

Die Bedeutung des Exocyst-Komplexes bei der Phagosomenreifung in Endothelzellen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Liane Rauch

Hamburg, 2015

Tag der Disputation: 10.07.2015

Folgende Gutachter haben die Dissertation zur Annahme empfohlen:

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin Aepfelbacher
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Streit

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2011 bis Februar 2015 unter Anleitung von Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf erstellt. Die Arbeit wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (GRK-1459) unterstützt.

Dissertationsgutachter: Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher
Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Streit

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	Internalisierungsvorgänge in humanen Zellen	6
1.2	Phagozytose	7
1.2.1	Phagozytose-Rezeptoren	8
1.2.2	Umorganisation der Plasmamembran während der Phagozytose	9
1.2.3	Reifung der Phagosomen	11
1.3	Endothelzellen als Ziel bakterieller Invasion	13
1.3.1	Invasion von Endothelzellen durch <i>S. aureus</i>	14
1.4	Membrantransportvorgänge in eukaryotischen Zellen	15
1.4.1	Der Exocyst-Komplex	16
1.4.1.1	Molekulare Organisation und Lokalisation des Exocyst-Komplexes	16
1.4.1.2	Funktionen des Exocyst-Komplexes	19
1.4.1.3	Der Exocyst in Infektion und Pathogenese	22
1.5	Fragestellung und Zielsetzung	25
2	ERGEBNISSE	26
2.1	Das Modellsystem der Interaktion von Staphylokokken mit primären humanen Endothelzellen	26
2.2	Integrin-vermittelte Internalisierung von beschichteten Partikeln in primäre humane Endothelzellen	26
2.3	Exocyst-Proteine lokalisieren an reifenden Phagosomen in Endothelzellen	28
2.4	Exocyst-haltige Recycling-Endosomen interagieren mit Phagosomen	33
2.5	Einfluss des Exocysten auf die Reifung von Phagosomen in Endothelzellen	39
2.6	Abhängigkeit der phagosomalen Ansäuerung von der Rekrutierung von Exocyst und <i>recycling endosomes</i> zum Phagosom	41
2.7	Exocyst und <i>recycling endosomes</i> sind für den bakteriellen Abbau entscheidend	44
3	DISKUSSION	47
3.1	Integrin-vermittelte Internalisierung von Staphylokokken und beschichteten Polystyrol-Kügelchen in Endothelzellen	47
3.2	Exocyst-Proteine lokalisieren an reifenden Phagosomen	48
3.3	Exocyst-haltige <i>recycling endosomes</i> interagieren mit Phagosomen	50
3.4	Einfluss des Exocysten auf die Reifung von Phagosomen in Endothelzellen	51
3.5	Abhängigkeit der phagosomalen Ansäuerung von der Rekrutierung von Exocyst und RE zum Phagosom	52
3.6	Exocyst und <i>recycling endosomes</i> sind für den bakteriellen Abbau entscheidend	54
3.7	Zusammenfassung	55

4 MATERIALIEN	56
4.1 Geräte	56
4.2 Mikroskopie	57
4.3 Einwegartikel	58
4.4 Komplettsysteme, Enzyme und Reagenzien	59
4.5 Wachstumsmedien, Zusätze und Antibiotika	60
4.6 Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien	61
4.7 Chemikalien und Puffer-Lösungen	62
4.8 Protein- und DNS-Marker	64
4.9 siRNA	65
4.10 Plasmide	65
4.11 Primer	66
4.12 Antikörper	66
4.13 Software und Datenbanken	67
5 METHODEN	68
5.1 Mikrobiologische Methoden	68
5.1.1 Kultivierung von Bakterien	68
5.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	68
5.1.3 Transformation chemisch kompetenter Bakterien	68
5.1.4 Quantifizierung intrazellulär überlebender Bakterien	69
5.2 Molekularbiologische Methoden	69
5.2.1 Isolation von Plasmid-DNS	69
5.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNS	69
5.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	70
5.2.4 Arbeiten mit DNS	70
5.2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	70
5.2.4.2 Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen	71
5.2.4.3 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	71
5.2.4.4 Ligation	71
5.2.4.5 Sequenzierung	72
5.3 Proteinbiochemische Methoden	72
5.3.1 Proteinexpression und –aufreinigung	72
5.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	73
5.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	73
5.3.4 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	74
5.3.5 Western Blot Analysen	74
5.3.6 Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen	74
5.3.7 Beschichtung von Latex-Kügelchen mit Proteinen	75

5.3.8	Phagosomenisolation	75
5.3.9	Bestimmung der β -Hexosaminidase-Aktivität	76
5.4	Zellkultur und zellbiologische Methoden	76
5.4.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	77
5.4.2	Isolation von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur	77
5.4.3	Kryokonservierung und Reaktivierung von Kryokulturen	78
5.4.4	Zellbehandlungen	78
5.4.4.1	Transfektion und siRNA Experimente	78
5.4.4.2	Interaktion von beschichteten Kügelchen oder Bakterien mit Endothelzellen	78
5.5	Mikroskopische Methoden	79
5.5.1	Immunfluoreszenzfärbung und Fluoreszenzmikroskopie	79
5.5.2	Bestimmung der Internalisierungsrate mittels Innen-Außen-Färbung	79
5.5.3	Lebendzellmikroskopie und Photokonvertierung	80
5.5.4	Evaluation der Rekrutierung von Proteinen zum Phagosom	80
5.5.5	Kolokalisationsstudien	81
5.5.6	Messung der Phagosomen-Ansäuerung	81
6	LITERATURVERZEICHNIS	82
7	ZUSAMMENFASSUNG	96
8	ABSTRACT	97
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	98
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	100
11	TABELLENVERZEICHNIS	101
12	ANHÄNGE AUF ELEKTRONISCHEM DATENTRÄGER	102
13	VERÖFFENTLICHUNGEN	103
14	DANKSAGUNG	104
15	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	106

1 Einleitung

1.1 Internalisierungsvorgänge in humanen Zellen

Als Endozytose kann man allgemein die Aufnahme/ Internalisierung von Flüssigkeiten, gelösten Stoffen, Makromolekülen, Membrankomponenten und Partikeln in die Zelle bezeichnen. Dabei wird die Plasmamembran der Wirtszelle nach innen eingestülpt und das aufgenommene Material in Transportvesikel, sogenannte Endosomen, eingeschlossen und in den Zellinnenraum abgeschnürt. Je nach Aufnahmemechanismus haben manche Autoren vier Formen der Endozytose unterschieden: i) die Clathrin-vermittelte Endozytose, ii) Caveolin-abhängige Endozytose, iii) Makropinozytose und iv) Phagozytose [Alberts *et al.* 1999]. Inzwischen ist klar, dass diese vier Hauptarten der Endozytose durch eine Reihe von Variationen und variablen Ausprägungen weiter differenziert werden können (neueres Review [Schmid 2010]).

i) Clathrin-vermittelte Endozytose

Die Clathrin-vermittelte Endozytose ermöglicht die Aufnahme von Nährstoffen, Viren und Bakterien sowie Rezeptoren in die Zelle. Durch die Internalisierung von Rezeptoren werden maßgebliche Vorgänge der Signaltransduktion sowie Zellhomöostase beeinflusst. Eine Reihe von Rezeptor-Ligand-Komplexen wird über Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen. Dazu gehören beispielsweise der LDL-(*low density lipoprotein*)-Rezeptorkomplex, bei dem Cholesterol-beladenes LDL in die Zelle aufgenommen wird, sowie das mit Eisen beladene Transferrin, das über den Transferrin-Rezeptor internalisiert wird [Schmid 1997; Brodsky *et al.* 2001]. Die Abschnürung der Clathrin-beschichteten Vesikel erfolgt durch das Motorprotein Dynamin, welches durch GTP-Hydrolyse eine Konformationsänderung erfährt und die Verbindung von Plasmamembran und Vesikel trennt [Hinshaw 2000; Sever *et al.* 2000].

ii) Caveolin-abhängige Endozytose

Caveolae sind 50 – 100 nm große Einstülpungen auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran, die reich an Cholesterol und Sphingolipiden sind [Palade 1953; Yamada 1955]. Sie kommen in hoher Dichte in vaskulären Endothelzellen, Adipozyten, Fibroblasten und Epithelzellen vor und entstehen durch die Polymerisation von Caveolinen [Parton 1996; Smart *et al.* 1999]. Die Hauptstrukturproteine sind Caveolin-1, -2, -3, die palmitoyliert sind und eine haarnadelförmige Struktur aufweisen [Krajewska und Maslowska 2004; Williams *et al.* 2004]. Caveolae sind an Cholesterol-Transport und –Homöostase beteiligt [Fielding und Fielding 1997] sowie bei der Reorganisation der extrazellulären Fibronectin-Matrix [Sottile und Chandler 2005].

iii) Makropinozytose

Während der Makropinozytose kommt es zur Ausbildung von großen Membranausstülpungen auf der Zelloberfläche. Diese ermöglichen den Einschluss von beträchtlichen Flüssigkeitsmengen aus dem extrazellulären Raum und werden nach Fusion der Membranausstülpungen als sogenannte Makropinosomen in das Zellinnere abgeschnürt [Swanson 2008]. Auch Pathogene wie *Salmonella typhimurium* und *Legionella pneumophila* nutzen Makropinosomen, um in das Zellinnere zu gelangen [Alpuche-Aranda *et al.* 1994; Watarai *et al.* 2001].

iv) Phagozytose

Phagozytose ist eine besondere Form der Endozytose, bei der große Partikel, wie z.B. Mikroorganismen und Zelltrümmer, aufgenommen und in große endozytische Vesikel, sogenannte Phagosomen, eingeschlossen werden [Flannagan *et al.* 2012]. Da dieser Prozess aus mikrobiologischer Sicht besonders wichtig ist, wird im folgenden Abschnitt detaillierter auf dieses Thema eingegangen (siehe Kapitel 1.2).

1.2 Phagozytose

Die Phagozytose wurde vor über 100 Jahren zum ersten Mal von Metchnikoff beschrieben [Metchnikoff 1884]. Dieser Prozess beschreibt die Rezeptor-vermittelte, Aktin-abhängige Aufnahme von großen Partikeln ($>0,5 \mu\text{m}$). Sie ist eine wichtige Funktion von Zellen zum Schutz vor infektiösen und nicht-infektiösen Partikeln sowie zur Beseitigung von fremden zellulären Bestandteilen, um so die Gewebemöostase wiederherzustellen [Flannagan *et al.* 2012]. Obwohl Phagozytose hauptsächlich von spezialisierten Zellen (sogenannten „professionellen Phagozyten“), wie polymorphkernigen Granulozyten, dendritischen Zellen oder Makrophagen durchgeführt wird, ist der Prozess in fast allen Zellen zu finden. Zur Gruppe der „nicht-professionellen“ Phagozyten gehören Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen, die sich durch ein geringeres Rezeptor-Repertoire von den „professionellen“ Phagozyten unterscheiden [Rabinovitch 1995]. Die Phagozytose lässt sich in drei Schritte unterteilen: i) die Anheftung der Partikel an Rezeptoren, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden, ii) die phagozytäre Aufnahme, die durch eine dramatische Umorganisation der Plasmamembran sowie u.a. Exozytosevorgänge an der Anheftungsstelle charakterisiert ist sowie iii) die Reifung des Phagosoms. Die Schritte der Phagozytose sind in Abb. 1.1 graphisch dargestellt.

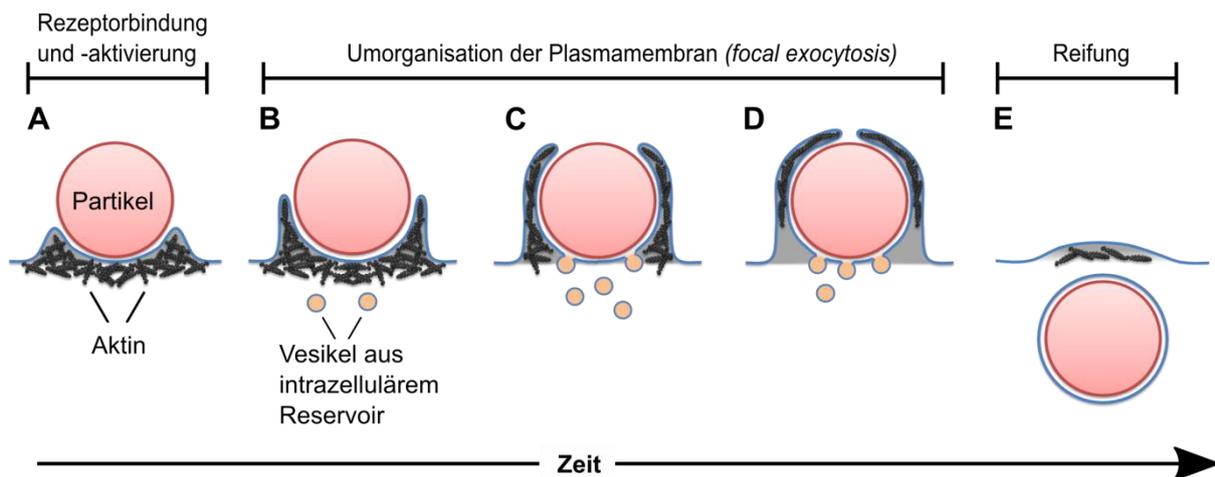


Abb. 1.1 Stadien der Phagozytose

A) Rezeptoren auf der Oberfläche des Wirtes werden durch Liganden der Partikel gebunden und aktiviert. Durch die induzierte Signalkaskade wird eine aktinreiche Struktur an der Anheftungsstelle gebildet, der sogenannte *phagocytic cup*. **B - D)** Die Plasmamembran beginnt sich auszustülpfen, um den Partikel vollständig zu umschließen. Dabei kommt es zu einer starken Oberflächenvergrößerung der Membran durch Pseudopodienvergrößerung. Gleichzeitig findet an der Basis des *cups* bereits die Aktindepolymerisierung statt. Aus einem intrazellulären Reservoir werden Vesikel zum *phagocytic cup* rekrutiert, die mit der Plasmamembran fusionieren. Dieser Schritt wird als *focal exocytosis* bezeichnet. **E)** Das Phagosom ist vollständig von Membran umgeben und schnürt sich in den Innenraum ab. Anschließend findet die Reifung zum Phagolysosom durch stetige Interaktion mit dem endosomalen Kompartiment statt. Abbildung modifiziert nach [Swanson 2008].

1.2.1 Phagozytose-Rezeptoren

Phagozyten besitzen Rezeptoren, die es ihnen ermöglichen zwischen körperfremden und körpereigenen Liganden zu differenzieren. Dabei werden bakterielle Oberflächenproteine, sogenannte PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*), durch PRRs (*pattern recognition receptors*) erkannt [Janeway 1992]. Bakterielle Liganden sind z.B. Lipopolysaccharide (LPS) von gram-negativen oder Lipoteichonsäuren von gram-positiven Bakterien [Sieling und Modlin 2002]. Zur Gruppe der PRRs in Säugerzellen gehören die Toll-ähnlichen Rezeptoren (*toll-like receptors*, TLR), welche die bakteriellen Oberflächenproteine erkennen und die angeborene Immunantwort auslösen. So werden beispielsweise gram-positive Bakterien von TLR2 und TLR6 erkannt und gram-negative von TLR4-Rezeptoren [Stuart und Ezekowitz 2005]. Eine indirekte Erkennung körperfremder Bestandteile wird durch Opsonierung erreicht. Dabei werden körperfremde Partikel durch Immunglobuline (Ig) oder durch Komponenten des Komplementsystems markiert [Ezekowitz *et al.* 1984]. Das wichtigste Opsonin der Immunglobulinfamilie ist das IgG, dessen konstanter Teil durch Fc-Gamma-Rezeptoren erkannt wird [Indik *et al.* 1992; Tuijnman *et al.* 1992]. Die Komplementrezeptoren CR1, CR3 und CR4 erkennen Partikel, die mit Spaltprodukten der Komplementkaskade wie C3b, C4b und iC3b markiert sind. Weitere phagozytische Rezeptoren wie der Mannose-Rezeptor, der zu den Lektinen gehört und Kohlenhydratstrukturen auf Pathogenen erkennt [Stahl und Ezekowitz 1998] sowie der

Lipopolysaccharidrezeptor CD14 [Devitt *et al.* 1998] und die Integrine $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha V\beta 3$, welche die Aufnahme von Fibronektin-assoziierten Partikeln in die Zelle vermitteln [Blystone *et al.* 1994]. Von besonderer Bedeutung für das Verständnis dieser Arbeit ist die Funktion von Fibronektin als Opsonin, welches im Zusammenhang mit Wundheilungsprozessen sowie Interaktionen mit Mikroorganismen in verschiedenen Zelltypen beschrieben wurde [Blystone *et al.* 1994]. Fibronektin agiert als „Brückenmolekül“ z.B. zwischen dem $\alpha 5\beta 1$ -Integrinrezeptor und den Fibronektin-bindenden Proteinen A/B von *S. aureus* sowie dem *Yersinia* spp. Adhäsin, YadA [Sinha *et al.* 1999; Fowler *et al.* 2000; Heise und Dersch 2006]. *Yersinien* exprimieren auch das Adhäsin Invasin auf ihrer Oberfläche, das direkte hochaffine Bindungen zu fünf verschiedenen $\beta 1$ -Heterodimeren eingehen kann [Isberg und Leong 1990]. Der $\alpha 5\beta 1$ -Integrinrezeptor wird dabei mit einer 100-fach höheren Affinität durch Invasin gebunden als durch sein natürliches Substrat Fibronektin [Tran Van Nhieu und Isberg 1993]. Integrine sind heterodimere Rezeptoren mit einer α - und einer β -Untereinheit, die in fast allen eukaryotischen Zellen exprimiert werden [Dupuy und Caron 2008]. Obwohl viele Integrine mit Phagozytose in Verbindung gebracht wurden, ist $\alpha M\beta 2$ der am besten charakterisierte Phagozytoserezeptor aus der Integrinfamilie. Er trägt auch die Bezeichnung Komplementrezeptor 3 (CR3) und spielt eine essentielle Rolle bei der Aufnahme Komplement-opsonierter Mikroorganismen und damit der angeborenen Immunantwort [Beller *et al.* 1982].

1.2.2 Umorganisation der Plasmamembran während der Phagozytose

Bei der Phagozytose werden durch Ligand-Phagozytoserezeptor-Bindung diverse Signalkaskaden aktiviert, wodurch ein drei-dimensionaler mikroadhäsiver Prozess induziert wird. Dabei kommt es häufig auch zur Ausbildung von Membranausstülpungen [Swanson und Hoppe 2004; Swanson 2008] sowie zur Reorganisation von Zytoskelettelementen [Castellano *et al.* 2001]. Griffin *et al.* zeigten, dass die phagozytische Aufnahme von Partikeln durch eine Reißverschluss-ähnliche Ligand-Rezeptor-Bindung induziert wird (siehe Abb. 1.2) [Griffin *et al.* 1975]. Entgegen der allgemeinen These, dass Aktin die Membranausstülpung nach außen presst, wurde von Herant *et al.* gezeigt, dass die Aktinpolymerisierung die Membran arretiert und der natürlichen Membranfluktuation entgegen wirkt [Herant *et al.* 2006]. Dieser Aufnahmemechanismus wurde auch in „nicht-professionellen“ Phagozyten beschrieben [Caron und Hall 1998; Underhill und Ozinsky 2002]. Der aktinreiche *phagocytic cup* bildet sich innerhalb von Sekunden und disassembliert bereits nach ein bis fünf Minuten [Greenberg *et al.* 1991; Diakonova *et al.* 2002]. Kleine GTPasen der Rho Familie haben eine fundamentale Rolle während der Phagozytose. Zum einen fördern sie die Formation von Aktinfilamenten an der Phagozytosestelle durch

Rekrutierung von Aktinnukleation-fördernde Faktoren (engl. NPFs) sowie des Aktin-Nukleationskomplex Arp2/3 [Welch und Mullins 2002]. Zum anderen beeinflussen sie Phosphoinositole. So wurde eine biphasische Akkumulation von Phosphoinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P₂) und PI(3)P am *phagocytic cup* detektiert [Brumell und Grinstein 2003]. Der Verlust von PI(4,5)P₂ am Phagosom geht mit der Schließung des Phagosomes einher [Marshall *et al.* 2001]. Lange Zeit ging man davon aus, dass eine einfache Verdichtung der Plasmamembran um die Partikel genügte, um ein Phagosom zu formen [Niedergang und Chavrier 2004]. Doch quantitative Spektroskopie und elektrophysiologische Messungen in Makrophagen zeigten, dass sich die Membranoberfläche während der Phagozytose vergrößerte [Holevinsky und Nelson 1998].

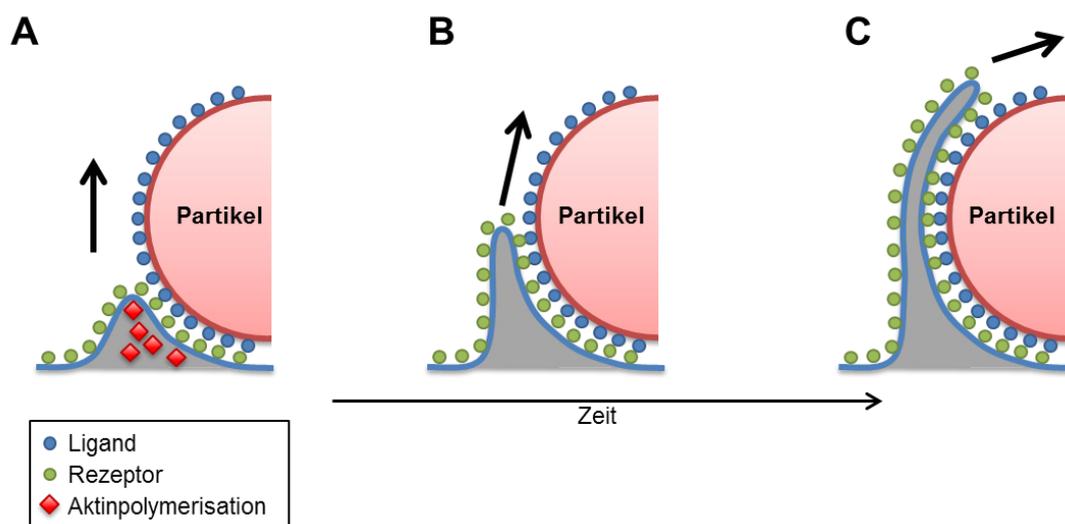


Abb. 1.2 Modell des Reißverschluss-Mechanismus während der Phagozytose

A - C Membranrezeptoren des Wirtes (grüne Punkte) werden durch die Liganden (blaue Punkte) auf der Oberfläche der Partikel sequentiell gebunden, beginnend an der Basis. Daraus resultiert eine zunehmende Umhüllung des Partikels mit Plasmamembran über die Zeit (von links nach rechts). Die Pfeile kennzeichnen die Bewegungsrichtung. Durch die Ligand-Rezeptor-Bindung wird eine Signalkaskade induziert, die zur Aktinpolymerisation (rote Rauten) führt und die Membranbewegung stabilisiert. Abbildung modifiziert nach [Tollis *et al.* 2010].

Die benötigten Membranen werden von intrazellulären Reservoiren zum *phagocytic cup* transportiert und fusionieren dort in einem SNARE-(*soluble N-ethylmaleinimide sensitive factor attachment protein receptor*)-abhängigen Mechanismus mit der Plasmamembran [Booth *et al.* 2001]. Diesen Vorgang bezeichnet man als *focal exocytosis* [Booth *et al.* 2001; Huynh *et al.* 2007]. Verschiedene intrazelluläre Kompartimente wie *recycling endosomes* [Bajno *et al.* 2000], endoplasmatisches Retikulum [Gagnon *et al.* 2002] und späte Phagosomen [Braun *et al.* 2004] sind dabei am Membrantransport beteiligt. Auf diesem Wege werden nicht nur Membranen am *phagocytic cup* zur Verfügung gestellt, sondern auch spezifische Proteine zum Phagosom geliefert, die für die Reifung essentiell sind.

1.2.3 Reifung der Phagosomen

Nach der Schließung des Phagosoms wird die Komposition des Kompartiments durch sequentielle Interaktion mit Komponenten des endozytischen sowie des *recycling endocytic* Signalweges modifiziert [Desjardins *et al.* 1994; Beron *et al.* 1995; Brown 1995; Bajno *et al.* 2000]. Dieser Prozess wird als Phagosomenreifung bezeichnet. Die wichtigsten Schritte des Reifungsprozesses sind in Abb. 1.3 dargestellt.

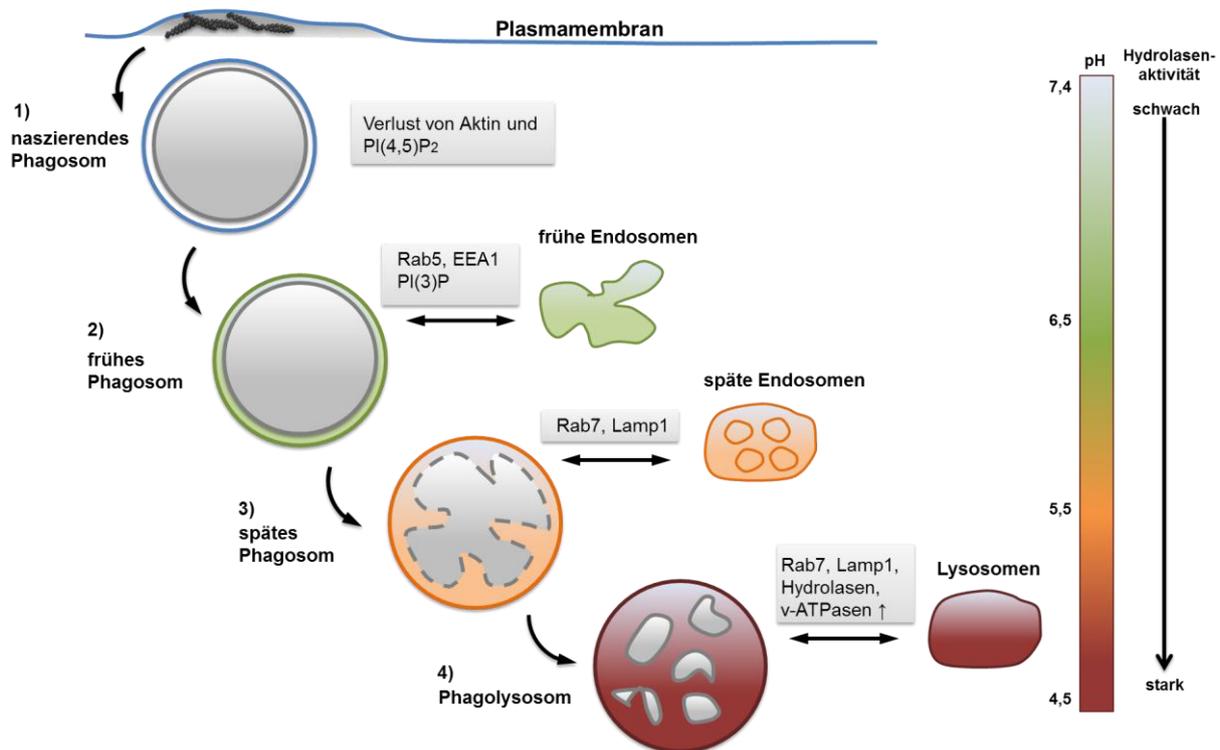


Abb. 1.3 Die vier Hauptstadien während der Phagosomenreifung

1) Bereits in diesem frühen phagosomalen Stadium unterscheidet sich die Membranzusammensetzung zwischen Plasmamembran und Phagosom. So wurden bereits Aktin und PI(4,5)P₂ vom Phagosom ausgeschlossen. **2)** Das frühe Phagosom ist reich an molekularen Markern der frühen Endosomen und zeigt eine leichte Azidität. **3)** Nach sequentieller Fusion mit späten Endosomen reichern sich Rab7 und Lamp1 am späten Phagosom an. Das Innere des späten Phagosoms erreicht bereits einen pH-Wert von max. 5,5. **4)** Das Phagosom wird durch Fusion mit Lysosomen zum Phagolysosom. Dieses ist stark angesäuert, reich an Hydrolasen und degradiert die internalisierten Partikel. Die Boxen zeigen wichtige molekulare Markerproteine sowie enzymatische Aktivitäten für jedes Reifestadium. Abbildung modifiziert nach [Botelho und Grinstein 2011].

Phagozytose und Phagosomenreifung werden durch zahlreiche *fusion* und *fission* Vorgänge (engl. Fusion und Spaltung) koordiniert, die durch Rab GTPasen und SNARE-Proteine reguliert und katalysiert werden [Niedergang und Chavrier 2004]. Die SNARE-Proteine Syntaxin 13 und Syntaxin 7 sind am Verlauf der Phagosomenreifung beteiligt. Sie sind an *recycling endosomes* (RE) und späten Phagosomen lokalisiert und akkumulieren während der Reifung an den Phagosomen. Des Weiteren sind sie an der Phago-Lysosomen-Fusion beteiligt [Collins *et al.* 2002]. Rab GTPasen gehören zu den kleinen GTPasen und

bestimmen z.B. die Lipidkomposition von Membranen indem sie spezifische Enzyme rekrutieren. Sie beeinflussen zudem die Vesikelbeweglichkeit durch Motorproteine und steuern den vesikulären Transport durch Interaktionen mit dem Aktinzytoskelett [Stenmark 2009; Mizuno-Yamasaki *et al.* 2012]. Die Rab GTPasen geben zudem dem Kompartiment an dem sie lokalisiert sind eine eindeutige Identität [Gutierrez 2013]. Rab5 ist ein Markerprotein der frühen Endosomen, das die Interaktion von frühen Endosomen mit dem Phagosom sowie die homotypische Endosomenfusion vermittelt [Bucci *et al.* 1992; Duclos *et al.* 2000]. Rab5 rekrutiert die PI(3)-Kinase zum Phagosom, welches die Phosphorylierung von Phospholipiden katalysiert. Dadurch wird PI(3)P am frühen Phagosom angereichert [Christoforidis *et al.* 1999; Murray *et al.* 2002]. Als Folge der Lokalisation von Rab5 und PI(3)P am Phagosom findet die Rekrutierung von EEA1 (*early endosome antigen 1*) statt, welches das Andocken und Fusionieren mit Vesikeln katalysiert [Gaulhier *et al.* 2000; Lawe *et al.* 2000]. Während der Reifung vom frühen zum späten Phagosom sinkt die Assoziation von Rab5 mit der phagosomalen Membran, während sich die Lokalisation von Rab7 manifestiert [Desjardins *et al.* 1994]. Rab7 ist sowohl an späten Phagosomen als auch Lysosomen lokalisiert und stellt einen wichtigen Regulator während des Membrantransports vom frühen zum späten Phagosom [Vitelli *et al.* 1997; Feng *et al.* 2001] sowie in der Lysosomenbiogenese dar [Bucci *et al.* 1992]. Die GTPase Rab11, welche mit *recycling endosomes* assoziiert ist, spielt ebenfalls eine essentielle Rolle während der Phagosomenreifung. So katalysiert Rab11 das *recycling* phagosomaler Komponenten [Pitt *et al.* 1992; Leiva *et al.* 2006] und wurde an Salmonellen-haltigen Phagosomen detektiert [Smith *et al.* 2007]. Zudem wurde auch die Interaktion von Proteinen des endoplasmatischen Retikulums mit den Phagosomen beschrieben [Gagnon *et al.* 2002]. Lysosomen lassen sich von Endosomen durch die Anwesenheit von lysosomal-assoziierten Membranproteinen (Lamp1 oder Lamp2) differenzieren [Chang *et al.* 2002]. Dieses Kompartiment stellt das terminale Organell des endozytischen Signalweges dar und spielt eine wichtige Rolle in der Degradation des phagozytierten Materials [Kornfeld und Mellman 1989; Funato *et al.* 1997]. Die Ansäuerung der Kompartimente wird oft als Alleinstellungsmerkmal eines vollständig gereiften Phagosoms angesehen [Kinchen und Ravichandran 2008]. Denn nur ein pH-Wert von 4,5 – 5,5 ist ausreichend um Proteasen der Cathepsin-Familie zu aktivieren [Lennon-Dumenil *et al.* 2002]. Die Ansäuerung erfolgt dabei in zwei Stufen: einer frühen Ansäuerung, die nur zu einer geringen pH-Wert-Senkung führt und bisher nur unzureichend charakterisiert ist und einer späten Ansäuerung, die durch den Transport von v-ATPasen zum Phagosomen charakterisiert wird [Beyenbach und Wieczorek 2006]. Der exakte Mechanismus, durch welchen die v-ATPasen zum Phagosom transportiert werden, ist in multizellulären Organismen sehr komplex und gilt noch aufzuklären. Seto *et al.* zeigten, dass Rab7, Rab20

und Rab39 an der Ansäuerung von *S. aureus*-haltigen Phagosomen beteiligt waren, doch auch hier blieb der regulatorische Mechanismus ungeklärt [Seto *et al.* 2011].

1.3 Endothelzellen als Ziel bakterieller Invasion

Endothelzellen bilden die innere Zellschicht aller vaskulären und lymphatischen Blutgefäße und stellen damit eine wichtige Barriere zwischen dem Blut, dem subendothelialen Bereich der Blutgefäße und letztlich dem extrazellulären Raum dar. Sie kontrollieren den Stoffaustausch zwischen Gewebe und Blut und haben eine zentrale Bedeutung in der Abwehr von Mikroorganismen [Lemichez *et al.* 2010]. Obwohl die Endothelzellen zu den „nicht-professionell“ phagozytierenden Zellen gezählt werden, wurde bereits 1886 von Wyssokowitsch beschrieben, dass das Endothelgewebe Mikroorganismen aufnimmt [Wyssokowitsch 1886]. Nach der Entwicklung von Zellkulturmodellen wurde auch *in vitro* die Phagozytose von *Staphylokokkus aureus*, *Neisseria gonorrhoea* und *Escherichia coli* in Endothelzellen beschrieben [Welsh *et al.* 1974]. Vann und Procter suggerierten, dass die Phagozytose von Bakterien in Endothelzellen ein Abwehrmechanismus zum Schutz vor Sepsis ist und sie zeigten, dass Endothelzellen eine ausgeprägte bakterizide Aktivität besitzen [Vann und Proctor 1988]. Einige Pathogene können auf der Endothelzelloberfläche kolonisieren und führen so zur Aktivierung der Zellen. Andere penetrieren das Endothelgewebe und aktivieren dadurch den *endothelial pathogen killing mechanism*. Während der Endothelzellaktivierung kommt es zur Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen sowie zur Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-II Molekülen (*major histocompatibility complex class II*), wodurch das Endothelium auch als immunologisches Organ betrachtet werden kann [Valbuena und Walker 2006]. In der folgenden Tabelle sind pathogene Bakterien aufgeführt, die mit den Endothelzellen interagieren (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1 Pathogenen Bakterien, die mit Endothelzellen interagieren*

Bakterien	Krankheit	Symptome
<i>Bacillus anthracis</i>	Anthrax	Pneumonie, Hautnekrose, Hämorrhagischer Schock
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Lyme-Borreliose	Fieber, Herzrhythmusstörungen
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Atherosklerose	Artheromatöse Läsionen
<i>Haemophilus influenzae</i>	Sepsis	Meningitis und endotoxischer Schock
<i>Neisseria meningitidis</i>	Meningitis	Septischer Schock und Meningitis
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sepsis	Toxischer Schock, Endokarditis und Infektion von Lunge, Leber und Milz
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Rheumatisches Fieber	Gewebeschäden an Herz, Niere und zentralem Nervensystem

* modifiziert nach [Lemichez *et al.* 2010]

Auch Viren (Cytomegalovirus, humaner Herpesvirus 8, Dengue Virus und Ebola) infizieren Endothelzellen, doch dies wird an dieser Stelle nicht weiter adressiert (weitere Informationen unter [Valbuena und Walker 2006]).

Generell können Bakterien entweder direkt an die eukaryotische Zelle binden oder durch Ausschüttung von Toxinen die Aktivierung des Endothelgewebes initiieren. So kann die Endothelzellschicht durch das CTD-Toxin (*cytolethal distending toxin*), das von diversen gram-positiven Bakterien produziert wird oder durch EDIN (*epidermal-cell differentiation inhibitor*), das von *S. aureus* produziert wird, geschädigt werden [Boyer und Crystal 2006; Ge *et al.* 2008]. Die Letalfaktor-Untereinheit des Anthrax-Toxins von *Bacillus anthracis* induziert direkt die Caspase-abhängige Apoptose von Endothelzellen und trägt entscheidend zur Pathologie des vaskulären Systems bei [Kirby 2004]. Obwohl Staphylokokken und Streptokokken als extrazelluläre Pathogene betrachtet werden, dringen sie in Endothelzellen ein, um vor Zellen des Immunsystems sowie Antibiotika geschützt zu sein. Die Transzytose sowie Invasion von Gruppe A Streptokokken und *S. aureus* in das Gewebe wird dabei z.B. durch Fibronectin induziert, welches die Verbindung von SfbI (*streptococcal fibronectin-binding protein*) oder FnbPA/B (*fibronectin binding protein A/B*) an den $\alpha 5\beta 1$ -Integrinrezeptor vermittelt [Nitsche-Schmitz *et al.* 2007]:

1.3.1 Invasion von Endothelzellen durch *S. aureus*

S. aureus gehört zur Gattung der Staphylokokken und zählt zu den wichtigsten Erregern ambulant erworbener und nosokomialer (im Krankenhaus erworbener) Infektionen. *S. aureus* ist ein kommensaler Keim und ist auf der Hautflora von ca. 30 % der gesunden Menschen zu finden. Die Pathogenität des Bakteriums wird durch seine Virulenzfaktoren bestimmt, die es ihm ermöglichen mit vaskulären Endothelzellen zu interagieren und Sepsis sowie bakterielle Endokarditis zu manifestieren [Lowy 1998]. Bereits in den 1950er Jahren wurde das gram-positive Bakterium mit Gefäßentzündungen oder schwerer Endokarditis in Verbindung gebracht, nachdem man Ratten, Hunden und Kaninchen mit Staphylokokken infiziert hatte (zusammengefasst in [Altschul 1954]). Obwohl man lange Zeit davon ausging, dass Endokarditis bevorzugt an vorgeschädigten Herzklappen entsteht [Grant *et al.* 1927-1929], wurden auch unauffällige Herzklappen besiedelt. Dabei wurde nach Phagozytose der Bakterien in die Endothelzellen die Zellyse der Endothelzellen initiiert, wodurch eine zunehmende Kolonisation begünstigt wurde [Watanakunakorn *et al.* 1973]. Seit der Entwicklung von Zellkultursystemen wurde zunehmend die Rolle von *S. aureus* in der Infektion des Endothelgewebes charakterisiert [Hamill *et al.* 1986]. Mittels zielgerichteter Mutagenese des α -Hämolysin-Gens von *S. aureus* (Stamm DU1090, Hämolysin-defizient) fand man heraus, dass die Zellyse des Endothelgewebes durch das Toxin induziert wurde. Auch Fibronectin spielt eine wichtige Rolle in der Aufnahme von *S. aureus* [Kuusela 1978;

Procter *et al.* 1982]. Das Pathogen nutzt die auf seiner Oberfläche exprimierte Fibronectin-bindende Proteine, um mit Hilfe von Fibronectin an den $\alpha 5\beta 1$ -Integrinrezeptor zu binden und in die Zielzelle zu invadieren [Sinha *et al.* 2000]. Die Ligand-Rezeptorbindung erfolgt dabei nach dem Reißverschlussprinzip, wie unter Abb. 1.2 dargestellt [Sinha und Herrmann 2005] und erfordert eine komplexe Aktinstrukturierung an der Anheftungsstelle [Schroder *et al.* 2006]. Endothelzellen besitzen eine hohe bakterizide Aktivität gegen *S. aureus*. So zeigten Vann und Procter, dass nach Phagozytose des Hämolyysin-defizienten *S. aureus* die Anzahl intrazellulärer Erreger sehr stark vermindert war und keine Schädigung des Endothelgewebes zu beobachten war [Vann und Procter 1987; Vann und Procter 1988]. Auch Schröder *et al.* zeigten, dass invadierte Staphylokokken bereits nach 24 h zu 99 % eliminiert wurden. Sie beobachteten zudem, dass *S. aureus* in *small colony variants* (SCV) differenzierte, die es ihm ermöglichen in den lysosomalen Strukturen des Wirtes zu überleben [Schroder *et al.* 2006]. Die Publikationen zeigen, dass „nicht-professionelle“ Phagozyten und im speziellen Endothelzellen eine wichtige Bedeutung in der Phagozytose von Staphylokokken besitzen und dadurch entscheidend zur Gewebekomöostase und -Regeneration beitragen. Eine bessere Charakterisierung des intrazellulären Transports der Pathogene ist jedoch nötig, um gezielter die Prozessierung der Bakterien zu kontrollieren und zu steuern.

