktins an der *M. marinum*-Vakuole in *Dictyostelium* zu untersuchen, sollten die Folgen der Deletion von WASH bzw. die Folgen der Depolymerisation des Aktins analysiert werden. Dazu wurden Änderungen in der Proteinkomposition der Membran des Kompartiments im Infektionsverlauf mithilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie verfolgt. Um die Dynamik der Prozesse darstellen zu können, sollten die Analysen auch Lebenszell-mikroskopische Untersuchungen miteinschließen. Zuletzt sollten die im *Dictyostelium*-*M. marinum*-Modellsystem gemachten Beobachtungen in murinen Phagozyten, die sowohl mit *M. marinum* als auch mit dem Humanpathogen *M. tuberculosis* infiziert wurden, überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 2.1: Geräte

Gerät	Modell	Hersteller / Lieferant
Analysenwaage	Handy H51	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Brutschränke		
- Mykobakterien- und <i>Dictyostelium</i> -Kultur	Innova 42	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- BV-2-Kultur	Innova CO-170	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- BV-2-Infektion	Heraeus	Thermo Fisher, Waltham, USA
Durchflusszytometer	Accuri C6	BD, Franklin Lakes, USA
Einfrierbehälter	Mr. Frosty	Thermo Fisher, Waltham, USA
Magnetrührer	combimag RCT	IKA, Staufen, Deutschland
Mikroskope		
- Lichtmikroskop	CKX41	Olympus, Hamburg, Deutschland
- Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	FluoView 1000	Olympus, Hamburg, Deutschland
- Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop	cellR Imaging System	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle	R-234	Sharp, Osaka, Japan
pH-Meter	pH Level 1	inoLab, Weilheim, Deutschland
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten	P2, P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe	Matrix	Thermo Fisher, Waltham, USA
Präzisionsspinzette	INOX 5	Dumont & Fils, Montignez, Schweiz
Präzisionswaage	PCB 1000-1	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland
Sterilbänke		
- <i>Dictyostelium</i> -Kultur	Kojair 2009	Kojair, Vilppula, Finnland
- BV-2-Kultur	Heraeus Herasafe	Thermo Fisher, Waltham, USA
Ultraschallbad	Sonorex Super	Bandelin, Berlin, Deutschland
Vakuumpumpe	Laboport	KNF, Freiburg, Deutschland
Vortexer	VF2	IKA, Staufen, Deutschland
Wasserbad		GFL, Burgwedel, Deutschland

Zählkammer	Neubauer-improved	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zentrifugen		
- Tischkühlzentrifuge	5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Tischzentrifuge	5415 D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Tischzentrifuge	5417	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Standzentrifuge	GS-6KR	Beckmann, Krefeld, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Spezifikation	Hersteller / Lieferant
Deckgläschen	12 mm, No.1	Assistent, Sondheim, Deutschland
Probenröhrchen für Durchflusszytometrie	12 x 75 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Glaskugeln	4 mm	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kryo-Röhrchen	1,5 ml	Thermo Fisher, Waltham, USA
Küvetten	Halb-Mikro-Einmalküvette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Latex-Beads	Fluorescein-gekoppelt, 1 µm	Polysciences, Warrington, USA
Kulturschälchen für Lebendzell-Mikroskopie	µ-Slide 8 well	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Objektträger	76 x 26 mm	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Parafilm	Parafilm M	Pechiney, Chicago, USA
Petri-Schalen	100 x 15 mm, viergeteilt	Thermo Fisher, Waltham, USA
Pipettenspitzen	10 µl / 200 µl / 1.000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße	1,5 µl / 2,0 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten	5 ml / 10 ml / 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Siebfilter	50 µm	Partec, Görlitz, Deutschland
Vakuum-Filter	0,22 µm, 500 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkultur-Flaschen	25 cm ² / 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkultur-Platten	24-Loch	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland BD, Franklin Lakes, USA
Zellkultur-Schalen	35 x 10 mm / 100 x 20 mm	BD, Franklin Lakes, USA
Zentrifugenröhrchen	15 ml / 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 2.3: Chemikalien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller / Lieferant
7H11 (Flüssig-Kultivierung von Mykobakterien)	BD, Franklin Lakes, USA
7H9 (Kultivierung von Mykobakterien auf Platten)	BD, Franklin Lakes, USA
Antibiotika	s. 2.2; Tabelle 2.7
Antikörper	s. 2.6.2; Tabelle 2.9, 2.10 und 2.11
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMEM (Medium für RAW-B-Zellen)	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
DPBS ohne Kalzium und Magnesium	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
D-Sorbitol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einbett-Medium , ProLong Gold	Life Technologies, Carlsbad, USA
Ethanol (100%)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fötales Kälberserum (FKS)	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
Gelatine , TypA, ~300 g Bloom	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glyzerol	BD, Franklin Lakes, USA
HEPES	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
HL5-C mit Glukose (<i>Dictyostelium</i> -Medium)	Formedium, Hunstanton, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
LatrunculinA (LatA)	Enzo, Farmingdale, USA
L-Glutamin (100x)	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
Lysotracker Red DND-99 (LT)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Natriumazid (NaN_3)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH, 50%)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
Neutralrot (NR)	Merck, Darmstadt, Deutschland
OADC (für Kultivierung von Mykobakterien)	BD, Franklin Lakes, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phalloidin (Alexa Fluor 488, 568 und 647)	Life Technologies, Carlsbad, USA
RPMI 1640 (mit stabilem Glutamin, BV-2-Medium)	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Trypsin	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
Tween 80	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.4 Lösungen, Puffer und Medien

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen und Puffer mit doppelt deionisiertem Wasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage der Firma TKA (Modell *GenPure*) angesetzt. Dieses Wasser wird im Folgenden als ddH₂O bezeichnet. Für sterile Anwendungen wurden hitzeunempfindliche Lösungen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Hitzesensitive Lösungen wurden steril-filtriert (Porengröße 0,22 µm).

Tabelle 2.4: Lösungen, Puffer und Medien

Lösung / Puffer / Medium	Bestandteile
Blockierlösung für Immunfluoreszenz-Färbung, 200 ml	0,2 g Gelatine 200 ml 1x PBS durch kurzes Erwärmen lösen 0,2 ml Triton X-100 nicht steril gehandhabt
Fixierlösung, 200 ml	8 g PFA 200 ml Sörensen-Puffer, 1x bei max. 60 °C lösen, aliquotieren, bei -20 °C lagern nicht steril gehandhabt
Lysispuffer, 200 ml	0,2 ml Triton X-100 200 ml PBS, 1x steril-filtrieren
PBS-Puffer (Phosphate-Buffered Saline), 10x, 1 l	80 g NaCl 2 g KCl 14,2 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ in 800 ml ddH ₂ O lösen mit NaOH auf pH 7,4 einstellen, mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen autoklavieren
Sörensen-Azid-Puffer, 200 ml	65 mg Natriumazid 200 ml Sörensen-Puffer, 1x
Sörensen-Puffer, 50x, 1 l	99,86 g KH ₂ PO ₄ 13,61 g Na ₂ HPO ₄ in 800 ml ddH ₂ O lösen mit NaOH auf pH 6 einstellen, mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen autoklavieren

Sörensen-Sorbitol-Puffer, 200 ml	0,73 g D-Sorbitol 200 ml Sörensen-Puffer, 1x
--	---

2.1.5 Software

Tabelle 2.5: Software

Software	Anwendung
Prism, v5.0b GraphPad, La Jolla, USA	- Auswertung aller Quantifizierungen - Darstellung aller Quantifizierungen
Excel, 2004 Microsoft, Redmond, USA	- Auswertung der FACS-Experimente - Auswertung der KBE-Experimente
FlowJo v7.6.3 Tree Star, Ashland, USA	- Auswertung der FACS-Experimente
ImageJ, v1,45s National Institutes of Health, USA	- Bildbearbeitung
Photoshop CS2 Adobe, San Jose, USA	- Bildbearbeitung - Bildzusammenstellung
FluoView v1.7b Olympus, Hamburg, Deutschland	- Bildaufnahme am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop
xcellence rt 1.2 Olympus, Hamburg, Deutschland	- Bildaufnahme und Bildbearbeitung am Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop
EndNote X.0.2 Thomson Reuters, New York, USA	- Literaturverwaltung

2.2 Organismen und Kultivierung

Alle Medien wurden mit ddH₂O angesetzt. Hitzesensitive Medien wurden steril-filtriert (Porengröße 0,22 µm). Fötale Kälberserum (FKS) wurde vor der Verwendung für 30 min auf 56 °C erhitzt, um Komplementfaktoren zu inaktivieren. Bis zur Verwendung erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

Tabelle 2.6: Medien

Medium	Bestandteile
Medium für <i>Dictyostelium</i>-Kultur (HL5-C) 1 l	26,55 g HL5-C-Pulver 1 l ddH ₂ O autoklavieren bei RT lagern

Medium für BV-2-Kultur, (RPMI) 500 ml	450 ml RPMI 1640 50 ml FKS bei 4 °C lagern
Medium für RAW-B-Kultur, (DMEM) 500 ml	450 ml DMEM 50 ml FKS 5 ml L-Glutamin 5 ml HEPES 5 ml Natriumpyruvat bei 4 °C lagern
Medium für Mykobakterien-Flüssigkultur, (7H9) (<i>M. marinum</i> und <i>M. smegmatis</i>) 1 l	4,7 g 7H9-Pulver 2 ml Glycerol 900 ml ddH ₂ O autoklavieren und abkühlen lassen 100 ml OADC 0,5 ml Tween 80 steril-filtrieren, dunkel bei 4 °C lagern
Medium für <i>M. tuberculosis</i>-Flüssigkultur, (7H9) 1 l	4,7 g 7H9-Pulver 800 ml ddH ₂ O autoklavieren und abkühlen lassen 200 ml OADC steril-filtrieren, dunkel bei 4 °C lagern
Kulturplatten für Mykobakterien, (7H11) 1 l	21 g 7H11-Pulver 5 ml Glycerol 900 ml ddH ₂ O autoklavieren, auf 50-55 °C abkühlen 100 ml OADC handwarm in viergeteilte Petrischalen gießen, dunkel bei 4 °C lagern

Tabelle 2.7: Antibiotika

Antibiotikum	Anwendung
Apramycin (50 mg/ml) Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	- Selektion von <i>M. marinum</i> L1D gfp (50 µg/ml)
Blasticidin , (10 mg/ml) InvivoGen, San Diego, USA	- Selektion der Ax2-wshA ⁻ -Zellen (5 µg/ml)
Gentamycin , (10 mg/ml) Formedium, Hunstanton, USA	- Selektion der VMC- bzw. VatM- GFP-Expression in Ax2-Zellen (beide 5 µg/ml)
Hygromycin „HygroGold“, (50 mg/ml) InvivoGen, San Diego, USA	- Selektion der GFP-WASH Expression in Ax2-wshA ⁻ -Zellen (20 µg/ml) - Selektion von <i>M. marinum</i> mCherry und <i>M. marinum</i> ΔRD1 gfp (50 µg/ml)

Kanamycin (50 mg/ml) Formedium, Hunstanton, USA	- Selektion von <i>M. marinum</i> gfp, <i>M. tuberculosis</i> gfp und <i>M. smegmatis</i> gfp (50 µg/ml)
Penicillin-Streptomycin-Lösung (100x) Life Technologies, Carlsbad, USA	- Zugabe zum <i>Dictyostelium</i> -, BV-2- und RAW-B-Kulturmedium (1x; 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)

2.2.1 *Dictyostelium discoideum*

Der in dieser Arbeit verwendete *Dictyostelium discoideum* Wildtyp-Stamm Ax2 wurde erstmals von Watts und Ashworth 1970 beschrieben (Watts & Ashworth 1970). Mindestens drei verschiedene Mutationen befähigen die Zellen zum axenischen Wachstum (Williams 1978, Williams et al 1974). Das bietet den Vorteil, dass ein definiertes Medium verwendet werden kann und die Zellkultur einfach zu handhaben ist. Die Ax2-Zellen wurden von dem *Dictybase* Konsortium (www.dictybase.org) bezogen. Sie wurden adhärent in 10 ml HL5-C-Medium (s. Tabelle 2.6) in 10 cm-Kulturschalen bei 22 °C unter sterilen Bedingungen kultiviert und alle zwei bis drei Tage verdünnt. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen über mehrmaliges leichtes Schlagen der Kulturschale gegen die Tischkante vom Plattenboden gelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml frischem HL5-C aufgenommen und je nach Bedarf an Zellzahl wurde ein entsprechendes Volumen in neue Kulturschalen oder 24-Loch-Platten überführt.

Die WASH-Deletionsmutante, im Nachfolgenden als „wshA⁻“ bezeichnet, wurde im Labor von Dr. Robert Insall (BEATSON Institute, Glasgow, GB) durch gezielte Genmodifikation ausgehend vom Ax2-Wildtyp erstellt (Carnell et al 2011). Dabei wurde das für WASH kodierende Gen (Dictybase-Katalognummer: DDB_G0292878) über homologe Rekombination durch eine Blastocidin-Resistenzkassette ersetzt. Die wshA⁻-Zellen wurden wie der Wildtyp, mit zusätzlicher Zugabe von Blastocidin kultiviert (Tabelle 2.7). Die Genkomplementierung erfolgte über die Transfektion der wshA⁻-Zellen mit dem extrachromosomalen Plasmid pDM448 (Veltman et al 2009). Dieses kodiert für das GFP-WASH-Fusionsprotein (Park et al 2013). Die transformierten Zellen wurden über die Zugabe von Hygromycin selektiert (Tabelle 2.7).

Die konstitutiv VacuolinA-Myc-Cofilin exprimierenden Ax2-Zellen, im Nachfolgenden „VMC-Zellen“ genannt, wurden freundlicherweise von Dr. Markus Maniak (Universität Kassel,

Deutschland) überlassen. Hierbei wurde die für VMC-kodierende DNA-Sequenz an den C-Terminus von VacuolinA im pA15-vacuolinA-GFP-Vektor, der eine Gentamycin-Resistenz trägt, ligiert. Eine detaillierte Beschreibung der Zusammensetzung des DNA-Konstrukts ist der Publikation von (Drengk et al 2003) zu entnehmen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden außerdem Ax2-Zellen verwendet, die konstitutiv das Fusionsprotein aus der Untereinheit VatM der vakuolaren Protonen-ATPase (V-ATPase) und GFP exprimieren. Diese Zellen wurden von Dr. Thierry Soldati (Universität Genf, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

Für die Langzeitaufbewahrung wurden Zellstabilate generiert, die im flüssigen Stickstoff gelagert wurden. Im Einzelnen wuchsen *Dictyostelium*-Zellen bis zu einer etwa 80%-igen Dichte auf der Kulturplatte an (ca. $1,8 \times 10^7$ Zellen). Das Medium wurde abgenommen, die Zellen anschließend von der Platte gelöst, in 10 ml frischem HL5-C aufgenommen und sedimentiert (500 xg, 5 min, 22 °C). Das Pellet wurde in 2 ml HL5-C, das 10% DMSO enthielt, gelöst und auf zwei Kryo-Röhrchen verteilt. Die Zugabe des DMSO verhindert dabei die Bildung von Eiskristallen beim Gefriervorgang. Die Aliquots wurden in Einfrierbehälter überführt, die eine gleichmäßige Abkühlgeschwindigkeit von 1 °C/min gewährleisten. Anschließend wurden sie 24 h bei -80 °C und dauerhaft im flüssigen Stickstoff aufbewahrt.

2.2.2 BV-2-Zellen

Die murine Mikroglia-Zelllinie BV-2 wurde von Dr. Marc Ballivet (Universität Genf, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Ihr Entstehen geht auf die Arbeiten von Dr. Elisabetta Blasi zurück und umfasst die Immortalisierung primärer Mikroglia-Zellen aus der Maus durch Infektion mit einem Retrovirus (Blasi et al 1990). Die Zelllinie ist im biologischen Ressourcenzentrum *Interlab Cell Line Collection* (ICLC) unter der Katalognummer ATL03001 hinterlegt. Die BV-2-Zellen wurden adhärent in 7 ml RPMI-Medium (s. Tabelle 2.6) in 25 cm² Kulturflaschen bei 37 °C und 5% CO₂ unter sterilen Bedingungen kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde die Kultur verdünnt. Dazu wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen mit 5 ml DPBS gewaschen und anschließend in 1 ml Trypsin 4 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kulturflasche leicht gegen die Tischkante geklopft, um die restlichen adhärennten Zellen zu lösen. Durch die Zugabe von 9 ml RPMI-Medium wurde die Aktivität des Trypsins gestoppt und die Zellen in den gewünschten Verdünnungen in neue Kulturflaschen oder 24-Loch-Platten überführt. Die BV-2-Zellen wurden ähnlich wie die *Dictyostelium*-Zellen (vgl.

2.2.1) kryokonserviert. Es wurden 5×10^6 Zellen pro Aliquot verwendet, die in 1 ml RPMI und 10% DMSO gelöst wurden.

2.2.3 RAW-B-Zellen

Bei den RAW-B-Zellen handelt es sich um eine leukämische Makrophagen-Zelllinie aus der Maus, die von dem Ressourcenzentrum *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen wurde. Die Kultur von RAW-B-Makrophagen erfolgte durch Anna Geffken in der Arbeitsgruppe von Dr. Ulrich Schaible am FZ Borstel, Deutschland. Die Zellen wuchsen adhärent in 8 ml DMEM (s. Tabelle 2.6) in 25 cm² Kulturflaschen bei 37 °C und einer 7,5%-haltigen CO₂-Atmosphäre.

2.2.4 *Mycobacterium marinum*

Der Wildtyp-Stamm „M“ von *Mycobacterium marinum* sowie die davon abgeleiteten Mutanten *M. marinum* Δ RD1 und *M. marinum* L1D stammten aus dem Labor von Dr. Lalita Ramakrishnan (Universität Washington, USA). Der M-Stamm ist im biologischen Ressourcenzentrum ATCC unter der Katalognummer BAA-535 hinterlegt und wurde 1992 aus Hautläsionen eines Patienten des *Moffett Hospitals*, San Francisco, USA isoliert. Die Mutante *M. marinum* Δ RD1 zeichnet sich durch eine Deletion der *Region of Difference 1* aus, einer Folge von neun Genen, die in allen virulenten Mykobakterien-Stämmen vorhanden ist (Abdallah et al 2007). Durch eine homologe Rekombination wurde der RD1-Lokus durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ausgetauscht (Volkman et al 2004). L1D ist eine Mutante von *M. marinum* bei der die Kanamycin-Resistenzkassette in das Gen *mag24-1* inseriert wurde (Ramakrishnan et al 2000). Zur Generierung von fluoreszenten Stämmen wurde der Wildtyp mit dem extrachromosomalen Plasmid pMSP12::gfp transformiert (Volkman et al 2004). Dieses trägt eine Kanamycin-Resistenzkassette und kodiert für das grünfluoreszierende Protein (GFP), das durch den konstitutiven Promotor *msp12* (*macrophage strong promoter 12*) reguliert ist (Chan et al 2002). *M. marinum* Δ RD1 und *M. marinum* L1D wurden mit Derivaten des pMSP12::gfp Plasmids transformiert, die entweder eine Hygromycin- bzw. eine Apramycin-Resistenzkassette enthielten (Cosma et al 2006). Es wurde auch ein rotfluoreszierender Wildtyp-Stamm verwendet, der das extrachromosomale Plasmid

pCHERRY3 (Plasmiddatenbank *addgene*; Katalognummer: 24659) trug und für eine Hygromycin-Resistenz kodierte.

Der Wildtyp und alle Mutanten von *M. marinum* wurden steril in 12-20 ml 7H9-Medium (Tabelle 2.6) in 50 ml Glaskolben bei 32 °C und 120 rpm schüttelnd unter S2-Laborbedingungen kultiviert. Um ein Klumpen der Bakterien möglichst zu vermeiden, enthielt das Medium 0,05% Tween 80 und der Kultur wurden außerdem ca. 20-30 Glaskugeln mit einem Durchmesser von je 4 mm hinzugefügt. Von allen Mutanten von *M. marinum* wurden Aliquots für die Langzeitlagerung bei -80 °C erstellt. Dazu wurden 100 ml der jeweiligen Kultur bis zur stationären Wachstumsphase kultiviert, sodass die bei 600 nm gemessene optische Dichte (OD_{600nm}) ca. 3 betrug. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3.000 xg, 20 min, 4 °C) und das Pellet wurde in 6 ml 7H9, das 50% Glyzerin enthielt, resuspendiert. Die Bakterien wurden anschließend auf sechs Kryo-Röhrchen verteilt und bei -80 °C langfristig gelagert. Von den häufig verwendeten fluoreszierenden *M. marinum* gfp und *M. marinum* mCherry Bakterien wurden Aliquots vorbereitet, die ausschließlich für Infektionen verwendet wurden. Dazu wuchsen jeweils 100 ml der entsprechenden Kultur bis zu einer OD_{600nm} von 1 an. Diese wurde anschließend abzentrifugiert (3.000 xg, 20 min, 4 °C) und das Pellet wurde in 90 ml 7H9, das ebenfalls 1:1 mit Glyzerin vermischt war, gelöst. Je 1 ml der Suspension wurde in 2 ml-Reaktionsgefäße pipettiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.5 *Mycobacterium smegmatis*

Mycobacterium smegmatis mc2 155 wurde freundlicherweise von Dr. Gareth Griffiths (Universität Oslo, Norwegen) zur Verfügung gestellt und ist bei ATCC unter der Katalognummer 700084 hinterlegt. Es handelt sich um ein Isolat aus menschlichem Smegma und besitzt gegenüber anderer *M. smegmatis* Subspezies den Vorteil, dass es sich sehr effizient transformieren lässt. Der in dieser Arbeit verwendete Stamm wurde mit pMSP12::gfp transformiert (Volkman et al 2004) und über Kanamycin selektiert. *M. smegmatis* gehört wie *M. marinum* zu den Organismen der Risikogruppe 2 und beide Kultivierungen sind identisch.

2.2.6 *Mycobacterium tuberculosis*

Der in dieser Arbeit verwendete Wildtyp-Stamm H37Rv von *Mycobacterium tuberculosis* wurde im Labor von Dr. Ulrich Schaible (FZ Borstel, Deutschland) von Anna Geffken kultiviert. Ursprünglich wurde er von Dr. Tanya Parish (Queen Mary University of London, GB) zur Verfügung gestellt. Der Stamm wurde mit einem extrachromosomalen Plasmid transformiert, das für ein konstitutiv exprimiertes GFP kodiert und eine Kanamycin-Resistenzkassette trägt. Die Bakterien wurden steril in 7H9-*Mtb*-Medium (Tabelle 2.6) in 25 cm²-Kulturflaschen bei 37 °C unter S3-Laborbedingungen kultiviert.

2.3 Infektionen

Für Infektionsversuche mit *Mycobacterium marinum* (Abschnitt 2.3.1 und 2.3.2) dienen Bakterien-Aliquots in Glycerin, die bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt wurden (vgl. 2.2.4). Dazu wurde ca. eine Woche vor der geplanten Infektion ein Mykobakterien-Aliquot in 9 ml 7H9-Medium verdünnt und die Bakterien abzentrifugiert (3.000 xg, 5 min, 22 °C) um das Glycerin abzunehmen. Das Pellet wurde in 10 ml frischem Medium gelöst, sodass die OD_{600nm} ca. 0,1 betrug. Die Bakterien wurden bei 32 °C und 120 rpm schüttelnd inkubiert. Nach 24 h wurde die Kultur mit 7H9 auf 20 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und das Wachstum der Mykobakterien weiterhin täglich über eine Messung der OD überprüft. Sobald die *M. marinum*-Kultur nach ca. 4 d die logarithmische Wachstumsphase erreicht hat, wurden die Bakterien täglich verdünnt (OD_{600nm} von 0,2-0,4 in einem Gesamtvolumen von 15 ml).

Für Infektionsversuche mit *Mycobacterium tuberculosis* wurden Kryoconservate der Bakterien verwendet, die sechs Tage vor der Infektion in Kultur gebracht wurden. Nach vier Tagen in Kultur wurden die Bakterien 1:10 in frischem 7H9-*Mtb*-Medium verdünnt und weitere zwei Tage bis zur Verwendung kultiviert.

2.3.1 Infektion von *Dictyostelium*-Zellen mit *M. marinum*

Etwa 15 h vor der Infektion wurde die OD_{600nm} der Mykobakterien-Flüssigkultur auf 0,25 in 18 ml Gesamtvolumen eingestellt. Anschließend wurden $2,5 \times 10^7$ *Dictyostelium*-Zellen in einer 10 cm-Kulturschale ausgesät. Vor und während der Infektion wurde ein HL5-C-Medium

verwendet, das weder Penicillin noch Streptomycin enthielt. Kurz vor der Infektion wurde erneut die OD der Mykobakterien gemessen und betrug i. d. R. 0,8-1,0. Um die größeren Mykobakterien-Aggregate zu entfernen, wurde die gesamte Kultur durch einen 50 µm Filter pipettiert und die OD_{600nm} des Durchflusses bestimmt. Von der Höhe der OD_{600nm} wurde auf die Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) pro Volumen und somit der Bakterienzahl pro 1 ml geschlossen. Der Tabelle (Tabelle 2.8) wurde von Dr. T. Soldati zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.8: OD_{600nm}-KBE-Relation

OD _{600nm}	KBE
0,60	0,9 x 10 ⁸
0,70	1,1 x 10 ⁸
0,80	1,2 x 10 ⁸
0,85	1,5 x 10 ⁸
0,90	1,7 x 10 ⁸
0,95	1,8 x 10 ⁸
1,00	1,9 x 10 ⁸

Es wurde angenommen, dass eine konfluent bewachsene *Dictyostelium*-Kulturschale, die einen Durchmesser von 10 cm hat, 5 x 10⁷ Zellen fasst. Da für die Infektion eine *multiplicity of infection* (MOI) von 20 Bakterien pro Zelle gewählt wurde, wurden insgesamt 1 x 10⁹ Mykobakterien pelletiert (3.000 xg, 5 min, 25 °C) und in 10 ml HL5-C aufgenommen. Das Medium in der *Dictyostelium*-Kulturschale wurde abgenommen und die *M. marinum*-Suspension auf die Zellen gegeben. Die Schale wurde mit Parafilm verschlossen und die Bakterien wurden zweimal auf die *Dictyostelium*-Zellen abzentrifugiert. Dieses ermöglicht eine schnelle und synchrone Infektion möglichst vieler Zellen. Als Infektions-Startzeit, wurde der Beginn der Zentrifugation festgelegt, 0 hpi (*hours post infection*). Zwischen den beiden Zentrifugationsschritten, wurden die Kulturschalen kreuzweise geschwenkt, um die Bakterien wieder gleichmäßig über den Zellen zu verteilen. Anschließend wurden die Kulturschalen 15 min bei 25 °C inkubiert, damit die sich evtl. vom Plattenboden gelösten Zellen wieder absinken konnten und Zeit hatten, die Bakterien zu phagozytieren. Nach Ablauf der Inkubation wurden die extrazellulären Bakterien möglichst vollständig von der Platte gewaschen. Dazu wurde das überstehende Medium mit einer serologischen 10 ml Pipette abgezogen und die Zellen mit 7 ml frischem HL5-C-Medium überschichtet. Die Prozedur wurde mindestens fünfmal wiederholt bis nur vereinzelt extrazelluläre Mykobakterien vorkamen. Zuletzt wurden 10 ml HL5-C zu den Zellen gegeben und diese bei 25 °C inkubiert. Nach Ablauf von 4 h wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen und in 10 ml Medium von

der Kulturschale gelöst. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels einer Zählkammer wurden für die meisten Experimente 6×10^4 Zellen auf je ein Deckgläschen, was zuvor in eine 24-Loch-Platte gelegt wurde, pipettiert und das Medium auf je 0,5 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden zum gegebenen Zeitpunkt, aber nicht später als 8 hpi, fixiert. Für die Analyse später Infektionszeitpunkte (24-26 hpi) wurden nur 2×10^4 infizierte Zellen auf Deckgläschen ausgesät.

Für die Untersuchung der Lokalisation von GFP-WASH (Abschnitt 3.2, Abb. 3.2) wurden sehr frühe Zeitpunkte in der Infektion analysiert (10 mpi sowie 1 und 3 hpi). Um den Infektionsablauf zu erleichtern, wurden 15 h vor der Infektion je 2×10^4 Zellen bereits auf Deckgläschen, die zuvor in eine 24-Loch-Platte gelegt wurden, ausgesät. Es wurde angenommen, dass ein voll bewachsenes 12 mm-Deckgläschen etwa 7×10^4 Zellen fasst. Es wurde dieselbe MOI gewählt wie auch für die Infektionen in 10 cm-Kulturschalen und die Mykobakterien wurden auf die gleiche Weise vorbereitet (s. o.) und anschließend in einem Volumen von je 0,5 ml auf die Deckgläschen pipettiert. Die Bakterien wurden auf die Zellen zentrifugiert (je 500 xg, 2 min, 25 °C), bis 10 mpi bei 25 °C inkubiert und anschließend ein Teil der Zellen fixiert. Für die späteren Infektionszeitpunkte (1, 3, 6 und 24 hpi) wurden die Deckgläschen mindestens fünfmal gewaschen. Dabei wurde das Medium jedes Mal steril mit einer Vakuumpumpe abgenommen und die Zellen mit 0,5 ml frischem Medium überschichtet. Die Zellen für den 6 und 24 hpi-Zeitpunkt wurden bei 4 hpi erneut zweimal gewaschen.

2.3.2 Infektion von BV-2-Zellen mit *M. marinum*

Die Infektion von BV-2-Zellen mit *M. marinum* erfolgte ausschließlich auf Deckgläschen, die in einer 24-Loch-Platte verteilt waren. Auch hier wurden 15 h vor der Infektion je 2×10^4 Zellen auf 12 mm-Deckgläschen ausgesät, wobei das verwendete RPMI-Medium kein Antibiotikum enthielt. Die OD der Mykobakterien-Flüssigkultur wurde auf 0,25 eingestellt. Die für die Infektion verwendete MOI betrug 2, wobei auch hier angenommen wurde, dass ein voll bewachsenes Deckgläschen 7×10^4 Zellen enthält. Die Mykobakterien wurden zweimal (500 xg, 2 min, 25 °C) auf die Zellen zentrifugiert. Anschließend folgte die Inkubation der infizierten Zellen bei 32 °C und 5% CO₂. Bei 1 hpi wurden die extrazellulären Bakterien mindestens zweimal mittels einer Vakuumpumpe gewegewaschen, bevor die Zellen erneut bis zur weiteren Prozessierung bei 32 °C und 5% CO₂ inkubiert wurden.

2.3.3 Infektion von RAW-B-Zellen mit *M. tuberculosis*

Die Infektion von RAW-B-Zellen mit *M. tuberculosis* wurde von Anna Geffken und Kristine Hagens in der AG von Prof. U. Schaible am FZ Borstel unter S3-Laborbedingungen durchgeführt. Dazu wurden am Vortag der Infektion je 2×10^5 Zellen auf Deckgläschen, die zuvor in eine 24-Loch-Platte gelegt wurden, ausgesät. Am Tag der Infektion wurde die Mykobakterien-Kultur pelletiert (4.000 U, 10 min, 25 °C), einmal mit DPBS gewaschen und in DPBS resuspendiert. Um Bakterienaggregate möglichst aufzulösen, wurde die Kultur durch eine 0,4 µm breite Kanüle gedrückt. Zu 100 µl Paraformaldehyd (4% in DPBS) wurden 900 µl der Bakteriensuspension pipettiert und die optische Dichte (OD_{580nm}) bestimmt. Es wurde davon ausgegangen, dass bei einer OD_{580nm} von 0,1 ca. 5×10^7 Bakterien pro 1 ml Medium vorhanden sind. Um final eine MOI von 5 zu erreichen, wurde eine entsprechende Bakterienzahl pelletiert. Dazu wurde angenommen, dass ein mit RAW-B-Makrophagen bewachsenes Deckgläschen 2×10^5 Zellen fasst. Anschließend folgte die Zentrifugation der Mykobakterien auf die Zellen (500 xg, 5 min, 25 °C) während zeitgleich der Infektionszeitpunkt 0 hpi festgelegt wurde. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C und 7,5% CO₂ wurden die extrazellulären Bakterien abgenommen und die infizierten Zellen mit je 0,5 ml frischem DMEM-Medium überschichtet und bis zur weiteren Prozessierung wie gewohnt im Brutschrank inkubiert.

2.4 Beladen infizierter BV-2- und RAW-B-Zellen mit Lysotracker

Lysotracker Red (LT) ist ein basischer, membranpermeabler Stoff, der vornehmlich in aziden Vakuolen wie z. B. Lysosomen akkumuliert. Dort erfolgt die Protonierung des LT, wodurch dieser rotfluoreszentes Licht emittiert. Er wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, um azide mykobakterielle Kompartimente sichtbar zu machen. Die auf Deckgläschen infizierten BV-2- und RAW-B-Zellen wurden 20 min vor der Exposition in LatrunculinA-haltigem (LatA) bzw. DMSO-haltigem (DMSO-Kontrolle) Medium mit LT beladen (75 nM LT in RPMI- bzw. DMEM-Medium). Anschließend wurde das LT-haltige Medium abgenommen und durch LatA- bzw. DMSO-haltiges Medium ausgetauscht. LT kann mithilfe von PFA fixiert werden, sodass die rote Fluoreszenz erhalten bleibt.

2.5 Exposition in LatrunculinA (LatA)-haltigem Medium

2.5.1 Exposition infizierter *Dictyostelium*-Zellen in LatA-haltigem Medium

Das für *Dictyostelium*-Experimente verwendete LatA wurde in Ethanol (100%) gelöst (100 µg in 100 µl), aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. In allen durchgeführten Experimenten wurde das LatA in der gleichen Konzentration, 2,1 µg LatA pro 1 ml HL5-C-Medium, eingesetzt, was einer Molarität von 5 µmol/l entsprach. Bei 6 hpi wurden je 150 µl LatA-haltiges Medium pro Deckgläschen auf die Zellen pipettiert und unterschiedlich lange (15-120 min) bei 25 °C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen sofort fixiert. Parallel zu der Exposition in LatA-haltigem Medium wurden in jedem Experiment Kontrollzellen in gleicher Weise Ethanol-haltigem Medium ausgesetzt (0,21% Ethanol in HL5-C-Medium). Für Langzeitversuche wurden *Dictyostelium*-Zellen gleichermaßen bei 6 hpi für 120 min mit LatA-behandelt. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 0,5 ml Medium gewaschen und bis zur Fixierung bei 24 hpi in HL5-C-Medium (ohne Zusätze) bei 25 °C inkubiert. Zur Untersuchung später Infektionszeitpunkte wurden infizierte Zellen bis 24 hpi auf Deckgläschen kultiviert und die Exposition in LatA-haltigem Medium erfolgte in gleicher Weise wie zum frühen Zeitpunkt bei 6 hpi. Die Exposition von *Dictyostelium* in LatA-haltigem Medium während der Lebendzell-Mikroskopie wird im Abschnitt 2.6 beschrieben. Ebenso eine solche während der KBE-Experimente wird in Abschnitt 2.7 und während der durchflusszytometrischen Experimente in Abschnitt 2.8. beschrieben.

2.5.2 Exposition infizierter BV-2- und RAW-B-Zellen in LatA-haltigem Medium

Für Experimente mit Säugerzellen wurde LatA in DMSO gelöst (100 µg in 100 µl) und im Vergleich zu den *Dictyostelium*-Versuchen (Abschnitt 2.4.1) doppelt konzentriert verwendet (10 µM). Die infizierten Zellen wurden bis 2 bzw. 4 hpi auf Deckgläschen inkubiert und anschließend 30 min LatA-haltigem Medium (RPMI bzw. DMEM) ausgesetzt. Danach erfolgte sofort die Fixierung der Zellen. Parallel zu den LatA-behandelten Zellen wurden zwei verschiedene Kontrollen gemacht. Zum einen wurde eine Medium-Kontrolle mitgeführt, in der die BV-2-Zellen nur in RPMI und die RAW-B-Zellen nur in DMEM inkubiert wurden sowie eine DMSO-Kontrolle, in der die Zellen nur DMSO-haltigem Medium ausgesetzt waren (0,42% DMSO in RPMI bzw. DMEM). Die Kontrollen wurden ansonsten in gleicher Weise behandelt wie der LatA-Ansatz.

2.6 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse

2.6.1 Fixierung infizierter Zellen

Für sämtliche Immunfluoreszenz-Versuche wurden sowohl *Dictyostelium*-, als auch BV-2- und RAW-B-Zellen in einer 4%-igen PFA-Lösung in Sörensen-Puffer (Fixierlösung s. Tabelle 2.4) fixiert. Dazu wurden die mit den jeweiligen Zellen bewachsenen Deckgläschen mithilfe einer Präzisionspinzette in 24-Loch-Platten überführt, die mit je 0,5 ml der PFA-Lösung (4 °C) gefüllt waren. Die Platten wurden für 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Fixierlösung abgenommen und je 1 ml PBS auf die Deckgläschen gegeben. Diese wurden bis zur Verwendung in der Immunfluoreszenz-Färbung bei 4 °C aufbewahrt.

2.6.2 Verwendete Antikörper und Phalloidin

Tabelle 2.9: Primäre Antikörper für Immunfluoreszenz-Analysen von *Dictyostelium*-Zellen

Antikörper (Klon)	Spezies / Klonalität / Verdünnung	Bezugsquelle
α -Calmodulin	Kaninchen / PK / 1:1.000	Dr. Thierry Soldati, Universität Genf, Schweiz
α -C-Myc (9E11)	Maus / MK / 1:10	Santa Cruz Biotechnology, # sc-47694
α -GFP	Kaninchen / PK / 1:500	MBL, Woburn, USA # 598
α -p80 (H161)	Maus / MK / 1:10	Dr. Pierre Cosson, Universität Genf, Schweiz,
α -VatA (221.35.2)	Maus / MK / 1:10	Dr. Markus Maniak, Universität Kassel, Deutschland

PK = polyklonal / MK = monoklonal

Tabelle 2.10: Primäre Antikörper für Immunfluoreszenz-Analysen muriner Zellen

Antikörper (Klon)	Spezies / Klonalität / Verdünnung	Bezugsquelle
α -LAMP-1	Kaninchen / PK / 1:100	Abcam, Cambridge, UK, # ab24170
α -LAMP-2 (GL2A7)	Ratte / MK / 1:10	Hybridoma Bank, Universität Iowa, USA
α -WASH1	Kaninchen / PK / 1:100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, # HPA002689

PK = polyklonal / MK = monoklonal

Tabelle 2.11: Sekundäre Antikörper und Phalloidin

Antikörper* / Phalloidin	Spezies / Verdünnung
α -Kaninchen Alexa Fluor 488	Ziege / 1:1.000
α -Kaninchen Alexa Fluor 568	Ziege / 1:1.000
α -Kaninchen Alexa Fluor 647	Huhn / 1:500
α -Maus Alexa Fluor 568	Ziege / 1:1.000
α -Maus Alexa Fluor 647	Huhn / 1:500
α -Ratte Alexa Fluor 594	Ziege / 1:1.000
Phalloidin Alexa Fluor 568	1:500
Phalloidin Alexa Fluor 647	1:200

* Alle Antikörper waren polyklonal und wurden von Life Technologies, Carlsbad, USA bezogen.

2.6.3 Immunfluoreszenz-Färbung

Die Immunfluoreszenz-Färbung der in PFA-Lösung fixierten Zellen erfolgte für alle drei Zell-Typen, (*Dictyostelium*, BV-2 und RAW-B) nach dem gleichen Protokoll. Dazu wurden die bei 4 °C in PBS gelagerten und mit den jeweiligen Zellen bedeckten Deckgläschen mithilfe einer Präzisionsspinzette in eine weitere 24-Loch-Platte überführt, in die jeweils 1 ml Blockierlösung (s. Tabelle 2.4) vorgelegt wurde. Die Blockierlösung enthielt Gelatine, die während einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur (RT) freie und unspezifische Bindungsstellen absättigen konnten. Das hat den Vorteil, dass die jeweiligen Epitope mit höherer Stringenz gebunden werden konnten. Während der Inkubationszeit wurde eine Dunkelkammer vorbereitet, in der ein Parafilm-Streifen und ein feuchtes Papiertuch gelegt wurden. Die jeweiligen primären Antikörper wurden in der für sie spezifischen Verdünnung zu der Blockierlösung gegeben und in 30 μ l-Aliquots auf den Parafilm-Streifen pipettiert. Die Deckgläschen wurden mit der zellbedeckten Seite auf die Antikörper-Tropfen mithilfe einer Präzisionsspinzette gelegt. Die Bindung der primären Antikörper erfolgte 1 h lang bei RT. Anschließend wurden die Deckgläschen aufgenommen, einmal in PBS getunkt und wieder für 10 min in die 24-Loch-Platte, die die Blockierlösung enthielt, gelegt. Es folgte erneut eine Absättigung unspezifischer Bindungsstellen, sodass die Zellfixate hiernach in sekundärem Antikörper inkubiert werden konnten (1 h, RT). Dieser wurde ebenfalls in der Blockierlösung verdünnt und in 30 μ l-Tropfen auf einen neu vorbereiteten Parafilm-Streifen pipettiert. Wenn eine Fluoreszenz-Markierung des Aktins erforderlich war, wurde das Phalloidin zusammen mit dem sekundären Antikörper in Blockierlösung verdünnt und auf gleiche Weise inkubiert. Zuletzt wurden die Deckgläschen in PBS getunkt und der überschüssige Puffer durch ein

senkrecht aufsetzen des Deckgläschens auf ein Papiertuch abgesaugt. Die Deckgläschen wurden mit der zellbedeckten Seite auf einen Tropfen Einbett-Medium (s. Tabelle 2.3) auf einem zuvor mit Ethanol gereinigten Objektträger gelegt. Die Objektträger wurden zum Aushärten des Einbett-Mediums über Nacht in eine Dunkelkammer bei RT gelegt. Am Folgetag konnten die Präparate im Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

2.6.4 Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie

Die in der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie eingesetzte Lichtquelle erzeugt Licht unterschiedlicher Wellenlängen, die erst durch den Einsatz spezieller Filter auf das jeweilige Fluorophor angepasst werden. Das bietet den Vorteil, dass das emittierte Licht für das menschliche Auge sichtbar ist und so der Einsatz eines Photovervielfachers (s. Abschnitt 2.5.5) umgangen werden kann. Da hier auch ein großflächiger Bereich einer Probe gleichzeitig beleuchtet werden kann, liegt die Bildinformation eines gesamten Sichtfeldes sofort vor. Diese Vorteile eines Weitfeld-Fluoreszenzmikroskops wurden für die Quantifizierung von Lysotracker und der Proteine VatA, p80, LAMP-1, LAMP-2 am mykobakteriellen Kompartiment sowie für die Zählung von *Ejectosomes* ausgenutzt.

Das in dieser Arbeit verwendete Mikroskopie-System *cellR Imaging System*, bestand aus dem Inversmikroskop Olympus IX81, das mit einem Olympus 100x/1,4 UPlanSApo Ölimmersionsobjektiv ausgestattet war, einem MT20-I-Fluoreszenzbeleuchtungssystem mit einem Xenonbrenner und insgesamt zwei Filtersätzen (Tabelle 2.12).

Tabelle 2.12: Filtersätze des Weitfeld-Fluoreszenzmikroskops

Filtersatz*	Angeregte Fluorophore
Anregungsfilter HC 470/22 Emissionsfilter 512	GFP, Alexa Fluor 488
Anregungsfilter HC 555/20 Emissionsfilter 630	mCherry, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Lysotracker

* Alle Filtersätze wurden von Olympus, Hamburg, Deutschland bezogen.

Über einen schnellen Wechsel zwischen dem roten und dem grünen Filtersatz wurde eine Lokalisation der jeweiligen Proteine oder von Lysotracker (rot) um die Mykobakterien (grün) bestimmt und quantifiziert.

2.6.5 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (Punktscanner)

Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie ist, dass Anregungs- und Emissionsstrahlen mithilfe von Lochblenden (*pinholes*) fokussiert werden und nur die Bildinformationen einer fokalen Ebene detektiert wird. Da es sich hierbei um Licht handelt, das punktförmig-gebündelt auf die Probe trifft, ist ein Abrastern des Objekts notwendig.

Das in dieser Arbeit verwendete konfokale Mikroskopie-System *FluoView 1000* bestand aus dem Inversmikroskop Olympus IX81, das mit einem Olympus 100x/1,4 UPlanSApo Ölimmersionsobjektiv ausgestattet war, und insgesamt drei Laserlinien (Tabelle 2.13).

Tabelle 2.13: Laserlinien des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops

Laserline*	Angeregte Fluorophore
488 nm Argon	GFP, Alexa Fluor 488, DIC (<i>Differential Interference Contrast</i>)
559 nm Diode	mCherry, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Lysotracker
635 nm Diode	Alexa Fluor 647

* Alle Laserlinien wurden von Olympus, Hamburg, Deutschland bezogen.

Die eingesetzte Laserintensität betrug je nach Protein und Fluorophor zwischen 1% und 30%. Das emittierte Licht wurde mithilfe eines Photovervielfachers (*photomultiplier*) detektiert, dessen Beschleunigungsspannung auf 600-900 mV eingestellt wurde. Die elektronische Nachverstärkung des Signals (*gain*) und Kontrastverstärkung (*offset*) wurden auf „0“ eingestellt. Die Bilder wurden mit einer Auflösung von 1024 x 1024 dpi (*dots per inch*) mit einer Verweilzeit von 8-10 μ s pro Pixel dreifach gemittelt (Kalman 3x) aufgenommen. Alle Einstellungen wurden mittels der FluoView v1.7b Software (s. Tabelle 2.5) vorgenommen.

Mittels der konfokalen Mikroskopie wurde in der vorliegenden Arbeit die Lokalisation von Aktin und WASH am Kompartiment auf Grund einer besseren optischen Auflösung im Vergleich zum Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop analysiert. Ebenfalls wurden so alle Präparate betrachtet, die mit dem Farbstoff Alexa Fluor 647 markiert waren. Grundsätzlich wurden alle im Kapitel 3 aufgeführten Fluoreszenzbilder (mit Ausnahme der Bilder aus der Lebendzell-Mikroskopie) mit der hier vorgestellten Methode aufgenommen.

2.6.6 Bildbearbeitung und -analyse

Die Bildaufnahme erfolgte am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop mithilfe der FluoView Software. Die Bilder wurden als oif-Dateien (*original imaging format*) exportiert und ins Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (s. Tabelle 2.5) geladen. Darin erfolgte das Zuschneiden der Bilder, die Zuweisung der Falschfarben und die Überlagerung der aufgenommenen Kanäle. Darüber hinaus wurde eine Anpassung der Helligkeit und des Kontrastes, immer auf das gesamte Bild bezogen, vorgenommen. Die Bildbearbeitung wurde so durchgeführt, dass der Aussagegehalt der Aufnahmen nicht verfälscht wurde.

2.6.7 Quantifizierungs-Experimente

Die meisten Quantifizierungs-Experimente wurden mithilfe der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie (vgl. 2.5.4) in mindestens drei technischen und biologischen Replikas (n) durchgeführt. Zur Quantifizierung der Proteine p80 und VatA in *Dictyostelium* (n = 3-4), LAMP-1 und LAMP-2 in RAW-B-Makrophagen (n = 3) sowie der Lysotracker-positiven Bakterien in BV-2- (n = 3-6) und RAW-B-Zellen (n = 3) wurden jeweils 100-300 Mykobakterien bzw. Mykobakterien-Aggregate (wenn nicht als Einzelbakterien zählbar) ausgewertet. Für die Zählung der Proteine wurde zwischen einer Anlagerung des jeweiligen Markers an die Mykobakterien („assoziert“) und keiner Anlagerung („nicht-assoziert“) unterschieden. Bei der Zählung von p80 wurde die Kategorie „assoziert“ zusätzlich in „voll assoziiert“ und „partiell assoziiert“ unterteilt, je nachdem, ob das Protein die Mykobakterien vollständig oder nur in Teilen umgab. Für die statistische Analyse wurde die Gruppe der „assozierten“ Mykobakterien der Gruppe der „partiell assoziierten“ zugeordnet. Für die Quantifizierung der *Ejectosomes* (n = 2-6) wurden pro *Dictyostelium*-Mutante 100 infizierte Zellen ausgewertet. Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie wurde zur Quantifizierung von Aktin (n = 3-6) und WASH (n = 4) an der mykobakteriellen Vakuole in *Dictyostelium* genutzt. Dazu wurden je 30 Kompartimente mit einem 4- bis 6-fachen digitalen Zoom betrachtet und den Kategorien „assoziert“ oder „nicht-assoziert“ zugeordnet.

Die Quantifizierungen wurden mithilfe der Prism-Software (s. Tabelle 2.5) ausgewertet. Wenn nicht anders aufgeführt, wurden alle gemessenen Werte als Durchschnittswerte einschließlich des Standardfehlers (SEM = *Standard Error of the Mean*) dargestellt. Um die statistische Relevanz der Daten zu überprüfen, wurde ein *unpaired student's t-test*

durchgeführt. Die Kriterien für die Varianz-Analyse waren $p > 0,05$ (ns = nicht signifikant), $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).

2.7 Lebendzell-Mikroskopie von *Dictyostelium*

Die Lebendzell-Mikroskopie wurde ausschließlich am Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop (Olympus *cellR Imaging System*) durchgeführt. Wie in Abschnitt 2.5.4 dargestellt, bietet es den Vorteil, dass die Bilder im Millisekunden-Bereich generiert werden können und besonders schnelle Zellprozesse in *Dictyostelium*, z. B. Bewegung der Endosomen, optimal nachverfolgt werden können. Ein Nachteil der Weitfeldmikroskopie ist jedoch, dass viele beleuchtete Ebenen übereinander liegen und gleichzeitig detektiert werden. Die mangelnde axiale Auflösung führt somit zu einem unscharfen Bild. Um dem entgegenzuwirken, müssen die Bilder einer Dekonvolution unterzogen werden. Dazu wird ein mathematischer Algorithmus verwendet, der das Signal ungewünschter Fokusebenen errechnet und vom erzielten Bild subtrahiert. Die Dekonvolution der Fluoreszenzbilder wurde mithilfe der Olympus xcellence rt-Software unter der Verwendung des *no neighbour*-Algorithmus und einer 50%-igen Reduktion des Bildrauschens durchgeführt.

Das Olympus *cellR Imaging System* verfügte über eine spezielle Inkubationskammer, die 3 h vor der Nutzung des Mikroskops auf konstante $24 \pm 0,2$ °C temperiert wurde. Für die Lebendzell-Mikroskopie wurden spezielle Mikroskopie-Kulturschälchen (s. Tabelle 2.2) verwendet, in denen pro Kammer 6×10^5 infizierte *Dictyostelium*-Zellen ausgesät wurden. Die Zellen wurden in steril-filtriertem HL5-C-Medium inkubiert, da das Autoklavieren des Mediums die Bildung von Fluorophoren fördert, die sich störend in der Mikroskopie auswirken.

2.7.1 Mikroskopie infizierter Ax2-Zellen nach Beladen mit Neutralrot

Ax2-Wildtyp-Zellen wurden zunächst nach dem Protokoll in Abschnitt 2.3.1 mit *M. marinum* gfp infiziert und bei 4 hpi auf Mikroskopie-Schälchen in 200 µl HL5-C-Medium ausgesät. Bei 6 hpi wurden die Zellen für 1 h in 150 µl LatA-haltigem (5 µM) bzw. für Kontrollmessungen in Ethanol-haltigem Medium (0,21% Ethanol in 150 µl HL5-C-Medium) inkubiert. Im Anschluss daran wurde für 1 min eine Neutralrot (NR)-haltige Lösung (62 µM)

zu den jeweiligen Ansätzen in einer Verdünnung von 1:100 pipettiert. Die Zellen wurden danach mit je 200 µl HL5-C-Medium gewaschen und erneut 150 µl LatA- bzw. Ethanolhaltigem Medium ausgesetzt. Es wurden sofort innerhalb von 6-8 min 100 infizierte Zellen des LatA-Ansatzes und danach in gleicher Weise 100 infizierte Zellen des Kontrollansatzes ausgezählt und die Anzahl NR-positiver Mykobakterien bestimmt. Die Auszählung der Zellen erfolgte mit 100-facher Vergrößerung (Olympus 100x/1,4 UPlanSApo Ölimmersionsobjektiv) und 12%-iger Lampenintensität (s. auch Abschnitt 2.5.4) in drei biologischen und technischen Replikas. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Prism-Software (s. Abschnitt 2.5.7).

2.7.2 Mikroskopie infizierter Ax2-VatM-GFP-Zellen

Zunächst wurden die Ax2-VatM-GFP überexprimierenden Zellen (s. Abschnitt 2.2.1), wie in Abschnitt 2.3.1 dargestellt, mit *M. marinum* mCherry infiziert. Bei ca. 4 hpi wurden die Zellen in Mikroskopie-Schälchen in insgesamt 200 µl HL5-C-Medium pipettiert und bis zum Beginn der Mikroskopie im Brutschrank bei 25 °C inkubiert. Bei 6 hpi wurde das Medium gegen 150 µl frisches HL5-C-Medium ausgetauscht und die Zellen alle 20 s über 10 min lang unter den folgenden Einstellungen aufgenommen:

Objektiv:	Olympus 60x/1,35 UPlanSApo Ölimmersionsobjektiv
Lampenintensität:	12%
Belichtungszeit gfp:	140 ms
Belichtungszeit mCherry:	10 ms

Nach Ablauf der 10 min wurden, ohne das Kulturschälchen über dem Objektiv zu verschieben, 50 µl LatA-haltiges Medium zu den Zellen gegeben, sodass das LatA in einer Endkonzentration von 5 µM vorlag (s. Abschnitt 2.4.1). Anschließend wurden die Aufnahmen über weitere 35 min fortgeführt. Die Bilder wurden einer Dekonvolution unterzogen (s. Abschnitt 2.6), als tiff-Dateien (*tagged image file format*) exportiert und in ImageJ (s. Abschnitt 2.5.6) bearbeitet.

2.8 Messung koloniebildender Einheiten (KBE)

Die Messung der koloniebildenden Einheiten (KBE) ist eine Methode, die in dieser Arbeit dazu verwendet wurde, um zum einen das Wachstum von *M. marinum* in *Dictyostelium*, zum anderen das Wachstum von *M. marinum* im zellfreien Medium jeweils mit und ohne LatA-Exposition zu bestimmen.

2.8.1 Messung der in *Dictyostelium* gewachsenen Mykobakterien

Ax2-Zellen wurden, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, mit *M. marinum* gfp infiziert. Nach 4 hpi wurden je 3×10^5 Zellen auf neun kleine Zellkultur-Schalen (35 mm) verteilt, mit je 1 ml HL5-C-Medium überschichtet und weiterhin bei 25 °C inkubiert. Bei 6 hpi wurde in acht der Schälchen das Medium abgenommen und zu vier Schälchen wurden je 0,5 ml LatA-haltiges Medium (5 µM in HL5-C-Medium) und zu den anderen vier Schälchen je 0,5 ml Ethanol-haltiges Medium (0,21% Ethanol in HL5-C-Medium) für 2 h dazugegeben (vgl. auch Abschnitt 2.4.1). Das neunte Schälchen wurde wie folgt unter sterilen Bedingungen behandelt. Das Medium wurde abgenommen, die Zellen vom Schalenboden gelöst und in 1 ml frischem HL5-C-Medium aufgenommen. Davon wurde 0,3 ml Zellsuspension abgenommen und abzentrifugiert (4.900 xg, 4 min, 22 °C). Um die Mykobakterien aus *Dictyostelium* zu isolieren, wurde das Pellet in 0,3 ml Lysispuffer gelöst (0,1% Triton in PBS, s. Tabelle 2.4) und sofort 10 s lang mithilfe eines Vortexers resuspendiert. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurde die Suspension erneut 30 s lang auf gleiche Weise geschüttelt. Danach wurde eine dreifache Verdünnungsreihe der Mykobakterien pipettiert, wobei immer 30 µl zu vorgelegten 270 µl Lysispuffer dazugegeben wurden. Je 15 µl der Verdünnungen wurden auf je ein Viertel der Mykobakterien-Kulturplatten (s. Tabelle 2.4) pipettiert und gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden in einer feuchten Kammer bei 32 °C für 5-7 d inkubiert. Von den restlichen acht Kulturschälchen wurde das LatA- bzw. Ethanol-haltige Medium bei 8 hpi abgenommen und die Zellen wurden einmal mit je 1 ml HL5-C-Medium gewaschen und mit je 1 ml Medium überschichtet. Die infizierten Zellen wurden im Brutschrank bei 25 °C inkubiert. Bei 10, 24, 32 und 48 hpi wurde das Medium jeweils einmal von einem Schälchen mit behandelten und einmal von einem mit nicht-behandelten Zellen abgenommen. Die Zellen wurden vom Boden der Kulturschalen gelöst und in dem jeweiligen Medium, in dem sie kultiviert wurden, aufgenommen. Dieser Schritt war notwendig, um die extrazellulären Bakterien, die z. B. ihre Wirtszellen über das *Ejectosome* verlassen haben, mit in die Analysen einzubeziehen. Die weitere Vorgehensweise glich der bei 6 hpi.

Nachdem die Mykobakterien auf den Kulturplatten angewachsen waren, wurden solche Verdünnungen ausgezählt, die zwischen 10 und ca. 150 Bakterienkolonien zeigten. Für die grafischen Auswertungen mithilfe der Prism-Software wurden die Gesamtzahlen der Bakterien pro 1 ml Bakteriensuspension unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungen ausgerechnet. Das Bakterienwachstum wurde auf den 6 hpi-Wert normalisiert und somit als Vielfaches dessen dargestellt.

2.8.2 Messung der im zellfreien Medium gewachsenen Mykobakterien

Um zu klären, ob das LatA einen direkten Einfluss auf die Proliferation von Mykobakterien hat, wurde eine *M. marinum* gfp-Kultur wie für eine Infektion vorbereitet (vgl. Abschnitt 2.3.1). Es wurden 9×10^7 Bakterien abzentrifugiert (3.000 xg, 5 min, 25 °C), in 9 ml HL5-C-Medium resuspendiert, gleichmäßig auf neun 35 mm-Kulturschälchen verteilt und bei 25 °C inkubiert. Nach 6 h Inkubation wurde in vier der Schälchen LatA (5 µM) und in weitere vier Ethanol (0,21%) pipettiert. Die Bakterien aus dem neunten Schälchen wurden pelletiert (3.000 xg, 4 min, 25 °C), einmal mit HL5-C-Medium gewaschen und anschließend in 1 ml Medium aufgenommen. Davon wurden wiederum 0,3 ml entnommen, pelletiert (3.000 xg, 4 min, 25 °C) und in 0,3 ml Lysispuffer gelöst (0,1% Triton in PBS, s. Tabelle 2.4). Ansonsten wurde in gleicher Weise vorgegangen wie in Abschnitt 2.7.1 bereits beschrieben und die Bakterien zuletzt auf Kultur-Platten verteilt. Die anderen acht Ansätze wurden wie folgt behandelt. Die Bakterien wurden bei 8 hpi jeweils pelletiert, einmal mit HL5-C gewaschen (3.000 xg, 4 min, 25 °C), wieder in je 1 ml Medium aufgenommen und in acht neue Kulturschälchen gegeben. Bei 10, 24, 32 und 48 hpi wurden jeweils Bakterien aus einem der Schälchen des LatA-Ansatzes sowie Bakterien aus einem der Schälchen des Kontrollansatzes pelletiert und in 1 ml Lysispuffer aufgenommen. Mit je 0,3 ml der Bakteriensuspension wurde so verfahren wie für den 6 hpi-Zeitpunkt bereits beschrieben. Die KBE wurden nach 5-7 d in gleicher Weise ausgezählt, wie in Abschnitt 2.7.1 aufgeführt.

2.9 Durchflusszytometrische Analysen

Der Infektionsverlauf von grünfluoreszierenden *M. marinum* in *Dictyostelium*-Zellen wurde mithilfe der Durchflusszytometrie nachverfolgt. Durch die Messung der Vorwärtslichtstreuung (FSC, *forward scatter*) konnte auf die Partikelgröße geschlossen und somit zwischen einem

kleinen Partikel, wie einem Bakterium (2-6 μm) und einem größeren, wie einer *Dictyostelium*-Zelle (10 μm) unterschieden werden. Zur Unterscheidung von infizierten Zellen (grünfluoreszent) und nicht-infizierten Zellen (nicht-fluoreszent) wurde die Messung der grünen Fluoreszenz herangezogen. Außerdem wurden grün-fluoreszente Latex-Beads gemessen. Trägt man beide Messgrößen gegeneinander auf, resultieren daraus vier unterschiedliche Populationen (Abbildung 2.1), deren Größenänderung im Infektionsverlauf nachverfolgt werden kann.

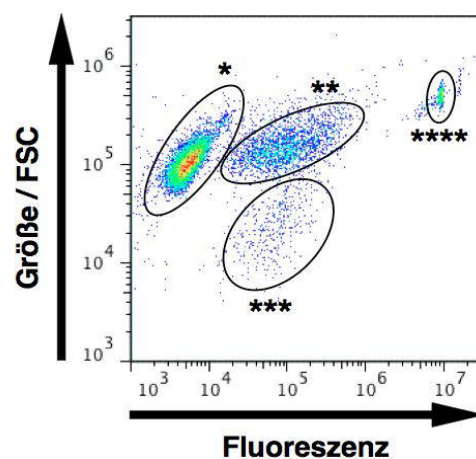


Abbildung 2.1: Durchflusszytometrische Analyse von *Dictyostelium* infiziert mit *M. marinum* gfp.

Durch die Auftragung der Partikelgröße (FSC, *forward scatter*) gegen die Fluoreszenz können vier unterschiedliche Populationen voneinander unterschieden werden: Nicht-infizierte Zellen (*), infizierte Zellen (**), extrazelluläre Bakterien (***) sowie Latex-Beads (****).

Zur Durchführung der durchflusszytometrischen Analysen wurden Ax2 und wshA⁻-Zellen (s. Abschnitt 2.2.1), wie in Abschnitt 2.3.1 dargestellt, infiziert und es wurden je 3×10^5 Zellen auf fünf kleine Zellkultur-Schalen (35 mm) pro Zelllinie verteilt. Die Zellen wurden mit je 1 ml HL5-C überschichtet und bei 25 °C inkubiert. Bei 6, 10, 24, 32 und 48 hpi wurden die Zellen aus je einem Ax2- und einem wshA⁻-Schälchen vom Schalenboden gelöst und in das Medium, in dem sie zuvor inkubierten, aufgenommen. Je 0,2 ml der Zellsuspension wurde abgenommen und in zuvor vorgelegte 0,2 ml Sörensen-Azid-Puffer (s. Tabelle 2.4) pipettiert. Das hoch-verdünnte Azid (0,03% in PBS) bewirkt, dass die Zellen sich abrunden und Bakterien, die möglicherweise an den Zellen adhären, sich ablösen können. Somit wurde die Anzahl der infizierten Zellen nicht durch falsch-positive Zellen verfälscht. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (4.900 xg, 4 min, 22 °C), das Pellet sofort in 0,5 ml Sörensen-Sorbitol-Puffer (s. Tabelle 2.4) aufgenommen und in Probenröhrchen (s. Tabelle 2.2) überführt. Um bei jeder Messung am Durchflusszytometer dasselbe Volumen zu messen und somit Aussagen über die Änderungen der absoluten Zellzahlen machen zu können,

wurde der Zellsuspension 1 μl einer Latex-Bead-Lösung (s. Tabelle 2.2) hinzugefügt (ca. $4,55 \times 10^5$ Beads). Da die Beads eine stärkere Grünfluoreszenz als die gfp-exprimierenden Mykobakterien besitzen, konnten sie als separate Population aufgelöst werden (Abb. 2.1).

Bei jeder durchflusszytometrischen Messung wurden genau 200 Beads detektiert. Gleichzeitig wurde eine variable Anzahl der nicht-infizierten und der infizierten Zellen sowie die der extrazellulären Bakterien aufgenommen. Außerdem konnte die durchschnittliche Fluoreszenz der infizierten Zellen ermittelt werden, die, multipliziert mit der Anzahl der infizierten Zellen, eine Aussage über die Gesamtfluoreszenz der infizierten Zellen zuließ. Von der Gesamtfluoreszenz der infizierten Zellen konnte auf das Wachstum der Mykobakterien in ihren jeweiligen Zellen geschlossen werden. Als weitere Analysemethode diente die Auftragung der Anzahl der infizierten Zellen gegen die gemessene Fluoreszenz. Das daraus resultierende Histogramm lässt Aussagen über die Verteilung der Mykobakterien in ihren Wirtszellen zu. Viele stark-fluoreszente Zellen würden auf eine große Anzahl an Zellen deuten, die mit vielen Bakterien infiziert sind. Dagegen würden viele schwach-fluoreszente Zellen auf eine große Anzahl an Zellen deuten, die mit wenigen Bakterien infiziert sind.

3 Ergebnisse

Das Strukturprotein Aktin ist an wichtigen Prozessen in der Infektion von *Dictyostelium discoideum* mit *Mycobacterium marinum*, wie z. B. der Bakterienaufnahme und Bakterienfreisetzung (Hagedorn et al 2009) beteiligt. Hinweise, dass das Protein auch eine Rolle bei der Nischenetablierung und Replikation der Bakterien spielt, geben die Untersuchungen des Aktin-bindenden Proteins Coronin. Dieses reichert sich an der Vakuole von *M. marinum* in *Dictyostelium* an und hat einen negativen Einfluss auf die Proliferation des Bakteriums (Solomon et al 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das abundante und über alle Tierstämme hochkonservierte Protein Aktin an der mykobakteriellen Vakuole lokalisiert. Im Folgenden wurde seine dortige Funktion im Hinblick auf die Etablierung und Aufrechterhaltung der Replikationsnische sowie den weiteren Infektionsverlauf untersucht.

3.1 Aktin lokalisiert am frühen *M. marinum*-Kompartiment in *Dictyostelium*

Zunächst wurde untersucht, ob und wann Aktin an der *M. marinum*-Vakuole lokalisiert. Dazu wurden *Dictyostelium*-Zellen mit dem pathogenen Bakterium *M. marinum* infiziert, welches konstitutiv das grünfluoreszierende Protein (GFP) exprimiert. Die Zellen wurden an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten im Infektionsverlauf, 6 und 24 hpi (*hours post infection*), fixiert und das Aktin über Fluoreszenz-markiertes Phalloidin markiert. Charakteristisch für den frühen Zeitpunkt (6 hpi) ist, dass sich das *M. marinum*-Kompartiment in seiner Komposition bereits deutlich von einem Phagosom, wie beispielsweise das des apathogenen Bakteriums *Mycobacterium smegmatis*, unterscheidet. Es zeichnet sich dabei durch einen Ausschluss der vakuolaren Protonen-ATPase (V-ATPase) und der lysosomalen Protease CathepsinD aus (Hagedorn & Soldati 2007). Zum frühen Infektionszeitpunkt (6 hpi) ist eine Bakterienproliferation jedoch noch nicht messbar (Hagedorn & Soldati 2007). Der zweite Zeitpunkt (24 hpi) greift ein spätes Stadium in der Infektion auf, an dem *M. marinum* seine Nische bereits etabliert und sich mehrfach geteilt hat (Hagedorn & Soldati 2007).

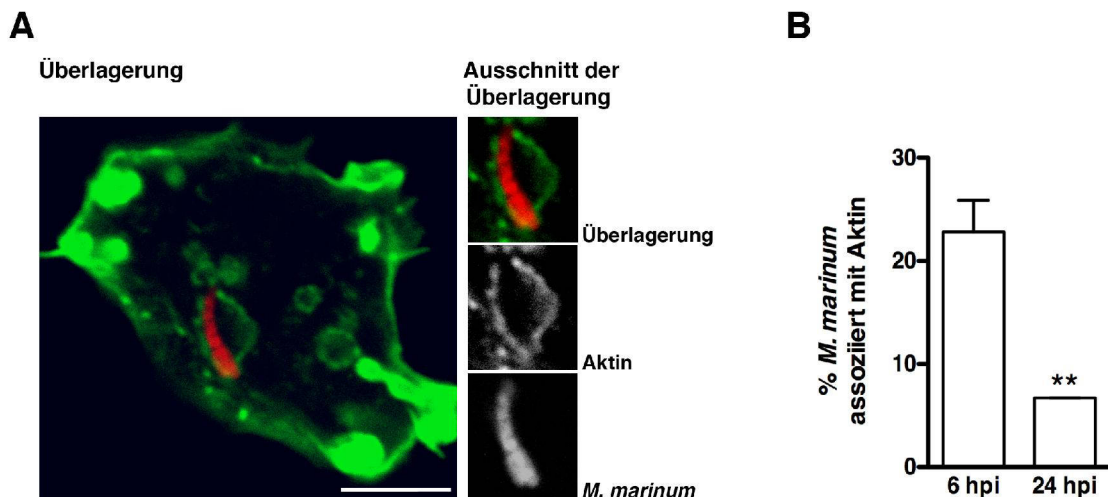


Abbildung 3.1: Aktin lokalisiert am frühen *M. marinum*-Kompartiment in *Dictyostelium*.

Dictyostelium-Zellen wurden mit *M. marinum* gfp infiziert, bei 6 und 24 hpi fixiert und das Aktin wurde über Phalloidin Alexa Fluor 568 markiert. Die Analyse der Zellen erfolgte mithilfe der konfokalen Mikroskopie. **(A)** Repräsentatives Bild einer infizierten Zelle bei 6 hpi. Aktin (grün) lagerte sich punktförmig in einer dünnen Schicht um *M. marinum* (rot) an. Größenbalken = 5 μ m. **(B)** Quantifizierung der Assoziation von Aktin um *M. marinum* bei 6 und 24 hpi (n = 3). Bei 6 hpi waren signifikant mehr Mykobakterien mit Aktin assoziiert im Vergleich zu 24 hpi (** p = 0,0065).