1.4 Membrantransportvorgänge in eukaryotischen Zellen

Membrantransportvorgänge beschreiben den Transport von Membran-gebundenen Materialien zwischen intrazellulären Kompartimenten und der Plasmamembran. Dieser Prozess ist essentiell für die Lieferung von Proteinen und anderen Makromolekülen zu unterschiedlichen Stellen innerhalb- und außerhalb der Zelle. Als Transportmittel dienen Vesikel, in denen Cargos eingeschlossen werden. Der Transport der Vesikel erfolgt dabei entlang des Zytoskeletts wie z.B. Aktinfilamenten oder Mikrotubuli (zusammengefasst in [Hutagalung und Novick 2011]). Die Vesikel adhärieren an der Zielmembran durch *tethering*-Komplexe und fusionieren mit der Membran durch Proteine der SNARE-Familie [Segev 2009]. Dabei werden zwei intrazelluläre Transportrichtungen unterschieden. Zum einen der exozytotische Weg vom ER, über Golgi zur Plasmamembran sowie der endozytische Transport, der durch frühe und späte Endosomen zu den Lysosomen führt. Der endozytische Weg wurde erstmals von Brown und Goldstein während des Transports des LDL-Rezeptors beschrieben [Brown und Goldstein 1986]. Dabei werden Cargos Clathrin- oder Caveolin-abhängig in Vesikel aufgenommen und nach Abschnürung durch Dynamin von der Plasmamembran ins Zellinnere transportiert. Die Vesikel werden dabei über die endosomalen Kompartimente zur finalen Degradationsstelle in die Lysosomen befördert. Bereits früh kann auch der Vesikelinhalt über *sorting endosomes* wieder zur

Plasmamembran zurück transportiert werden. Bei dem exozytotischen Weg, der erstmals durch Palade *et al.* beschrieben wurde, werden Cargos vom Syntheseort im ER durch die drei Golgi-Zisternen *cis*, *medial* und *trans* zur Plasmamembran transportiert [Palade 1975]. Viele Transportprozesse erfordern die Unterstützung von sogenannten *tethering*-Faktoren, um die Vesikel an der Zielmembran zu arretieren, bevor sie SNARE-abhängig fusionieren können. Ein Multiproteinkomplex, der im Transport von *post*-Golgi-Vesikeln zur Plasmamembran beschrieben wurde, ist der Exocyst-Komplex.

1.4.1 Der Exocyst-Komplex

Der Exocyst-Komplex ist ein evolutionär konservierter oktamerischer Proteinkomplex, der den Transport von sekretorischen *post*-Golgi Vesikeln zur Plasmamembran reguliert. Sein Name leitet sich vom biologischen Prozess der Exozytose ab, bei dem ein Cargo-beladenes Vesikel mit der Plasmamembran fusioniert und dadurch Proteine und Lipide in die Plasmamembran sowie den Vesikelinhalt in den extrazellulären Raum entlässt. Zum Exocyst-Komplex gehören die Proteine Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 und Exo84, die erstmals von Novick *et al.* während der Teilung von *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben wurden. Er induzierte mit Hilfe von Temperatur-sensitiven Mutanten die Akkumulation von Vesikeln wodurch die Fusion mit der Plasmamembran beeinträchtigt und somit die Sekretion inhibiert wurde [Novick *et al.* 1980; Novick *et al.* 1981]. Sechs der von Novick identifizierten Proteine erhielten daher den Namen „Sec“, weil sie die Sekretion inhibierten. Später wurde durch TerBush, Novick und Kollegen der Exocyst-Protein-Komplex mit den sechs Sec-Proteinen aus Hefe aufgereinigt und zwei weitere Komponenten Exo70 und Exo84 wurden identifiziert [TerBush *et al.* 1996]. Auch in humanen Zellen, *Drosophila* und Pflanzen wurden alle acht homologen Proteine des Exocysten identifiziert [Ting *et al.* 1995; Elias *et al.* 2003; Murthy *et al.* 2003].

1.4.1.1 Molekulare Organisation und Lokalisation des Exocyst-Komplexes

Um die Funktionen des Exocysten im kommenden Abschnitt besser zu verstehen, ist es wichtig vorher auf die molekulare Organisation des Komplexes einzugehen. Die Interaktionen der Exocyst-Proteine untereinander wurde bereits ausreichend durch verschiedenste Methoden wie *yeast two hybrid* Experimente, Proteinbindungsexperimente mit *in vitro* translatierten Proteinen sowie mit aufgereinigten rekombinanten Proteinen untersucht (zusammengefasst in [Munson und Novick 2006]). Es zeigte sich, dass die Exocyst-Proteine untereinander multiple Interaktionen eingehen. Eine Reihe dieser Interaktionen wurden sowohl im Hefe- als auch im humanen Exocyst-Komplex gefunden. In Hefen wurde zudem gezeigt, dass die Integrität des Komplexes bereits beim Verlust eines

Exocyst-Proteins stark beeinträchtigt ist [TerBush und Novick 1995]. Strukturelle Hinweise zum Aufbau erhielt man durch die Kristallstrukturen folgender Exocysten: einer trunkierten Variante von Exo70 aus Hefe und Maus [Dong *et al.* 2005; Hamburger *et al.* 2006; Moore *et al.* 2007], der C-terminalen Domäne von *Drosophila* Sec15 [Wu *et al.* 2005], sowie von Exo84 und Sec6 aus Hefen [Dong *et al.* 2005; Sivaram *et al.* 2006]. Dabei zeigten sich trotz geringer Sequenzhomologien viele strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen den einzelnen Exocyst-Komponenten. So sind die Proteine durch Stangen-ähnliche, gebündelte Helices aufgebaut. Jedes Bündel besteht aus drei bis fünf α -Helices, die mit einem flexiblen Arm verbunden sind. Die Vorhersage der Sekundärstruktur auf Grundlage der Sequenz lässt vermuten, dass die bisher nicht kristallisierten Exocyst-Komponenten einen ähnlichen helikalen Aufbau besitzen. Kürzlich wurde die Kristallstruktur der N-terminalen Domäne von Sec3 aus Hefe aufgeklärt [Baek *et al.* 2010; Yamashita *et al.* 2010]. Dabei zeigte sich, dass Sec3 eine halb-offene β -Fasstruktur sowie eine C-terminale α -Helix besitzt in der eine Pleckstrin-Homologie-(PH)-ähnliche Domäne lokalisiert ist. Diese Domäne befähigt Sec3 zur direkten Bindung an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P₂) in der Plasmamembran sowie zur Interaktion mit kleinen GTPasen wie Rho1 und Cdc42 [Zhang *et al.* 2008; Baek *et al.* 2010; Yamashita *et al.* 2010]. Die Organisation des Komplexes in humanen Zellen wurde mittels Elektronenmikroskopie charakterisiert [Hsu *et al.* 1999]. Ohne Einsatz von Fixierungsmitteln zeigte der Komplex eine variable Konformation mit vier bis sechs „Armen“, die radial von einem zentralen Punkt ausgingen. Im Gegensatz dazu zeigte die Glutaraldehydfixierung, dass der Exocyst in einer „T“ oder „Y“-Form organisiert war [Hsu *et al.* 1998]. Auch in *Arabidopsis thaliana* wurde die „Y“-Struktur mittels Elektronentomographie bestätigt [Segui-Simarro *et al.* 2004]. Die Unterschiede in der Morphologie mit und ohne Fixierungsmittel lassen vermuten, dass es während des Transports von Vesikeln zur Konformationsänderung des Exocysten kommt. Alternativ wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Exocyst als Oktamerkomplex bzw. dissoziiert vorlag. Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es allerdings keine genaue Beschreibung wie sich der Exocyst-Holokomplex organisiert. Obwohl die Exocyst-Proteine strukturelle Homologien besitzen, zeigt jede Komponente ein eigenes hydrophobisches und elektrostatisches Oberflächenprofil [Sivaram *et al.* 2006], welches die individuellen Bindungsmöglichkeiten bestimmt. So wurde in Hefen und humanen Zellen bereits gezeigt, dass Sec3 und Exo70 an PI(4,5)P₂ der Plasmamembran binden. Beide Proteine besitzen positive Aminosäurereste, die positiv-geladene Cluster auf der Oberfläche des C-Terminus von Exo70 und N-Terminus von Sec3 bilden [He *et al.* 2007; Liu *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2008]. Mutation dieser basischen Reste führt zur Fehllokalisierung des Exocysten und zu gravierenden Fehlern in der Sekretion [Liu *et al.* 2007].

Wie man es von einem Proteinkomplex erwartet, der in die Exozytose involviert ist, lokalisiert der Exocyst in Bereichen der Plasmamembran. In Hefen ist der Exocyst in der Region der

Abknospung zu finden [He und Guo 2009], in *Drosophila* und menschlichen Neuronen lokalisiert der Exocyst an den Verzweigungspunkten der neuronalen Wachstumskegel [Hazuka *et al.* 1999; Lalli und Hall 2005; Mehta *et al.* 2005]. Des Weiteren ist der Exocyst an Zell-Zell-Kontakten in polarisierten Epithelzellen sowie am *leading edge* während der Zellbewegung zu finden [Hertzog und Chavrier 2011; Liu und Guo 2011]. In den letzten Jahren gab es zudem vermehrte Publikationen über die Rolle des Exocysten in Pflanzen. So wurde der Komplex an den wachsenden Enden des Pollenschlauchs, den Wurzelhaarspitzen sowie in der Zellteilungsebene detektiert [Hala *et al.* 2008; Fendrych *et al.* 2010]. Bereits seit Entdeckung des Komplexes rückt die Frage in den Fokus, wie der Exocyst rekrutiert wird. Erste Studien in Hefen implizierten, dass Sec3 als räumlicher Orientierungspunkt für andere Exocysten an der Plasmamembran fungiert [Finger *et al.* 1998]. Jedoch zeigten spätere Ergebnisse, dass Sec3 allein nicht in der Lage ist den Exocyst-Komplex an der Sekretionsstelle festzuhalten [Roumanie *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2005; Songer und Munson 2009]. Mittels Lebendzellmikroskopie und FRAP-Experimenten (*Fluorescence recovery after photobleaching*) wurde gezeigt, dass sechs der acht Exocyst-Proteine an Vesikeln lokalisiert sind und entlang des Aktinzytoskeletts zur Polarisierungsstelle transportiert werden. Während in Hefe Sec3-GFP unabhängig vom vesikulären Transport an der Plasmamembran lokalisierte [Finger *et al.* 1998], zeigte Exo70-GFP sowohl Vesikel-abhängige als auch -unabhängige Transportwege [Boyd *et al.* 2004]. Jedoch wurde nicht geklärt, ob die übrigen Exocyst-Komponenten einzeln oder bereits als zusammengefügter Komplex zu Exo70 und Sec3 transportiert werden. Der Ablauf der Assemblierung und Disassemblierung des Exocysten ist daher seit vielen Jahren eine zentrale Frage. Bisher ist nicht bekannt, wann und wie viele Exocyst-Komponenten sich zu einem Komplex zusammenfinden. Zwar gab es Hinweise, dass der ~750 kDa große Komplex in funktionelle Unterkomplexe sowie monomere Untereinheiten disassembliert, doch die Isolation solcher Sub-Komplexe ließ sich bisher nicht umsetzen [Munson und Novick 2006]. Durch Anwendung verschiedener Zentrifugationsmethoden, Zellfraktionierungen sowie Immunfluoreszenzexperimente in Hefen, *Drosophila* sowie humanen Zellen wurde gezeigt, dass die Exocyst-Proteine vorwiegend einzeln im Zytoplasma als auch dem Plasmamembran-Bereich vorliegen (zusammengefasst in [Heider und Munson 2012]). Die Lokalisation zur Plasmamembran ist essentiell für die Exozytose sowie die Kommunikation mit den SNARE-Proteinen. So wurde durch Exocyst-Mutanten gezeigt, dass der Exocyst nicht nur mit den SNAREs interagiert, sondern auch deren Assemblierung initiiert [Grote *et al.* 2000]. Weiterhin wurden Interaktionen zwischen Exocyst und Syntaxin sowie dem t-SNARE-Bindeprotein Snapin in humanen Zellen detektiert [Hsu *et al.* 1996; Bao *et al.* 2008]. In diversen Zelltypen wurde die Assoziation von Exocysten und Plasmamembran gezeigt, wie z.B. für Sec6/8 an der basal-lateralen Membran von Epithelzellen [Grindstaff *et al.* 1998; Oztan *et al.* 2007], an

postsynaptischen Membranen von Neuronen [Sans *et al.* 2003] sowie während der Insulin-induzierten Exozytose des Glucose-Transporters GLUT4 in Adipozyten [Inoue *et al.* 2003]. Als weitere Lokalisationsstelle wurde der Sec6/Sec8-Komplex in Bereichen des *trans*-Golgi Netzwerkes detektiert [Yeaman *et al.* 2001]. Auch im perinukleären *recycling compartment* sind Exocyst-Komponenten lokalisiert. So zeigten Prigent *et al.*, dass der Exocyst in *recycling endosomes* zu finden und am *recycling* von endozytiertem Transferrin involviert ist. Weiterhin zeigten sie, dass Sec10 stromabwärts von Arf6 (*ADP ribosylation factor 6*) agiert, wodurch Sec10 nach seiner Aktivierung an die Plasmamembran lokalisiert [Prigent *et al.* 2003]. Auch Sec8 und Exo70 wurden in Transferrin-Rezeptor-positiven *recycling endosomes* detektiert [Folsch *et al.* 2003]. Durch die Arbeiten von Zhang *et al.* wurde zudem erstmals gezeigt, dass Sec15 als Effektor der GTPase Rab11 dient [Zhang *et al.* 2004]. Da der Exocyst in eukaryotischen Zellen sowohl an der Plasmamembran als auch dem perinukleären *recycling compartment* zu finden ist, wurde die Hypothese aufgestellt, dass verschiedene Quellen des Exocysten in unterschiedlichen vesikulären Stadien agieren [Yeaman *et al.* 2001].

1.4.1.2 Funktionen des Exocyst-Komplexes

Der Exocyst gehört zur Familie der *complex associated with tethering containing helical rods* (CATCHR), die durch einen konservierten helikalen Aufbau gekennzeichnet sind. Er stellt als *tethering*-Faktor initiale und lange Verbindungen zwischen Vesikeln und der Zielmembran her [Yu und Hughson 2010]. Dabei arretiert und stabilisiert der Exocyst die Vesikel und initiiert somit die Anheftung und Fusion mit SNARE-Proteinen [Pfeffer 1996; Whyte und Munro 2002]. Im Zusammenhang mit seiner *tethering*-Funktion ist der Exocyst in diverse zelluläre Prozesse von Ein- und Mehrzellern involviert, die in Abb. 1.4 graphisch zusammengefasst sind.

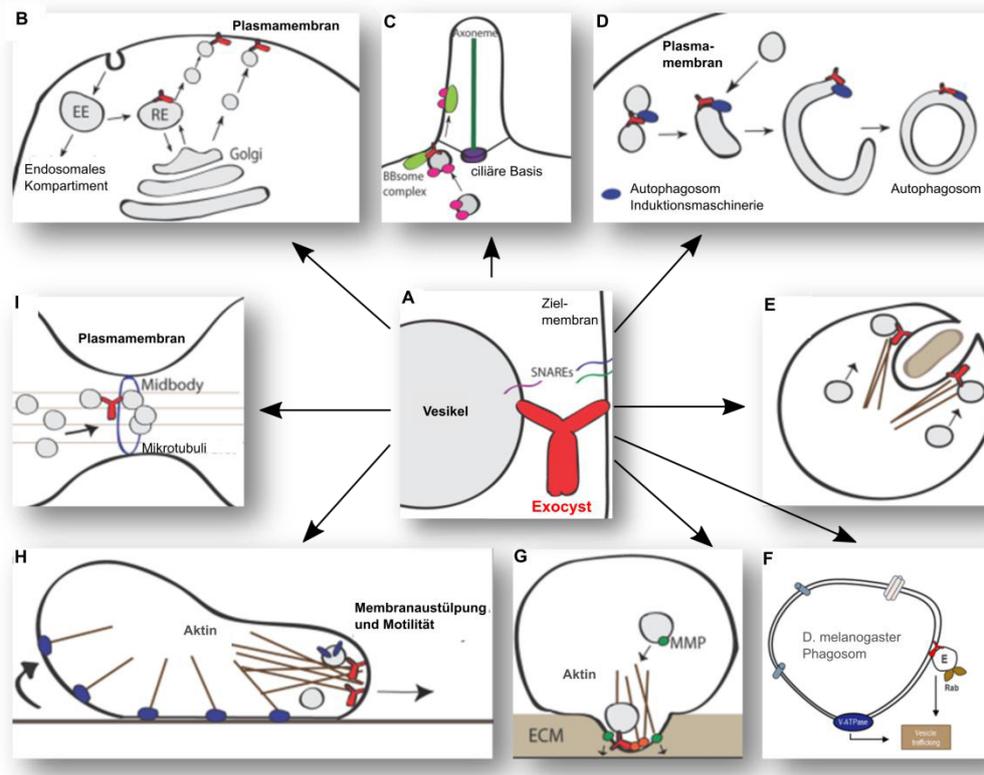


Abb. 1.4 Funktionen des Exocyst in verschiedenen Prozessen von ein- und mehrzelligen Organismen

A) Der Exocyst stellt durch die Interaktion mit Proteinen und Lipiden die initiale Verbindung der Vesikel bzw. Zielmembran her. Die Vesikel werden in die Nähe der SNARE-Proteine gebracht, wodurch sich der SNARE-Komplex formiert und die Vesikelfusion initiiert wird [Pfeffer 1996; Yu und Hughson 2010]. **B)** Während der polarisierten Sekretion werden durch den Exocyst sekretorische Vesikel vom Golgi Apparat zur Plasmamembran transportiert sowie internalisierte Bestandteile über die recycling endosomes zur Plasmamembran zurück transportiert (RE: recycling endosomes, EE: frühe Endosomen) [Wu *et al.* 2005; Oztan *et al.* 2007]. **C)** Der Exocyst reguliert den direkten Transport von Proteinen und Membranen zur ciliären Basis und fördert die Cilienbildung. Der BBSome-Komplex transportiert Proteine entgegen der Diffusionsbarriere in das Cilium [Das und Guo]. **D)** Exo84 und ein möglicher Subkomplex des Exocysten interagiert mit der Autophagosomen-Induktionsmaschinerie, wodurch die Formation des Autophagosoms gefördert wird [Bodemann *et al.* 2011]. **E)** Das invading Pathogen übernimmt die Regulation der zellulären Prozesse der Zielzelle inklusive des Exocysten, um durch Polarisation des Zytoskeletts, den Transport von Vesikeln zu Membranaustülpungen und Makropinozytose seinen Eintritt in den Wirt zu vermitteln [Nichols und Casanova 2010]. **F)** Der Exocyst ist mit Phagosomen von *Drosophila melanogaster* assoziiert. Während der Phagozytose rekrutiert der Exocyst Endosomen zum Phagosom, um auf diesem Wege Membranen vom intrazellulären Pool zur Verfügung zu stellen [Stuart *et al.* 2007]. **G)** Der Exocyst kolokalisiert mit Proteinen der Invadopodien und induziert den Transport von Matrixmetalloproteinasen (MMPs), wodurch die Degradation der extrazellulären Matrix (ECM) sowie das invasive Wachstum induziert werden [Sakurai-Yageta *et al.* 2008; Liu *et al.* 2009]. **H)** Der Exocyst interagiert mit Lipiden und Proteinen der Vorderkante von migrierenden Zellen und reguliert den Transport von fokalen Adhäsionsproteinen aus dem hinteren Teil, um die Migration zu fördern [Zuo *et al.* 2006; Rosse *et al.* 2009; Thapa *et al.* 2012]. **I)** Der Exocyst ist an Bereichen der Zytokinese lokalisiert, um Vesikel zu transportieren sowie zu dirigieren, um die Formation neuer Membran und die Abschnürung zu ermöglichen [Gromley *et al.* 2005]. Abbildung modifiziert nach [Heider und Munson 2012].

In höheren Eukaryoten spielt der Exocyst eine essentielle Rolle in Wachstum und Entwicklung der Organismen. So zeigten der *knockout* von Sec5 und Sec8 in Mäusen sowie Sec6 in *Drosophila* eine hohe Letalität im frühen Entwicklungsstadium [Friedrich *et al.* 1997; Murthy *et al.* 2003; Murthy *et al.* 2005]. In *Drosophila* konnte durch Mutation von Sec5 gezeigt werden, dass der Exocyst wichtig für die neurale Entwicklung ist, interessanterweise ist er aber nicht für die Fusion von Vesikeln mit der synaptischen Membran essentiell [Murthy

et al. 2003]. Im Gegensatz dazu wurde Sec8 an aufgereinigten humanen synaptischen Vesikeln gefunden und zeigt, dass der Exocyst in anderen Organismen durchaus für die Weiterleitung synaptischer Signale von Bedeutung ist [Takamori *et al.* 2006]. In Hefen spielt der Exocyst eine wichtige Rolle während der gerichteten Sekretion und transportiert Vesikel vom Golgi- bzw. *recycling compartments* zur Plasmamembran [He und Guo 2009; Wu *et al.* 2010]. Im Zusammenhang mit der Degradation der extrazellulären Matrix, wurde eine Kollokalisierung von Sec3 und Sec8 mit IQGAP1 in Invadopodien gefunden, welche regulatorisch auf die Rekrutierung von Matrixmetalloproteinase wirkte [Liu *et al.* 2009]. Zudem wurde eine Beteiligung des Exocysten am sekretorischen Transport des Glucose-Transporters GLUT4 in Adipozyten nach Insulin-Stimulation nachgewiesen [Inoue *et al.* 2003]. Auch in Prozessen der Cytokinese, Zellmigration, Tumorinvasion sowie Ciliogenese spielt der Exocyst eine essentielle Rolle (zusammengefasst in [Heider und Munson 2012]). Der Exocyst interagiert und reguliert Phosphoinositole, wodurch wichtige Prozesse wie Zellpolarisierung und Vesikeltransport beeinflusst werden. So wird beim *knockdown* von Exo70 der gerichtete Transport von Integrinen zum *leading edge* beeinträchtigt [Thapa *et al.* 2012]. Erst vor kurzem wurde die Beteiligung des Exocysten in die Autophagosom-Biogenese gezeigt. So aktiviert Exo84 durch Interaktion mit RalB die Assemblierung der Autophagom-Induktionsmaschinerie [Bodemann *et al.* 2011]. Durch die Arbeit von Stuart *et al.* wurde der Exocyst an *Drosophila*-Phagosomen detektiert und eine funktionelle Beteiligung an der Phagozytose von *E. coli* und *S. aureus* nachgewiesen [Stuart *et al.* 2007]. Dieses Thema wurde durch die Arbeit von Nichols *et al.* wieder aufgegriffen, als sie zeigten das der Exocyst an der Invasion von Salmonellen beteiligt ist und es während der Internalisierung zu einer direkten Interaktion von Exo70 mit SipC kommt, einer Komponente des Typ-III-Sekretionssystems (T3SS) der Bakterien [Nichols und Casanova 2010]. Das Thema der Rolle des Exocyst in der bakteriellen Pathogenese sowie Phagozytose wird im kommenden Abschnitt näher betrachtet. Durch die Interaktion des Exocysten mit kleinen GTPasen werden diverse zelluläre Funktionen reguliert. So bindet Sec15 in Hefen direkt an die GTP-gebundene Form der Rab GTPase Sec4, die peripher mit sekretorischen Vesikeln assoziiert ist und die Assemblierung des Exocyst-Komplexes reguliert [Guo *et al.* 1999]. In höheren Eukaryoten interagiert Sec15 mit Rab11, wodurch der Vesikeltransport von den *recycling endosomes* zur Plasmamembran beeinflusst wird [Wu *et al.* 2005; Oztan *et al.* 2007]. Prigent *et al.* zeigten zusätzlich, dass Sec10 die Funktion und die Morphologie des *recycling* Signalweges durch Interaktion mit der konstitutiv-aktiven Form von Arf6 beeinflusst [Prigent *et al.* 2003]. Der Exocyst wird zudem auch durch die Rho GTPasen Cdc42, Rho1 und Rho3 reguliert. Die GTP-gebundene Form der Rho GTPasen bindet dabei direkt an den N-Terminus von Sec3, sodass Mutationen in Cdc42 und Rho1 in Hefe zu einer diffusen Verteilung des Exocysten führten [Guo *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2001]. In humanen Zellen

bindet Exo70 direkt an TC10, einem Homolog von Cdc42. Diese Interaktion ist dabei eher wichtig für die Fusion als für den Transport von GLUT4-Vesikeln zur Plasmamembran in Adipozyten nach Insulinstimulierung [Inoue *et al.* 2003]. Einhergehend mit diesem Verhalten wurde auch nach *knockdown* von Exo70 in Hela-Zellen die Fusion der *post*-Golgi-Vesikel mit der Plasmamembran blockiert, während kein signifikanter Einfluss auf den Transport beobachtet wurde [Liu *et al.* 2007]. Im humanen System werden Vesikel entlang des Zytoskeletts vom Golgi zur Plasmamembran transportiert und auch diese Interaktion wird durch den Exocysten reguliert. So inhibiert Exo70 die Tubulinpolymerisierung *in vitro* [Wang *et al.* 2004] und interagiert mit den Arp2/3-Komplex wodurch die Zellmigration beeinflusst wird [Zuo *et al.* 2006]. Auch wenn es bisher noch keine mechanistischen Erkenntnisse gibt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Exocyst notwendig ist, um Vesikel von den Mikrotubuli freizulassen [Wang und Hsu 2006].

1.4.1.3 Der Exocyst in Infektion und Pathogenese

Erstmals wurde der Exocyst durch die Arbeit von Stuart *et al.* mit bakterieller Phagozytose in Verbindung gebracht [Stuart *et al.* 2007]. Sie zeigten durch eine proteomische Analyse, dass 617 Proteine mit dem Phagosom von *Drosophila melanogaster* assoziiert sind und identifizierten erstmals den Exocysten als funktionelle Komponente. Mittels Immunfluoreszenz und Western Blot Analysen zeigten sie auch die Assoziation des Exocysten mit Phagosomen aus J774-Makrophagen und S2-Zellen. Weiterhin konnten sie durch siRNA-Behandlung zeigen, dass Sec8, Sec10 und Sec15 sowohl in die Aufnahme von *S. aureus* als auch *E. coli* involviert waren. Die Internalisierungsrate war nach *knockdown* von Sec8, Sec10 und Sec15 um 25 – 30 % reduziert. Dagegen zeigten Sec3, Sec5 und Exo70 eine heterogene Beteiligung an der Aufnahme der Bakterien [Stuart *et al.* 2007]. Kurze Zeit später wurde in Hela die Interaktion von *Salmonella typhimurium* mit dem Exocysten gezeigt [Nichols und Casanova 2010]. Nach Adhäsion der *Salmonellen* an das intestinale Epithelgewebe werden bakterielle Effektorproteine in das Zytosol der Zielzelle mittels T3SS transportiert. Das T3SS ist ein Nadel-ähnlicher Komplex der eine Translokationspore bildet, an deren Spitze die Proteine SipB und SipC zu finden sind. Die Spitze des T3SS interagiert mit der Plasmamembran sowie des Zytosols des Zielorganismus [Miki *et al.* 2004]. Nichols und Casanova zeigten mittels Immunfluoreszenz und *Pull-down*-Experimenten, dass SipC direkt mit Exo70 interagiert [Nichols und Casanova 2010]. Weiterhin wurden Sec5, Sec8, Sec10 und Exo70 an den Invasionsstellen von *S. typhimurium* detektiert. Die Assemblierung des Exocysten war dabei abhängig von der kleinen GTPase RalA, die während der *Salmonellen*-Infektion durch den translozierten Effektor SopE aktiviert wurde. Sie zeigten, dass der *knockdown* von RalA oder Sec5 zu einer verminderten Anzahl von Invasionsherden und einer beeinträchtigten bakteriellen Internalisierung führte [Nichols

und Casanova 2010]. In späteren Untersuchungen wurde auch die Interaktion von bakteriellen Toxinen mit dem Exocysten charakterisiert. Das Bakterium *Bacillus anthracis* produziert ein Toxin, das sich aus den Untereinheiten Protektives Antigen, Letalfaktor (LF) und Ödemfaktor (EF) zusammensetzt. Das Toxin wird während der Infektion ausgeschieden, dringt in die Zellen des Wirts ein und zerstört diese [Mourez 2004; Tournier *et al.* 2007]. Guichard *et al.* konnten in *D. melanogaster* zeigen, dass Rab11 und Sec15 von EF und LF angegriffen werden [Guichard *et al.* 2010]. Während EF die apikalen Level von Rab11 reduzierte und somit indirekt die Vesikelformation durch den Bindungspartner Sec15 inhibierte, wirkte LF direkt auf die Anzahl an Sec15-GFP Vesikeln. In humanen Endothelzellen konnten sie zusätzlich zeigen, dass durch das Toxin die Formation von Sec15-Vesikeln blockiert, sowie die Expression von Cadherinen reduziert wurde, was zu vaskulären Dysfunktionen während der *B. anthracis* Infektion induzierte [Guichard *et al.* 2010]. Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte auch die Wirkung des Cholera-Toxins, das vom Bakterium *Vibrio cholerae* exprimiert wird und zu starker wässriger Diarrhoe führt [Guichard *et al.* 2013]. Sie zeigten, dass der funktionelle Teil des Toxins (CtxA) die Synthese des zyklischen AMPs in intestinalen Epithelzellen erhöht und gleichzeitig den Rab11-Exocyst-abhängigen Transport von E-Cadherin und Notch Signalkomponenten zu den Zell-Zell-Kontakten inhibiert [Guichard *et al.* 2013]. Durch die Arbeit von Mohammadi und Isberg wurde gezeigt, dass die Exozytose wichtig für die Phagosomformation ist und durch den Exocyst und die Rho GTPase Cdc42 reguliert wird [Mohammadi und Isberg 2013]. Während die Inaktivierung von Cdc42 keinen Einfluss auf die Internalisierung von *Yersinia pseudotuberculosis* hatte, zeigte sich eine stark verminderte Aufnahme von großen Invasin-beschichteten Kügelchen. Interessanterweise führte die Überexpression des *recycling endosome* Markers Rab11 zur Kompensation des durch *Cdc42-knockdown* induzierten Aufnahmedefekts großer Partikel. Auch die funktionelle Beteiligung von Exo70 an der Phagozytose wurde charakterisiert. Dabei zeigten Zellen mit siRNA-Behandlung gegen Exo70 sowohl bei Invasin- als auch IgG-beschichteten 4,5 µm Kügelchen eine um 50 % verminderte Internalisierungsrate. Die Daten zeigten, dass die funktionelle Beteiligung des Exocysten an der Internalisierung nicht vom Integrin-Rezeptor abhängig ist. Durch die Arbeit von Fernandes *et al.* wurde vor kurzem erstmals die Beteiligung des Exocysten an der Invasion von Trypanosomen gezeigt [Fernandes *et al.* 2015]. Sec8 und Exo70 lokalisierten sowohl an der Anheftungsstelle extrazellulärer *T. cruzi* als auch an internalisierten Parasiten. Zudem zeigten die Daten, dass der Exocyst an der Wundheilung der Plasmamembran sowie der Invasion von *T. cruzi* beteiligt ist. So wurden nach Knockdown von Sec8 und Exo70 signifikant weniger intrazelluläre Parasiten sowie eine stark verminderte Wundheilung im Vergleich zu Kontroll siRNA-transfizierten Zellen detektiert. Die Daten suggerierten, dass die Rekrutierung des Exocysten zur parasitären Vakuole wichtig für die Erweiterung der

Membran an der Anheftungsstelle ist. Auch bei viralen Infektionen spielt der Exocyst eine regulatorische Funktion. So wurde durch einen *yeast two-hybrid screen* Sec3 als neuer Interaktionspartner des Westnil- und des Dengue Virus identifiziert [Bhuvanakantham *et al.* 2010]. Mutationsstudien der SH2-Domäne von Sec3 zeigten dabei die direkte Interaktion mit dem N-terminalen Teil des C-Proteins, dass für die Pathogenese der *Flaviviridae* Familie verantwortlich ist. Durch die Interaktion des Exocysten mit dem Protein C wurde die Transkription und Translation der viralen RNA moduliert. Sec3 agierte als anti-Flavivirus-Faktor indem er die Bindung des Transkriptionsfaktors EF1 α an die 3'UTR des Virengenoms inhibierte [Bhuvanakantham *et al.* 2010]. Im Gegensatz dazu zeigte der *knockdown* von Exo70 in HepG2-Zellen keinen Einfluss auf die virale Transkription oder Translation, sondern führte zu einem verminderten Virus-Austritt bzw. -Sekretion. So wurde bei Exo70-*knockdown* 75 – 80% weniger virales Hüllprotein-E in das Wachstumsmedium der HepG2-Zellen sezerniert [Chen *et al.* 2010]. Ein Verwandter Prozess der Phagozytose ist die Autophagy, welche zur zellulären Immunantwort gehört. Autophagy spielt eine wichtige Rolle bei der Gewebemöostase, sowie bei der Beseitigung von Pathogenen [Yang und Klionsky 2010]. Bodemann *et al.* zeigten in humanen Epithelzellen und Gebärmutterhalskrebszellen, dass Infektion mit *S. typhimurium* oder Nährstoffmangel zur Aktivierung von RalB sowie seinem Effektorprotein Exo84 führten [Bodemann *et al.* 2011]. Die Interaktion von RalB und Exo84 führte weiterhin zur Assemblierung und Aktivierung der Autophagy-Induktionsmaschinerie [Bodemann *et al.* 2011]. Interessanterweise identifizierten sie zwei Komplexe, die Exocyst und Autophagykomponenten enthielten. Zum einen den Autophagy-aktiven RalB-Exo84-Komplex, der funktionelles ULK und PI3K enthält, die für den ersten Schritt der Autophagosomformation, der Nukleation, essentiell sind. Dieser Komplex war während der Nährstoffdepletion aktiv und induzierte Autophagy. Der zweite Komplex aus Sec5-ULK-PI3K korrelierte mit dem inaktivem-Autophagystadium und lag unter nährstoffreichen Bedingungen vor. Nachdem der Exocyst-Komplex auch in Pflanzen identifiziert wurde, rückte die Rolle des Exocysten für die Morphogenese von *Arabidopsis thaliana* immer mehr in den Mittelpunkt [Hala *et al.* 2008]. Im Gegensatz zu Hefen oder humanen Zellen, die nur ein Gen für Exo70 besitzen, existiert in Pflanzen eine große Exo70 Genfamilie mit 23 Mitgliedern [Elias *et al.* 2003]. Pecenkova *et al.* zeigten, dass Exo70B2 und Exo70H1 in die Abwehr des Bakteriums *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* sowie des Pilzes *Blumeria graminis* involviert sind [Pecenkova *et al.* 2011]. Die *Arabidopsis*-Mutanten von Exo70B2 und H1 zeigten unter anderem Probleme in der Papillenformation und waren viel anfälliger für Infektionen durch *P. syringae* [Pecenkova *et al.* 2011; Stegmann *et al.* 2012].

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Im Gegensatz zur bisher verbreiteten Ansicht, dass der Exocyst-Komplex vor allem *tethering*-Faktor beim Transport sekretorischer Vesikel zur Plasmamembran agiert, wurde er mittlerweile bei diversen mit der Umorganisation von zellulären Membranen assoziierten Prozessen beschrieben, wie z.B. bei der Sekretion von Matrixmetalloproteinasen, Zellmigration und Autophagosom-Biogenese [Zuo *et al.* 2006; Sakurai-Yageta *et al.* 2008; Bodemann *et al.* 2011]. Interessanterweise wurde der Exocyst-Komplex in vorangegangenen Arbeiten an phagozytischen Aufnahmestrukturen und Phagosomen von Yersinien, Salmonellen und Trypanosomen detektiert, jedoch wurde eine Beteiligung an der Phagosomenreifung nicht näher betrachtet [Stuart *et al.* 2007; Nichols und Casanova 2010; Mohammadi und Isberg 2013; Fernandes *et al.* 2015]. Da diese Prozesse eine große Bedeutung bei der Abwehr von Mikroorganismen und somit der zellulären Immunantwort haben, war es relevant, die Rolle des Exocysten in der Phagosomenreifung zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Exocysten bei der Reifung von Phagosomen in Endothelzellen erforscht, um eine Beteiligung dieses Protein-Komplexes an einem für vaskuläre Infektionen wichtigen Prozess zu verifizieren. Als *in vitro* Modell wurden dabei primäre humane Endothelzellen verwendet, die als einlagige Zellschicht alle Blut- und Lymphgefäßen auskleiden und deshalb oft das Ziel bakterieller Invasion z.B. durch *S. aureus* sind.

Folgende Fragestellungen sollten in dieser Arbeit adressiert werden:

1. Lokalisiert der Exocyst an Bakterien-haltigen Phagosomen in Endothelzellen?
2. Wie ist die Dynamik der Interaktion von Exocyst-Proteinen mit dem Phagosom?
3. Welche spezifischen intrazellulären Membranvesikel assoziieren mit dem Exocyst-Komplex?
4. Welchen Einfluss haben Exocyst-abhängige Vesikeltransportprozesse auf die Phagosomenreifung?

Die Beantwortung dieser Fragen sollte zu einem besseren molekularen Verständnis der Phagosomenreifung in Endothelzellen beitragen und somit einen möglichen Ansatzpunkt für die Behandlung von Infektionen des Endothelgewebes bieten.

2 Ergebnisse

2.1 Das Modellsystem der Interaktion von Staphylokokken mit primären humanen Endothelzellen

Zur Charakterisierung der Phagozytose von Staphylokokken und der Reifung Staphylokokken-haltiger Phagosomen im humanen Endothelgewebe wurde ein Infektionsmodell angewendet. Als bakterielles Modell wurde *S. carnosus*, der das Fibronektin-bindende Protein A (FnBPA) vom *S. aureus* Stamm 8325 4 xenogen auf der Bakterienoberfläche exprimiert (FnBPA-*S. carnosus*, [Sinha *et al.* 2000]), eingesetzt. Die adhäsiven Eigenschaften dieses avirulenten Stammes werden dabei ausschließlich durch FnBPA bewirkt, welches die Adhäsion an lösliches oder zellulär gebundenes Fibronectin vermittelt. Als nicht-bakterielles Modellsystem wurden Polystyrol-Kügelchen mit Durchmessern von 1 bis 3 μm benutzt, die mit GST-Fusionsproteinen von FnBPA oder Invasin beschichtet wurden (siehe Methoden 5.3.7). Im Gegensatz zu Bakterien heften diese Partikel kaum aneinander und eignen sich daher hervorragend zur Analyse von phagosomalen Strukturen mit einzelnen Partikeln. Partikel mit einem Durchmesser von 3 μm besitzen zudem eine 9-fach größere Oberfläche im Vergleich zu Staphylokokken, wodurch mehr Zelloberflächenrezeptoren bei der Adhäsion und Invasion aktiviert werden.