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der infizierten Zellen ergab, dass bei 6 hpi ein Viertel aller Mykobakterien eine Assoziation mit Aktin zeigte (Abb. 3.1-B). Das Aktin lagerte sich teils punktförmig, teils in einer dünnen Schicht um die Bakterien an (Abb. 3.1-A). Bei 24 hpi waren dagegen weniger als 7% der Bakterien mit Aktin assoziiert (Abb. 3.1-B). Da die Verteilung des Aktins um *M. marinum* die Umrisse eines typischen Kompartiments nachzeichneten und die Mykobakterien bei 24 hpi noch in ihrer Vakuole lokalisiert sind (Hagedorn & Soldati 2007), wurde davon ausgegangen, dass es sich um Kompartiment-assoziiertes Aktin handelte. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Assoziation von Aktin am *M. marinum*-Kompartiment einen transienten Zustand darstellt, der sich auf die frühe Phase in der Infektion erstreckt. Der geringe Prozentsatz an *M. marinum*, der eine Assoziation mit Aktin bei 24 hpi aufwies, könnte aus einer asynchronen Infektion resultieren. Es ist möglich, dass ein Teil der Mykobakterien bereits in weniger als 24 h den Infektionszyklus beendet und die Wirtszellen über *Ejectosomes* verlassen hat. Werden solche Bakterien von benachbarten *Dictyostelium*-Zellen aufgenommen, beginnt in ihnen ein erneuter Zyklus.

3.2 Die Rolle des Nukleationsfaktors WASH an der *M. marinum*-Vakuole

Als Nächstes wurde untersucht, welche Proteine die Polymerisation des Aktins am Kompartiment initiieren. Die punktförmige Verteilung des Aktins an der *M. marinum*-Vakuole ähnelte dem Lokalisationsmuster von WASH-vermitteltem Aktin an Lysosomen in *Dictyostelium* (Carnell et al 2011). WASH (*Wiskott-Aldrich-syndrome protein and SCAR Homolog*) ist ein Protein, das zur Gruppe der *Nucleation-Promoting-Faktoren* (NPF) gehört. NPF initiieren in Anwesenheit des ARP2/3-Komplexes, präexistierender Aktinfilamente und Aktinmonomere eine *de-novo*-Synthese von Aktinsträngen (Campellone & Welch 2010). WASH ist ein NPF, der die Polymerisation von Aktin an der Membran von Endosomen reguliert (Derivery et al 2009, Gomez & Billadeau 2009). Da die Vorgänge an der *M. marinum*-Vakuole streng reguliert an den endosomalen Membrantransport der Wirtszelle gekoppelt bleiben, ist eine Assoziation von WASH am Kompartiment denkbar. Im Nachfolgenden wurde überprüft, ob und wann sich der NPF an der *M. marinum*-Vakuole anreichert. Im Falle des Vorhandenseins von WASH am Kompartiment sollte untersucht werden, ob es die Polymerisation des dort vorhandenen Aktins initiiert und welche Funktion seine dortige Aktivität für die *M. marinum*-Vakuole hat.

3.2.1 WASH initiiert die Polymerisation des Aktins am *M. marinum*-Kompartiment

Zunächst wurde überprüft, ob WASH an der Membran der mykobakteriellen Vakuole lokalisiert. Um WASH in *Dictyostelium* zu detektieren, wurden Zellen verwendet, die ein Fusionsprotein aus GFP und WASH überexprimieren. Diese Zellen wurden mit *M. marinum* infiziert, welches konstitutiv das rotfluoreszierende Protein mCherry exprimiert. Die *Dictyostelium*-Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Infektionsverlauf fixiert und die Membran des Kompartiments anschließend über eine Immunfluoreszenz-Färbung von p80 markiert. Das Transmembranprotein p80 ist ein putativer Kupfertransporter (Ravanel et al 2001), der nach Bakterienaufnahme in der Membran der *M. marinum*-Vakuole über den gesamten Infektionsverlauf akkumuliert (Hagedorn & Soldati 2007). Zuletzt wurden Koloalisationsstudien von GFP-WASH und Aktin, welches über Fluoreszenz-markiertes Phalloidin markiert wurde, durchgeführt.

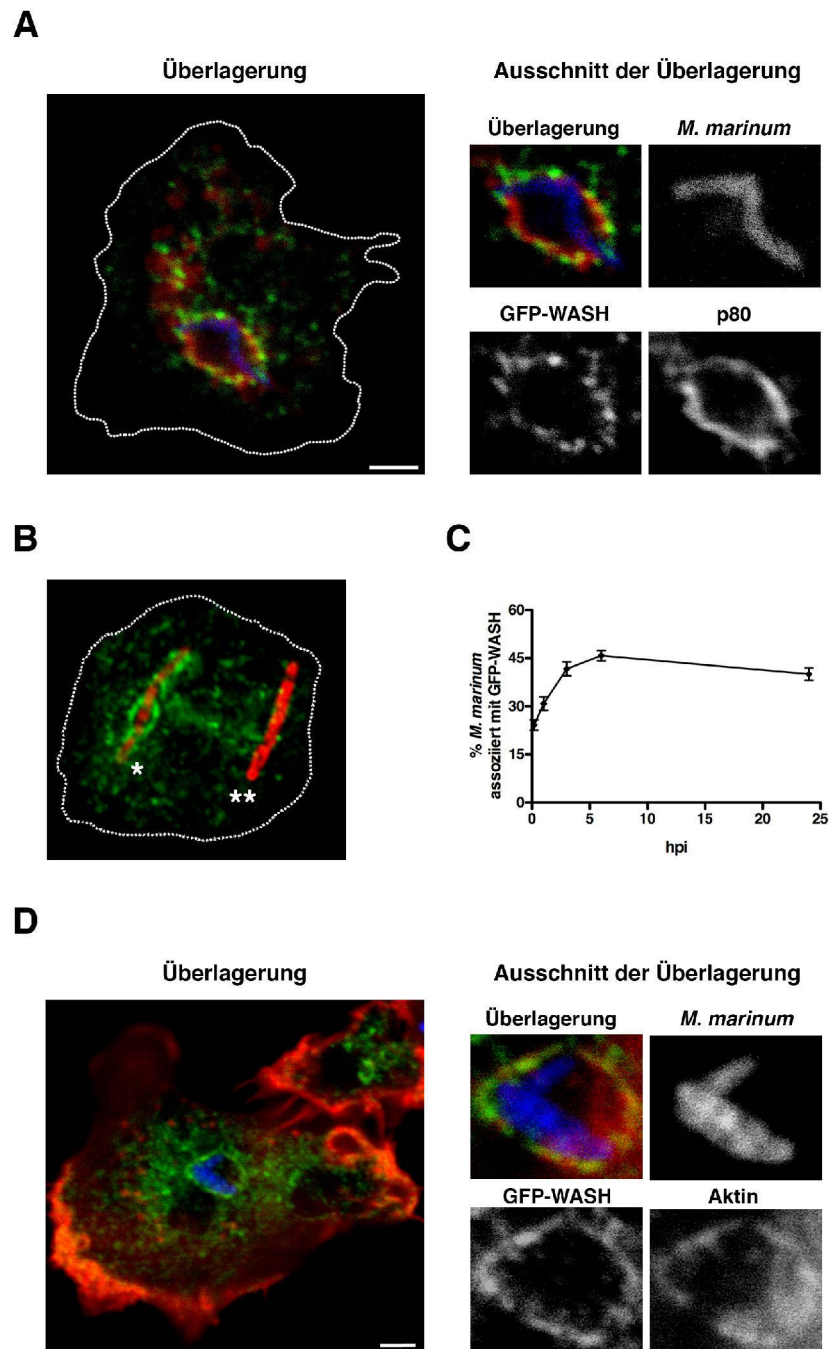


Abbildung 3.2: GFP-WASH lokalisiert an der Membran der *M. marinum*-Vakuole.

GFP-WASH überexprimierende *Dictyostelium*-Zellen wurden mit *M. marinum* mCherry infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert. Die Fluoreszenz von GFP-WASH wurde über eine indirekte Immunfluoreszenz-Färbung mit einem anti-GFP Antikörper verstärkt. Die Analyse der Zellen erfolgte mithilfe der konfokalen Mikroskopie. **(A)** Repräsentatives Bild einer infizierten Zelle bei 6 hpi. Der Zellkortex ist mit einer gestrichelten Linie angedeutet. Die Membran des Kompartiments wurde über eine Immunfluoreszenz-Färbung von p80 markiert. GFP-WASH (grün) lagerte sich in punktförmigen Strukturen um *M. marinum* (blau) an die Membran des Kompartiments (p80, rot) an. Größenbalken = 2 μ m. **(B)** Beispielhafte Darstellung der beiden Kriterien zur Quantifizierung der Anlagerung von GFP-WASH (grün) um *M. marinum* (rot) bei 6 hpi. Der Zellkortex ist mit einer gestrichelten Linie angedeutet. Das mit „*“ gekennzeichnete Bakterium war assoziiert mit GFP-WASH und das mit „**“ war nicht assoziiert mit GFP-WASH. **(C)** Quantifizierung der Assoziation von GFP-WASH um *M. marinum* bei 10 min sowie 1, 3, 6 und 24 h nach Infektion (n = 4). **(D)** Repräsentatives Bild einer infizierten Zelle bei 6 hpi. Das Aktin der Zelle wurde über Phalloidin Alexa Fluor 647 markiert. GFP-WASH (grün) kolokalisierte mit Aktin (rot) um *M. marinum* (blau). Größenbalken = 2 μ m.

Abbildung 3.2-A zeigt, dass bei 6 hpi GFP-WASH sich in punktförmigen Strukturen an die Membran der *M. marinum*-Vakuole, die über den Kompartiment-Marker p80 visualisiert wurde, anlagerte. Bei der Quantifizierung der Assoziation von GFP-WASH am Kompartiment im Zeitverlauf wurde zwischen Mykobakterien unterschieden, die deutlich von GFP-WASH umgeben waren (Abb. 3.2-B, * assoziiert) und solchen, die keine Anlagerung von GFP-WASH zeigten (Abb. 3.2-B, ** nicht-assoziert). Bereits 10 min nach Infektion mit *M. marinum* war etwa ein Viertel aller Bakterien mit GFP-WASH assoziiert und der Prozentsatz der GFP-WASH-positiven Bakterien stieg bis 6 hpi auf durchschnittlich 46% (Abb. 3.2-C). Auch nach 24 hpi blieb der Anteil positiver *M. marinum* konstant, obwohl zu diesem Zeitpunkt nur noch etwa 7% der Bakterien mit Aktin assoziiert waren (Abb. 3.1-B). Möglicherweise ist WASH in der späten Infektionsphase zwar am Kompartiment vorhanden, jedoch in seiner Aktivität inhibiert. Denkbar ist auch eine erhöhte Rate der Depolymerisation des Aktins bei 24 hpi, was eine verkürzte Halbwertszeit der Aktinfilamente bedingen würde. Kolokalisationsstudien von GFP-WASH und Aktin bei 6 hpi zeigten, dass die Signale beider Proteine zu großen Anteilen überlappten (3.2-D). Dennoch war zu diesem Zeitpunkt etwa die Hälfte der GFP-WASH-positiven Mykobakterien nicht mit Aktin assoziiert (vgl. 3.1-B und 3.2-C). Möglicherweise lag das an der geringen Menge von Aktin am mykobakteriellen Kompartiment, die unter der Detektionsgrenze lag, oder ist wiederum auf eine niedrige oder fehlende WASH-Aktivität bzw. eine erhöhte Rate der Depolymerisation des Aktins zurückzuführen.

Als Nächstes wurde untersucht, ob ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Aktin am Kompartiment und dem dort assoziierten WASH besteht. Dazu wurde die WASH-Deletionsmutante von *Dictyostelium* (*wshA*⁻) verwendet. Diese Zellen zeichnen sich durch eine absolute Abwesenheit von Aktin an Endosomen aus (Carnell et al 2011). In der experimentellen Durchführung wurden die *wshA*⁻-Zellen mit *M. marinum* gfp infiziert, bei 6 hpi fixiert und das Aktin anschließend über Fluoreszenz-markiertes Phalloidin markiert. Mithilfe der konfokalen Mikroskopie wurde das Vorhandensein von Aktin um die Mykobakterien quantifiziert.

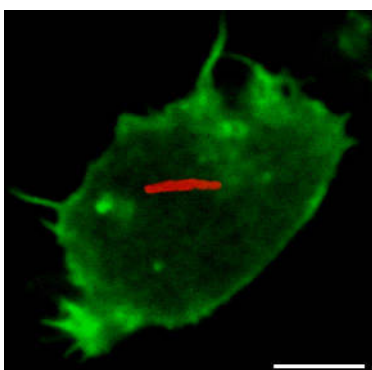


Abbildung 3.3: Die Deletion von WASH führt zu einer absoluten Abwesenheit von Aktin an der *M. marinum*-Vakuole. Repräsentatives Bild einer infizierten *wshA*⁻-Zelle, bei 6 hpi. *WshA*⁻-Zellen wurden mit *M. marinum* gfp infiziert und bei 6 hpi fixiert. Das Aktin wurde über Phalloidin Alexa Fluor 568 markiert und mithilfe der konfokalen Mikroskopie analysiert. Es konnte kein Aktin (grün) um *M. marinum* (rot) detektiert werden (n = 3). Größenbalken = 5 µm.

In der WASH-Deletionsmutante konnte in keinem der drei unabhängigen Versuche Aktin um *M. marinum* bei 6 hpi detektiert werden (Abb. 3.3). Aus den Lokalisationsstudien von WASH am Kompartiment und der Tatsache, dass die Deletion von WASH eine absolute Abwesenheit von Aktin an der *M. marinum*-Vakuole bewirkt, lässt sich schließen, dass der *Nucleation-Promoting-Faktor* WASH bereits früh in der Infektion an die *M. marinum*-Vakuole rekrutiert wird, wo er die Polymerisation des Aktins initiiert.

3.2.2 WASH stimuliert das Recycling der V-ATPase am *M. marinum*-Kompartiment

Als Nächstes wurde die Funktion von WASH und dem davon generierten Aktin am *M. marinum*-Kompartiment analysiert. Untersuchungen des endozytischen Systems in *Dictyostelium* haben gezeigt, dass WASH das Recycling der V-ATPase (vakuolare Protonen-ATPase) an Lysosomen vermittelt, die als Folge davon zu Postlysosomen reneutralisieren (Carnell et al 2011). In *wshA*⁻-Zellen ist die Reneutralisierung aufgrund des fehlenden Recyclings der V-ATPase nicht möglich (Carnell et al 2011). Die zytosolische Untereinheit Vata der V-ATPase und das Membranprotein p80 reichern sich kurz nach Bakterienaufnahme durch die Wirtszelle am *M. marinum*-Kompartiment an (Hagedorn & Soldati 2007). Anders als p80, wird Vata früh in der ersten Phase der Infektion wieder abgeführt (Hagedorn & Soldati 2007). Als Nächstes wurde untersucht, ob das Recycling der V-ATPase an der *M. marinum*-Vakuole durch WASH stimuliert wird. Dazu wurden *wshA*⁻-Zellen infiziert, bei 6 hpi fixiert und die Proteine Vata und p80 über eine Immunfluoreszenz-Färbung lokalisiert. Die Assoziation der Mykobakterien mit dem jeweiligen Protein wurde anschließend quantifiziert. Die Kriterien für die Zählung von Vata waren entweder eine vollständige Anlagerung („assoziiert“) oder keine Anlagerung („nicht-assoziiert“) des Proteins um die Mykobakterien (Abb. 3.4-A). Bei der Zählung von p80 wurden drei verschiedene Kriterien festgelegt, eine volle („assoziiert“), eine partielle („partiell assoziiert“) sowie keine Anlagerung („nicht-assoziiert“) des Proteins an *M. marinum* (Abb. 3.4-B). Für die statistische Auswertung wurde die Gruppe der „partiell assoziierten“ Mykobakterien der Gruppe der „assoziierten“ zugeordnet. Da es sich bei Vata um ein Membran-assoziiertes und bei p80 um ein transmembranes Protein handelt, wurde angenommen, dass ihre Anlagerung um die Mykobakterien eine Akkumulation der Proteine in der Membran des Kompartiments bedeuten (Hagedorn et al 2009, Hagedorn & Soldati 2007).

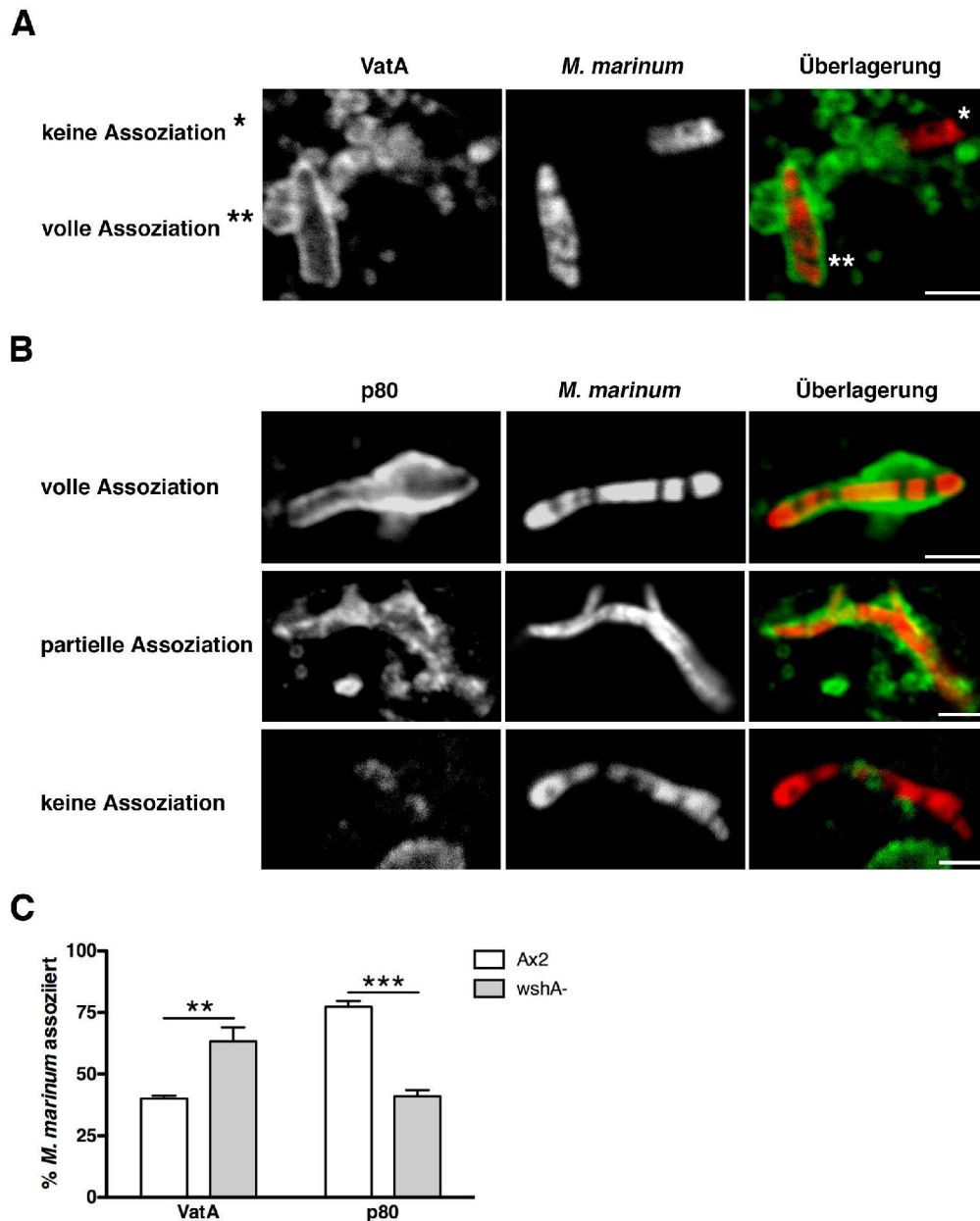


Abbildung 3.4: Die Deletion von WASH führt zu einer Anreicherung der V-ATPase am *M. marinum*-Kompartiment.

Wildtyp- und *wshA*⁻-Zellen wurden mit *M. marinum* gfp infiziert, bei 6 hpi fixiert und die Proteine VatA bzw. p80 wurden jeweils durch eine Immunfluoreszenz-Färbung markiert. **(A)** Beispielhafte Darstellung der Kriterien zur Quantifizierung der Anlagerung von VatA um *M. marinum* in Wildtyp-Zellen. Waren die Mykobakterien (rot) vollständig von VatA (grün) umschlossen, wurden sie als „assoziiert“ (**) gewertet. War kein VatA um die Bakterien detektierbar, wurden sie als „nicht-assoziiert“ (*) gezählt. Größenbalken = 2 µm. **(B)** Beispielhafte Darstellung der Kriterien zur Quantifizierung der Anlagerung von p80 um *M. marinum* in Wildtyp-Zellen. Waren die Mykobakterien (rot) vollständig von p80 (grün) umschlossen (obere Reihe), wurden sie als „assoziiert“ gewertet. War p80 nur partiell um die Bakterien zu finden (mittlere Reihe), wurden sie als „partiell assoziiert“ gewertet. War das p80 jedoch nicht um *M. marinum* detektierbar (untere Reihe), wurden sie als „nicht-assoziiert“ gezählt. Größenbalken = 2 µm. **(C)** Quantifizierung der Assoziation von VatA (n = 4) und p80 (n = 3) in Wildtyp- und *wshA*⁻-Zellen mithilfe der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie bei 6 hpi. Während die Assoziation mit VatA in *wshA*⁻-Zellen verglichen mit dem Wildtyp signifikant höher war (** p = 0,0074), war die Assoziation (voll und partiell) mit p80 in *wshA*⁻-Zellen signifikant niedriger (*** p < 0,0001).

Die Quantifizierung bei 6 hpi ergab, dass die Anzahl der VatA-positiven Bakterien, verglichen mit dem Wildtyp (40%), in *wshA*⁻-Zellen signifikant höher war (63%, Abb. 3.4-C). Gleichmaßen wurde für p80, gemessen am Wildtyp (77%), in *wshA*⁻-Zellen eine signifikante Abnahme in der Anlagerung an *M. marinum* beobachtet (41%, Abb. 3.4-C). Somit scheint die Funktion von WASH an der *M. marinum*-Vakuole, der Funktion an Lysosomen gleich zu sein. Abgeleitet von den Beobachtungen von Carnell (Carnell et al 2011) wird angenommen, dass WASH und das davon generierte Aktin am frühen *M. marinum*-Kompartiment wichtig sind, um die V-ATPase abzuführen.

Zusammengenommen zeigen die bisherigen Experimente, dass WASH bereits ab 10 min nach Infektion an der *M. marinum*-Vakuole akkumuliert und dort die Polymerisation des Aktins initiiert. Die Folge der WASH-Aktivität ist vermutlich das Recycling der V-ATPase am mykobakteriellen Kompartiment.

3.3 Die Rolle des Aktins am frühen *M. marinum*-Kompartiment

Als Nächstes wurde untersucht, welche Rolle das Aktin selbst, unabhängig von seinem Nukleator WASH, an der *M. marinum*-Vakuole spielt. Dazu wurden die Aktinfilamente in zwei unterschiedlichen Ansätzen depolymerisiert und die Änderungen der Komposition der Kompartimentmembran analysiert. Im ersten Ansatz erfolgte die Depolymerisation des Aktins mithilfe des Fusionsproteins VacuolinA-Myc-Cofilin (VMC). Der zweite Ansatz beruhte auf der Applikation der Aktin-depolymerisierenden Substanz LatrunculinA (LatA). Diese Versuche unterscheiden sich in einem weiteren grundlegenden Aspekt zu den Experimenten in der WASH-Deletionsmutante. In ihnen wurden die Änderungen eines zu dem Zeitpunkt bereits divergierten Kompartiments als unmittelbare Folge der Aktin-Wegnahme bei 6 hpi verfolgt.

3.3.1 Depolymerisation des Aktins mittels des VMC-Fusionsproteins führt zur Akkumulation der V-ATPase

Das Fusionsprotein VMC besteht aus VacuolinA, dem Myc-Epitop zur Detektion des Gesamtproteins in der Zelle und Cofilin (Abb. 3.4-A). VacuolinA fungiert dabei als Zielprotein, welches das Fusionskonstrukt an Postlysosomen von *Dictyostelium* lokalisiert. Dort depolymerisiert VMC Cofilin-vermittelt das assoziierte Aktin (Drengk et al 2003). Vacuolin-Proteine akkumulieren darüber hinaus auch an der mykobakteriellen Vakuole am Ende der ersten Infektionsphase (Hagedorn & Soldati 2007). Um zu überprüfen, ob das VMC-Protein VacuolinA-vermittelt am Kompartiment lokalisiert, wurden VMC-überexprimierende Zellen mit *M. marinum* infiziert. Bei 6 hpi wurden die Zellen fixiert und das Fusionsprotein über einen Myc-Antikörper detektiert. Im weiteren Vorgehen wurde das Vorhandensein von Aktin am Kompartiment sowie die Akkumulation von VatA und p80 in der Membran der *M. marinum*-Vakuole überprüft.

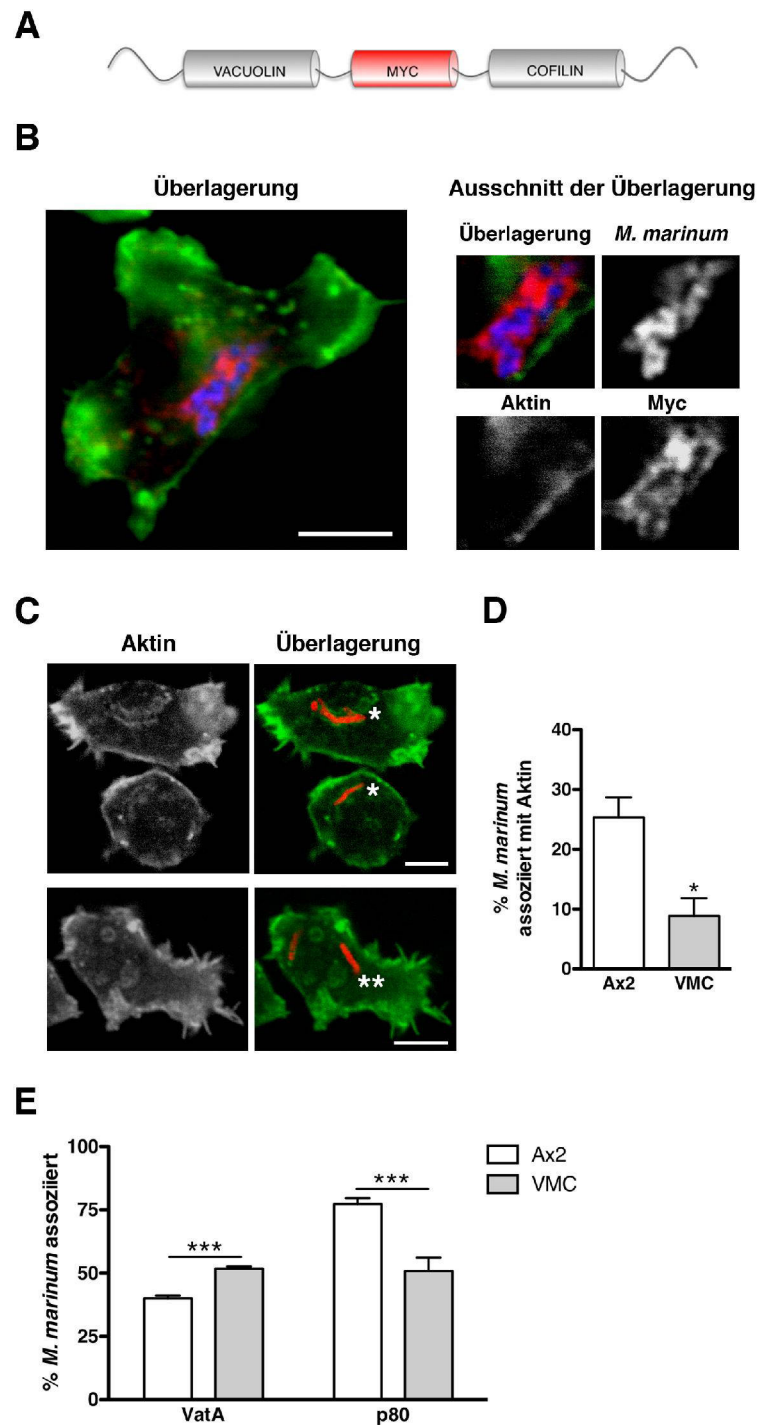


Abbildung 3.5: Depolymerisation des Aktins mittels des VMC-Fusionsproteins führt zur Akkumulation der V-ATPase an der *M. marinum*-Vakuole.

Wildtyp- und VMC-Zellen wurden mit *M. marinum* gfp infiziert und bei 6 hpi fixiert. Die Analyse der Zellen erfolgte mithilfe der konfokalen Mikroskopie. **(A)** Schematische Darstellung des VMC-Fusionsproteins. **(B)** Das Fusionsprotein wurde durch eine Immunfluoreszenz-Färbung des Myc-Epitops und Aktin über Phalloidin Alexa Fluor 647 markiert. Während Myc (rot) um *M. marinum* (blau) lokalisierte, war kein Aktin (grün) am Kompartiment detektierbar. Größenbalken = 5 μ m. **(C)** Kriterien zur Quantifizierung der Anlagerung von Aktin um *M. marinum* in VMC-Zellen. Das Aktin wurde über Phalloidin Alexa Fluor 568 markiert. Aktin (grün) lagerte sich teils punktförmig um die Mykobakterien (rot) an, die als „assoziiert“ (*, obere Reihe) gewertet wurden. Wenn kein Aktin um die Bakterien detektierbar war (**, untere Reihe), wurden diese als „nicht-assoziiert“ gewertet. Größenbalken = 5 μ m. **(D)** Quantifizierung der Assoziation von Aktin in Wildtyp- und VMC-Zellen bei 6 hpi (n = 3). Verglichen zum Wildtyp wurden in VMC-Zellen signifikant weniger mit Aktin assoziierte

Mykobakterien beobachtet (* $p = 0,0168$). **(E)** Die Proteine Vata und p80 wurden jeweils durch eine Immunfluoreszenz-Färbung markiert und am Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop bei 6 hpi quantifiziert ($n = 4$). In VMC-Zellen war die Assoziation mit Vata signifikant höher (** $p = 0,0005$) und die Assoziation (voll und partiell) mit p80 signifikant niedriger (** $p = 0,0003$) verglichen zum Wildtyp.

Die Immunfluoreszenz-Färbung von Myc zeigte, dass bei 6 hpi etwa jedes fünfte *M. marinum*-Bakterium von dem Fusionsprotein VMC (Abb. 3.5-A) umhüllt war (Abb. 3.5-B). Dieses Ergebnis ist konform mit der Beobachtung, dass Vacuolin bei 6 hpi erst beginnt an der Replikationsnische zu akkumulieren (Hagedorn & Soldati 2007). Alle Mykobakterien, die positiv für VMC waren, zeigten keine Assoziation mit Aktin (Abb. 3.5-B). Dieses deutet darauf hin, dass das dort vorhandene Aktin durch ein funktionsfähiges Cofilin depolymerisiert wurde. Eine Quantifizierung des Kompartiment-assoziierten Aktins (Abb. 3.5-C) zeigte eine Reduktion positiver Bakterien von 25% in Wildtyp-Zellen auf 8% in VMC-Zellen (Abb. 3.5-D). Die Komposition der Membran des Kompartiments war ebenfalls verändert. Die Assoziation von Vata stieg von durchschnittlich 40% im Wildtyp auf 52% der *M. marinum*-Vakuolen in VMC-überexprimierenden Zellen. Gleichzeitig reduzierte sich die Assoziation von p80 von 77% in Wildtyp-Zellen auf 51% in VMC-Zellen (Abb. 3.5-E). Das Ausmaß der Änderung in der Assoziation beider Proteine in VMC-Zellen war geringer im Vergleich zu der Änderung in wshA⁻-Zellen (vgl. Abb. 3.5-E). Das ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass in VMC-Zellen das Fusionskonstrukt bei 6 hpi nur an etwa 20% aller Mykobakterien lokalisierte. Nur an diesen relativ wenigen Kompartimenten konnte Aktin zum Zeitpunkt der Analyse depolymerisiert werden. Damit blieben auch die gemessenen Effekte der Depolymerisation des Aktins auf diesen geringen Anteil der Kompartimente beschränkt. Zusammenfassend zeigt der VMC-Ansatz, dass eine lokale Depolymerisation des Aktins an bereits divergierten *M. marinum*-Kompartimenten bei 6 hpi ebenfalls zu einer Anreicherung der V-ATPase führt.

3.3.2 Depolymerisation des Aktins mittels LatA führt zur Akkumulation der V-ATPase

Die Depolymerisation von Aktin mittels des VMC-Fusionsproteins ist zwar ein räumlich sehr gezielter, jedoch ein zeitlich eher unspezifischer Ansatz. In den nachfolgenden Experimenten wurde das Aktin-depolymerisierende Toxin LatA verwendet. Der entscheidende Vorteil in der Applikation dieser Substanz ist ihre sofortige Wirkung zu jedem beliebigen Zeitpunkt in der Infektion. Der Wirkungsmechanismus von LatA besteht in dem spezifischen Binden von G-Aktin, das sich infolge davon nicht zu Filamenten anlagern kann. Es wurde bereits gezeigt, dass die Wirkungsweise von LatA spezifisch, schnell und reversibel ist (Drengk et al 2003, Morton et al 2000). Um den Einfluss der LatA-vermittelten Depolymerisation des Aktins auf

das mykobakterielle Kompartiment zu untersuchen, wurden *Dictyostelium*-Wildtyp-Zellen mit *M. marinum* infiziert. Bei 6 und 24 hpi wurden die Zellen für eine Stunde in LatA- bzw. Ethanol-haltigem (Kontrolle) Medium inkubiert und anschließend fixiert. Das Aktin wurde durch eine Phalloidin-Färbung markiert und nachfolgend fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Änderungen in der Komposition der Membran des Kompartiments, hinsichtlich Vata und p80, wurden nach unterschiedlich langer Inkubationszeit (15-120 min) in LatA- bzw. Ethanol-haltigem (Kontrolle) Medium bei 6 und 24 hpi quantifiziert.

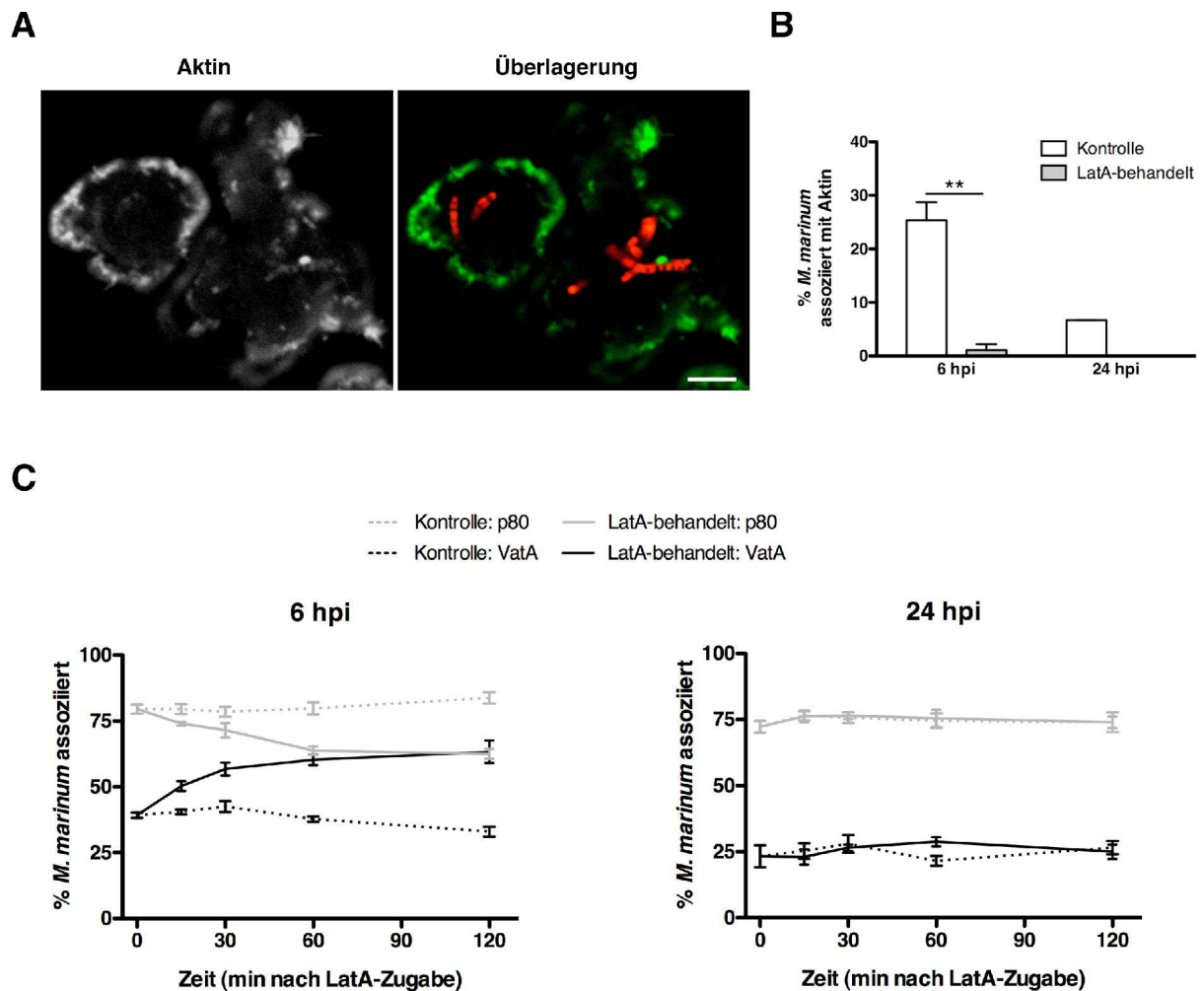


Abbildung 3.6: Depolymerisation des Aktins mittels LatA führt zur Akkumulation der V-ATPase an der *M. marinum*-Vakuole.

Ax2-Wildtyp-Zellen wurden mit *M. marinum* gfp infiziert und bei 6 und 24 hpi unterschiedlich lange in LatA-haltigem bzw. Ethanol-haltigem (Kontrolle) Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert. **(A)** Verteilung des Aktins in *Dictyostelium* nach 1 h Inkubation in LatA-haltigem Medium bei 6 hpi. Nach der Fixierung wurde das Aktin über Phalloidin Alexa Fluor 568 markiert. Aktin (grün) war nur punktförmig im Zellkortex, nicht jedoch um *M. marinum* (rot) detektierbar. Größenskalen = 5 µm. **(B)** Quantifizierung der Assoziation von Aktin mit *M. marinum* bei 6 und 24 hpi nach einer einstündigen Inkubation in LatA- bzw. Ethanol-haltigem (Kontrolle) Medium (n = 3). Die Analyse erfolgte mithilfe der konfokalen Mikroskopie. Während die LatA-Exposition bei 6 hpi zu einer signifikanten Reduktion der Anlagerung von Aktin um die Mykobakterien führte (** p = 0,0019), wurden bei 24 hpi nie mit Aktin assoziierte Bakterien beobachtet. **(C)** Quantifizierung der Assoziation von Vata und p80 mit *M. marinum* am Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop (n = 4). Bei 6 und 24 hpi wurden die infizierten Zellen für 15, 30, 60 bzw. 120 min in LatA- bzw. Ethanol-haltigem (Kontrolle) Medium inkubiert. Anschließend

wurden die Zellen sofort fixiert und die Proteine VatA und p80 jeweils durch eine Immunfluoreszenz-Färbung markiert. Während bei 6 hpi, im Vergleich zu Kontrollzellen, mit anhaltender Exposition in LatA-haltigem Medium der Anteil mit VatA assoziierter *M. marinum* stieg, fiel gleichzeitig der Anteil mit p80 assoziierter Bakterien. Bei 24 hpi wurden keine Änderungen in der Assoziation mit VatA bzw. p80 im Vergleich zu Kontrollzellen beobachtet.

Nach einer einstündigen Exposition in LatA-haltigem Medium zeigten die Zellen eine deutliche Abrundung des Zellkörpers und Aktin-basierte Zellfortsätze, wie z. B. Filopodien, waren nicht mehr erkennbar (Abb. 3.6-A). Die Lokalisation des verbleibenden Aktins war auf den Zellkortex und dort auf punktförmige Strukturen beschränkt (Abb. 3.6-A). Eine Quantifizierung des Kompartiment-assoziierten Aktins ergab nach einer einstündigen Inkubation in LatA-haltigem Medium bei 6 hpi nur ca. 1% und bei 24 hpi keine positiven Vakuolen (Abb. 3.6-B). Als Kontrolle dienten Wildtyp-Zellen, die zum gleichen Zeitpunkt nur dem Lösungsmittel Ethanol, in dem das LatA verdünnt war, ausgesetzt waren. Diese Ergebnisse zeigen, dass, anders als in VMC-Zellen (vgl. Abb. 3.5-D), Aktin an nahezu allen Kompartimenten zu einem bestimmten Zeitpunkt depolymerisiert worden ist. Die Untersuchung der Komposition der Membran des Kompartiments bei 6 hpi ergab, dass mit fortschreitender LatA-Exposition die Untereinheit VatA der V-ATPase an der Replikationsnische angereichert wurde. Die Assoziation des Kompartiment-Markers p80 nahm zur gleichen Zeit jedoch ab (Abb. 3.6-C, linker Graf). Nach einer einstündigen LatA-Exposition waren im Durchschnitt bereits 60% der Bakterien VatA-positiv (Kontrollzellen: 38%) und nur 64% der Bakterien waren positiv für p80 (Kontrollzellen: 80%). Die Analyse der Membran des Kompartiments bei 24 hpi ergab keine Änderung hinsichtlich der Assoziation von VatA und p80 nach einer Exposition im LatA-haltigen Medium im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 3.6-C, rechter Graf). Sowohl in LatA-exponierten als auch in nicht-exponierten Zellen war VatA zu allen Zeitpunkten an durchschnittlich 25% und p80 zu allen Zeitpunkten an durchschnittlich 75% aller Kompartimente vorhanden.

Die LatA-vermittelte Depolymerisation des Aktins einer Zelle ist ein schnelles und synchrones Ereignis (Morton et al 2000). Die daraus resultierenden Änderungen in der Membran der Kompartimente erfolgen jedoch nicht sofort bzw. nicht an allen *M. marinum*-Vakuolen zum gleichen Zeitpunkt. Auf die Gesamtheit aller Kompartimente bezogen, handelt es sich daher um ein asynchrones Ereignis. Eine weitere Beobachtung war, dass die Änderungen in der Komposition der Vakuolenmembran nur bei 6 hpi, nicht aber bei 24 hpi erfolgen. Diese Daten deuten erneut darauf hin, dass die Kompartimente einen transienten, Aktin-abhängigen Zustand durchlaufen, der sich auf die frühe Phase in der Infektion erstreckt. Darüber hinaus bestätigen die Ergebnisse der LatA-Versuche die

Schlussfolgerungen aus den VMC-Experimenten. In beiden Fällen führt die Depolymerisation des Aktins zu einer Anreicherung der V-ATPase am mykobakteriellen Kompartiment.

3.4 Charakterisierung der Akkumulation der V-ATPase an der *M. marinum*-Vakuole

Im Weiteren wurde die Akkumulation der V-ATPase am Kompartiment während der LatA-Exposition näher charakterisiert. Dabei wurde zunächst darauf eingegangen, welchen Ursprung die sich an der *M. marinum*-Vakuole anreichernde Untereinheit VatA der V-ATPase hat. Darüber hinaus wurde in einer Lebendzell-mikroskopischen Untersuchung die Akkumulation der Untereinheit VatM der V-ATPase auf Einzelzellniveau während der Inkubation in LatA-haltigem Medium verfolgt.

3.4.1 Das angereicherte VatA stammt von Lysosomen

Die V-ATPase lokalisiert in *Dictyostelium* an den Membranen zweier unterschiedlicher Vakuolenarten, den Lysosomen sowie der kontraktilen Vakuole (KV). Letztere ist ein tubuläres Organell der Protisten, das der Osmoregulation dient (Gabriel et al 1999). Es wurde überprüft, ob die Anreicherung der V-ATPase am mykobakteriellen Kompartiment aus der Fusion mit Vesikeln, die der KV entstammen, resultiert. Dazu wurde das Vorhandensein von Calmodulin am Kompartiment überprüft. Calmodulin ist ein Kalzium-bindendes regulatorisches Protein, das zwar mit der Membran der KV assoziiert ist (Heuser et al 1993), nicht jedoch an der Membran von Lysosomen vorkommt (Zhu & Clarke 1992). *Dictyostelium*-Zellen wurden mit *M. marinum* gfp infiziert, bei 6 hpi für eine Stunde in LatA- bzw. Ethanolhaltigem (Kontrolle) Medium ausgesetzt und anschließend sofort fixiert. Die Proteine VatA und Calmodulin wurden durch eine Immunfluoreszenz-Färbung markiert.

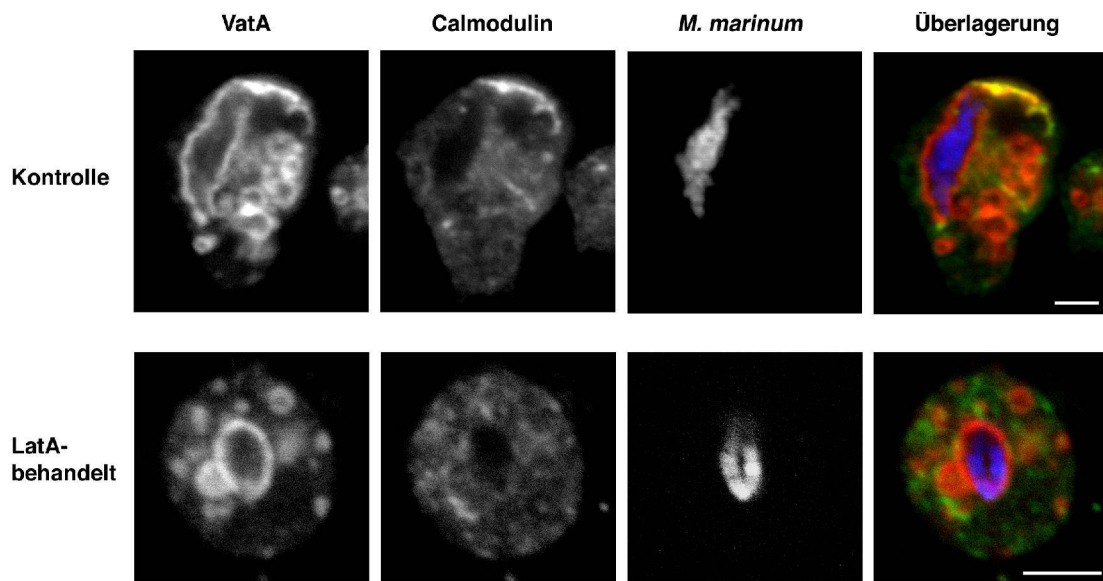


Abbildung 3.7: Das angereicherte VatA am mykobakteriellen Kompartiment stammt nicht von der kontraktilen Vakuole.

Ax2-Wildtyp-Zellen wurden mit *M. marinum* gfp infiziert, bei 6 hpi für 1 h in LatA- bzw. Ethanolhaltigem (Kontrolle) Medium inkubiert und anschließend sofort fixiert. VatA und Calmodulin wurden über eine Immunfluoreszenz-Färbung markiert. Die Analyse der Zellen erfolgte am konfokalen Mikroskop. Sowohl in den Kontrollzellen (obere Reihe) als auch in den LatA-behandelten Zellen (untere Reihe) war lediglich VatA (rot), nicht jedoch Calmodulin (grün), um *M. marinum* (blau) lokalisiert. Größenbalken = 2 μm .

Die Immunfluoreszenz-Analyse ergab, dass sich unabhängig von der LatA-Exposition nur VatA, nie aber Calmodulin um *M. marinum* anlagerte (Abb. 3.7). So konnte ausgeschlossen werden, dass die V-ATPase am Kompartiment aus der Fusion mit Vesikeln, die der KV entstammten, resultierten. Im Umkehrschluss muss die Anreicherung der V-ATPase an der *M. marinum*-Vakuole aus der Fusion mit Lysosomen zurückzuführen sein.

3.4.2 Die Anreicherung der V-ATPase am Kompartiment erfolgt synchron

Als Nächstes wurde die Dynamik der Akkumulation der V-ATPase an einzelnen mykobakteriellen Kompartimenten Lebendzell-mikroskopisch untersucht. Die Analysen der fixierten Zellen ergaben, dass die Änderungen in der Komposition der Membran hinsichtlich VatA vermutlich nicht sofort und nicht zur gleichen Zeit an allen *M. marinum*-Vakuolen abzulaufen scheinen (s. Abschnitt 3.3.2). Zum einen ist denkbar, dass die Assoziation mit der V-ATPase über einen längeren Zeitraum und an vielen Kompartimenten gleichzeitig erfolgt. Zum anderen könnte es sich um einen schnellen Prozess handeln, der jedoch nur an wenigen *M. marinum*-Vakuolen zur gleichen Zeit abläuft. Zur Klärung dieser Frage wurden Lebendzell-mikroskopische Versuche an infizierten *Dictyostelium*-Zellen durchgeführt. Um die V-ATPase in lebenden Zellen sichtbar zu machen, wurden Zellen verwendet, die die Untereinheit VatM der V-ATPase in Fusion mit GFP überexprimierten. VatM ist ein weiterer Bestandteil des V-ATPase-Multiprotein-Komplexes, der im Gegensatz zu VatA transmembran vorliegt. Es wurde bereits gezeigt, dass das VatM-GFP-Fusionsprotein in endolysosomalen Membranen lokalisiert (Liu & Clarke 1996) und dort zu einem funktionsfähigen V-ATPase-Komplex assembliert (Clarke et al 2002, Liu & Clarke 1996). Zunächst wurde überprüft, ob die beiden Untereinheiten VatA und VatM gleichzeitig am *M. marinum*-Kompartiment lokalisieren. Eine übereinstimmende Lokalisation würde bedeuten, dass immer wenn VatA an der Vakuole assoziiert ist diese gleichzeitig positiv für VatM ist und umgekehrt. Nur in einem solchen Fall ist es möglich, Rückschlüsse von der Lokalisation einer Untereinheit auf das Vorhandensein der anderen Untereinheit zu ziehen. VatM-GFP überexprimierende Zellen wurden hierzu bei 6 hpi fixiert und die Lokalisation von VatA wurde über eine entsprechende Immunfluoreszenz-Färbung nachgewiesen. Für die Lebendzell-mikroskopischen Untersuchungen wurden VatM-GFP-Zellen mit *M. marinum* mCherry infiziert. Die Bildaufnahme erfolgte 10 min vor und 35 min nach Zugabe von LatA. Als Kontrolle dienten Zellen, die gleichermaßen jedoch nur unter Zugabe des Lösungsmittels Ethanol gefilmt wurden.

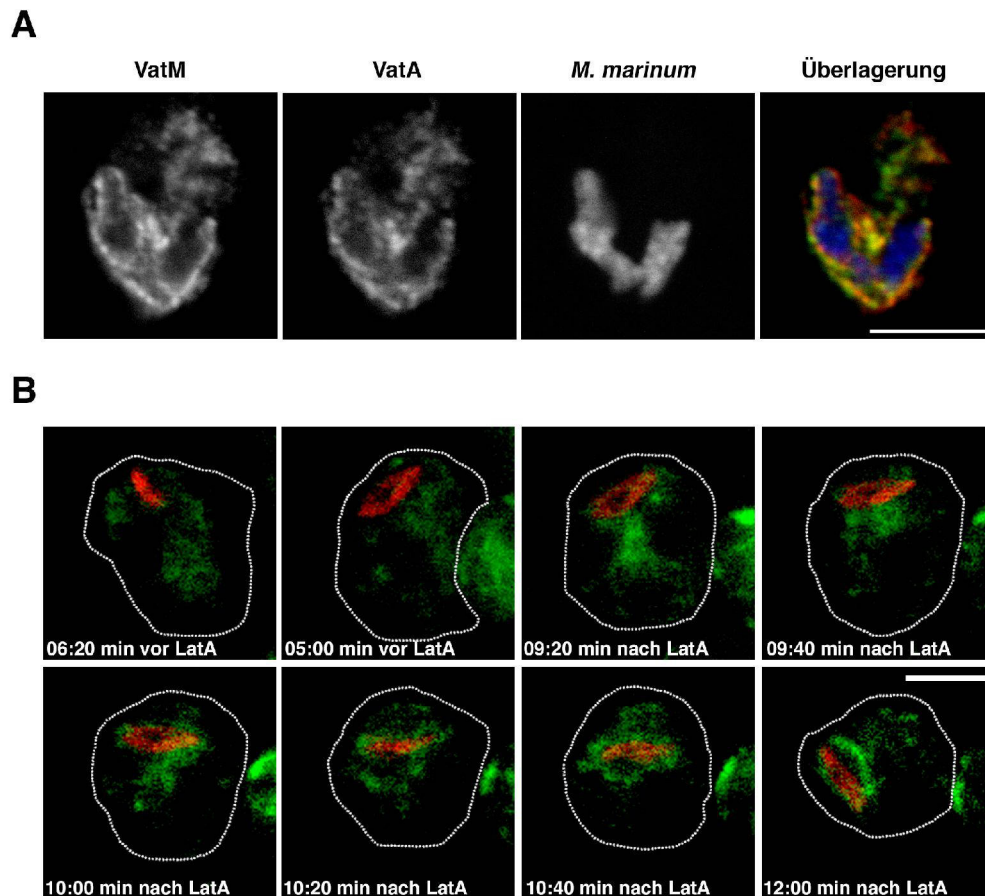


Abbildung 3.8: Die Anreicherung der V-ATPase an einem mykobakteriellen Kompartiment ist ein schnelles und synchrones Ereignis.

VatM-GFP überexprimierende *Dictyostelium*-Zellen wurden mit *M. marinum* mCherry infiziert. (A) Beispielhafte Darstellung einer Lokalisation von VatA und VatM in einer infizierten Zelle. Bei 6 hpi wurden die Zellen fixiert. VatA wurde über eine Immunfluoreszenz-Färbung markiert. Die Analyse der Zellen mittels der konfokalen Mikroskopie ergab, dass VatM (rot) und VatA (grün) beide um *M. marinum* lokalisierten und dort leicht gegeneinander versetzt vorkamen. Größenbalken = 5 μ m. (B) Lebendzell-mikroskopische Untersuchung der Akkumulation von VatM an der *M. marinum*-Vakuole bei 6 hpi. Eine infizierte Zelle wurde 10 min vor und weitere 35 min während der Exposition in LatA-haltigem Medium mithilfe eines Weitfeld-Fluoreszenzmikroskops beobachtet. Die Analyse ergab, dass ein zunächst VatM-freies Mykobakterium (rot) vor der LatA-Zugabe nicht mit VatM (grün) assoziiert war. Nach 9:20 min Inkubation in LatA-haltigem Medium akkumulierten VatM-positive Vesikel um die Bakterien und fusionierten zwischen 10:20 min und 10:40 min mit dem mykobakteriellen Kompartiment. Etwa 12 min nach LatA-Zugabe war das Bakterium vollständig von VatM umgeben. Größenbalken = 5 μ m.

Die Analyse der Lokalisation von VatA und VatM in fixierten Zellen bei 6 hpi ergab, dass entweder keines der beiden Proteine oder aber beide Untereinheiten gleichermaßen um die Mykobakterien angereichert waren. Abbildung 3.8-A zeigt exemplarisch zwei *M. marinum*-Vakuolen, die positiv für VatA und VatM waren. Beide Proteine zeigten eine ähnliche Verteilung in der Zelle und am Kompartiment, wobei eine vollständige Überlagerung beider nicht festzustellen war. Für VatM-GFP konnte ein geringfügig stärkeres Signal detektiert werden, was zum einen an der Überexpression und der möglicherweise höheren Konzentration des Proteins in der Zelle lag, zum anderen daran, dass das Signal von GFP

über einen entsprechenden Fluoreszenz-markierten Antikörper verstärkt wurde. Somit konnte in der nachfolgenden Lebendzell-Mikroskopie von der Lokalisation von VatM-GFP auf das Vorhandensein von VatA geschlossen werden.

Die Analyse der Lebendzell-mikroskopischen Aufnahmen ergab, dass gelegentlich, ab ca. 10 min nach Zugabe von LatA, VatM-positive Vesikel in unmittelbarer Nähe der Mykobakterien akkumulierten (Abb. 3.8-B; 09:20-10:20 min nach LatA-Zugabe). Diese fusionierten innerhalb weniger Sekunden mit der *M. marinum*-Vakuole (Abb. 3.8-B; 10:20-10:40 min nach LatA-Zugabe), sodass im Resultat das VatM-GFP deutlich sichtbar am Kompartiment vorlag (Abb. 3.8-B; 12:00 min nach LatA-Zugabe). Bezogen auf ein einzelnes Kompartiment handelte sich um ein schnelles und synchrones Ereignis, das auf keinen bestimmten Teil der Membran beschränkt war. Diese Beobachtung stimmt auch damit überein, dass in den Quantifizierungsversuchen von VatA vor und nach Zugabe von LatA entweder eine vollständige oder keine Assoziation vorhanden war (vgl. Abb. 3.4-A). Partielle Assoziationen, wie sie für p80 beobachtet wurden (vgl. Abb. 3.4-B), lagen nicht vor. Bezogen auf die Gesamtheit aller Kompartimente handelte es sich jedoch nicht um einen zeitgleichen Vorgang. Möglicherweise sind der Fusion der VatM-GFP-positiven Vesikel andere Ereignisse vorgeschaltet. Es ist denkbar, dass diese Ereignisse eines bestimmten Schwellenwertes bedürfen, um ablaufen zu können, und je nach Zustand der Zelle oder des Mykobakteriums variieren. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass zu unterschiedlichen Zeiten nach der Depolymerisation des Aktins die V-ATPase innerhalb weniger Sekunden am *M. marinum*-Kompartiment akkumuliert.

3.5 Apathogene und avirulente Mykobakterien zeigen keine Änderungen der Vakuolen nach Depolymerisation des Aktins

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Änderungen an der mykobakteriellen Vakuole hinsichtlich der Assoziation mit p80 spezifisch für die Replikationsnische pathogener Mykobakterien sind. Hierzu wurden *Dictyostelium*-Wildtyp-Zellen mit je zwei avirulenten Mutanten von *M. marinum*, der Deletionsmutante Δ RD1 oder der Insertionsmutante L1D (s. Abschnitt 1.4.4 und 2.2.4) bzw. mit dem apathogenen Bakterium *Mycobacterium smegmatis* koinkubiert. Weder die *M. marinum*-Mutanten noch *M. smegmatis* replizieren in *Dictyostelium* (Hagedorn et al 2009, Hagedorn & Soldati 2007). Im folgenden Versuch wurde 6 h nach Phagozytose der beiden Mutanten und *M. smegmatis*, bzw. 6 h nach Infektion mit *M. marinum*, dem Medium LatA bzw. Ethanol (Kontrolle) für 1 h hinzugefügt. Die Zellen

wurden im Anschluss fixiert und das Membranprotein p80 durch eine Immunfluoreszenz-Färbung markiert. Anders als bei *M. marinum* bleibt die V-ATPase an den Vakuolen der avirulenten und apathogenen Mykobakterien auch bei 6 h nach Phagozytose assoziiert (Hagedorn & Soldati 2007). Daher konnten die Änderungen in der Komposition der Vakuolenmembran nur anhand der Abnahme der Assoziation von p80 verfolgt werden.

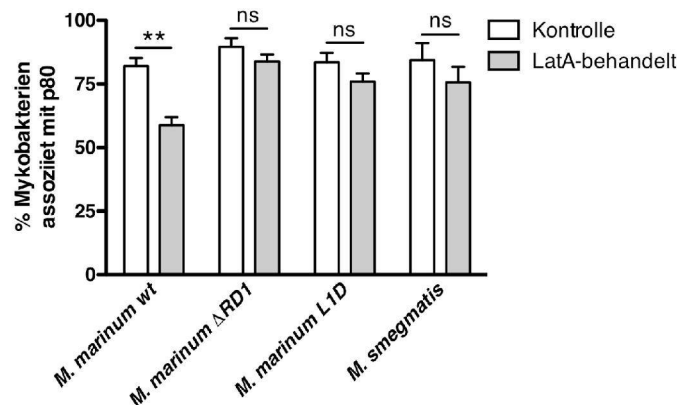


Abbildung 3.9: Apathogene und avirulente Mykobakterien zeigen keine Änderungen der Vakuolen hinsichtlich p80 nach Depolymerisation des Aktins.

Dictyostelium-Wildtyp-Zellen wurden je mit *M. marinum* gfp, *M. marinum* ΔRD1 gfp, *M. marinum* L1D gfp und *M. smegmatis* gfp koinkubiert. Nach 6 h wurden die Zellen für 1 h in LatA- bzw. Ethanolhaltigem (Kontrolle) Medium inkubiert und anschließend sofort fixiert. Das Protein p80 wurde durch eine Immunfluoreszenz-Färbung markiert und seine Anlagerung an die Mykobakterien wurde mithilfe der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert (n = 3). Während die Assoziation von *M. marinum* gfp mit p80 nach der Inkubation in LatA-haltigem Medium signifikant höher war (** p = 0,0066), konnten im Falle der anderen Bakterien keine statistisch relevanten Änderungen gemessen werden (ns: p > 0,2).

Die Quantifizierung zeigt, dass die Depolymerisation des Aktins keine Abnahme in der Assoziation von p80 an den Vakuolen der avirulenten *M. marinum*-Mutanten und dem apathogenen Bakterium *M. smegmatis* bewirkte (Abb. 3.9). Während bei dem pathogenen *M. marinum* eine signifikante Abnahme in der p80-Assoziation mit dem Kompartiment von durchschnittlich 82% auf 59% (** p = 0,007) gemessen wurde, waren die Änderungen im Falle von *M. marinum* ΔRD1 (von 90% auf 84%; p = 0,33), *M. marinum* L1D (von 84% auf 76%; p = 0,2) und *M. smegmatis* (von 91% auf 83%; p = 0,39) statistisch nicht signifikant (Abb. 3.9). Diese Ergebnisse zeigen, dass 6 h nach Aufnahme der Bakterien durch die *Dictyostelium*-Wirtszellen nur die Vakuolen der pathogenen *M. marinum*-Bakterien ein Aktin-abhängiges Stadium durchlaufen. Diese Beobachtung legt nahe, dass ein Zusammenhang zwischen diesem Stadium und der Fähigkeit, ein Replikationskompartiment zu etablieren, besteht. Es ist jedoch auch denkbar, dass zu dem Zeitpunkt kein Aktin an den Vakuolen der anderen Bakterien vorhanden ist. Andererseits könnte zwar Aktin auch mit den Vakuolen der anderen Bakterien bei 6 h nach Aufnahme durch die Wirtszellen assoziiert sein, seine

Depolymerisation aber eine andere Auswirkung haben als die Abnahme der Assoziation mit p80.

3.6 Langzeitfolgen der Depolymerisation des Aktins am frühen *M. marinum*-Kompartiment

In drei unabhängigen Ansätzen, der Infektion der WASH-Deletionsmutante, der Infektion der VMC-Zellen sowie der Applikation von LatA, wurde die Anreicherung der V-ATPase als Folge der Depolymerisation des Aktins am mykobakteriellen Kompartiment gezeigt. Im Folgenden sollte geklärt werden, welche Auswirkung die Anreicherung der Protonen-ATPase auf den pH-Wert der *M. marinum*-Vakuole hat. Daran anschließend wurde untersucht, wie sich die Depolymerisation des Aktins und die daraus resultierenden Änderungen am frühen Kompartiment auf den weiteren Infektionsverlauf auswirken. Dazu wurde die Replikation der Mykobakterien in *Dictyostelium* gemessen. Im dritten Abschnitt dieses Kapitels wurde der Infektionsverlauf von *M. marinum* in der WASH-Deletionsmutante charakterisiert (vgl. Kapitel 3.2 und 3.3).

3.6.1 Depolymerisation des Aktins führt zur Azidifizierung des Kompartiments

Die Anlagerung der Untereinheiten VatA und VatM der V-ATPase an die Vakuole von *M. marinum* legt nahe, dass der gesamte V-ATPase-Proteinkomplex an dem Kompartiment assembliert. Um zu überprüfen, ob es sich um die Akkumulation eines funktionsfähigen Multiproteins handelt, wurde eine pH-Wert-Messung der mykobakteriellen Vakuole mithilfe von Neutralrot (NR) durchgeführt. NR ist ein azidophiler Marker, der bei pH-Werten über 7,4 ungeladen sowie membranpermeabel ist und eine gelbliche Färbung aufweist. Mit sinkendem pH-Wert wird der Indikator protoniert und nimmt eine rote Farbe an. Als Kation ist das NR nicht mehr in der Lage, Membranen zu durchqueren und wird als Folge davon in sauren Vakuolen zurückgehalten. Im Einzelnen wurden *Dictyostelium*-Wildtyp-Zellen mit *M. marinum* gfp infiziert und bei 6 hpi für 1 h LatA- bzw. Ethanol-haltigem (Kontrolle) Medium ausgesetzt. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit NR beladen und diejenigen Bakterien quantifiziert, die sich in einem rotfluoreszierenden und damit NR-positiven Kompartiment befanden.

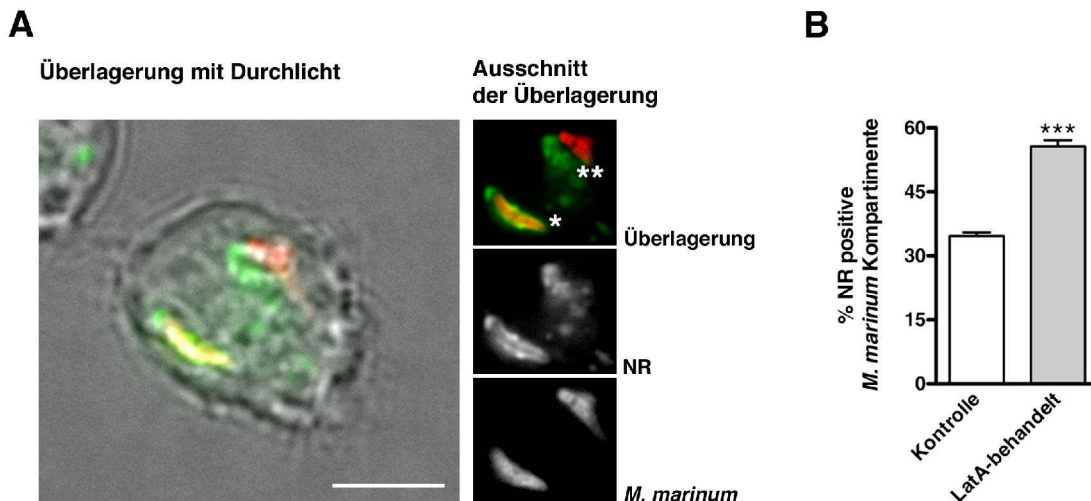


Abbildung 3.10: Depolymerisation des Aktins führt zur Azidifizierung des Kompartiments.

Ax2-Zellen wurden mit *M. marinum* gfp infiziert und ab 6 hpi in LatA- bzw. Ethanol-haltigem (Kontrolle) Medium inkubiert. Bei 7 hpi wurden die Zellen für 1 min mit NR beladen und anschließend sofort am Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop analysiert. **(A)** Repräsentatives Bild einer infizierten Zelle bei 7 hpi nach 1 h LatA-Exposition. Es konnte gut zwischen Bakterien (rot) unterschieden werden, die in einem NR (grün)-positiven Kompartiment lokalisiert waren (*) und solchen, die nicht von NR umgeben waren (**). Größenbalken = 5 μ m. **(B)** Quantifizierung der NR-positiven Kompartimente mit und ohne LatA-Exposition bei 6 hpi (n = 3). Die Anzahl NR-positiver *M. marinum*-Vakuolen in LatA-behandelten Zellen war signifikant höher im Vergleich zu den *M. marinum*-Vakuolen in Kontrollzellen (*** p = 0,0002).

Bereits eine einminütige Exposition in NR-haltigem Medium war ausreichend, um die infizierten Zellen mit dem Farbstoff zu beladen. Sehr gut konnte auch zwischen NR-positiven und somit sauren Kompartimenten und NR-negativen, neutralen Kompartimenten, unterschieden werden (Abb. 3.10-A). Eine Zählung ergab, dass in Kontrollzellen durchschnittlich 35% aller *M. marinum*-Vakuolen NR-positiv waren. LatA-behandelte Zellen hingegen zeigten 56% NR-positive Kompartimente (Abb. 3.10-B). Daraus resultierte ein 1,6-facher signifikanter Anstieg in der Anzahl saurer Kompartimente nach einer Depolymerisation des Aktins bei 6 hpi. Dieser Anstieg war dem von VatA unter gleichen Versuchsbedingungen sehr ähnlich (von durchschnittlich 38% auf 60% nach 1 h LatA-Exposition, vgl. Abb. 3.6-C, linker Graf). Die Ergebnisse zeigen, dass die Depolymerisation von Aktin am mykobakteriellen Kompartiment bei 6 hpi mit einer Anreicherung einer funktionsfähigen V-ATPase korreliert. Dieses führt wiederum zu einer Ansäuerung der Vakuole.

3.6.2 Depolymerisation des Aktins führt zur Reduktion der Bakterienzahlen

Als Nächstes wurde untersucht, wie weitreichend die Folgen der Depolymerisation des Aktins am frühen Kompartiment sind. Im Genauen wurde untersucht, ob die Anreicherung

der V-ATPase am mykobakteriellen Kompartiment nach der Wegnahme des Aktins ebenfalls zu späten Zeitpunkten in der Infektion bestehen bleibt. Dazu wurden Ax2-, wshA⁻- und VMC-Zellen mit *M. marinum* infiziert und bei 24 hpi fixiert. Ein Teil der Wildtyp-Zellen wurde bei 6 hpi für 2 h in LatA- bzw. Ethanol-haltigem (Kontrolle) Medium inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und bei 24 hpi fixiert. Anschließend wurde VatA durch eine Immunfluoreszenz-Färbung markiert und die Assoziation des Proteins mit *M. marinum* in den jeweiligen Zellen quantifiziert.

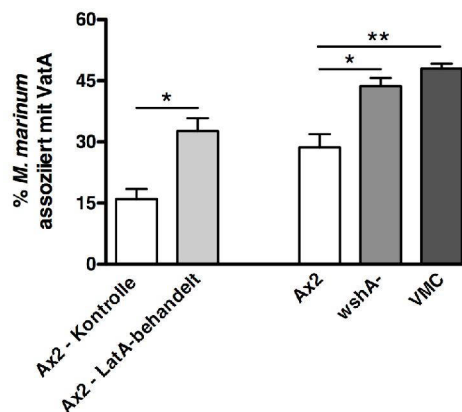


Abbildung 3.11: Die Depolymerisation des Aktins am frühen *M. marinum*-Kompartiment bewirkt eine erhöhte Assoziation mit VatA in der späten Infektionsphase.