2.2 Integrin-vermittelte Internalisierung von beschichteten Partikeln in primäre humane Endothelzellen

Integrine sind heterodimere Rezeptoren bestehend aus einer alpha- und einer beta-Kette in der Plasmamembran verschiedener Zelltypen und sind häufig das Ziel bakterieller Pathogene. So nutzen beispielsweise *Yersinia* spp. und *S. aureus* in Epithel- bzw. Endothelzellen diese Rezeptoren zum Eintritt in die Wirtszellen. Die Bakterien exprimieren Adhäsine (Oberflächenproteine), die die Interaktion mit dem Wirt vermitteln. Während das Adhäsionsmolekül Invasin direkt an den $\beta 1$ -Integrin-Rezeptor bindet und die Internalisierung über den $\alpha 5\beta 1$ -Rezeptor induziert [Tran Van Nhieu und Isberg 1993], ist für die Interaktion von FnBPA mit dem $\alpha 5\beta 1$ -Rezeptor lösliches oder zellulär organisiertes Fibronectin essentiell (Abb. 2.1 A) [Sinha *et al.* 1999]. Um die Kinetik der Integrin-vermittelten Aufnahme in Endothelzellen zu bestimmen, wurden 3 μm Polystyrolkügelchen entweder mit GST-Inv397 oder GST-FnBPA beschichtet (siehe Methoden 5.3.7) und durch Zentrifugation an die Oberfläche von HUVEC (*human umbilical chord vein endothelial cell*) gebunden. Nach Inkubation bei 37°C für definierte Zeitpunkte wurden extra- und intrazelluläre Kügelchen mittels Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht und die Anzahl intrazellulärer Kügelchen quantifiziert (siehe Methoden 5.5.2). Nach 10 min waren bereits 70 % der Invasin-beschichteten Partikel internalisiert, während nur 50 % FnBPA-beschichtete Kügelchen

aufgenommen wurden. Zu allen Zeitpunkten danach wurden ca. 20 – 30 % mehr Invasin-beschichtete als FnBPA-beschichtete Partikel internalisiert (vgl. Abb. 2.1 B). Mittels videomikroskopischer Aufnahmen wurde die Rekrutierung von mRFP-Lifeact und GFP- $\alpha 5$ -Integrin zu Invasin-beschichteten Kügelchen visualisiert (Abb. 2.1 C). Das mRFP-Lifeact Plasmid dient der Visualisierung von filamentösem Aktin in lebenden Zellen und stört dabei nicht die Dynamik des Zytoskeletts [Riedl *et al.* 2008]. Durch Adhäsion von Invasin-beschichteten Partikeln an die Oberfläche von HUVEC wurden sowohl Aktinpolymerisierung als auch Integrinrekrutierung induziert. Dabei zeigten sich 1 min:12 sec nach der Adhäsion die stärksten Intensitäten um das Invasin-beschichtete Kügelchen (Abb. 2.1 C, roter Pfeil).

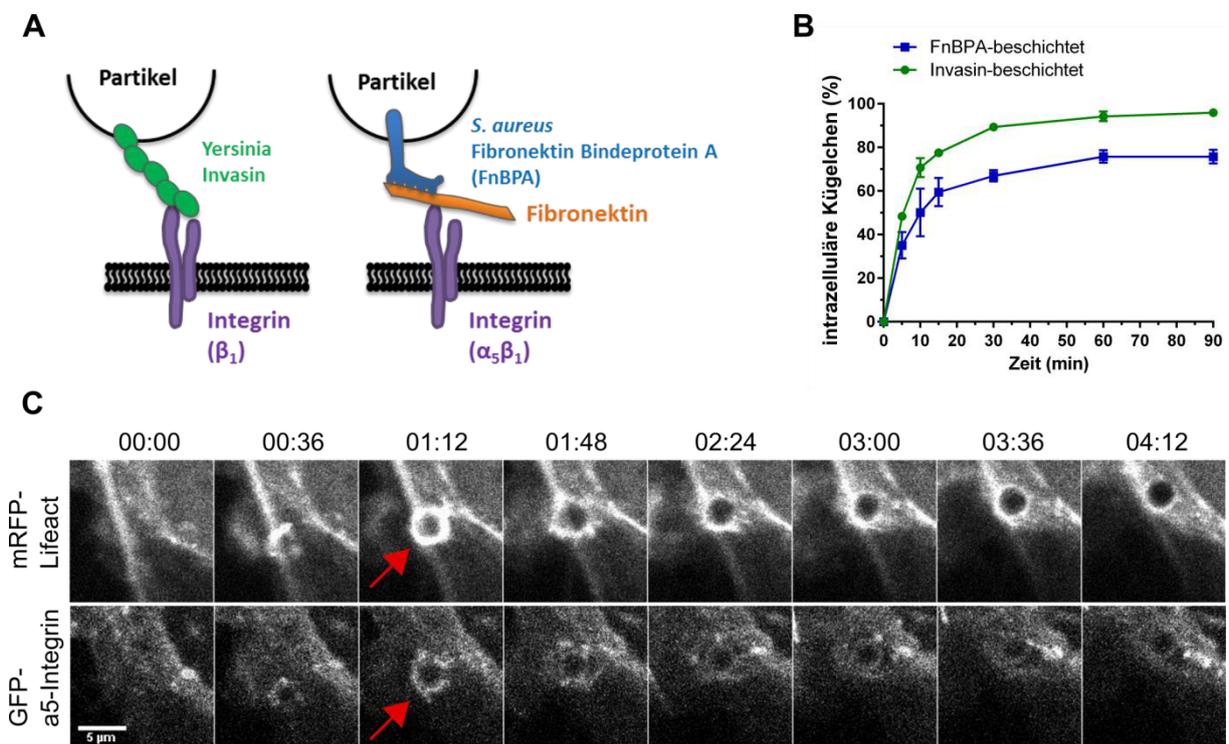


Abb. 2.1 Internalisierung von Invasin- und FnBPA beschichteten Partikeln in primäre humane Endothelzellen (HUVEC) und Effekte auf die Aktin- und Integrinrekrutierung

A) Schematische Darstellung der Bindung von Invasin-beschichteten (**links**) und FnBPA-beschichteten Partikeln (**rechts**) an Integrin-Rezeptoren. **B)** Graphische Darstellung der Internalisierungskinetik von 3 μ m FnBPA- und Invasin-beschichteten Kügelchen in HUVEC. Die Partikel wurden auf die Zellen zentrifugiert, für die angegebenen Zeitpunkte bei 37°C inkubiert und nach Fixierung einer Innen/ Außenfärbung unterzogen (siehe Methoden 5.5.2). Mikroskopisch wurde die Anzahl assoziierter und internalisierter Kügelchen bestimmt und als prozentualer Anteil intrazellulärer Kügelchen dargestellt. Die Werte stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung von 1000 Partikeln aus zwei unabhängigen Experimenten dar. **C)** GFP- $\alpha 5$ -Integrin und mRFP-Lifeact exprimierende HUVEC wurden mit Invasin-beschichteten Kügelchen inkubiert und videomikroskopisch analysiert. Die Dynamiken von Aktin (**obere Bildreihe**) und $\alpha 5$ -Integrin (**untere Reihe**) an der Adhäsionsstelle sind dargestellt. Der rote Pfeil kennzeichnet den Höhepunkt der Aktinpolymerisierung sowie der Integrin-Rekrutierung. Maßstab: 5 μ m.

Aufgrund der effektiven und synchronen Internalisierung von Invasin-beschichteten Partikeln in Endothelzellen, eignen sich diese besonders zur Untersuchung der phagosomalen Reifungsprozesse. Für alle weiteren Experimente wurden daher ausschließlich Invasin-induzierte Prozesse untersucht.

2.3 Exocyst-Proteine lokalisieren an reifenden Phagosomen in Endothelzellen

Bereits in vorangegangenen Arbeiten wurden Exocyst-Proteine an phagozytischen Aufnahmestrukturen und reifenden Phagosomen detektiert [Stuart *et al.* 2007; Nichols und Casanova 2010; Mohammadi und Isberg 2013]. So wurde eine funktionelle Rolle des Exocysten an der Invasion bzw. Phagozytose von Yersinien, Salmonellen und Trypanosomen gezeigt, jedoch wurde die Beteiligung an der Phagosomenreifung nicht näher betrachtet [Nichols und Casanova 2010; Mohammadi und Isberg 2013; Fernandes *et al.* 2015].

Zunächst wurde die Lokalisierung des Exocyst an endothelialen Phagosomen videomikroskopisch untersucht. Hierzu wurden HUVEC mit Plasmiden für GFP-Exo70 oder YFP-Sec10 transfiziert und mit 3 µm Invasin-beschichteten Kügelchen inkubiert. Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder einer konfokalen Ebene des im Anhang aufgeführten Video 1 sind unter Abb. 2.2 A aufgeführt. Dabei zeigte sich, dass GFP-Exo70 sehr schnell zur Partikeladhäsionsstelle rekrutiert wurde. Bereits 30 s nach der Anheftung kam es zur Ausbildung der phagozytischen Aufnahmestruktur (*phagocytic cup*) und nach 90 s war das Kügelchen bereits vollständig eingeschlossen. Diese Werte korrelierten auch mit den Aufnahmezeit aus Abb. 2.1 C. Auf die maximale mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von GFP-Exo70 nach 3 min folgte eine Senke bei 13 min (blauer Pfeil Abb. 2.2 A) sowie ein zweiter Höchststand nach 22 min (roter Pfeil Abb. 2.2 A). Das Rekrutierungsverhalten von Exo70 war somit biphasisch.

Interessanterweise wurde auch nach Expression von YFP-Sec10 in HUVEC eine biphasische Rekrutierung zu Invasin-beschichteten Kügelchen beobachtet (Abb. 2.2 B). So wurde YFP-Sec10 mit hoher Intensität nach 9 min sowie in der zweiten Phase nach 24 min detektiert. Vergleicht man die Internalisierungskinetik aus Abb. 2.1 B mit diesem Zeitverlauf der Exocyst-Rekrutierung (Abb. 2.2 B) wird klar, dass der Großteil der Partikel während des ersten Akkumulationspunktes internalisiert wurde. Es lässt sich schlussfolgern, dass GFP-Exo70 und YFP-Sec10 in zwei Phasen zu internalisierenden Kügelchen transportiert werden:

- (i) Phase 1: Von 0 – 13 min findet die Internalisierung und Einschluss der Partikel in frühe Phagosomen statt.
- (ii) Phase 2: Zwischen 18 - 27 min schreitet der Reifungsprozess weiter voran und 89 % der Partikel liegen zu diesem Zeitpunkt bereits interzellulär vor.

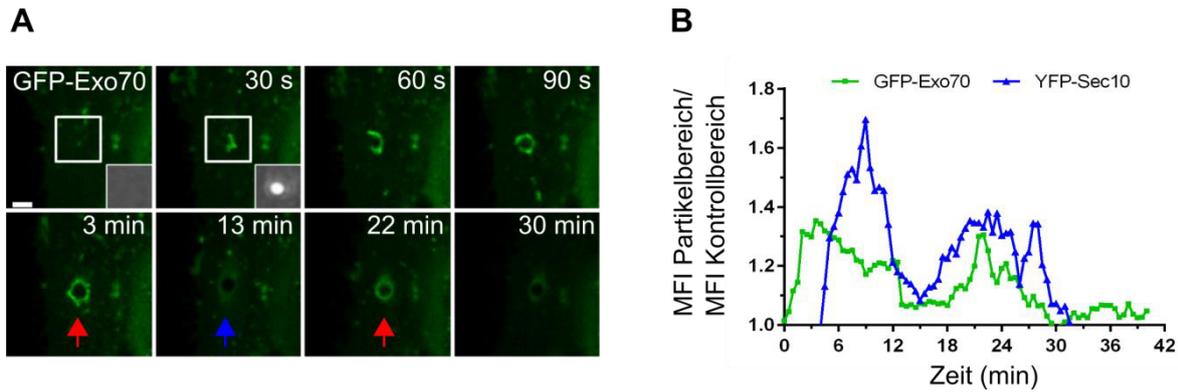


Abb. 2.2 Biphasische Rekrutierung von Exo70 und Sec10 zu Invasin-beschichteten Kügelchen

A) GFP-Exo70 exprimierende HUVEC wurden mit 3 μm Invasin-beschichteten Partikeln inkubiert und videomikroskopisch analysiert. Einzelbilder einer Fokusebene wurden dem im Anhang aufgeführten Film (Video 1, maximale Projektion) entnommen. Die eingezeichneten Quadrate kennzeichnen die jeweiligen Phasenkontrastbilder, die am unteren Bildrand eingefügt sind. Maßstab: 10 μm . **B)** HUVEC wurden mit GFP-Exo70 oder YFP-Sec10 transfiziert, mit Invasin-beschichteten 3 μm Partikeln inkubiert und videomikroskopisch analysiert. Das Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des Partikelbereichs vs. partikelfreier Bereich (Kontrollbereich) wurde über die Zeit dargestellt.

Zur Korrelation der biphasischen Rekrutierung mit den Reifungsstadien von endothelialen Phagosomen wurden fluoreszenzmikroskopische Analysen durchgeführt. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die Reifestadien durch die An- oder Abwesenheit von endosomalen und lysosomalen Markerproteinen bestimmt werden [Fairn und Grinstein 2012]. Daher wurden HUVEC mit GFP-Rab5, GFP-Rab7 oder YFP-Lamp1 transfiziert, mit 3 μm Invasin-beschichteten Partikeln inkubiert und die Anzahl positiver Phagosomen des entsprechenden Markerproteins zu verschiedenen Zeiten quantifiziert. Während des 120-minütigen Zeitverlaufes zeigte sich eine sequentielle Rekrutierung der Markerproteine zu den Phagosomen (Abb. 2.3 A). Auf Grundlage dieser Markerverteilung wurden drei Reifestadien für Phagosomen in Endothelzellen definiert:

- i) frühe Phagosomen (FP), die nach 5 min die höchste GFP-Rab5 Intensität zeigten, jedoch keine Assoziation mit GFP-Rab7 oder YFP-Lamp1 aufwiesen.
- ii) späte Phagosomen (SP) zeigten nach 30 min eine hohe GFP-Rab7 Fluoreszenz, und eine minimale YFP-Lamp1 Fluoreszenz. GFP-Rab5 war zu diesem Zeitpunkt nur selten an den Phagosomen zu detektieren.
- iii) Phagolysosomen (Ply) zeigten nach 120 min eine maximale YFP-Lamp1 Intensität, eine marginale Assoziation mit GFP-Rab7 und nahezu keine GFP-Rab5 Fluoreszenz (Abb. 2.3 A).

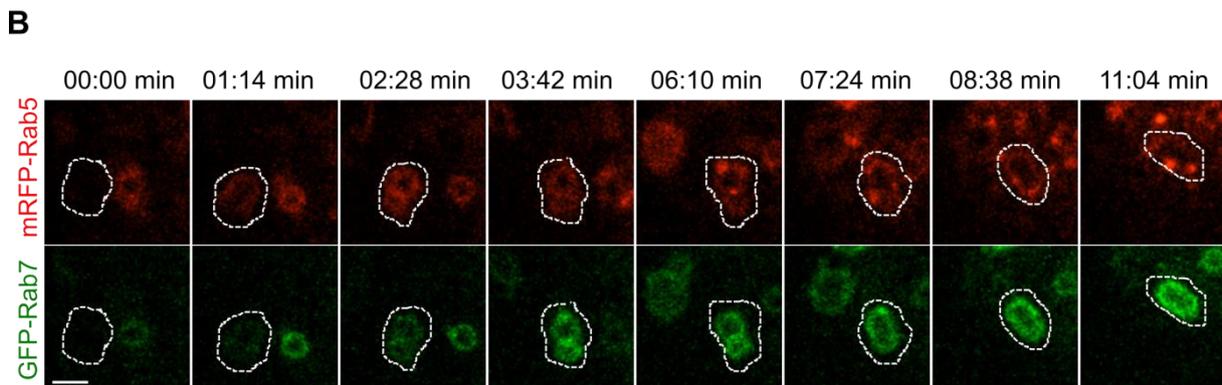
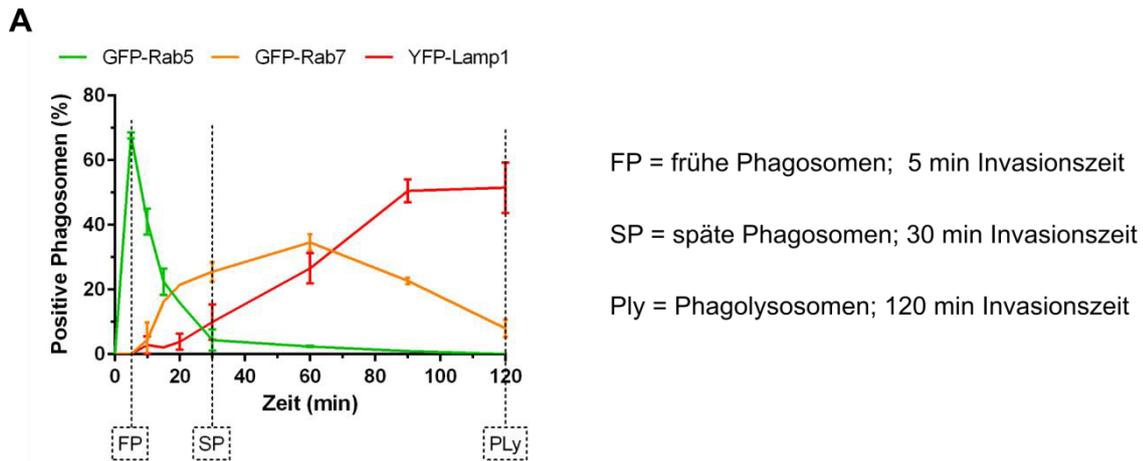


Abb. 2.3 Bestimmung der Reifestadien von Phagosomen in Endothelzellen

A) HUVEC wurden mit GFP-Rab5, GFP-Rab7 oder YFP-Lamp1 transfiziert und mit Invasin-beschichteten Kügelchen für die angegebenen Zeiten inkubiert. Partikel-enthaltende Phagosomen wurden als positiv gezählt, wenn sie ein signifikantes Fluoreszenzsignal des entsprechenden Markers besaßen. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung von 300 Phagosomen aus drei unabhängigen Experimenten dar. Drei verschiedene Reifestadien wurden definiert: FP = frühe Phagosomen; SP = späte Phagosomen und Ply = Phagolysosomen. **B)** HUVEC wurden mit mRFP-Rab5 und GFP-Rab7 kotransfiziert. Nach Infektion mit FnBPA-*S. carnosus* wurden die Zellen lebendzellmikroskopisch analysiert. Einzelbilder des Videos sind abgebildet. Die gestrichelten Linien begrenzen die Bakterien. Maßstab: 2,5 μ m.

Auch die lebendzellmikroskopische Analyse von FnBPA-*S. carnosus* zeigte die sequentielle Rekrutierung von mRFP-Rab5 und GFP-Rab7 zum Phagosom (Abb. 2.3 B). Bereits zu Beginn der Internalisierung wird mRFP-Rab5 zu den Bakterien transportiert, und zeigte nach 2:28 min das stärkste Fluoreszenzsignal. Anschließend reichert sich zunehmend GFP-Rab7 am Phagosom an, wobei gleichzeitig die mRFP-Rab5-Intensität sinkt. Nach 11 min wurde nur noch GFP-Rab7 am den bakteriellen Phagosomen detektiert (Abb. 2.3 B).

Mit Hilfe des Zeitverlaufs (Abb. 2.3 A) konnte die Korrelation zwischen Reifestadien und Exocyst-Rekrutierung zu endothelialen Phagosomen bestimmt werden. Hierzu wurden FP, SP und Ply auf die Anwesenheit der endogenen Exocyst-Proteine Sec5, Sec8 und Exo70 getestet. Alle drei Exocysten konnten sowohl an 3 μ m Invasin-beschichteten Kügelchen als auch FnBPA-*S. carnosus* enthaltenden FP, SP und Ply detektiert werden (Abb. 2.4 A, B). Die Quantifizierung zeigte, dass an 65 – 80 % der frühen Phagosomen, ca. 50 % der späten

Phagosomen sowie 25 – 45 % der Phagolysosomen die getesteten Exocyst-Proteine nachgewiesen werden können (Abb. 2.4 A). Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Exocyst-Proteine an bakteriellen Phagosomen sind in Abb. 2.4 B zu finden. Sie zeigen eine enge Assoziation von Exo70 mit phagosomalen Strukturen. Sowohl die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen als auch die Quantifizierung zeigen deutlich, dass die Assoziation von Exocyst mit Phagosomen mit zunehmender Reifung sinkt.

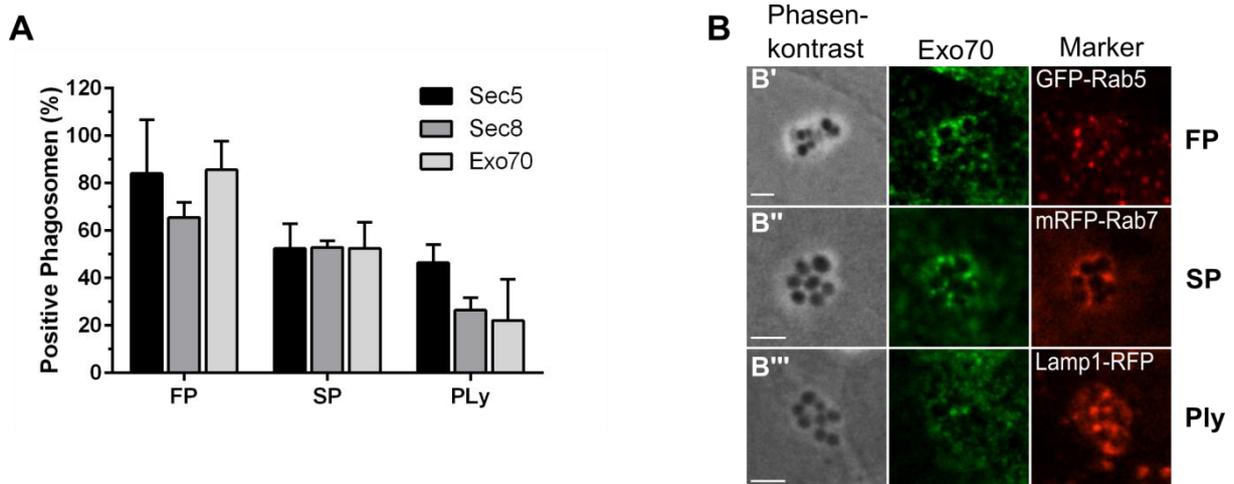


Abb. 2.4 Lokalisierung des Exocyst an frühen und späten Phagosomen sowie Phagolysosomen

A) HUVEC wurden mit GFP-Rab5, GFP-Rab7 und YFP-Lamp1 transfiziert, mit Invasin-beschichteten Kügelchen inkubiert und für angegebene Exocyst-Proteinen immungefärbt. Der prozentuale Anteil an FP, SP und Ply (wie in Abb. 2.3 definiert), der ein signifikantes Fluoreszenzsignal des jeweiligen Exocyst-Proteins zeigte, wurde bestimmt. Jeder Balken repräsentiert Mittelwerte \pm Standardabweichung von 150 Phagosomen aus drei unabhängigen Experimenten. **B)** HUVEC wurden mit (**B'**) mRFP-Rab5, (**B''**) mRFP-Rab7 und (**B'''**) Lamp1-RFP transfiziert und mit FnBPA-*S. carnosus* infiziert. FP, SP und Ply wurden mit Exo70 (grüner Kanal) immungefärbt. Repräsentative Bilder sind abgebildet. Maßstäbe: 2,5 μ m.

Zur Verifizierung der physikalischen Interaktion von Exocyst mit reifenden Phagosomen wurden diese aus der Endothelzelllinie Ea.hy926 isoliert. Die Aufreinigung der Phagosomen erfolgte dabei nach der Methode von Desjardins und Vinet und beruht auf dem geringen Sedimentationskoeffizienten der Polystyrol-Kügelchen, die im Saccharose-Gradienten nach oben treiben und in Bereichen geringer Saccharosekonzentration [Desjardins *et al.* 1994; Vinet und Descoteaux 2009]. Die Isolation der Phagosomen erfolgte, wie in 5.3.8 beschrieben, nach Inkubation der Zellen mit Invasin-beschichteten Kügelchen für 30 min bzw. 120 min. Der Erfolg der Aufreinigung sowie die Identität der phagosomalen Fraktionen wurden durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunoblot mittels spezifischer Antikörper kontrolliert (Abb. 2.5 A). Die phagosomalen Fraktionen waren frei von Membranen des endoplasmischen Retikulums (Markerprotein Bip), Zytoplasma (Markerprotein GAPDH) sowie frühen Endosomen (Markerprotein EEA1), zeigten jedoch hohe Mengen Rab7 (Marker für späte Endosomen) sowie der lysosomalen Markerproteine Limp2 und reifem Cathepsin D (Abb. 2.5 A). Weiterhin wurde die

Enzymaktivität des lysosomalen Enzyms β -Hexosaminidase bestimmt, um die Anreicherung von lysosomalen Strukturen in den aufgereinigten Phagosomen zu überprüfen. Wie in Abb. 2.5 B zu sehen ist, zeigen die Phagosomen eine 2,5-fach höhere spezifische β -Hexosaminidase Aktivität im Vergleich zum jeweiligen post-nukleären Überstand (PNS). Durch Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen Sec5, Sec8 und Exo70 im Immunoblot wurde die Assoziation dieser Exocysten-Proteine mit aufgereinigten Phagosomen verschiedener Reifestadien nachgewiesen (Abb. 2.5 C). An späten Phagosomen bzw. Phagolysosomen wurden ca. 15 % - 30 % Sec5, Sec8 und Exo70 im Vergleich zum jeweiligen PNS detektiert.

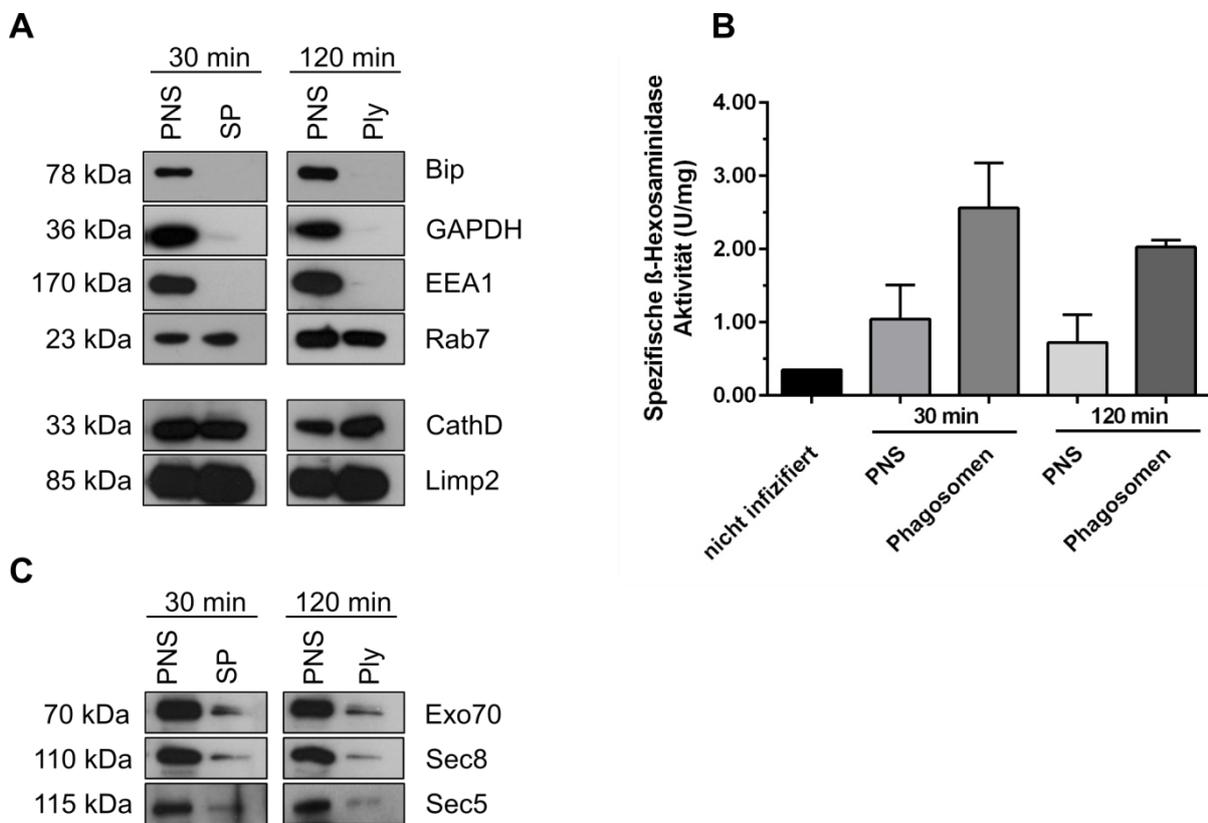


Abb. 2.5 Exocyst-Proteine sind mit aufgereinigten Phagosomen assoziiert

A + C) Zur Isolation von späten Phagosomen und Phagolysosomen wurden Ea.hy926 für 30 min bzw. 120 min mit 1 μ m Invasin-beschichteten Kügelchen inkubiert und, wie unter 5.3.8 beschrieben, mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Gleiche Proteinmengen (5 μ g/Spur) des post nukleären Überstandes (*post nuclear supernatant*, PNS) und der phagosomalen Fraktionen von späten Phagosomen (SP) bzw. Phagolysosomen (Ply) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach anschließender Immunblotanalysen mit angegebenen spezifischen Antikörpern analysiert. **B)** Zur Bestimmung der spezifische β -Hexosaminidase Aktivität (U/mg) wurden jeweils 5 μ g des PNS sowie SP und Ply mit Substrat bei 37°C inkubiert und die Produktentstehung, wie unter 5.3.9 beschrieben, bei 405 nm photometrisch gemessen. 5 μ g untransfiziertes Ea.hy926 Proteinlysate wurden als Kontrolle mitgeführt.

Zusammenfassend konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie sowie biochemischer Aufreinigung die Assoziation von Exocyst-Proteinen mit endothelialen Phagosomen verschiedener Reifestadien gezeigt werden. Es wurde deutlich, dass die Rekrutierung des

Exocysten an K ugelchen- oder Bakterienhaltige Kompartimente in Endothelzellen in zwei Stufen stattfindet, die mit der Partikelinvasion bzw. frühen einerseits und späten Reifung andererseits assoziiert ist. Es stellte sich jedoch die Frage, was der Ursprung der Exocyst-haltigen Endosomen ist und auf welchem Wege diese zum reifenden Phagosom transportiert werden.

2.4 Exocyst-haltige Recycling-Endosomen interagieren mit Phagosomen

Die Lokalisation des Exocysten am Phagosom wurde mittels Immunfluoreszenz sowie Lebendzellmikroskopie genauer betrachtet. Dabei ist der Exocyst heterogen um phagosomalen Strukturen verteilt. Wie in Abb. 2.6 A deutlich zu erkennen ist, zeigt Sec5 in der x/z-Projektion eine punktuelle Morphologie an GFP-Rab7 positiven Phagosomen, wie sie bei vesikulären bzw. endosomalen Strukturen zu finden ist. Unter Verwendung von Lebendzellmikroskopie zeigte sich, dass YFP-Sec10 positive Endosomen dynamisch und in hoher Frequenz zu bakteriellen Phagosomen transportiert wurden (Abb. 2.6 B sowie Video 2). Die Pfeile in Abb. 2.6 B verfolgen Sec10 an FnBPA-*S. carnosus*-haltigen Phagosomen und zeigen, dass sich der Exocyst entlang der phagosomalen Membran mehrerer Bakterien bewegt.

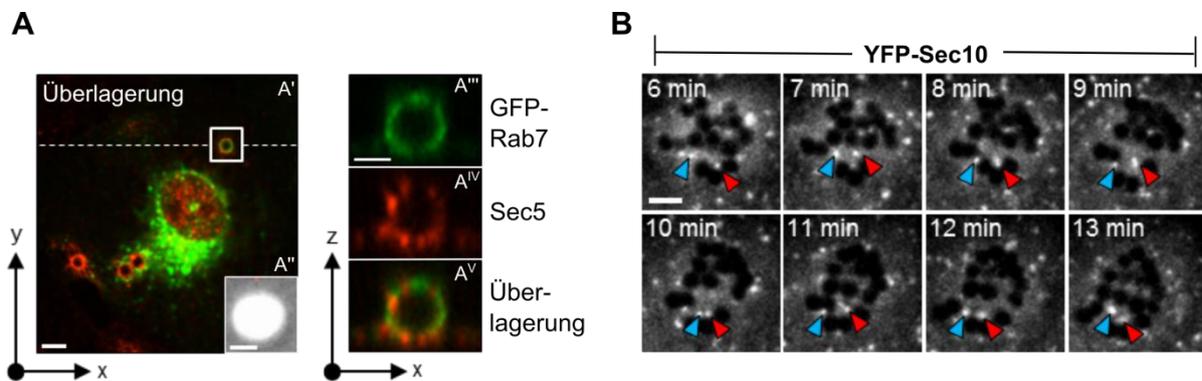


Abb. 2.6 Exocyst-haltige Endosomen interagieren mit endothelialen Phagosomen

A) HUVEC wurden mit GFP-Rab7 transfiziert, mit Invasin-beschichteten K ugelchen für 30 min inkubiert und mit Sec5-Antikörper immungefärbt. Die weiße Quadrat in **A'** markiert den Bereich des Phasenkontrastbildes (**A''**) sowie der x/z-Projektionen (**A''', A''', A''**), die entlang der gestrichelten Linie aufgenommen wurden. Maßstäbe: 2,5 μ m. **B)** HUVEC wurden mit YFP-Sec10 transfiziert und mit FnBPA-*S. carnosus* infiziert. Videomikroskopisch wurde die Rekrutierung von Sec10-haltigen Endosomen zu den Phagosomen aufgenommen. Repräsentative Bilder des Videos 2 (siehe Anhang) wurden dargestellt. Die blauen und roten Pfeile kennzeichnen YFP-Sec10 Endosomen, die dynamisch mit den Bakterien interagieren. Maßstab: 2,5 μ m.

Zur Aufklärung, welchen Ursprung die Exocyst-haltigen Strukturen am Phagosomen haben, wurden systemische Kollokalisationsanalysen mit Markerproteinen des endolysosomalen Weges durchgeführt. Hierzu wurde der *Pearson's* Koeffizient bestimmt, welcher die

Korrelation der Intensitätsverteilung von zwei Fluoreszenzkanälen beschreibt. Der Koeffizient kann Werte von -1 bis +1 annehmen, dabei zeigt ein Wert von -1 keine Kolokalisation an, während ein Wert von +1 eine vollständige Kolokalisation beider Kanäle bedeutet [Zinchuk und Zinchuk 2008]. HUVEC wurden hierzu mit den Plasmiden für frühe Phagosomen (GFP-Rab5), späte Phagosomen (GFP-Rab7), Phagolysosomen (YFP-Lamp1) und *recycling endosomes* (GFP-TfR, GFP-Rab11) transfiziert und mit Exo70-Antikörper immungefärbt. In nicht-infizierten Zellen wiesen GFP-Rab5, GFP-Rab7 und YFP-Lamp1 einen mittleren *Pearson's* Koeffizienten unter einem Wert von 0,5 auf und wurden nach Vergleich mit publizierten Koeffizienten als nicht kolokalisierend angesehen (Abb. 2.7 A, [Zinchuk und Zinchuk 2008]). Exemplarische Immunfluoreszenzbilder sind in Abb. 2.7 B aufgeführt. Sie zeigen Überlagerungen von Exocyst-Vesikeln mit Endosomen bzw. Phagolysosomen in der Peripherie (Abb. 2.7 B). Da aus der Literatur bereits bekannt ist, dass die Exocyst-Komponente Sec15 direkt mit dem Recycling Endosomen Marker Rab11 interagiert [Zhang *et al.* 2004], wurden Kolokalisationsexperimente mit Recycling Markern Rab11 und TfR durchgeführt. Sowohl die Quantifizierung als auch die repräsentativen Immunfluoreszenzbilder zeigten eine starke Kolokalisierung von Exo70-Vesikeln mit den *recycling endosomes* Markern GFP-Rab11 und GFP-TfR (Abb. 2.7 A und B, sowie Daten nicht gezeigt).

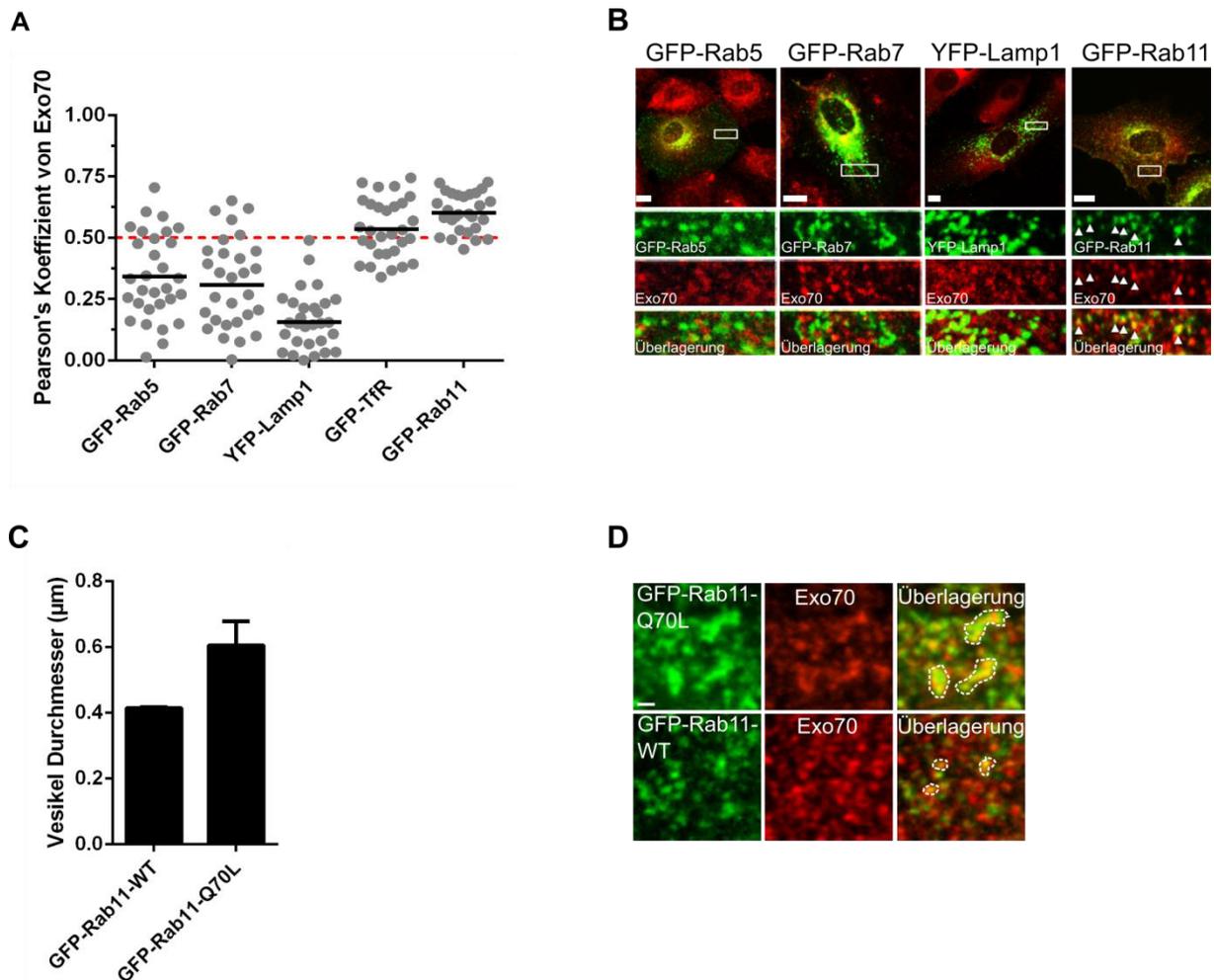


Abb. 2.7 Exocyst kolokalisiert mit recycling endosomes

A + B) HUVEC wurde mit GFP-Rab5, GFP-Rab7, YFP-Lamp1, GFP-TfR und GFP-Rab11 transfiziert und mit Exo70-Antikörper immungefärbt. **A)** Der Pearson's Koeffizient wurde wie unter 5.5.5 beschrieben quantifiziert. Jeder Punkt stellt den Messwert von einer Zelle dar. Die horizontalen Linien zeigen den Mittelwert von 30 Zellen, die pro Kondition quantifiziert wurden. Werte über der roten gestrichelten Linie zeigen eine signifikante Kolokalisation an [Zinchuk und Zinchuk 2008]. **B)** Repräsentative immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Pearson Quantifizierung sind dargestellt. Die Einzelkanäle, die im Überlagerungsbild angezeigten weißen Quadrat, wurden 6-fach vergrößert unter dem jeweiligen Überlagerungsbild dargestellt. Die weißen Pfeile zeigen kolokalisierende Vesikel an. Maßstab: 10 μm . **C)** HUVEC, die die WT- bzw. konstitutiv-aktive Mutante von GFP-Rab11 (Rab11-Q70L) exprimieren, wurden mit Exo70 immungefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Quantifizierung des Vesikel-Durchmessers erfolgte mit ImageJ. Die Balken stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung von 1000 Vesikeln aus zwei unabhängigen Experimenten dar. **D)** Repräsentative Aufnahmen von C) sind dargestellt. Im Überlagerungsbild sind kolokalisierende Strukturen mit einer gestrichelten Linie markiert. Maßstab: 1 μm .