Dictyostelium Ax2-, wshA⁻- und VMC-Zellen wurden mit *M. marinum* gfp infiziert. Bei 6 hpi wurde ein Teil der Wildtyp-Zellen in LatA- bzw. Ethanol-haltigem (Kontrolle) Medium für 2 h inkubiert. Alle Zellen wurden bei 24 hpi fixiert und das Protein VatA über eine Immunfluoreszenz-Färbung markiert. Die Quantifizierung der Assoziation der Mykobakterien mit VatA erfolgte mithilfe der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie (n = 3). Die LatA-Exposition führte zu einem Anstieg VatA-positiver Mykobakterien im Vergleich zu Kontrollzellen (* p = 0,0147). Auch in wshA⁻ (* p = 0,0177) und VMC-Zellen (** p = 0,0051) wurden mehr mit VatA assoziierte Bakterien gezählt als in Wildtyp-Zellen.

Wie Abbildung 3.11 zeigt, reichte eine zweistündige LatA-Exposition infizierter Ax2-Zellen bei 6 hpi aus, um bei 24 hpi im Vergleich zu Kontrollzellen (16%) immer noch eine doppelt so hohe Anzahl VatA-positiver Kompartimente (33%) vorzufinden. Auch in wshA⁻ (44%) bzw. VMC-Zellen (48%) waren bei 24 hpi signifikant mehr *M. marinum*-Vakuolen mit VatA assoziiert als in Wildtyp-Zellen (29%, Abb. 3.12). Im Hinblick auf die Anreicherung der V-ATPase hat die Depolymerisation des Aktins eine langanhaltende und möglicherweise unumkehrbare Auswirkung auf die *M. marinum*-Vakuole.

Im weiteren Experiment wurde untersucht, welche Auswirkung eine zweistündige Depolymerisation des Aktins mithilfe von LatA bei 6 hpi und die daraus resultierende Ansäuerung der *M. marinum*-Vakuolen auf die Proliferation der Bakterien in *Dictyostelium* hat. In einem Vorexperiment wurde zunächst überprüft, ob die LatA-Exposition einen direkten Einfluss auf die Proliferation von *M. marinum* in einer zellfreien Umgebung hat (Abb. 3.12-A). *M. marinum* wurde dazu in HL5-C-Medium inkubiert und nach 6 h wurde dem Medium LatA bzw. Ethanol (Kontrolle) für 2 h hinzugefügt. Nach 10, 24, 32 und 48 h Inkubation in HL5-C-Medium wurden die Mykobakterien auf Kulturplatten überführt. Das Schema des Experiments ist in Abb. 3.11-A grafisch dargestellt. Sobald die Bakterien nach fünf bis sieben Tagen zu sichtbaren Kolonien auf den Kulturplatten anwuchsen, konnte die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) bestimmt werden. Im Hauptexperiment hingegen wurden infizierte *Dictyostelium*-Zellen bei 6 hpi für 2 h in LatA- bzw. Ethanol-haltigem (Kontrolle) Medium inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal gewaschen und die Infektion in frischem Medium fortgeführt. Zu bestimmten Zeitpunkten im Infektionsverlauf (10, 24, 32 und 48 hpi) wurden die Wirtszellen lysiert, die Mykobakterien isoliert und auf Kulturplatten überführt (für Experiment-Schema s. Abb. 3.12-B). Nach Anwachsen der Bakterien auf den Kulturplatten konnte die Anzahl der KBE bestimmt werden.

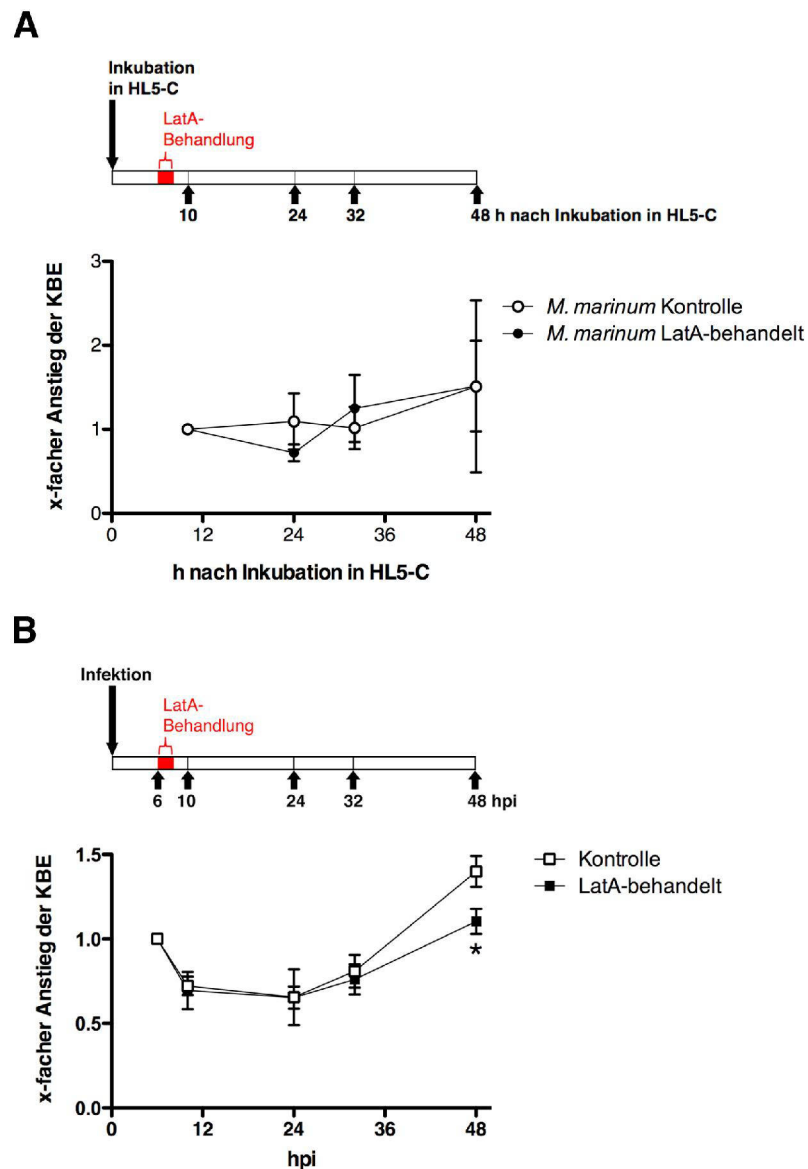


Abbildung 3.12: Depolymerisation des Aktins am frühen Kompartiment führt zur Reduktion der Bakterienzahlen im Infektionsverlauf.

Zählung der KBE (koloniebildende Einheiten) von *M. marinum* nach Inkubation in LatA- bzw. Ethanolhaltigem (Kontrolle) HL5-C-Medium. **(A)** Vorexperiment. *M. marinum* wurde in HL5-C-Medium inkubiert und nach 6 h wurde dem Medium LatA bzw. Ethanol für 2 h hinzugefügt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Inkubation wurden die Mykobakterien auf Kulturplatten überführt und nach Anwachsen zu sichtbaren Kolonien (5-7 d) ausgezählt (n = 3). **(B)** Hauptexperiment. Ax2-Zellen wurden mit *M. marinum* infiziert und bei 6 hpi für 2 h in LatA- bzw. Ethanolhaltigem (Kontrolle) Medium inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Infektionsverlauf wurden die Zellen lysiert und *M. marinum* isoliert. Die Mykobakterien wurden anschließend auf Kulturplatten überführt und nach ihrem Anwachsen zu sichtbaren Kolonien ausgezählt (* p = 0,037, n = 5).

Im Vorexperiment konnte gezeigt werden, dass eine zweistündige Inkubation von *M. marinum* in LatA-haltigem HL5-C-Medium ohne Wirtszellen keinen Einfluss auf die Replikation der Bakterien hat (Abb. 3.12-A). Sowohl die LatA-behandelten als auch die nur dem Lösungsmittel Ethanol ausgesetzten Mykobakterien zeigten nach 48 h Inkubation in HL5-C-Medium ein 1,5-faches Wachstum. Das Hauptexperiment zeigte, dass die LatA-

Exposition infizierter *Dictyostelium*-Zellen bei 6 hpi zu einem geringeren Anstieg der Bakterienzahlen im Vergleich zu den Bakterienzahlen aus Kontrollzellen ab 32 hpi führte (Abb. 3.12-B). Bei 48 hpi wurde für den LatA-Ansatz ein 1,1-facher Anstieg der KBE und für den Kontrollansatz ein 1,4-facher Anstieg gemessen (Abb. 3.12-B). Beide Werte wurden auf die Zahlen der jeweiligen 6 hpi-Zeitpunkte vor der Zugabe von LatA bzw. Ethanol genormt (Abb. 3.12-B). Da das Vorexperiment zeigte, dass LatA keine direkte toxische Wirkung auf *M. marinum* hat, sind die im Hauptexperiment gemessenen Unterschiede in den Bakterienzahlen bei 48 hpi allein auf die Depolymerisation des Aktins der Wirtszelle und der daraus resultierenden Effekte zurückzuführen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass das Aktin in der frühen Phase der Infektion daran beteiligt ist, die Assoziation der V-ATPase und damit die Ansäuerung des Kompartiments zu reduzieren. Wird das Aktin zu dem Zeitpunkt depolymerisiert, sind die Folgen selbst in der späten Infektionsphase unumkehrbar und ausreichend, um das Wachstum der Mykobakterien in *Dictyostelium* zu reduzieren.

3.6.3 WASH trägt zur Ausbreitung der Infektion von *M. marinum* in *Dictyostelium* bei

Der Erfolg einer Infektion von *M. marinum* in *Dictyostelium* wird darin gemessen, wie effizient das Bakterium sich in seiner Wirtszelle vermehren und diese über eine Aktin-Struktur, bezeichnet als *Ejectosome*, verlassen kann (Hagedorn et al 2009, Hagedorn & Soldati 2007). Die Anzahl der *Ejectosomes* zu einem bestimmten Zeitpunkt ist ein Maß für die Effizienz der Ausbreitung des Bakteriums von Zelle zu Zelle. Im nachfolgenden Experiment wurde die Häufigkeit eines solchen Austritts aus der Wirtszelle in Abhängigkeit von dem Vorhandensein von WASH gemessen. Dazu wurden Wildtyp-, *wshA*⁻- und mit GFP-WASH komplementierte *wshA*⁻-Zellen mit *M. marinum* infiziert und die Anzahl gebildeter *Ejectosomes* pro 100 infizierte Zellen in der späten Infektionsphase (21-26 hpi) bestimmt.

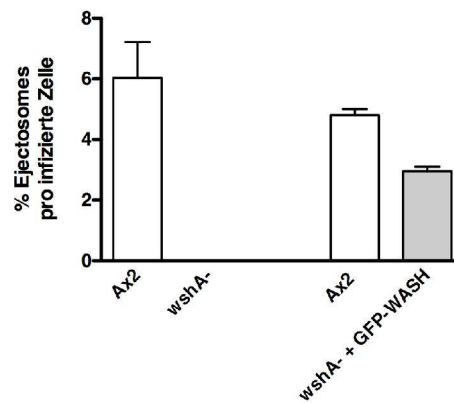


Abbildung 3.13: Die Ausbildung von *Ejectosomes* ist abhängig von WASH.

Ax2, wshA⁻ und mit GFP-WASH komplementierte wshA⁻-Zellen wurden mit *M. marinum* gfp infiziert und zwischen 21 und 26 hpi fixiert. Das Aktin wurde über Phalloidin Alexa Fluor 568 markiert. Die Anzahl der *Ejectosomes* pro 100 infizierte Zellen wurde anschließend mithilfe der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Während in wshA⁻-Zellen keine *Ejectosomes* beobachtet werden konnten (n = 6), führte die Komplementierung der Deletion durch GFP-WASH erneut zur Ausbildung der Aktin-basierten Struktur (n = 2).

Während ca. 6% aller infizierten Wildtyp-Zellen bei 21-26 hpi *Ejectosomes* aufwiesen, konnte in wshA⁻-Zellen kein *Ejectosome* in einem der sechs unabhängig voneinander durchgeführten Experimente beobachtet werden (Abb. 3.13). Die Expression von GFP-WASH in wshA⁻-Zellen führte erneut zu einer Ausbildung von der Aktin-basierten Struktur (3%, Abb. 3.13). Die Ergebnisse belegen zum einen, dass die Ausbildung von *Ejectosomes* von dem Vorhandensein von WASH abhängig ist. Zum anderen legen sie nahe, dass *M. marinum* keinen vollständigen und somit erfolgreichen Infektionszyklus in wshA⁻-Zellen durchläuft.

Um die bisherigen Ergebnisse zu überprüfen, wurde der Infektionsverlauf von grünfluoreszierenden *M. marinum* in Ax2-Wildtyp-Zellen im Vergleich zu wshA⁻-Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie bis 48 hpi analysiert. Wie im Abschnitt 2.9 dargestellt, lassen sich in einer grafischen Auftragung der Vorwärtslichtstreuung (Maß für Zellgröße) und der gemessenen grünen Fluoreszenz (Detektion der grünfluoreszierenden Bakterien) drei verschiedene Populationen voneinander trennen. Dazu gehört die Gruppe der nicht-infizierten Zellen (* groß, nicht fluoreszent), der infizierten Zellen (** groß, stark fluoreszent) sowie die der extrazellulären Bakterien (***) klein, stark fluoreszent, s. auch 3.14-A). Im Infektionsverlauf von *M. marinum* in den beiden Zelllinien wurde zunächst die Proliferation der Gesamtzellen (Summe aus nicht-infizierten (*) und infizierten (**)) Zellen) und die Anzahl der extrazellulären Bakterien (***) verfolgt. Darüber hinaus wurde die Entwicklung der Population infizierter Zellen hinsichtlich ihres Fluoreszenzprofils, ihrer Größe und ihrer Gesamtfluoreszenz analysiert. Um Aussagen über absolute Werte treffen zu können, wurde bei jeder Messung dasselbe Volumen analysiert (für Details s. Abschnitt 2.9).

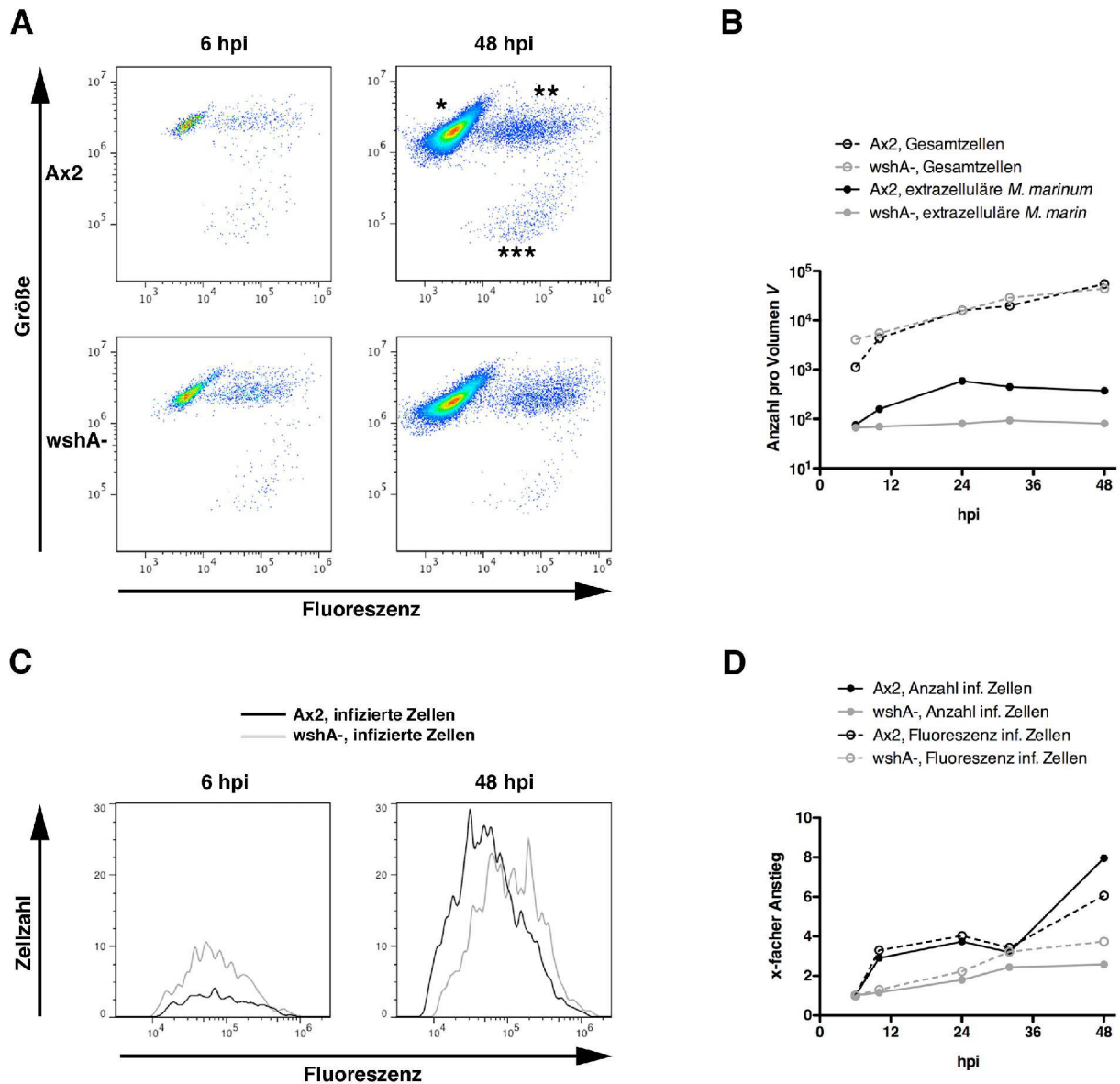


Abbildung 3.14: Die Deletion von WASH führt zu einer geringeren Ausbreitung der Infektion von *M. marinum* in *Dictyostelium*.

Ax2-Wildtyp-Zellen und wshA⁻-Zellen wurden mit *M. marinum* infiziert und der Infektionsverlauf (6, 10, 24, 32 und 48 hpi) wurde mithilfe der Durchflusszytometrie verfolgt. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von insgesamt drei unabhängigen Experimenten. **(A)** Aus der grafischen Auftragung der Vorwärtslichtstreuung (Maß für Partikelgröße) und der Fluoreszenzintensität konnte zwischen den Populationen der nicht-infizierten Zellen (*), infizierten Zellen (**) und extrazellulären Bakterien (***) unterschieden werden. Die Diagramme zeigen die unterschiedlichen Populationen, die aus der Infektion der Ax2- und wshA⁻-Zellen bei 6 und 48 hpi resultierten. **(B)** Quantifizierung der Anzahl der Gesamtzellen (Summe aus * und **) sowie die der extrazellulären Mykobakterien (***) zwischen 6 und 48 hpi. Während die Entwicklung der Gesamtzellzahl der beiden Zelllinien ähnlich war, wurden in der Infektion von wshA⁻-Zellen weniger extrazelluläre Bakterien ab 10 hpi gemessen. **(C)** Histogramme der Population infizierter Ax2- und wshA⁻-Zellen bei 6 und 48 hpi. Bei 48 hpi wiesen infizierte Ax2-Zellen vorwiegend eine geringe Fluoreszenz auf. In den meisten infizierten wshA⁻-Zellen wurde dagegen eine mittlere bis starke Fluoreszenz gemessen. **(D)** Quantifizierung der infizierten Zellen (inf. Zellen) und ihrer jeweiligen Gesamtfluoreszenz zwischen 6 und 48 hpi. Die Zahlen wurden auf den Wert von 6 hpi der jeweiligen Zelllinie genormt und als Vielfaches davon dargestellt. In der Infektion von Ax2 waren bis 48 hpi deutlich mehr Zellen infiziert und auch die Gesamtfluoreszenz war gegenüber den wshA⁻-Zellen erhöht.

Aus den Plots in Abb. 3.14-A ist zunächst ersichtlich, dass die Populationsgrößen der infizierten (**) und der nicht-infizierten (*) Zellen in Wildtyp- und *wshA*⁻-Zellen zwischen 6 und 48 hpi deutlich zugenommen haben. Eine Quantifizierung der Gesamtzellzahl (Summe aus infizierten und nicht-infizierten Zellen) in Abb. 3.14-B zeigte, dass sowohl Ax2- als auch *wshA*⁻-Zellen bei 48 hpi auf etwa 5×10^5 Zellen angewachsen waren. Somit war, wie bereits publiziert (Carnell et al 2011), das Proliferationsverhalten der Deletionsmutante ähnlich dem des Wildtyps. Was sich jedoch deutlich zwischen den beiden Zelllinien unterschied, war die Anzahl der extrazellulären Bakterien bei 48 hpi (Abb. 3.14-A). Die Quantifizierung in Abb. 3.14-B zeigte, dass, ausgehend von einer vergleichbaren Anzahl extrazellulärer Bakterien bei 6 hpi bei beiden Zelllinien (je ca. 70 Bakterien), der Wildtyp bereits ab 10 hpi (ca. 160 Bakterien) und deutlich bei 24 hpi (ca. 600 Bakterien) Mykobakterien ins umgebende Medium entlassen hat. Im Fall der *wshA*⁻-Zellen blieb die Anzahl extrazellulärer Bakterien im gesamten Infektionsverlauf nahezu konstant (ca. 70-90 Bakterien). Diese Beobachtung stimmt damit überein, dass die Deletionsmutante nicht in der Lage ist, *Ejectosomes* auszubilden und *M. marinum* daher nicht aus der Zelle austreten kann. Um rückschließend zu überprüfen, ob die Mykobakterien in ihren Wirtszellen zurückgehalten werden, wurde die Entwicklung der Population der intrazellulären Bakterien analysiert. Dazu wurde ein Fluoreszenzprofil von der Gruppe der infizierten Zellen in Form eines Histogramms erstellt (Abb. 3.14-C). Dieses gibt Aufschluss darüber, wie die Fluoreszenz, und somit die Bakterien in den Zellen verteilt sind. Es stellte sich heraus, dass bei 6 hpi sowohl die meisten Wildtyp- als auch die meisten *wshA*⁻-Zellen mit einer mittleren Menge an *M. marinum* infiziert waren. Die durchschnittliche Fluoreszenz der Wildtyp-Zellen betrug $1,27 \times 10^5$ Einheiten und die der Deletionsmutante durchschnittlich $1,08 \times 10^5$ Einheiten. Bei 48 hpi war eine deutliche Änderung der Fluoreszenzverteilung zwischen den beiden Zelllinien festzustellen. Während die meisten Ax2-Zellen mit einer geringen Bakterienmenge beladen waren (durchschnittliche Fluoreszenz: $0,95 \times 10^5$ Einheiten), waren die meisten *wshA*⁻-Zellen mit einer mittleren bis hohen Anzahl von *M. marinum* infiziert (durchschnittliche Fluoreszenz: $1,58 \times 10^5$ Einheiten, Abb. 3.14-C). Aus den Beobachtungen, dass in *wshA*⁻-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen die Population der extrazellulären Bakterien im Infektionsverlauf konstant blieb und die durchschnittliche Fluoreszenz pro infizierte Zelle zunahm, lässt sich schließen, dass die Mykobakterien in *wshA*⁻-Zellen zwar proliferieren dort jedoch akkumulieren. Um Aussagen über das Ausmaß der Proliferation von *M. marinum* in den beiden Zelllinien machen zu können, wurde die Population der infizierten Zellen analysiert. Dazu wurde die Anzahl der infizierten Zellen und ihre Gesamtfluoreszenz, d. h. das Produkt aus der Anzahl der infizierten Zellen und der durchschnittlichen Fluoreszenz einer infizierten Zelle, miteinander verglichen. Die gemessenen Werte wurden auf die jeweiligen Zahlen des 6 hpi-Zeitpunktes

genormt. Die Analyse der Entwicklung der Populationsgröße der infizierten Zellen ergab für den Wildtyp einen achtfachen und für *wshA*⁻-Zellen nur einen zweifachen Anstieg zwischen 6 und 48 hpi (Abb. 3.14-D). Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass die infizierten *wshA*⁻-Zellen sich seltener teilen als infizierte Wildtyp-Zellen. Da die Deletionsmutante außerdem keine Bakterien ins Medium entlässt, ist es naheliegend, dass die Reinfektion neuer Wirtszellen durch bereits freigelassene Bakterien ausbleibt. Beide Effekte zusammengenommen setzen die Anzahl der infizierten Zellen vergleichsweise herab. Die Analyse der Gesamtfluoreszenz, und somit der Gesamtheit aller grünfluoreszierender intrazellulärer Bakterien, ergab für Ax2 einen 6,1-fachen Anstieg zwischen 6 und 48 hpi. In *wshA*⁻-Zellen belief sich die relative Zunahme jedoch nur auf 3,7 (Abb. 3.14-D). Damit ist in den Wildtyp-Zellen ein ca. 1,65-fach besseres Wachstum der Mykobakterien möglich. *M. marinum* ist zwar in der Lage, in *wshA*⁻-Zellen zu replizieren (Zunahme der Gesamtfluoreszenz), jedoch bleibt die Infektion auf eine geringere Anzahl von Zellen beschränkt.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass WASH und das durch das WASH generierte Aktin am frühen Kompartiment zur Ausbreitung der Infektion von *M. marinum* in *Dictyostelium* beitragen.

3.7 Infektion muriner Phagozyten mit *M. marinum* und *M. tuberculosis*

Die Versuche im *Dictyostelium*-Modellsystem zeigten, dass WASH-vermitteltes Aktin am frühen *M. marinum*-Kompartiment lokalisiert und dort das Recycling der V-ATPase stimuliert. Durch die Deletion von WASH oder die Depolymerisation des Aktins werden die Kompartimente angesäuert und das Wachstum von *M. marinum* wird limitiert. In dem nachfolgenden Kapitel wurden die wichtigsten Beobachtungen auf das murine Phagozyten-Modell übertragen. Ziel der Analysen war es, zu überprüfen, ob Aktin auch dort, am Kompartiment von *M. marinum* und dem Humanpathogen *Mycobacterium tuberculosis*, lokalisiert. Im Falle einer Lokalisation an der mykobakteriellen Vakuole sollte im Folgenden die Rolle des Aktins dort näher charakterisiert werden.

3.7.1 Aktin und WASH lokalisieren an den frühen Kompartimenten von *M. marinum* und *M. tuberculosis* in murinen Phagozyten

Zunächst wurde untersucht, ob und wann Aktin und WASH an den Kompartimenten von *M. marinum* und *M. tuberculosis* lokalisieren. Dazu wurde die Zelllinie BV-2 mit *M. marinum* und die Zelllinie RAW-B mit *M. tuberculosis* infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Infektion (1, 2, 4, 6 und 24 hpi) fixiert. Das Aktin wurde durch eine Phalloidin-Färbung und WASH durch eine Immunfluoreszenz-Färbung markiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

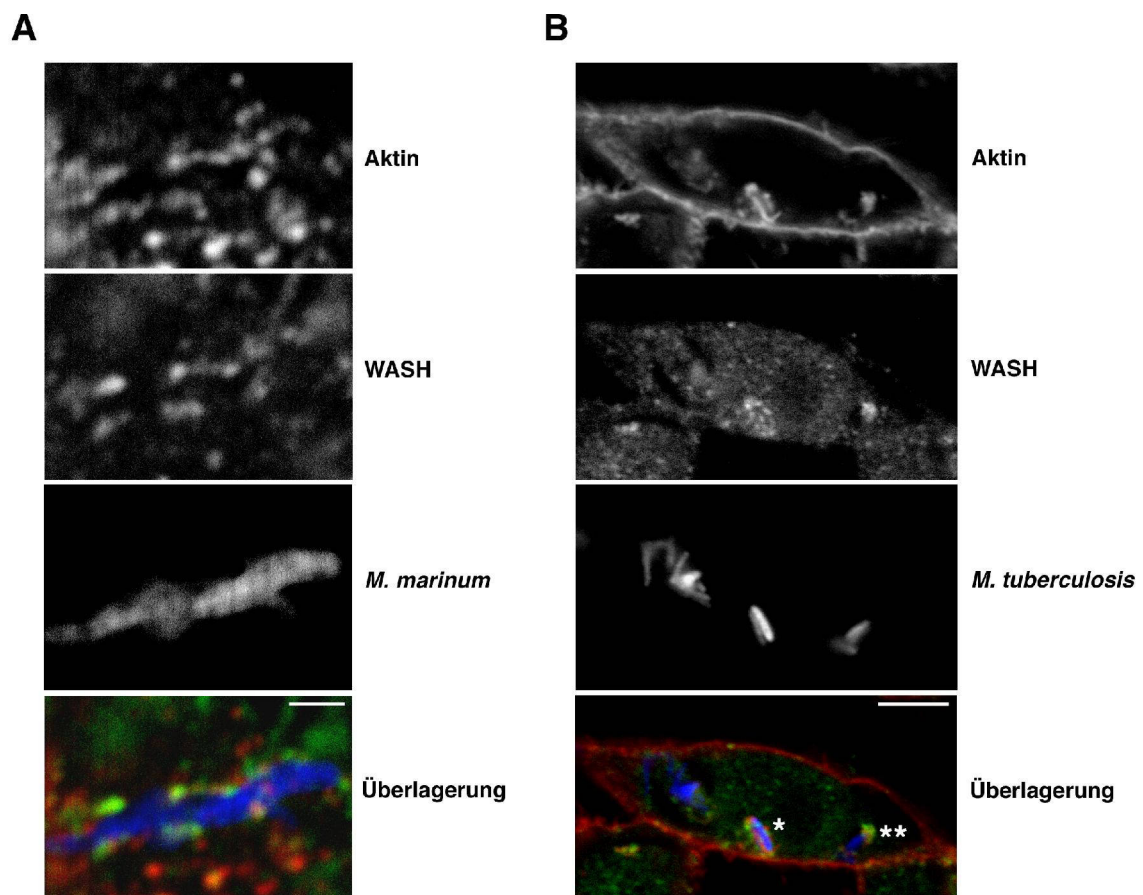


Abbildung 3.15: Aktin lokalisiert an den frühen Kompartimenten von *M. marinum* und *M. tuberculosis* in murinen Phagozyten.

Analyse der Lokalisation von Aktin und WASH in infizierten murinen Phagozyten bei 2 hpi mithilfe der konfokalen Mikroskopie. Aktin wurde jeweils durch Phalloidin Alexa Fluor 568 und WASH durch eine Immunfluoreszenz-Färbung markiert. **(A)** Mit *M. marinum* gfp infizierte BV-2-Zellen. Aktin (rot) und WASH (grün) lagerten sich in nur teils überlagernden Punkten um *M. marinum* (blau) an. Größenbalken = 2 μm . **(B)** Mit *M. tuberculosis* gfp infizierte RAW-B-Zellen. Während Aktin (rot) das Bakterium fast vollständig umschloss, war WASH (grün) in großen Punkten um *M. tuberculosis* (blau) lokalisiert (* und **). Größenbalken = 5 μm .

In drei unabhängigen Versuchen waren sowohl in der Infektion mit *M. marinum* als auch mit *M. tuberculosis* Aktin und WASH gelegentlich und ausschließlich bei 2 hpi um die jeweiligen Bakterien lokalisiert (Abb. 3.15). Ab 4 hpi wurde keine Assoziation beobachtet. An der

M. marinum-Vakuole lag Aktin in deutlichen Punkten, die nur partiell mit WASH überlappten, auf der vollen Länge des Kompartiments vor (Abb. 3.15-A). Die *M. tuberculosis*-Vakuole hingegen zeigte häufiger eine stärkere Assoziation mit Aktin, das die Bakterien umschloss. Auch hier lag WASH in deutlichen Punkten um das Kompartiment vor (Abb. 3.15-B). Damit weisen die Ergebnisse erneut darauf hin, dass die Assoziation von Aktin am Kompartiment pathogener Mykobakterien einen transienten Zustand darstellt, der sich auf die sehr frühe Phase in der Infektion erstreckt. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen aus dem *Dictyostelium*-Modell bei 6 hpi überein (vgl. Abschnitt 3.1).

3.7.2 Depolymerisation des Aktins führt zur Azidifizierung der Vakuolen von *M. marinum* und *M. tuberculosis*

Im *Dictyostelium*-Modellsystem wurde gezeigt, dass die Depolymerisation des Aktins zur Anreicherung der V-ATPase an der *M. marinum*-Vakuole führt. Gleichzeitig nahm der Anteil azider Kompartimente zu. Da Aktin auch an den Kompartimenten von *M. marinum* und *M. tuberculosis* in murinen Phagozyten bei 2 hpi vorlag, wurde überprüft, ob die Depolymerisation des Aktins hier ebenfalls mit einer Azidifizierung der mykobakteriellen Vakuolen einhergeht. Daneben wurde in gleicher Weise der 4 hpi-Zeitpunkt analysiert. Da zu diesem Zeitpunkt kein Aktin mehr an den Kompartimenten beobachtet wurde, ist davon ausgegangen worden, dass die Depolymerisation des Aktins dann keinen Einfluss mehr auf die mykobakterielle Vakuole hat. In dem entsprechenden Versuch wurden die murinen Zelllinien mit dem jeweiligen Pathogen infiziert und anschließend mit dem pH-Indikator Lysotracker (LT) beladen. Bei 2 bzw. 4 hpi wurden die Zellen 30 min in LatA- bzw. DMSO-haltigem (DMSO-Kontrolle) Medium oder nur im Medium (Medium-Kontrolle) inkubiert. Im Anschluss wurden die Phagozyten sofort fixiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. LT ist ein azidophiler Marker, der im neutralen Zustand membranpermeabel ist. Nach der Protonierung in einer sauren Umgebung wird er in den jeweiligen Vakuolen zurückgehalten und weist eine rote Färbung auf. Nach der Fixierung der Zellen bleibt das Signal des LT erhalten.