Zur Überprüfung, ob Exocyst-haltige Strukturen mit *recycling endosomes* interagieren, wurde die Regulation der *recycling endosomes* modifiziert. Durch die Arbeit von Lock und Stow wurde bekannt, dass die Überexpression von Rab11 oder seiner konstitutiv-aktiven Mutante zur Störung des Transports von *recycling endosomes* zur Plasmamembran führt und dadurch vergrößerte *recycling vesicles* akkumulieren [Lock und Stow 2005]. So zeigte sich nach Expression von GFP-Rab11-Q70L in HUVEC eine Vergrößerung des Durchmessers von Rab11-positiven Vesikeln, die mit Exo70 kolokalisieren (Abb. 2.7 C + D).

Die vermutete Interaktion von Exocyst-Proteinen und *recycling endosomes* mit Partikelhaltigen Phagosomen wurde anschließend biochemisch und mikroskopisch überprüft. Hierzu wurden Polystyrol-haltige Phagosomen, wie unter 5.3.8 beschrieben, aufgereinigt und mittels Immunblot-Experimenten mit angegebenen Antikörpern analysiert. Die Aufreinigung zeigte eine starke Assoziation von *recycling endosomes* und Exocyst-Proteinen mit späten Phagosomen und Phagolysosomen (Abb. 2.8 A). Die Ergebnisse wurden mittels konfokaler Mikroskopie bestätigt. Exo70 kolokalisierte mit den typischen *recycling endosomes* Markern GFP-TfR und GFP-Rab11 an FnBPA-*S. carnosus*-haltigen Phagosomen (Abb. 2.8 B). Die kolokalisierenden Vesikel wurden in Abb. 2.8 B mit einem Pfeilspitzen markiert. Die Quantifizierung zeigte, dass $96 \pm 3\%$ der Exo70-positiven Vesikel, die mit dem späten Phagosom interagierten mit GFP-Rab11 überlagerten (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 3$; 200 Phagosomen wurden quantifiziert).

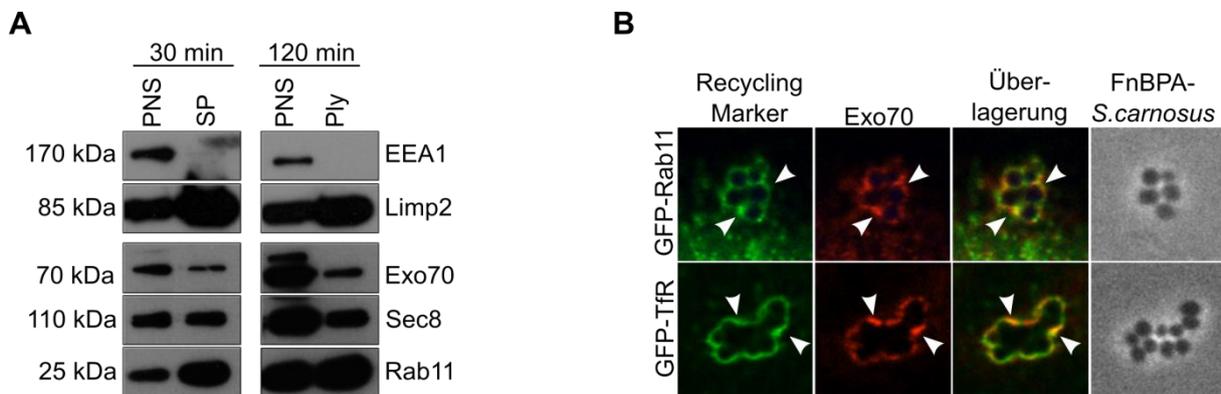


Abb. 2.8 Exocyst kolokalisiert mit *recycling endosomes* am Phagosom

A) Zur Isolation von späten Phagosomen und Phagolysosomen wurden *Ea.hy926* für 30 min bzw. 120 min mit $1\ \mu\text{m}$ Invasin-beschichteten Kügelchen inkubiert und, wie unter 6.3.8 beschrieben, mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Gleiche Proteinmengen ($5\ \mu\text{g}/\text{Spur}$) des *post nuclear supernatant* (PNS) und der phagosomalen Fraktionen von späten Phagosomen (SP) bzw. Phagolysosomen (Ply) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach anschließender Immunblotanalysen mit angegebenen spezifischen Antikörpern analysiert. **B)** HUVEC wurden mit GFP-TfR und GFP-Rab11 transfiziert, mit FnBPA-*S. carnosus* für 30 min infiziert und mit Exo70-Antikörper immungefärbt. Repräsentative Bilder sind aufgeführt. Kolokalisierende Strukturen wurden mit weißen Pfeilspitzen markiert. Maßstab: $2,5\ \mu\text{m}$.

Die Lokalisation von Exocyst und *recycling endosomes* an Phagosomen in Endothelzellen wurde auch in der Zelllinie HBMEC (*human brain microvascular endothelial cells*) aus mikrovaskulärem Gehirngewebe bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Zur besseren Visualisierung der Lokalisation von Exocyst und *recycling endosomes* am Phagosom wurden hochauflösende 3D-mikroskopische Aufnahmen angefertigt. Hierzu wurde 3D-SIM (*structured illumination microscopy*) angewendet, dass laut Herstellerangaben eine laterale Auflösung von $120 \pm 5\ \text{nm}$ und eine axiale Auflösung von $340 \pm 10\ \text{nm}$ erzielt

(GE Healthcare, LifeScience). Interessanterweise war nicht das komplette 3 μm Phagosom mit Exo70 und GFP-TfR bedeckt sondern zeigte distinkte, Ring-ähnliche Strukturen, die sich axial auf Mitte des Phagosoms befanden (Abb. 2.9, weiße ausgefüllte Pfeile). Der Überlagerungskanal zeigte, dass Exo70 und GFP-TfR an ihrer Kontaktstelle kolokalisieren aber auch freie GFP-TfR und Exo70-Strukturen zu finden sind.

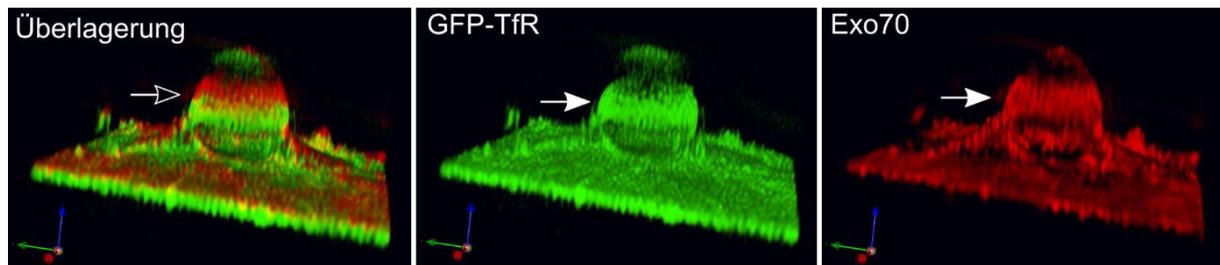


Abb. 2.9 3D-Rekonstruktion von Exo70 und TfR am Phagosom

Ea.hy926, die stabil TfR-pH exprimieren, wurden für 30 min mit 3 μm Invasin-beschichteten Partikeln inkubiert und mit GFP- und Exo70-Antikörper immungefärbt. Hochauflösende fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mittels SIM (*structured illumination* Mikroskopie) am DeltaVision OMX 4 (GE Healthcare, LifeScience, Buckinghamshire, UK) angefertigt. Die 3D-Rekonstruktion erfolgte in Volocity 6. Die weißen ausgefüllten Pfeile kennzeichnen ringähnliche Strukturen auf mittlerer Höhe des Phagosoms. Der nicht-ausgefüllte Pfeil im Überlagerungsbild zeigt die konzentrierte Kolokalisierung zwischen TfR und Exo70 an.

Nach den Kolokalisationsanalysen stellte sich die Frage, ob *recycling endosomes* und Exocyst nur kurzzeitig am Phagosomen überlagern, oder ob diese die gleichen Rekrutierungswege besitzen. Hierzu wurden Photokonvertierungsexperimente durchgeführt (Abb. 2.10 A). HUVEC wurden dazu mit dem Fusionsprotein pKaede-Sec10 transfiziert, mit 3 μm Invasin-beschichteten Kügelchen inkubiert und lebendzellmikroskopisch analysiert. Nach UV-Bestrahlung verschiebt sich die Kaede-Fluoreszenz von grün ($\lambda_{\text{ex/em}} = 508 \text{ nm}/518 \text{ nm}$) nach rot ($\lambda_{\text{ex/em}} = 572 \text{ nm}/580 \text{ nm}$) [Ando *et al.* 2002]. Das sogenannte Rab11-positive *perinuclear recycling compartment* der Zellen wurde markiert und mit einem 405 nm Laser konvertiert (Abb. 2.10 C). Die Rekrutierung von roten/ konvertierten Sec10-Vesikeln zum Phagosomen wurde mit weißen Pfeilspitzen gekennzeichnet und zeigt den direkten Transport von Exocyst vom *recycling compartment* zum Phagosom. Erste Exocyst-haltige Vesikel erreichten bereits 72 s nach der Konvertierung der perinukleären Region die Phagosomen (Abb. 2.10 D-G). Diese Experimente beweisen, dass der Exocyst direkt vom endosomalen *recycling compartment* zum Phagosom transportiert wurde. Interessanterweise wurden Exocyst und *recycling endosomes* zusätzlich mit gleicher Dynamik zum Phagosom transportiert. So verdeutlicht die Zeitkurve in Abb. 2.10 I eine biphasische Kinetik für Exo70 und GFP-Rab11.

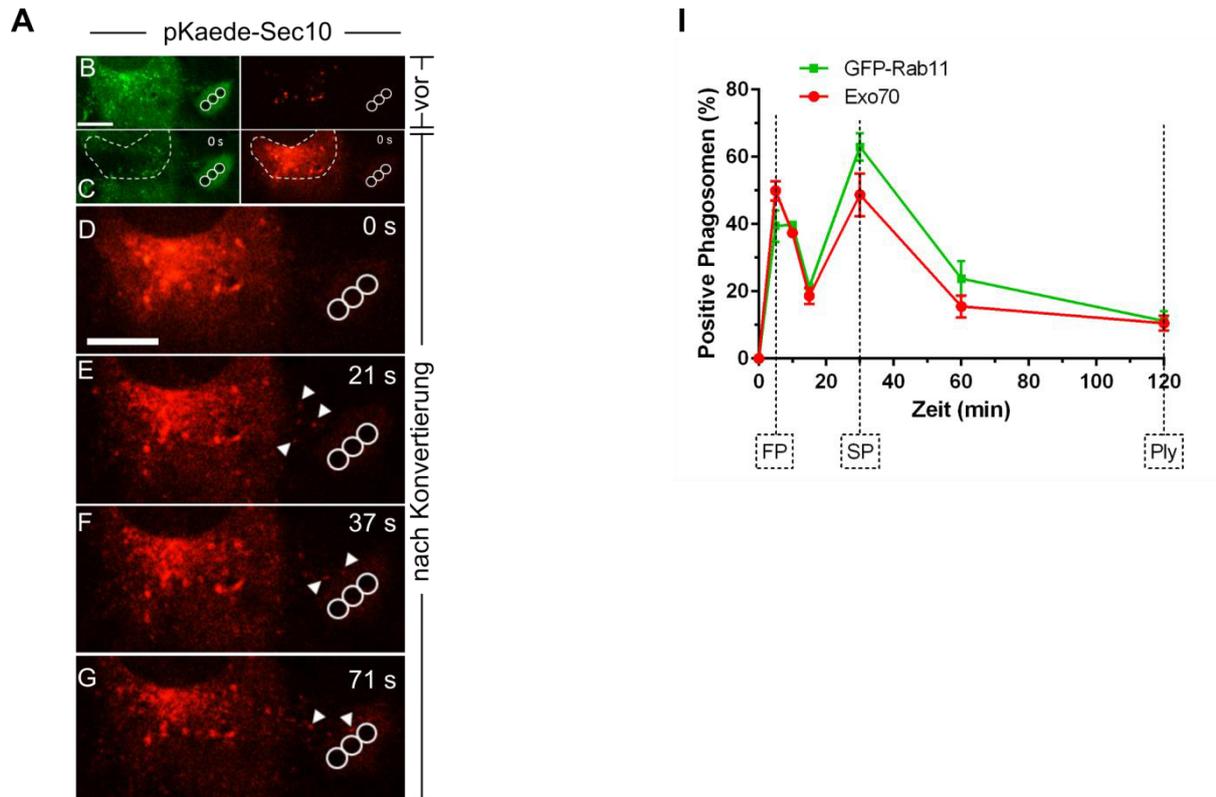


Abb. 2.10 Ko-Rekrutierung von Exocyst und recycling endosomes zum Phagosom

A – G) HUVEC wurden mit dem photokonvertierbaren Fusionsprotein pKaede-Sec10 transfiziert, mit 3 μm Invasin-beschichteten Kügelchen inkubiert und lebendzellmikroskopisch analysiert. **B)** Vor der Konvertierung war das Fluoreszenzsignal nur im grünen Kanal zu detektieren. **C)** Nach Bestrahlung der perinukleären Region (gestrichelter Bereich) mit einem 405 nm Laser findet die Konvertierung statt, wodurch die rote Fluoreszenz aktiviert wird. **D – G)** Der konvertierte Bereich wird mit 2-facher Vergrößerung über die Zeit dargestellt. Die Rekrutierung von konvertierten Vesikeln zu den Phagosomen (Kreise) ist mit weißen Pfeilspitzen gekennzeichnet. Maßstab: 10 μm . **I)** GFP-Rab11 exprimierende HUVEC wurden mit Exo70 immungefärbt und 3 μm Invasin-beschichteten Kügelchen inkubiert. Die Rekrutierung der Proteine zum Phagosom wurde wie unter 5.5.4 beschrieben durchgeführt. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens 200 Phagosomen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Während die erste Rekrutierungsphase mit der Akkumulation von frühen Endosomen einhergeht, ist die zweite Phase in die Reifung der späten Phagosomen einzuordnen. Dieses biphasische Verhalten wurde zuvor bereits nach Lebendzellmikroskopie von GFP-Exo70 und YFP-Sec10 beobachtet (siehe Abb. 2.2 B) und konnte auch für dsRed-Rab11 beobachtet werden (Video nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte anhand der aufgeführten Experimente gezeigt werden, dass die Exocyst-haltigen Vesikel, die mit dem Phagosom interagieren *recycling endocytic vesicles* sind. Im folgenden Abschnitt wurde überprüft, welche Konsequenzen die Interaktion für die Phagosomenreifung hat.

2.5 Einfluss des Exocysten auf die Reifung von Phagosomen in Endothelzellen

Während der Phagosomenreifung fusionieren und interagieren viele zelluläre Proteine und Membrankompartimente mit dem Phagosom. Unter anderem Vesikel die Rab5, Rab7 oder Lamp1 tragen. Durch die Lokalisation dieser Markerproteine kann das Reifestadium von Phagosomen bestimmt werden [Flannagan *et al.* 2009]. Zur Verifizierung des Exocyst-Einflusses auf die Phagosomenreifung wurde die Lokalisation von Rab5, Rab7 und Lamp1 am Phagosom nach *knockdown* von Exocyst-Proteinen untersucht (Abb. 2.11 A - E). Je zwei verschiedene siRNAs gegen Sec8 und Exo70 oder Kontroll siRNA wurden in HUVEC transfiziert und der prozentuale Anteil von Phagosomen positiv für Rab5, Rab7 und Lamp1 wurden ausgewertet. Es konnte eine minimale, jedoch nicht signifikante Reduktion von Rab5-positiven Phagosomen nach Exocyst *knockdown* detektiert werden (Abb. 2.11 A). Der Anteil von Phagosomen an denen Rab7 lokalisiert war, wurde durch *knockdown* von Exocyst jedoch nicht verändert (Abb. 2.11 B). Dagegen zeigte sich eine leichte aber signifikante Verminderung der Lokalisation von Lamp1 an LysoTracker-positiven Phagolysosomen (Abb. 2.11 C). Die Daten zeigen einen Einfluss des Exocysten auf die Phagosomenreifung der sich signifikant auf den Reifungsgrad von Phagolysosomen in Endothelzellen auswirkt.

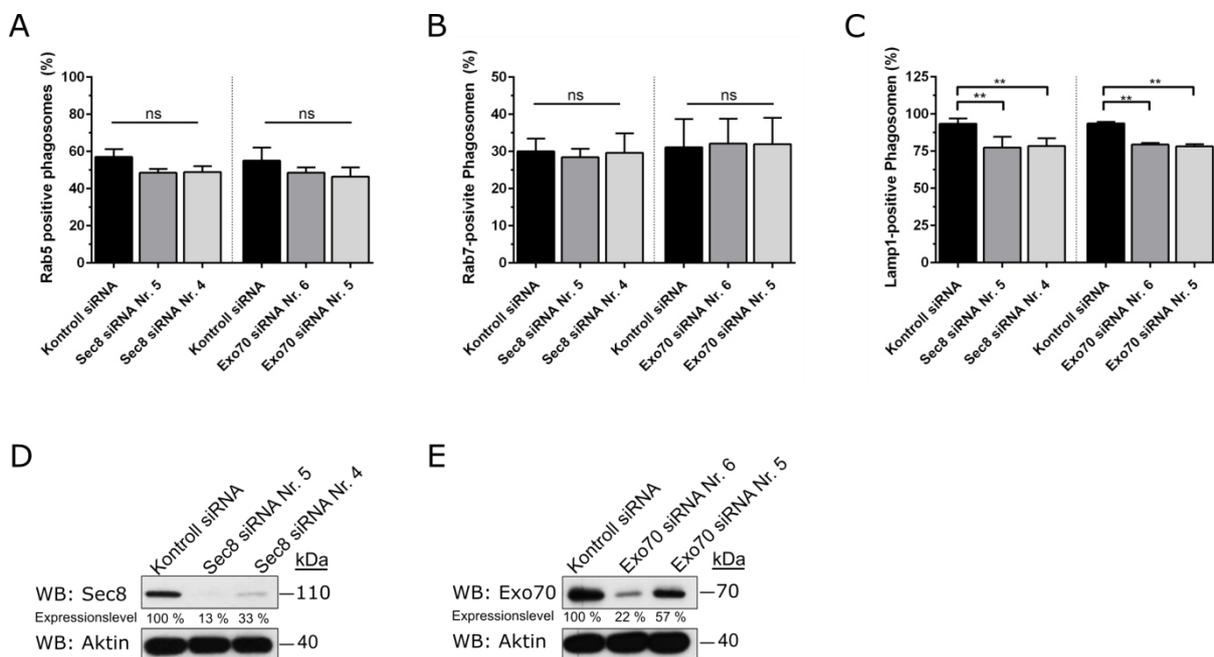


Abb. 2.11 Der *knockdown* von Exocyst beeinträchtigt die Reifung von Phagolysosomen mit in Endothelzellen

A - C HUVEC wurden mit Kontroll siRNA sowie siRNA gegen Sec8 (siRNA Nr. 5 und 4) und Exo70 (siRNA Nr. 6 und 5) transfiziert und mit 3 μ m Invasin-beschichteten Kügelchen für 5 min, 30 min und 120 min inkubiert. Die Zellen wurden für **(A)** Rab5, **(B)** Rab7 und **(C)** Lamp1, in LysoTracker beladenen Zellen immungefärbt und der prozentuale Anteil für den entsprechenden Marker positiver Phagosomen bestimmt. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm Standardabweichung von 2 bis 3 unabhängigen Experimenten. **p < 0,01. **D + E** Repräsentative Western Blots der *knockdown* Effizienzen sind dargestellt. Aktin diente als Ladekontrolle.

Interessanterweise führte die Störung des Exocysten zur starken Verminderung der Assoziation von *recycling endosomes* mit den Phagosomen (Abb. 2.12). So wurden nach *knockdown* von Sec8 und Exo70 50 % weniger Rab11-positive Phagosomen im Vergleich zu den Kontrollbedingungen detektiert.

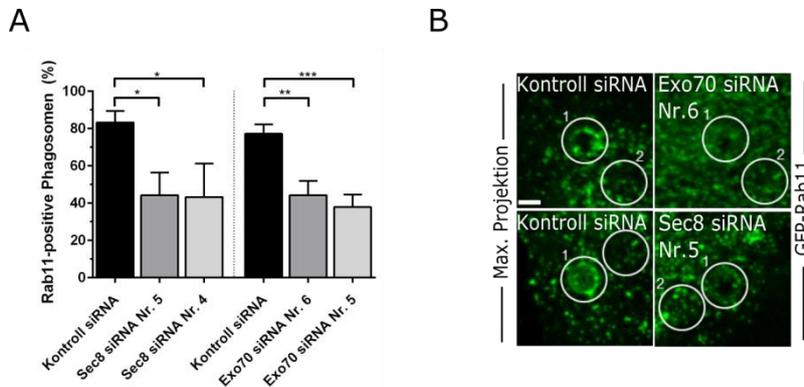


Abb. 2.12 Der *knockdown* von Exocysten beeinträchtigt die Rekrutierung von *recycling endosomes* zum Phagosom

A-C) HUVEC wurden mit Kontroll siRNA sowie siRNA für Sec8 (siRNA Nr. 5 und 4) und Exo70 (siRNA Nr. 6 und 5) sowie mit einem GFP-Rab11 Plasmid transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit 3 μ m Invasin-beschichteten Kügelchen für 30 min inkubiert. Der prozentuale Anteil GFP-Rab11-positiver Phagosomen wurde quantifiziert. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. **B)** Repräsentative Immunfluoreszenzbilder der maximalen Projektion aller Ebenen der GFP-Rab11 Akkumulation am Phagosom in Kontroll siRNA sowie siRNA für Exo70 und Sec8 behandelten Zellen. Die Kreise (6 μ m Durchmesser) zeigen die Regionen um das Phagosom (1) sowie Kontrollbereiche ohne Phagosom (2). Maßstab: 2,5 μ m.

Das reziproke Experiment, bei dem Rab11 mittels siRNA herunterreguliert wurde, zeigte eine verringerte Rekrutierung von Sec15 zum Phagosom (Abb. 2.13). Nach siRNA-vermitteltem *knockdown* von Rab11 ist ca. 25 % weniger Sec15 an den Phagosomen detektierbar. Repräsentative Western Blot-Ergebnisse des *knockdown* sind in Abb. 2.13 aufgeführt. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich Exocyst und *recycling endosomes* gegenseitig regulieren und ihr Transport zum Phagosom voneinander abhängt.

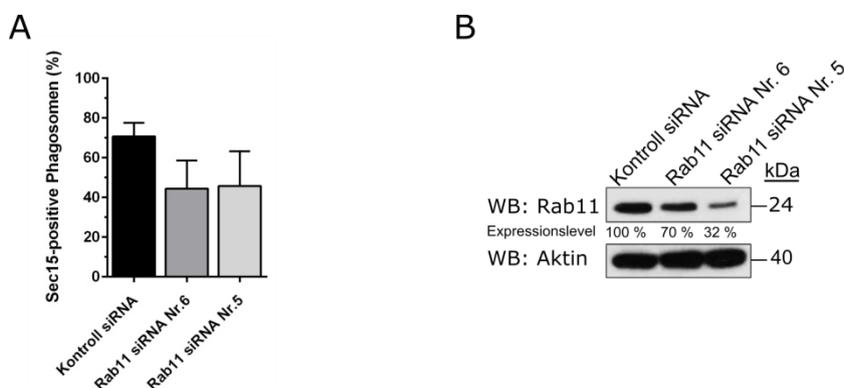


Abb. 2.13 Verringerte Assoziation von Exocyst mit späten Phagosomen nach Rab11 *knockdown*

A+B) HUVEC wurden mit Kontroll siRNA bzw. siRNA für Rab11a (Nr. 6 und 5) transfiziert und für 30 min mit 3 μ m Invasin-beschichteten Partikeln inkubiert. Nach Immunfärbung wurde der prozentuale Anteil Sec15-positiver Phagosomen bestimmt. Jeder Balken stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dar. **B)** Repräsentativer Western Blot zur Kontrolle der *knockdown* Effizienz.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Exocyst-Proteinen wahrscheinlich durch Störung der Interaktion von *recycling endosomes* mit dem Phagosom zur veränderten Phagolysosomen-Reifung führt.

2.6 **Abhängigkeit der phagosomalen Ansäuerung von der Rekrutierung von Exocyst und *recycling endosomes* zum Phagosom**

Eine starke Ansäuerung (pH 4 - 5) wird oft als Alleinstellungsmerkmal eines vollständig gereiften Phagosoms angesehen [Kinchen und Ravichandran 2008]. Im folgenden Abschnitt wurde daher die Rolle von Exocyst und *recycling endosomes* bei der Ansäuerung von Phagosomen charakterisiert. Zur lebendzellmikroskopischen Analyse der Ansäuerung wurde der Farbstoff pHrodo verwendet, welcher ein Rhodamin-Grundgerüst besitzt und ein pH-abhängiges Emissionsspektrum zeigt. So ist er im neutralen Bereich nicht-fluoreszierend aber seine Fluoreszenz steigt erheblich mit zunehmender Ansäuerung der Umgebung. HUVEC wurden daher mit pHrodo-Dextran für 15 min vorinkubiert und nach Zugabe von 3 μ m Invasin-beschichteten Partikeln lebendzellmikroskopisch analysiert. Der Fluoreszenzanstieg der Phagosomen wurde anschließend über die Zeit verfolgt. Die repräsentativen Bilder in Abb. 2.14 A zeigen drei unterschiedliche Stadien. Während Partikel (3) extrazellulär vorlag und kein Fluoreszenzsignal während der videomikroskopischen Aufzeichnung zeigte, war Kügelchen (2) bereits internalisiert, vollständig angesäuert und zeigte die maximale Fluoreszenzintensität. Im Gegensatz dazu zeigte Kügelchen (1) einen Intensitätsanstieg von pHrodo über die Zeit, der auf die Ansäuerung und somit Reifung des Phagosoms zurückzuführen ist (Abb. 2.14 A). Die Quantifizierung der pHrodo-Intensität in Phagosomen aus Abb. 2.14 A zeigte dabei einen linearen Anstieg nach 12 min.

Im Folgenden wurde die zeitliche Relation von Ansäuerung und Exocyst-Rekrutierung in Phagosomen untersucht. Hierzu wurden HUVEC, die YFP-Sec10 exprimierten, mit pHrodo-Dextran markiert, mit 3 μ m Invasin-beschichteten Kügelchen inkubiert und videomikroskopisch analysiert. Die repräsentativen Aufnahmen in Abb. 2.14 C zeigten eine dynamische Rekrutierung von YFP-Sec10 zum kontinuierlich ansäuernenden Phagosom. Besonders häufig war die Interaktion von Sec10 mit dem Phagosom in den ersten 10 min. Im Laufe der Intensitätssteigerung von pHrodo (10 min – 20 min) kam es zur Akkumulation von Sec10-Vesikeln, die scheinbar mit der phagosomalen Membran fusionierten.

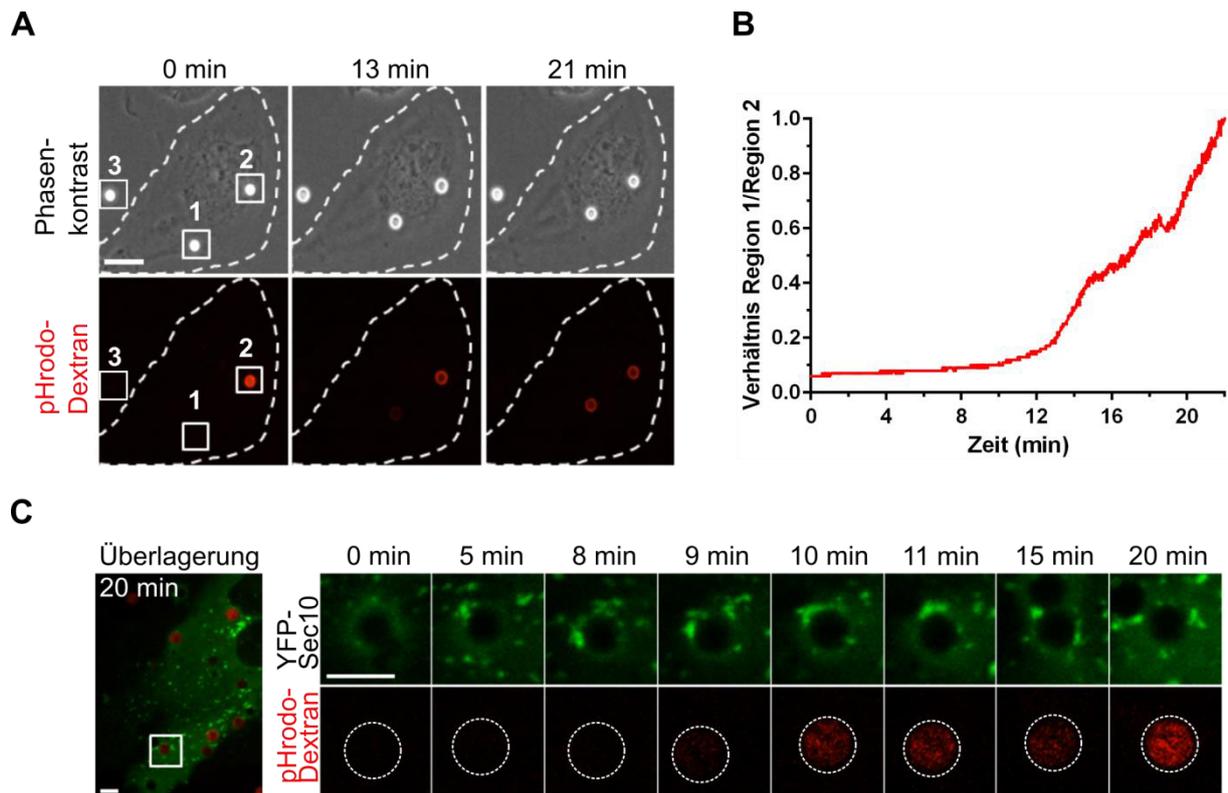


Abb. 2.14 **Rekrutierung von Exocyst zum Phagosom induziert Ansäuerung**

A) HUVEC wurden mit pHrodo-Dextran beladen und nach Inkubation mit 3 μm Invasin-beschichteten Kügelchen mittels *spinning disc* Mikroskopie analysiert. Einzelbilder des Videos sind abgebildet. Die Quadrate markieren ein frühes, nicht-angesäuertes Phagosom (1), ein vollständig angesäuertes Phagosom (2) und ein extrazelluläres Kügelchen (3) zum Zeitpunkt 0 min. Während die Fluoreszenzintensität von (1) im Verlauf der Reifung steigt, zeigt (2) eine sinkende Intensität, die durch *photobleaching* induziert wurde. Maßstab: 10 μm . **B)** Graphische Darstellung der Ansäuerung von pHrodo-Dextran beladenen Phagosomen. Das Verhältnis der Intensität von Region (1) und Region (2) aus A sind dargestellt. **C)** HUVEC wurden mit einem YFP-Sec10 Plasmid transfiziert und mit pHrodo-Dextran beladen. Nach Zugabe von 3 μm Invasin-beschichteten Partikeln wurde die Ansäuerung mittels *spinning disc* Mikroskopie verfolgt. Einzelbilder des weißen Quadrats im Überlagerungsbild wurden 3,7-fach vergrößert über die Zeit dargestellt. Der gestrichelte Kreis markiert das Phagosom. Maßstab: 5 μm .

Zur Untersuchung, ob die Rekrutierung von Exocyst-Komponenten zum Phagosom eine Bedeutung für die Ansäuerung des Kompartiments hat, wurden *knockdown* Experimente durchgeführt. Hierzu wurden HUVEC mit siRNA für Exocysten transfiziert und mit pHrodo-Dextran, wie unter 5.5.6 beschrieben, beladen und anschließend mittels *spinning disc* Mikroskopie analysiert. Der Zeitverlauf von Kontroll siRNA behandelten Zellen in Abb. 2.15 A zeigt einen exponentiellen Kurvenverlauf mit einer Sättigungsgrenze, bei der vermutlich die maximale Ansäuerung der Lysosomen erreicht ist. Der exponentielle Anstieg der pHrodo-Fluoreszenz war zwischen 20 – 50 min nach Internalisierung der Kügelchen zu finden. Dieser Zeitraum koinzidiert mit der Reifung von späten Phagosomen (SP), wie es aus dem Rekrutierungsanalysen in Abb. 2.3 hervorgeht. Die Behandlung von HUVEC mit siRNA für Sec8, Exo70 oder Rab11 verringerte den Anstieg der pHrodo-Fluoreszenz deutlich (Abb. 2.15 A-C). die scheinbare Sättigung der pHrodo-Fluoreszenz wurde außerdem deutlich früher erreicht. So betrug die maximale pHrodo-Intensität in mit siRNA für Sec8-, Exo70-

oder Rab11 transfizierten HUVEC in 1 h „alten“ Phagosomen nur 30 – 40 % des Wertes in Kontrollzellen (Abb. 2.15 B). Um einen verminderten Transport von pHrodo-Dextran zum Phagosom als Ursache für diese Effekte auszuschließen, wurde eine *in situ* Kalibrierung, wie unter 5.5.6 beschrieben, durchgeführt. Dabei wurde der intra- und extrazelluläre pH-Wert auf 4,0 eingestellt und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Phagosomen gemessen. Die Messdaten zeigen, dass unter diesen Umständen alle Phagosomen vergleichbare pHrodo-Intensitäten erreichten und somit gleiche Mengen von pHrodo in den Phagosomen enthalten war (Abb. 2.15).

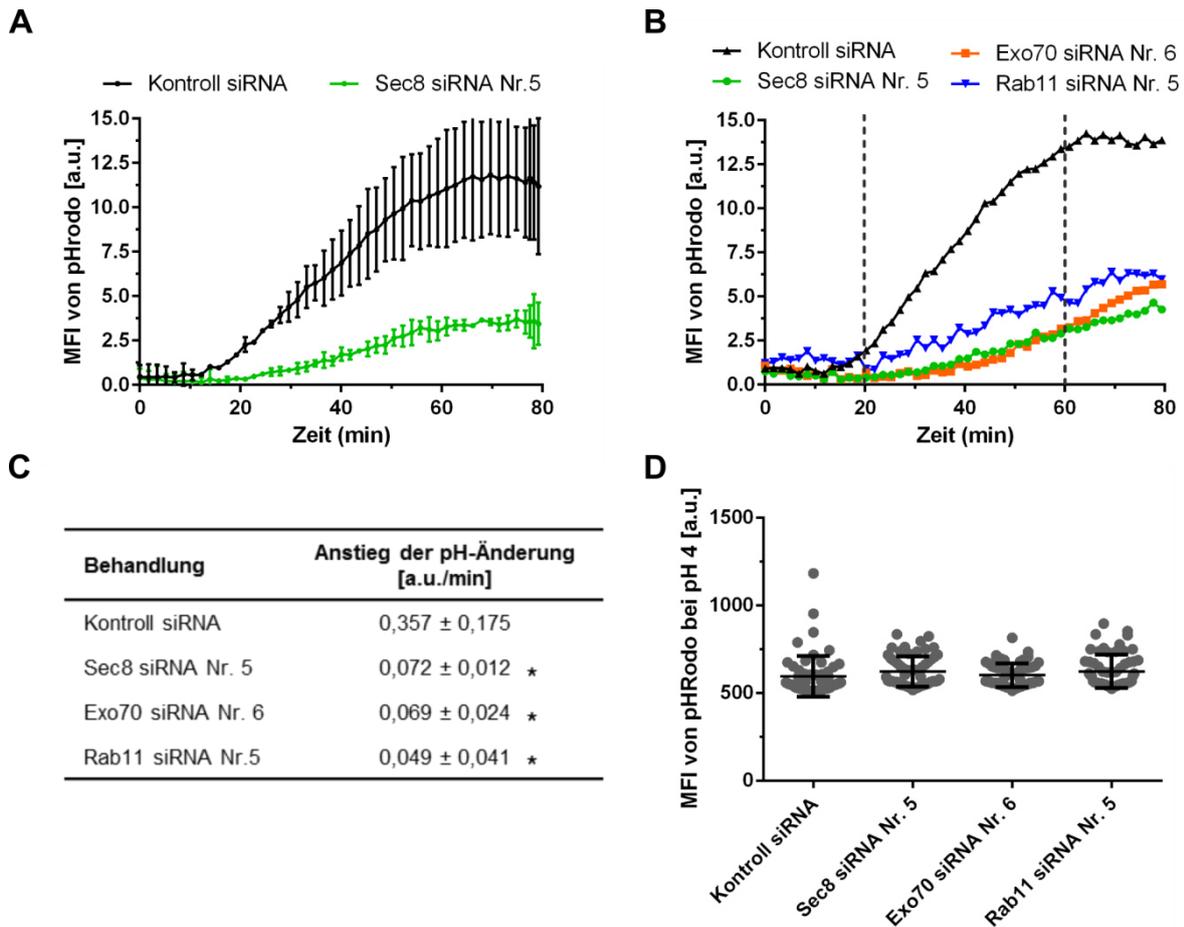


Abb. 2.15 Der knockdown von Exocyst und Rab11 beeinträchtigt die Ansäuerung von Phagosomen in Endothelzellen

A-C) HUVEC wurden mit Kontroll siRNA und siRNA für Sec8 (Nr. 5), Exo70 (Nr. 6) oder Rab11 (Nr.5) transfiziert. Die Zellen wurden nach Beladung mit pHrodo-Dextran mit 3 µm Invasin-beschichteten Kügelchen versetzt und für 80 min mikroskopiert. Für jede Behandlung wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von pHrodo von etwa 150 Zellen mit ca. 700 Phagosomen aus einem mikroskopischen Feld eines 20x-fachen Objektiv bestimmt. **A)** Zeitverlauf der Intensität von pHrodo in Kontroll- und Sec8 siRNA Nr. 5 transfizierten Zellen. Jeder Punkt stellt den Mittelwert ± Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten dar. **B)** Intensitätsverlauf von pHrodo in Kontroll siRNA und siRNA für Sec8, Exo70 und Rab11 transfizierten Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Die gestrichelten Linien begrenzen den Bereich der pH-Änderung, der für die lineare Regression verwendet wurde. **C)** Der Anstieg der pH-Änderung zwischen 20 – 60 min wurde aus den Fluoreszenzintensitätskurven wie unter (B) dargestellt mittels linearer Regression ermittelt. Die Daten zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontroll siRNA. **D)** Zur Verifizierung der Menge an pHrodo in Kontroll und siRNA behandelten Zellen wurde eine *in situ* Kalibrierung bei pH 4 durchgeführt (siehe 5.5.6). Die Daten repräsentierenden Mittelwert ± Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten. Ein Punkt repräsentiert die Intensitätsmessung eines Phagosoms.

Zusammenfassend ließ sich anhand der pHrodo-Experimente zeigen, dass Exocyst und Rab11 entscheidende Faktoren bei der Phagosomen-Ansäuerung sind. Die anderen Ergebnisse in dieser und anderen Arbeiten lassen vermuten, dass Exocyst die Interaktion von Rab11-positiven *recycling endosomes* mit dem reifenden Phagosom vermittelt und dies für die Aspekte der Phagosomenreifung wie die Ansäuerung essentiell ist.

2.7 Exocyst und *recycling endosomes* sind für den bakteriellen Abbau entscheidend

Ansäuerung ist eine der wichtigsten Schritte der Phagosomenreifung, da er viele Folgeaktion initiiert. So erlangen beispielsweise Cathepsine erst im sauren pH-Bereich ihre volle Funktionsfähigkeit und ermöglichen den Abbau phagozytierter Partikel im Phagosom [Lennon-Dumenil *et al.* 2002]. Im folgenden Abschnitt wurde daher die Abbau-/Eliminierungsleistung der Endothelzellen ermittelt. Hierzu wurden HUVEC für 30 min mit FnBPA-*S. carnosus* infiziert und anschließend zwischen 2 – 24 h in Gentamicin-haltigem Medium bei 37°C inkubiert. Da das Aminoglykosidantibiotikum Gentamicin nicht die Zellmembran überwinden kann, werden dadurch nur extrazelluläre Bakterien durch Inhibierung der Proteinbiosynthese abgetötet, bereits internalisierte Staphylokokken werden dagegen weiter intrazellulär prozessiert. Wie in Abb. 2.16 A zu sehen ist, wurden in Kontroll siRNA-transfizierten Zellen 4 h nach der Infektion noch 50 % und 24 h nach der Infektion nur noch ca. 10 % der Bakterien detektiert. Dies zeigt die hohe bakterizide Kapazität der Endothelzellen. Im Vergleich dazu konnten in Zellen mit Exocyst *knockdown* 4 h nach Infektion noch ca. 75 – 80 % intrazelluläre Bakterien nachgewiesen werden (Abb. 2.16 A+B). Bei Sec8-Depletion konnten nach 24 h Inkubationszeit durchschnittlich noch 46 % der Bakterien detektiert werden während nach Depletion von Exo70 noch 26 % der intrazellulären Bakterien vorlagen. Diese Ergebnisse zeigen die Bedeutung des Exocyst-Komplexes für den Abbau/ die Eliminierung phagozytierter Staphylokokken.

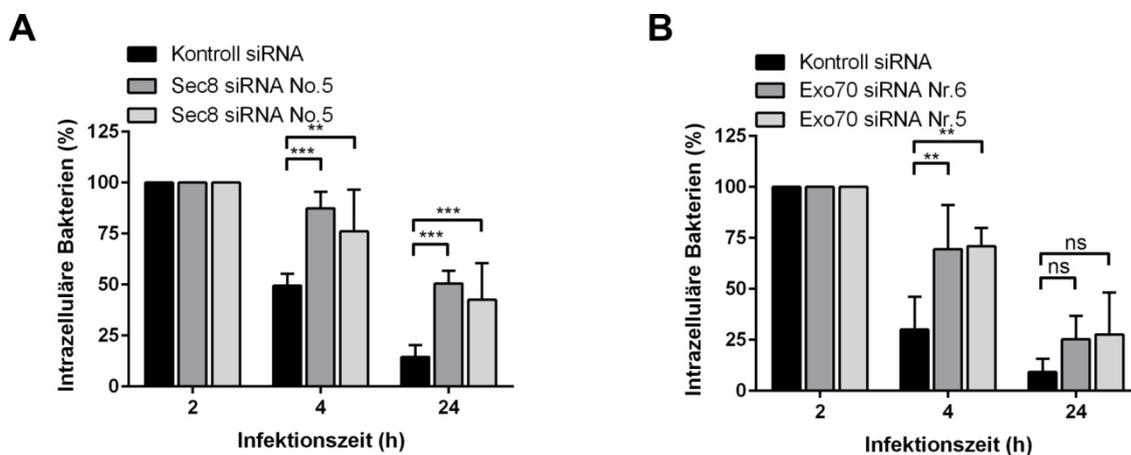


Abb. 2.16 *Knockdown* von Sec8 und Exo70 reduzieren deutlich den bakteriellen Abbau

A + B) HUVEC wurden mit Kontroll siRNA und siRNA gegen Sec8 (Nr. 5 und Nr. 4) und Exo70 (Nr. 6 und Nr. 5) transfiziert. Die Zellen wurden mit einem Bakterien-Zell-Verhältnis von 100:1 mit FnBPA-*S. carnosus* für 30 min infiziert. Extrazelluläre Bakterien wurden durch Waschen entfernt und die Zellen nach Zugabe von 50 µg/ml Gentamicin bis zu 2 h, 4 h bzw. 24 h bei 37°C inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurde diese auf Agarplatten ausgestrichen und dadurch die Zahl lebender intrazellulärer Bakterien bestimmt. Die Anzahl intrazellulärer Bakterien wurden auf den 2 h Wert normiert, um Defekte während der Aufnahme auszuschließen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. ** < p 0,01, *** < p 0,001.

Auch die Aktivität der *recycling endosomes* ist essentiell für einen vollständigen bakteriellen Abbau. Die Inhibition von Rab11 mittels siRNA bzw. durch Überexpression der dominant-negativen Mutante Rab11-S25N beeinträchtigte den Abbau von FnBPA-*S. carnosus* deutlich. So lagen auch 24 h nach der Infektion noch 28 – 35 % der Bakterien intrazellulär vor (Abb. 2.17).

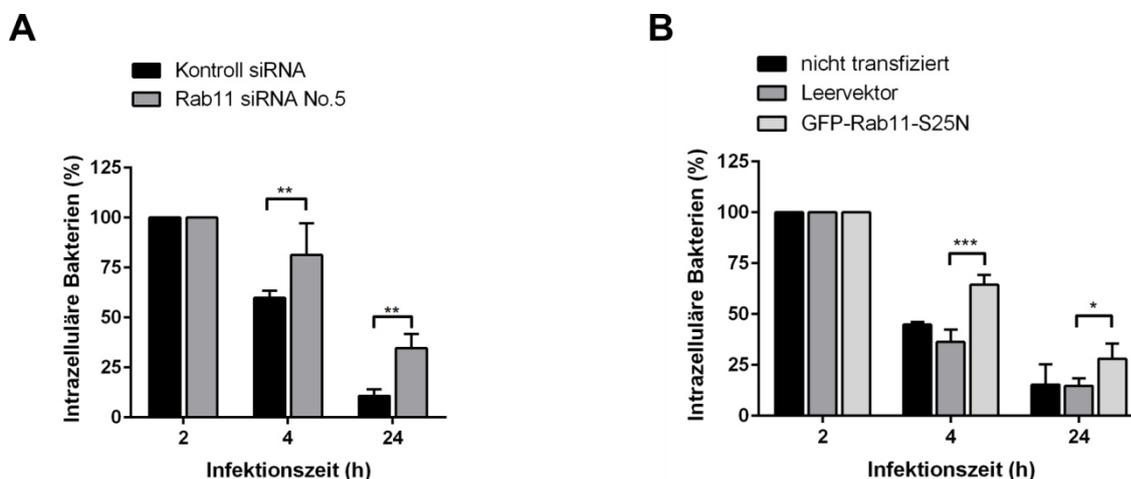


Abb. 2.17 Die Inhibition von Rab11 beeinträchtigt den bakteriellen Abbau

HUVEC wurden mit Kontroll siRNA und siRNA gegen Rab11 (**A**) bzw. mit GFP-Leervektor oder der dominant-negativen Mutante von Rab11 (**B**) transfiziert. Die Zellen wurden mit einem Bakterien-Zell-Verhältnis von 100:1 mit FnBPA-*S. carnosus* für 30 min infiziert. Extrazelluläre Bakterien wurden durch Waschen entfernt und die Zellen nach Zugabe von 50 µg/ml Gentamicin für 2 h, 4 h oder. 24 h bei 37°C inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurde diese auf Agarplatten ausgestrichen und die Zahl intrazellulärer Bakterien bestimmt. Die Anzahl intrazellulärer Bakterien wurden auf den 2 h Wert normiert, um Defekte während der Aufnahme auszuschließen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. * < p 0,05, ** < p 0,01, *** < p 0,001.

Zur Untersuchung, ob Exocyst und *recycling endosomes* die gleichen Prozesse für den bakteriellen Abbau regulieren, wurden Doppel-*knockdown* sowie Wiederherstellungsexperimente durchgeführt (Abb. 2.18). Dabei zeigte sich, dass der inhibitorische Effekt von Exo70-*knockdown* auf die bakterielle Elimination durch Überexpression der konstitutiv-aktiven Mutante von Rab11 (GFP-Rab11-Q70L) aufgehoben werden konnte (Abb. 2.18 A). Des Weiteren führte der Doppel-*knockdown* von Exo70 und Rab11 zu keiner signifikanten Steigerung des bakteriellen Abbaus im Vergleich zu jeweiligen Einzel-*knockdowns*. Diese Daten zeigen, dass Rab11 und Exocyst im selben regulatorischen Prozess agieren.

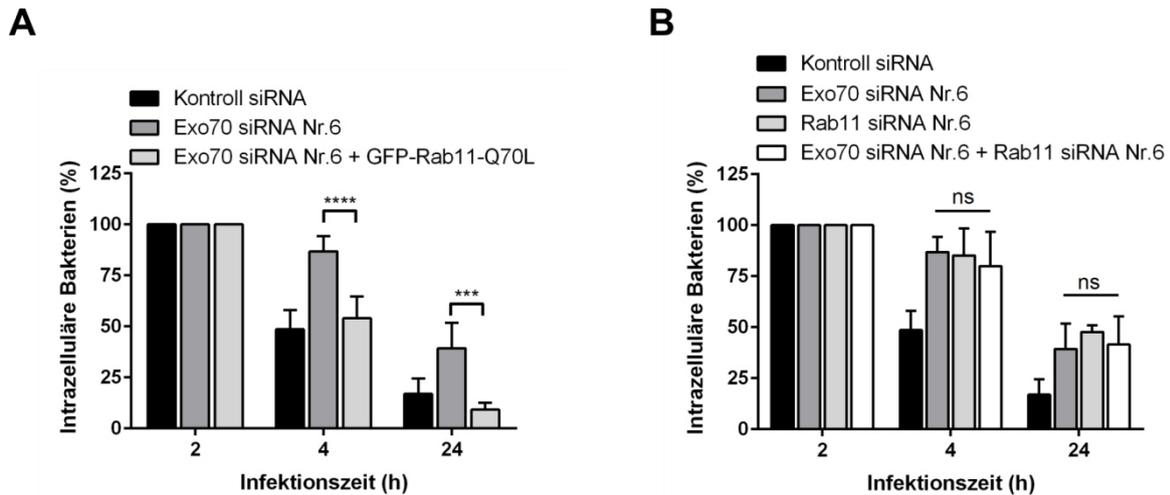


Abb. 2.18 Exo70 und Rab11 regulieren die bakterielle Degradation über gleiche Signalwege

HUVEC wurden Kontroll siRNA oder einzeln siRNA für Exo70 bzw. Rab11 transfiziert. Zusätzlich wurde eine Kombination aus Exo70 siRNA mit GFP-Rab11-Q70L (**A**) bzw. aus beiden siRNAs (**B**) in die Zellen eingebracht. Die Zellen wurden mit einem Bakterien-Zell-Verhältnis von 100:1 mit FnBPA-*S. carnosus* für 30 min infiziert. Extrazelluläre Bakterien wurden durch Waschen entfernt und die Zellen nach Zugabe von 50 µg/ml Gentamicin bis zu 2 h, 4 h bzw. 24 h bei 37°C inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurde diese ausplattiert und die Menge intrazellulärer Bakterien bestimmt. Die Anzahl intrazellulärer Bakterien wurden auf den 2 h Wert normiert, um Defekte während der Aufnahme auszuschließen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. *** < p 0,001.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass die Phagosomenreifung durch die Interaktion von *recycling endosomes* mit dem Phagosom vermittelt durch den Exocyst gesteuert wird. Diese Wechselwirkungen zwischen intrazellulären Membrankompartimenten spielen dabei eine wichtige Rolle für die Ansäuerung, die Phagolysosomen-Biogenese sowie schließlich die bakterielle Degradation im Phagolysosom.

3 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Integrin-vermittelte Internalisierung von Staphylokokken sowie mit einem invasiven Oberflächenprotein von Staphylokokken- und Yersinien beschichtete Partikel in primäre humane Endothelzellen (HUVEC) untersucht. Mittels mikroskopischer-, zell- und mikrobiologischer Methoden wurden die Prozesse der phagozytären Aufnahme, der Phagosomenreifung sowie der bakteriellen Degradation in Endothelzellen charakterisiert.

3.1 Integrin-vermittelte Internalisierung von Staphylokokken und beschichteten Polystyrol-Kügelchen in Endothelzellen

Endothelzellen kleiden als flache, dünne Zellschicht alle Blut- und Lymphgefäße aus und stellen eine wichtige Barriere zwischen dem vaskulären Raum und den umgebenden Geweben und Organen dar. Ihre kritische Lokalisierung macht sie daher zum idealen Ziel für viele Mikroorganismen, die in die Blutbahn eingedrungen sind. *S. aureus* ist ein extrazellulärer und fakultativ intrazellulärer Mikroorganismus, dessen Adhäsion und Invasion in Endothelzellen eine äußerst wichtige Rolle in der Pathogenese endovaskulärer Infektionen wie Endokarditis spielt [Lowy 1998]. Bereits in den 1980er Jahren wurde *in vivo* und *in vitro* die Interaktion von *S. aureus* mit dem Endothelgewebe gezeigt [Hamill *et al.* 1986; Vann und Proctor 1987; Vann und Proctor 1988]. Die Internalisierung wurde dabei durch die indirekte Interaktion des Fibronektin-bindenden Protein A (FnBPA) des Pathogens mit den Integrinen der Zielzelle vermittelt. Das extrazelluläre Matrixprotein Fibronektin agierte dabei als Brückenmolekül zwischen FnBPA und dem $\alpha 5\beta 1$ -Rezeptor [Sinha *et al.* 1999]. Sinha *et al.* zeigten, dass die Expression von FnBPA in nicht-pathogenen *Lactococcus lactis* zur erfolgreichen zellulären Invasion des Bakterium in „nicht-professionelle“ Phagozyten ausreichend war [Sinha *et al.* 2000]. In der vorliegenden Arbeit wurde daher FnBPA-*S. carnosus* verwendet. Dieser avirulente Staphylokokken-Stamm exprimiert FnBPA als einigies Adhäsionsmolekül auf der Oberfläche, um eine Integrin-vermittelte Aufnahme der Bakterien in primäre Endothelzellen zu erzielen. Eine 100-fach affinere Bindung zu dem $\alpha 5\beta 1$ -Integrinrezeptor wird durch das Yersinien exprimierte Adhäsionsprotein Invasin erzielt [Tran Van Nhieu und Isberg 1993]. Invasin gilt als professionelles Invasin, das Yersinien die Translokation durch spezialisierte Epithelzellen, sogenannte M-Zellen, des Dünndarms ermöglicht. Es bindet dabei direkt an die $\beta 1$ -Kette des Integrinheterodimers [Isberg *et al.* 2000]. Vaskuläre Endothelzellen (HUVEC), die in der Lage sind auch Silikonpartikel mittels Phagozytose in einem Aktin-abhängigen Mechanismus aufzunehmen [Serda *et al.* 2009], wurden in dieser Arbeit mit Polystyrol-Partikel von 3 μm Durchmesser, die mit Fusionsproteinen von GST-Invasin bzw. GST-FnBPA beschichtet waren, zur Interaktion

gebracht. Anschließend wurde eine Kinetik der Aufnahme der FnBPA- und Invasin beschichteten Partikel in die Endothelzellen erhoben. Die in Abb. 2.1 B dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Invasin-beschichtete Partikel mit einer schnelleren Kinetik internalisiert wurden, als FnBPA-beschichtete Kügelchen. Während bereits nach 10 min 70 % der Invasin-beschichteten Partikel internalisiert wurden, lagen in gleicher Zeit nur 50 % der FnBPA-beschichteten Kügelchen intrazellulär vor. Diese Werte decken sich mit publizierten Daten [Schroder *et al.* 2006], bei denen die langsamere Internalisierung der FnBPA-Kügelchen bzw. Bakterien durch eine längere Adhäsionszeit auf der Zelloberfläche erklärt wurde. Die längere Verweildauer der Bakterien auf der Zelloberfläche könnte einen Selektionsvorteil darstellen. Es befähigt möglicherweise die Staphylokokken extrazellulär zu kolonisieren und die Zellen durch unterschiedliche Toxine massiv zu schädigen [Lowy 2000]. Lebendzellmikroskopische Analysen von Invasin-beschichteten Partikeln in dieser Arbeit zeigten, dass auch Invasin die Aktin-abhängige Aufnahme über den $\alpha 5\beta 1$ -Integrinrezeptor in Endothelzellen vermittelte und die Partikel bereits nach wenigen Minuten intrazellulär vorlagen (Abb. 2.1 C). Aufgrund der effektiveren, schnelleren und absolut synchronen Internalisierung Invasin-beschichteter Partikel schienen diese optimal für die in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Untersuchung der Phagosomenreifung in Endothelzellen geeignet.

3.2 Exocyst-Proteine lokalisieren an reifenden Phagosomen

Bakterien werden nach der Invasion von Endothelzellen in Phagosomen eingeschlossen, welche dann mit Bestandteilen des endolysosomalen Signalweges interagieren, was zur bakteriellen Elimination in den so entstandenen Phagolysosomen führt [Krut *et al.* 2003; Laschke *et al.* 2005; Schroder *et al.* 2006]. Trotz ihrer hohen bakteriziden Aktivität und damit potentiell wichtigen Rolle in der Immunabwehr, sind der Ablauf der Phagosomenreifung sowie daran beteiligte Mechanismen in Endothelzellen nur unzureichend charakterisiert [Laschke *et al.* 2005; Schroder *et al.* 2006]. Erst vor kurzem wurde bei einer Proteomanalyse als neuer phagosomaler Bestandteil von Drosophila-Phagosomen der Exocyst identifiziert [Stuart *et al.* 2007]. Der Exocyst besteht aus acht Komponenten (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 und Exo84), die sowohl als Einzelproteine, Subkomplexe mehrerer Proteine und als vollständiger Oktamer funktionieren können. Der Exocyst transportiert sekretorische Vesikel zur Plasmamembran und arretiert diese dort, damit sie SNARE-abhängig fusionieren können [Boyd *et al.* 2004]. Zusätzlich zu seiner Rolle in der Exozytose wurde später die funktionelle Beteiligung des Exocysten an der Phagozytose von Yersinien, Salmonellen und Trypanosomen gezeigt [Nichols und Casanova 2010; Mohammadi und Isberg 2013; Fernandes *et al.* 2015]. Jedoch wurde die Bedeutung dieses *tethering*-Komplexes bei der Phagosomenreifung nicht näher adressiert. In dieser Arbeit wurde daher

die Rolle des Exocysten in der Phagosomenreifung von humanen Endothelzellen untersucht und charakterisiert. Mittels Immunfluoreszenz-mikroskopischer Analysen, Lebendzellmikroskopie sowie biochemischer Isolation von Phagosomen konnten die Lokalisation der Exocyst-Proteine Sec5, Sec8, Sec10, Sec15 und Exo70 an verschiedenen Reifestadien der Phagosomen gezeigt werden. Diese Daten sind konsistent mit den Ergebnissen von Stuart *et al.*, die fast alle Exocyst-Komponenten (ausgenommen Exo84) an entstehenden Phagosomen in Drosophilazellen detektieren konnten [Stuart *et al.* 2007] und sprechen für eine evolutionär konservierte Rolle des Komplexes während der Phagozytose. Zudem detektierten Stuart *et al.* Sec6 und Sec8 auch an reifenden Phagosomen. In dieser Arbeit zeigten die Exocysten-Proteine eine vesikuläre Morphologie an den Phagosomen. Dies steht auf der einen Seite im Gegensatz zu den Daten von Mohammadi *et al.*, die eine homogene, zytosolische Verteilung des Exocysten detektierten [Mohammadi und Isberg 2013]. Auf der anderen Seite stimmen die Lokalisationsergebnisse dieser Arbeit mit der Vorstellung überein, dass der Exocyst-Komplex an intrazellulären Membrankompartimenten lokalisiert ist [Boyd *et al.* 2004; Bendezu *et al.* 2012; Rivera-Molina und Toomre 2013]. So zeigten Rivera-Molina *et al.* eine vesikuläre Morphologie von Sec8 und den gleichzeitigen Transport mit Vamp2-Vesikeln zur Plasmamembran [Boyd *et al.* 2004; Bendezu *et al.* 2012; Rivera-Molina und Toomre 2013]. Auch Boyd *et al.* zeigten in Hefen die vesikuläre Ausprägung von Sec8 [Boyd *et al.* 2004]. Lebendzellmikroskopische Analysen in dieser Arbeit zeigten, dass Exocyst-haltige Endosomen in einer frühen und einer späten Reifungsphase mit dem Phagosom interagierten (Abb. 2.2). Während die frühe Phase mit der Internalisierung und dem Einschluss der Partikel in Phagosomen einherging, war die zweite Interaktionsphase mit der Rekrutierung von Rab7 zum Phagosom sowie der phagosomalen Ansäuerung verbunden. Wir nehmen an, dass der Exocyst während der frühen Phagozytose in Rezeptor- und Membrantransport involviert ist, während er in der späteren Phase die Fusion von endosomalen Vesikeln mit dem Phagosom reguliert und dadurch die Reifung steuert. In der bestehenden Literatur wurde eine funktionelle Überexpression von GFP-fusionierten Exocyst-Proteinen in humanen Zellen eher als kritisch erachtet [Matern *et al.* 2001; Mohammadi und Isberg 2013; Rivera-Molina und Toomre 2013]. Solche Fusionsproteine zeigten meist eine diffuse Lokalisierung im Zytosol und wurden möglicherweise aufgrund des Fluoreszenzproteinanhangs nicht in den Komplex integriert. Lebendzellmikroskopische Analysen dieser Arbeit zeigten jedoch eine eindeutig vesikuläre Morphologie von YFP-Sec10 und GFP-Exo70 sowie eine hohe Dynamik mit der die Proteine zum Phagosom transportiert wurden (Abb. 2.2 A, Abb. 2.6 B, Abb. 2.10 A, Abb. 2.14 C). Diese Daten werden begleitet von der Beobachtung in Hefen, wo nach Überexpression von Exo70-GFP sowohl ein Vesikel-abhängiger als auch –unabhängig Transport von Exo70-GFP zur Polarisationsregion gezeigt wurde [Boyd *et al.* 2004]. Viele Studien lassen vermuten, dass Subkomplexe aus

einzelnen Exocysten-Proteinen existieren, doch bisher fehlt der biochemische Beweis für diese Aussage, da die Isolation und Rekonstitution der Subkomplexe äußerst anspruchsvoll ist [Dong *et al.* 2005; Sivaram *et al.* 2006]. Auch im Zuge der Experimente in dieser Arbeit, war es nicht möglich die Frage zu adressieren.

3.3 Exocyst-haltige *recycling endosomes* interagieren mit Phagosomen

In dieser Arbeit wurde die Lokalisierung von Exocyst-haltigen *recycling endosomes* (RE) an Phagosomen mittels mikroskopischer Techniken und biochemischer Isolation von Phagosomen gezeigt. Die präsentierten Daten zeigen, dass 96 % der Exocyst-haltigen Vesikel, die mit dem Phagosom interagierten positiv für das RE-Markerprotein Rab11 waren. Hohe Kollokalisationskoeffizienten zwischen den RE-Markern Rab11 und Transferrin-Rezeptor (TfR) sowie den Exocyst-Proteinen wurden auch an Staphylokokken-haltigen Phagosomen detektiert (Abb. 2.8 B). In dieser Arbeit wurde zudem mittels Photokonvertierungsexperimente der direkte Transport von Sec10-haltigen Vesikeln vom perinukleären *recycling compartment* zu Phagosomen gezeigt (Abb. 2.10). Diese Ergebnisse sind konform mit diversen Forschungsergebnissen in unterschiedlichen Zellsystemen. So assoziieren Exocyst-Komponenten während der Exozytose mit RE und sind am Transport und *recycling* von Membranen an Plasmamembranausstülpungen beteiligt [Prigent *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2004; Takahashi *et al.* 2012]. Auch Rivera-Molina *et al.* zeigten kürzlich in Endothelzellen die Lokalisation der Exocyst-Komponente Sec8 an *recycling endocytic vesicles*, die nach Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran bis zur vollständigen Ausschüttung des Vesikelinhalts in den extrazellulären Raum mit der Plasmamembran assoziiert blieben [Rivera-Molina und Toomre 2013]. Passend zur Untersuchung der Rolle des Exocysten in der Phagozytose in dieser Arbeit, wurden die direkte Interaktionen der Exocyst-Komponenten Sec10 und Sec15 mit *ADP-ribosylation factor 6* (Arf6) und Rab11 in diversen humanen Zellen gefunden, welche bereits beide im Transport von Endosomen und Membranen zum *phagocytic cup* beschrieben wurden [Bajno *et al.* 2000; Niedergang *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2004]. Während Mohammadi *et al.* zeigten, dass Rab11 bzw. TfR mit Exo70 nur an großen Partikeln (4,5 µm Durchmesser) lokalisieren [Mohammadi und Isberg 2013], wurden in dieser Arbeit kolokalisierende Strukturen von Exo70 mit TfR- und Rab11 sowohl an Partikeln mittlerer Größe (3 µm) als auch an FnBPA-*S. carnosus*-haltigen Phagosomen (1 µm Durchmesser) detektiert. Zudem wurden in dieser Arbeit die Assoziation von Rab11 und Exocyst-Proteinen an isolierten Phagosomen (1 µm Partikeldurchmesser) mittels Western Blot bestätigt. Die Daten korrelieren mit den Ergebnissen diverser Proteomanalysen, in denen Rab11 mit Partikel-haltigen Phagosomen assoziiert war [Garin *et al.* 2001; Gotthardt *et al.* 2006; Stuart *et al.* 2007; Jutras *et al.* 2008; Trost *et al.* 2009]. Des

Weiteren wurde Rab11 auch an Salmonellen-haltigen Vakuolen beschrieben [Smith *et al.* 2007]. Die phagozytische Aufnahme von Partikeln in Endothelzellen erfolgt nach dem Reißverschlussmodell, bei dem die Membran um die Partikel wächst [Peacock *et al.* 1999; Sinha *et al.* 1999; Sinha und Herrmann 2005]. Lange Zeit wurde darüber spekuliert, wie die Oberflächenvergrößerung der Plasmamembran an der Anheftungsstelle umgesetzt werden kann. Bajno *et al.* mutmaßten, dass der Exocyst-Subkomplex Sec6/Sec8, der bereits in Hefen in polarisierten Membrantransportprozessen beschrieben wurde [TerBush *et al.* 1996], in die Rekrutierung von *recycling endosomes* zur Phagozytosestelle involviert sei [Bajno *et al.* 2000]. Diese Hypothese stützt die Ergebnisse dieser Arbeit, da bei der hochauflösenden 3D-Mikroskopie distinkte, Ring-ähnliche Strukturen von TfR und Exo70 an den Phagosomen detektiert wurden (Abb. 2.9). Der Exocyst könnte an dieser Stelle als Plattform für die Interaktion von RE mit dem Phagosom agieren. Interessanterweise wurde in dieser Arbeit eine biphasische Rekrutierungskinetik von Exo70 als auch von Rab11 zum Phagosom detektiert (Abb. 2.2, Abb. 2.10 I). Während die erste Phase mit der Internalisierung sowie der frühen Reifung einherging, ist die zweite Rekrutierung der späten Reifungsphase zuzuordnen. Auch Rogers und Foster detektierten bei einer Proteomanalyse biphasische Rekrutierungen von Rab35, einem Markerprotein für *recycling endosomes*, von Lamp1 (engl. *lysosome-associated membrane protein 1*), von einigen Cathepsinen sowie den SNARE-Proteinen Syntaxin 7 und Vamp8 zu Partikel-haltigen Phagosomen [Rogers und Foster 2007]. Die Lokalisation von Rab11 an frühen Phagosomen wurde bereits beschrieben und scheint die Fusion von frühen Endosomen und Vesikeln des Golgi-Kompartiments mit dem Phagosom zu regulieren [Garin *et al.* 2001; Husebye *et al.* 2010]. Die starke Akkumulation von Rab11 an späten Phagosomen und Lysosomen wird in dieser Arbeit erstmals beschrieben und stellt möglicherweise einen weiteren Fusionsvorgang von *recycling endocytic vesicles* mit dem reifenden Phagosom dar. Dabei werden möglicherweise auch Komponenten vom Phagosom recycelt und andere Cargos bzw. Membranen zum Phagosom transportiert.

3.4 Einfluss des Exocysten auf die Reifung von Phagosomen in Endothelzellen

Rab GTPasen sind zentrale Regulatoren der dynamischen Interaktion von Phagosomen und dem intrazellulären Kompartiment [Flannagan *et al.* 2012] und definieren durch ihre An- oder Abwesenheit den Reifestatus des Phagosoms. Viele Studien zeigten, dass Rab5 essentiell für die Reifung des Phagosoms ist, da es dessen Fusion mit den frühen Endosomen reguliert [Sturgill-Koszycki *et al.* 1996; Vieira *et al.* 2003]. Die Rekrutierung und Aktivierung von Rab7 induziert anschließend die Fusion des Phagosoms mit den späten Endosomen sowie Lysosomen und geht mit dem Verlust von frühen Markerproteinen wie Rab5 einher [Vieira *et*

al. 2003]. Durch die terminale Anreicherung von Lamp1 am Phagosom wird die lysosomale Membranintegrität konserviert und das späte Phagosom vom Phagolysosom unterschieden [Eskelinen *et al.* 2003; Flannagan *et al.* 2012]. Durch die Arbeiten in Hefen ist bekannt, dass die *tethering* Komplexe CORVET (engl. *C core vacuole/ endosomes tethering complex*) und HOPS (engl. *homotypic fusion and protein sorting*) den Übergang von Rab5 zu Rab7 in humanen Endosomen und Phagosomen regulieren [Peplowska *et al.* 2007; Plemel *et al.* 2011]. In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Exocysten als *tethering* Komplex auf die Phagosomenreifung untersucht. Dabei wurde nach siRNA-vermitteltem *knockdown* von Sec8 und Exo70 kein Einfluss auf die Fusion von Rab5 und Rab7-positiven Endosomen mit dem Phagosom detektiert (Abb. 2.11 A+B). Interessanterweise zeigte sich ein Einfluss auf den Reifungsgrad der Phagolysosomen in Endothelzellen. So wurden nach *knockdown* von Sec8 und Exo70 weniger Lamp1-positive Phagolysosomen detektiert (Abb. 2.11 C).

Kürzlich veröffentlichte Daten zeigten, dass der *knockdown* von Rab11 oder Exo70 den Transport von Cargos zur Plasmamembran verzögerte [Takahashi *et al.* 2012] und implizierten die Beteiligung beider Proteine an Transportprozessen zur Plasmamembran. In dieser Arbeit wurde nach Inaktivierung der Exocyst-Komponenten Exo70 und Sec8 mittels siRNA eine verringerte Lokalisation von RE am Phagosom detektiert. Der beeinträchtigte Transport von Rab11 zum Phagosom durch *knockdown* des Exocysten suggeriert, dass der Exocyst-Komplex die Interaktion von *recycling endocytic vesicles* mit dem Phagosom kontrolliert und dadurch die Phagosomenreifung reguliert. Durch die Arbeiten von Leiva *et al.* zeigte sich, dass Rab11 eine essentielle Komponente während der Phagosomenreifung ist, indem es durch das Effektorprotein RCP (engl. *Rab-coupling protein*) das *recycling* vom Phagosom reguliert [Leiva *et al.* 2006]. Die Exocyst-Komponente Sec15 wurde bereits als direkter Effektor von Rab11 beschrieben [Zhang *et al.* 2004] und scheint auch in dem hier untersuchten System abwärts von Rab11 zu agieren. So zeigte der *knockdown* von Rab11 mittels siRNA eine geringere Assoziation von Sec15 mit Phagosomen im Vergleich mit Kontroll siRNA transfizierten Zellen (Abb. 2.13). Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Arbeit, dass ein Zusammenspiel von RE und Exocyst die Reifung des Phagosoms beeinflusst.

3.5 Abhängigkeit der phagosomalen Ansäuerung von der Rekrutierung von Exocyst und RE zum Phagosom

Während seiner Reifung werden diverse Proteine zum Phagosom transportiert, unter anderem saure Proteasen, MHC Klasse-II Moleküle und v-ATPasen. Besonders wichtig für die Funktionalität der sauren Proteasen wie Cathepsine ist ein sehr niedriger pH-Wert. Daher stellt die Ansäuerung der Phagosomen oft das Alleinstellungsmerkmal für ein funktionelles Phagosom dar [Kinchen und Ravichandran 2008]. Die Ansäuerung erfolgt dabei

in zwei Stufen. Die erste Stufe resultiert in einer geringen pH-Wert Senkung zu einer frühen Phase der Phagosomenreifung [Hackam *et al.* 1997], die allerdings nur unzureichend charakterisiert ist. Die zweite Stufe ist durch den Transport von ATP-abhängigen Protonenpumpen, sogenannten v-ATPasen, zum Phagosom gekennzeichnet [Beyenbach und Wieczorek 2006]. Die Anwesenheit von v-ATPasen in der phagosomalen Membran ist gut etabliert [Lukacs *et al.* 1990], doch der Mechanismus über den die Protonenpumpen zum Phagosom transportiert werden bleibt unklar [Sun-Wada *et al.* 2009]. Sun-Wada *et al.* zeigten, dass die v-ATPase $\alpha 3$ -Untereinheit, welche eine Komponente des späten endosomalen und lysosomalen v-ATPase-Komplexes ist, an Phagosomen lokalisierte [Sun-Wada *et al.* 2009] und von tubulären Strukturen der perinukleären Lysosomen zum Phagosom rekrutiert wurde. In dieser Arbeit wurde die Funktion der Interaktion von RE und Exocyst mit reifenden Phagosomen durch Charakterisierung der Phagosomen-Ansäuerung analysiert. Unter Verwendung des pH-sensitiven Farbstoffs, pHrodo, war die gleichzeitige Visualisierung von phagosomaler Ansäuerung und Interaktion der vesikulären Exocyst-Komponente Sec10 möglich (Abb. 2.14 C). Dabei zeigte sich, dass YFP-Sec10-positive Vesikel in hoher Frequenz zu dem ansäuernden Phagosom transportiert wurden und dass die Exocyst-Komponente an den sauren Phagosomen akkumulierte. Um eine funktionelle Beteiligung von Exocyst und RE an der Phagosomenreifung zu untersuchen, wurde daher die Phagosomen-Ansäuerung nach *knockdown* von Sec8, Exo70 und Rab11 durch Intensitätsanstieg des pHrodo-Farbstoffs bestimmt. Interessanterweise zeigte der Verlust von RE und Exocyst-Komponenten nur noch einen geringen Intensitätsanstieg von pHrodo, was auf eine beeinträchtigte Ansäuerung hinweist (Abb. 2.15 A-C). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten deshalb an, dass Exocyst und RE den Transport von v-ATPase-haltigen Vesikeln zum Phagosom vermitteln. Im Vergleich mit der Literatur wurde Rab11 bereits als Anwärter für den Transport von v-ATPasen in proximalen Tubuluszellen aus Mäusen beschrieben [Curtis und Gluck 2005]. Rab11 war primär in apikalen RE von Epithelzellen und gastrischen Belegzellen zu finden, wo es das apikale *recycling* der H^+/K^+ -ATPase regulierte. Erst kürzlich wurde die Kollokalisierung von Arf6, einem *recycling endosomes* Markerprotein, und v-ATPase in Nierenepithelzellen gezeigt [Hurtado-Lorenzo *et al.* 2006]. Die direkte Bindung von Arf6 an die c-Untereinheit der v-ATPase schien dabei *in vivo* entscheidend für den Proteintransport im endosomalen Degradationsweg zu sein. In Anbetracht der Ergebnisse von Prigent *et al.*, die eine Arf6-abhängige Regulation des post-endozytischen *recycling* durch das Effektorprotein Sec10 detektierten [Prigent *et al.* 2003], liegt die Vermutung nah, dass RE und Exocyst am Transport von v-ATPasen zum Phagosom beteiligt sein könnten. Weiterhin resultiert die Ansäuerung des Phagosoms nicht allein aus der Phago-Lysosomen-Fusion sondern scheint auch für den Reifungsprozess selbst erforderlich zu sein [Flannagan *et al.* 2012]. So zeigte die Behandlung von Zellen mit schwachen Basen

oder v-ATPase-Inhibitoren sowohl eine Inhibierung der Ansäuerung als auch Störung endosomaler Transportprozesse und sowie gestörte Phagosomenreifung [Gordon *et al.* 1980]. Diese Daten unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit bei denen weniger Lamp1-positive Phagosomen nach *knockdown* von Sec8 und Exo70 detektiert wurden und suggerieren, dass die unvollständige Ansäuerung die Rekrutierung von Lamp1 zum Phagosom beeinflusst. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Interaktion von RE und Exocyst mit dem Phagosom sowohl wichtig für die Ansäuerung als auch die Reifung ist.

3.6 Exocyst und *recycling endosomes* sind für den bakteriellen Abbau entscheidend

Unsere Daten unterstützen die Hypothese, dass Phagosomen zur gleichen Zeit mit Komponenten des klassischen endosomal/ lysosomen Transportweges und dem *recycling* endosomalen Weg interagieren [Fairn und Grinstein 2012]. Diese Interaktionen scheinen sich dabei in Hinblick auf Proteinrekrutierung (Lamp1) und Ansäuerung gegenseitig zu beeinflussen. Die Phagosomen bilden in ihrem Inneren während der Reifung ein saures Milieu, wodurch lysosomale Proteasen der Cathepsin-Familie aktiviert werden und phagozytierte Partikel degradiert werden können [Lennon-Dumenil *et al.* 2002]. In dieser Arbeit wurde die bakterizide Aktivität von Endothelzellen durch Bestimmung intrazellulär überlebender Staphylokokken bestimmt. Nach *knockdown* von Exo70, Sec8 und Rab11 wurden auch 24 h nach der Infektion ca. 30 % mehr überlebende Bakterien detektiert im Vergleich zu Kontroll siRNA transfizierten Zellen. Diese Ergebnisse korrelieren mit einer verminderten intraphagosomalen Ansäuerung und zeigen eine funktionelle Beteiligung von RE und Exocyst am bakteriellen Abbau. Bislang konnte die Beteiligung des Exocysten am Transport potentieller weiterer mikrobizider Faktoren in dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden, was zum unter anderem auf die unterschiedliche Kinetik der Rekrutierung von v-ATPasen und lysosomale Proteinase (Cathepsine) zum Phagosom zurückzuführen ist [Tsang *et al.* 2000; Yates *et al.* 2007]. Die Daten dieser Arbeit zeigen zudem, dass die Expression des konstitutiv-aktiven Rab11 (Rab11-Q70L) den Degradationsdefekt durch *knockdown* von Exo70 rückgängig machen konnte (Abb. 2.17 B). Zudem führte die Expression der dominant-negativen Form von Rab11 zu einer verminderten Degradationsfähigkeit der Endothelzellen. Diese Beobachtung lässt sich auf einen gesteigerten Membrantransport zurückzuführen. Denn es wurde bereits gezeigt, dass die exogene Expression von Rab11 eine Steigerung von Transportprozessen zur Plasmamembran induziert [Ren *et al.* 1998; Cox *et al.* 2000]. Da der Doppel-*knockdown* von Rab11 und Exo70 keine additiven Effekte während der bakteriellen Degradation zeigte, lässt sich schlussfolgern, dass Exocyst und RE im selben regulatorischen Signalweg agieren.

3.7 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die funktionelle Beteiligung des Exocysten an der Phagosomenreifung in Endothelzellen gezeigt werden. Die Daten unterstützen die Idee, dass der Exocyst die Interaktion von Vesikeln wie z.B. *recycling endocytic vesicles* mit dem reifenden Phagosom vermittelt und dadurch den Reifungsprozess steuert. Die Depletion von Exocyst und Rab11 führt zu einer verringerten Rekrutierung von *recycling endocytic vesicles* zum Phagosom und zeigte als Sekundäreffekt eine beeinträchtigte Ansäuerung der Phagosomen. Die bakterizide Kapazität der Endothelzellen war stark von der Anwesenheit von Exocyst und RE abhängig. Obwohl es Hinweise gibt, dass der Transport von v-ATPasen zum Phagosomen von RE und Exocyst abhängig ist, bleibt der molekulare Mechanismus des Exocyst-abhängigen Transports weiterhin unklar. Die Daten tragen zum Verständnis der Phagosomenreifung in „nicht-professionellen“ Phagozyten bei und zeigen die essentielle Verbindung von phagolysosomalen Reifungsvorgängen und des *recycling endocytic* Transportweges. Das Modell in Abb. 3.1 fasst die Ergebnisse dieser Arbeit graphisch zusammen.