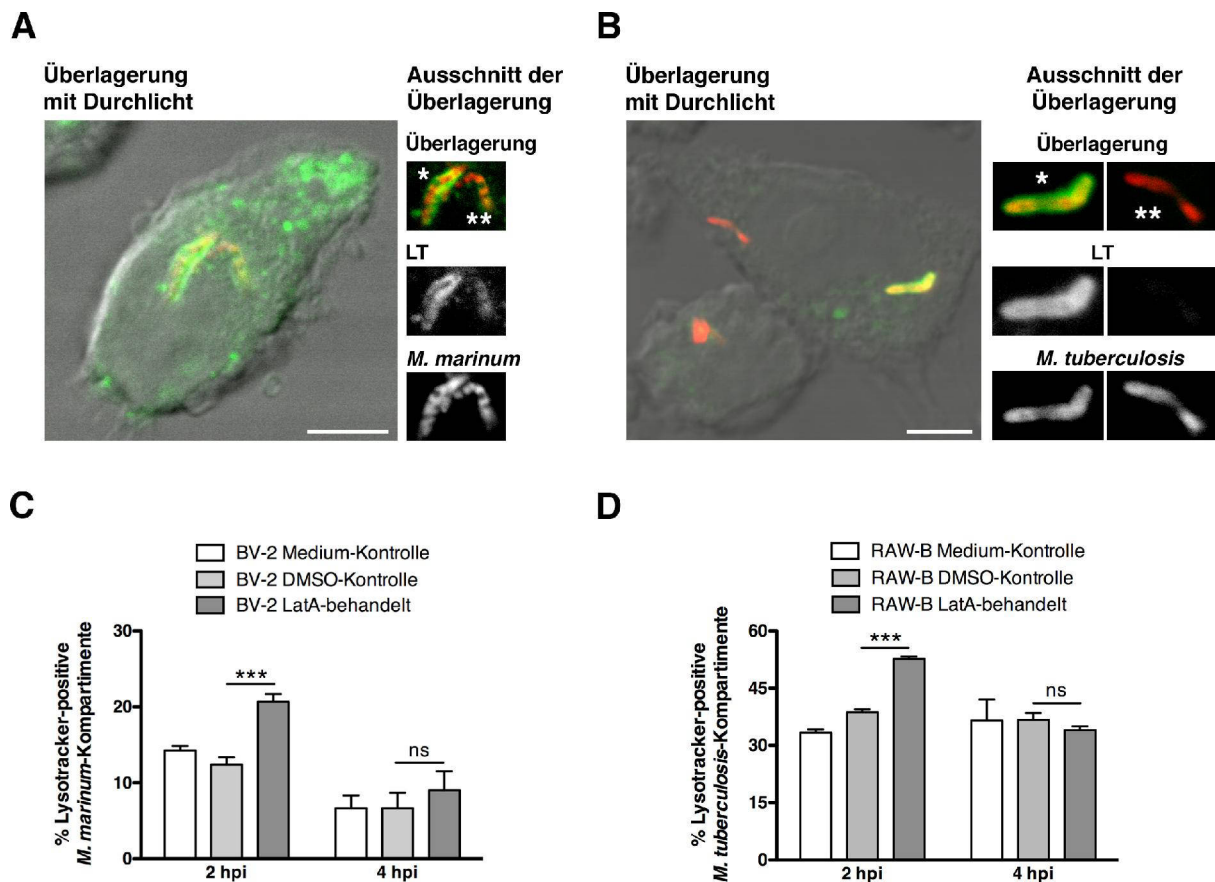


Abbildung 3.16: Depolymerisation des Aktins in murinen Phagozyten führt zur Azidifizierung der Vakuolen von *M. marinum* und *M. tuberculosis*.

Infizierte BV-2- bzw. RAW-B-Zellen wurden mit Lysotracker (LT) beladen und anschließend 30 min in LatA- bzw. DMSO-haltigem (DMSO-Kontrolle) Medium oder nur im Medium (Medium-Kontrolle) bei 2 und 4 hpi inkubiert. **(A)** Mit *M. marinum* gfp infizierte BV-2-Zellen. Es konnte deutlich zwischen Bakterien (rot) unterschieden werden, die in einem LT (grün)-positivem Kompartiment lokalisiert waren (*) und Bakterien, die LT-negativ waren (**). Größenbalken = 5 μ m. **(B)** Mit *M. tuberculosis* gfp infizierte RAW-B-Zellen. Auch in RAW-B-Zellen war die Unterscheidung zwischen LT (grün)-positiven (*) und LT-negativen (**) Bakterien (rot) gut möglich. Größenbalken = 5 μ m. **(C)** Quantifizierung von LT-positiven *M. marinum* in BV-2-Zellen. Verglichen mit der DMSO-Kontrolle stieg der Anteil LT-positiver Bakterien nach der LatA-Exposition bei 2 hpi an (***) $p = 0,0007$, $n = 6$). Bei 4 hpi war kein signifikanter Unterschied mehr messbar (ns: $p > 0,5$, $n = 3$). **(D)** Quantifizierung von LT-positiven *M. tuberculosis* in RAW-B-Zellen ($n = 3$). Bei 2 hpi wurde ein Anstieg in der Anzahl LT-positiver Bakterien nach einer LatA-Exposition, verglichen mit Bakterien aus DMSO-Kontrollzellen, gemessen (***) $p = 0,0002$). Zum späteren Zeitpunkt (4 hpi) unterschieden sich die Werte zwischen den Kontrollen und dem LatA-Ansatz nicht mehr (ns: $p > 0,27$).

Beide Zelllinien ließen sich sehr gut mit dem pH-Marker Lysotracker beladen. Es konnte daher deutlich zwischen LT-positiven, d. h. aziden (**, Abb. 3.16-A und 3.16-B), und LT-negativen, neutralen Kompartimenten (*, Abb. 3.16-A und 3.16-B) unterschieden werden. Eine Quantifizierung der LT-positiven *M. marinum*-Vakuolen in BV-2-Zellen nach einer LatA-Exposition im Vergleich zu infizierten Kontrollzellen, die nur dem Lösungsmittel DMSO ausgesetzt waren, ergab einen signifikanten Anstieg von durchschnittlich 12% auf 21%. Bei 4 hpi schwankten die Werte zwischen 7% (DMSO-Kontrolle) und 9% (LatA-Ansatz, Abb. 3.16-C). Um einen möglichen Einfluss des Lösungsmittels DMSO auszuschließen, wurden

auch solche Zellen ausgezählt, die während der DMSO- bzw. LatA-Exposition nur dem reinen Kulturmedium (Medium-Kontrolle) ausgesetzt waren. Es konnte jedoch weder bei 2 hpi (15%) noch bei 4 hpi (7%) ein Unterschied zu der DMSO-Kontrolle gemessen werden (Abb. 3.16-C). In der Infektion mit *M. tuberculosis* wurde ebenfalls ein signifikanter Anstieg von LT-positiven Kompartimenten bei 2 hpi (von durchschnittlich 39% in der DMSO-Kontrolle auf 53% nach der LatA-Exposition) gemessen. Bei 4 hpi waren keine signifikanten Änderungen mehr messbar. In der DMSO-Kontrolle wurden 37% und nach einer Exposition in LatA-haltigem Medium 34% LT-positive Bakterien gezählt (Abb. 3.16-D). Auch hier hatte das DMSO keinen Einfluss auf die Änderung des pH-Wertes der Kompartimente, weder bei 2 hpi (33%) noch bei 4 hpi (37%, Abb. 3.16-D). Im murinen Phagozyten-Modell konnte wie in den *Dictyostelium*-Experimenten (vgl. Abschnitt 3.7.1) gezeigt werden, dass die Depolymerisation des Aktins mit einer Zunahme azider Kompartimente korreliert. In den Experimenten mit *M. marinum* handelte es sich um eine 1,8-fache und in den Versuchen mit *M. tuberculosis* um eine 1,4-fache Zunahme.

3.7.3 Depolymerisation des Aktins fördert die Anreicherung von LAMP-1 am *M. tuberculosis*-Kompartiment

Das vorangegangene Experiment zeigte, dass die Depolymerisation des Aktins mit einer Zunahme azider Kompartimente einhergeht. Der Anstieg in der Protonenkonzentration eines Phagosoms ist auf die Anreicherung der V-ATPase zurückzuführen. Das so angesäuerte Phagosom fusioniert anschließend mit Lysosomen unter Bildung eines Phagolysosoms (Huotari & Helenius 2011). In einem abschließenden Experiment wurde untersucht, ob die Depolymerisation des Aktins und der dadurch bedingte Abfall des pH-Werts in der *M. tuberculosis*-Vakuole ebenfalls mit einer Zunahme lysosomaler Marker in der Membran des Kompartiments korreliert. Eine abundante Klasse der Lysosom-assoziierten Proteine bilden die LAMP (*Lysosome-Associated Membrane Protein*), (Eskelinen et al 2003). Um zu überprüfen, ob die Depolymerisation des Aktins möglicherweise die Fusion der mykobakteriellen Kompartimente mit Lysosomen begünstigt, wurde die Assoziation von *M. tuberculosis* mit den Proteinen LAMP-1 und LAMP-2 quantifiziert. Dazu wurden RAW-B-Makrophagen mit *M. tuberculosis* infiziert und bei 2 und 4 hpi für 30 min in LatA- bzw. DMSO-haltigem (DMSO-Kontrolle) Medium oder nur im Medium (Medium-Kontrolle) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert und LAMP-1 sowie LAMP-2 jeweils durch eine Immunfluoreszenz-Färbung markiert.

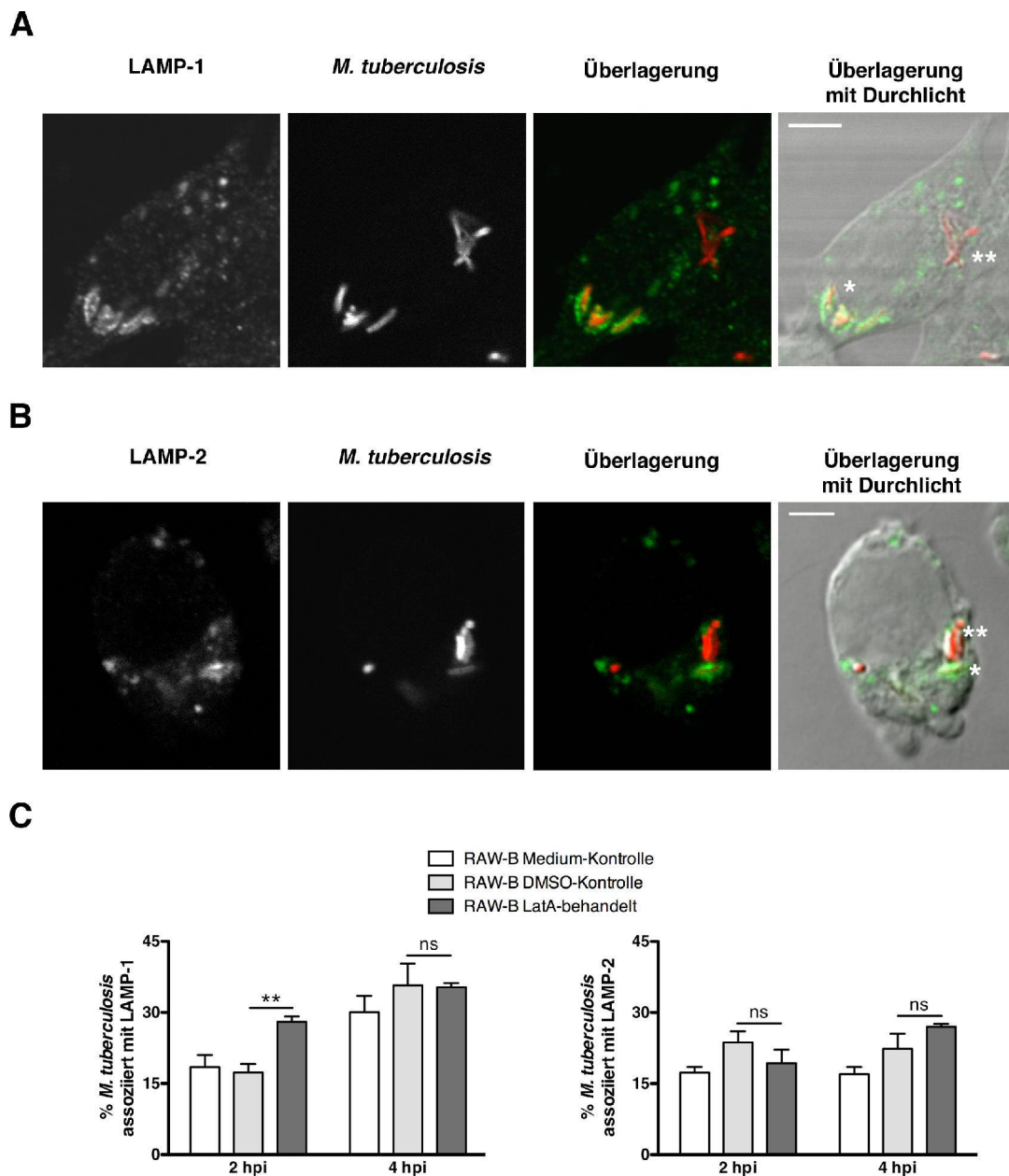


Abbildung 3.17: Depolymerisation des Aktins in RAW-B-Makrophagen fördert die Anreicherung von LAMP-1 am *M. tuberculosis*-Kompartiment.

RAW-B-Makrophagen wurden mit *M. tuberculosis* gfp infiziert und bei 2 bzw. 4 hpi für 30 min in LatA- bzw. DMSO-haltigem (DMSO-Kontrolle) Medium oder nur im Medium (Medium-Kontrolle) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Proteine LAMP-1 bzw. LAMP-2 durch eine Immunfluoreszenz-Färbung markiert. **(A)** Lokalisation von LAMP-1. Beispielhafte Darstellung einer Assoziation (*) und keiner Assoziation (**) von LAMP-1 (grün) mit *M. tuberculosis* (rot). Größenbalken = 5 μ m. **(B)** Lokalisation von LAMP-2. Auch hier wurde zwischen einer Assoziation (*) von *M. tuberculosis* (rot) mit LAMP-2 (grün) und keiner Assoziation mit LAMP-2 (**) unterschieden. Größenbalken = 5 μ m. **(C)** Quantifizierung der Assoziation von je LAMP-1 oder LAMP-2 mit *M. tuberculosis* mithilfe der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie (n = 3). Während die Anzahl LAMP-1-positiver Bakterien nach einer Exposition in LatA-haltigem Medium im Vergleich zur DMSO-Kontrolle bei 2 hpi signifikant anstieg (** p = 0,0072), war bei 4 hpi kein Unterschied mehr messbar (ns: p > 0,9). Bei der Quantifizierung von LAMP-2 wurde weder bei 2 hpi (ns: p > 0,3) noch bei 4 hpi (ns: p > 0,2) eine statistisch signifikante Änderung zwischen den LatA-behandelten Zellen und Zellen aus der DMSO-Kontrolle gemessen.

Die Analyse der Immunfluoreszenz-Färbung von LAMP-1 (Abb. 3.17-A) und von LAMP-2 (Abb. 3.17-B) ergab, dass einige *M. tuberculosis*-Vakuolen deutlich von dem jeweiligen Protein umgeben waren. Die meisten Kompartimente bei 2 und 4 hpi zeigten jedoch keine Assoziation. Die Quantifizierung von LAMP-1 bei 2 hpi ergab einen signifikanten Anstieg von durchschnittlich 17% in der DMSO-behandelten Kontrolle auf 28% nach einer LatA-Exposition (Abb. 3.17-C). Bei 4 hpi war keine Änderung messbar (DMSO-Kontrolle: 36%; nach LatA-Exposition: 35%). Ein Vergleich der DMSO-exponierten Zellen und solcher, die in reinem Kulturmedium inkubiert wurden, ergab weder bei 2 noch bei 4 hpi einen Unterschied, sodass ein Einfluss des DMSO auf die LAMP-1-Assoziation am Kompartiment ausgeschlossen werden konnte (Abb. 3.17-C). Die Quantifizierung von LAMP-2 ergab weder bei 2 hpi (DMSO-Kontrolle: 24%; nach LatA-Exposition: 19%) noch bei 4 hpi (DMSO-Kontrolle: 22%; nach LatA-Exposition: 27%) eine signifikante Änderung (Abb. 3.17-D). Auch hier hatte das Lösungsmittel DMSO, in dem LatA verdünnt war, keinen Einfluss auf die LAMP-2 Assoziation am Kompartiment (Abb. 3.17-D).

Zusammenfassend zeigen die Experimente im murinen Phagozyten-Modell, dass das Aktin bei 2 hpi transient am mykobakteriellen Kompartiment lokalisiert. Wird das Aktin zu diesem Zeitpunkt depolymerisiert, steigt die Anzahl azider *M. marinum* und *M. tuberculosis*-Vakuolen. Damit konnten hier die Beobachtungen aus dem *Dictyostelium*-Modellsystem rekapituliert werden. Darüber hinaus konnte im Makrophagen-Modell gezeigt werden, dass sich das lysosomale Protein LAMP-1, nicht jedoch LAMP-2, in der Membran der *M. tuberculosis*-Vakuole anreichert. Diese Beobachtung weist möglicherweise auf die Fusion des Kompartiments mit einer besonderen Lysosom-Subklasse hin.

4 Diskussion

Pathogene Mykobakterien verfügen über vielfältige Mechanismen zur Manipulation der Biogenese ihrer Vakuole in Wirtszellen. Ein wichtiges Ereignis in der Etablierung ihrer Replikationsnische ist der erfolgreiche Ausschluss der V-ATPase aus der Membran des Phagosoms (Sturgill-Koszycki et al 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Wirtszellproteins WASH (*Wiskott-Aldrich-syndrome protein and SCAR Homolog*) und des davon generierten Aktins in der Etablierung und Aufrechterhaltung des mykobakteriellen Kompartiments in einem Phagozyten-Modell untersucht. Im *Dictyostelium*-Modellsystem wurde gezeigt, dass sowohl die Deletion von WASH als auch die Depolymerisation des Aktins zur Anreicherung der V-ATPase an der *M. marinum*-Vakuole führte. Als Folge davon wurden die Kompartimente angesäuert und die Proliferation der Bakterien reduziert. Die Schlussfolgerungen aus dem *Dictyostelium*-Modell konnten in der Infektion muriner Phagozyten mit *M. tuberculosis* rekapituliert werden. Das erste Kapitel der Diskussion setzt sich mit der Wahl der beiden Modellsysteme zur Untersuchung der Infektion mit Mykobakterien auseinander. Anschließend folgt eine Ausführung über die Methoden zur Depolymerisation des Aktins und die Auswirkungen auf das mykobakterielle Kompartiment sowie auf den gesamten Infektionsverlauf. Zuletzt werden die möglichen Wirkungsmechanismen von WASH und Aktin am mykobakteriellen Kompartiment anhand von zwei Modellen diskutiert.

4.1 Modellsysteme zur Untersuchung der Infektion mit Mykobakterien

Um zu verstehen, wie *M. tuberculosis* die alveolaren Makrophagen infiziert und seine Replikationsvakuole in ihnen etabliert, werden zellbasierte Infektionsmodelle herangezogen. Aufgrund ihrer einfachen Handhabung wurden in der vorliegenden Arbeit zwei leukämische Zelllinien aus der Maus verwendet, zum einen RAW-B-Makrophagen, zum anderen BV-2-Mikroglia-Zellen. Letztere eignen sich ebenfalls sehr gut als Wirtsmodell für Infektionen mit *M. tuberculosis*, da Mikroglia-Zellen die wichtigsten Wirtszellen bei der Entwicklung einer Neurotuberkulose darstellen (Curto et al 2004, Peterson et al 1995). Da die Arbeiten mit *M. tuberculosis* nur unter Laborbedingungen der Sicherheitsstufe S3 durchgeführt werden dürfen und die Bakterien eine Generationszeit von 24 h aufweisen, ist die Vorbereitung und die Durchführung der Versuche besonders zeitintensiv. Aus diesem Grund wurde der experimentelle Hauptteil dieser Arbeit im *Dictyostelium*-*M. marinum*-Modellsystem

durchgeführt. Sowohl die Amöbe *Dictyostelium* als auch Phagozyten der Säugetiere greifen auf die gleichen evolutionär konservierten Mechanismen zum Abtöten von Mikroorganismen zurück. Diese Mechanismen haben sich ursprünglich in primitiven Protozoen, wie z. B. Amöben, entwickelt (Cosson & Soldati 2008). Da *Dictyostelium* Wachstumstemperaturen von bis zu 25 °C toleriert, sind Infektionen mit *M. marinum* gut möglich. *M. marinum* ist ein S2-Organismus, der bei 25-35 °C wächst und eine Generationszeit von nur 6 h bei 25 °C hat (Clark & Shepard 1963). Darüber hinaus ist er ein naher Verwandter von *M. tuberculosis* und ein etabliertes Modellbakterium zur Untersuchung dessen Pathogenität (Berg & Ramakrishnan 2012, Stamm & Brown 2004, Stinear et al 2008). Sowohl die Mechanismen der Nischenetablierung in Phagozyten als auch die der Ausbildung von Granulomen sind bei beiden Bakterien sehr ähnlich (Swaim et al 2006, Tobin & Ramakrishnan 2008). Darüber hinaus wurde der Infektionsverlauf von *M. marinum* in *Dictyostelium*-Zellen bereits in vorangegangenen Arbeiten grundlegend beschrieben (Hagedorn et al 2009, Hagedorn & Soldati 2007, Solomon et al 2003). Zur Untersuchung der Rolle von Aktin und Aktin-regulierenden Proteinen in der Infektion mit Mykobakterien ist *Dictyostelium* besonders gut geeignet. Die Amöbe ist der am häufigsten verwendete Modellorganismus zur Untersuchung des Aktin-Zytoskeletts sowie der Zellmotilität und es stehen zahlreiche Deletionsmutanten Aktin-bindender und -regulierender Proteine zur Verfügung (Noegel & Schleicher 2000). So wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig die *Dictyostelium*-Mutante von WASH für Infektionsversuche verwendet. Diese Experimente können in einem Makrophagen-Modell nicht durchgeführt werden, da die Deletion von WASH hier zu einem Zusammenbruch des endolysosomalen Netzwerks führt (Gomez et al 2012). *Dictyostelium* ist außerdem ein sehr gut untersuchtes Modell für den endosomalen Transit in Phagozyten (Maniak 2003, Neuhaus et al 2002, Ravanel et al 2001). Vor allem sind die Mechanismen der Anreicherung (Clarke et al 2002) und des Recyclings der V-ATPase (Clarke et al 2010) an Endosomen bereits im Detail untersucht. Dieses grundlegende Wissen wurde für die Analysen der Akkumulation der V-ATPase am mykobakteriellen Kompartiment genutzt. Da es möglich ist, Fusionsproteine aus einzelnen Untereinheiten der V-ATPase und fluoreszierenden Proteinen in *Dictyostelium* zu exprimieren, konnten Lebendzell-mikroskopische Untersuchungen durchgeführt werden. Nicht zuletzt besteht im *Dictyostelium*-Modell die Möglichkeit, die Membran des Kompartiments über den gesamten Infektionsverlauf hinweg mithilfe eines Markerproteins zu visualisieren (Hagedorn & Soldati 2007). Es handelt sich dabei um den putativen Kupfertransporter p80 (Ravanel et al 2001). Dieser wurde hier als Referenzprotein herangezogen, um zunächst die Membran des Kompartiments zu lokalisieren und dann Änderungen in ihrer Komposition nachzuverfolgen. Seine Funktion hinsichtlich des Ionentransports wird in Abschnitt 4.3 diskutiert. Im Makrophagen-Modell ist kein solches

Markerprotein der mykobakteriellen Vakuole bekannt. Zwar besteht die Möglichkeit, die Lipide der Membran des Kompartiments zu markieren, jedoch ist die Detektion dieser sehr schwierig.

Zusammenfassend betrachtet diente das *Dictyostelium*-*M. marinum*-Modell dazu, die Mechanismen der Anreicherung der V-ATPase nach der Depolymerisation von Aktin am Kompartiment zu charakterisieren. Darüber hinaus wurde hier die Lokalisation von WASH und Aktin am mykobakteriellen Kompartiment erstmalig gezeigt und die Rolle der beiden Proteine in der Etablierung der Replikationsnische untersucht. Im *M. tuberculosis*-Phagozyten-Modell wurde in einzelnen Kontrollexperimenten die Ansäuerung der Kompartimente nach der Depolymerisation von Aktin sowie die Anreicherung lysosomaler Proteine überprüft. Grundsätzlich konnten die im *Dictyostelium*-Modellsystem erzielten Ergebnisse auf das murine Phagozyten-Modell übertragen werden.

4.2 Methoden zur Untersuchung der Rolle von Aktin am Kompartiment

Sowohl im *Dictyostelium*- als auch im murinen Phagozyten-Modell wurde Aktin an den Kompartimenten von *M. marinum* bzw. *M. tuberculosis* mithilfe der konfokalen Mikroskopie lokalisiert. Aktin kommt in der Zelle in zwei verschiedenen Formen vor. Das monomere Protein (G-Aktin) kann bei Vorhandensein von ATP, Magnesium und bestimmten Nukleationsfaktoren zu einer filamentösen Form (F-Aktin) polymerisiert werden (Campellone & Welch 2010). Das Kompartiment-assoziierte Aktin wurde als polymeres Protein mithilfe von Fluoreszenz-markiertem Phalloidin, das ausschließlich die F-Form bindet, detektiert (Chazotte 2010). Um die Funktion der Aktinfilamente am Kompartiment bei 6 hpi zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Methoden zur Depolymerisation der F-Form zugunsten der G-Form angewandt. Der erste Ansatz basierte auf dem Abbau der Kompartiment-assoziierten Filamente mithilfe des VacuolinA-Myc-Cofilin (VMC) Fusionsproteins. Dem zweiten Ansatz lag die Applikation der Aktin-depolymerisierenden Substanz LatrunculinA (LatA) zugrunde. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit ein dritter Ansatz verfolgt. Hier wurde eine Mutante von *Dictyostelium* untersucht, in der der Kompartiment-assoziierte Aktin-Nukleationsfaktor WASH, deletiert war. Durch die Anwendung dreier verschiedener Methoden der Aktin-Wegnahme konnten die sich daraus ergebenden Folgen unter verschiedenen zeitlichen und lokalen Aspekten betrachtet werden. Die jeweiligen Ansätze werden nachfolgend diskutiert.

In *Dictyostelium* sind späte Endosomen deutlich mit dem Protein Vacuolin und Aktin assoziiert (Carnell et al 2011). Drengk und Kollegen haben gezeigt, dass das Fusionsprotein VacuolinA-Myc-Cofilin (VMC) an diesen Endosomen lokalisiert und dort Cofilin-vermittelt das Aktin depolymerisiert (Drengk et al 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde die Tatsache ausgenutzt, dass Vacuolin und somit auch VMC mit Ablauf der frühen Infektionsphase (ab 6 hpi) am mykobakteriellen Kompartiment akkumulieren (Hagedorn & Soldati 2007). Dort konnte eine lokal gezielte Depolymerisation des Kompartiment-assoziierten Aktins erfolgen. Dieser gezielte Abbau der Aktinfilamente an der *M. marinum*-Vakuole und den späten Endosomen bietet den Vorteil, dass das kortikale Aktin der Zelle von der Depolymerisation nicht betroffen ist. So behalten die Zellen ihre typische Morphologie sowie Motilität bei und auch die Phagozytoserate wird nicht verändert (Drengk et al 2003). Außerdem bleibt die Kinetik des endosomalen Transits erhalten (Drengk et al 2003). Somit kann davon ausgegangen werden, dass in VMC-exprimierenden Zellen lediglich Aktin-abhängige Vorgänge an der mykobakteriellen Replikationsnische ausgeschaltet sind. Der Stofftransport im endolysosomalen Netzwerk der Wirtszelle bleibt währenddessen erhalten. Ein wesentlicher Nachteil in der Anwendung dieser Methode ist, dass sich die Aktivität des Fusionsproteins an der *M. marinum*-Vakuole zeitlich nicht regulieren lässt. So deckte sich das zeitliche Auftreten von Aktin am Kompartiment bei 6 hpi nur teilweise mit dem von VMC, welches zu dem Zeitpunkt dort erst zu akkumulieren begann. Folglich ist auch zu erklären, dass bei 6 hpi nur ein Fünftel aller Kompartimente mit dem Fusionsprotein assoziiert war und dass nur an diesen Kompartimenten Aktin depolymerisiert werden konnte. Darüber hinaus ist es auch möglich, dass endogenes Vacuolin mit dem VMC-Fusionsprotein um die Lokalisation am Kompartiment in Konkurrenz trat. In gleicher Weise wie die Anreicherung ist auch das Recycling von VMC an der *M. marinum*-Vakuole zeitlich nicht regulierbar. Da Vacuolin-Proteine bis zum Nischenbruch an der Membran des Kompartiments assoziiert sind (Hagedorn & Soldati 2007), ist zu vermuten, dass die VMC-vermittelte Depolymerisation des Aktins ebenfalls so lange an der mykobakteriellen Vakuole erhalten blieb. Im *Dictyostelium*-Modell ist derzeit kein anderes Protein bekannt, das zwar zum selben Zeitpunkt jedoch in einem kürzeren Zeitfenster am Kompartiment akkumuliert. Somit bleiben die Vacuolin-Proteine vorerst die bestgeeigneten Zielproteine.

Bezüglich des Aspekts der zeitlichen Regulierbarkeit bietet die Applikation einer Aktin-depolymerisierenden Substanz einen eindeutigen Vorteil, da ihre Zugabe zu jedem beliebigen Zeitpunkt in der Infektion erfolgen kann. In dieser Arbeit wurde LatA als solche verwendet. LatA bindet in einem Verhältnis von 1:1 die monomere Form von Aktin, welche sich als Folge davon nicht mehr zu Filamenten anlagern kann (Coue et al 1987, Morton et al

2000, Spector et al 1983). Damit besitzt LatA einen einfachen, aber sehr spezifischen Wirkungsmechanismus. Andere depolymerisierende Substanzen wie z. B. Cytochalasine, inhibieren die Polymerisation des Aktins an den Filamentenden, wo sie mit anderen Aktin-assoziierten Proteinen der Wirtszelle um die Bindung konkurrieren. Cytochalasine müssen daher 10- bis 100-fach höher konzentriert verwendet werden als LatA (Spector et al 1989, Spector et al 1983, Yahara et al 1982). Da die Wirkung von LatA schnell und reversibel ist (Spector et al 1983), kann der Auf- und Abbau von Aktinfilamenten im Infektionsverlauf über Zugabe und Wegnahme der Substanz reguliert werden. Für *Dictyostelium* wurde gezeigt, dass bereits 15 min nach Zugabe von 10 μ M LatA der endosomale Transit vollständig blockiert ist (Drengk et al 2003). Nur wenige Minuten nach Wegnahme der Substanz ist die Prozessierung der Lysosomen zu Postlysosomen wieder hergestellt (Carnell et al 2011). In dieser Arbeit wurde LatA in einer Konzentration von 5 μ M verwendet. Versuche mit dieser Konzentration zeigen, dass das kortikale Aktin innerhalb von weniger als einer Minute zusammenfällt und 40 min nach Wegnahme von LatA wieder vollständig aufgebaut ist (Gerisch et al 2004). Außerdem wurde bei dieser Konzentration innerhalb einer Stunde an nahezu jedem Kompartiment Aktin depolymerisiert. Für die Versuche in murinen Phagozyten wurde eine doppelt so hohe LatA-Konzentration verwendet (10 μ M), die Expositionszeit jedoch auf 30 min halbiert. Unter diesen Bedingungen wurde für Fibroblasten ein kompletter Abbau der Aktinfilamente beschrieben (Wakatsuki et al 2001). Aufgrund der genannten Eigenschaften ist LatA eine häufig verwendete Substanz zur Depolymerisation von Aktin. Gegenüber der VMC-Methode hat sie jedoch den Nachteil einer lokal unspezifischen Wirkungsweise. Da LatA die Gesamtheit aller Aktinfilamente der Wirtszelle depolymerisiert, runden sich die Zellen ab und verlieren ihre Motilität. Auch die Phagozytose und die Zellteilung sind inhibiert (Drengk et al 2003). Um diese unerwünschten Folgen zeitlich möglichst einzugrenzen, gleichzeitig jedoch die Effekte der Depolymerisation des Aktins am Kompartiment zu akkumulieren, wurden *Dictyostelium*-Zellen maximal 1 h und bei Langzeitversuchen bis zu 2 h in LatA-haltigem Medium inkubiert. Da LatA sowohl in den Versuchen in *Dictyostelium* als auch in murinen Makrophagen verwendet wurde, konnten die Effekte der Depolymerisation des Aktins in den beiden Modellen direkt miteinander verglichen werden.

Die beiden erstgenannten Methoden zur Depolymerisation der Aktinfilamente hatten zum Ziel, die Rolle des Proteins an solchen Kompartimenten zu untersuchen, die bei 6 hpi bereits deutlich von den Bakterien manipuliert worden sind. Zu dem Zeitpunkt zeichnen sich die mykobakteriellen Vakuolen durch den Ausschluss der vakuolaren Protonen-ATPase (V-ATPase) und der lysosomalen Protease CathepsinD aus. Sie zeigen damit deutliche

Unterschiede zu den Phagosomen der apathogenen Art *M. smegmatis* (Hagedorn & Soldati 2007). Mithilfe des dritten Ansatzes wurde die Rolle von Aktin in der Etablierung der mykobakteriellen Replikationsnische untersucht. Er basierte auf der Deletion des einzigen für WASH kodierenden Gens und somit der absoluten Abwesenheit des entsprechenden Proteins in der Wirtszelle. Das zur Gruppe der *Nucleation-Promoting*-Faktoren (NPF) gehörende Protein WASH initiiert in Anwesenheit des ARP2/3-Komplexes, präexistierender Aktinfilamente und Aktinmonomere eine *de-novo*-Synthese von Aktinfilamenten (Campellone & Welch 2010) an der Membran von Endosomen (Carnell et al 2011, Derivery et al 2009, Gomez & Billadeau 2009). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass WASH bereits bei 10 min nach Infektion an der Vakuole von *M. marinum* akkumulierte. Die Deletion von WASH führte wiederum zu einer absoluten Abwesenheit von Aktin um die Kompartimente. Im Vergleich zu den beiden vorangegangenen Methoden zeichnete sich dieser Ansatz dadurch aus, dass hier kein bestehendes Kompartiment-assoziiertes Aktin depolymerisiert worden ist, sondern dass ein solches seit Beginn der Infektion nicht vorhanden war. Damit konnte dieser Ansatz dazu genutzt werden, die Ergebnisse der beiden anderen Ansätze optimal zu ergänzen.

4.3 Folgen der Depolymerisation des Aktins am frühen mykobakteriellen Kompartiment

Die Depolymerisation des Aktins sowie die Deletion von WASH in *Dictyostelium* hatte bei 6 hpi die Akkumulation der V-ATPase und eine Abnahme in der Assoziation von p80 an den *M. marinum*-Vakuolen zur Folge. Gleichzeitig wurde ein Anstieg in der Anzahl azider Kompartimente beobachtet. Im murinen Phagozyten-Modell wurde ebenfalls die Ansäuerung der Vakuolen von *M. marinum* und *M. tuberculosis* beobachtet. Außerdem wurde die Anreicherung des lysosomalen Proteins LAMP-1 an der *M. tuberculosis*-Vakuole nach der Depolymerisation des Aktins gezeigt. Nachfolgend werden die Auswirkungen der Aktin-Wegnahme auf die mykobakteriellen Kompartimente in den unterschiedlichen Modellen diskutiert. Anschließend wird auf die Folgen der Ansäuerung der *M. marinum*-Vakuolen im Hinblick auf den gesamten Infektionsverlauf im *Dictyostelium*-Modell eingegangen.