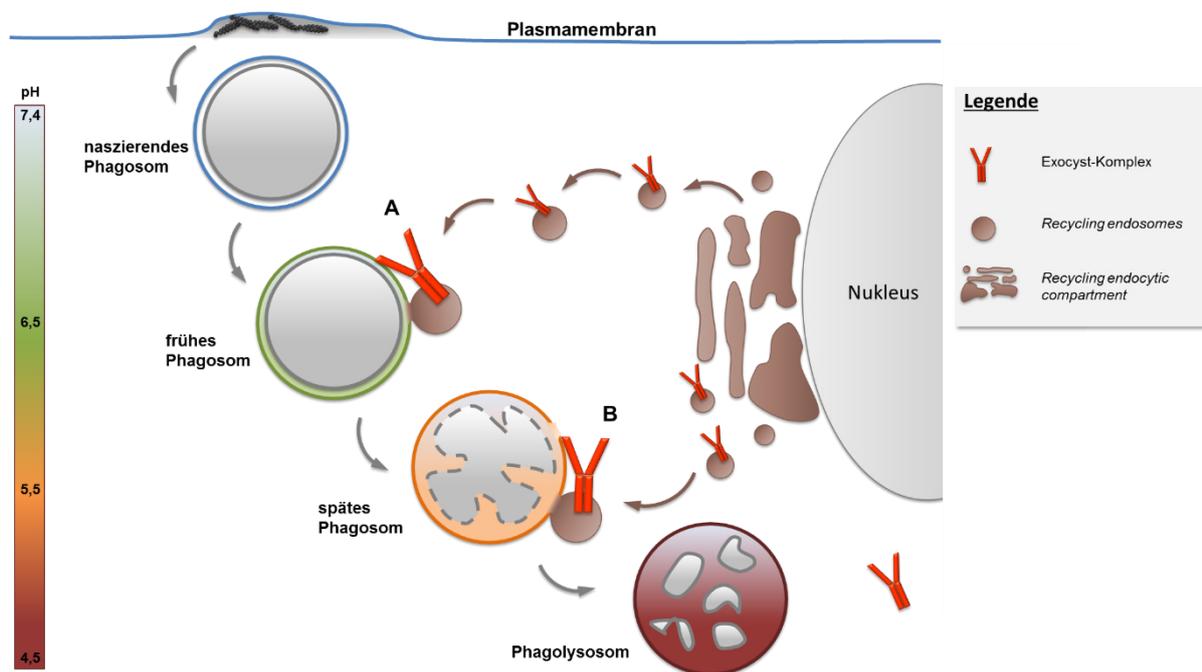


Abb. 3.1 Modell der Interaktion von Exocyst und *recycling endocytic vesicles* mit dem reifenden Phagosom

Nach Abschnürung des Phagosoms von der Plasmamembran reift das Phagosom durch sequentielle Fusionsprozesse mit Vesikeln des endo/lysosomalen Signalweges vom frühen Phagosom, zum späten Phagosom und letztendlich zum Phagolysosom. Der Exocyst, der im *recycling endocytic compartment* lokalisiert ist, wird in zwei Phasen (**A + B**) zum reifenden Phagosom rekrutiert und vermittelt die Interaktion von *recycling endosomes* mit der phagosomalen Membran wodurch die Fusion ermöglicht wird. Diese Fusionschritte sind entscheidend für den Verlauf der Reifung, da möglicherweise v-ATPasen in *recycling endosomes* zu finden sind. Die Reifung kann durch Messung der Ansäuerung des Phagosoms verfolgt werden.

4 Materialien

4.1 Geräte

Tabelle 4.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Accu-Jet	Accu-jet pro, Brand, Wertheim (D)
Elektrophorese	Agarose-Gel: Roth, Karlsruhe (D) SDS-PAGE: Mini-Protean II, Biorad, München (D)
Entwickler für Röntgenfilme	Curix 60, Agfa, Mortsel (D)
Entwicklerkassette	Hartenstein, Würzburg (D)
Gefrierbehälter	Kryogefrierbehälter, Nalgene Scientific, Rockford (USA)
Magnetrührer	RCT-Basic, IKA-Labortechnik, Staufen (D)
NanoDrop® ND-1000	PegLab, Erlangen (D)
pH-Meter	Seven easy, Mettler-Toledo, Giessen (D)
Photometer	Ultrospec 3000 pro, Amersham/GE Healthcare Europe, München (D)
Pipetten	2, 10, 100, 200, 1000 µl, Research Plus, Eppendorf, Hamburg (D)
Power Supply	Power Pac 2000, BioRad
Schüttelinkubator	Certomat BS-1, Sartorius, Göttingen (D)
Sonifizierer	Digital Sonifier 250-D, Branson, Danbury (USA)
Sterilbank	Hera Safe, Thermo Scientific, Rockford (USA)
Thermocycler	Primus-96, MWG-Biotech, Ebersberg (D)
UV-Transilluminator + Detektor	ChemiDoc XRS, BioRad
Vortex	REAX Topo, Heidolph Instruments, Schwabach (D)
Waage	440-47N, Kern, Balingen-Frommern (D)
Wasserbad	GFL Typ 1013, GFL, Burgwedel (D)
Western Blot-Apparatur	OWL HEP-1, Thermo Scientific
Zellinkubator	CB Series, Binder, Tuttlingen, (D)
Zelltransfektion	Neon Transfektionssystem, Invitrogen, Carlsbad (USA)
Zellzählkammer	Neubauer-Zählkammer, Hartenstein, Würzburg (D)
Zentrifugen	Sorvall RC-5B, Thermo Scientific 5417R und 5810R, Eppendorf, Hamburg (D) Sigma Zentrifuge 3-18K, Sigma, Osterode (D) Ultrazentrifuge Optima L100, Beckmann, Krefeld (D)

4.2 Mikroskopie

Tabelle 4.2 Technische Details des *Laser scanning* Mikroskops

<i>Laser scanning</i> Mikroskop	Produktbezeichnung, Hersteller
Hersteller	Leica, Wetzlar, D
Stativ	Leica DMI 6000
Objektiv	63x HCX Plan Apochromat CS Ölimmersion, NA 1.40-0.60
Detektor	2x HyD, 2x PMT, 1x Trans-PMT
Laser	Diode 405 nm/ Multi-Ar 458 nm/ 476 nm/ 488 514 nm, DPSS 561 nm, HeNe 633 nm
Emissionsfilter	L5 ET: BP 480/40 (grün), N3 ET: BP546/12 (rot)
UV Lampe	EL 6000 120W (LQHXP 120 LEJ)
Halogenlampe	100 W, 12 V
Weitere Ausstattung	<i>Piezo Focus drive: SuperZ Galvo type H</i>
Software	Leica LAS AF

Tabelle 4.3 Technische Details des *Spinning disc* microscopes

<i>Spinning disc confocal</i>	Produktbezeichnung, Hersteller
Hersteller	Improvision, Coventry (UK)
Stativ	Axiovert 200 M, Zeiss, Jena (D)
Objektiv	Plan-Apochromat 63x / 1.4 Ph3 Ölimmersion
Konfokale Einheit	<i>Spinning disc</i> CSU-22, Yokogawa, Tokyo, (J)
Kamera	EM-CCD C9100-02, Hamamatsu, (J)
Laser	Cobolt Calypso CW 491 nm, Cobolt Jive 561 nm, Stockholm (S)
Emissionsfilter	ET 525/50 (grün), ET 620/60 (rot), Chroma Technology, Rockingham (USA)
UV Lampe	X-cite <i>series</i> 120 W mit Hg-Lampe, EXFO, Mississauga (K)
Halogenlampe	100 W, Zeiss, Jena (D)
Inkubationskammer	Temperatur/ Feuchtigkeit/ CO ₂ -Kontrolle, Solent Scientific, Regensworth (UK)
Weitere Ausstattung	Motorisierte BioPrecision XY-Einheit und PiezoZ-Einheit, Ludl Electronic Products, Hawthorne (USA)
Software	Volocity Version 6.1 – 6.3, Perkin Elmer, Waltham (USA)

Tabelle 4.4 Technische Details des *structured illumination* Mikroskop (SIM)

3D-SIM ¹	Produktbezeichnung, Hersteller
Hersteller	DeltaVision OMX, Little Chalfont, (UK)
Objektiv	100x/1.42 Ölimmersion
Kamera	Evolve EMCCD, Photometrics, (USA)
Laser	OPSL 488 nm, OPSL 568 nm, Diode 642 nm
Weitere Ausstattung	XYZ Nanomover, DeltaVision OMX Blaze SIM Modul™, GE Healthcare
Software	DeltaVision UltraMax und SoftWoRx v 6.1

¹ Das Gerät wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Derek Toomre (Yale University, New Haven, USA) verwendet.

Zur Bearbeitung der mikroskopischen Aufnahmen wurden Volocity (Perkin Elmer, Waltham, USA), ImageJ (Bethesda, USA) und Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems GmbH, München, D) genutzt.

4.3 Einwegartikel

Tabelle 4.5 Einwegartikel

Name	Firma
Deckgläser	Rund, 12 mm Durchmesser, No 1, Hartenstein, Würzburg (D)
Einmalspritzen	Steril, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, B. Braun, Melsungen (D)
Gewebekulturflasche	T-25, T75, Sarstedt, Nürnberg (D)
Gewebekulturschale	15 cm, Sarstedt, Nürnberg (D)
Glasbodenschale	Rund, 35 mm Durchmesser, Collagen-beschichtet, MatTek Corporation, Ashland (USA)
Glaspasteurpipette	230 mm, Heinz Herenz Medizinalbedarf, Hamburg (D)
Impföse	10 µl, Sarstedt, Nürnberg (D)
Kryogefriergefäß	1,6 ml, Sarstedt, Nürnberg (D)
Küvette	1,5 ml, Semi-Micro, Brand, Wertheim (D)
Mikroskopieobjektträger	12-Loch µ-Kammer, Ibidi, Martinsried (D)
Multi-Loch-Platte	6 bzw. 24-Loch, Sarstedt, Nürnberg (D)
Objektträger	76 x 26 mm, Karl Hecht, Sondheim (D)
Parafilm M	Bemis®, Pechiney Plastic Packaging, Neenah (USA)
PVDF Membran	Immobilion-P, 0,45 µm Porengröße, Millipore, Billerica (USA)
Reaktionsgefäße	Sterile 15 ml/50 ml, Sarstedt, Nürnberg (D)
Reaktionsgefäße	0,2 ml, Biozym Scientific, Hessisch Odendorf (D)
Reaktionsgefäße	0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml, Sarstedt, Nürnberg (D)

Name	Firma
Röntgenfilm	Super RX, Fuji Medizinische Röntgenfilme, Fujifilm, Tokyo, (J)
Serologische Pipetten	Sterile 2, 5, 10, 25 ml, Sarstedt, Nürnberg (D)
Skalpell	Steril, B. Braun, Melsungen (D)
Spinal Nadel	Spinal-Nadel, 20 GA 3,50IN, 0,9 x 90 mm, BD, Heidelberg (D)
Spritzenfilter	SFCA 0,2 µm, Thermo Scientific
Whatman Papier	190 g/m ² , BioRad
Zentrifugationsröhrchen	Ultra Clear Centrifuge Tubes, $\frac{9}{16}$ x 3 $\frac{3}{4}$ (14 x 95 mm), Beckmann Coulter Inc, Krefeld, (D)

4.4 Komplettsysteme, Enzyme und Reagenzien

Tabelle 4.6 Komplettsysteme

Komplettsystem	Hersteller
BioRad Protein Assay	BioRad
Neon® Transfektionssystem	Invitrogen
Nucleospin Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren (D)
PCR Extender System	5 Prime, Hamburg (D)
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden (D)
QIAprep spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden (D)
ZR Plasmid Miniprep – Classic Kit	Zymo Research, Irvine (USA)

Tabelle 4.7 Enzyme

Enzyme	Hersteller
α-Chymotrypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
FastDigest® Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
FastAP™ (Alkalische Phosphatase)	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
PCR Extender System	5 Prime, Hamburg (D)
T4 DNA Ligase	Roche, Mannheim (D)
TrypLE Express	Invitrogen/Life Technologies
Trypsin 0.05 %, 0,53 mM EDTA	Invitrogen/Life Technologies

4.5 Wachstumsmedien, Zusätze und Antibiotika

Tabelle 4.8 Wachstumsmedien für Bakterien

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium (<i>lysogenic broth</i>), pH 7,5	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl
TSB (<i>tryptic soy broth</i>)-Medium, pH 7,3	17 g/l Trypton 3 g/l Soyton 2,5 g/l Glucose 5 g/l NaCl 2,5 g/l K ₂ HPO ₄

Tabelle 4.9 Wachstumsmedien und Zusätze für Zellkulturen

Produkt	Zusätze	Hersteller
Endotheliales Wachstumsmedium (ECGM)		Promo Cell GmbH, Heidelberg (D)
	2 % (v/v) Fetales Kälberserum (FKS)	Promo Cell GmbH, Heidelberg (D)
	1 x Wachstumsfaktoren	
	50 µg/ml Gentamicin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
	0,05 µg/ml Amphotericin B	Promo Cell GmbH, Heidelberg (D)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)		Gibco, Carlsbad (USA)
	10 % (v/v) FKS	Gibco, Carlsbad (USA)
	1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin	Gibco, Carlsbad (USA)
	1 x HAT	Sigma-Aldrich

Tabelle 4.10 Antibiotikakonzentrationen zur Selektion

Antibiotika	Finale Konzentration	Hersteller
Ampicillin	100 µg/ml in ddH ₂ O	Sigma-Aldrich
Kanamycin	50 µg/ml in ddH ₂ O	Sigma-Aldrich
Chloramphenicol	20 µg/ml in EtOH	Roth

4.6 Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien

Tabelle 4.11 *E. coli*-Stämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>F-endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17 (rK- mK+), λ-</i>	[Taylor <i>et al.</i> 1993]
<i>E. coli</i> Top10	<i>F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔ139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1λ⁻</i>	[Grant <i>et al.</i> 1990]
<i>E. coli</i> BL21	<i>F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ</i>	[Moffatt und Studier 1987]

Tabelle 4.12 *Staphylococcus*-Stamm

Bakterienstamm	Merkmale	Referenz
FnBPA- <i>S. carnosus</i>	Expression von FnBPA vom <i>S. aureus</i> Stamm 8325-4 in <i>S. carnosus</i> TM300	[Sinha <i>et al.</i> 2000]

Tabelle 4.13 Eukaryotische Zellen

Name	Merkmale	Herkunft
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i> , primäre Zellen wurden aus menschlichen Nabelschnüren isoliert, für Experimente wurden Passagen P2-P4 benutzt	Eigene Isolation
Ea.hy 926	Stabile Endothelzelllinie, entstanden durch Hybridisierung von HUVEC und humanen Lungenkarzinom Zelllinie A549	Derek Toomre (Yale University, New Haven, USA)
TfRcpH	stabil exprimierende Transferrin-Rezeptor-pHluorin Ea.hy926	Derek Toomre (Yale University, New Haven, USA)

4.7 Chemikalien und Puffer-Lösungen

Puffer	Konzentration	Zusammensetzung
Coomassie Färbelösung	0,1 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blau R-250
	25 % (w/v)	Methanol
	10 % (w/v)	Essigsäure
Entfärbelösung	25 % (w/v)	Methanol
	10 % (w/v)	Essigsäure
PBS (10x)	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	14,4 g	Na ₂ HPO ₄
	2,3 mM	KH ₂ PO ₄ NaOH pH 7,4
Elutionspuffer	30 mM	Glutathion
	50 mM	Tris pH 8,8
Zelllysispuffer	1 %	TX-100
	50 mM	Tris pH 7,4
	100 mM	NaCl
	10 mM	MgCl
	10 %	Glycerol
<u>SDS-PAGE</u>		
Trenngelpuffer	1,5 M	Tris-HCl pH 8,8
	0,1 % (w/v)	SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M	Tris-HCl pH 6,8
	0,1 % (w/v)	SDS
Ladepuffer SDS-PAGE (4x)	1 M	Tris pH 6,8
	250 mM	SDS
	20 % (w/v)	Glycerol
	4 %	β-Mercaptoethanol Bromphenolblau
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
<u>Western Blot</u>		
Blottpuffer	150 mM	Tris
	25 mM	Glycin
	20 % (v/v)	Methanol

Puffer	Konzentration	Zusammensetzung
TBS (10x)	20 mM 150 mM	Tris pH 7,4 NaCl
TBS-T	1x 0,3 %(v/v)	TBS Tween20
<u>Elektrophorese</u>		
TAE (50x)	40 mM 10 mM	Tris-Acetat pH 8,3 EDTA ddH ₂ O, pH 7,4
<u>Kompetente Bakterien</u>		
TfB1 (4°C)	30 mM 50 mM 100 mM 10 mM 15 % (w/v)	KAc MnCl ₂ RbCl CaCl ₂ Glycerin ddH ₂ O, pH 5,8
Tfb2 (4°C)	10 mM 10 mM 75 mM 15 % (w/v)	MOPS, pH 7,0 RbCl CaCl ₂ Glycerin
<u>Phagosomenisolation</u>		
Homogenisationspuffer	8,55 % (w/v) 3 mM	Saccharose Imidazol ddH ₂ O, pH 7,4
Saccharose-Lösungen	8,55 %, 10 %, 25 %, 35 %, 62 % (w/v) 3 mM	Saccharose Imidazol ddH ₂ O, pH 7,4
Phagosom-Lysispuffer	150 mM 20 mM 10 mM 1 % (v/v)	NaCl Tris-HCl EDTA NP-40 ddH ₂ O, pH 7,5
<u>β-Hexosaminidase Aktivität</u>		
Reaktionspuffer (2x)	0,2 M 0,2 % (v/v) 0,4 % (w/v)	Natriumcitrat TX100 BSA

Puffer	Konzentration	Zusammensetzung
Substratpuffer	10 mM	4-Nitrophenyl-N-Acetyl- β -D-glucosaminid
	ad	Reaktionspuffer
Stopp-Puffer	0,4 M	Glycin pH 10,4
<u>Phagosomen-Ansäuerung</u>		
Isotonische Kaliumlösung	143 mM	KCl
	1 mM	MgCl ₂
	1 mM	CaCl ₂
	5 mM	Glucose
	20 mM	Acetat pH 4,0

4.8 Protein- und DNS-Marker

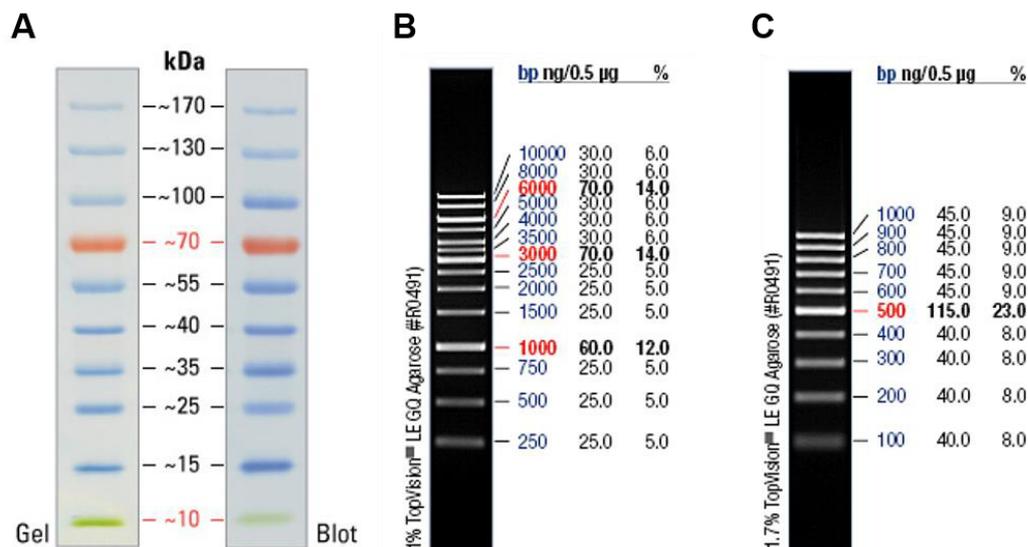


Abb. 4.1 Protein- und DNS-Leiter

A PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). **B** GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Rockford, USA). **C** GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific).

4.9 siRNA

Tabelle 4.14 siRNA Sequenzen

Name	Sequenz (5' → 3')	Firma
Kontrolle	siRNA Negativkontrolle aus einem Pool aus 4 siRNAs ohne Zielgen, Sequenz unbekannt	Thermo Scientific
Exo70	siRNA Nr.5 UCGCAGAGAAGAAUCUACCUUGUGUU	MWG Operon
Exo70	siRNA Nr.6 GGUUAAGGUGACUGAUUATT	Qiagen
Sec8	siRNA Nr.5 CCUUGAUACCUUCACUAU	MWG Operon
Sec8	siRNA Nr.4 TAAGGGCTTGGCGAACTGAA	Qiagen
Rab11a	siRNA Nr.5 AAGAGTAATCTCTGTCTCGA	Qiagen
Rab11a	siRNA Nr.6 CGAAATGAGTTAATCTGGAA	Qiagen

4.10 Plasmide

Tabelle 4.15 prokaryotische Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
GST-FnBPA	pGEX- <i>fnbpa</i> -DuD4; <i>S. aureus</i> FnBPA Domäne, N-terminaler GST-Tag	[Schroder <i>et al.</i> 2006]
GST-Inv397	pGEX-4T-3-pINV397; <i>Y. enterocolitica</i> Serotyp O:8, N-terminaler GST-Tag	[Wiedemann <i>et al.</i> 2001]

Tabelle 4.16 eukaryotische Plasmide

Plasmid	Vektorgerüst	Herkunft
dsRed-Rab11	n.d.	Derek Toomre (Yale University, New Haven, USA)
GFP-Exo70	pEGFP-C1	Wei Guo (University of Pennsylvania, PA, USA)
GFP-Rab11	pEGFP-C2	S. Ferguson (Robarts Research Institute, Ontario, K)
GFP-Rab11-Q70L	pEGFP-C2	S. Ferguson (Robarts Research Institute, Ontario, K)
GFP-Rab11-S25N	pEGFP-C2	S. Ferguson (Robarts Research Institute, Ontario, K)
GFP-Rab5	n.d.	Craig Roy (Yale University, New Haven, CT, USA)
GFP-Rab7	n.d.	Craig Roy (Yale University, New Haven, CT, USA)
GFP-TfR	n.d.	Derek Toomre (Yale University, New Haven, USA)
Lamp1-RFP	n.d.	[Sherer <i>et al.</i> 2003]
mRFP-Lifeact	n.d.	Stefan Linder (UKE, Hamburg, D)
mRFP-Rab5	pmRFP-C3	[Vonderheit und Helenius 2005]
mRFP-Rab7	pmRFP-C3	[Vonderheit und Helenius 2005]
Sec10-Kaede	pKaede-MN1	diese Arbeit
YFP-Lamp1	pEYFP-N1	R. Henry (Ann Arbor, MI, USA)

Plasmid	Vektorgerüst	Herkunft
YFP-Sec10	pEYFP-C1	Derek Toomre (Yale University, New Haven, USA)
pEGFP-C1	n.d.	BD Clontech, Heidelberg (D)
pEGFP-C2	n.d.	BD Clontech, Heidelberg (D)
pmRFP-C3	n.d.	BD Clontech, Heidelberg (D)

4.11 Primer

Tabelle 4.17 Primer

Name	Sequenz (5' → 3')
Sec10-BamHI-Kaede-for	CTAGGATCCATAATGGCTACCACGGCCGAG
Sec10-EcoRI-Kaede-rev	GCCGAATTCGCGCTGAAGTGTTCGAGCAAG

4.12 Antikörper

Tabelle 4.18 Primärantikörper

Antigen	Spezies	Verd.	Verd.	Hersteller
		IF	WB	
Aktin	Maus	-	1:10000	Millipore
Cathepsin D	Ziege	-	1:1000	Santa Cruz
EEA1	Kaninchen	1:200	1:1000	Cell Signaling
Exo70	Maus	1:200	1:1000	[Vega und Hsu 2001]
GAPDH	Kaninchen	-	1:5000	Sigma
GST	Maus	1:200	1:2000	BD Biosciences
GST	Kaninchen	1:200	1:2000	Invitrogen
Lamp1	Kaninchen	-	1:1000	Cell Signaling
Lamp1 (H4A3)	Maus	1:100	-	DSHB
Limp2 (L2T2)	Kaninchen	-	1:1000	[Zachos <i>et al.</i> 2012]
Rab11a	Maus	1:100	-	BD Transduction
Rab11a	Kaninchen	1:100	-	Cell Signaling
Rab5	Maus	1:100	-	BD Transduction
Rab7a	Kaninchen	1:100	-	Cell Signaling
<i>S. epidermidis</i> 5179	Kaninchen	1:2000	-	[Schommer <i>et al.</i> 2011]
Sec15	Kaninchen	1:200	1:2000	Atlas Antibodies
Sec5	Kaninchen	1:200	1:1000	ProteinTech Group
Sec8	Maus	1:200	1:2000	BD Biosciences

Antigen	Spezies	Verd. IF	Verd. WB	Hersteller
Transferrin Rezeptor	Kaninchen	1:200	-	Abcam
Bip/ GRP78	Maus	-	1:500	BD Transduction

Zur Visualisierung von F-Aktin wurde Alexa-488-, 568-, oder 647-gekoppeltes Phalloidin (Invitrogen) in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Zellkerne wurden mit 300 nM DAPI (Invitrogen) gefärbt.

Tabelle 4.19 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Alexa-488 Ziege anti-Maus	Invitrogen	1:200 in 5 % BSA
Alexa-568 Ziege anti-Maus	Invitrogen	1:200 in 5 % BSA
Alexa-647 Ziege anti-Maus	Invitrogen	1:200 in 5 % BSA
Alexa-488 Ziege anti-Kaninchen	Invitrogen	1:200 in 5 % BSA
Alexa-568 Ziege anti-Kaninchen	Invitrogen	1:200 in 5 % BSA
Alexa-647 Ziege anti-Kaninchen	Invitrogen	1:200 in 5 % BSA
Alexa-488 Ziege anti-Ratte	Invitrogen	1:200 in 5 % BSA
Alexa-568 Ziege anti-Ratte	Invitrogen	1:200 in 5 % BSA
Alexa-647 Ziege anti-Ratte	Invitrogen	1:200 in 5 % BSA
Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert	GE Healthcare	1:5000 od. 1:100000 in TBS-T
Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	GE Healthcare	1:5000 od. 1:100000 in TBS-T
Anti-Ratte IgG, HRP-konjugiert	GE Healthcare	1:5000 od. 1:100000 in TBS-T
Anti-Ziege IgG, HRP-konjugiert	Santa Cruz	1:5000 od. 1:100000 in TBS-T

4.13 Software und Datenbanken

Tabelle 4.20 Software und Datenbanken

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems GmbH, München, (D)
Excel 2010	Microsoft, Redmond, WA, (USA)
Graphpad Prism 6	La Jolla, CA, (USA)
ImageJ	Bethesda (USA)
Volocity 6	PerkinElmer Life Sciences, Boston, (USA)
Volocity DEMO	PerkinElmer Life Sciences, Boston, (USA)
NCBI Datenbank	www.ncbi.nlm.nih.gov

5 Methoden

5.1 Mikrobiologische Methoden

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden in den Laboren der gentechnischen Sicherheitsstufe 2 (S2) durchgeführt.

5.1.1 Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht von FnBPA-*S. carnosus*, welcher FnBPA vom *S. aureus* Stamm 8325-4 in *S. carnosus* TM300 exprimiert, erfolgte in *tryptic soy broth*-(TSB) Medium bei 37°C im Schüttelinkubator für 12 - 16 h [Sinha *et al.* 2000]. Die Übernachtskultur wurde am Versuchstag 1:20 mit TSB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.7 schüttelnd bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 5 min bei 6000 x *g* zentrifugiert, einmal in sterilem PBS gewaschen und resuspendiert.

Zur Anzucht von *E. coli* wurden DH5α bzw. BL21 in 5 ml *lysogeny broth*-(LB)-Medium mit einer einzelnen Kolonie von der Selektionsplatte beimpft und bei 37°C schüttelnd über Nacht inkubiert. Zur Selektion wurden Agarplatten, supplementiert mit jeweils 100 µg/µl Ampicillin, 50 µg/µl Kanamycin oder 20 µg/µl Chloramphenicol, verwendet.

Zur Kryokonservierung wurden 800 µl einer exponentiell wachsenden Flüssigkultur (OD₆₀₀ ~0.6) mit 200 µl sterilem Glycerol gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* wurden 300 ml LB-Medium mit dem gewünschten *E. coli*-Stamm beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 schüttelnd bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde anschließend auf Eis herunter gekühlt. Nach Zentrifugation der Bakteriensuspension für 10 min bei 3000 rpm und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 20 ml kaltem TFB 1 Puffer resuspendiert. Die Lösung wurde anschließend für 90 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend erneut zentrifugiert und das Pellet in 1,5 ml kaltem TFB 2 Puffer resuspendiert. 100 µl Aliquots der Bakteriensuspension wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Zusammensetzung der Puffer ist unter Abschnitt 5.7 zu finden.

5.1.3 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

100 µl chemisch kompetenter *E. coli*-Stämme DH5α bzw. BL21 wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit 100 – 400 ng Plasmid-DNS für 30 min auf Eis inkubiert. Durch Hitzeschock für 2 min bei 42°C entstanden Poren in der Bakterienmembran, durch die die Plasmid-DNS

in die Bakterien gelangte. Nach dreiminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit 900 µl sterilem LB-Medium versetzt und eine Stunde bei 37°C im Inkubator geschüttelt, um die Expression des Resistenzgens zu induzieren. Nach Zentrifugation bei 400 x g für 3 min wurde der Überstand dekantiert, die Bakterien im Rückfluss resuspendiert und unter Verwendung eines Drygalski-Spatels auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert. Die Anzucht der transformierten Bakterien erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

5.1.4 Quantifizierung intrazellulär überlebender Bakterien

Es wurden 5×10^4 Zellen in die Kavität einer 24-Lochplatte ausgesät und 24 – 48 kultiviert. Mindestens 12 h vor der Infektion mit FnBPA-*S. carnosus* wurden die Zellen in antibiotikafreiem Medium inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Bakterien-Zell-Verhältnis von 100:1 infiziert und anschließend für 1 min bei 100 x g zentrifugiert. Die Bakteriensuspension wurde in verschiedenen Verdünnungsstufen ausplattiert, um die exakte Bakterienzahl des Inokulums zu bestimmen. Nach Inkubation der Zellen für 30 min bei 37°C wurden nicht adhärierte Bakterien durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Nach weiterer Inkubation bei 37°C in Gentamicin-haltigem Medium (50 µg/µl) wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl 0,1 % TX100/PBS lysiert. Verschiedene Verdünnungsstufen der lysierten Zellen wurden anschließend in Triplikaten auf TSB-Agarplatten plattiert und die Zahl koloniebildender Bakterien (*colony forming units*, CFU) nach Inkubation bei 37°C über Nacht ermittelt. Gleichzeitig wurde der Zellkulturüberstand auf Agarplatten ausplattiert, um das Wachstum extrazellulärer Bakterien auszuschließen.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Isolation von Plasmid-DNS

Die Plasmid-DNS aus *E. coli* DH5α wurde aus einer 5 ml Vorkultur mit dem *ZR Plasmid Miniprep-Classik Kit* (Zymo Research, Irvine, USA) entsprechend der Herstellerangaben isoliert. Die Präparation erfolgte dabei nach dem Prinzip der alkalischen Lyse [Birnboim und Doly 1979].

5.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNS

Zur Konzentrationsbestimmung von doppelsträngiger DNS (dsDNS) wurde das Absorptionsmaximum bei 260 nm photometrisch im NanoDrop bestimmt. Aus der Extinktion der Lösung wird dabei die Konzentration nach folgendem Verhältnis bestimmt: $A_{260} = 1$ entspricht 50 µg/ml dsDNS. Zur Qualitätskontrolle und zur Größenbestimmung von Plasmid-DNS erfolgte die Auftrennung der Nukleinsäuren in einem Agarosegel (siehe 5.2.3).

5.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Unter Verwendung von Agarose-Gelelektrophorese können DNS-Fragmente sichtbar gemacht und deren Größe und Reinheit abgeschätzt werden. Hierbei bewegen sich DNS-Fragmente im elektrischen Feld aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen von der Kathode zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von Anzahl der Nukleotide, der angelegten Spannung (8 V/cm) sowie der Konzentration der eingesetzten Agarose (0,8 – 2 %).

Zur Größenbestimmung wurde die DNS mit Ladepuffer gemischt und zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker (1 kb DNA-Leiter, GeneRuler™, Thermo Fisher, Waltham, USA) in einem 1 % (w/v) Agarosegel, versetzt mit RedSAFE (HIS Diagnostics, Freiburg, Germany), bei 90 V in TAE-Puffer aufgetrennt. Die mit RedSAFE interkalierte dsDNS wurde anschließend mittels UV-Licht (302 nm) und einem Transilluminator sichtbar gemacht. Die verwendeten Puffer sind Tabelle 4.6 zu entnehmen.

5.2.4 Arbeiten mit DNS

5.2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Amplifikation eines definierten DNS-Bereichs, der durch zwei Oligonukleotide (Primer) begrenzt wird. Die Generierung von PCR-Produkten für Klonierungen wurde unter Verwendung des *5 Prime Extender Systems* (5 PRIME GmbH, Hilden, Germany) durchgeführt. Dieser PCR-Mix kombiniert verschiedene thermostabile Polymerasen, wodurch die Amplifikation von langen PCR-Produkten ermöglicht und durch die zusätzliche Korrekturlesefunktion die Genauigkeit der PCR verbessert werden.

Der Reaktionsansatz für die PCR setzt sich folgendermaßen zusammen:

5 µl	<i>High Fidelity Buffer</i> (10x)
1 µl	Vorwärtsprimer (10 pmol/µl)
1 µl	Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)
2 µl	dNTPs (10 mM)
0.3 µl	Polymerase-Mix
1 µl	DNA-Template (100 ng/µl)
ad 50 µl	ddH ₂ O

Das Reaktionsgemisch wurde im Thermocycler nach folgendem Schema inkubiert (Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: Programm für die 5 Prime Extender PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Programm	Zyklen
1	94 C	2 min	Initiale Denaturierung	1 x
2	94°C	20 s	Denaturierung	30-35
	T _m + 3°C	15 s	Annealing	
	72°C	1 kb DNS/45 s	Elongation	
3	72°C	5 min	Finale Elongation	1 x
4	4°C	∞	Pause	1 x

Anschließend wurde das PCR-Produkt in einem 1 % (w/v) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und das Transkript mittels *Nucleo Spin Extract II* Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

5.2.4.2 Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen

Die PCR-Produkte und die entsprechenden Expressionsvektoren wurden mittels *FastDigest*® Restriktionendonukleasen (Thermo Fisher) entsprechend der Herstellerangaben für 20 min bei 37°C im Thermocycler geschnitten und die Reaktion bei 80°C für 5 min inaktiviert. Die erhaltenen Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese (5.2.3) aufgetrennt und mittels Gelextraktion aufgereinigt (5.2.4.3).

5.2.4.3 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarosegelen wurden die DNS-Banden unter schwachem ultraviolettem (UV)-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des *Nucleo Spin Extract II* Kits (Macherey-Nagel, Düren, Germany) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

5.2.4.4 Ligation

Zur Ligation wurde die T4-DNA-Ligase (1 U/μl; Roche) verwendet. Diese ist in der Lage, die überhängenden komplementären Restriktionsenden unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) miteinander zu verknüpfen. Geschnittenes PCR-Produkt und Plasmid wurden in einem Stoffmengenverhältnis von ca. 3:1 in folgenden Ansatz eingesetzt:

1 μl	Linearisierter Vektor
3 μl	Restringiertes PCR-Produkt
2 μl	T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)
1 μl	T4-DNA-Ligase (1 U/μl)
ad 20 μl	ddH ₂ O

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16°C im Thermocycler inkubiert.

5.2.4.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von der Firma SeqLab (Göttingen, Germany) durchgeführt. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit den Sequenzen der *NCBI*-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) verglichen und ausgewertet.

5.3 Proteinbiochemische Methoden

5.3.1 Proteinexpression und –aufreinigung

Glutathion-S-Transferase (GST) ist ein 26 kDa großes Protein, welches in eukaryotischen Zellen zu finden ist. GST bindet mit einer hohen Affinität an sein Substrat Glutathion (GSH), welches zusätzlich an eine Sepharosematrix immobilisiert werden kann. Da die Bindung zwischen GST und GST reversibel ist und unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgehoben werden kann, wird dieses System zur Aufreinigung von Proteinen verwendet. Das gewünschte Protein wird dabei mit GST fusioniert und mittels bakterieller Expressionsvektoren (pGEX-4T-3) in einem Protease-defizienten *E. coli* Stamm (BL21) nach Induktion exprimiert. Das Fusionsprotein kann anschließend über eine Glutathion-Sepharose aufgereinigt werden.

Zunächst wurde eine Vorkultur bestehend aus 50 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium (100 µg/ml) mit einer Kolonie des entsprechenden Stammes aus einem Glycerolstock oder von einer Agarplatte beimpft. Die Vorkultur wurde bei 180 rpm und 37°C für 12 – 16 h inkubiert. Anschließend wurden 1 l LB-Medium der Expressionskultur mit einer 1:40-Verdünnung der Übernachtskultur überimpft und schüttelnd (180 rpm, 37°C) bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,5 – 0,7 inkubiert. Nach Induktion der Proteinexpression mit 0,4 mM IPTG (Isopropyl- β -D-1-Thiogalactopyranosid) wurde die Kultur für weitere 4 h schüttelnd bei 37°C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend bei 6000 rpm und 4°C für 10 min (Sorvall RC 5B, Rotor GS-3) zentrifugiert und das Bakterienpellet bei -20°C gelagert.

Alle Aufreinigungsschritte wurden bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt. Das Bakterienpellet wurde in 5 ml PBS, versetzt mit 0,1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), resuspendiert und durch 10 Ultraschallbehandlungen für je 10 s bei einer Amplitude von 20 % (Digital Sonifier 250-D, Branson, Danbury, USA) aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 20000 x g für 30 min bei 4°C (Sigma Zentrifuge 3-18K, Sigma, Osterode, Germany) abgetrennt. Das Bakterienlysat wurde anschließend für 1 h bei 4°C mit einer Glutathion-Sepharose 4B Matrix (GE Healthcare) in einer Einweg-Polypropylensäule (5 ml, Quiagen, Hilden, Germany) rotierend inkubiert. Die Matrix wurde anschließend viermal mit

10 ml PBS gespült, um ungebundenes Protein zu entfernen. Die Elution des GST-Fusionsproteins erfolgte durch Inkubation der Matrix mit 1 ml Glutathion-Elutionspuffer für 1 h bei 4°C und wurde anschließend gegen PBS über Nacht bei 4°C dialysiert. Die Expression und Aufreinigung des Fusionsproteins wurde mittels SDS-PAGE (siehe 5.3.2) und Coomassie-Färbung (siehe 5.3.4) überprüft. Die Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen ist unter Abschnitt 4.7 zu finden.

5.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinquantifizierung wurde nach Herstellerangaben mit dem BioRad Protein-Assay Kit (Biorad) durchgeführt. Die Methode beruht auf der Bindung von *Coomassie Brilliant blue G-250* an Proteine und der daraus folgenden Verschiebung des Absorptionsmaximas von 465 nm zu 595 nm [Bradford 1976].

5.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein elektrophoretisches Auftrennverfahren für Proteine nach ihren Molekulargewichten unter denaturierten Bedingungen.

Für die Elektrophorese wurden selbstgefertigte, chemisch inerte Acrylamid-Bisacrylamidgele (Biorad) verwendet. Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel ist in Tabelle 5.2 aufgeführt. Die Proteinproben wurden mit 4-fachem SDS-PAGE Probenpuffer für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend in die Geltaschen gegeben. Die Proben wurden für 30 min mit 80 V im 4 %-igen Sammelgel unter Verwendung des SDS-Tris-Glycin-Laufpuffers fokussiert. Nach Übertritt in das Trenngel wurden die Proteine bei einer Spannung von 120 – 150 V, ihrer Größe entsprechend, aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein vorgefärbter Proteinmarker mitgeführt.

Tabelle 5.2: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE

Verbindung	10 % Trenngel	4 % Sammelgel
ddH ₂ O	4,2 ml	1,55 ml
Puffer pH 8,8	2,5 ml	-
Puffer pH 6.8	-	625 µl
Acrylamid 30 %	3,3 ml	325 µl
APS (10 mg/ml)	50 µl	12,5 µl
TEMED	5 µl	2,5 µl

5.3.4 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Die Visualisierung und Fixierung von Proteinbanden nach elektrophoretischer Auftrennung in der SDS-PAGE erfolgte durch die irreversible Einlagerung von *Coomassie Brilliant Blue-G250* in die Proteine. Die Nachweisgrenze von Proteinen liegt dabei bei 500 ng Protein. Nach einstündiger Inkubation des Trenngels in Coomassie-Färbelösung wurde das Gel für 2 h in Entfärbelösung geschüttelt und anschließend durch mehrfachen Wechsel mit ddH₂O gewaschen, bis kein unspezifischer Hintergrund auf den Gelen sichtbar war.

5.3.5 Western Blot Analysen

Der Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Membran aus Polyvinylidendifluorid (PVDF, Immobilon, Millipore, Darmstadt, Germany) erfolgte durch Elektroblot). Drei Lagen Filterpapier (90 g/m², Hartenstein) wurden in Transferpuffer getränkt und auf der Kathode platziert. Das SDS-Gel wurde vom Sammelgel befreit und auf die Filterpapiere gelegt. Die PVDF-Membran wurde für 5 min in Methanol inkubiert und luftblasenfrei auf das Gel gebettet. Abgedeckt wurde das System mit drei in Transferpuffer geschwenkten Filterpapieren. Der Transfer der Proteine wurde je nach Molekulargewicht der Proteine bei konstanter Stromstärke (1,2 mA/cm²) für 90 min durchgeführt. Anschließend erfolgte die Immundetektion der Proteinbanden mittels epitopspezifischen Primärantikörpern. Zunächst wurden freie, unspezifische Bindungsstellen auf der PVDF-Membran durch Inkubation mit 5 % (w/v) fettarmen Milchpulver in TBS-T für 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht abgesättigt. Anschließend wurde der Blot mit epitopspezifischen Primärantikörpern rotierend für 3 h bei RT inkubiert. Die verwendeten Primärantikörper und Verdünnungen sind Tabelle 4.18 aufgelistet. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für jeweils 5 min wurde die Membran mit einem Meerrettichperoxidase-(HRP)-konjugierten speziesspezifischen Sekundärantikörper (siehe Tabelle 4.19) für 1 h bei RT rotierend inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 5 min mit TBS-T gewaschen. Die Immundetektion wurde mittels Chemolumineszenz durch Zugabe einer 1:1-Mischung aus Peroxid- und Luminolverstärkerlösung des *SuperSignal West Femto* bzw. *Pico* (Thermo Scientific), durchgeführt. Die Detektion des emittierten Lichts erfolgte mittels Röntgenfilmen (Super RX, Fuji medical X-ray Film, Fujifilm, Tokyo, Japan), die in einem Curix 60 (Agfa, Morsel, Belgien) entwickelt wurden.

5.3.6 Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen

2 x 10⁶ Zellen wurden durch Zugabe von 100 µl kaltem Lysispuffer (Zusammensetzung siehe 4.7), versetzt mit Protease-Inhibitor (*complete protease inhibitor*, Roche), lysiert. Nach zügigem Abstreichen der Zellen mit einem Zellkulturspatel wurde das Lysat in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 20 min auf Eis inkubiert. Durch

Zentrifugation bei 14000 x *g* und 4°C wurden nichtlysierte Zellen und unlösliche Bestandteile pelletiert und das Proteinlysate in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

5.3.7 Beschichtung von Latex-Kügelchen mit Proteinen

Eine monodisperse Lösung aus Polystyrol-Kügelchen (1 µm oder 3 µm, Polysciences Inc., Eppelheim, D) mit einer Konzentration von $1,68 \times 10^9$ bzw. $4,55 \times 10^{10}$ Partikeln pro ml wurde mit GST-Fusionsproteinen inkubiert. Die Expression und Aufreinigung von GST-FnBPA und GST-Inv397 erfolgte dabei wie unter 5.3.1 beschrieben. 50 µl Partikellösung wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 60 µg Fusionsprotein für 4 – 12 h bei 4°C rotierend inkubiert. Die Latexkügelchen wurden anschließend mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 5 % (w/v) BSA (Carl Roth) für 1 h bei RT abgesättigt. Nach drei Waschschritten mit PBS und Zentrifugation bei 7000 x *g* für 5 min wurden die Partikel in 125 µl 0,02 % BSA in PBS resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

5.3.8 Phagosomenisolation

Die Isolation von Phagosomen wurde nach der Methoden von Desjardins und Vinet durchgeführt [Desjardins *et al.* 1994; Vinet und Descoteaux 2009]. Hierzu wurden zwölf 150 mm Zellkulturschalen mit Ea.hy926 ausgesät und mit 1×10^{10} GST-Inv397 beschichteten Kügelchen (1 µm, *blue dyed Latex beads*, Polysciences Inc, Eppelheim, D) pro Schale inkubiert. Zur Synchronisierung der Phagozytose wurden die Zellkulturschalen für 10 min auf Eis gelagert und anschließend für 30 min bzw. 120 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen vorsichtig mit warmen PBS gewaschen, um nicht internalisierte Partikel zu entfernen. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Nach Zugabe von 5 ml eiskaltem PBS/Schale wurden die Zellen mit Hilfe eines Gummischabers vorsichtig von der Zellkulturschale abgelöst. Die Zellsuspension wurde durch Zentrifugation bei 500 x *g* für 3 min pelletiert. Nach zweimaligem Waschen des Pellets mit je 15 ml kaltem PBS wurden die Zellen in 2 ml Homogenisierungspuffer aufgenommen, für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend für 3 min bei 500 x *g* zentrifugiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Zugabe von 1 ml Homogenisierungspuffer und 10-facher Passage durch eine 22 Gauge-Nadel. Der postnukleäre Überstand (*post nuclear supernatant*, PNS) wurde durch 5-minütige Zentrifugation bei 500 x *g* gewonnen und in einem 1:1-Verhältnis mit 62 %-iger Saccharose-Lösung vermischt. Die PNS-Suspension wurde mit Hilfe einer langen Nadel (Braun) unter einen diskontinuierlichen Gradienten aus je 2 ml 10 %-iger, 25 %-iger, 35 %-iger und 40 %-iger Saccharose eingebracht. Nach Ultrazentrifugation bei 100000 x *g* für 1 h (SW41 Rotor, Beckmann Ultrazentrifuge) wurde die Phagosomenfraktion in der Interphase zwischen 10 %-iger und 25 %-iger Saccharoselösung gesammelt und nach zweimaligen

Waschen mit PBS bei 35000 x g für 15 min pelletiert. Das Pellet wurde in 50 µl Phagosome-Lysispuffer resuspendiert. Je 5 µg des PNS bzw. der Phagosomenfraktion wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die Zusammensetzung verwendeter Lösungen ist unter 4.7 zu finden.

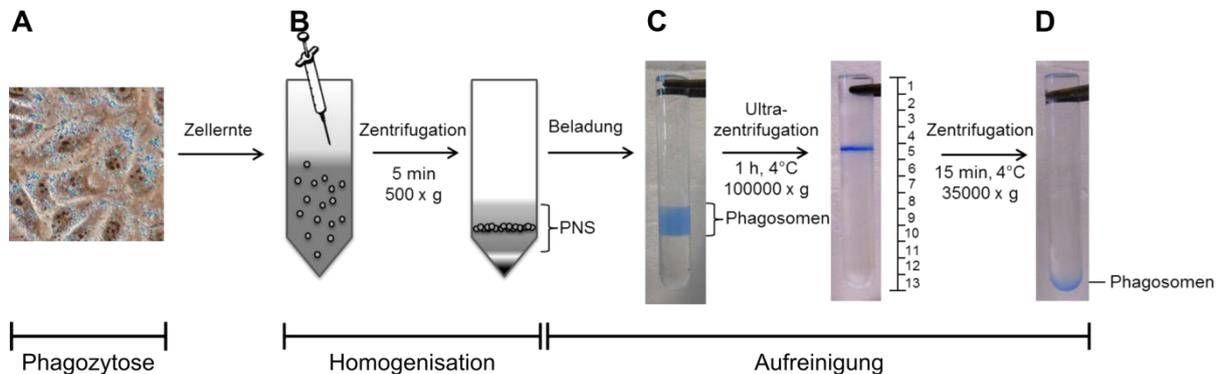


Abb. 5.1 Aufreinigung von Phagosomen mittels Dichtegradientenzentrifugation

A) Interaktion von Ea.hy926 mit 1 µm Invasin-beschichteten Kügelchen und Inkubation für 30 oder 120 min. **B)** Homogenisation der Zelllysats durch Passagieren mit einer Kanüle. **C)** Die blaue Phagosomenfraktion wird in einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten eingebracht und mittels Ultrazentrifugation separiert. **D)** Nach erneuter Zentrifugation wird das Phagosomenpellet in Lysispuffer aufgenommen.

5.3.9 Bestimmung der β -Hexosaminidase-Aktivität

Die Qualität der Phagosomenisolation wurde durch Messung der β -Hexosaminidase Aktivität kontrolliert. Als Substrat diente 4-Nitrophenyl-N-Acetyl- β -D-Glucosaminid (Sigma) welches mit 2,5 µg Protein der phagosomalen Fraktion bzw. PNS für 45 min bei 37°C inkubiert wurde. Durch Zugabe von Stopp-Puffer wurde die enzymatische Reaktion beendet und der Substratumsatz bei 405 nm im Photometer bestimmt. Unter Verwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes wurde die Enzymaktivität berechnet.

$$A = \frac{\Delta E}{\text{min}} \times \frac{V_m}{\epsilon \times d \times V_p}$$

A = Enzymaktivität (U)
 $\Delta E/\text{min}$ = Differenz der Extinktion
 ϵ = molarer Extinktionskoeffizient
 (für Nitrophenol 18,45 µmol⁻¹ x cm)
 V_p = Probenvolumen während der Reaktion (100 µl)
 V_m = Meßvolumen in der Küvette (1000 µl)
 d = Schichtdicke der Lösung (1 cm)

Die Zusammensetzung der Puffer ist unter Abschnitt 4.6 aufgeführt.

5.4 Zellkultur und zellbiologische Methoden

Die verwendeten immortalisierte Endothelzelllinie Ea.hy926 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Derek Toomre (Department of Cell Biology, Yale University, New Haven, CT, USA) im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt. Humane Nabelschnüre zur Präparation

von HUVEC aus der Nabelschnurvene wurden freundlicherweise durch das Marienkrankenhaus (Frauenklinik, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

5.4.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die verwendeten eukaryotischen Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂-Partialdruck im Inkubator kultiviert. Für die Ea.hy926 Zelllinie wurde DMEM (nach Dulbecco modifiziertes Eagle's Minimum Essential Medium, Invitrogen), versetzt mit 10 %-igen fetalem Kälberserum (Sigma), Penicillin-Streptomycin (100 U/ml, PAA Laboratories GmbH) und 2 % HAT (Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin, Sigma) verwendet. Die primären Endothelzellen wurden hingegen in *endothelial cell growth medium* (ECGM, PromoCell) kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde nach jedem dritten Tag gewechselt. In fünftägigem Rhythmus bzw. bei vollständiger Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden diese mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, Invitrogen) gewaschen und anschließend für 5 min bei 37°C mit 0,05 % Trypsin/ 0,02 % EDTA (PAA Laboratories GmbH) oder bei HUVEC (*human umbilical vascular endothelial cells*) mit TrypLE inkubiert. Nach Zentrifugation bei 200 x *g* für 5 min wurde das Zellpellet in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Für die Kultivierung von HUVEC wurden die Zellkulturflaschen mit 0,2 % Gelatine überschichtet.

5.4.2 Isolation von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur

HUVEC sind eine Primärkultur von Endothelzellen, die aus Nabelschnurvenen gewonnen werden. Die Methode der Gewinnung und Kultivierung dieser Zellen wurde erstmals von Jaffe *et. al* beschrieben [Jaffe *et al.* 1973]. Hierzu wird eine sterile Kanüle in die Vene der Nabelschnur eingebracht und diese mehrfach mit sterilem PBS, ergänzt mit 50 µg/ml Gentamicin, gespült. Anschließend wird die Vene vollständig mit 1 mg/ml (w/v) α-Chymotrypsin-PBS-Lösung befüllt, am unteren Ende mit einer Klemme verschlossen und für 30 min bei 37°C inkubiert. Zum Separieren der Zellen von der Zellmatrix wurde die Nabelschnur zusätzlich massiert. Die Zell-Chymotrypsin-Lösung wurde nach Zugabe von 20 ml PBS in einem sterilen Reaktionsgefäß aufgefangen. Darin enthaltenes FKS stoppte die Trypsinierungsreaktion. Mittels Zentrifugation (200 x *g*, 5 min, RT) wurden die Zellen pelletiert und anschließend in 5 ml ECGM aufgenommen. Die frisch präparierten HUVEC wurden in einer T-25 Zellkulturflasche bis zur vollständigen Konfluenz bei 37°C inkubiert. Für Experimente wurden HUVEC der Passagen 3 – 5 verwendet.

5.4.3 Kryokonservierung und Reaktivierung von Kryokulturen

Eukaryotische Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Dazu wurden 4×10^6 Zellen in 1.5 ml FKS mit 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden in einen mit Isopropanol gefüllten Kryogefrierbehälter transferiert und eingefroren. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Reaktivieren der kryokonservierten Zellen wurde die Zellsuspension in 10 ml warmen Zellkulturmedium aufgenommen und anschließend bei $200 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in ein steriles Zellkulturgefäß überführt. Der erste Mediumswechsel erfolgte 24 h nach dem Auftauen.

5.4.4 Zellbehandlungen

5.4.4.1 Transfektion und siRNA Experimente

Zum Einbringen von DNA oder siRNA in HUVEC bzw. Ea.hy926 Zellen wurde das Neon® Transfektionssystem (Invitrogen) laut Herstellerangaben verwendet. Die Elektroporation erfolgte durch einen elektrischen Impuls von 1350 V für 30 ms. Die Zellen wurden 16 – 24 h nach der DNS-Transfektion analysiert. Nach Behandlungen der Zellen mit Kontroll siRNA sowie siRNA gegen Exo70, Sec8 oder Rab11 (siRNA Sequenzen siehe 4.9) wurden die Zellen für weitere zwei Tage kultiviert.

5.4.4.2 Interaktion von beschichteten Kügelchen oder Bakterien mit Endothelzellen

Latexkugeln aus Polystyrol ($1 \mu\text{m}$ oder $3 \mu\text{m}$) wurden wie unter 5.3.7 beschrieben mit GST-Inv397 oder GST-FnBPA beschichtet. Je $4 \mu\text{l}$ Partikel-Lösung wurden zu $2,5 \times 10^5$ HUVEC, die auf Gelatine-beschichtete Deckgläsern adhärirt waren, gegeben. Nach Zentrifugation bei $150 \times g$ für 1 min wurden die Zellen für die Dauer des Infektionsversuches bei 37°C inkubiert.

Für Infektionsversuche mit Bakterien wurde *S. carnosus* TM300, welcher FnBPA vom *S. aureus* Stamm 8325-4 exprimiert, verwendet (FnBPA-*S. carnosus*, [Sinha *et al.* 2000]). Die Anzucht erfolgte dabei wie unter 5.1.1 beschrieben. Auf Deckgläsern ausgesäte HUVEC wurden in antibiotikafreiem ECGM mit einem Bakterien-Zell-Verhältnis von 10-30:1 infiziert, 1 min bei $150 \times g$ zentrifugiert und für verschiedene Zeitpunkte bei 37°C inkubiert.

5.5 Mikroskopische Methoden

5.5.1 Immunfluoreszenzfärbung und Fluoreszenzmikroskopie

Zur Immunfluoreszenzfärbungen wurden HUVEC auf Gelatine-beschichtete Deckgläser (Hartenstein) in 24-Loch-Platten (Sarstedt) ausgesät. Die Zellen wurden nach entsprechender Inkubation bei 37°C dreimal mit PBS gewaschen und mit 3,7 % (v/v) Formaldehyd/PBS für 10 min fixiert und mit 0,1 % (v/v) TX100 in PBS für 10 min permeabilisiert. Unspezifische Bindungen wurden durch 30-minütige Inkubation mit 5 % (w/v) BSA blockiert. Die Zellen wurden anschließend für 1 h mit dem Primärantikörper und nach dreimaligem Waschen für 45 min mit dem Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Verwendete Antikörper und deren Verdünnungen in 5 % BSA sind unter 4.12 zu finden. Zur Färbung von DNS oder Aktin wurden DAPI oder Phalloidin zur Sekundärantikörper-Lösung hinzugefügt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläser in MOWIOL eingebettet und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Aufnahmen wurden an einem kofokalen *laser scanning* Mikroskop (Leica TCS SP5) oder einem Mikroskop mit *spinning disc* Einheit (Improvision) mit einem 63-fachen Öl-Immersionsobjektiv angefertigt. Weitere technische Details der Mikroskope sind im Kapitel 4.2 beschrieben.

5.5.2 Bestimmung der Internalisierungsrate mittels Innen-Außen-Färbung

Zur Unterscheidung von extrazellulären (adhärenten) und internalisierten Partikeln oder Bakterien wurde eine sogenannte Innen-Außen-Färbung angewendet. Hierzu wurden HUVEC auf Gelatine-beschichtete Deckgläser in 24-Loch-Platten ausgesät. Beschichtete Latex-Kugeln oder FnBPA-*S. carnosus* wurden für verschiedene Zeitpunkte mit den Zellen bei 37°C inkubiert (siehe 5.4.4.2). Nach Ende der Infektion wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, mit 3,7 % Formaldehyd für 10 min fixiert und 30 min in 5 % BSA geblockt. Extrazelluläre Partikel wurden mit primären anti-GST bzw. anti-5179 Antikörper und sekundären anti-Kaninchen Alexa-568-konjugiertem Antikörper gefärbt. Internalisierte Partikel wurden nach 10-minütiger Permeabilisierung mit 0,1 % TX100 in PBS für 30 min in 5 % BSA geblockt und nochmals mit anti-GST bzw. anti-5179 Primärantikörpern inkubiert. Anschließend wurden diese mit anti-Kaninchen Alexa-488-gekoppeltem Sekundärantikörper angefärbt. Nach Waschen mit PBS wurden die Deckgläser in MOWIOL eingebettet und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Extrazelluläre Partikel erscheinen gelb (Überlagerung von roter und grüner Färbung), während intrazelluläre Partikel nur in grün gefärbt wurden. Für jede Bedingung wurden 1000 Partikel aus drei unabhängigen Experimenten quantifiziert. Der phagozytische Index beschreibt das Verhältnis von

internalisierten zu nicht-internalisierten Partikeln bzw. Bakterien und ist dargestellt als Mittelwert \pm SD.

5.5.3 Lebendzellmikroskopie und Photokonvertierung

Für videomikroskopische Aufnahmen wurden HUVEC einen Tag vor dem Experiment auf Collagen-beschichtete Glasbodenschalen ausgesät. Die Aufnahmen wurden an einem konfokalen Mikroskop mit einer *Spinning disc* Einheit und einem 63-fachen Öl-Immersionsobjektiv mit Temperaturkontrolleinheit angefertigt. Weitere technische Details des Mikroskops sind unter Tabelle 4.3 aufgeführt.

Für Photokonvertierungsexperimente wurde ein Kaede-Fusionskonstrukt in HUVEC transfiziert. Durch UV-Bestrahlung des Kaede-Fusionsprotein verschiebt sich das Emissionsspektrum von grün ($\lambda_{ex/em} = 508 \text{ nm}/518 \text{ nm}$, gKaede) nach rot ($\lambda_{ex/em} = 572 \text{ nm}/580 \text{ nm}$) [Ando *et al.* 2002]. Der zu konvertierende Bereich der *recycling compartments* wurde mit Hilfe eines Markierungswerkzeugs umrandet und mit einem 405 nm Laser (25 % Laserintensität, 50 Zyklen) bestrahlt. Die Bildaufnahme erfolgte am *spinning disc* Mikroskop, wobei fünf Bilder alle 5 s vor der Konvertierung aufgenommen wurden. Nach der Konvertierung wurden die Bilder mit maximaler Geschwindigkeit aufgenommen.

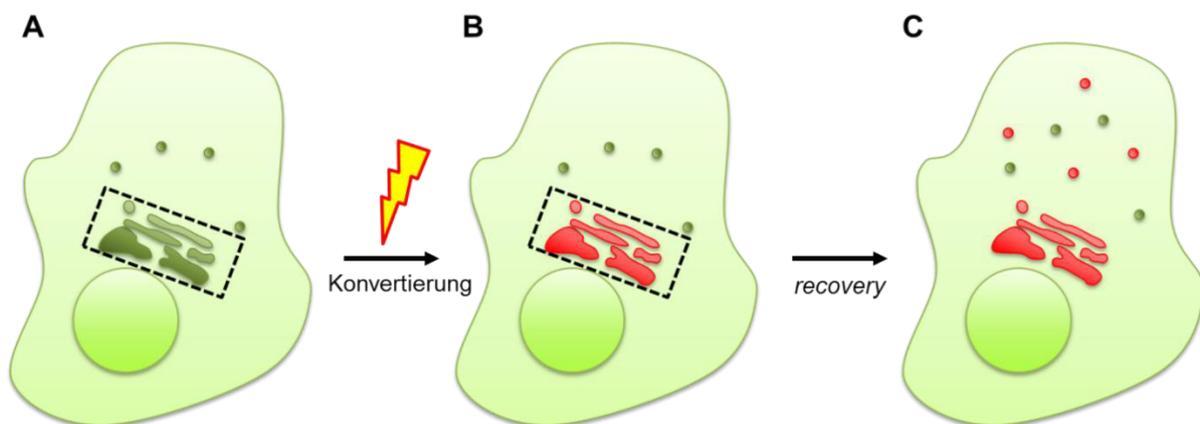


Abb. 5.2 Photokonvertierung von Kaede-Fusionsproteinen

A-B) Nach UV-Bestrahlung des markierten Bereichs des *recycling compartment* wird das Emissionsspektrum von Kaede von grün nach rot verschoben. **C)** Konvertierte (rote) Vesikel verteilen sich anschließend ausgehend vom *recycling compartment* in der gesamten Zelle.

5.5.4 Evaluation der Rekrutierung von Proteinen zum Phagosom

Zur Bestimmung der Rekrutierung von Proteinen zum Phagosom wurde das Verhältnis aus mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI) in einer zirkulären 6 μm Region um das Phagosom sowie einer phagosomfreien Region bestimmt. Für jeden Zeitpunkt wurde der Mittelwert der MFI von 10 z-Ebenen mit Hilfe der Volocity Software gemessen. Ein Phagosom wurde als

positives gezählt, wenn die MFI am Phagosom 20 % höher war als im Kontrollbereich (Phagosomfrei). Zur Quantifizierung der Lamp1-positiven Phagosomen wurden die Zellen für 30 min mit 50 nM LysoTracker (Invitrogen) inkubiert und anschließend mit Lamp1 Antikörper gefärbt. Nur LysoTracker-positive Phagosomen wurden in die Auswertung einbezogen.

5.5.5 Kolokalisationsstudien

Zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisierung von Proteinen, wurden Kolokalisationsstudien durchgeführt. Hierzu wurden die zu untersuchenden Proteine mit spezifischen Primärantikörpern, wie unter 5.5.1 beschrieben, gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Als Auswertemethode wurde die Volocity Software zur Bestimmung des *Pearson's* Korrelationskoeffizienten und des *Mander's* Koeffizienten benutzt [Manders *et al.* 1993]. *Pearson's* Korrelationskoeffizient kann einen Wert von -1 bis +1 einnehmen, wobei ein Wert von null eine zufällige Verteilung und ein Wert von +1 eine vollständige Kolokalisierung impliziert. Bezugnehmend auf publizierte Daten für den *Pearson's* Koeffizienten wird ein Wert zwischen 0,5 und 1,0 als kolokalisierend angesehen. Der *Mander's* Koeffizient kann Werte von 0 bis 1 annehmen, wobei ein Wert größer als 0,5 (ausgewählte Kanäle überlappen in >50 %) als signifikant kolokalisierend betrachtet wird [Zinchuk und Zinchuk 2008]. Vor der Auswertung wurde eine Hintergrundkorrektur für jeden Kanal durchgeführt.

5.5.6 Messung der Phagosomen-Ansäuerung

HUVEC wurden 18 - 24 h vor dem Experiment in die Kavitäten eines 12-Loch μ -Kammer Objektträgers ausgesät. Die Zellen wurden mit 20 μ g/ml pHrodo-Dextran (MW 10.000, Invitrogen) für 15 min bei 37°C inkubiert, anschließend vorsichtig mit warmen PBS gewaschen und mit 1 μ l Invasin-beschichteter Latex-Kügelchen inkubiert. Lebendzellmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem 20-fachen Objektiv angefertigt. Die Fluoreszenzintensität von pHrodo-haltigen Phagosomen wurde nach Korrektur der Hintergrundintensität für jede Bedingung mit Hilfe der Volocity Software bestimmt. Zur Sicherstellung gleicher Mengen pHrodo in den Zellen wurde eine *in situ* Kalibrierung durchgeführt [Chow *et al.* 2004]. Hierzu wurden die Zellen in isotonischer Kaliumlösung pH 4,0 versetzt mit 10 μ g/ml Nigericin (Tocris Bioscience) inkubiert, um die maximale MFI von pHrodo für alle Bedingungen zu bestimmen.

6 Literaturverzeichnis

- Alberts, B., *et al.* (1999). Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. Weinheim, Deutschland, Wiley-VCH.
- Alpuche-Aranda, C. M., *et al.* (1994). Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J Exp Med*, 179(2), pp. 601-8.
- Altschul, R. (1954). Endothelium. Its development, morphology, function and pathology. *The Macmillan Company, New York*, pp.
- Ando, R., *et al.* (2002). An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(20), pp. 12651-6.
- Baek, K., *et al.* (2010). Structure-function study of the N-terminal domain of exocyst subunit Sec3. *J Biol Chem*, 285(14), pp. 10424-33.
- Bajno, L., *et al.* (2000). Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation. *J Cell Biol*, 149(3), pp. 697-706.
- Bao, Y., *et al.* (2008). Snapin interacts with the Exo70 subunit of the exocyst and modulates GLUT4 trafficking. *J Biol Chem*, 283(1), pp. 324-31.
- Beller, D. I., *et al.* (1982). Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor. *J Exp Med*, 156(4), pp. 1000-9.
- Bendezu, F. O., *et al.* (2012). Fission yeast Sec3 and Exo70 are transported on actin cables and localize the exocyst complex to cell poles. *PLoS One*, 7(6), pp. e40248.
- Beron, W., *et al.* (1995). In vitro reconstitution of phagosome-endosome fusion: evidence for regulation by heterotrimeric GTPases. *Arch Biochem Biophys*, 317(2), pp. 337-42.
- Beyenbach, K. W. und Wieczorek, H. (2006). The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp Biol*, 209(Pt 4), pp. 577-89.
- Bhuvanakantham, R., *et al.* (2010). Human Sec3 protein is a novel transcriptional and translational repressor of flavivirus. *Cell Microbiol*, 12(4), pp. 453-72.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7(6), pp. 1513-23.
- Blystone, S. D., *et al.* (1994). Integrin alpha v beta 3 differentially regulates adhesive and phagocytic functions of the fibronectin receptor alpha 5 beta 1. *J Cell Biol*, 127(4), pp. 1129-37.
- Bodemann, B. O., *et al.* (2011). RalB and the exocyst mediate the cellular starvation response by direct activation of autophagosome assembly. *Cell*, 144(2), pp. 253-67.
- Booth, J. W., *et al.* (2001). Membrane dynamics in phagocytosis. *Semin Immunol*, 13(6), pp. 357-64.
- Botelho, R. J. und Grinstein, S. (2011). Phagocytosis. *Curr Biol*, 21(14), pp. R533-8.

- Boyd, C., *et al.* (2004). Vesicles carry most exocyst subunits to exocytic sites marked by the remaining two subunits, Sec3p and Exo70p. *J Cell Biol*, 167(5), pp. 889-901.
- Boyer, J. L. und Crystal, R. G. (2006). Genetic medicine strategies to protect against bioterrorism. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 117, pp. 297-310; discussion 310-1.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, pp. 248-54.
- Braun, V., *et al.* (2004). TI-VAMP/VAMP7 is required for optimal phagocytosis of opsonised particles in macrophages. *Embo J*, 23(21), pp. 4166-76.
- Brodsky, F. M., *et al.* (2001). Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, pp. 517-68.
- Brown, E. J. (1995). Phagocytosis. *Bioessays*, 17(2), pp. 109-17.
- Brown, M. S. und Goldstein, J. L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232(4746), pp. 34-47.
- Brumell, J. H. und Grinstein, S. (2003). Role of lipid-mediated signal transduction in bacterial internalization. *Cell Microbiol*, 5(5), pp. 287-97.
- Bucci, C., *et al.* (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell*, 70(5), pp. 715-28.
- Caron, E. und Hall, A. (1998). Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science*, 282(5394), pp. 1717-21.
- Castellano, F., *et al.* (2001). Actin dynamics during phagocytosis. *Semin Immunol*, 13(6), pp. 347-55.
- Chang, M. H., *et al.* (2002). CD107a (LAMP-1) and CD107b (LAMP-2). *J Biol Regul Homeost Agents*, 16(2), pp. 147-51.
- Chen, Z., *et al.* (2010). EXO70 protein influences dengue virus secretion. *Microbes Infect*, 13(2), pp. 143-50.
- Chow, C. W., *et al.* (2004). Measurements of phagocytosis and phagosomal maturation. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 15, pp. Unit 15 7.
- Christoforidis, S., *et al.* (1999). The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature*, 397(6720), pp. 621-5.
- Collins, R. F., *et al.* (2002). Syntaxins 13 and 7 function at distinct steps during phagocytosis. *J Immunol*, 169(6), pp. 3250-6.
- Cox, D., *et al.* (2000). A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(2), pp. 680-5.
- Curtis, L. M. und Gluck, S. (2005). Distribution of Rab GTPases in mouse kidney and comparison with vacuolar H⁺-ATPase. *Nephron Physiol*, 100(3), pp. p31-42.
- Das, A. und Guo, W. (2011). Rabs and the exocyst in ciliogenesis, tubulogenesis and beyond. *Trends Cell Biol*, 21(7), pp. 383-6.

- Desjardins, M., *et al.* (1994). Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol*, 124(5), pp. 677-88.
- Devitt, A., *et al.* (1998). Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*, 392(6675), pp. 505-9.
- Diakonova, M., *et al.* (2002). Dynamics of cytoskeletal proteins during Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *Mol Biol Cell*, 13(2), pp. 402-11.
- Dong, G., *et al.* (2005). The structures of exocyst subunit Exo70p and the Exo84p C-terminal domains reveal a common motif. *Nat Struct Mol Biol*, 12(12), pp. 1094-100.
- Duclos, S., *et al.* (2000). Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Sci*, 113 Pt 19, pp. 3531-41.
- Dupuy, A. G. und Caron, E. (2008). Integrin-dependent phagocytosis: spreading from microadhesion to new concepts. *J Cell Sci*, 121(Pt 11), pp. 1773-83.
- Elias, M., *et al.* (2003). The exocyst complex in plants. *Cell Biol Int*, 27(3), pp. 199-201.
- Eskelinen, E. L., *et al.* (2003). At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol*, 13(3), pp. 137-45.
- Ezekowitz, R. A., *et al.* (1984). Local opsonization by secreted macrophage complement components. Role of receptors for complement in uptake of zymosan. *J Exp Med*, 159(1), pp. 244-60.
- Fairn, G. D. und Grinstein, S. (2012). How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol*, 33(8), pp. 397-405.
- Fendrych, M., *et al.* (2010). The Arabidopsis exocyst complex is involved in cytokinesis and cell plate maturation. *Plant Cell*, 22(9), pp. 3053-65.
- Feng, Y., *et al.* (2001). Expression and properties of Rab7 in endosome function. *Methods Enzymol*, 329, pp. 175-87.
- Fernandes, M. C., *et al.* (2015). The exocyst is required for trypanosome invasion and the repair of mechanical plasma membrane wounds. *J Cell Sci*, 128(1), pp. 27-32.
- Fielding, C. J. und Fielding, P. E. (1997). Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res*, 38(8), pp. 1503-21.
- Finger, F. P., *et al.* (1998). Sec3p is a spatial landmark for polarized secretion in budding yeast. *Cell*, 92(4), pp. 559-71.
- Flannagan, R. S., *et al.* (2009). Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol*, 7(5), pp. 355-66.
- Flannagan, R. S., *et al.* (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol*, 7, pp. 61-98.
- Folsch, H., *et al.* (2003). The AP-1A and AP-1B clathrin adaptor complexes define biochemically and functionally distinct membrane domains. *J Cell Biol*, 163(2), pp. 351-62.

- Fowler, T., *et al.* (2000). Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur J Cell Biol*, 79(10), pp. 672-9.
- Friedrich, G. A., *et al.* (1997). The secretory protein Sec8 is required for paraxial mesoderm formation in the mouse. *Dev Biol*, 192(2), pp. 364-74.
- Funato, K., *et al.* (1997). Reconstitution of phagosome-lysosome fusion in streptolysin O-permeabilized cells. *J Biol Chem*, 272(26), pp. 16147-51.
- Gagnon, E., *et al.* (2002). Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell*, 110(1), pp. 119-31.
- Garin, J., *et al.* (2001). The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol*, 152(1), pp. 165-80.
- Gaullier, J. M., *et al.* (2000). Interaction of the EEA1 FYVE finger with phosphatidylinositol 3-phosphate and early endosomes. Role of conserved residues. *J Biol Chem*, 275(32), pp. 24595-600.
- Ge, Z., *et al.* (2008). In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cell Microbiol*, 10(8), pp. 1599-607.
- Gordon, A. H., *et al.* (1980). Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature*, 286(5768), pp. 79-80.
- Gotthardt, D., *et al.* (2006). Proteomics fingerprinting of phagosome maturation and evidence for the role of a Galpha during uptake. *Mol Cell Proteomics*, 5(12), pp. 2228-43.
- Grant, RT., *et al.* (1927-1929). Heart valve irregularities in relation to subacute bacterial endocarditis. *Heart*, 14, pp. 247-261.
- Grant, S. G., *et al.* (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(12), pp. 4645-9.
- Greenberg, S., *et al.* (1991). Ca(2+)-independent F-actin assembly and disassembly during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J Cell Biol*, 113(4), pp. 757-67.
- Griffin, F. M., Jr., *et al.* (1975). Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. *J Exp Med*, 142(5), pp. 1263-82.
- Grindstaff, K. K., *et al.* (1998). Sec6/8 complex is recruited to cell-cell contacts and specifies transport vesicle delivery to the basal-lateral membrane in epithelial cells. *Cell*, 93(5), pp. 731-40.
- Gromley, A., *et al.* (2005). Centriolin anchoring of exocyst and SNARE complexes at the midbody is required for secretory-vesicle-mediated abscission. *Cell*, 123(1), pp. 75-87.
- Grote, E., *et al.* (2000). Ordering the final events in yeast exocytosis. *J Cell Biol*, 151(2), pp. 439-52.

- Guichard, A., *et al.* (2013). Cholera toxin disrupts barrier function by inhibiting exocyst-mediated trafficking of host proteins to intestinal cell junctions. *Cell Host Microbe*, 14(3), pp. 294-305.
- Guichard, A., *et al.* (2010). Anthrax toxins cooperatively inhibit endocytic recycling by the Rab11/Sec15 exocyst. *Nature*, 467(7317), pp. 854-8.
- Guo, W., *et al.* (1999). The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *Embo J*, 18(4), pp. 1071-80.
- Guo, W., *et al.* (2001). Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nat Cell Biol*, 3(4), pp. 353-60.
- Gutierrez, M. G. (2013). Functional role(s) of phagosomal Rab GTPases. *Small GTPases*, 4(3), pp. 148-58.
- Hackam, D. J., *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(47), pp. 29810-20.
- Hala, M., *et al.* (2008). An exocyst complex functions in plant cell growth in Arabidopsis and tobacco. *Plant Cell*, 20(5), pp. 1330-45.
- Hamburger, Z. A., *et al.* (2006). Crystal structure of the *S.cerevisiae* exocyst component Exo70p. *J Mol Biol*, 356(1), pp. 9-21.
- Hamill, R. J., *et al.* (1986). Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect Immun*, 54(3), pp. 833-6.
- Hazuka, C. D., *et al.* (1999). The sec6/8 complex is located at neurite outgrowth and axonal synapse-assembly domains. *J Neurosci*, 19(4), pp. 1324-34.
- He, B. und Guo, W. (2009). The exocyst complex in polarized exocytosis. *Curr Opin Cell Biol*, 21(4), pp. 537-42.
- He, B., *et al.* (2007). Exo70 interacts with phospholipids and mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane. *Embo J*, 26(18), pp. 4053-65.
- Heider, M. R. und Munson, M. (2012). Exorcising the exocyst complex. *Traffic*, 13(7), pp. 898-907.
- Heise, T. und Dersch, P. (2006). Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(9), pp. 3375-80.
- Herant, M., *et al.* (2006). Mechanics of neutrophil phagocytosis: experiments and quantitative models. *J Cell Sci*, 119(Pt 9), pp. 1903-13.
- Hertzog, M. und Chavrier, P. (2011). Cell polarity during motile processes: keeping on track with the exocyst complex. *Biochem J*, 433(3), pp. 403-9.
- Hinshaw, J. E. (2000). Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16, pp. 483-519.
- Holevinsky, K. O. und Nelson, D. J. (1998). Membrane capacitance changes associated with particle uptake during phagocytosis in macrophages. *Biophys J*, 75(5), pp. 2577-86.

- Hsu, S. C., *et al.* (1999). Targeting vesicles to specific sites on the plasma membrane: the role of the sec6/8 complex. *Trends Cell Biol*, 9(4), pp. 150-3.
- Hsu, S. C., *et al.* (1998). Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. *Neuron*, 20(6), pp. 1111-22.
- Hsu, S. C., *et al.* (1996). The mammalian brain rsec6/8 complex. *Neuron*, 17(6), pp. 1209-19.
- Hurtado-Lorenzo, A., *et al.* (2006). V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. *Nat Cell Biol*, 8(2), pp. 124-36.
- Husebye, H., *et al.* (2010). The Rab11a GTPase controls Toll-like receptor 4-induced activation of interferon regulatory factor-3 on phagosomes. *Immunity*, 33(4), pp. 583-96.
- Hutagalung, A. H. und Novick, P. J. (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev*, 91(1), pp. 119-49.
- Huynh, K. K., *et al.* (2007). Fusion, fission, and secretion during phagocytosis. *Physiology (Bethesda)*, 22, pp. 366-72.
- Indik, Z. K., *et al.* (1992). Human Fc gamma RII: the structure of the Fc gamma RII cytosolic domain governs phagocytic function. *Trans Assoc Am Physicians*, 105, pp. 214-21.
- Inoue, M., *et al.* (2003). The exocyst complex is required for targeting of Glut4 to the plasma membrane by insulin. *Nature*, 422(6932), pp. 629-33.
- Isberg, R. R., *et al.* (2000). Signaling and invasin-promoted uptake via integrin receptors. *Microbes Infect*, 2(7), pp. 793-801.
- Isberg, R. R. und Leong, J. M. (1990). Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell*, 60(5), pp. 861-71.
- Jaffe, E. A., *et al.* (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*, 52(11), pp. 2745-56.
- Janeway, C. A., Jr. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today*, 13(1), pp. 11-6.
- Jutras, I., *et al.* (2008). Modulation of the phagosome proteome by interferon-gamma. *Mol Cell Proteomics*, 7(4), pp. 697-715.
- Kinchen, J. M. und Ravichandran, K. S. (2008). Phagosome maturation: going through the acid test. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(10), pp. 781-95.
- Kirby, J. E. (2004). Anthrax lethal toxin induces human endothelial cell apoptosis. *Infect Immun*, 72(1), pp. 430-9.
- Kornfeld, S. und Mellman, I. (1989). The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol*, 5, pp. 483-525.
- Krajewska, W. M. und Maslowska, I. (2004). Caveolins: structure and function in signal transduction. *Cell Mol Biol Lett*, 9(2), pp. 195-220.