Folgen der Depolymerisation des Aktins in den Phagozyten auf die Vakuolen von *M. marinum* und *M. tuberculosis*

Eines der wichtigsten Ereignisse in der Phagosomenreifung ist die Anreicherung der V-ATPase in der Membran des Phagosoms. Es handelt sich dabei um einen Multiprotein-Komplex, der unter Verbrauch von ATP Protonen in die Vakuole transportiert (Hackam et al

1997). Die damit verbundene Azidifizierung des Phagosoms ist Voraussetzung für die Aktivierung lysosomaler Hydrolasen und antimikrobieller Peptide (Yates et al 2005). Sturgill-Koszycki und Kollegen haben erstmalig beobachtet, dass *M. avium* in der Lage ist, die Anreicherung der V-ATPase an seiner Vakuole zu verhindern (Sturgill-Koszycki et al 1994). Während die Kompartimente anderer Pathogene wie z. B. *Leishmania* einen pH-Wert von 5,5 aufweisen, residiert *M. avium* in Vakuolen mit einem pH-Wert von 6,4 (Petthe et al 2004, Schaible et al 1998, Sturgill-Koszycki et al 1994, Yates et al 2005). Kürzlich wurde ein möglicher Mechanismus des Ausschlusses der V-ATPase aus der Membran des mykobakteriellen Kompartiments im Detail beschrieben. Dabei sezerniert *M. tuberculosis* den Pathogenitätsfaktor ptpA (*protein tyrosine phosphatase A*) ins Zytosol der Wirtszelle (Bach et al 2008, Bach et al 2006). PtpA bindet dort die zytosolische Untereinheit H der V-ATPase, die in der Membran von Lysosomen lokalisiert (Wong et al 2011). Folglich ist die V-ATPase nicht mehr in der Lage, mit dem HOPS-Komplex (*Homotypic vacuole fusion and vacuole Protein Sorting*) in der Membran des Kompartiments zu interagieren (Wong et al 2011). Somit ist die Fusion des V-ATPase-haltigen Lysosoms mit der mykobakteriellen Vakuole nicht mehr möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei 2 und 4 hpi nur ca. 10% Lysotracker-positive und somit azide *M. marinum*-Kompartimente in BV-2-Mikroglia-Zellen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert. In Arbeiten an murinen J774-Makrophagen belaufen sich die Anteile azider *M. marinum*-Vakuolen bei 1 hpi auf 35% (Via et al 1998) und bei 2 hpi auf 30% (Tan et al 2006). Auch für *M. tuberculosis* divergieren die Angaben über die Anteile azider Kompartimente in verschiedenen Studien deutlich. Während knapp 40% Lysotracker-positive Kompartimente bei 2 und 4 hpi in RAW-B-Makrophagen in der vorliegenden Arbeit und 45% bei 2 hpi in peritonealen Zellen (Bonilla et al 2010) quantifiziert wurden, berichten andere Arbeiten wiederum von 20% aziden *M. tuberculosis*-Vakuolen bei 1 hpi in murinen Knochen-Makrophagen (Sullivan et al 2012). Möglicherweise beruhen die Unterschiede auf einer Zelllinien-spezifischen Kinetik der Ansäuerung der Kompartimente (Jordao et al 2008). Darüber hinaus könnten sie jedoch auch auf eine unterschiedliche Zählweise der Experimentatoren, die Verwendung verschiedener Mikroskope oder eine variierende Erhaltung der Fluoreszenzintensität des pH-Markers nach der chemischen Fixierung der Zellen (Shi et al 2010) zurückgeführt werden. Somit ergeben sich allein aus den genannten technischen Gegebenheiten quantitative Unterschiede bei der Bestimmung des Anteils azider Kompartimente.

In *Dictyostelium* wiederum war es nicht möglich, azide Endosomen mithilfe von Lysotracker zu detektieren, sodass hier der pH-Marker Neutralrot verwendet wurde. Clarke und Maddera haben auf diese Weise bereits die Azidifizierung der Vakuolen von *Legionella pneumophila* gezeigt (Clarke & Maddera 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden 35% Neutralrot-positive und somit azide *M. marinum*-Vakuolen bei 6 hpi in *Dictyostelium* nachgewiesen. Zur gleichen Zeit betrug der Anteil der für die Untereinheit VatA der V-ATPase-positiven Kompartimente 40%. Beide Signale konnten nicht auf eine mögliche Kolo-kalisation überprüft werden, da Neutralrot nicht chemisch fixiert und VatA nur über eine Immunfluoreszenz-Markierung detektiert werden kann. Andere Arbeiten belegen jedoch die Kolo-kalisation Neutralrot-positiver Endosomen mit der ebenfalls zytosolischen Untereinheit VatB der V-ATPase (Peracino et al 2006) bzw. mit der transmembranen Untereinheit VatM (Clarke et al 2002) in lebenden Zellen. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass die katalytisch aktive Untereinheit VatA an der *M. marinum*-Vakuole auf das Vorhandensein einer funktionsfähigen V-ATPase und einen niedrigen pH-Wert hindeutet.

Neben der V-ATPase wurde auch die Akkumulation des putativen Kupfertransporters p80 (Ravanel et al 2001) in der Membran der Kompartimente beobachtet. Gewöhnlich akkumuliert p80 in der Membran des Kompartiments von *M. marinum* und an den Vakuolen der avirulenten Mutanten *M. marinum* Δ RD1 und *M. marinum* L1D sowie des apathogenen Bakteriums *M. smegmatis* (Hagedorn & Soldati 2007). Es wird angenommen, dass es sich bei p80 um einen Kupfertransporter handelt (Nose et al 2006, Ravanel et al 2001). Außerdem ist ungeklärt, ob dieser die vermeintlichen Kupferionen in die mykobakteriellen Vakuolen importiert oder exportiert (Hagedorn & Soldati 2007). Die Rolle von Kupfer im mykobakteriellen Kompartiment ist ambivalent. Zum einen wird es für die Proliferation von Mykobakterien in ihren Wirtszellen benötigt, zum anderen sind hohe Konzentrationen des Ions toxisch für die Bakterien (Samanovic et al 2012). Pathogene Mykobakterien sind in der Lage, Kupferionen mithilfe von Exportern, die in ihrer Zellwand lokalisiert sind, wieder auszuschleusen (Ward et al 2010, Wolschendorf et al 2011). Damit können sie auch bei sehr hohen Konzentration an Kupferionen in ihrer Vakuole überleben. Sollte es sich bei p80 um einen Kupferimporter handeln, wären pathogene Mykobakterien aufgrund ihrer Regulationsmechanismen in der Lage, eine ihnen entsprechende Homöostase an Kupferionen einzustellen. Möglicherweise verfügen die avirulenten Mutanten von *M. marinum* sowie das apathogene Bakterium *M. smegmatis* nicht über solche Mechanismen der Ionenregulation. Die hohe Konzentration an Kupferionen in ihrer Vakuole könnte somit zu ihrem Abtöten beitragen.

In allen drei Ansätzen in *Dictyostelium*, in denen Aktin an der Vakuole von *M. marinum* entweder depolymerisiert worden ist oder seit Beginn der Infektion nicht vorhanden war, nahm der Anteil p80-positiver Kompartimente ab. Die avirulenten Mutanten von *M. marinum* sowie das apathogene Bakterium *M. smegmatis* zeigten keine Änderungen hinsichtlich der Assoziation mit p80 nach der Exposition in LatA-haltigem Medium bei 6 h nach Phagozytose. Das deutet darauf hin, dass die Depolymerisation des Aktins Änderungen in der Komposition der Membran des *M. marinum*-Kompartiments bewirkt, die spezifisch für die pathogenen Bakterien sind. Zeitgleich mit der Abnahme der Assoziation von p80 an den Kompartimenten von *M. marinum* nahm der Anteil VatA-positiver Bakterien bei 6 hpi um ca. 20% im Vergleich zu Kontrollzellen zu. Da das Aktin, das zuvor depolymerisiert wurde, an 23% der *M. marinum*-Vakuolen lokalisierte, die nicht gleichzeitig mit VatA assoziiert waren (Daten nicht gezeigt), wird angenommen, dass die Akkumulation von VatA an diesen 20% der Kompartimente erfolgte. In gleichem Maße wie die Assoziation von VatA an den Vakuolen von *M. marinum*, stieg auch die Anzahl Neutralrot-positiver Kompartimente um das 1,7-fache, von 35% auf knapp 60%, nach einer Stunde Inkubation in LatA-haltigem Medium. Diese Beobachtung bestätigt die Vermutung, dass die Depolymerisation des Aktins die Akkumulation einer funktionsfähigen V-ATPase am mykobakteriellen Kompartiment bewirkte. Darüber hinaus zeigen sie, dass die Ereignisse zur Etablierung der Replikationsnische von *M. marinum* hinsichtlich p80 und der V-ATPase durch die Wegnahme von Aktin umgekehrt wurden.

Im murinen Phagozyten-Modell konnte der Anstieg azider Kompartimente nach einer halbstündigen Exposition in LatA-haltigem Medium bei 2 hpi rekapituliert werden. In mit *M. marinum* infizierten BV-2-Zellen war ein 1,8-facher Anstieg von 12% auf 21% und in RAW-B-Makrophagen, die mit *M. tuberculosis* infiziert waren, ein 1,4-facher Anstieg von 39% auf 53% zu verzeichnen. Darüber hinaus konnte in der Infektion mit *M. tuberculosis*, zeitgleich mit der Zunahme azider Kompartimente, eine 1,6-fache Anreicherung des Lysosom-assoziierten Proteins LAMP-1 (*Lysosome-Associated Membrane Protein-1*) von 17% auf 28% ermittelt werden. Da bei der Etablierung des mykobakteriellen Kompartiments die Vakuole von *M. tuberculosis* mit frühen Endosomen fusioniert, trägt es normalerweise die dafür typischen Charakteristika (He et al 2012, Sturgill-Koszycki et al 1996). Kennzeichnend ist hier die Akkumulation bestimmter Proteine in der Membran des Kompartiments, wie z. B. die von Rab5 (Fratti et al 2001, Kelley & Schorey 2003, Via et al 1997), Rab14 (Roberts et al 2006) sowie die des Transferrin-Rezeptors (Russell et al 1996). Die Konversion von Rab5 zu Rab7, die gewöhnlich bei der Phagosomenreifung erfolgt und die Fusion mit späten Endosomen und Lysosomen einleitet (Fairn & Grinstein 2012), ist an den Kompartimenten

pathogener Mykobakterien inhibiert (Via et al 1997). Somit reichern sich Lysosom-assoziierte Proteine wie LAMP an der etablierten Vakuole von *M. tuberculosis* nicht an (Clemens & Horwitz 1995). Durch die Depolymerisation des Aktins wurde diese Blockade an einem Teil der *M. tuberculosis*-Kompartimente für LAMP-1 aufgehoben. Da LAMP-1 und LAMP-2 die Anreicherung lysosomaler Proteasen wie z. B. Cathepsine fördern (Huynh et al 2007), ist anzunehmen, dass die Kompartimente nach der Wegnahme des Aktins im Zusammenhang mit einem sinkenden pH-Wert zunehmend einen lysosomalen Charakter erlangen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Experimente durchgeführt, die das Proliferationsverhalten der Mykobakterien in den entsprechenden Wirtszellen nach der Depolymerisation des Aktins messen. Diese werden im nachfolgenden Abschnitt diskutiert.

Folgen der Ansäuerung der *M. marinum*-Vakuolen auf den weiteren Infektionsverlauf im *Dictyostelium*-Modell

Im *Dictyostelium*-Modell wurden die Langzeitfolgen der Aktin-Wegnahme an der *M. marinum*-Vakuole untersucht. Die Daten zeigten, dass eine zweistündige Exposition der infizierten Zellen in LatA-haltigem Medium bei 6 hpi, auch bei 24 hpi noch einen doppelt so hohen Anteil VatA-positiver Kompartimente, nämlich 33%, zur Folge hatte. Auch in VMC-Zellen und der WASH-Deletionsmutante war bei 24 hpi der Anteil VatA-positiver *M. marinum*-Vakuolen gegenüber Wildtyp-Zellen um das ca. 1,5-fache erhöht. Scheinbar ist die Azidifizierung, die durch die Wegnahme des Aktins am frühen Kompartiment erfolgt, zum Teil bis zum späten Infektionszeitpunkt unumkehrbar. Messungen der koloniebildenden Einheiten haben gezeigt, dass in *Dictyostelium*-Zellen, die nicht in LatA-haltigem Medium inkubiert wurden, die Anzahl der Mykobakterien im Verlauf von 48 hpi um das 1,4-fache stieg. In Zellen, die wiederum bei 6 hpi für 2 h in LatA-haltigem Medium inkubiert wurden, konnte nur ein 1,1-faches Wachstum von *M. marinum* gemessen werden. Dabei konnte ein direkter Einfluss von LatA auf das Wachstum von *M. marinum* im zellfreien Medium ausgeschlossen werden. Diese Versuche zeigen, dass die LatA-Exposition und die damit einhergehende Azidifizierung das Wachstum der Bakterien reduzieren oder die Bakterien sogar abtöten kann. Andere Studien geben ebenfalls Hinweise darauf, dass der pH-Wert der mykobakteriellen Vakuolen und das Überleben der Bakterien in ihren Wirtszellen korrelieren. So wurden Mutanten von *M. tuberculosis* identifiziert, die nicht in der Lage sind, die Azidifizierung ihrer Vakuolen zu verhindern und dadurch ein deutlich reduziertes Wachstum gegenüber den Wildtyp-Bakterien bei 48 hpi aufweisen (Pethe et al 2004). Darüber hinaus ist aus Arbeiten im Mausmodell bekannt, dass eine Reduktion azider Phagosomen bei 1 hpi zu einem erhöhten Wachstum von *M. tuberculosis* führt (Bonilla et al 2010). Grundsätzlich könnten Mykobakterien der anhaltenden Azidifizierung ihrer Vakuole auch auf eine andere Weise begegnen. Es gibt

Hinweise darauf, dass die Bakterien sich an die geänderten Bedingungen in ihrem Kompartiment anpassen und weiterhin replizieren oder zumindest persistieren können. *M. tuberculosis* ist beispielsweise in der Lage, den pH-Wert seines Kompartiments über den Zweikomponenten-Regulator „PhoPR“ zu messen (Bretl et al 2011, Walters et al 2006). PhoPR aktiviert wiederum den *acid and phagosome regulated-(aprABC)*-Genlokus (Abramovitch et al 2011). Infolge dieser Aktivierung wird die Lipid-Zusammensetzung der bakteriellen Membran restrukturiert und die Bakterien vor einem proteolytischen Abbau geschützt (Abramovitch et al 2011, Pethe et al 2004). Somit ist es möglich, dass *M. marinum* teilweise an die anhaltende Ansäuerung seines Kompartiments adaptiert. Grundsätzlich zeigen die Daten jedoch, dass die Proliferation herabgesetzt bzw. die Absterberate der Bakterien erhöht ist.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit der Infektionsverlauf von *M. marinum* in der WASH-Deletionsmutante (*wshA*⁻) mithilfe der Durchflusszytometrie verfolgt. Wie bereits diskutiert, war auch in *wshA*⁻-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen die Anzahl der Vata⁺-positiven Kompartimente bei 6 hpi (von 40% auf 63%) und 24 hpi (von 29% auf 44%) deutlich erhöht. Es konnte gezeigt werden, dass *M. marinum* nicht in der Lage war, die *wshA*⁻-Zellen über *Ejectosomes* zu verlassen und benachbarte Zellen zu infizieren. Somit blieb die Infektion mit *M. marinum* auf einen geringeren Anteil der Wirtszellen beschränkt. Damit gleicht der Infektionsverlauf von *M. marinum* in *wshA*⁻-Zellen dem Infektionsverlauf in *RacH*⁻-Zellen. *RacH* ist eine GTPase aus *Dictyostelium*, die das Aktin-Zytoskelett reguliert und an der Regulation des endosomalen Transports beteiligt ist (Hagedorn & Soldati 2007, Somesh et al 2006). Auch in der *RacH*-Deletionsmutante ist *M. marinum* nicht in der Lage, *Ejectosomes* auszubilden (Hagedorn et al 2009). Zum einen ist denkbar, dass in *wshA*⁻-Zellen *M. marinum* in einer mit der V-ATPase angereicherten Vakuole verbleiben. Damit würden die Bakterien nie ins Zytosol der Zelle gelangen, um von dort aus die Zelle über *Ejectosomes* zu verlassen. Andererseits ist auch möglich, dass *M. marinum* aufgrund einer unvollendeten Etablierung seines Kompartiments und somit einer unzureichenden Umstellung seines gesamten Stoffwechsels nicht in der Lage ist, *Ejectosomes* auszubilden. Diese Daten demonstrieren, dass Aktin und insbesondere das Kompartiment-assoziierte Aktin bereits früh in der Infektion einen Einfluss auf die Etablierung der mykobakteriellen Replikationsnische nehmen und somit die erfolgreiche Ausbreitung der Infektion über die Ausbildung von *Ejectosomes* mit Mykobakterien sichern.

4.4 Mögliche Wirkungsmechanismen von WASH und Aktin am mykobakteriellen Kompartiment

Zuletzt werden die möglichen Mechanismen der Anreicherung der V-ATPase an den Vakuolen von *M. marinum* in *Dictyostelium* sowie der Zunahme azider mykobakterieller Kompartimente in murinen Phagozyten diskutiert. Dazu werden zwei Modelle vorgestellt, die dem WASH-vermittelten Aktin an der mykobakteriellen Nische zwei mögliche Funktionen beimessen. Diese werden in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt. Abschließend wird ein Ausblick über die Arbeiten gegeben, wie die Modelle weiterhin überprüft und darüber hinaus ausgebaut werden könnten.

Wirkungsmechanismus 1: Kompartiment-assoziiertes Aktin verhindert die Fusion der mykobakteriellen Vakuole mit Lysosomen.

Liebl und Griffiths konnten anhand Lebendzell-mikroskopischer Aufnahmen in Makrophagen zeigen, dass Latex-Bead-haltige Endosomen früher Stadien Aktin auf ihrer Oberfläche polymerisieren können (Liebl & Griffiths 2009). Sobald Aktin in einer deutlich sichtbaren Schicht die Phagosomen umgibt, ist die Fusion mit Lysosomen nicht möglich. Phagosomen späterer Stadien zeigen keine Assoziation mit Aktin und fusionierten ungehindert mit späten Endosomen und Lysosomen (Liebl & Griffiths 2009). Die Autoren schlagen damit einen Mechanismus zur zeitlichen Regulierung der Phagosomenreifung vor, bei dem das Vorhandensein von Aktin die Prozessierung der Phagosomen arretiert und seine Abwesenheit die Prozessierung fortsetzt. Es ist denkbar, dass pathogene Bakterien wie *M. marinum* und *M. tuberculosis* diesen schon vorhandenen Mechanismus der Zellen zur Regulation der Fusionsereignisse an ihrem eigenen Kompartiment ausnutzen. Die Ergebnisse der Lebendzell-mikroskopischen Untersuchungen von *Dictyostelium*-Zellen unterstützen diese Hypothese. Hier wurde die Dynamik der Anreicherung der transmembranen Untereinheit VatM der V-ATPase an den Kompartimenten von *M. marinum* nach der Depolymerisation des Aktins untersucht. Dabei akkumulierten VatM-GFP-positive Vesikel ca. 10 min nach Exposition in LatA-haltigem Medium um VatM-GFP-freie Kompartimente. Da nach der Depolymerisation keine Aktinfilamente in der Zelle mehr vorhanden waren, ist denkbar, dass das Heranführen der Vesikel entlang von Mikrotubuli erfolgte (Clarke & Maddera 2006). Sobald sich die VatM-GFP-positiven Endosomen an den mykobakteriellen Vakuolen angereichert haben, fusionierten sie innerhalb weniger Sekunden mit der Membran der Kompartimente. Es wurde bereits gezeigt, dass das VatM-GFP-Fusionsprotein in endolysosomalen Membranen lokalisiert (Liu & Clarke 1996) und dort zu einem funktionsfähigen V-ATPase-Komplex assembliert (Clarke et al 2002, Liu & Clarke

1996). Daher liegt die Vermutung nahe, dass das Kompartiment nach der Fusion mit den VatM-positiven Vesikeln angesäuert wurde. Um auszuschließen, dass diese Vesikel Teil des osmoregulatorischen Organells, der kontraktile Vakuole (KV), von *Dictyostelium* waren, wurden die mykobakteriellen Kompartimente auf das Vorhandensein des KV-Markers Calmodulin nach der Depolymerisation von Aktin überprüft. Calmodulin ist ein Kalzium-bindendes regulatorisches Protein, das zwar mit der Membran der KV assoziiert ist (Heuser et al 1993), nicht jedoch an der Membran von Lysosomen vorkommt (Zhu & Clarke 1992). Die Analyse der fixierten Zellen ergab, dass die Depolymerisation von Aktin zu keiner Anreicherung von Calmodulin an den *M. marinum*-Vakuolen führte. Daher wurde angenommen, dass die V-ATPase-positiven Vesikel, die mit den Kompartimenten fusionierten, nicht von der KV stammten, sondern wahrscheinlich endolysosomalen Ursprungs waren. Gleichzeitig mit der Anreicherung der V-ATPase an den *M. marinum*-Vakuolen nahm die Assoziation mit dem putativen Kupfertransporter p80 ab. Endolysosomale Vesikel sind zwar deutlich mit der V-ATPase, jedoch kaum mit p80 angereichert (Adessi et al 1995, Ravanel et al 2001). So ist denkbar, dass das in der Membran des Kompartiments vorhandene p80 nach der Fusion mit den endosomalen Vesikeln verdünnt wird und teils nicht mehr detektierbar ist. Aus dem Fusions-Modell ergibt sich jedoch noch eine weitere Frage. Eine vermehrte Fusion der *M. marinum*-Vakuolen mit endolysosomalen Vesikeln nach der Wegnahme des Aktins würde eine Zunahme der Membran bedeuten, welche die Bakterien umgibt. Die Analyse fixierter Zellen ergab aber, dass die VatA-angereicherte Membran des Kompartiments die Bakterien immer sehr dicht umschloss. Somit muss es noch einen Mechanismus geben, der die Abschnürung von Vesikeln vom bestehenden Kompartiment vermittelt. Lebendzell-mikroskopische Aufnahmen ergaben, dass sich nach der Depolymerisation des Aktins mit Flüssigkeit gefüllte Vesikel vom mykobakteriellen Kompartiment abgeschnürt haben (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise war der Abschnürungsprozess und der Abtransport der Vesikel auf das Wirken von Mikrotubuli zurückzuführen (Clarke & Maddera 2006). Auf diese Weise würde die Membran, die möglicherweise mit p80, nicht jedoch mit der V-ATPase angereichert war, wieder vom Kompartiment abgeführt werden. Daneben belegen auch Arbeiten an anderen Pathogenen eine Rolle des Kompartiment-assoziierten Aktins in der Blockierung der Fusion mit lysosomalen Vesikeln. So ist beispielsweise auch das Kompartiment von *Leishmania donovani* im frühen Infektionsstadium mit Aktin assoziiert und die Fusion mit LAMP-1-assoziierten Endosomen inhibiert (Holm et al 2001).

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Depolymerisation von Aktin in RAW-B-Makrophagen zu einer Anreicherung von LAMP-1, nicht jedoch von LAMP-2

an der Vakuole von *M. tuberculosis* führte. Möglicherweise sind LAMP-1 und LAMP-2 auf unterschiedlichen Subtypen von Lysosomen lokalisiert (Clemens & Horwitz 1995), deren Fusion mit dem mykobakteriellen Kompartiment über unterschiedliche Mechanismen inhibiert wird. Das würde auch erklären, warum bei 4 hpi nur 22% der *M. tuberculosis*-Vakuolen positiv für LAMP-2 dafür aber 36% positiv für LAMP-1 waren. Auch in *Dictyostelium* wurden zwei Lysosom-Subtypen beschrieben, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit der Vakuole von *Klebsiella aerogenes* verschmelzen (Souza et al 1997).

Neben der Möglichkeit als vor Fusionsereignissen schützende Schicht um die Kompartimente könnte Aktin auch auf eine weitere Art Fusionsereignisse inhibieren. In *Dictyostelium* sind späte Endosomen mit Aktin assoziiert (Carnell et al 2011, Drengk et al 2003). Wird das dort vorhandene Aktin depolymerisiert, bilden die Endosomen Traubenartige Aggregate (Drengk et al 2003). Drengk und Kollegen schlagen eine Rolle des Aktins in der Verankerung der späten Endosomen an distinkten Stellen im Zytosol vor, sodass keine zufälligen Fusionsereignisse ablaufen können. Wenn das strukturegebende Aktin depolymerisiert wird, fällt das endolysosomale Netz zusammen und bewirkt Fusionen, möglicherweise auch an der mykobakteriellen Vakuole.

Wirkungsmechanismus 2: Der WASH-Komplex polymerisiert Aktin am Kompartiment und fördert dort das Recycling der V-ATPase.

Im *Dictyostelium*-Modell sind wenige Minuten nach der Infektion mit *M. marinum* ca. 60% der Kompartimente mit der Untereinheit Vata der V-ATPase assoziiert (Hagedorn & Soldati 2007). In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass der Anteil Vata-positiver Vakuolen im Infektionsverlauf kontinuierlich abnahm. Bei 6 hpi waren ca. 40% der Kompartimente positiv für Vata und 35% positiv für den azidophilen Marker Neutralrot. Bei 24 hpi waren nur noch etwa 25% aller Kompartimente mit Vata assoziiert. Arbeiten im murinen Phagozyten-Modell belegen ebenfalls eine kontinuierliche Abnahme azider mykobakterieller Kompartimente bis 48 hpi auf 15-25% (Sullivan et al 2012, Tan et al 2003). Auch für Rab7, eine GTPase, die auf späten Endosomen lokalisiert und die Fusion mit Lysosomen fördert (Fairn & Grinstein 2012), ist bekannt, dass sie wenige Minuten nach der Infektion mit *M. tuberculosis* an der Membran des Kompartiments akkumuliert und wieder abgeführt wird (Clemens et al 2000, Seto et al 2009). Da Proteine wie z. B. die V-ATPase und Rab7 nur transient an der mykobakteriellen Vakuole vorkommen, ist anzunehmen, dass es bestimmte Mechanismen ihres Recyclings vom Kompartiment geben muss. In der vorliegenden Arbeit wurde der *Nucleation-Promoting-Faktor* WASH bei 30 mpi an den Vakuolen von *M. marinum* und *M. tuberculosis* in murinen Phagozyten und ab 10 mpi an der Vakuole von *M. marinum* in

Dictyostelium detektiert. WASH lokalisiert in *Dictyostelium* an Lysosomen, wo es die Polymerisation von Aktin initiiert und dadurch die in der Membran angereicherte V-ATPase in Form sich abschnürender Vesikel wieder abführt (Carnell et al 2011). Auf diesem Wege reneutralisieren die Lysosomen zu Postlysosomen. Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion des für WASH kodierenden Gens zu einer Abwesenheit von Aktin und gleichzeitig zu einer Akkumulation der V-ATPase am *M. marinum*-Kompartiment führte. Möglicherweise rekrutieren die Mykobakterien WASH an ihr Kompartiment, wo dieses die Polymerisation von Aktin initiiert. Es ist bekannt, dass die V-ATPase in der Lage ist, Aktin zu binden (Holliday et al 2000, Vitavska et al 2005, Vitavska et al 2003). Somit ist denkbar, dass das Kompartiment-assoziierte Aktin die dort vorhandene Protonenpumpe über eine direkte Interaktion aus der Membran des Kompartiments wieder abführt.

In murinen Fibroblasten wurde gezeigt, dass WASH Ausstülpungen der endosomalen Membran bewirkt (Derivery et al 2009). Möglicherweise generiert Aktin im Zusammenspiel mit Mikrotubuli dabei die für die Tubulation der Membran benötigte Kraft (Derivery et al 2009, Takenawa & Suetsugu 2007). Über eine Interaktion mit Fam21, einem Protein des WASH-Komplexes, reichern sich transmembrane und Membran-assoziierte Proteine an, die in die endosomalen Membranausstülpungen sortiert werden (Harbour et al 2012, Jia et al 2012). Diese schnüren sich anschließend vom Endosom ab und werden zum Golgi-Apparat oder zur Plasmamembran transportiert (Harbour et al 2012). Diesen Mechanismus könnten pathogene Mykobakterien an ihrem Kompartiment dazu ausnutzen, bestimmte Proteine wieder abzuführen. Somit könnte WASH eine Rolle in der gezielten Sortierung von Proteinen am mykobakteriellen Kompartiment spielen und Aktin ihre Abschnürung veranlassen.

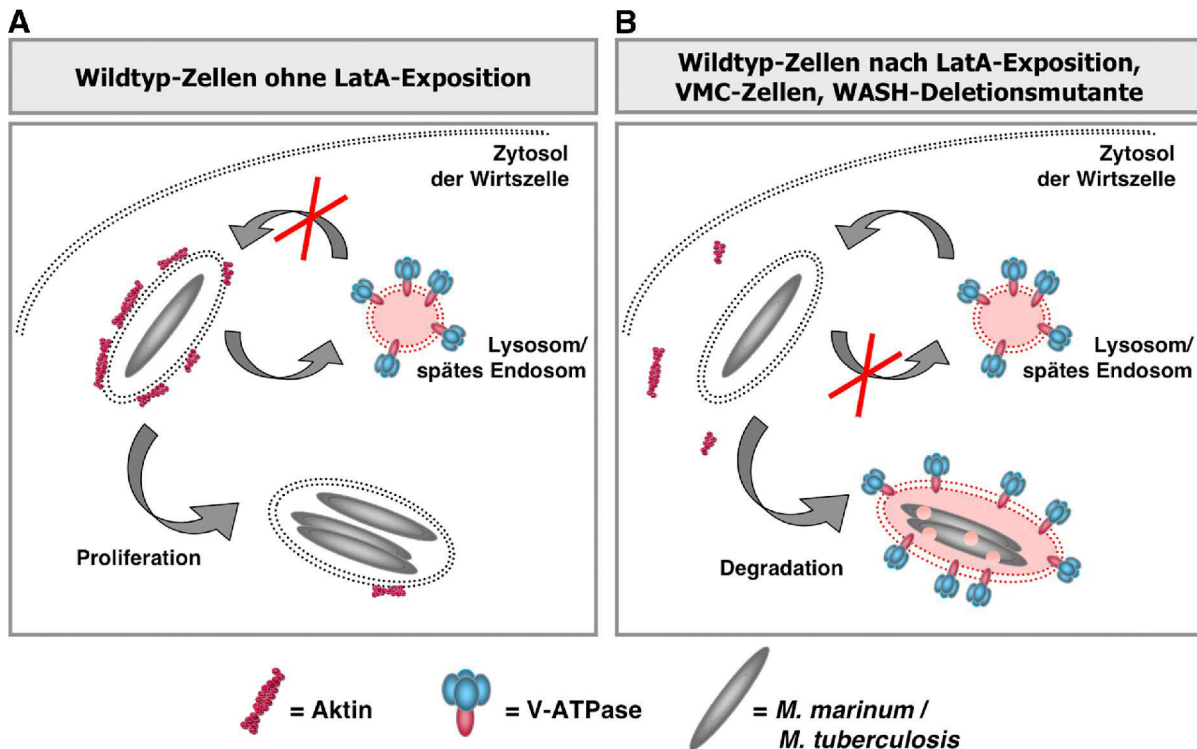


Abbildung 4.1: Mögliche Wirkungsmechanismen von WASH und Aktin am mykobakteriellen Kompartiment.

(A) In *Dictyostelium* Wildtyp-Zellen und in murinen Phagozyten sind die frühen mykobakteriellen Kompartimente mit Aktin assoziiert. Die Mykobakterien etablieren erfolgreich ihre Replikationsnische und proliferieren in einer Vakuole mit einem neutralen pH-Wert. Wirkungsmechanismus 1: Kompartiment-assoziiertes Aktin verhindert die Fusion der mykobakteriellen Vakuole mit Lysosomen. Wirkungsmechanismus 2: Aktin fördert das Recycling der V-ATPase an der mykobakteriellen Vakuole. (B) Nach der Depolymerisation des Aktins an dem mykobakteriellen Kompartiment in Wildtyp-Zellen von *Dictyostelium* und in murinen Phagozyten sowie in VMC-Zellen und der WASH-Deletionsmutante von *Dictyostelium* ist kein Aktin am frühen mykobakteriellen Kompartiment vorhanden. Die Mykobakterien sind nicht in der Lage, ihre Replikationsnische zu etablieren und residieren in einer aziden Vakuole (rot unterlegt). Wirkungsmechanismus 1: Die Fusion der mykobakteriellen Vakuole mit Lysosomen erfolgt ungehindert. Wirkungsmechanismus 2: Die V-ATPase wird nicht mehr aus der Membran des Kompartiments recycelt.

Zusammenfassende Betrachtung beider Wirkungsmechanismen

Sehr wahrscheinlich ist jedoch eine mindestens zweifache Funktion des Aktins an dem mykobakteriellen Kompartiment. Um ihre Replikationsnische aufzubauen und aufrechtzuerhalten, ist ein ständiger Stoffaustausch mit der Wirtszelle notwendig. Nährstoffe müssen in das Kompartiment und metabolische Abfallstoffe wieder aus dem Kompartiment transportiert werden (Vergne et al 2004). Alle diese Vorgänge bedürfen kontrollierter Fusions- aber auch Abschnürungsprozesse an der mykobakteriellen Vakuole. Interessant bei der Betrachtung der Wirkungsmechanismen von Aktin am Kompartiment ist, dass diese scheinbar auf sehr frühe Stadien in der Infektion beschränkt sind. In *Dictyostelium*-Zellen wurden bei 24 hpi nur noch etwa 7% mit Aktin-assoziierte *M. marinum*-Vakuolen ermittelt. In murinen Phagozyten war die Zeitspanne sogar noch kürzer. Aktin konnte nur bei 2 hpi, aber

nicht mehr bei 4 hpi an den Vakuolen von *M. marinum* bzw. *M. tuberculosis* beobachtet werden. Somit blieben auch die Effekte der Depolymerisation des Aktins, die Ansäuerung der Kompartimente und die Anreicherung von LAMP-1, auf diese jeweils frühen Zeitpunkte beschränkt. Warum die Aktin-Abhängigkeit transient ist, kann hier lediglich spekuliert werden. Einige Arbeiten belegen, dass die Fusionsereignisse und der Membranumsatz an der Vakuole von *M. tuberculosis* und *M. avium* vor allem in der ersten Stunde nach Infektion besonders hoch ist (Russell et al 1996). Möglicherweise wird Aktin an späteren Zeitpunkten nicht mehr benötigt, weil die Fusions- und Recyclingvorgänge deutlich reduziert sind. Die Kompartimente könnten in der Aktin-sensitiven Phase so umgebaut werden, dass sie zu späteren Zeitpunkten kein Aktin mehr zu ihrer Aufrechterhaltung benötigen. In *Dictyostelium*-Zellen wurde im Infektionsverlauf eine veränderte Morphologie der *M. marinum*-Vakuole beobachtet. Bei 24 hpi waren die Kompartimente deutlich geweitet (Hagedorn & Soldati 2007) und in elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind in ihnen membranöse Ablagerungen erkennbar (Daten nicht gezeigt). Diese Ablagerungen ähnelten den *multilamellar bodies*, die eukaryotischen Zellen unter anderem als Lipidspeicher dienen (Paquet et al 2013). Es ist denkbar, dass die Mykobakterien einen Nährstoffspeicher in ihrer Replikationsvakuole anlegen. Somit könnten sie in der späteren Infektionsphase unabhängig vom zusätzlichen Aktin-vermittelten Stofftransport aus dem Zytosol der Wirtszelle replizieren. Außerdem könnten an späteren Zeitpunkten in der Infektion andere Mechanismen greifen, die die Fusionsereignisse kontrollieren. So ist beispielsweise bekannt, dass mykobakterielle Lipide wie Lipoarabinomannan und Trehalosedimykolat in die Membran endolysosomaler Vesikel eingebaut werden, sodass diese nicht mehr mit dem mykobakteriellen Kompartiment fusionieren können (Fratti et al 2001, Indrigo et al 2003, Vergne et al 2003). Während Aktin nur eine transiente Präsenz an den mykobakteriellen Vakuolen aufwies, war WASH in *Dictyostelium* und den murinen Phagozyten (Daten für BV-2- und RAW-B-Zellen nicht gezeigt) auch bei 24 hpi an den Kompartimenten assoziiert. Denkbar ist, dass WASH in einer inaktiven Form an der mykobakteriellen Vakuole assoziiert war und nicht über Fam21 von dem Kompartiment recycelt wurde (Park et al 2013). Weniger wahrscheinlich ist die Möglichkeit, dass Aktin bei späten Zeitpunkten in einer so geringen Menge an den Kompartimenten vorhanden war, dass es nicht ausreichend chemisch fixiert und daher gewegewaschen wurde (Small et al 1999).

Ausblick

Wie vielfältig die Funktionen von WASH und dem davon generierten Aktin an den Kompartimenten pathogener Mykobakterien auch sein mögen, die Daten deuten auf einen zeitlich präzise regulierten Mechanismus der Proteine hin. Aus Untersuchungen des

kortikalen Aktins ist bekannt, dass hier mindestens drei verschiedene Aktin-Nukleatoren aktiviert werden (Campellone & Welch 2010) die Redundanzen aufweisen (Veltman et al 2012). Umso mehr erstaunt die Beobachtung, dass WASH nicht nur an Endosomen (Carnell et al 2011), sondern auch am mykobakteriellen Kompartiment scheinbar der einzige Aktin-Nukleator ist. Um die Interaktion zwischen den Wirtszellen und dem Pathogen besser zu verstehen, müsste der Mechanismus, über den WASH an das Kompartiment rekrutiert wird, untersucht werden. Die Interaktionspartner von WASH könnten über eine Ko-Immunpräzipitation auf Grundlage eines gesamten Mykobakterienlysats isoliert und massenspektrometrisch identifiziert werden. Es gibt bereits erste Hinweise, dass Aktin-Nukleatoren Zielmoleküle von Pathogenitätsfaktoren sind. Aus Infektionen mit *M. ulcerans* ist bekannt, dass das Pathogen das Lipid Mykolakton sezerniert, welches an den Aktin-Nukleator WASP bindet. Dadurch wird die Autoinhibierung des Proteins aufgehoben und unkontrolliert Aktin polymerisiert, was zu einer defekten Zelladhäsion und zur Ruptur von Gewebe führt (Guenin-Mace et al 2013). Die Lipide von Mikroorganismen haben häufig eine regulatorische Funktion in den entsprechenden Wirtszellen. So wurde auch das Oberflächenprotein Lipophosphoglykan von *Leishmania donovani* als derjenige Faktor identifiziert, der die Aktinpolymerisation am Kompartiment initiiert (Holm et al 2001). *M. tuberculosis* ist wiederum mit dem Lipid Trehalosedimykolat assoziiert, das die Fähigkeit besitzt die Phagosomenreifung zu inhibieren (Axelrod et al 2008). Diese und weitere Lipide sind mögliche Kandidatenmoleküle, die WASH an das mykobakterielle Kompartiment rekrutieren und seine dortige Aktivität regulieren könnten.

IV Literaturverzeichnis

- Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion PA, Cox J, Luirink J, et al. 2007. Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol* 5: 883-91
- Abramovitch RB, Rohde KH, Hsu FF, Russell DG. 2011. aprABC: a Mycobacterium tuberculosis complex-specific locus that modulates pH-driven adaptation to the macrophage phagosome. *Mol Microbiol* 80: 678-94
- Adessi C, Chapel A, Vincon M, Rabilloud T, Klein G, et al. 1995. Identification of major proteins associated with Dictyostelium discoideum endocytic vesicles. *J Cell Sci* 108 (Pt 10): 3331-7
- Alibaud L, Kohler T, Coudray A, Prigent-Combaret C, Bergeret E, et al. 2008. Pseudomonas aeruginosa virulence genes identified in a Dictyostelium host model. *Cell Microbiol* 10: 729-40
- Axelrod S, Oschkinat H, Enders J, Schlegel B, Brinkmann V, et al. 2008. Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide. *Cell Microbiol* 10: 1530-45
- Bach H, Papavinasasundaram KG, Wong D, Hmama Z, Av-Gay Y. 2008. Mycobacterium tuberculosis virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33B. *Cell Host Microbe* 3: 316-22
- Bach H, Sun J, Hmama Z, Av-Gay Y. 2006. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis PtpA is an endogenous tyrosine phosphatase secreted during infection. *Infection and Immunity* 74: 6540-6
- Bear JE. 2009. Sorting out endosomes in the WASH. *Dev Cell* 17: 583-4
- Berg RD, Ramakrishnan L. 2012. Insights into tuberculosis from the zebrafish model. *Trends Mol Med* 18: 689-90
- Bermudez LE, Goodman J. 1996. Mycobacterium tuberculosis invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect Immun* 64: 1400-6
- Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F. 1990. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol* 27: 229-37
- Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, et al. 2010. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med* 363: 1005-15
- Bonilla DL, Fan YY, Chapkin RS, McMurray DN. 2010. Transgenic mice enriched in omega-3 fatty acids are more susceptible to pulmonary tuberculosis: impaired resistance to tuberculosis in fat-1 mice. *J Infect Dis* 201: 399-408
- Borisy GG, Svitkina TM. 2000. Actin machinery: pushing the envelope. *Curr Opin Cell Biol* 12: 104-12
- Boulais J, Trost M, Landry CR, Dieckmann R, Levy ED, et al. 2010. Molecular characterization of the evolution of phagosomes. *Mol Syst Biol* 6: 423
- Bozzaro S, Eichinger L. 2011. The professional phagocyte Dictyostelium discoideum as a model host for bacterial pathogens. *Current Drug Targets* 12: 942-54
- Bozzaro S, Peracino B, Eichinger L. 2013. Dictyostelium host response to legionella infection: strategies and assays. *Methods Mol Biol* 954: 417-38
- Bretl DJ, Demetriadou C, Zahrt TC. 2011. Adaptation to environmental stimuli within the host: two-component signal transduction systems of Mycobacterium tuberculosis. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 566-82
- Caceres N, Tapia G, Ojanguren I, Altare F, Gil O, et al. 2009. Evolution of foamy macrophages in the pulmonary granulomas of experimental tuberculosis models. *Tuberculosis (Edinb)* 89: 175-82
- Calmette A. 1931. Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG. *Proc R Soc Med* 24: 1481-90
- Campellone KG, Welch MD. 2010. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 237-51

- Cardona PJ, Gordillo S, Diaz J, Tapia G, Amat I, et al. 2003. Widespread bronchogenic dissemination makes DBA/2 mice more susceptible than C57BL/6 mice to experimental aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 71: 5845-54
- Cardona PJ, Llatjos R, Gordillo S, Diaz J, Ojanguren I, et al. 2000. Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 52: 156-63
- Carnell M, Zech T, Calaminus SD, Ura S, Hagedorn M, et al. 2011. Actin polymerization driven by WASH causes V-ATPase retrieval and vesicle neutralization before exocytosis. *The Journal of cell biology* 193: 831-9
- Chan K, Knaak T, Satkamp L, Humbert O, Falkow S, Ramakrishnan L. 2002. Complex pattern of *Mycobacterium marinum* gene expression during long-term granulomatous infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 3920-5
- Chazotte B. 2010. Labeling cytoskeletal F-actin with rhodamine phalloidin or fluorescein phalloidin for imaging. *Cold Spring Harb Protoc* 2010: pdb prot4947
- Clark HF, Shepard CC. 1963. Effect of Environmental Temperatures on Infection with *Mycobacterium Marinum* (Balnei) of Mice and a Number of Poikilothermic Species. *J Bacteriol* 86: 1057-69
- Clarke M. 2010. Recent insights into host-pathogen interactions from *Dictyostelium*. *Cell Microbiol* 12: 283-91
- Clarke M, Kohler J, Arana Q, Liu T, Heuser J, Gerisch G. 2002. Dynamics of the vacuolar H(+)-ATPase in the contractile vacuole complex and the endosomal pathway of *Dictyostelium* cells. *J Cell Sci* 115: 2893-905
- Clarke M, Maddera L. 2006. Phagocyte meets prey: Uptake, internalization, and killing of bacteria by *Dictyostelium amoebae*. *Eur J Cell Biol*
- Clarke M, Maddera L, Engel U, Gerisch G. 2010. Retrieval of the vacuolar H-ATPase from phagosomes revealed by live cell imaging. *PLoS One* 5: e8585
- Clemens DL, Horwitz MA. 1995. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med* 181: 257-70
- Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA. 2000. *Mycobacterium tuberculosis* and *Legionella pneumophila* phagosomes exhibit arrested maturation despite acquisition of Rab7. *Infect Immun* 68: 5154-66
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, et al. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-44
- Cosma CL, Klein K, Kim R, Beery D, Ramakrishnan L. 2006. *Mycobacterium marinum* Erp is a virulence determinant required for cell wall integrity and intracellular survival. *Infect Immun* 74: 3125-33
- Cosson P, Soldati T. 2008. Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria. *Curr Opin Microbiol* 11: 271-6
- Coue M, Brenner SL, Spector I, Korn ED. 1987. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett* 213: 316-8
- Curto M, Reali C, Palmieri G, Scintu F, Schivo ML, et al. 2004. Inhibition of cytokines expression in human microglia infected by virulent and non-virulent mycobacteria. *Neurochem Int* 44: 381-92
- Derivery E, Sousa C, Gautier JJ, Lombard B, Loew D, Gautreau A. 2009. The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Dev Cell* 17: 712-23
- Desjardins M. 1995. Biogenesis of phagolysosomes: the "kiss and run" hypothesis. *Trends in Cell Biology* 5: 183-6
- Dionne MS, Ghori N, Schneider DS. 2003. *Drosophila melanogaster* is a genetically tractable model host for *Mycobacterium marinum*. *Infect Immun* 71: 3540-50

- Drengk A, Fritsch J, Schmauch C, Ruhling H, Maniak M. 2003. A coat of filamentous actin prevents clustering of late-endosomal vacuoles in vivo. *Curr Biol* 13: 1814-9
- Eichinger L, Pachebat JA, Glockner G, Rajandream MA, Sugang R, et al. 2005. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 435: 43-57
- El-Etr SH, Yan L, Cirillo JD. 2001. Fish monocytes as a model for mycobacterial host-pathogen interactions. *Infect Immun* 69: 7310-7
- Eskelinen EL, Tanaka Y, Saftig P. 2003. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol* 13: 137-45
- Esposito C, Marasco D, Delogu G, Pedone E, Berisio R. 2011. Heparin-binding hemagglutinin HBHA from *Mycobacterium tuberculosis* affects actin polymerisation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 410: 339-44
- Fairn GD, Grinstein S. 2012. How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol* 33: 397-405
- Flannagan RS, Jaumouille V, Grinstein S. 2012. The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol* 7: 61-98
- Flesch I, Kaufmann SH. 1987. Mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma-activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 138: 4408-13
- Flynn JL, Chan J. 2005. What's good for the host is good for the bug. *Trends Microbiol* 13: 98-102
- Fratti RA, Backer JM, Gruenberg J, Corvera S, Deretic V. 2001. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol* 154: 631-44.
- Fratti RA, Chua J, Vergne I, Deretic V. 2003. Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5437-42
- Gabriel D, Hacker U, Kohler J, Muller-Taubenberger A, Schwartz JM, et al. 1999. The contractile vacuole network of *Dictyostelium* as a distinct organelle: its dynamics visualized by a GFP marker protein. *J Cell Sci* 112 (Pt 22): 3995-4005
- Gagneux S. 2012. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367: 850-9
- Gao LY, Guo S, McLaughlin B, Morisaki H, Engel JN, Brown EJ. 2004. A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Mol Microbiol* 53: 1677-93
- Gao LY, Laval F, Lawson EH, Groger RK, Woodruff A, et al. 2003. Requirement for kasB in *Mycobacterium mycolic acid* biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy. *Mol Microbiol* 49: 1547-63
- Gerisch G, Bretschneider T, Muller-Taubenberger A, Simmeth E, Ecke M, et al. 2004. Mobile actin clusters and traveling waves in cells recovering from actin depolymerization. *Biophys J* 87: 3493-503
- Getahun H, Gunneberg C, Granich R, Nunn P. 2010. HIV infection-associated tuberculosis: the epidemiology and the response. *Clin Infect Dis* 50 Suppl 3: S201-7
- Gey van Pittius NC, Sampson SL, Lee H, Kim Y, van Helden PD, Warren RM. 2006. Evolution and expansion of the *Mycobacterium tuberculosis* PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (*esx*) gene cluster regions. *BMC Evol Biol* 6: 95
- Golden MP, Vikram HR. 2005. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Am Fam Physician* 72: 1761-8
- Gomez TS, Billadeau DD. 2009. A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting. *Dev Cell* 17: 699-711
- Gomez TS, Gorman JA, de Narvajias AA, Koenig AO, Billadeau DD. 2012. Trafficking defects in WASH-knockout fibroblasts originate from collapsed endosomal and lysosomal networks. *Mol Biol Cell* 23: 3215-28

- Gouin E, Welch MD, Cossart P. 2005. Actin-based motility of intracellular pathogens. *Curr Opin Microbiol* 8: 35-45
- Greub G, Raoult D. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 413-33
- Guenin-Mace L, Veyron-Churlet R, Thoulouze MI, Romet-Lemonne G, Hong H, et al. 2013. Mycolactone activation of Wiskott-Aldrich syndrome proteins underpins Buruli ulcer formation. *J Clin Invest* 123: 1501-12
- Hackam DJ, Rotstein OD, Zhang WJ, Demaurex N, Woodside M, et al. 1997. Regulation of phagosomal acidification. Differential targeting of Na⁺/H⁺ exchangers, Na⁺/K⁺-ATPases, and vacuolar-type H⁺-atpases. *J Biol Chem* 272: 29810-20.
- Hagedorn M, Rohde KH, Russell DG, Soldati T. 2009. Infection by tubercular mycobacteria is spread by nonlytic ejection from their amoeba hosts. *Science* 323: 1729-33
- Hagedorn M, Soldati T. 2007. Flotillin and RacH modulate the intracellular immunity of Dictyostelium to Mycobacterium marinum infection. *Cell Microbiol* 9: 2716-33
- Harbour ME, Breusegem SY, Antrobus R, Freeman C, Reid E, Seaman MN. 2010. The cargo-selective retromer complex is a recruiting hub for protein complexes that regulate endosomal tubule dynamics. *J Cell Sci* 123: 3703-17
- Harbour ME, Breusegem SY, Seaman MN. 2012. Recruitment of the endosomal WASH complex is mediated by the extended 'tail' of Fam21 binding to the retromer protein Vps35. *Biochem J* 442: 209-20
- Harrison RE, Bucci C, Vieira OV, Schroer TA, Grinstein S. 2003. Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP. *Mol Cell Biol* 23: 6494-506
- Hayes MJ, Merrifield CJ, Shao D, Ayala-Sanmartin J, Schorey CD, et al. 2004. Annexin 2 binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on endocytic vesicles is regulated by the stress response pathway. *J Biol Chem* 279: 14157-64
- He Y, Li W, Liao G, Xie J. 2012. Mycobacterium tuberculosis-specific phagosome proteome and underlying signaling pathways. *J Proteome Res* 11: 2635-43
- Hestvik AL, Hmama Z, Av-Gay Y. 2005. Mycobacterial manipulation of the host cell. *FEMS Microbiol Rev* 29: 1041-50
- Heuser J, Zhu Q, Clarke M. 1993. Proton Pumps Populate the Contractile Vacuoles of Dictyostelium Amoebae. *J. Cell Biol.* 121: 1311-27
- Holliday LS, Lu M, Lee BS, Nelson RD, Solivan S, et al. 2000. The amino-terminal domain of the B subunit of vacuolar H⁺-ATPase contains a filamentous actin binding site. *J Biol Chem* 275: 32331-7
- Holm A, Tejle K, Magnusson KE, Descoteaux A, Rasmusson B. 2001. Leishmania donovani lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation. *Cell Microbiol* 3: 439-47
- Huizing M, Didier A, Walenta J, Anikster Y, Gahl WA, Kramer H. 2001. Molecular cloning and characterization of human VPS18, VPS 11, VPS16, and VPS33. *Gene* 264: 241-7
- Huotari J, Helenius A. 2011. Endosome maturation. *EMBO J* 30: 3481-500
- Huynh KK, Eskelinen EL, Scott CC, Malevanets A, Saftig P, Grinstein S. 2007. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO J* 26: 313-24
- Indrigo J, Hunter RL, Jr., Actor JK. 2003. Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. *Microbiology* 149: 2049-59
- Insall RH, Machesky LM. 2009. Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks. *Dev Cell* 17: 310-22
- Jenne N, Rauchenberger R, Hacker U, Kast T, Maniak M. 1998. Targeted gene disruption reveals a role for vacuolin B in the late endocytic pathway and exocytosis. *J. Cell Sci.* 111: 61-70

- Jia D, Gomez TS, Billadeau DD, Rosen MK. 2012. Multiple repeat elements within the FAM21 tail link the WASH actin regulatory complex to the retromer. *Molecular Biology of the Cell* 23: 2352-61
- Johansson M, Rocha N, Zwart W, Jordens I, Janssen L, et al. 2007. Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betaIII spectrin. *J Cell Biol* 176: 459-71
- Jordao L, Bleck CK, Mayorga L, Griffiths G, Anes E. 2008. On the killing of mycobacteria by macrophages. *Cell Microbiol* 10: 529-48
- Kaplan G, Post FA, Moreira AL, Wainwright H, Kreiswirth BN, et al. 2003. Mycobacterium tuberculosis growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity. *Infect Immun* 71: 7099-108
- Kelley VA, Schorey JS. 2003. Mycobacterium's arrest of phagosome maturation in macrophages requires Rab5 activity and accessibility to iron. *Mol Biol Cell* 14: 3366-77
- King JS, Insall RH. 2009. Chemotaxis: finding the way forward with Dictyostelium. *Trends Cell Biol* 19: 523-30
- Lalloo UG, Pillay S. 2008. Managing tuberculosis and HIV in sub-Sahara Africa. *Curr HIV/AIDS Rep* 5: 132-9
- Lang R. 2013. Recognition of the mycobacterial cord factor by Mincle: relevance for granuloma formation and resistance to tuberculosis. *Front Immunol* 4: 5
- Lee E, Knecht DA. 2002. Visualization of actin dynamics during macropinocytosis and exocytosis. *Traffic* 3: 186-92
- Leoni E, Legnani P, Mucci MT, Pirani R. 1999. Prevalence of mycobacteria in a swimming pool environment. *J Appl Microbiol* 87: 683-8
- Liebl D, Griffiths G. 2009. Transient assembly of F-actin by phagosomes delays phagosome fusion with lysosomes in cargo-overloaded macrophages. *Journal of Cell Science* 122: 2935-45
- Liu T, Clarke M. 1996. The vacuolar proton pump of Dictyostelium discoideum: molecular cloning and analysis of the 100 kDa subunit. *Journal of Cell Science* 109 (Pt 5): 1041-51
- Maniak M. 2002. Conserved features of endocytosis in Dictyostelium. *Int Rev Cytol* 221: 257-87
- Maniak M. 2003. Fusion and fission events in the endocytic pathway of Dictyostelium. *Traffic* 4: 1-5
- Matsunaga I, Moody DB. 2009. Mincle is a long sought receptor for mycobacterial cord factor. *J Exp Med* 206: 2865-8
- Maxfield FR, Yamashiro DJ. 1987. Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. *Adv Exp Med Biol* 225: 189-98
- Menzio FD, Reddy VM, Cayet D, Raze D, Debie AS, et al. 2006. Mycobacterium tuberculosis heparin-binding haemagglutinin adhesin (HBHA) triggers receptor-mediated transcytosis without altering the integrity of tight junctions. *Microbes Infect* 8: 1-9
- Miyake Y, Toyonaga K, Mori D, Kakuta S, Hoshino Y, et al. 2013. C-type Lectin MCL Is an FcRgamma-Coupled Receptor that Mediates the Adjuvanticity of Mycobacterial Cord Factor. *Immunity* 38: 1050-62
- Morton WM, Ayscough KR, McLaughlin PJ. 2000. Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nature Cell Biology* 2: 376-8
- Neuhaus EM, Almers W, Soldati T. 2002. Morphology and dynamics of the endocytic pathway in Dictyostelium discoideum. *Mol Biol Cell* 13: 1390-407
- Neyrolles O, Guilhot C. 2011. Recent advances in deciphering the contribution of Mycobacterium tuberculosis lipids to pathogenesis. *Tuberculosis (Edinb)* 91: 187-95
- Noegel AA, Schleicher M. 2000. The actin cytoskeleton of Dictyostelium: a story told by mutants. *J Cell Sci* 113 (Pt 5): 759-66

- Nose Y, Rees EM, Thiele DJ. 2006. Structure of the Ctr1 copper trans'PORE'ter reveals novel architecture. *Trends Biochem Sci* 31: 604-7
- Ohkuma S, Moriyama Y, Takano T. 1982. Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein-isothiocyanate-dextran fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 2758-62
- Orme IM. 2003. The mouse as a useful model of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 83: 112-5
- Paquet VE, Lessire R, Domergue F, Fouillen L, Fillion G, et al. 2013. Lipid composition of multilamellar bodies secreted by Dictyostelium discoideum reveals their amoebal origin. *Eukaryot Cell*
- Parent LJ, Salam MM, Appelbaum PC, Dossett JH. 1995. Disseminated Mycobacterium marinum infection and bacteremia in a child with severe combined immunodeficiency. *Clin Infect Dis* 21: 1325-7
- Park L, Thomason PA, Zech T, King JS, Veltman DM, et al. 2013. Cyclical Action of the WASH Complex: FAM21 and Capping Protein Drive WASH Recycling, Not Initial Recruitment. *Developmental cell* 24: 169-81
- Pawlowski A, Jansson M, Skold M, Rottenberg ME, Kallenius G. 2012. Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS Pathog* 8: e1002464
- Peracino B, Wagner C, Balest A, Balbo A, Pergolizzi B, et al. 2006. Function and mechanism of action of Dictyostelium Nramp1 (Slc11a1) in bacterial infection. *Traffic* 7: 22-38
- Peterson PK, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Anderson WR, et al. 1995. CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized Mycobacterium tuberculosis by human microglia. *Infect Immun* 63: 1598-602
- Pethe K, Swenson DL, Alonso S, Anderson J, Wang C, Russell DG. 2004. Isolation of Mycobacterium tuberculosis mutants defective in the arrest of phagosome maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13642-7
- Pfeffer SR. 2013. Rab GTPase regulation of membrane identity. *Curr Opin Cell Biol*
- Pollard TD, Borisy GG. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112: 453-65
- Pozos TC, Ramakrishnan L. 2004. New models for the study of Mycobacterium-host interactions. *Curr Opin Immunol* 16: 499-505
- Ramakrishnan L, Federspiel NA, Falkow S. 2000. Granuloma-specific expression of Mycobacterium virulence proteins from the glycine-rich PE-PGRS family. *Science* 288: 1436-9
- Ravanel K, de Chasse B, Cornillon S, Benghezal M, Zulianello L, et al. 2001. Membrane sorting in the endocytic and phagocytic pathway of Dictyostelium discoideum. *Eur J Cell Biol* 80: 754-64
- Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. 2002. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 168: 4620-7
- Roberts EA, Chua J, Kyei GB, Deretic V. 2006. Higher order Rab programming in phagolysosome biogenesis. *J Cell Biol* 174: 923-9
- Robinson DN, Spudich JA. 2004. Mechanics and regulation of cytokinesis. *Curr Opin Cell Biol* 16: 182-8
- Rotty JD, Wu C, Bear JE. 2013. New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 7-12
- Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F. 2009. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol* 10: 943-8
- Russell DG, Dant J, Sturgill-Koszycki S. 1996. Mycobacterium avium- and Mycobacterium tuberculosis-containing vacuoles are dynamic, fusion-competent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from the host cell plasmalemma. *J Immunol* 156: 4764-73.
- Samanovic MI, Ding C, Thiele DJ, Darwin KH. 2012. Copper in microbial pathogenesis: meddling with the metal. *Cell Host Microbe* 11: 106-15

- Schaible UE, Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Russell DG. 1998. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in murine macrophages. *J Immunol* 160: 1290-6
- Seto S, Matsumoto S, Ohta I, Tsujimura K, Koide Y. 2009. Dissection of Rab7 localization on Mycobacterium tuberculosis phagosome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 387: 272-7
- Shi H, He X, Yuan Y, Wang K, Liu D. 2010. Nanoparticle-based biocompatible and long-life marker for lysosome labeling and tracking. *Anal Chem* 82: 2213-20
- Sillo A, Matthias J, Konertz R, Bozzaro S, Eichinger L. 2011. Salmonella typhimurium is pathogenic for Dictyostelium cells and subverts the starvation response. *Cell Microbiol* 13: 1793-811
- Slosarek M, Kubin M, Pokorny J. 1994. Water as a possible factor of transmission in mycobacterial infections. *Cent Eur J Public Health* 2: 103-5
- Small J, Rottner K, Hahne P, Anderson KI. 1999. Visualising the actin cytoskeleton. *Microsc Res Tech* 47: 3-17
- Smith J, Manoranjan J, Pan M, Bohsali A, Xu J, et al. 2008. Evidence for pore formation in host cell membranes by ESX-1-secreted ESAT-6 and its role in Mycobacterium marinum escape from the vacuole. *Infect Immun* 76: 5478-87
- Solomon JM, Leung GS, Isberg RR. 2003. Intracellular replication of Mycobacterium marinum within Dictyostelium discoideum: efficient replication in the absence of host coronin. *Infect Immun* 71: 3578-86
- Somesh BP, Neffgen C, Iijima M, Devreotes P, Rivero F. 2006. Dictyostelium RacH Regulates Endocytic Vesicular Trafficking and is Required for Localization of Vacuolin. *Traffic*
- Souza GM, Mehta DP, Lammertz M, Rodriguez-Paris J, Wu RR, et al. 1997. Dictyostelium lysosomal proteins with different sugar modifications sort to functionally distinct compartments. *J. Cell Sci.* 110: 2239-48
- Spector I, Shochet NR, Blasberger D, Kashman Y. 1989. Latrunculins--novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton* 13: 127-44
- Spector I, Shochet NR, Kashman Y, Groweiss A. 1983. Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* 219: 493-5
- Stamm LM, Brown EJ. 2004. Mycobacterium marinum: the generalization and specialization of a pathogenic mycobacterium. *Microbes Infect* 6: 1418-28
- Stamm LM, Morisaki JH, Gao LY, Jeng RL, McDonald KL, et al. 2003. Mycobacterium marinum escapes from phagosomes and is propelled by actin-based motility. *J Exp Med* 198: 1361-8
- Stamm LM, Pak MA, Morisaki JH, Snapper SB, Rottner K, et al. 2005. Role of the WASP family proteins for Mycobacterium marinum actin tail formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14837-42
- Steinert M. 2011. Pathogen-host interactions in Dictyostelium, Legionella, Mycobacterium and other pathogens. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22: 70-6
- Stevens TH, Forgac M. 1997. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 779-808
- Stinear TP, Jenkin GA, Johnson PD, Davies JK. 2000. Comparative genetic analysis of Mycobacterium ulcerans and Mycobacterium marinum reveals evidence of recent divergence. *J Bacteriol* 182: 6322-30
- Stinear TP, Seemann T, Harrison PF, Jenkin GA, Davies JK, et al. 2008. Insights from the complete genome sequence of Mycobacterium marinum on the evolution of Mycobacterium tuberculosis. *Genome Research* 18: 729-41
- Sturgill-Koszycki S, Schaible UE, Russell DG. 1996. Mycobacterium-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *Embo J* 15: 6960-8.

- Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, et al. 1994. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263: 678-81.
- Sullivan JT, Young EF, McCann JR, Braunstein M. 2012. The Mycobacterium tuberculosis SecA2 system subverts phagosome maturation to promote growth in macrophages. *Infect Immun* 80: 996-1006
- Swaim LE, Connolly LE, Volkman HE, Humbert O, Born DE, Ramakrishnan L. 2006. Mycobacterium marinum infection of adult zebrafish causes caseating granulomatous tuberculosis and is moderated by adaptive immunity. *Infect Immun* 74: 6108-17
- Takenawa T, Suetsugu S. 2007. The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 37-48
- Tan C, Stronach B, Perrimon N. 2003. Roles of myosin phosphatase during Drosophila development. *Development* 130: 671-81
- Tan T, Lee WL, Alexander DC, Grinstein S, Liu J. 2006. The ESAT-6/CFP-10 secretion system of Mycobacterium marinum modulates phagosome maturation. *Cell Microbiol* 8: 1417-29
- Tobin DM, Ramakrishnan L. 2008. Comparative pathogenesis of Mycobacterium marinum and Mycobacterium tuberculosis. *Cell Microbiol* 10: 1027-39
- Tonjum T, Welty DB, Jantzen E, Small PL. 1998. Differentiation of Mycobacterium ulcerans, M. marinum, and M. haemophilum: mapping of their relationships to M. tuberculosis by fatty acid profile analysis, DNA-DNA hybridization, and 16S rRNA gene sequence analysis. *J Clin Microbiol* 36: 918-25
- Trunz BB, Fine P, Dye C. 2006. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet* 367: 1173-80
- Underhill DM, Gantner B. 2004. Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes Infect* 6: 1368-73
- Veltman DM, Akar G, Bosgraaf L, Van Haastert PJ. 2009. A new set of small, extrachromosomal expression vectors for Dictyostelium discoideum. *Plasmid* 61: 110-8
- Veltman DM, King JS, Machesky LM, Insall RH. 2012. SCAR knockouts in Dictyostelium: WASP assumes SCAR's position and upstream regulators in pseudopods. *J Cell Biol* 198: 501-8
- Vergne I, Chua J, Deretic V. 2003. Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca²⁺/calmodulin-PI3K hVPS34 cascade. *J Exp Med* 198: 653-9
- Vergne I, Chua J, Lee HH, Lucas M, Belisle J, Deretic V. 2005. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4033-8
- Vergne I, Fratti RA, Hill PJ, Chua J, Belisle J, Deretic V. 2004. Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest: mycobacterial phosphatidylinositol analog phosphatidylinositol mannoside stimulates early endosomal fusion. *Mol Biol Cell* 15: 751-60
- Via LE, Deretic D, Ulmer RJ, Hibler NS, Huber LA, Deretic V. 1997. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J Biol Chem* 272: 13326-31.
- Via LE, Fratti RA, McFalone M, Pagan-Ramos E, Deretic D, Deretic V. 1998. Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation. *J Cell Sci* 111: 897-905.
- Vieira OV, Bucci C, Harrison RE, Trimble WS, Lanzetti L, et al. 2003. Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 23: 2501-14
- Vitavska O, Merzendorfer H, Wieczorek H. 2005. The V-ATPase subunit C binds to polymeric F-actin as well as to monomeric G-actin and induces cross-linking of actin filaments. *The Journal of biological chemistry* 280: 1070-6

- Vitavska O, Wieczorek H, Merzendorfer H. 2003. A novel role for subunit C in mediating binding of the H⁺-V-ATPase to the actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry* 278: 18499-505
- Volkman HE, Clay H, Beery D, Chang JC, Sherman DR, Ramakrishnan L. 2004. Tuberculous granuloma formation is enhanced by a mycobacterium virulence determinant. *PLoS biology* 2: e367
- Wakatsuki T, Schwab B, Thompson NC, Elson EL. 2001. Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *J Cell Sci* 114: 1025-36
- Walters SB, Dubnau E, Kolesnikova I, Laval F, Daffe M, Smith I. 2006. The Mycobacterium tuberculosis PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis. *Mol Microbiol* 60: 312-30
- Ward SK, Abomoelak B, Hoyer EA, Steinberg H, Talaat AM. 2010. CtpV: a putative copper exporter required for full virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol* 77: 1096-110
- Watts DJ, Ashworth JM. 1970. Growth of myxameobae of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum in axenic culture. *Biochem J* 119: 171-4
- Welin A, Lerm M. 2012. Inside or outside the phagosome? The controversy of the intracellular localization of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 92: 113-20
- Welin A, Winberg ME, Abdalla H, Sarndahl E, Rasmusson B, et al. 2008. Incorporation of Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan into macrophage membrane rafts is a prerequisite for the phagosomal maturation block. *Infect Immun* 76: 2882-7
- Williams KL. 1978. Characterization of Dominant Resistance to Cobalt Chloride in DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM and Its Use in Parasexual Genetic Analysis. *Genetics* 90: 37-47
- Williams KL, Kessin RH, Newell PC. 1974. Genetics of growth in axenic medium of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum. *Nature* 247: 142-3
- Wolschendorf F, Ackart D, Shrestha TB, Hascall-Dove L, Nolan S, et al. 2011. Copper resistance is essential for virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 1621-6
- Wong D, Bach H, Sun J, Hmama Z, Av-Gay Y. 2011. Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 19371-6
- Yahara I, Harada F, Sekita S, Yoshihira K, Natori S. 1982. Correlation between effects of 24 different cytochalasins on cellular structures and cellular events and those on actin in vitro. *J Cell Biol* 92: 69-78
- Yates RM, Hermetter A, Russell DG. 2005. The kinetics of phagosome maturation as a function of phagosome/lysosome fusion and acquisition of hydrolytic activity. *Traffic* 6: 413-20
- Zhu Q, Clarke M. 1992. Association of calmodulin and unconventional myosin with the contractile vacuole complex of Dictyostelium Discoideum. *J. Cell Biol.* 118: 347-58
- Zumla A, Nahid P, Cole ST. 2013. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat Rev Drug Discov* 12: 388-404

V. Danksagung

Ich danke Dr. Monica Hagedorn, dass ich meine Doktorarbeit in ihrem Labor anfertigen und dieses spannende „außerplanmäßige“ Thema verfolgen durfte. Ich danke ihr für die Betreuung meines Projekts und ihre Unterstützung sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Prof. Dr. Egbert Tannich und Prof. Dr. Iris Bruchhaus bin ich dankbar für die Übernahme des Referats bzw. des Koreferats und die Mitbetreuung meiner Arbeit.

Ich danke Prof. Dr. Markus Maniak und Prof. Dr. Robert Insall für die Bereitstellung der VMC-Zellen bzw. der WASH-Deletionsmutante.

Dr. Lydia Herrmann möchte ich meinen Dank für die vielen anregenden Diskussionen und das Korrekturlesen dieser Arbeit aussprechen. Der gesamten Arbeitsgruppe, den jetzigen Kollegen und allen ehemaligen, danke ich für eine schöne Zeit, ob im Labor, auf dem Volleyballfeld oder der „Katz-Kantine“. Auch den lieben Kollegen aus den benachbarten Laboren danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Freundschaft.

Erwähnen möchte ich außerdem Prof. Dr. Matthias Leippe und Dr. Christoph Gelhaus, die mich darin bestärkt haben, diesen Weg zu gehen.

Dziękuję również moim kochanym rodzicom i rodzinie za modlitwę, wsparcie i za ich miłość.

Ich danke meinen wunderbaren Freunden und Dimitry für ihre Liebe und Unterstützung.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift

„**Untersuchungen zur Rolle von Aktin und Aktin-regulierenden Proteinen während der Infektion mit Mykobakterien im *Dictyostelium*-Modellsystem**“ selbständig verfasst und nur die im Literaturverzeichnis aufgeführten Quellen verwendet habe.

Diese Arbeit ist darüber hinaus keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

R. Kolombo

Hamburg, 04.07.2013