- Krut, O., *et al.* (2003). Strain-specific association of cytotoxic activity and virulence of clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Infect Immun*, 71(5), pp. 2716-23.
- Kuusela, P. (1978). Fibronectin binds to *Staphylococcus aureus*. *Nature*, 276(5689), pp. 718-20.
- Lalli, G. und Hall, A. (2005). Ral GTPases regulate neurite branching through GAP-43 and the exocyst complex. *J Cell Biol*, 171(5), pp. 857-69.
- Laschke, M. W., *et al.* (2005). Intravital fluorescence microscopy: a novel tool for the study of the interaction of *Staphylococcus aureus* with the microvascular endothelium in vivo. *J Infect Dis*, 191(3), pp. 435-43.
- Lawe, D. C., *et al.* (2000). The FYVE domain of early endosome antigen 1 is required for both phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 binding. Critical role of this dual interaction for endosomal localization. *J Biol Chem*, 275(5), pp. 3699-705.
- Leiva, N., *et al.* (2006). Reconstitution of recycling from the phagosomal compartment in streptolysin O-permeabilized macrophages: role of Rab11. *Exp Cell Res*, 312(10), pp. 1843-55.
- Lemichez, E., *et al.* (2010). Breaking the wall: targeting of the endothelium by pathogenic bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 8(2), pp. 93-104.
- Lennon-Dumenil, A. M., *et al.* (2002). Analysis of protease activity in live antigen-presenting cells shows regulation of the phagosomal proteolytic contents during dendritic cell activation. *J Exp Med*, 196(4), pp. 529-40.
- Liu, J. und Guo, W. (2011). The exocyst complex in exocytosis and cell migration. *Protoplasma*, 249(3), pp. 587-97.
- Liu, J., *et al.* (2009). The role of the exocyst in matrix metalloproteinase secretion and actin dynamics during tumor cell invadopodia formation. *Mol Biol Cell*, 20(16), pp. 3763-71.
- Liu, J., *et al.* (2007). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane for exocytosis in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 18(11), pp. 4483-92.
- Lock, J. G. und Stow, J. L. (2005). Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Mol Biol Cell*, 16(4), pp. 1744-55.
- Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 339(8), pp. 520-32.
- Lowy, F. D. (2000). Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? *Trends Microbiol*, 8(8), pp. 341-3.
- Lukacs, G. L., *et al.* (1990). Phagosomal acidification is mediated by a vacuolar-type H(+)-ATPase in murine macrophages. *J Biol Chem*, 265(34), pp. 21099-107.
- Manders, EMM., *et al.* (1993). Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J Microsc*, 169, pp. 375-382.
- Marshall, J. G., *et al.* (2001). Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *J Cell Biol*, 153(7), pp. 1369-80.

- Matern, H. T., *et al.* (2001). The Sec6/8 complex in mammalian cells: characterization of mammalian Sec3, subunit interactions, and expression of subunits in polarized cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(17), pp. 9648-53.
- Mehta, S. Q., *et al.* (2005). Mutations in *Drosophila* sec15 reveal a function in neuronal targeting for a subset of exocyst components. *Neuron*, 46(2), pp. 219-32.
- Metchnikoff, È. (1884). Über die Beziehung der Phagozyten zu Milzbrandbacillen. *Arch. Pathol. Anat.*, 97, pp. 502-526.
- Miki, T., *et al.* (2004). Characterization of Salmonella pathogenicity island 1 type III secretion-dependent hemolytic activity in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Microb Pathog*, 37(2), pp. 65-72.
- Mizuno-Yamasaki, E., *et al.* (2012). GTPase networks in membrane traffic. *Annu Rev Biochem*, 81, pp. 637-59.
- Moffatt, B. A. und Studier, F. W. (1987). T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell*, 49(2), pp. 221-7.
- Mohammadi, S. und Isberg, R. R. (2013). Cdc42 interacts with the exocyst complex to promote phagocytosis. *J Cell Biol*, 200(1), pp. 81-93.
- Moore, B. A., *et al.* (2007). The crystal structure of mouse Exo70 reveals unique features of the mammalian exocyst. *J Mol Biol*, 371(2), pp. 410-21.
- Mourez, M. (2004). Anthrax toxins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 152, pp. 135-64.
- Munson, M. und Novick, P. (2006). The exocyst defrocked, a framework of rods revealed. *Nat Struct Mol Biol*, 13(7), pp. 577-81.
- Murray, J. T., *et al.* (2002). Role of Rab5 in the recruitment of hVps34/p150 to the early endosome. *Traffic*, 3(6), pp. 416-27.
- Murthy, M., *et al.* (2003). Mutations in the exocyst component Sec5 disrupt neuronal membrane traffic, but neurotransmitter release persists. *Neuron*, 37(3), pp. 433-47.
- Murthy, M., *et al.* (2005). Sec6 mutations and the *Drosophila* exocyst complex. *J Cell Sci*, 118(Pt 6), pp. 1139-50.
- Nichols, C. D. und Casanova, J. E. (2010). Salmonella-directed recruitment of new membrane to invasion foci via the host exocyst complex. *Curr Biol*, 20(14), pp. 1316-20.
- Niedergang, F. und Chavrier, P. (2004). Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. *Curr Opin Cell Biol*, 16(4), pp. 422-8.
- Niedergang, F., *et al.* (2003). ADP ribosylation factor 6 is activated and controls membrane delivery during phagocytosis in macrophages. *J Cell Biol*, 161(6), pp. 1143-50.
- Nitsche-Schmitz, D. P., *et al.* (2007). Invasion mechanisms of Gram-positive pathogenic cocci. *Thromb Haemost*, 98(3), pp. 488-96.
- Novick, P., *et al.* (1981). Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell*, 25(2), pp. 461-9.

- Novick, P., *et al.* (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell*, 21(1), pp. 205-15.
- Oztan, A., *et al.* (2007). Exocyst requirement for endocytic traffic directed toward the apical and basolateral poles of polarized MDCK cells. *Mol Biol Cell*, 18(10), pp. 3978-92.
- Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, 189(4200), pp. 347-58.
- Palade, G. E. (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem*, 1(4), pp. 188-211.
- Parton, R. G. (1996). Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol*, 8(4), pp. 542-8.
- Peacock, S. J., *et al.* (1999). Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiology*, 145 (Pt 12), pp. 3477-86.
- Pecenkova, T., *et al.* (2011). The role for the exocyst complex subunits Exo70B2 and Exo70H1 in the plant-pathogen interaction. *J Exp Bot*, 62(6), pp. 2107-16.
- Peplowska, K., *et al.* (2007). The CORVET tethering complex interacts with the yeast Rab5 homolog Vps21 and is involved in endo-lysosomal biogenesis. *Dev Cell*, 12(5), pp. 739-50.
- Pfeffer, S. R. (1996). Transport vesicle docking: SNAREs and associates. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12, pp. 441-61.
- Pitt, A., *et al.* (1992). Assays for phagosome-endosome fusion and phagosome protein recycling. *Methods Enzymol*, 219, pp. 21-31.
- Plemel, R. L., *et al.* (2011). Subunit organization and Rab interactions of Vps-C protein complexes that control endolysosomal membrane traffic. *Mol Biol Cell*, 22(8), pp. 1353-63.
- Prigent, M., *et al.* (2003). ARF6 controls post-endocytic recycling through its downstream exocyst complex effector. *J Cell Biol*, 163(5), pp. 1111-21.
- Procter, RA., *et al.* (1982). Fibronectin binding to *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 257, pp. 14788-94.
- Rabinovitch, M. (1995). Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol*, 5(3), pp. 85-7.
- Ren, M., *et al.* (1998). Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11), pp. 6187-92.
- Riedl, J., *et al.* (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods*, 5(7), pp. 605-7.
- Rivera-Molina, F. und Toomre, D. (2013). Live-cell imaging of exocyst links its spatiotemporal dynamics to various stages of vesicle fusion. *J Cell Biol*, 201(5), pp. 673-80.
- Rogers, L. D. und Foster, L. J. (2007). The dynamic phagosomal proteome and the contribution of the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(47), pp. 18520-5.

- Rosse, C., *et al.* (2009). An aPKC-exocyst complex controls paxillin phosphorylation and migration through localised JNK1 activation. *PLoS Biol*, 7(11), pp. e1000235.
- Roumanie, O., *et al.* (2005). Rho GTPase regulation of exocytosis in yeast is independent of GTP hydrolysis and polarization of the exocyst complex. *J Cell Biol*, 170(4), pp. 583-94.
- Sakurai-Yageta, M., *et al.* (2008). The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is required for tumor cell invasion downstream of Cdc42 and RhoA. *J Cell Biol*, 181(6), pp. 985-98.
- Sans, N., *et al.* (2003). NMDA receptor trafficking through an interaction between PDZ proteins and the exocyst complex. *Nat Cell Biol*, 5(6), pp. 520-30.
- Schmid, S. L. (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem*, 66, pp. 511-48.
- Schmid, S. L. (2010). Clathrin-mediated endocytosis: a universe of new questions. *Mol Biol Cell*, 21(22), pp. 3818-9.
- Schommer, N. N., *et al.* (2011). Staphylococcus epidermidis uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A.1. *Infect Immun*, 79(6), pp. 2267-76.
- Schroder, A., *et al.* (2006). Live cell imaging of phagosome maturation in Staphylococcus aureus infected human endothelial cells: small colony variants are able to survive in lysosomes. *Med Microbiol Immunol*, 195(4), pp. 185-94.
- Schroder, A., *et al.* (2006). Staphylococcus aureus fibronectin binding protein-A induces motile attachment sites and complex actin remodeling in living endothelial cells. *Mol Biol Cell*, 17(12), pp. 5198-210.
- Segev, Nava (2009). Trafficking inside cells : pathways, mechanisms, and regulation. Austin, Texas, New York N.Y., Landes Bioscience; Springer Science+Business Media.
- Segui-Simarro, J. M., *et al.* (2004). Electron tomographic analysis of somatic cell plate formation in meristematic cells of Arabidopsis preserved by high-pressure freezing. *Plant Cell*, 16(4), pp. 836-56.
- Serda, R. E., *et al.* (2009). The association of silicon microparticles with endothelial cells in drug delivery to the vasculature. *Biomaterials*, 30(13), pp. 2440-8.
- Seto, S., *et al.* (2011). Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes. *Traffic*, 12(4), pp. 407-20.
- Sever, S., *et al.* (2000). Garrotes, springs, ratchets, and whips: putting dynamin models to the test. *Traffic*, 1(5), pp. 385-92.
- Sherer, N. M., *et al.* (2003). Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic*, 4(11), pp. 785-801.
- Sieling, P. A. und Modlin, R. L. (2002). Toll-like receptors: mammalian "taste receptors" for a smorgasbord of microbial invaders. *Curr Opin Microbiol*, 5(1), pp. 70-5.
- Sinha, B., *et al.* (1999). Fibronectin-binding protein acts as Staphylococcus aureus invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cell Microbiol*, 1(2), pp. 101-17.

- Sinha, B., *et al.* (2000). Heterologously expressed Staphylococcus aureus fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect Immun*, 68(12), pp. 6871-8.
- Sinha, B. und Herrmann, M. (2005). Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by Staphylococcus aureus. *Thromb Haemost*, 94(2), pp. 266-77.
- Sivaram, M. V., *et al.* (2006). The structure of the exocyst subunit Sec6p defines a conserved architecture with diverse roles. *Nat Struct Mol Biol*, 13(6), pp. 555-6.
- Smart, E. J., *et al.* (1999). Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol*, 19(11), pp. 7289-304.
- Smith, A. C., *et al.* (2007). A network of Rab GTPases controls phagosome maturation and is modulated by Salmonella enterica serovar Typhimurium. *J Cell Biol*, 176(3), pp. 263-8.
- Songer, J. A. und Munson, M. (2009). Sec6p anchors the assembled exocyst complex at sites of secretion. *Mol Biol Cell*, 20(3), pp. 973-82.
- Sottile, J. und Chandler, J. (2005). Fibronectin matrix turnover occurs through a caveolin-1-dependent process. *Mol Biol Cell*, 16(2), pp. 757-68.
- Stahl, P. D. und Ezekowitz, R. A. (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol*, 10(1), pp. 50-5.
- Stegmann, M., *et al.* (2012). The ubiquitin ligase PUB22 targets a subunit of the exocyst complex required for PAMP-triggered responses in Arabidopsis. *Plant Cell*, 24(11), pp. 4703-16.
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(8), pp. 513-25.
- Stuart, L. M., *et al.* (2007). A systems biology analysis of the Drosophila phagosome. *Nature*, 445(7123), pp. 95-101.
- Stuart, L. M. und Ezekowitz, R. A. (2005). Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity*, 22(5), pp. 539-50.
- Sturgill-Koszycki, S., *et al.* (1996). Mycobacterium-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *Embo J*, 15(24), pp. 6960-8.
- Sun-Wada, G. H., *et al.* (2009). Direct recruitment of H⁺-ATPase from lysosomes for phagosomal acidification. *J Cell Sci*, 122(Pt 14), pp. 2504-13.
- Swanson, J. A. (2008). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(8), pp. 639-49.
- Swanson, J. A. und Hoppe, A. D. (2004). The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol*, 76(6), pp. 1093-103.
- Takahashi, S., *et al.* (2012). Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane. *J Cell Sci*, 125(Pt 17), pp. 4049-57.
- Takamori, S., *et al.* (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*, 127(4), pp. 831-46.

- Taylor, R. G., *et al.* (1993). E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res*, 21(7), pp. 1677-8.
- TerBush, D. R., *et al.* (1996). The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, 15(23), pp. 6483-94.
- TerBush, D. R. und Novick, P. (1995). Sec6, Sec8, and Sec15 are components of a multisubunit complex which localizes to small bud tips in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 130(2), pp. 299-312.
- Thapa, N., *et al.* (2012). Phosphoinositide signaling regulates the exocyst complex and polarized integrin trafficking in directionally migrating cells. *Dev Cell*, 22(1), pp. 116-30.
- Ting, A. E., *et al.* (1995). rSec6 and rSec8, mammalian homologs of yeast proteins essential for secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(21), pp. 9613-7.
- Tollis, S., *et al.* (2010). The zipper mechanism in phagocytosis: energetic requirements and variability in phagocytic cup shape. *BMC Syst Biol*, 4, pp. 149.
- Tournier, J. N., *et al.* (2007). Contribution of toxins to the pathogenesis of inhalational anthrax. *Cell Microbiol*, 9(3), pp. 555-65.
- Tran Van Nhieu, G. und Isberg, R. R. (1993). Bacterial internalization mediated by beta 1 chain integrins is determined by ligand affinity and receptor density. *Embo J*, 12(5), pp. 1887-95.
- Trost, M., *et al.* (2009). The phagosomal proteome in interferon-gamma-activated macrophages. *Immunity*, 30(1), pp. 143-54.
- Tsang, A. W., *et al.* (2000). Altered membrane trafficking in activated bone marrow-derived macrophages. *J Leukoc Biol*, 68(4), pp. 487-94.
- Tuijnman, W. B., *et al.* (1992). Human low-affinity IgG receptor Fc gamma RIIa (CD32) introduced into mouse fibroblasts mediates phagocytosis of sensitized erythrocytes. *Blood*, 79(7), pp. 1651-6.
- Underhill, D. M. und Ozinsky, A. (2002). Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol*, 20, pp. 825-52.
- Valbuena, G. und Walker, D. H. (2006). The endothelium as a target for infections. *Annu Rev Pathol*, 1, pp. 171-98.
- Vann, J. M. und Proctor, R. A. (1987). Ingestion of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells results in time- and inoculum-dependent damage to endothelial cell monolayers. *Infect Immun*, 55(9), pp. 2155-63.
- Vann, J. M. und Proctor, R. A. (1988). Cytotoxic effects of ingested *Staphylococcus aureus* on bovine endothelial cells: role of *S. aureus* alpha-hemolysin. *Microb Pathog*, 4(6), pp. 443-53.
- Vega, I. E. und Hsu, S. C. (2001). The exocyst complex associates with microtubules to mediate vesicle targeting and neurite outgrowth. *J Neurosci*, 21(11), pp. 3839-48.
- Vieira, O. V., *et al.* (2003). Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol*, 23(7), pp. 2501-14.

- Vinet, A. F. und Descoteaux, A. (2009). Large scale phagosome preparation. *Methods Mol Biol*, 531, pp. 329-46.
- Vitelli, R., *et al.* (1997). Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway. *J Biol Chem*, 272(7), pp. 4391-7.
- Vonderheit, A. und Helenius, A. (2005). Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS Biol*, 3(7), pp. e233.
- Wang, S. und Hsu, S. C. (2006). The molecular mechanisms of the mammalian exocyst complex in exocytosis. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 5), pp. 687-90.
- Wang, S., *et al.* (2004). The mammalian exocyst, a complex required for exocytosis, inhibits tubulin polymerization. *J Biol Chem*, 279(34), pp. 35958-66.
- Watanakunakorn, C., *et al.* (1973). Some salient features of Staphylococcus aureus endocarditis. *Am J Med*, 54(4), pp. 473-81.
- Watarai, M., *et al.* (2001). Legionella pneumophila is internalized by a macropinocytotic uptake pathway controlled by the Dot/Icm system and the mouse Lgn1 locus. *J Exp Med*, 194(8), pp. 1081-96.
- Welch, M. D. und Mullins, R. D. (2002). Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 18, pp. 247-88.
- Welsh, M.J., *et al.* (1974). Phagocytosis by cultured human endothelial cells. *Federation Proceedings*, 33(632), pp. Abstract#2388.
- Whyte, J. R. und Munro, S. (2002). Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J Cell Sci*, 115(Pt 13), pp. 2627-37.
- Wiedemann, A., *et al.* (2001). Yersinia enterocolitica invasin triggers phagocytosis via beta1 integrins, CDC42Hs and WASp in macrophages. *Cell Microbiol*, 3(10), pp. 693-702.
- Williams, T. M., *et al.* (2004). Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis in vivo. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase (MMP-2/9) secretion. *J Biol Chem*, 279(49), pp. 51630-46.
- Wu, H., *et al.* (2010). The Exo70 subunit of the exocyst is an effector for both Cdc42 and Rho3 function in polarized exocytosis. *Mol Biol Cell*, 21(3), pp. 430-42.
- Wu, S., *et al.* (2005). Sec15 interacts with Rab11 via a novel domain and affects Rab11 localization in vivo. *Nat Struct Mol Biol*, 12(10), pp. 879-85.
- Wyssokowitsch (1886). Experimental Endocarditis. *Am J Cardiology*, pp.
- Yamada, E. (1955). The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol*, 1(5), pp. 445-58.
- Yamashita, M., *et al.* (2010). Structural basis for the Rho- and phosphoinositide-dependent localization of the exocyst subunit Sec3. *Nat Struct Mol Biol*, 17(2), pp. 180-6.
- Yang, Z. und Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 22(2), pp. 124-31.

- Yates, R. M., *et al.* (2007). Macrophage activation downregulates the degradative capacity of the phagosome. *Traffic*, 8(3), pp. 241-50.
- Yeaman, C., *et al.* (2001). Sec6/8 complexes on trans-Golgi network and plasma membrane regulate late stages of exocytosis in mammalian cells. *J Cell Biol*, 155(4), pp. 593-604.
- Yu, I. M. und Hughson, F. M. (2010). Tethering factors as organizers of intracellular vesicular traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 26, pp. 137-56.
- Zachos, C., *et al.* (2012). A critical histidine residue within LIMP-2 mediates pH sensitive binding to its ligand beta-glucocerebrosidase. *Traffic*, 13(8), pp. 1113-23.
- Zhang, X., *et al.* (2001). Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion. *J Biol Chem*, 276(50), pp. 46745-50.
- Zhang, X. M., *et al.* (2004). Sec15 is an effector for the Rab11 GTPase in mammalian cells. *J Biol Chem*, 279(41), pp. 43027-34.
- Zhang, X., *et al.* (2008). Membrane association and functional regulation of Sec3 by phospholipids and Cdc42. *J Cell Biol*, 180(1), pp. 145-58.
- Zhang, X., *et al.* (2005). The critical role of Exo84p in the organization and polarized localization of the exocyst complex. *J Biol Chem*, 280(21), pp. 20356-64.
- Zinchuk, V. und Zinchuk, O. (2008). Quantitative colocalization analysis of confocal fluorescence microscopy images. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 4, pp. Unit 4 19.
- Zuo, X., *et al.* (2006). Exo70 interacts with the Arp2/3 complex and regulates cell migration. *Nat Cell Biol*, 8(12), pp. 1383-8.

7 Zusammenfassung

Endothelzellen kleiden als einlagige Zellschicht alle Blut- und Lymphgefäße aus und stellen somit eine wichtige Barriere zwischen dem intravaskulären und extrazellulären Raum dar. Durch ihre Lage besitzen sie auch eine zentrale Bedeutung in der Abwehr von Mikroorganismen. Obwohl Endothelzellen zu den „nicht-professionellen“ Phagozyten zählen, besitzen sie eine hohe bakterizide Aktivität. Nach Internalisierung von Mikroorganismen werden diese in endothelialen Phagosomen eingeschlossen, welche nach Interaktion mit Bestandteilen des Endo-Lysosomalen Kompartiments zu Phagolysosomen reifen und ihren bakteriellen Inhalt degradieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von Phagosomen mit Proteinen des Exocyst-Komplexes in Endothelzellen untersucht und die Beteiligung dieses *tethering*-Komplexes bei der Reifung der Staphylokokken- und Polystyrol-Kügelchen-haltigen Phagosomen charakterisiert. Mittels biochemischer und mikroskopischer Methoden wurde die Interaktion von Exocyst-Proteinen (Sec5, Sec8, Sec10 und Exo70) und Markerproteinen für *recycling endosomes*, Rab11 und Transferrin-Rezeptor, mit Phagosomen verschiedener Reifestadien nachgewiesen. Durch *knockdown* der Exocyst-Proteine, Sec8 und Exo70, wurde eine verringerte Akkumulation von Rab11-positiven Vesikeln am Phagosom detektiert, wodurch maßgeblich die phagosomale Reifung beeinträchtigt wurde. Besonders deutlich konnte der Einfluss des Exocysten und der *recycling endosomes* auf die Phagosomenreifung durch Untersuchung der Ansäuerung der Phagosomen dargestellt werden. So führte die Depletion von Rab11 und Exocyst-Proteinen zu einer verminderten Ansäuerung der Phagosomen. Vermutlich dadurch wurde ebenfalls die Rekrutierung des phagolysosomalen Markerproteins Lamp1 zum Phagosom reduziert. Aufgrund der oben aufgezeigten Ergebniskette ergab sich als Konsequenz, dass der *knockdown* von Exocyst und *recycling endosomes* eine signifikante Beeinträchtigung des Abbaus von invadierten Staphylokokken in Endothelzellen hervorrief. Interessanterweise konnte der inhibitorische Einfluss von Exo70 auf die bakterielle Degradationsleistung durch Überexpression von konstitutiv-aktivem Rab11 (Rab11-Q70L) erfolgreich aufgehoben werden. Die Daten dieser Arbeiten zeigen damit, dass der Exocyst-Komplex die Interaktion von *recycling endocytic vesicles* mit dem Phagosom steuert und dadurch maßgeblich die Reifung und Funktionsweise der Phagosomen in Endothelzellen beeinflusst.

8 Abstract

Endothelial cells line the inner surface of all blood- and lymphatic vessels and thus represent a crucial barrier between the bloodstream and the surrounding tissue. Due to their localization, endothelial cells are also important for the cellular defense against microorganisms. Although they belong to the class of non-professional phagocytes, endothelial cells feature a high bactericidal activity. Internalized pathogens are enclosed in the endothelial cell phagosomes which mature via sequential interaction with components of the endo-lysosomal compartment and are finally degraded in the matured phagolysosomes. In this study, the interaction between phagosomes and the exocyst complex in endothelial cells was analyzed. Specifically, the role of this tethering complex during maturation of Staphylococci- and latex beads containing phagosomes was addressed. Using advanced imaging methods, the colocalization of exocyst proteins (Sec5, Sec8, Sec10 and Exo70) with marker proteins of recycling endosomes, Rab11 and transferrin receptor, was visualized during the phagosomal maturation process. A knockdown of the exocyst proteins Sec8 and Exo70 resulted in decreased accumulation of Rab11-positive vesicles at the phagosomes, which greatly reduced the phagosomal maturation. The strongest effect of the tethering proteins and recycling endosomes could be detected by analyzing the acidification of phagosomes. Knockdown of Rab11 and exocyst proteins reduced phagosomal acidification significantly and led to an impaired localization of Lamp1 to the phagolysosomes. As a consequence knockdown of exocyst and recycling endosomes significantly restrained elimination of internalized Staphylococci in endothelial cells. Intriguingly, the inhibition of bacterial degradation by Exo70 knockdown was rescued by the overexpression of a constitutively active Rab11 mutant (Rab11-Q70L). These results indicate that the exocyst complex controls the interaction of recycling endocytic vesicles with the phagosome and that this interaction is required for phagosome maturation in endothelial cells.

9 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
Cdc42	<i>Cell division cycle 42 GTP binding protein</i>
CFU	<i>Colony forming unit</i> (Kolonie-bildende Einheiten)
cm	Zentimeter
D	Deutschland
ddH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECGM	<i>Endothelial cell growth medium</i> (Endotheliales Wachstumsmedium)
EDTA	<i>Ethylendiamin Tetraacetic acid</i>
Em	Emission
EM-CCD	<i>Electron multiplier charge coupled device</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
Ex	Extinktion
FA	Formaldehyd
F-Aktin	Filamentöses Aktin
FKS	Fetales Kälberserum
FnBPA/B	Fibronectin-bindendes Protein A/B
FP	Frühes Phagosom
g	Gramm
G	Relative Zentrifugalkraft
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunden
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i> (primäre humane Endothelzellen)
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
ITPG	Isopropyl-β-D-1-Thiogalactopyranosid
kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAMP	<i>Lysosome-Associated Membrane Protein</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
M	Molar
MeOH	Methanol

MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i> (mittlere Fluoreszenzintensität)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MRSA	Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i>
n.d.	nicht definiert
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
Ply	Phagolysosom
PNS	<i>Post nuclear supernatant</i> (Postnukleärer Überstand)
PVDF	Polyvinylidene Fluorid
RE	<i>Recycling endosomes</i>
RNA	Ribnonukleinsäure
s	Sekunde
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. carnosus</i>	<i>Staphylococcus carnosus</i>
SCV	<i>Small colony variants</i>
SD	<i>Standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SNARE	<i>Soluble NSF Attachment Protein Receptor</i>
SP	Spätes Phagosom
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N-N',N'-Tetramethylethyldiamin
TfR	Transferrin Rezeptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane
TSB	<i>Tryptic soy broth</i>
U	Unit
UK	United Kingdom
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
USA	United States of America
V	Volt
v/v	<i>Volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
w/v	<i>Weight per volume</i> (Masse pro Volumen)

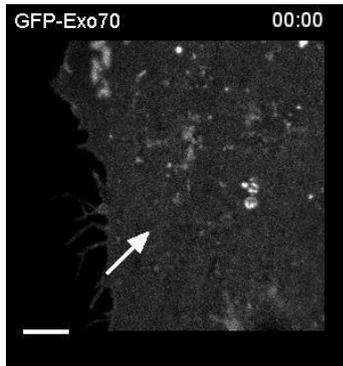
10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Stadien der Phagozytose	8
Abb. 1.2	Modell des Reißverschluss-Mechanismus während der Phagozytose.....	10
Abb. 1.3	Die vier Hauptstadien während der Phagosomenreifung.....	11
Abb. 1.4	Funktionen des Exocyst in verschiedenen Prozessen von ein- und mehrzelligen Organismen	20
Abb. 2.1	Internalisierung von Invasin- und FnBPA beschichteten Partikeln in primäre humane Endothelzellen (HUVEC) und Effekte auf die Aktin- und Integrinrekrutierung	27
Abb. 2.2	Biphasische Rekrutierung von Exo70 und Sec10 zu Invasinbeschichteten Kügelchen	29
Abb. 2.3	Bestimmung der Reifungsstadien von Phagosomen in Endothelzellen	30
Abb. 2.4	Lokalisierung des Exocyst an frühen und späten Phagosomen sowie Phagolysosomen.....	31
Abb. 2.5	Exocyst-Proteine sind mit aufgereinigten Phagosomen assoziiert.....	32
Abb. 2.6	Exocyst-haltige Endosomen interagieren mit endothelialen Phagosomen.....	33
Abb. 2.7	Exocyst kolokalisiert mit <i>recycling endosomes</i>	35
Abb. 2.8	Exocyst kolokalisiert mit <i>recycling endosomes</i> am Phagosom	36
Abb. 2.9	3D-Rekonstruktion von Exo70 und TfR am Phagosom	37
Abb. 2.10	Ko-Rekrutierung von Exocyst und <i>recycling endosomes</i> zum Phagosom.....	38
Abb. 2.11	Der <i>knockdown</i> von Exocyst beeinträchtigt die Reifung von Phagolysosomen mit in Endothelzellen	39
Abb. 2.12	Der <i>knockdown</i> von Exocysten beeinträchtigt die Rekrutierung von <i>recycling endosomes</i> zum Phagosom	40
Abb. 2.13	Verringerte Assoziation von Exocyst mit späten Phagosomen nach Rab11 <i>knockdown</i>	40
Abb. 2.14	Rekrutierung von Exocyst zum Phagosom induziert Ansäuerung.....	42
Abb. 2.15	Der <i>knockdown</i> von Exocyst und Rab11 beeinträchtigt die Ansäuerung von Phagosomen in Endothelzellen	43
Abb. 2.16	<i>Knockdown</i> von Sec8 und Exo70 reduzieren deutlich den bakteriellen Abbau	44
Abb. 2.17	Die Inhibition von Rab11 beeinträchtigt den bakteriellen Abbau	45
Abb. 2.18	Exo70 und Rab11 regulieren die bakterielle Degradation über gleiche Signalwege	46
Abb. 3.1	Modell der Interaktion von Exocyst und <i>recycling endocytic vesicles</i> mit dem reifenden Phagosom.....	55
Abb. 4.1	Protein- und DNS-Leiter.....	64
Abb. 5.1	Aufreinigung von Phagosomen mittels Dichtegradientenzentrifugation	76
Abb. 5.2	Photokonvertierung von Kaede-Fusionsproteinen	80

11 Tabellenverzeichnis

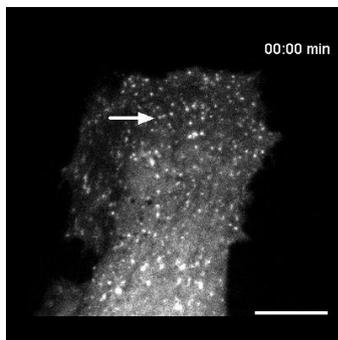
Tabelle 1.1	Pathogenen Bakterien, die mit Endothelzellen interagieren*	13
Tabelle 4.1	Geräte.....	56
Tabelle 4.2	Technische Details des <i>Laser scanning</i> Mikroskops	57
Tabelle 4.3	Technische Details des <i>Spinning disc microscopes</i>	57
Tabelle 4.4	Technische Details des <i>structured illumination</i> Mikroskop (SIM)	58
Tabelle 4.5	Einwegartikel.....	58
Tabelle 4.6	Komplettsysteme.....	59
Tabelle 4.7	Enzyme.....	59
Tabelle 4.8	Wachstumsmedien für Bakterien.....	60
Tabelle 4.9	Wachstumsmedien und Zusätze für Zellkulturen	60
Tabelle 4.10	Antibiotikakonzentrationen zur Selektion.....	60
Tabelle 4.11	<i>E. coli</i> -Stämme.....	61
Tabelle 4.12	<i>Staphylococcus</i> -Stamm.....	61
Tabelle 4.13	Eukaryotische Zellen.....	61
Tabelle 4.14	siRNA Sequenzen.....	65
Tabelle 4.15	prokaryotische Plasmide	65
Tabelle 4.16	eukaryotische Plasmide	65
Tabelle 4.17	Primer	66
Tabelle 4.18	Primärantikörper	66
Tabelle 4.19	Sekundärantikörper.....	67
Tabelle 4.20	Software und Datenbanken.....	67
Tabelle 5.1:	Programm für die <i>5 Prime Extender</i> PCR.....	71
Tabelle 5.2:	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE	73

12 Anhänge auf elektronischem Datenträger



Video 1: Rekrutierung von GFP-Exo70 zum *phagocytic cup* und Phagosomen von Endothelzellen

GFP-Exo70 exprimierende HUVEC wurden mit Invasin-beschichteten Kügelchen inkubiert und die Aufnahme der Kügelchen wurde mittels *spinning disc* Mikroskopie analysiert. Für jeden Zeitpunkt wurden 10 z-Ebenen mit 1 μm Abstand aufgenommen. Alle 30 s wurde ein Zeitpunkt aufgenommen und als maximale Projektion mit 3 Bildern pro Sekunde wiedergegeben. Maßstab: 5 μm . Der weiße Pfeil erscheint zu Beginn jeder GFP-Exo70 Akkumulationsphase.



Video 2: *Fusion* und *fission* von YFP-Sec10 Vesikeln an endothelialen Phagosomen

YFP-Sec10 exprimierende HUVEC wurden mit FnBPA-*S. carnosus* infiziert und die Rekrutierung von vesikulären Strukturen zu den Bakterien wurde mittels *spinning disc* Mikroskopie analysiert. Für jeden Zeitpunkt wurden 4 z-Ebenen mit 0,5 μm Abstand aufgenommen. Alle 30 s wurde ein Zeitpunkt aufgenommen und als maximale Projektion mit 4 Bildern pro Sekunde wiedergegeben. Maßstab: 10 μm . Der weiße Pfeil visualisiert die dynamische Rekrutierung von YFP-Sec10 zu den bakteriellen Phagosomen.

13 Veröffentlichungen

Publikationen:

Rauch, L., Hennings, K., Aepfelbacher, M. (2014), A Role for Exocyst in Maturation and Bactericidal Function of Staphylococci-Containing Endothelial Cell Phagosomes. *Traffic*, Volume 15, Issue 10, Pages 1083-1098

Vorträge mit Teilen des Inhalts dieser Arbeit:

Rauch, L.; Aepfelbacher, M. (April 2014) A role for Exocyst complex in Maturation and Bactericidal Function of Endothelial Cell Phagosomes, 2nd UKE Light Microscopy Symposium, Hamburg, Deutschland

Poster mit Teilen des Inhalts dieser Arbeit:

- 1) Rauch, L, Röder, A., Aepfelbacher M. (November 2011) Role of Cdc42GAP-RhoGTPase-Exocyst in *S. aureus* Invasion and Phagosome Maturation, GRK-1459 Begutachtung, Hamburg, Deutschland
- 2) Rauch, L; Aepfelbacher, M. (September 2012) A role for exocyst complex in *S. aureus*-phagosome maturation in endothelial cells, 64. Jahrestagung des Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Hamburg, Deutschland
- 3) Rauch, L; Aepfelbacher, M. (September 2012) A role for exocyst complex in *S. aureus*-phagosome maturation in endothelial cells, 1st International Symposium on Protein Trafficking in Health and Disease, Hamburg, Deutschland
- 4) Rauch, L; Aepfelbacher, M. (Februar 2013) A role for exocyst complex in *S. aureus*-phagosome maturation in endothelial cells, 1st UKE Light Microscopy Symposium, Hamburg, Deutschland
- 5) Rauch, L; Egg, K., Aepfelbacher, M. (April 2013) A role for exocyst complex in *S. aureus*-phagosome maturation in endothelial cells, SFB Symposium Sorting and Signaling, Freiburg, Deutschland
- 6) Rauch, L; Egg, K., Aepfelbacher, M. (März 2014) A role for Exocyst complex in Maturation and Bactericidal Function of Endothelial Cell Phagosomes, EMBO Workshop Signaling to and from Endomembranes, Konstanz, Deutschland

14 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die in irgendeiner Weise zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen und mich während meiner Promotion unterstützt haben:

Beginnen möchte ich mit Prof. Dr. Martin Aepfelbacher, der mir dieses interessante Thema zur Verfügung gestellt hat. Sie waren mein wissenschaftlicher Mentor und Begleiter und haben durch ihre stetige Unterstützung sowie die ständigen konstruktiven Diskussionen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Streit danke ich für die freundliche Übernahme der Begutachtung dieser Dissertation am Fachbereich Biologie.

Prof. Dr. Julia Kehr danke ich für die Bereitschaft den Vorsitz meiner Disputation zu übernehmen.

Ich danke allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern/innen des Instituts für Medizinische Mikrobiologie für die herzliche Aufnahme als Neu-Hamburgerin sowie die tolle Zeit im und außerhalb des Labors. Besonders danken möchte ich dabei: dem logistischen Team der Nabelschnur-Crew Kerstin R. und Kirsten, Andreas und Kerstin L. für die „Mauer der Liebe“, die immerwährende Inspiration von Flechtfrisuren durch Franziska, meiner Festival-Zelt-Partnerin Theresa, Claudia für ihren fränkischen Frohmut, Manuel für jeden ärztlichen Rat, Blot-Marie für ihre bewundernswerte Geduld, Stefan der „diebischen Elster“, „super-clean-Puffer-Herstellerin“ Laura sowie allen Mitgliedern des Fussibakterium Bolzerie. Ich danke euch für die tolle Arbeitsatmosphäre und die stetige Diskussionsbereitschaft – durch euch habe ich mich unglaublich wohl gefühlt.

Ganz besonders möchte ich mich bei Kirsten bedanken – du warst nicht nur eine Kollegin, sondern bist eine Freundin geworden, die mich durch all' die Höhen und Tiefen des Laboralltags sowie im Privatleben begleitet hat.

Prof. Stefan Linder danke ich für seinen unerschütterlichen Optimismus, die aufbauenden Worte und stets erheiternden Begegnungen auf dem Flur.

Bernd Zobiak und Antonio Virgilio Failla danke ich für die fantastische Unterstützung im Umgang mit den Mikroskopen. Im Besonderen Bernd, der sich um jedes noch so kleine Problem gekümmert hat.

Danken möchte ich dem Graduiertenkolleg 1459 für die finanzielle Unterstützung sowie allen Kommilitonen des GRKs für den ständigen wissenschaftlichen Austausch und die lustigen Retreats, die auch schon mal bei winterlichen Temperaturen in der Nordsee endeten. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch für den Forschungsaufenthalt im Labor von

Prof. Derek Toomre in New Haven bedanken. Vielen Dank an Felix für Rat und Tat. Großer Dank geht vor allem an Ira, die meine Zeit in den USA zu etwas ganz Besonderem gemacht hat.

Ich danke Saskia, die mich mit ihrer zurückhaltenden aber äußerst herzlichen Hanseaten-Mentalität in Hamburg aufgenommen hat. Danke, dass ich bei unzähligen Unternehmungen und einem Bierchen entspannen durfte und dass du auch in schwierigen Phasen immer für mich da warst.

Ich danke meiner Familie von ganzem Herzen für ihre Unterstützung und Zuwendung, durch die sie mir diesen Weg ermöglicht und ständig an mich geglaubt haben.

Zum Schluss geht der größte Dank an Markus. Danke für die unglaubliche Unterstützung und ständige Motivation, für die lehrenden und lobenden Worte und die aufopferungsvolle Geduld. Danke, dass du mein Leben mit all' den schönen Dingen bereichert hast und dass du immer für mich bist - ohne dich wäre ich nicht so weit gekommen.

15 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, März 2015

Liane Rauch